

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Dirección General de Investigación
Coordinación General de Programas

PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACION

CIENCIAS BÁSICAS

PROYECTO
DISEÑO *IN SILICO*, DE UNA SECUENCIA PEPTÍDICA COMO
POTENCIAL INMUNÓGENO EN FUNCIÓN DEL RECEPTOR TIPO
TOLL 8 DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS Y DE LA
GLICOPROTEÍNA 120 DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA
HUMANA TIPO 1.

INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

Equipo de Investigación

Coordinador

Dr. Oscar Manuel Cóbar Pinto

Investigadores

Lic. Rodrigo José Vargas Rosales

Licda. Keila Mariana Guerrero Gutiérrez

Licda. Silvia Lucrecia Oliva Flores

Investigadores Asociados

Licda. Dayrin Tatiana Ortiz López

Lic. Juan Francisco Carrascoza Mayén

Guatemala, Noviembre de 2011



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Dirección General de Investigación
Coordinación General de Programas

PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACION
CIENCIAS BÁSICAS

INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN 2011

DISEÑO *IN SILICO* DE UNA SECUENCIA PEPTÍDICA COMO POTENCIAL INMUNÓGENO EN FUNCIÓN DEL RECEPTOR TIPO TOLL 8 DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS Y DE LA GLICOPROTEÍNA 120 DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1

Equipo de Investigación

Coordinador

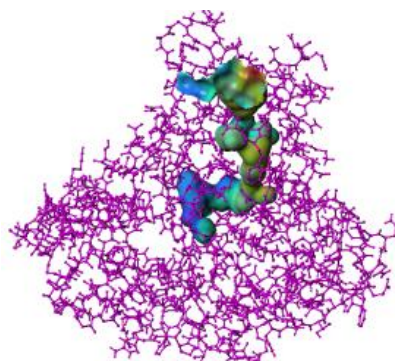
Dr. Oscar Manuel Cóbar Pinto

Investigadores

Lic. Rodrigo José Vargas Rosales
Licda. Keila Mariana Guerrero Gutiérrez
Licda. Silvia Lucrecia Oliva Flores

Investigadores Asociados

Licda. Dayrin Tatiana Ortiz López
Lic. Juan Francisco Carrascoza Mayén



Fecha: 30 de Noviembre de 2011

Instituciones participantes y co-financiantes:

Dirección General de Investigación/Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia/Universidad de San Carlos de
Guatemala
Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas

Guatemala, noviembre de 2011

INDICE GENERAL

1 Resumen.....	1
2 Introducción.....	3
3 Antecedentes	4
4 Justificación.....	9
5 Objetivos	11
6 Metodología	12
7 Resultados	16
8 Discusión de Resultados.....	38
9 Conclusiones.....	54
10 Recomendaciones.....	56
11 Bibliografía	57
12 Anexos	64

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Modelo de TLR-8 _____	16
Gráfica 2 Acercamiento de la estructura interna modelada para TLR-8. _____	17
Gráfica 3 Mapeo de Ramachandran para TLR-8-ver-final _____	17
Gráfica 4 Propiedades Bioquímicas de TLR-8 _____	18
Gráfica 5 Estructura Electroestática de CL075 _____	19
Gráfica 6 Estructura Farmacofórica de CL075 _____	20
Gráfica 7 Estructura Farmacofórica de CL075 (2) _____	20
Gráfica 8 Docking TLR8-SEQ1 _____	21
Gráfica 9 Docking TLR8- CL075 – 3 primeras posiciones óptimas. _____	21
Gráfica 10 Docking TLR8-CL075 – Mejor interacción encontrada (1era posición)_	21
Gráfica 11 Docking TLR8-CL075 – Interacciones de Campos electrostáticos. ____	22
Gráfica 12 Interacción de Serina de GAG VIH-1, en HLA-DR1 _____	25
Gráfica 13 Análisis Bioquímico de gp120 de VIH-1 _____	28
Gráfica 14 Presencia de grupos Manosa en gp120 de VIH-1: Los grupos se encuentran señalados en color rojo. _____	30
Gráfica 15 Estructuras de grupos manosa presentes en gp120. _____	30
Gráfica 16 Man 9 Potencial Lipofílico _____	31
Gráfica 17 Man 9 Potencial Electroestático _____	32
Gráfica 18 Man9 Puentes de Hidrógeno _____	32
Gráfica 19 Man9 Densidad Total de Hidrógeno Dadores y Aceptores _____	32
Gráfica 20 Man9 Densidad de Hidrógenos DAdores _____	33
Gráfica 21 Man9 Densidad de Hidrógenos Aceptores _____	33
Gráfica 22 Estructura De Man1_Man2 _____	33
Gráfica 23 Potencial Lipofílico De Man1_Man2 _____	34
Gráfica 24 Potencial Electroestático De Man1_Man2 _____	34
Gráfica 25 Formadores de puentes de Hidrógeno De Man1_Man2 _____	34
Gráfica 26 Densidad total d Hidrógenos Aceptores y Dadores De Man1_Man2 ____	35
Gráfica 27 Densidad de Hidrógenos Aceptores De Man1_Man2 _____	35
Gráfica 28 Densidad de Hidrógenos Dadores De Man1_Man2 _____	35
Gráfica 29 Cargas Electroestáticas de Poison-Bolzman De Man1_Man2 _____	36
Gráfica 30 Enlaces Teóricos y Experimentales de Manosas a Langerina. _____	36
Gráfica 31 CL075, estructura química. _____	43
Gráfica 32 Formación de puentes de hidrógeno entre GAG de VIH-1 y HLA-DR1. 47	
Gráfica 33 Superposición de Secuencias durante el Diseño de SEQ 3, V3-GAG de VIH-1. _____	47
Gráfica 34 V3-M03 en complejo con DR1. _____	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Constantes y Evaluaciones Farmacofóricas de SEQ1 (CL075): _____	19
Tabla 2 Análisis de Evaluaciones a las mejores conformaciones del docking TLR8-CL075 _____	22
Tabla 3 Análisis químico de 20 conformeros de CL075 en enlace con TLR-8 _____	23
Tabla 4 Evaluación total de los conformeros de CL075 en TLR-8 –todos los parámetros- _____	24
Tabla 5 Punteo Total del Docking Péptido-Enzima _____	26
Tabla 6 Punteo de las Colisiones del Docking entre el Péptido-Enzima _____	26
Tabla 7 Evaluación del Punteo D para el Docking entre Péptido-Enzima _____	27
Tabla 8 Evaluación del Punteo G para el Docking entre Péptido-Enzima _____	27
Tabla 9 Evaluación del Punteo Global para el Docking entre Péptido-Enzima _____	28
Tabla 10 Modelaje PM3 para Man9GlcNAc2 _____	31
Tabla 11 Descripción farmacofórica de SEQ 2 (Mamosas) _____	31
Tabla 12 Evaluaciones del Docking Manosas-Langerina. _____	36
Tabla 13 Evaluaciones físico-químicas del docking Manosa-Langerina. _____	37
Tabla 14 Evaluaciones totales del docking Manosa-Langerina. _____	37

1. RESUMEN

Recientemente se ha descubierto que las células dendríticas tipo Langerhans son hábiles en el manejo del Virus de Inmunodeficiencia Humana, debido a que su receptor Langerina se enlaza a los residuos tipo manosa presentes en la proteína de envoltura externa gp120 presente en el VIH-1, a diferencia de sus homólogas células detriticas, las cuales tras producirse el vínculo célula dendrítica-VIH, pueden ser infectadas. Este hallazgo ha liderado una serie de investigaciones basadas en el comportamiento de las células dendríticas y sus diferencias.

Adicionalmente, se ha encontrado que el receptor tipo Toll 8 puede potenciar el estímulo de la respuesta inmune. Otros estudios han determinado que una secuencia peptídica sola no puede producir por sí misma una respuesta inmune eficaz. Particularmente en infecciones virales, TLR-8 parece tener una actividad importante a través de una serie de reacciones bioquímicas que siguen la señalización de cascada correspondiente a la liberación de interferón alfa e interleucinas.

En este trabajo se propone el diseño *in silico* de un nuevo péptido antigénico basado en el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), con el propósito de que sea capaz de estimular al receptor MHC clase II DR1 en las células dendríticas tipo Langerhans.

Además se ha investigado la estructura teórica del receptor tipo Toll 8 (TLR-8) para el cual se ha propuesto una probable estructura tridimensional basada en la similitud de su secuencia con otras secuencias de conocida estructura terciaria.

Para estimular las células tipo Langerhans, dos moléculas han sido *diseñadas in silico* en base a los sitios activos de los receptores tipo Langerina y HLA-DR1 presentes en las células de Langerhans, y se ha determinado que una familia de ligandos utilizados previamente como estimulante de TLR-8, basados en secuencias uracilo o sus análogos artificiales, son eficaces en la potenciación de una respuesta inmune, especialmente en casos de infección viral.

Esta investigación únicamente se centra en el diseño *in silico* y en el modelaje molecular asistido computacionalmente. Se prevé que los resultados obtenidos en esta investigación puedan contribuir al desarrollo de nuevas vacunas contra el VIH-1, como parte de una generación de tratamientos basados en el diseño *in silico* que hace uso de tecnologías de vanguardia como el modelaje molecular y la bioinformática.

Palabras claves: Antígeno, VIH, Anticuerpo, inmune, bioinformática, modelaje molecular, TLR8, Langerhans Langerina, manosa, receptor, modelaje molecular.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo, ha sido posible gracias al apoyo financiero de la Dirección General de Investigación DIGI y co-financiamiento de la Facultad de ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

2. INTRODUCCIÓN

18,873 personas son portadoras de VIH en Guatemala según el estudio presentado por el Programa Nacional VIH y Sida, del Ministerio de Salud Pública en mayo de 2007. (García, 2007) Tan solo en 2006 se estimó un gasto total de 21.2 millones de Dólares Americanos, según el último reporte hasta la fecha UNGASS 2007, (Galindo, 2007) que cubría al total población en ese momento.

Esta investigación está enfocada desde tres puntos de vista: el informático, que busca el diseño molecular a través de modelaje computarizado del antígeno y la determinación de propiedades farmacofóricas de los sitios receptores en donde por medio de nanotecnología computacional y utilizando los clúster de alto procesamiento, se modeló una macromolécula de la cual se obtuvieron propiedades físico-químicas y que se pretende servirá como antígeno.

En el punto de vista bioinformático, se analizaron bases de datos de secuencias peptídicas de interés, su porcentaje de identidad y otra información de interés fármaco-biológico.

En el enfoque químico se han estudiado las interacciones cercanas moleculares ligando-proteína, determinando los grupos químicos relevantes que originan propiedades farmacofóricas y su mecanismo químico de reacción proteína-ligando o bien proteína-proteína.

Adicionalmente, la investigación se complementa con un enfoque biológico genético-fenotípico, puesto que es importante analizar las potenciales mutaciones que presentan resistencia ante fármacos en gp120 de VIH-1. Para lo anterior, se utilizaron nuevamente programas de software bioinformático que facilitó en gran medida la determinación de mutaciones de importancia farmacofórica y biológica, incorporando principios de la mimética de péptidos como fundamento para crear nuevos péptidos que puedan generar respuestas inmunes.

En el aspecto inmunológico, se investigó la forma de estimular una respuesta inmune controlada mediante la incorporación de antígenos de diseño que tienen por objetivo reaccionar directamente en los Receptores tipo Toll de las Células Dendríticas para crear respuestas inmunes tipo CD2, que se espera desencadenen la maduración de Linfocitos Th2 y Células B con ImM específicas para la neutralización del antígeno, el cual a su vez pretenderá mimetizar la estructura conformacional de gp120 presente en VIH-1.

3. ANTECEDENTES

Bases Biológicas de La Respuesta Inmune a las Vacunas.

Las primeras vacunas desarrolladas en el siglo XX estuvieron orientadas a estimular las células T, hasta que al final del siglo y en la actualidad, se ha descubierto el importante rol que desempeñan en la inmunidad las células presentadoras de antígeno, en especial las células dendríticas, las cuales orquestan en un principio la respuesta inmune, mientras que las células T la manejan (Bot, 2004; Ken, 2006).

Puesto que las células T no pueden percibir directamente un antígeno y se hace necesaria la célula dendrítica para procesar el epítipo a atacar y posteriormente presentar este antígeno como un producto de las moléculas del MHC a los timocitos, lo cual crea una respuesta inmune específica, es necesario contemplar entonces el proceso bioquímico que esta transformación conlleva y por tanto, las nuevas tecnologías en el desarrollo de vacunas han estado encaminadas hacia las células presentadoras de antígeno (Bot, 2004; Sille, 2005).

El reconocimiento de un antígeno por una célula presentadora de antígeno se lleva a cabo a través de PAMPs (Patrones Moleculares del Patógeno Asociado), los cuales interactúan con los Receptores tipo Toll (TLR) que se encuentran en las células presentadoras de antígeno (CPAs) (Sille, 2005; Akira, 2006; Goreden, 2005). Los PAMPs pueden ser enlazados entonces a diferentes tipos de TLR como:

PAMP	Receptor
Peptidoglicanos	TLR4 CD14,
Lipopolisacáridos	TLR2 y NOD2
Flagelinas	TLR5 TLR3
Cadenas de ADN dobles	TLR 7 y 8
guanosin submetilados y cadenas de ARN simples	CpG TLR9
oligodeoxinucleóticos contenedores de citosinas	

(Kopp, 2003; Wang, 2005), los cuales son los TLR portados en general por las CPAs (Ken S et al. 2006).

Las células dendríticas Mieloides son las principales presentadoras de antígeno. El receptor que activa una respuesta viral en estas es el TLR-8. Según el trabajo de Schlaepfer y Speck en 2008, se demuestra la diferencia entre la activación en células dendríticas mieloides y plasmocitoides, donde las células dendríticas mieloides expresan el TLR-8 preferentemente, mientras que las plasmocitoides expresan TLR-7. Ambas activan la respuesta inmunológica específica en células TCD8+, sin embargo TLR-7 demostró activar con más eficiencia la replicación en células linfoides de origen amigdalario, mientras que TLR-8 activó preferentemente las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) (Schlaepfer E. 2008).

Desarrollo de la Respuesta Inmune Específica.

En enlace de un antígeno a un Receptor Tipo Toll de una célula presentadora de antígeno genera la liberación de una serie de citosinas como IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF), estas inducen al núcleo de la célula a la transcripción de genes determinados. Las células dendríticas y otras semejantes como los macrófagos fagocitan el antígeno, degradándolo en su interior en secuencias más simples que luego son ensambladas en el retículo endoplásmico a los productos genéticos del MHC. Las secuencias peptídicas obtenidas de este proceso son expresadas en la membrana celular presentadora de antígeno y estimulan la maduración de las células dendríticas a CD1 o CD2 las cuales causan el desarrollo de una respuesta inmune Th1 o Th2 (Lesley-Jane, 1997).

Este proceso se debe a que las células T no pueden tener contacto directo con los antígenos en estado natural, en vez de eso reciben contacto con los receptores madurados en las células presentadoras de antígeno, que como se explicó, están compuestos de una región MHC clase I o II y una región variable compuesta por epítomos extraídos del antígeno ingerido por la célula presentadora de antígeno (Lesley-Jane, 1997).

Si dentro de las células T dentro del timo se encuentran células T que son capaces de reconocer estos receptores, entonces estas se dividen para dar paso a nuevas células T que expresarán exactamente el mismo anticuerpo que reconoció la célula T madre en su membrana de superficie.

Sin embargo, puede ocurrir una mutación posterior de esta célula T en su descendencia, dando lugar a células T que producen anticuerpos de mayor especificidad. Todas las células T que no logran enlazarse a algún receptor antigénico, mueren en el transcurso de 4-5 días, mientras que las células T que logran enlazarse con éxito, pasan a formar parte de las células de memoria, cuyo decaimiento puede durar semanas y hasta meses en presencia consecutiva del mismo antígeno.

El desarrollo de células B es semejante, debido a que estas si pueden enlazarse directamente al antígeno sin necesidad de una célula presentadora de antígeno, sin embargo, requieren de otras citosinas para desarrollarse. Las células B también pueden desarrollarse en células B de memoria y células B periféricas (Lesley-Jane, 1997).

Antígenos de Diseño.

Las relaciones Anticuerpo-Antígeno se basan en la estructura peptídica tridimensional que comprende la serie de grupos químicos funcionales que comprenden estos. Entender las reglas de las interacciones químicas entre paratopo¹ del anticuerpo y epítopo² de un antígeno determinado es útil para el diseño de vacunas. Los métodos asistidos por computadora ayudan a modelar *in silico*, las estructuras peptídicas del complejo paratopo-epítopo para simplificar el análisis estructural tridimensional del sitio de reacción (Edwards, 2000; He X, 2006).

¹ Paratopo: La parte del anticuerpo que reconoce el epítopo es llamada paratopo.

² Epítopo: Es la parte del antígeno que es reconocida por el sistema inmune.

La identificación de la estructura tridimensional del epítopo es la clave para desarrollar posteriormente posibles soluciones de parátomos afines que serán los anticuerpos. La estructura tridimensional de epítomos ha sido elucidada por varias técnicas, la más moderna es la cristalografía de rayos X. Otros métodos han sido utilizados con anterioridad para determinar la estructura de epítomos, como la mutagénesis dirigida sobre el sitio activo del antígeno (Carter, 1986; Szklarz, 1997), o bien la síntesis peptídica paralela (Frank, 2002; Reineke, 1999) que se basa en la síntesis de péptidos de traslape que cubren la secuencia antigénica por completo. En esta investigación se utilizan los resultados obtenidos por otros investigadores mediante cristalografía de rayos X, debido a que es una técnica más rápida, altamente precisa y además se cuenta con el software y el equipo, lo que la hace más económica. Adicionalmente las técnicas bioinformáticas sobre la localización de epítomos en base a estructuras elucidadas por rayos X han sido ampliamente desarrolladas (Halperin, 2003; Moreau, 2006).

Los estudios hechos por Geysen y colaboradores en 1984 (Geysen HM et al. 1985) sobre fiebre aftosa, en los que crea tres péptidos sintéticos que mimetizan epítomos presentes en el virus de esta enfermedad, dan cuenta de obtener como resultado anticuerpos con estructuras lógicas bien definidas en función de los antígenos incorporados. Demostraron también que el número de respuestas antigénicas para un determinado antígeno es bastante limitado, haciendo la observación de que en este caso, únicamente 2 de los 3 antígenos diseñados e incorporados estimularon una respuesta inmune.

Se hace énfasis en el trabajo de Geysen, Meloen y Bertelin de 1984 fundado en los trabajos de Green y colaboradores de 1982 y Bittle y colaboradores de 1982 (Green, 1982; Gittle, 1982; Geysen, 1984), quienes destacan el uso de matrices activadas para la síntesis peptídica en columna cromatográfica. Dichos trabajos que datan de hace casi 30 años fundamentan la síntesis peptídica por métodos de síntesis química orgánica tradicional que prescinde de tecnologías costosas. De hecho en la actualidad se cuentan con matrices poliméricas activadas de costos menores y eficiencias elevadas como la síntesis peptídica de fase sólida (He X, 2006), que se basa en el uso de derivados aminoacídicos 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc) y que cuenta con numerosas empresas que distribuyen los reactivos a nivel mundial.

El trabajo de Kolaster en 1990, demuestra que la base del diseño de péptidos asistidos computacionalmente se encuentra en las características fisicoquímicas de la proteína a neutralizar, como hidrofobicidad, flexibilidad, accesibilidad y estructura secundaria, las cuales han sido estudiadas por más de 25 años (Kolaskar AS, 1990).

Las más innovadoras técnicas en la búsqueda de epítomos funcionales incluyen el uso de análisis computacional tridimensional, como el desarrollado por Huang en 2008 en el que se desarrolla un innovador algoritmo computacional para el análisis de estructuras 3D en epítomos de células B con el fin de mimetizar el sitio activo.

Vacunas contra VIH-1 basadas en células T.

Existen fuertes motivos para contemplar la respuesta inmune en células T como la base fundamental para crear una respuesta inmune eficiente en contra de VIH-1, estos motivos son (Bette T et al. 2009):

1- Las mutaciones encontradas en VIH responden a un escape biológico al desarrollo de linfocitos T citotóxicos. (Bhattacharya, 2007; Brumme, 2007; Rousseau, 2008).

2- La respuesta inmune de células TCD8+ está directamente relacionada con la decaída de la carga viral.

3- Los productos HLA del genoma HLA B*5701 y un sitio cercano al gen HLA C (Almeida, 2007), son frecuentemente encontrados en la respuesta inmune del huésped y están relacionados con la producción de células T.

4- Las células T CD8+ responden a epítomos HIV específicos que pueden ser asociados con buenas salidas observadas para gente infectada de VIH, HLA B*5701-positiva (Altfeld, 2003; Kaslow, 1996) y HLA B*2701-positiva (Kaslow, 1996; Almeida, 2007).

Otro motivo para enfocarse en vacunas basadas en la respuesta inmune de células T es que estudios en primates revelan que la respuesta inmune puede reactivarse en animales que ya son portadores del virus.

Vacunas contra VIH-1 basadas en gp120.

La glicoproteína gp120 pertenece a la cubierta de VIH, es la primera glicoproteína en tener contacto con los linfocitos TCD4 y ésta pertenece al segmento V3 que también está compuesto por gp41.

Debido a que gp120 y gp41 se encuentran unidas y son las responsables de la primera interacción virus-célula, ambas se han perfilado muchas veces como candidatos favoritos para el diseño de drogas y vacunas de inhibición del contacto virus-célula. De hecho una gran cantidad de anticuerpos encontrados en el suero de individuos infectados pueden neutralizar el segmento V3 de VIH, cuyo epítopo es el principal dominio neutralizante de las cepas de VIH de línea adaptada a células T (Javaherian, 1989). Sin embargo, probablemente el motivo del fracaso de estos anticuerpos es la alta mutabilidad que gp120 presenta, y además el hecho de que la conformación terciaria de gp120 oculta (por su conformación terciaria) los epítomos principales de neutralización (Rsche, 1988; Kausik, 2006).

La estructura bioquímica de la secuencia V3 de gp120 de VIH-1 ha sido blanco de numerosos intentos de mimetizar con el fin de crear inmunógenos eficientes (Aguilar, 2001; Tolman 1993; Conley, 1994; Richalet, 1994). Sin embargo hasta este momento aún no ha quedado clara cuál es la verdadera estructura tridimensional de la región V3 entre otros motivos, por su alta tasa de mutación.

Los esfuerzos para elucidar la conformación estructural correcta de V3 en gp120 han sido encaminados por dos métodos (Kausik et al. 2006). El primero, consistente en determinar la estructura bioquímica de V3 por medio de enmascaramiento

antigénico de otras regiones inmunodominantes de gp120 (Pantophlet, 2003; Pantophlet R and Burton, 2003).

El segundo método es el diseño de una secuencia V3 que se enlace eficientemente a los anticuerpos desarrollados por la respuesta inmune, y que de hecho, tal resultado puede ser utilizado como un inmunógeno (Kausik et al. 2006). El segmento V3 de gp120 es muy variable pero dentro de su estructura existe una región en horquilla-Beta que se conserva (Stanfield et al. 2004).

La estructura de los inmunógenos orientados en esta región suelen ser pequeños, por lo cual se diseñan en forma de péptidos cíclicos unidos por puentes disulfuro, lo cual permite que la estructura del inmunógeno sea bien aceptada por las células dendríticas en orden de producir una respuesta inmune apropiada (Kausik, et al. 2006).

4. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala se están desarrollando fármacos por técnicas bioinformáticas, algo nunca antes trabajado en el país hasta 2009 (Carrascoza F, Cobar, 2010; Carrascoza F, Vargas 2010; Carrascoza F, 2009). Esto ha sido posible gracias a la fuerte inversión en software y hardware realizada por la Dirección General de Investigación y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología en conjunto con la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos.

Estos logros están produciendo una nueva generación de potenciales fármacos en contra del VIH y el la Enfermedad de Alzheimer diseñados *in silico*, lo cual ha abierto las puertas a pensar en un desarrollo integral en el diseño de fármacos más complejos como las vacunas.

El diseño de péptidos inmunógenos como vacunas, había estado restringido al país debido a las carencias tecnológicas que han existido hasta el momento. El diseño de una secuencia peptídica con actividad dirigida sobre un epítipo específico era algo sumamente difícil de obtener sin hacer pruebas de mutagénesis y secuenciación peptídica para la elucidación de sitios activos y posteriormente el diseño de un inmunógeno, haciéndose imposible si se le añaden los análisis de pruebas clínicas posteriores que son necesarios. El costo económico, tecnológico, de tiempo y conocimiento de todo esto es muy alto.

La bioinformática ha acercado la posibilidad de crear nuevos diseños de inmunógenos sin la necesidad de realizar previas la síntesis y ensayos clínicos al azar, necesarios para el diseño. Esta nueva técnica permite hacer una elucidación y diseño de inmunógenos de forma inteligente, de manera que en el momento de hacer una síntesis peptídica y una posterior prueba clínica, se obtienen una probabilidad de éxito del 80% o superior, debido que ahora es posible analizar directamente la interacción en el sitio activo de cualquier péptido que se pueda diseñar a través de programas computacionales como Autodock y SYBYL que permiten hacer esto reduciendo el costo a los recursos computacionales, con los cuales ahora ya se cuentan. Dado esto, la certeza de obtener secuencias peptídicas eficaces hace disminuir dramáticamente los costos de síntesis, pues ya no es necesario adquirir cantidades mayores de reactivos que serían utilizados en hacer pruebas sino que las cantidades son reducidas al igual que el tiempo a lo estrictamente necesario.

Aunque esta etapa de la investigación únicamente está enfocada al diseño de un inmunógeno eficaz contra el VIH-1, la síntesis química del inmunógeno diseñado como producto de esta investigación es factible, debido a que nuevas tecnologías en la síntesis de péptidos han sido desarrolladas, tecnologías que son suficientemente económicas para implementarse en el país.

18,873 personas son portadoras de VIH en Guatemala según el estudio presentado por el Programa Nacional VIH y Sida, del Ministerio de Salud Pública en mayo de 2007 (García, 2007).

Tan solo en 2006 se estimó un gasto promedio total de 21.2 millones de dólares Americanos en 2006, según el último reporte hasta la fecha UNGASS 2007 (Galindo, 2007), que cubría al total población en ese momento (posterior a 2007 no se han encontrado presupuestos) la cual tiene un costo anual que supera los 21 millones de Dólares Americanos.

Esta investigación trata el diseño de un inmunógeno en contra de VIH con énfasis en la genética de las cepas de VIH-1 que afectan a Latinoamérica y a Guatemala (B y F), ya que los tratamientos hasta ahora diseñados en Estados Unidos y otros países del primer mundo, tienen énfasis en las cepas de VIH-1 que afectan a los países de mayor desarrollo económico (A y E), por lo que es razonable pensar que los efectos de estos tratamientos no sean iguales en Latinoamérica.

5. OBJETIVOS

5.1 General.

Diseñar *in silico*, una secuencia peptídica como potencial inmunógeno en función del Receptor Tipo Toll-8 de las Células Dendríticas y de la glicoproteína 120 del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1.

5.2 Específicos.

5.2.1 Diseñar una secuencia peptídica con base en el Receptor Tipo Toll-8 presente en las Células Dendríticas y evaluar la fuerza de enlace químico TLR8-secuencia.

5.2.2 Diseño de una secuencia peptídica con base en gp120 región variable 3 de gp120 de VIH-1.

5.2.3 Analizar las interacciones entre las dos secuencias peptídicas diseñadas.

5.2.4 Unir ambas secuencias diseñadas y analizar las interacciones entre el Receptor Tipo Toll-8 y el inmunógeno compuesto.

5.3 Hipótesis

Es posible diseñar *in silico*, una secuencia peptídica como potencial inmunógeno en función del Receptor Tipo Toll-8 de las Células Dendríticas y de la glicoproteína 120 del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1.

6. METODOLOGÍA

Universo: VIH-1 y el sistema inmune humano.

Muestra: Epítomos en Receptores Tipo Toll-8 (TLR-8) y en la Secuencia Variable 3 de gp120 de VIH-1.

Instrumentos a Utilizar:

Software:

Linux Fedora 14

SYBYL de Tripos versión 10.2

Autodock 4.01/Autodock Tools

UCFS Chimera 1.2540

Gaussian '09 con Gauss View 5

Equipo:

8 Computadores 3.2 MHz AMD Phenom II x4 955

4 Gb de Memoria Ram/Computador

1 Gb de procesamiento gráfico/ Computador

1 Switch 1/10/100/1000 de capacidad de transferencia de datos.

Descripción de Técnicas Empleadas y Factores.

La elucidación de los epítomos de importancia en gp120 de VIH-1, el desarrollo de las secuencias peptídicas, así como el análisis de TLR-8, se realizaron por medio de programas computacionales que permiten un análisis exacto con archivos de tipo banco de dato proteico .pdb (*protein data bank*), que se recopilarán de la información brindada por autores de artículos que generan estos archivos virtuales tridimensionales en base a estudios cristalográficos de rayos X , que se encuentran almacenados en bases de datos como “The Research Collaboratory for Estructural Bioinformatics” (RCSB), que es un grupo respaldado por Rutgers University, el cual es el departamento RCSB-SDSC que está localizado en el Centro de Supercomputadoras de San Diego (SDCS), Estados Unidos; la “Skaggs School de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas” (SSPPS) de la Universidad de California, San Diego (UCSD), y el grupo RCSB-BMRB que está localizado en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Winsconsin-Madison. También se tomó en cuenta “The Word Wide Protein Data Bank” que es el centro de depósito mundial de proceso y distribución de datos .pdb, cuyo respaldo descansa en los grupos RCSB de Europa, Estados Unidos y Japón.

Los programas de estudio de estructuras biológicas macromoleculares que se utilizaron en este estudio como SYBYL, Autodock y Chimera, fueron seleccionados por su reconocimiento en la exactitud de la descripción atómica, la que se fundamenta en la interpretación de algoritmos matemáticos que describen los orbitales moleculares mediante una “malla electrónica virtual tridimensional”, permitiendo predecir los cambios energéticos en función de sus conformaciones probables entre el ligando y correceptor (Morris et al. 1998).

Parámetros a Utilizar en las Series de Evaluaciones en Autodock 4.01.

Número de corridas en Algoritmo Lamarkiano: 100

El algoritmo Lamarkiano es el modelo matemático utilizado por Autodock para calcular las fuerzas de las interacciones ligando-proteína en cada evaluación. Este es un algoritmo de mutación genética en donde se hace cambiar para cada individuo el “código genético molecular”, el cual está establecido por una secuencia numérica referente a los ángulos de enlaces que rotan y que componen la molécula, resultando en una serie de conformeros diferentes. Se realizaron 100 corridas.

Tamaño de la población: 150 individuos

Esto significa que de cada corrida realizada se seleccionaron automáticamente los 150 mejores enlaces ligando-proteína, basándose en la energía de enlace calculada por el Algoritmo genético.

Máximo Número de Evaluaciones: 2.5 millones

Este parámetro establece que dentro de cada corrida se harán 2.5 millones de enlaces proteína-ligando en diferentes posiciones y conformaciones.

Número Máximo de Generaciones: 27,000

Los 2.5 millones de evaluaciones se realizaron en 27 sets o generaciones debido a que las conformaciones que no alcanzan un nivel óptimo no pasan a ser base o plantilla de la siguiente generación.

Número máximo de individuos que sobreviven por cada corrida: 1

Número de generaciones de las cuales se escoge el peor individuo: 10

Cristalografía de Rayos X.

Esta técnica es la utilizada para la generación de los archivos .pdb. Consiste en realizar un escaneo de rayos X sobre un cristal purísimo de la molécula o proteína a analizar, la cual difracta los rayos X hacia un sensor, el cual determina según el ángulo de difracción, las posiciones atómicas exactas y mediante un algoritmo se determina las identidades más probables de dichos átomos. Estos datos son traducidos por software que interpreta los datos como resultados en una matriz virtual en tres dimensiones, de la cual se pueden guardar estos datos en archivos de extensión .pdb el cual es un lenguaje que identifica puntos de coordenadas cartesianas en los planos X, Y y Z para cada átomo, y que es actualmente el formato de modelaje molecular más extendido por su uso a nivel mundial.

Procedimiento.

En términos generales, el procedimiento de diseño de los elementos del complejo se ha dividido en cuatro secciones principales:

- Determinación de un estimulante del Receptor Tipo Toll-8 presente en las Células Dendríticas.
- Diseño de una secuencia peptídica con base en gp120 región variable 3 de gp120 de VIH-1.
- Análisis de interacciones entre péptido-enzima.
- Diseño de una estructura hábil de enlazarse al receptor manosa de la Langerina presente en las células de Langerhans.

Determinación de un estimulante del Receptor Tipo Toll-8 presente en las Células Dendríticas.

1. Fue necesario modelar una estructura tridimensional para TLR-8 debido a que la base de datos en el sitio *Protein Data Bank* no se encontró ninguna reportada. Para esto se utilizó el subprograma *Biopolymer* presente en SYBYL X y asistido con los sub módulos FUGUE y ORCHESTAR, con los cuales se ha construido una estructura tridimensional de TLR-8 en base a una secuencia presente en la base de datos NCBI.

2. En la construcción de la estructura terciaria, se han utilizado los algoritmos Homstrand, para determinar el esqueleto carbonado de la estructura, métodos semi-empíricos para modelar segmentos no coincidentes menores a 13 aminoácidos y métodos *ab initio* para casos de modelaje de algunas cadenas laterales.

3. Se creó un archivo .pdb de un TLR-8 representativo en base al análisis previamente realizado.

4. Se determinaron de las propiedades bioquímicas y farmacofóricas de TLR-8.

5. Se realizaron enlaces proteína-ligando (docking) a una serie de secuencias de uracilo y otros ligandos para TLR-8 que son buenos adyuvantes para estimular una respuesta inmune y que se ligan directamente a TLR-8.

6. La descripción farmacofórica de CL075, se realizó mediante el modelado computacional del ligando CL075 para obtener sus propiedades fisicoquímicas y bioquímicas.

7. Se determinó el sitio de enlace entre CL075 y TLR-8 utilizando Surflex Dock.

Diseño de una secuencia peptídica con base en gp120 región variable 3 de gp120 de VIH-1.

1. Análisis protéico por medio de base de datos de cepas B, C y F de VIH-1 gp120 y gp41 utilizando el programa computacional Chimera.

2. Se utilizó el programa UCSF Chimera para eliminar residuos de agua u otros átomos flotantes característicos de las proteínas gp120 obtenidas por cristalografía de rayos X.

3. Se analizaron los sitios activos de gp120, dentro de ellos, se estudió la variabilidad fenotípica en V3 para determinar su frecuencia de mutación y sus aminoácidos determinantes.
4. Se determinaron las propiedades bioquímicas y farmacofóricas de gp120.
5. Se determinaron puntos de enlace farmacofórico relevantes para el receptor DR1 de MHC II.
6. A continuación se utilizó SYBYL para diseñar secuencias aminoacídicas que mimetizan V3 y que pueden ser unidas a DR1.
7. Se comparó la secuencia obtenida, en su estructura con gp120.
8. Se analizaron 60 secuencias diferentes de segmentos V3 de VIH con un algoritmo creado en lenguaje de programación C para determinar cuáles de estas secuencias contenían puntos farmacofóricos importantes encontrados en el complejo gag-DR1 que fue utilizado como referencia.
9. Se realizó un muestreo conformacional (*conformational sampling*) al segmento V3 de gp120 en unión *in silico* con DR1. De la misma manera se hizo para los péptidos artificiales diseñados y también con una secuencia gag de VIH-1 que está reportada como capaz de formar complejo con DR1. Los datos de unión de enlace y las conformaciones preferidas se utilizaron como referencia para mejorar los péptidos diseñados.
10. Se compararon y analizaron los resultados de energía de enlace péptido-DR1, obtenidos por *Surflex-Dock* para los péptidos estudiados: V3, gag y un péptido mutante producto de diseño asistido computacionalmente.

Análisis de interacciones.

1. Se utilizó *Surflex-Dock* de SYBYL para crear un docking entre CL075 y la secuencia peptídica mimetizada con el objeto de evaluar si ambas secuencias pueden formar un complejo estable, lo cual es una interferencia. CL075 y el péptido diseñado no deben enlazarse de forma estable debido a que ambas secuencias estarán integradas en el complejo.

Diseño de una estructura hábil de enlazarse al receptor manosa de la Langerina presente en las células de Langerhans.

Se ha diseñado una estructura capaz de enlazarse al receptor manosa, que es el receptor Langerina presente en las células de Langerhans. Esto debido a que se eligió este tipo de célula para ser estimulada específicamente con el péptido inmunógeno debido a la habilidad de las CL para enlazarse a VIH-1 y procesarlo exitosamente.

De esta manera se aisló *in silico* una estructura manosa simple y una estructura manosa compleja para determinar afinidades de enlace.

7. RESULTADOS

La presentación de los resultados se ha dividido en 4 secciones:

7.1 Determinación de un estimulante del Receptor Tipo Toll-8 presente en las Células Dendríticas.

7.2 Diseño de una secuencia peptídica con base en gp120 región variable 3 de gp120 de VIH-1.

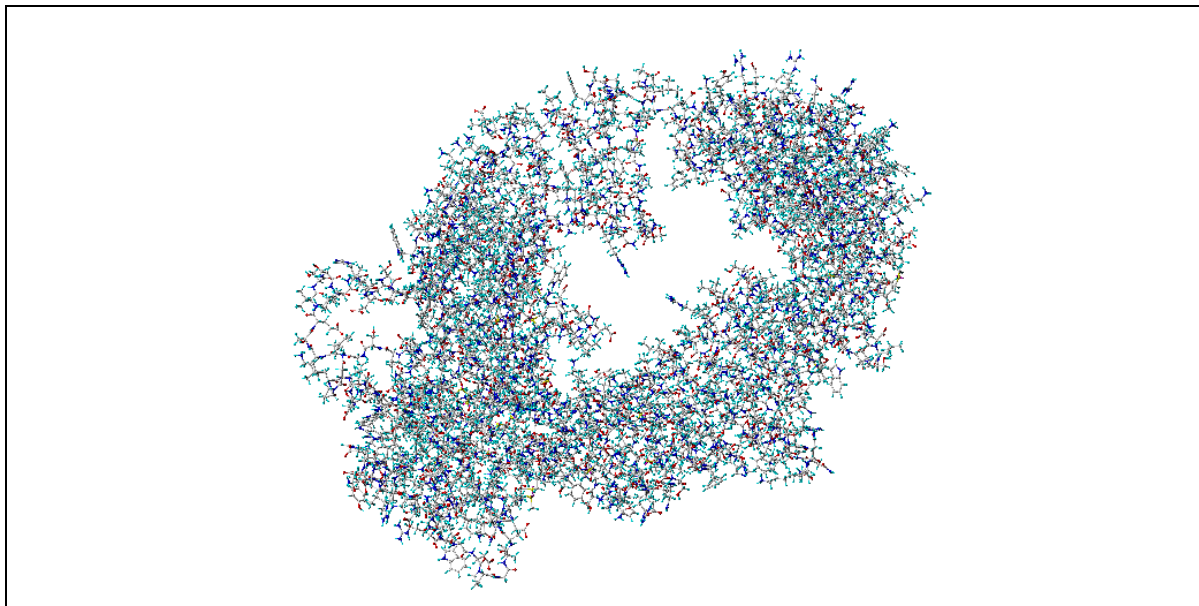
7.3 Análisis de interacciones entre péptido-enzima.

7.4 Diseño de una estructura hábil de enlazarse al receptor manosa de la Langerina presente en las células de Langerhans.

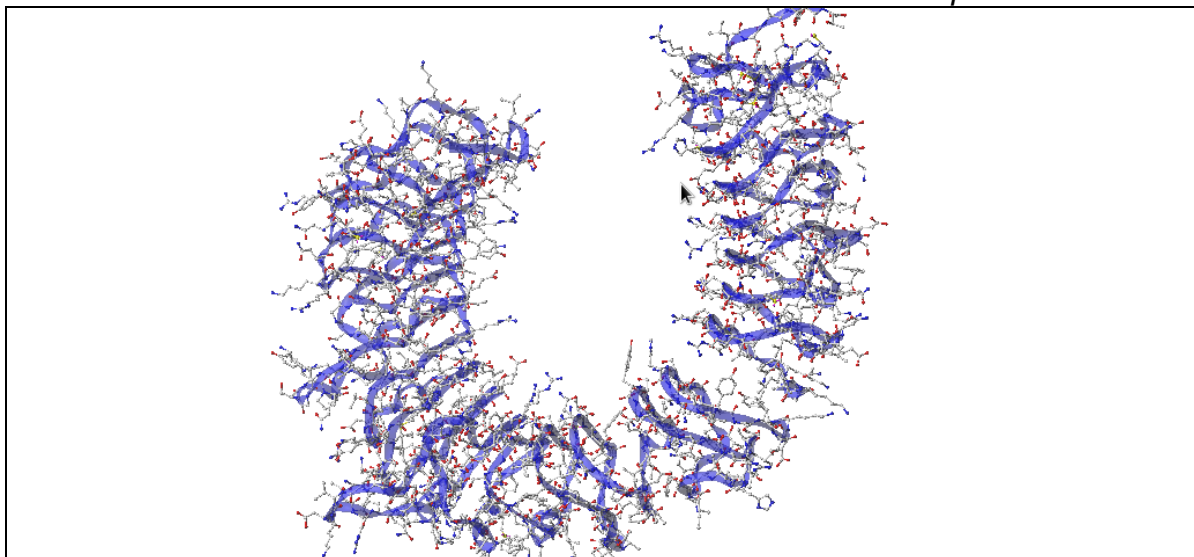
7.1. Determinación de un estimulante del Receptor Tipo Toll -8 presente en las Células Dendríticas.

Creación de un archivo .pdb de un TLR-8.

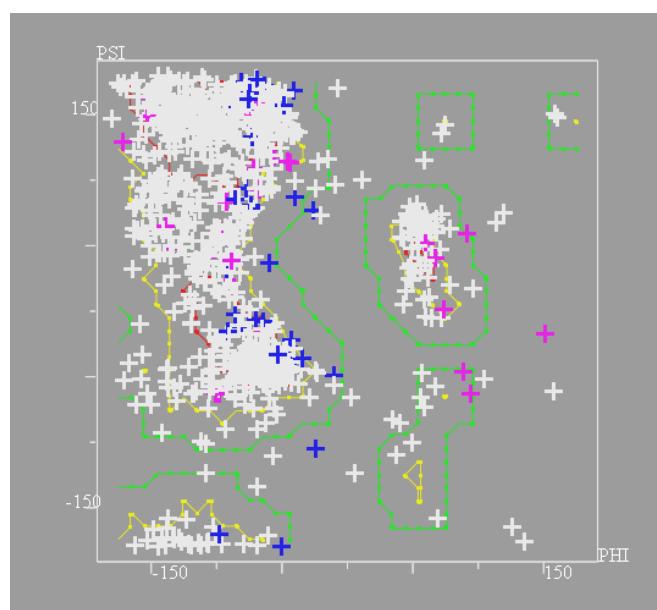
Gráfica 1 Modelo de TLR-8



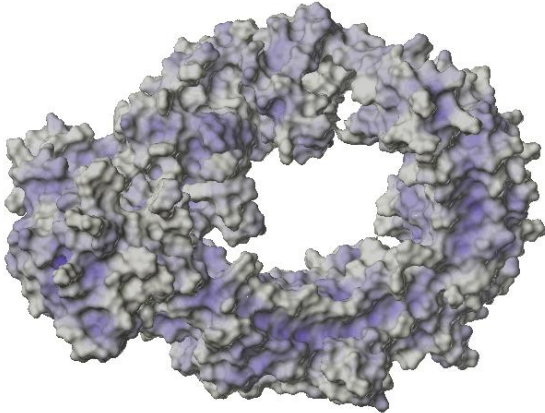
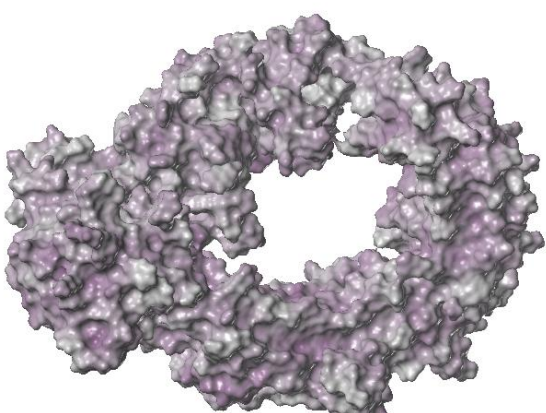
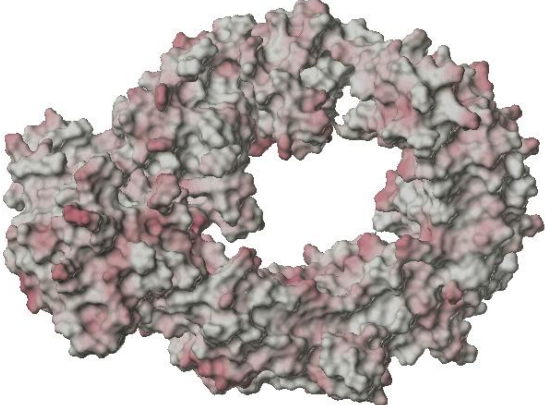
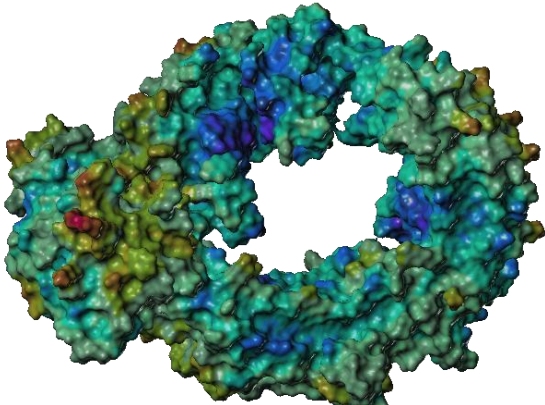
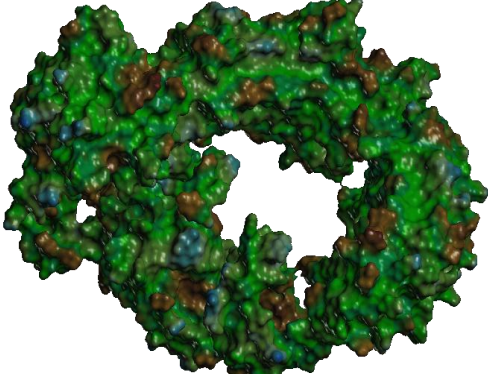
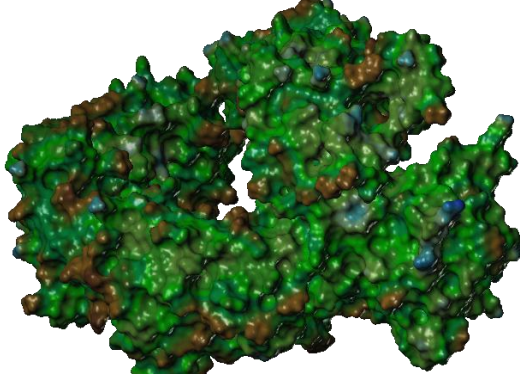
Gráfica 2 Acercamiento de la estructura interna modelada para TLR-8.



Gráfica 3 Mapeo de Ramachandran para TLR-8 versión final.



Gráfica 4 Propiedades Bioquímicas de TLR-8

Densidad de Hidrógenos Aceptores	Densidad Total de Hidrógenos dadores y Aceptores
	
Densidad de Hidrógenos Dadores	Potencial Eléctrico
	
Potencial Lipofílico	Potencial Lipofílico-2
	

Descripción Farmacofórica de SEQ1.

Tabla 1 Constantes y Evaluaciones Farmacofóricas de SEQ1 (CL075):

Compuesto	CLOGP	CMR	COMFA	ESTÉRICO	HIDROFÓBICO
CL075	3.8688	7.2116	102	9.9814	7.6569

Compuesto	ELECTROSTÁTICO	H DONADOR	H ACEPTOR	ESTÉRICO Y ELECTROSTÁTICO
CL075	0.7388	2.8119	3.9612	7.0965

CLOGP: Constante Logarítmica del Coeficiente de Partición Etanol-Agua.

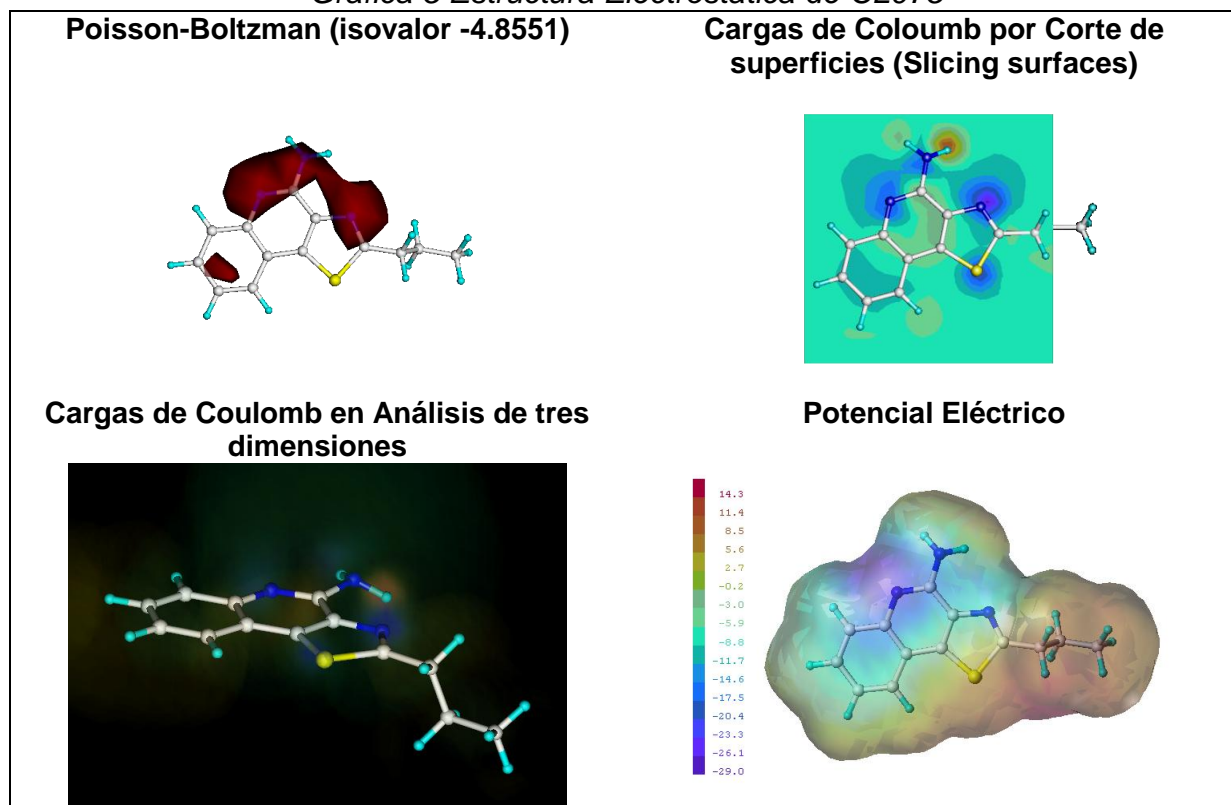
ESTÉRICO-HIDROFÓBICO: Evaluaciones asignadas por *Molecular Spread Sheet* de **Sybyl**®.

CMR: Constante de Refractividad Molar.

COMFA: Evaluación total de la combinación de factores farmacofóricos.

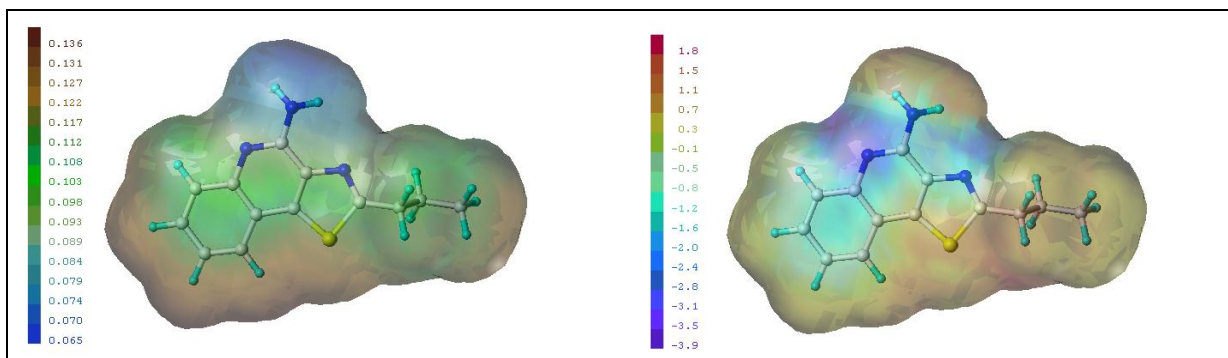
H Donador-Aceptor: Factor de Hidrógeno Dadores-Aceptores.

Gráfica 5 Estructura Electroestática de CL075

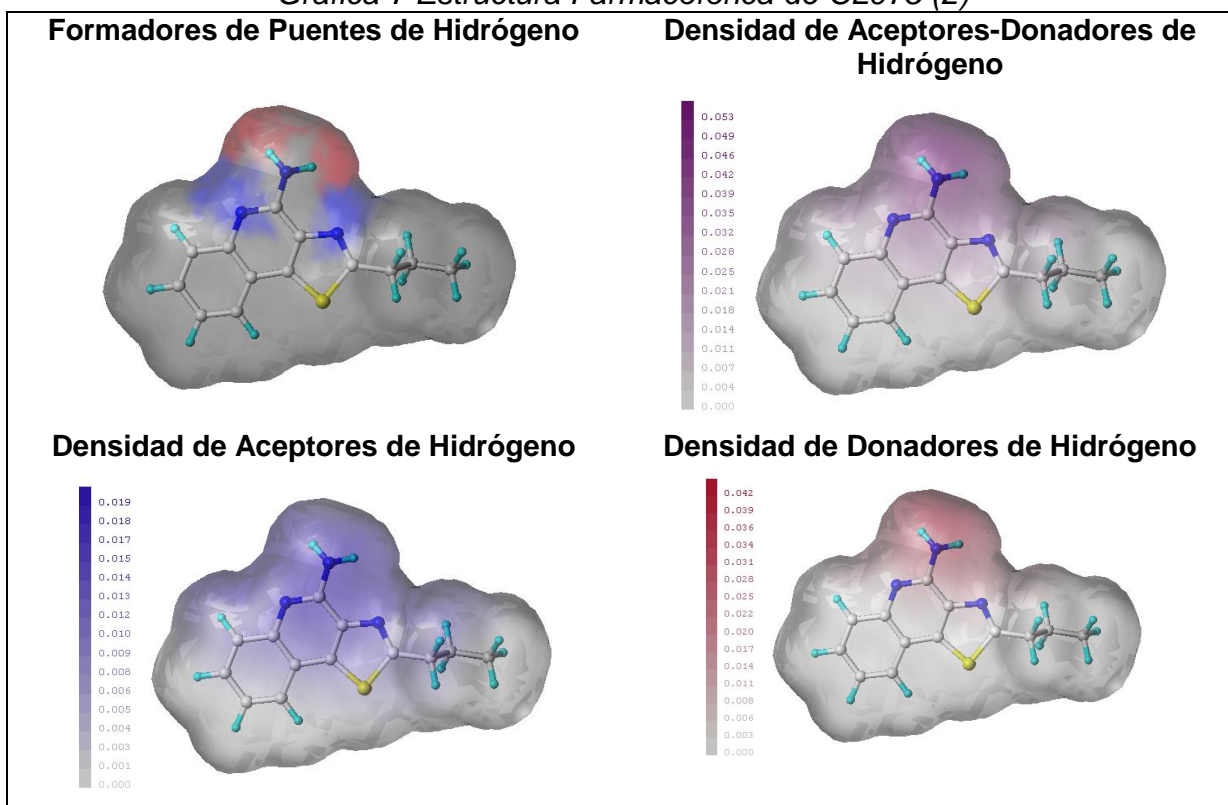


Gráfica 6 Estructura Farmacofórica de CL075

Potencial Lipofílico	Potencial Poisson Boltzman
----------------------	----------------------------



Gráfica 7 Estructura Farmacofórica de CL075 (2)



Optimización Geométrica de CL075

Modelo: RHF/PM3

Número de depósitos: 47

30 S shells

P 17 shells

Número de funciones de base: 81

Número de electrones: 86

Uso de la simetría molecular:

Molecular de carga: 0

Multiplicidad de spin: 1

Calor de formación: 241.710 kJ/mol

Debido a la energía de solvatación

Energía de Solvatación: SM5.4 / P-39,162

Medidas termodinámicas estándar: a 298,15 K y 1,00atm

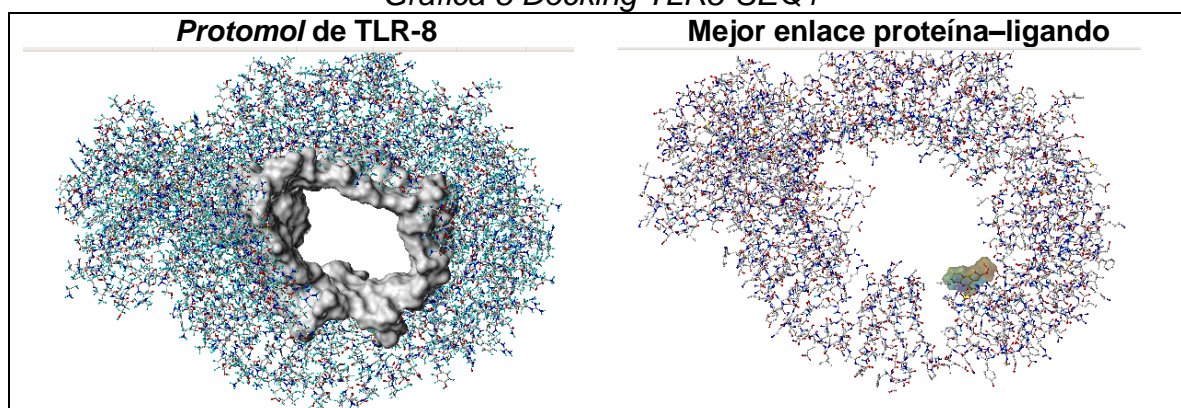
Entalpía

Entropía

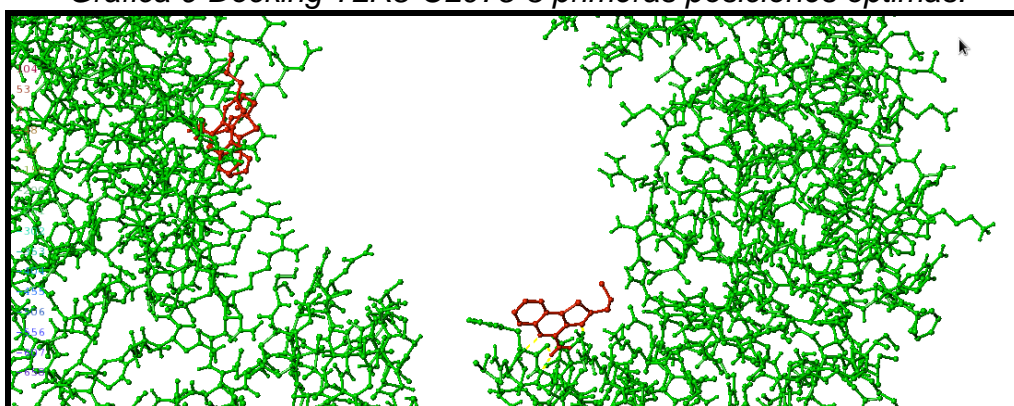
Cv

	J/mol.K	J/mol.K	J/mol.K
Vibraciones Totales	31.3296	193.9901	215.4925
Ideal Gas	2.4789		
Translation	3.7184	177.2573	12.4716
Rotation	3.7184	139.0912	12.4716
Totales	667.1655	510.3386	240.4357

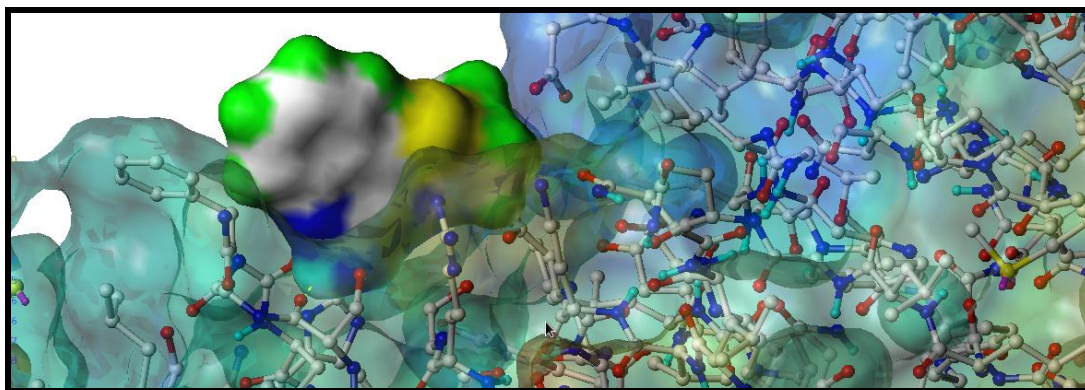
Gráfica 8 Docking TLR8-SEQ1



Gráfica 9 Docking TLR8-CL075-3 primeras posiciones óptimas.



Gráfica 10 Docking TLR-8-CL075–Mejor interacción encontrada (1era posición)



Gráfica 11 Docking TLR-8-CL075–Interacciones de Campos electrostáticos.

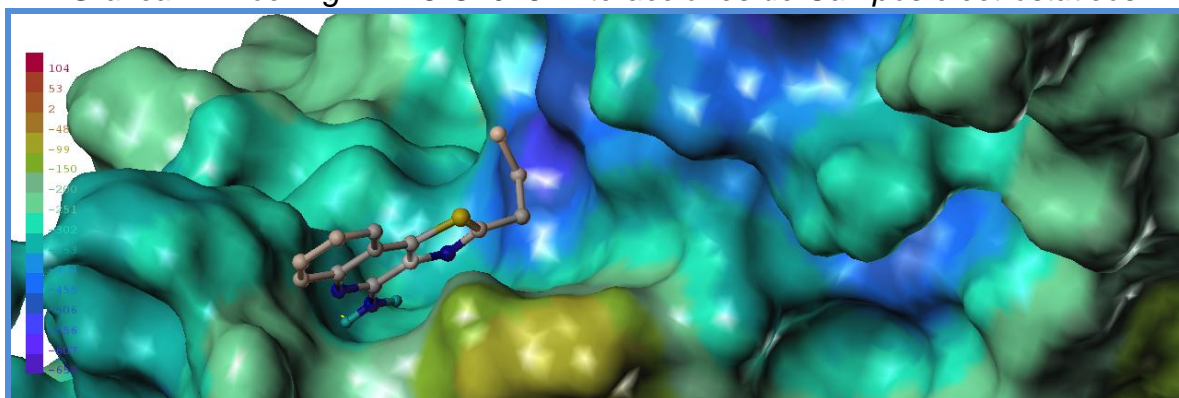


Tabla 2 Análisis de Evaluaciones a las mejores conformaciones del docking TLR8-CL075

Docking	Crash	Polar	Strain	Total
CL075_0	-0.4561	1.8984	0.016	3.4137
CL075_001	-0.4645	1.073	0.0752	3.081
CL075_002	-0.389	0.9929	0.0403	3.1431
CL075_003	-0.6826	1.4087	0.0529	3.0701
CL075_004	-0.5501	1.7197	0.0913	3.0363
CL075_005	-0.2624	1.0047	0.026	2.7605
CL075_006	-0.4583	2.2971	1.2633	1.3628
CL075_007	-0.2135	0.9144	0.0053	2.4935
CL075_008	-1.2177	1.9186	0.2531	2.2843
CL075_009	-0.6789	1.2674	0.4139	2.0638
CL075_010	-0.2334	1.0578	0.0449	2.8782
CL075_011	-0.241	0.987	0.0435	2.3093
CL075_012	-0.4263	1.8859	0.1361	2.4085
CL075_013	-0.4799	1.1448	0.2303	2.1529
CL075_014	-0.4078	1.1191	0.0292	2.3402
CL075_015	-0.5402	1.1467	0.0146	2.2444
CL075_016	-0.5212	1.1537	0.2956	1.9576
CL075_017	-0.4762	2.3191	0.0661	2.3121
CL075_018	-0.6564	1.5858	0.0867	2.0104
CL075_019	-0.254	1.0213	0.0167	2.8393

La columna **Crash** se refiere al nivel de penetración positiva o negativa del ligando en la enzima, así como a la propia interacción negativa del ligando consigo mismo. El valor más pequeño se interpreta como una penetración favorable.

La columna **Polar** es una evaluación basada en la contribución de Puentes de Hidrógeno en la interacción total.

La columna **Strain** se refiere al nivel de restricción referente a enlaces que rotan del ligando en la enzima, siendo valores cercanos a 0 los menos restringidos.

Tabla 3 Análisis químico de 20 conformeros de CL075 en enlace con TLR8

Docking	Punteo D	PMF	Punteo G	CHEM SCORE	DR_SCORE E	PMFR	GR	CHEM SCORER
CL075_000	-65.3972	-14.6257	-125.982	-6.4448	-71.507	-8.3159	-142.311	-7.4162
CL075_001	-65.2952	10.0551	-126.111	-8.9821	-76.1571	24.8691	-150.657	-9.7928
CL075_002	-60.9434	25.8933	-121.855	-5.0236	-71.9525	41.1617	-145.398	-5.7827
CL075_003	-68.8775	11.2702	-132.221	-6.6689	-72.376	14.8727	-151.195	-6.8951
CL075_004	-61.8737	12.0606	-117.107	-8.2458	-75.6961	28.3367	-146.476	-9.4967
CL075_005	-57.847	15.8138	-107.633	-6.9821	-70.4916	25.9818	-133.353	-8.4873
CL075_006	-56.8979	-15.5659	-94.2015	-8.657	-74.5703	12.51	-134.785	-8.9489
CL075_007	-58.197	11.7221	-105.828	-7.4714	-71.4014	30.4856	-132.774	-8.9188
CL075_008	-67.4523	25.3236	-140.225	-8.1198	-75.31	36.9391	-167.163	-8.6656
CL075_009	-65.8566	1.1724	-133.27	-11.6992	-73.6497	3.0378	-145.475	-15.8736
CL075_010	-52.8749	9.9726	-101.009	-6.8801	-71.6644	28.3534	-135.317	-8.5816
CL075_011	-49.947	-14.3025	-100.174	-8.9699	-60.2757	5.7488	-124.902	-11.2995
CL075_012	-55.2897	3.1292	-101.554	-8.6206	-67.5067	9.2435	-123.147	-9.893
CL075_013	-60.7454	21.3604	-117.119	-5.5482	-75.2038	37.7519	-144.063	-6.8016
CL075_014	-60.2154	22.991	-114.468	-5.3178	-70.4491	39.0088	-138.803	-6.0419
CL075_015	-53.5001	42.6946	-122.135	-11.7559	-65.6497	65.8799	-145.849	-11.156
CL075_016	-65.2601	1.5894	-130.891	-11.6447	-75.1216	3.9183	-145.978	-15.9774
CL075_017	-57.0544	-16.7403	-95.6593	-8.3097	-74.5536	17.3909	-135.791	-8.9836
CL075_018	-55.4482	6.0412	-106.285	-7.775	-69.1247	24.6394	-122.744	-8.8329
CL075_019	-54.7926	16.7605	-98.1705	-6.6969	-69.5788	24.185	-129.096	-8.4928

Punteo D. Evaluación relativa la carga y a las interacciones de van der Waals entre proteína y ligando.

Punteo G. Es una evaluación que utiliza los enlaces de hidrógeno, el complejo ligando-proteína y energías internas.

PMF. Es una evaluación relativa que toma en cuenta un grupo grande de complejos de Protein Data Bank y desarrolla energías libres de Helmholtz de las interacciones de los pares ligando-proteína (Potential of Mean Force, PMF).

Chem Score. Incluye un término de Puentes de Hidrógeno, interacciones metal-ligando (si existen), contacto lipofílico y entropía rotacional en conjunto con un término intercepto.

DR_SCORE PMFR_SCORE GR_SCORE (Relaxed Scores). Estas evaluaciones tienen el mismo significado que D Score, G Score y PMF Score, con la diferencia de que han sido tomadas posterior a un relajamiento (relaxed) o minimización energética aplicada al complejo formado por el docking para cada conformación.

Tabla 4 Evaluación total de los confórmers de CL075 en TLR8 –todos los parámetros-

Confórmero	GLOBAL CScore	CSCORER	GLOBAL CSCORER	CScore
CL075_000	4	4	2	4
CL075_001	5	5	3	5
CL075_002	3	3	2	3
CL075_003	4	4	3	4
CL075_004	3	3	3	3
CL075_005	1	1	2	1
CL075_006	2	2	2	2
CL075_007	1	1	1	1
CL075_008	2	2	2	2
CL075_009	4	4	4	4
CL075_010	2	2	2	2
CL075_011	2	2	2	2
CL075_012	2	2	1	2
CL075_013	1	1	1	1
CL075_014	1	1	1	1
CL075_015	2	2	2	2
CL075_016	4	4	4	4
CL075_017	1	1	2	1
CL075_018	1	1	2	1
CL075_019	1	1	2	1

Global Score: Sumatoria global de todas las evaluaciones normalizadas.

CScorer: Evaluación de Consenso Normalizada y optimizada.

Global Scorer: Evaluación global de los punteos por consenso.

CScore: Punteos por consenso.

CScore y **CScoreR** (Relaxed), **CScore** (Evaluación Consenso) integra un grupo de evaluaciones conocidas y funciones para evaluar la afinidad de ligandos enlazados a sitios activos de un receptor. La fuerza de la función de evaluación individual combinada para producir un consenso que es más robusto y exacto que cualquier función de evaluación para evaluar la interacción ligando-receptor.

7.2. Diseño de una secuencia peptídica con base en gp120 región variable 3 de gp120 de VIH-1.

Modelaje de SEQ 3

MINIMIZACIÓN DE GAG:

Método: Powell

Terminación: Por Gradiente

Inicial Optimización: Simplex

Máximo de iteraciones: 100.

Campo de Fuerza: Tripos

Carga: Ninguna

PBC: Ignorado

NB Cutoff: 8.0

Función Dieléctrica: Distancia

Constante Dieléctrica: 1.0

Energías calculadas para HLA-DR1 (Kcal/mol):

Se utilizó Tripos Campo de Fuerza Externo

Energía para la molécula: 1SJH

Bond Stretching Energy: 107.306

Angle Bending Energy: 969.874

Torsional Energy: 954.048

Out of Plane Bending Energy: 13.693

1-4 van der Waals Energy: 552.721

van der Waals Energy: -2776.491

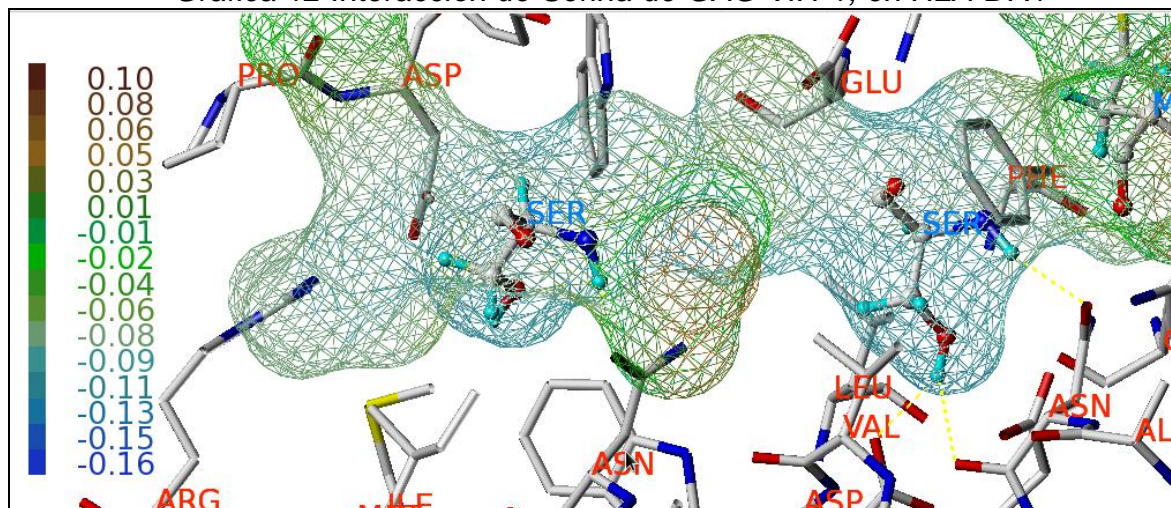
=====

Energía Total: -178.849 Kcal/mol

Superposición de Secuencias

gag	PRO	GLU	VAL*	ILE	PRO	MET*	PHE	SER*	ALA	LEU	SER*	GLU	GLY		
v3-01	PRO	GLY	ARG-	ALA	PHE	TYR+	ALA	THR+	GLY	GLN	ILE-	THR	GLY		
V3-M03	PRO	GLY	ARG?	ALA	PHE	TYR+	ALA	THR*	GLY	GLN	SER_	THR	GLY	ASP	
Refx	PRO	PRO	SER*	GLN	GLU	ALA-	SEP	LEU-	LYS	GLU	TYR*	ALA	PRO	PRO	ALA

Gráfica 12 Interacción de Serina de GAG VIH-1, en HLA-DR1



7.3. Análisis de interacciones entre péptido-enzima, secuencias GAG de VIH-1 y V3 de gp120 de VIH-1.

Docking de SEQ 3.

Tabla 5 Punteo Total del Docking Péptido-Enzima

Conformación	PUNTEO TOTAL		
	GAG	V3	V3-M03
_001	-0.2191	2.366	0.2963
_002	-0.2965	3.2995	0.1446
_003	-0.7586	1.8972	-0.3942
_004	-1.5137	1.3393	-2.7399
_005	-1.0318	0.957	-3.7249
_006	-2.0456	-2.4688	-4.6338
_007	-2.9385	-1.3366	-4.5006
_008	-1.957	-0.8313	-2.0132
_009	-3.3943	-2.7735	-4.5431
_010	-2.2938	-2.7865	-4.2296
_011	-3.8766	0.9304	-5.6775
_012	-8.4679	-1.985	-5.6202
_013	-11.8184	-2.2807	-5.1448
_014	-12.0057	-1.7257	-4.5455
_015	-11.4846	-1.6021	-6.5258
_016	-12.1374	-3.7315	-4.5529
_017	-12.406	-0.6521	-7.0816
_018	-13.1764	-2.9257	-6.8187

Tabla 6 Punteo de las Colisiones del Docking entre el Péptido-Enzima

Conformación	COLISIONES		
	GAG	V3	V3-M03
_001	-3.6079	-3.441	-4.8858
_002	-4.197	-2.6353	-8.1007
_003	-3.5565	-2.0305	-5.2687
_004	-4.0612	-2.2603	-5.6489
_005	-3.3877	-2.6053	-4.8475
_006	-3.598	-2.8089	-6.9297
_007	-3.9427	-2.5032	-4.1824
_008	-3.4843	-2.5852	-5.5571
_009	-2.8924	-2.257	-4.1753
_010	-4.8668	-2.3654	-4.3183
_011	-3.1121	-2.3274	-4.4827
_012	-4.4901	-2.4948	-3.548
_013	-2.3771	-3.6333	-3.4646
_014	-4.1042	-3.1235	-3.74
_015	-2.7943	-2.1607	-3.4635
_016	-3.3079	-2.1401	-3.7571
_017	-4.1419	-3.0659	-3.8218
_018	-3.3671	-3.0799	-4.5048

Punteo D, Evaluación relativa la carga y a las interacciones de van der Waals entre proteína y ligando.

Tabla 7 Evaluación del Punteo D para el Docking entre Péptido-Enzima

Conformación	Punteo D		
	GAG	V3	V3-M03
_001	-664.61	-21.214	-232.6831
_002	-721.188	-21.2683	-247.9853
_003	-647.981	7.4016	-197.2796
_004	-665.616	36.3232	-193.6979
_005	-664.592	33.2022	-180.5016
_006	-600.717	33.9664	-179.2308
_007	-637.768	39.2139	-160.9809
_008	-541.147	39.6383	-160.3994
_009	-528.457	28.8787	-136.9841
_010	-548.02	30.8243	-156.1461
_011	-512.444	41.4454	-134.5591
_012	-222.709	32.4187	-99.3265
_013	-95.4827	35.9591	-176.3076
_014	-166.038	84.5166	-150.4119
_015	-208.669	9.9044	-173.6044
_016	-141.265	60.392	-144.1084
_017	-69.0245	55.9422	-116.9344
_018	-149.082	16.1936	-133.8908

Punteo G, Es una evaluación que utiliza los enlaces de hidrógeno, el complejo ligando – proteína y energías internas para determinar afinidad enzima-ligando.

Tabla 8 Evaluación del Punteo G para el Docking entre Péptido-Enzima

Conformación	Punteo G		
	GAG	V3	V3-M03
_001	-664.61	-21.214	-530.4797
_002	-721.188	-21.2683	-572.0237
_003	-647.981	7.4016	-534.1365
_004	-665.616	36.3232	-534.0878
_005	-664.592	33.2022	-400.279
_006	-600.717	33.9664	-481.4559
_007	-637.768	39.2139	-446.428
_008	-541.147	39.6383	-434.1833
_009	-528.457	28.8787	-385.7588
_010	-548.02	30.8243	-434.3234
_011	-512.444	41.4454	-377.2268
_012	-222.709	32.4187	-299.2471
_013	-95.4827	35.9591	-377.7735
_014	-166.038	84.5166	-374.4459
_015	-208.669	9.9044	-379.4305
_016	-141.265	60.392	-354.9174
_017	-69.0245	55.9422	-330.9166
_018	-149.082	16.1936	-418.8754

Punteo Global: Es la sumatoria total de las propiedades filtradas y clasificadas como buenas, regulares o malas. A cada propiedad se le asigna un peso de 1 punto por ser bien ponderada dentro del límite establecido por SYBYL.

Tabla 9 Evaluación del Punteo Global para el Docking entre Péptido-Enzima

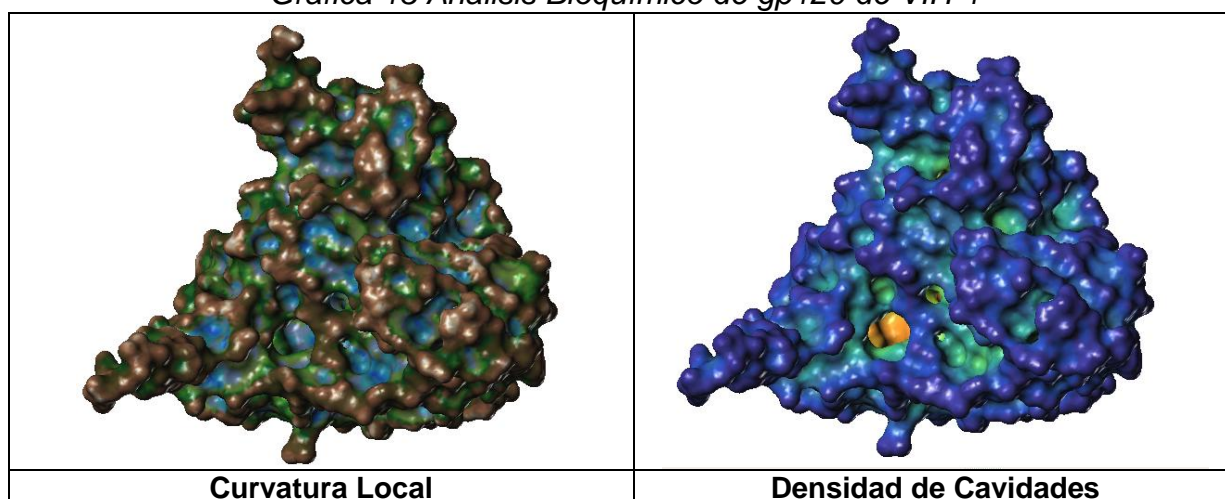
Conformación	Punteo Global		
	GAG	V3	V3-M03
_002	5	5	5
_003	5	3	5
_004	5	2	5
_005	5	2	5
_006	5	2	1
_007	5	2	3
_008	5	1	1
_009	5	2	1
_010	5	2	0
_011	5	3	0
_012	1	0	0
_013	0	2	0
_014	0	1	2
_015	0	1	0
_016	0	1	0
_017	0	2	1

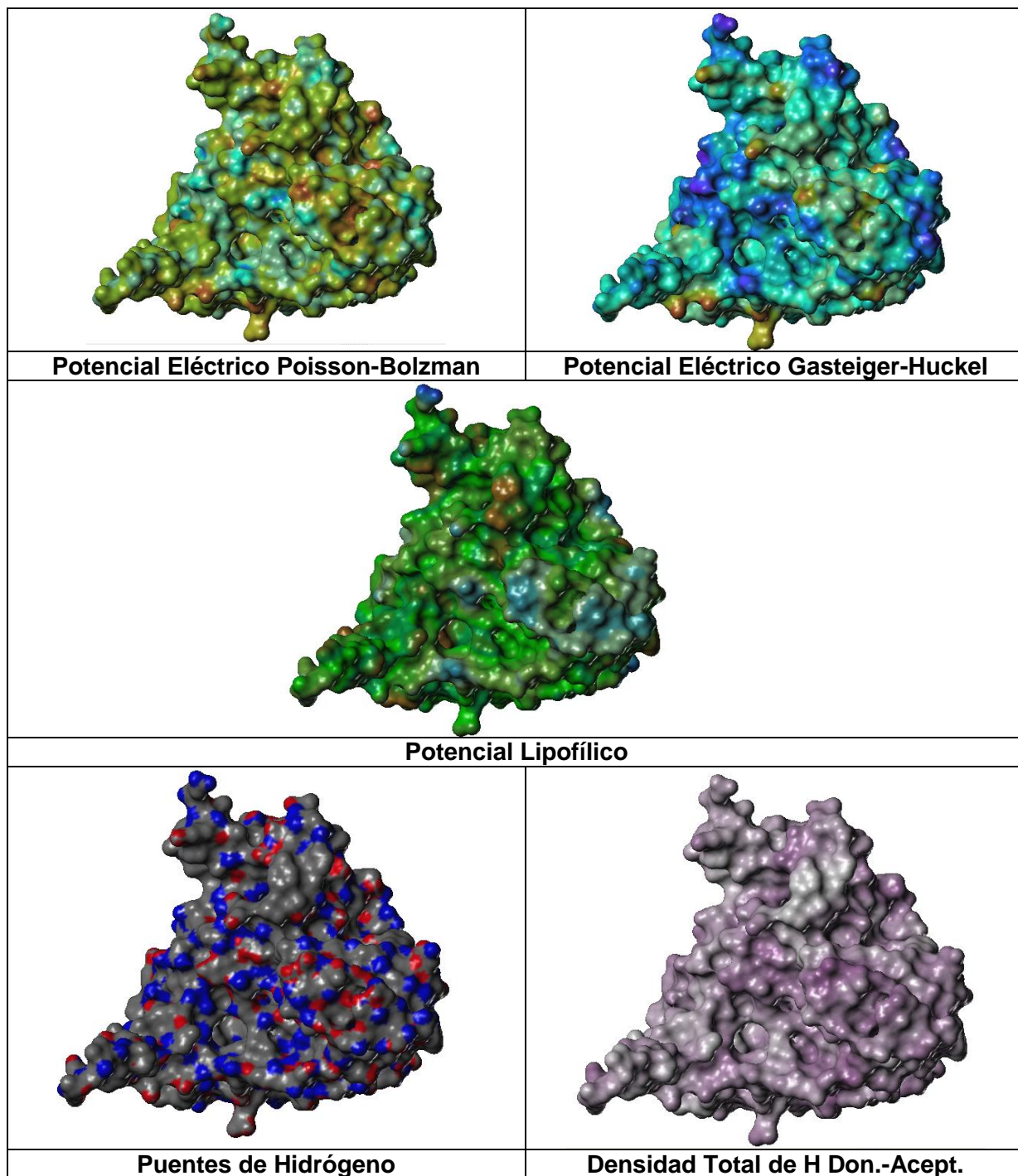
7.4. Diseño de una estructura hábil de enlazarse al receptor manosa de la Langerina presente en las células de Langerhans.

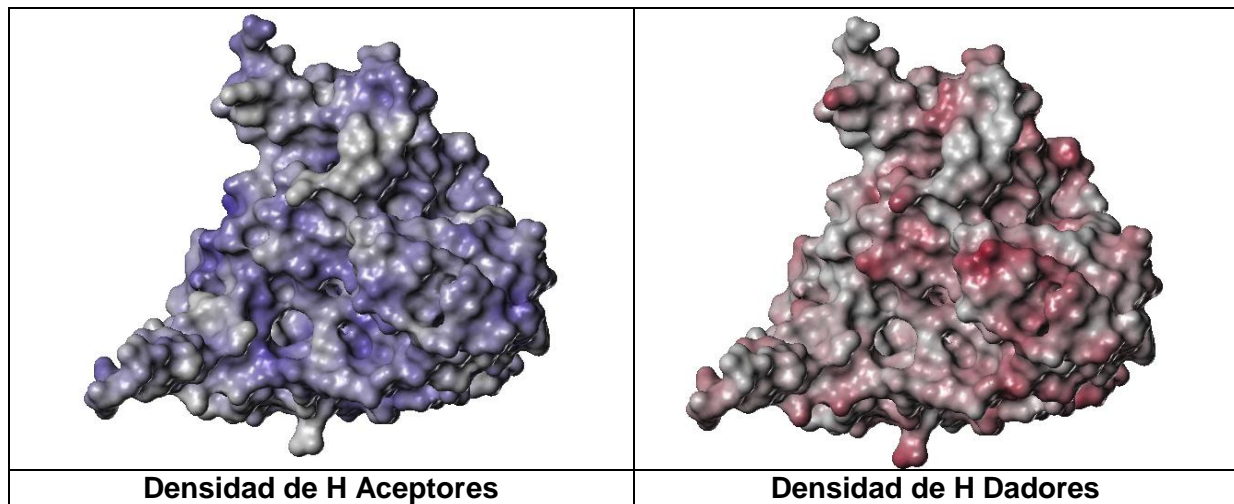
Resultados del Docking SEQ2- Langerina.

A- Epítomos en gp120 para el receptor Langerina.

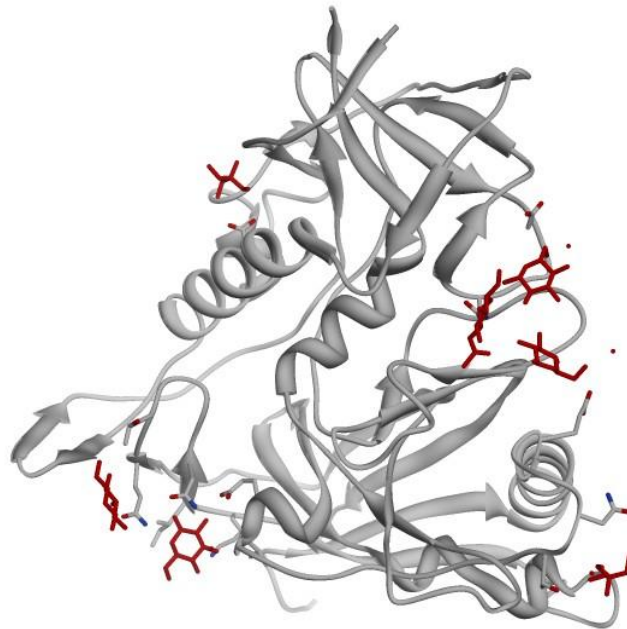
Gráfica 13 Análisis Bioquímico de gp120 de VIH-1



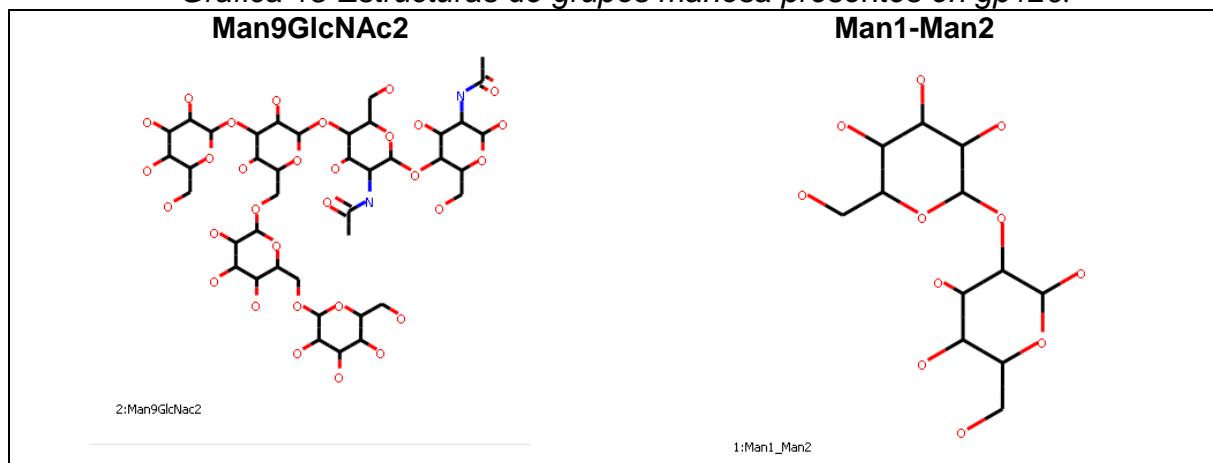




*Gráfica 14 Presencia de grupos Manosa en gp120 de VIH-1:
Los grupos se encuentran señalados en color rojo.*



Gráfica 15 Estructuras de grupos manosa presentes en gp120.



Modelaje molecular para grupos manosa Man1_Man2.

Proceso Ejecutado: Minimización Energética/Geométrica, DFT.
Minimize (Energy/Geometry) B3LYP/STO-3G

Tabla 10 Modelaje PM3 para Man9GlcNAc2

Cp = 285.578 cal/(mol K)
Cv = 283.591 cal/(mol K)
Dipole = (-6.428766, -7.968500, 0.871047) 10.275444 Debye
Enthalpy = 754.933 Kcal/Mol
Entropy = 427.020 cal/(mol K)
Gibbs Free Energy = 627.617 Kcal/Mol
Harmonic Zero Point Energy = 0 Kcal/Mol
Internal Energy = 754.340 Kcal/Mol

Se han obtenido los siguientes descriptores farmacofóricos utilizando el programa SYBYL de Tripos:

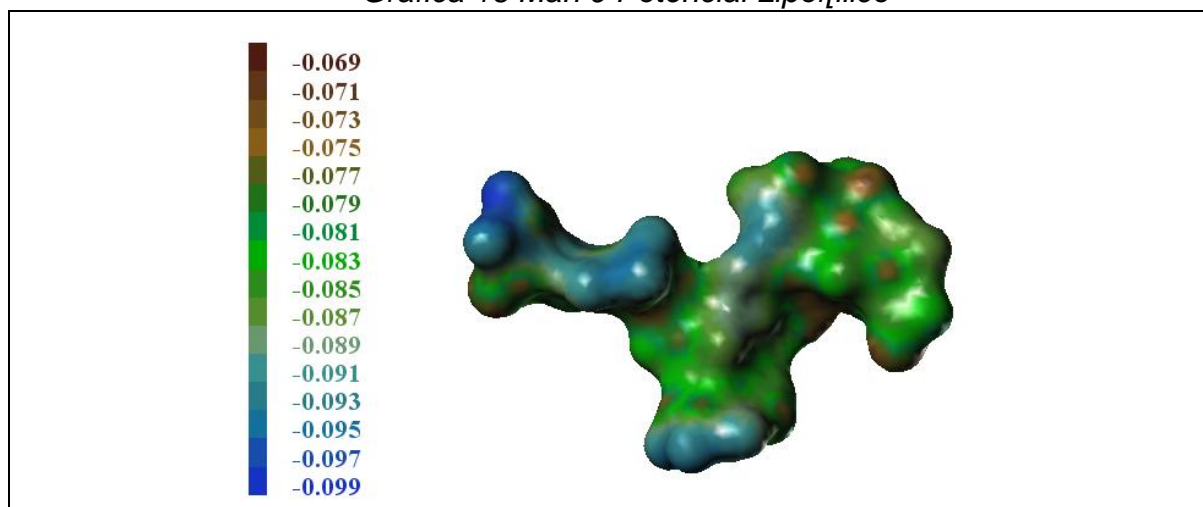
Tabla 11 Descripción farmacofórica de SEQ 2 (Mamosas)

	COMPUESTO	CLOGP	ESTÉRICO	ELECTROSTÁTICO	HIDROFÓBICO
1	MAN1_MAN2	-7.4413	1.4173	6.3391	0.3387
2	MAN9GLCNAC2	-	2.5944	11.2669	0.7666

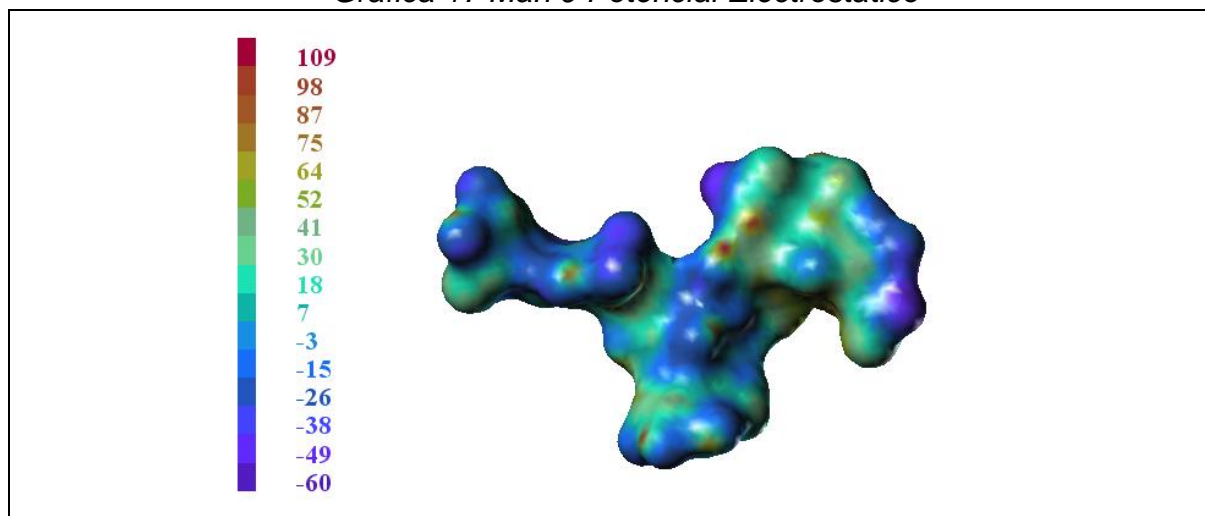
	COMPUESTO	COMSIA DONADOR	ACEPTOR	ESTÉRICO Y ELECTROSTÁTICO	DONADOR Y ACEPTOR
1	MAN1_MAN2	0	1.478	6.4179	1.0451
2	MAN9GLCNAC2	0	3.0192	11.4152	2.1349

Mapas Farmacofóricos para los grupos Manosas

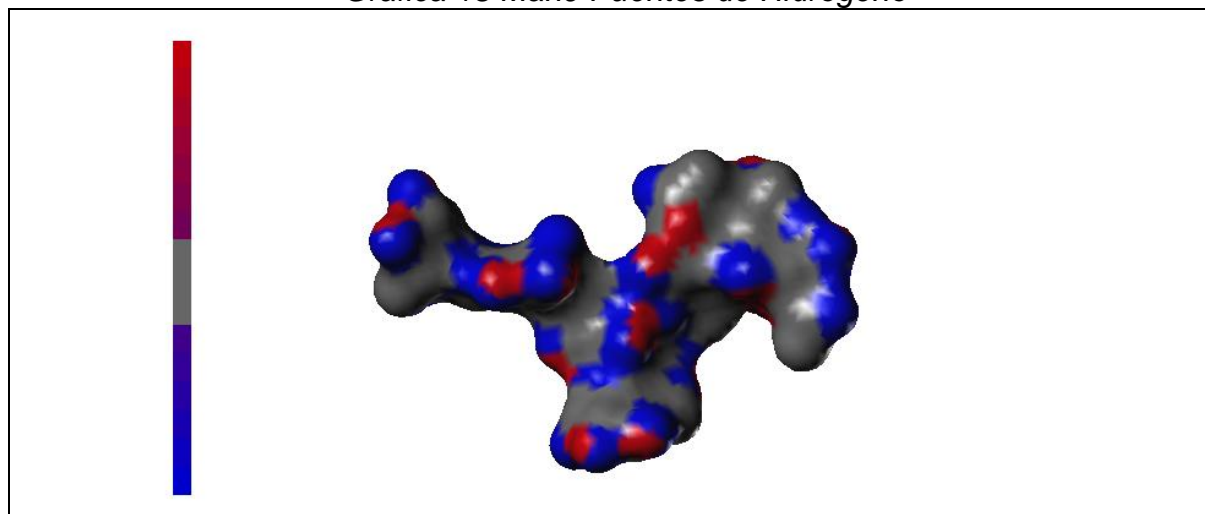
Gráfica 16 Man 9 Potencial Lipofílico



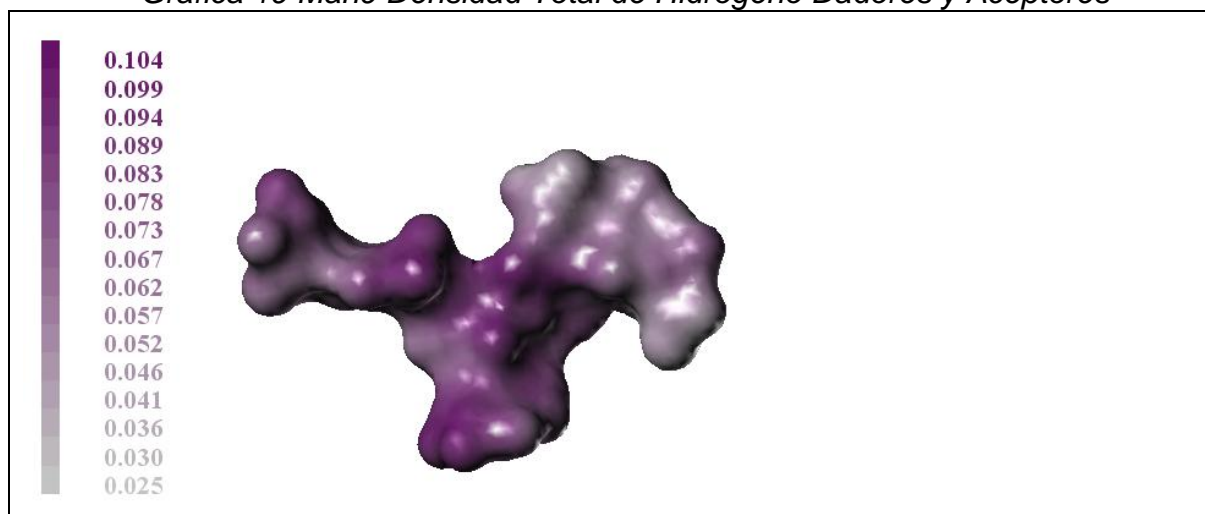
Gráfica 17 Man 9 Potencial Electroestático



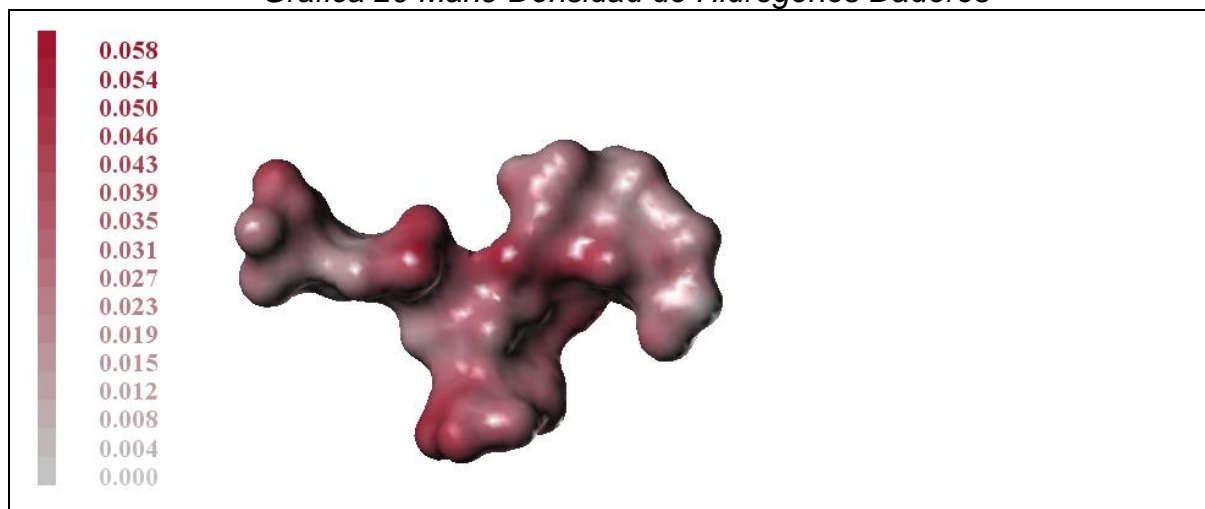
Gráfica 18 Man9 Puentes de Hidrógeno



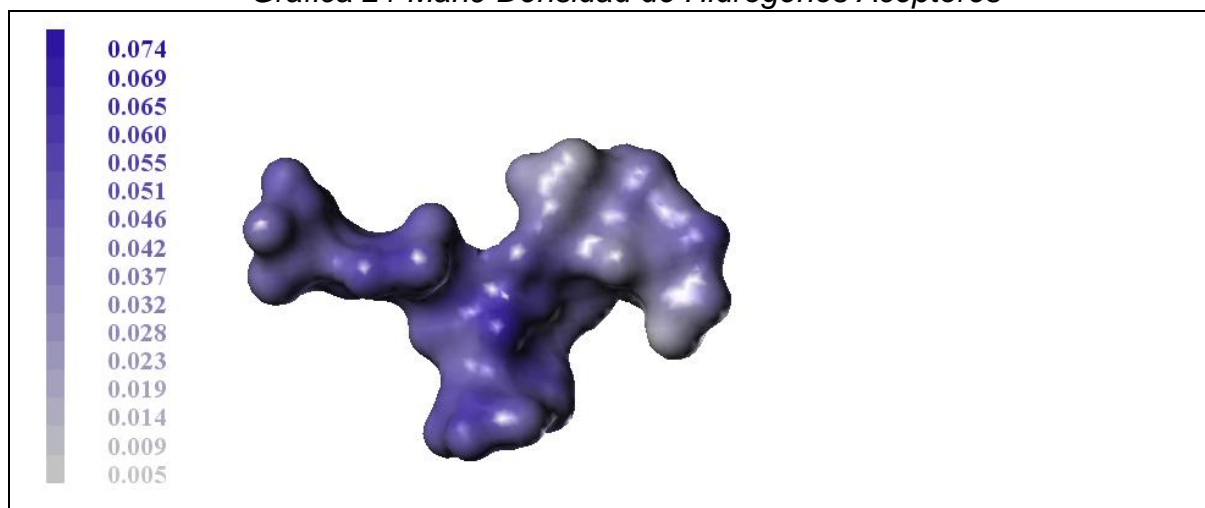
Gráfica 19 Man9 Densidad Total de Hidrógeno Dadores y Aceptores



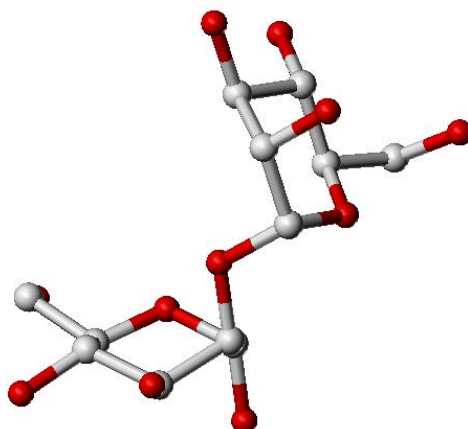
Gráfica 20 Man9 Densidad de Hidrógenos Dadores



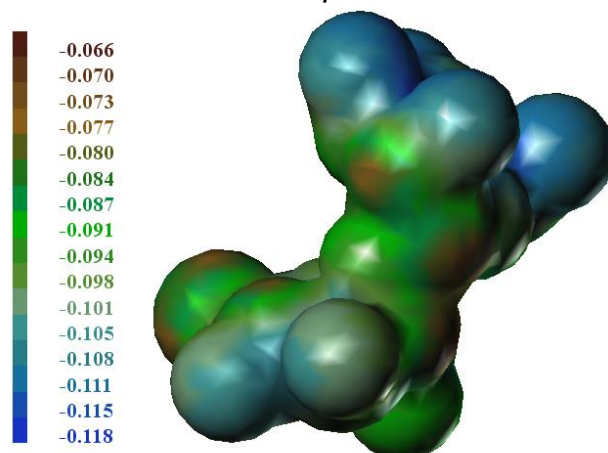
Gráfica 21 Man9 Densidad de Hidrógenos Aceptores



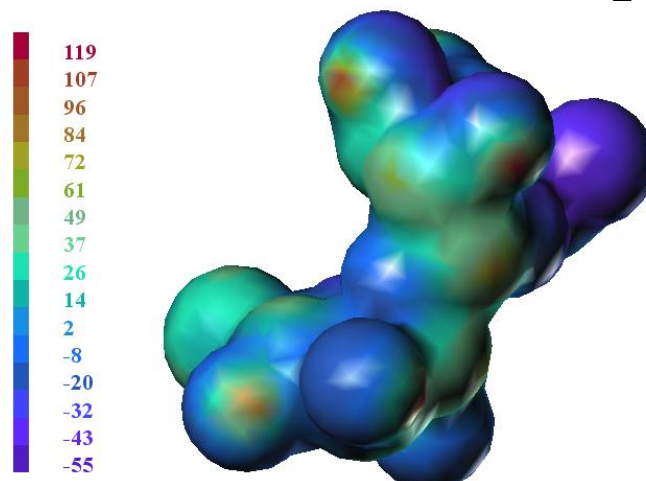
Gráfica 22 Estructura De Man1_Man2



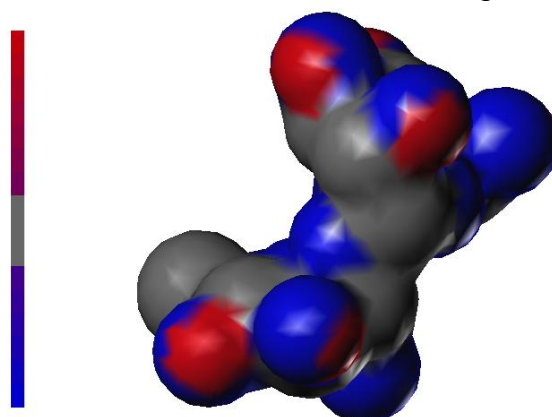
Gráfica 23 Potencial Lipofílico De Man1_Man2



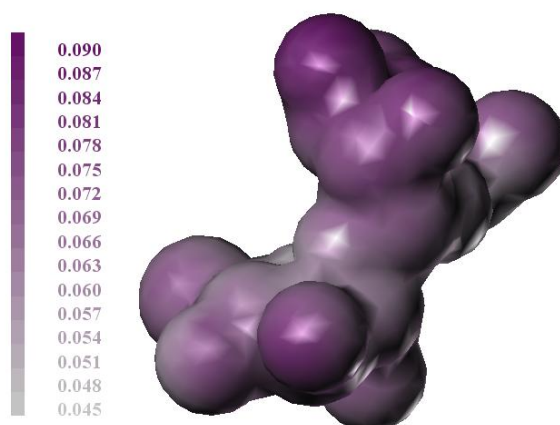
Gráfica 24 Potencial Electrostático De Man1_Man2



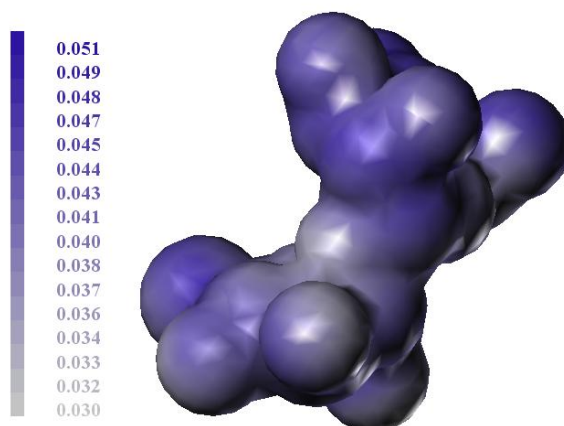
Gráfica 25 Formadores de Puentes de Hidrógeno de Man1_Man2



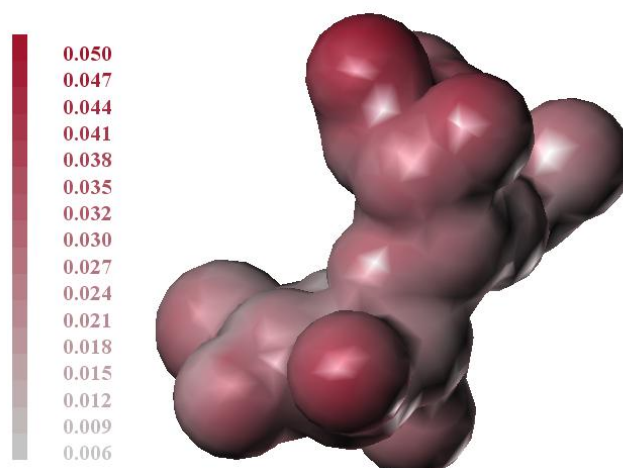
Gráfica 26 Densidad total de Hidrógenos Aceptores y Donadores de Man1_Man2



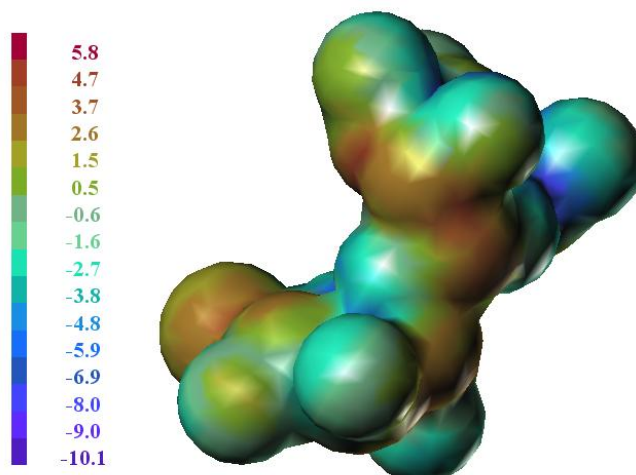
Gráfica 27 Densidad de Hidrógenos Aceptores de Man1_Man2



Gráfica 28 Densidad de Hidrógenos Dadores de Man1_Man2



Gráfica 29 Cargas Electroestáticas de Poison-Bolzman De Man1_Man2



Gráfica 30 Enlaces Teóricos y Experimentales de Manosas a Langerina.

Enlaces Teóricos de Manosa a Langerina	
Man9GlcNac2-Sitio A	Man1Man2
Enlaces Experimentales de Manosa a Langerina	
Manosa	Man1Man2

Análisis de las Mejores conformaciones encontradas por Man1Man2 y Man9GlcNac2.

Tabla 12 Evaluaciones del Docking Manosas-Langerina.

Conformaciones	Ligando	Total	Crash	Polar
1	Man1_Man2_000	-0.5008	-0.6152	0
2	Man1_Man2_001	-0.7158	-0.1818	0
1	Man9GlcNac2_000	2.132	-5.6676	8.9057
2	Man9GlcNac2_001	2.2411	-3.4535	8.8538

Tabla 13 Evaluaciones físico-químicas del docking Manosa-Langerina.

Confor.	Ligando	D_SCORE	PMF_SCORE	G_SCORE	CHEMSCORE
1	Man1_Man2_000	19937.057	4.5715	-75.407	-7.6123
2	Man1_Man2_001	12627.2596	41.4331	-60.9461	-5.8288
1	Man9GlcNac2_000	-2314.7999	-111.293	-354.306	-16.0179
2	Man9GlcNac2_001	-1841.1362	-58.9339	-245.042	-16.5984

Tabla 14 Evaluaciones totales del docking Manosa-Langerina.

Conformaciones	Ligando	CSC ORE	GLOBAL_CS CORE	CSCO RER	GLOBAL_CSC ORER
1	Man1_Man2_000	4	4	4	2
2	Man1_Man2_001	3	3	3	2
1	Man9GlcNac2_000	5	5	5	3
2	Man9GlcNac2_001	4	4	4	2

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Determinación de un estimulante del Receptor Tipo Toll-8 presente en las Células Dendríticas.

Creación de un archivo .pdb de TLR-8

Ha sido necesario realizar un primer modelado (Gráfica 2) para examinar la necesidad de completar la base de datos presente en FUGUE y ORCHESTRAR, los resultados obtenidos en el primer modelado no fueron del todo satisfactorios.

El modelaje de la proteína por este método es mucho más rápido, pero también implica la necesidad de exactitud en la longitud de secuencias homólogas y la secuencia desconocida para reducir el porcentaje de desviación real.

Después del primer modelado, fue necesario complementar la base de datos existente en FUGUE.

Posteriormente, fue necesario realizar minimizaciones energéticas sobre el primer modelo creado. Adicionalmente se modeló por separado una cuarta sección de un segmento perdido.

Los resultados finales para el modelado del Receptor Tipo Toll-8 se presentan a continuación:

1059 residuos en total

901 residuos modelados

158 residuos perdidos

0 cadenas laterales perdidas

Las secuencias homólogas sobre las que ha sido construido el modelo, se identifican en la base de datos PRODAT que provee SYBYL de Tripos con los códigos:

hs1xkua

hs2z64a

Adicionalmente se encontró un segmento homólogo que pertenece al TLR1 cuya secuencia se identifica en la base de datos pública NCBI como

1fyva "*Chain A, Crystal Structure Of The Tir Domain Of Human Tlr1*"

Por lo que, según las predicciones teóricas desarrolladas con el programa SYBYL TLR-8 debe tener una estructura circular como se aprecia en la Gráfica 1.

Consideraciones: El modelo que se presenta de TLR-8 es el primer modelo de la familia de receptores tipo Toll intra-citoplásmicos creados.

Dentro de esta familia, se encuentran los receptores de características exclusivas TLR-7, TLR-8, TLR-9 y TLR-10, habiéndose aislado y secuenciado la totalidad de ellos.

Ninguno de estos ha sido cristalizado y examinado por difracción de Rayos X. Las secuencias utilizadas para crear el presente modelo tuvieron una identidad entre sus aminoácidos que oscila entre 28 y 34 %, cuando se considera el límite de identidad para relacionar una esqueleto estructural el 32% de identidad, por lo cual, muchos de los segmentos (*loops*) presentes tuvieron que ser modelados por cálculos semi-empíricos tipo POWELL (el cual también está formulado por SYBYL), así mismo las cadenas laterales.

Tomando en cuenta que la mayoría de los otros receptores tipo Toll (TLR1-6) tienen diversas otras estructuras, se considera probable que efectivamente TLR-8 mantenga cierta semejanza en su estructura terciaria con los otros receptores. En este sentido, se puede considerar que si los otros receptores tienen una estructura terciaria no circular, pero si con forma de herradura y otros simplemente estructura tubular recta o semi-recta, no es difícil sugerir que el modelo TLR-8 obtenido tiene forma de herradura y probablemente se encuentra colapsado debido a que las secuencias estructurales utilizadas por homología para el modelo de TLR-8 están basadas en estos otros TLR que de hecho son más pequeños.

Esta hipótesis debe corroborarse con resultados experimentales.

TLR-8 posee 1058 aminoácidos mientras que una proteína de gran tamaño promedio posee entre 400 y 500 aminoácidos. Esto hace difícil la manipulación de la proteína tanto experimentalmente como *in silico*.

901 residuos modelados-158 residuos perdidos.

Debido a los parámetros de modelado utilizados por SYBYL, este no permite fácilmente el modelado de segmentos que no encuentran homología.

Dentro de los segmentos que no encontraron homología que fueron 13, cuyos aminoácidos suman 158/1058 en total, SYBYL permite modelar estos aminoácidos mediante cálculos semi-empíricos siempre que no excedan los 9 aminoácidos de longitud, probablemente debido a los recursos computacionales necesarios para crear estos modelos y al porcentaje de error de diferencia creado entre segmentos modelados por homología y segmentos modelados por métodos mecano-cuánticos. Si en un caso determinado el segmento modelado semi-empíricamente y el resto de la proteína modelada no coinciden por un mínimo de distancia entre los aminoácidos que conectan los segmentos, SYBYL-ORCHESTAR rechaza el segmento modelado y reporta que ningún modelo puede ser propuesto para el segmento en cuestión.

Es por esto que estos 158 residuos no se han podido modelar utilizando ORCHESTAR.

Sin embargo, actualmente se considera la probabilidad de modelar estos segmentos por separado utilizando métodos semi-empíricos dentro de SYBYL o con otros programas, pero el costo computacional de este desarrollo es muy alto respecto al tiempo y los recursos dentro de los que se trabajó esta investigación.

Validez del modelo.

Este modelo se considera válido únicamente para los fines de este proyecto, puesto que se trata de determinar el o los potenciales sitios activos para sARN presentes en TLR-8, con el fin de determinar la afinidad los sitios activos en el modelo.

El presente modelo de TLR-8 no se considera válido para fines de publicación.

Dados los motivos anteriores, es necesario refinar por minimizaciones energéticas la totalidad del modelo y considerar además el gran tamaño de esta proteína para modelarla utilizando recursos computacionales más amplios.

En la gráfica No.3, donde se muestra el mapeo de Ramachandran para los aminoácidos modelados en TLR-8, puede observarse que la mayoría de aminoácidos modelados se encuentran en zonas óptimas para el modelo de TLR-8 presentado. Algunos aún se encuentran fuera de las regiones permitidas.

Interpretación de los puntos en las gráficas Ramachandran.

Los puntos son coloreados de la siguiente forma:

Magenta Residuos de Glicina

Azul Residuos de Prolina

Blanco El resto de residuos.

Los puntos son ubicados en base a 4 columnas:

Phi El valor del ángulo phi

Psi El valor del ángulo psi

Tipo 1 (glicina), 2 (Prolina) o 3 (todos los otros tipos de residuos)

Posición 0 (residuo terminal), 1 (núcleo), 2 (permitido), 3 (generoso), 4 (prohibido)

La gráfica estadística Ramachandran resalta cuatro regiones representando varios niveles de preferencia conformacional para residuos.

Los contadores son coloreados de acuerdo al número de residuos en una matriz 10x10 como sigue:

Rojo	Región núcleo; contiene 100 o más residuos por caja.
Amarillo	Regiones permitidas; contiene 8 o más residuos por caja.
Verde	Región generosa; extendida por 20° alrededor de las regiones permitidas.
Todos los demás Regiones prohibidas; típicamente solo residuos Glicina.	

Información Adicional

Las estructuras proteicas de alta calidad seleccionadas para generar el mapa estadístico Ramachandran fueron obtenidas de la lista de 685 proteínas establecidas por Hobohm and Sander y muestran al menos 25% de similitud en secuencia desde octubre de 1997 en sus versiones PDB. (Sander, 2010; U, Hobohm, 1992; U,Hobohm, 1994)

Estudio Bioquímico de TLR-8.

Se realizó un mapeo completo de las propiedades bioquímicas de TLR-8 al modelo virtual (Gráfica 4).

La gráfica de Potencial Eléctrico revela propiedades particulares en ciertas regiones que no son fácilmente perceptibles en las otras gráficas, la zona intensamente azul observada delata una región altamente electronegativa que puede representar un potencial sitio activo.

En general se observó que la mayor actividad farmacofórica característica de la bioquímica de TLR-8 proviene del área interior del receptor, debido a una gran presencia de aminoácidos altamente polares como Arginina y Asparagina, que probablemente tienen interacción directa con los residuos uracilo presentes en las cadenas de ARN simple propias de los virus.

Descripción Farmacofórica de SEQ1.

La Tabla 1 describe las características físico-químicas encontradas para CL075 como producto del modelaje molecular realizado a este.

CL075 se usa actualmente en ensayos de vacunas como un potente coadyuvante, estimulante de la respuesta inmune para péptidos experimentales.

Puede observarse que su CLOGP es cercano a 5, el valor 3.86 se considera como muy bueno y supera al valor promedio de las drogas aprobadas por la FDA (2.56).

La Gráfica No. 5 describe la estructura electrostática de CL075, esta información es importante para entender las interacciones enzima-ligando durante el docking realizado a este compuesto contra TLR-8.

Puede observarse que CL075 posee grupos farmacofóricos muy activos electrostáticamente (principalmente amino) que mimetizan el tipo de estructura química presente en los grupos uracilo, los cuales son detectados por TLR-8.

La gráfica No. 6 muestra las propiedades bioquímicas de CL075 y en ella se puede apreciar que este posee un lado hidrófobo y un lado hidrófilo.

El mapa de hidrógenos dadores y aceptores se complementa con el análisis electrostático señalando, que son los grupos aminos los formadores de Puentes de Hidrógeno, siendo entonces esta la característica farmacofórica sobresaliente de este compuesto.

Propiedades farmacológicas de SEQ 1 CL075.

CL075 (conocido también bajo el nombre comercial 3M002) es un derivado de tiazoloquinolona que estimula TLR-8 en las células mononucleares de sangre periférica. Activa NF-kB y activa preferentemente la producción de TNF-a y IL-12.

CL075 también parece inducir la secreción de IFN a través de TLR-7 pero en menor medida.

Para ver una lista de otros estimulantes sintéticos de TLR-8 consultar la sección de Anexos.

Docking TLR8-SEQ1.

Se utilizó un proto-modelo (*protomol*) para el Receptor Tipo Toll-8 (TLR-8).

En la Gráfica 8 izquierda, el proto-modelo se puede apreciar como un área de volumen tridimensional en color gris que se ubica en el centro del TLR-8.

TLR-8 a su vez está representado en esquema de barras y bolas.

Una vez construido el proto-modelo, fue posible encontrar fácilmente las mejores posiciones de enlace.

En la gráfica derecha se muestra el enlace de CL075 a TLR-8 que presentó los mejores valores de unión enzima-ligando.

CL075 está representado en esquema de barras y bolas rodeado por un campo de van der Waals mapeado con una superficie de potencial electrostático.

TLR-8 se representa simplemente en esquema de barras y líneas.

Como producto del Docking entre TLR-8 y CL075, fue posible determinar áreas sensibles al enlace entre CL075 y TLR-8, dichas áreas sensibles se han establecido como regiones de enlace probables para CL075 en este receptor.

Se encontró que TLR-8 tiene una estructura partida en dos regiones, dada su forma curva-semicircular, se distingue una región interna compuesta por aminoácidos altamente reactivos, que son fácilmente identificados en sitios de reacción enzimática como Arginina, Asparagina, etc. Esta área se encuentra cubriendo la totalidad de esta zona interna.

Como puede observarse en la sección [Docking TLR8-SEQ1] en la Gráfica 8 [Protomol de TLR-8] en donde el proto-modelo cubre esta zona.

Por tanto se encontró que por lo menos los mejores 10 docking enzima-ligando reportados, poseen valores de evaluación química y de unión enzima-ligando muy semejantes.

Se considera que los resultados obtenidos por el programa SurflexDock y reportados como primera posición en las evaluaciones, son producto de una mejor conformación encontrada por el programa en un sitio específico del receptor, esto debido a la notable similitud entre todas las evaluaciones como se muestra en las gráficas siguientes.

En la Gráfica 9 (Docking TLR8-CL075-3 primeras posiciones óptimas) el ligando CL075 se encuentra representado en color rojo, mientras que TLR-8 en color verde. Pueden observarse dos sitios de unión diferentes de CL075 en la enzima para estas 3 primeras posiciones.

Mientras que la Gráfica 10 (Docking TLR8-CL075-Mejor interacción encontrada) muestra un detalle de las interacciones electrostáticas entre CL075 y TLR-8.

En esta gráfica, CL075 está representado en una volumetría de fuerzas de van der Waals y los colores representan la clase de átomo, verde H, azul N, amarillo S. Puede verse un Puente de Hidrógeno en CL075 representado por un color celeste. De forma semejante, TLR-8 se encuentra representado por una volumetría de fuerzas de van der Waals mapeado con un potencial eléctrico en su superficie, de manera que se puede ver fácilmente el nivel de penetración que alcanza CL075 en TLR-8 y el tipo de interacciones que se desarrollan, entre ellas, el grupo amino (NH_2) presente en CL075 forma Puentes de Hidrógeno con una cetona presente entre los aminoácidos de TLR-8; el grupo sulfuro se encuentra estabilizado con una molécula de Arginina; el grupo etilo en CL075 parece interactuar con otros grupos polares en TLR-8, esto explica algunos valores *polar* (o de interacción polar) en la Tabla 2 elevados entre la enzima y el ligando.

En la Gráfica 11, TLR-8 se encuentra representado en una volumetría de van der Waals opaca y mapeado en su superficie con potencial electrostático, en donde el color azul representa áreas más electronegativas y el color rojo las más electropositivas (ver escala a la izquierda).

CL075 se encuentra representado en esquema de bolas y barras, se puede ver como el área aromática de CL075 interactúa con áreas más neutras y el área amino de CL075 forma Puentes de Hidrógeno. A su vez el Azufre se orienta hacia un área más electropositiva.

En el caso de la cadena lateral carbonada de CL075, no se encuentra en posición favorable, pero el efecto inductivo de los átomos de N y S en CL075 mejora según la posición encontrada por el confórmero.

En la Tabla 2 (Análisis de Evaluaciones a las mejores conformaciones del docking) la columna "Total" se refiere a un sistema de evaluación semejante que toma en cuenta la sumatoria de los otros tres factores. Según estas evaluaciones la mejor posición tiene un valor de 3.41.

La Tabla 3 Muestra los mejores conformeros encontrados para el docking CL075-TLR8 respecto a sus evaluaciones fisicoquímicas.

Los primeros dos conformeros de la lista componen la mayor probabilidad de geometría para CL075 según estos resultados.

Una simplificación de todas las evaluaciones se muestra en la Tabla 4, en donde a cada conformero se le ha asignado 1 punto por cada valor fisicoquímico considerado como óptimo.

Las evaluaciones de consenso son evaluadas entre 1 y 5, donde 5 significa que todos los parámetros que componen la evaluación consenso (G Score, D Score, Chem Score, etc.), son buenos. Si la evaluación se encuentra entre 3-5 el candidato debe evaluarse, si se encuentra con un valor de 0, el candidato se considera malo y debe descartarse.

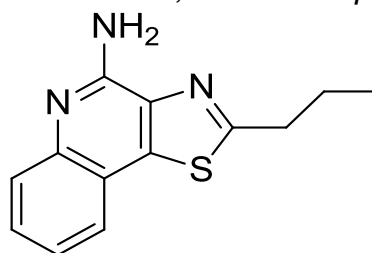
Análisis de Aminoácidos de Interacción.

Para CL075 se encontraron varios aminoácidos de interacción, debido a que este puede encontrarse bien ubicado en varias zonas de TLR-8.

Sin embargo, se analizan aquí las primeras tres posiciones consideradas como optimas entre la lista obtenida de conformeros y que por tanto poseen una alta probabilidad de ser el sitio activo de elección en un escenario real.

En el caso de CL075_000 los aminoácidos de interacción fueron ASN484, sus grupos amino y carboxilo interactúan con el anillo aromático y la cadena alifática de CL075 respectivamente. PHE 485 posee la misma interacción entre su grupo carboxilo y la cadena alifática de CL075.

Gráfica 31 CL075, estructura química.



También se considera importante la acción de ARG 483 que posee una interacción cercana de su grupo de cadena lateral con los átomos de N y S en CL075.

En los casos de CL075_001 y CL075_002, las interacciones cercanas para CL075_001 son LEU 666, SER 665, ASP 645 donde estos aportan sus grupos carboxilo a los anillos aromáticos de CL075.

Mientras que en el caso de CL075_002, TRP 642, ASP 644 y ASN 643, estos aportan sus grupos amino de cadena y de grupo R a los anillos heteroatómicos de CL075 especialmente orientados a los grupos S y N.

Tanto CL075_001 como CL075_002 se encuentran ubicados en la misma posición en el docking realizado a TLR-8 por lo que se analizan juntos desde el punto de vista de que la posición de CL075 en este sitio puede cambiar.

Diseño de una secuencia peptídica con base en gp120 región variable 3 de gp120 de VIH-1.

SEQ 3 fue diseñada en base a una secuencia de la región variable 3 de gp120 de VIH (V3).

Previo al diseño se escribió un programa en lenguaje C esperando encontrar mejores secuencias peptídicas de enlace para DR1 que es el receptor tipo MHC clase II presente en la células dendríticas.

El programa fue aplicado a la base de datos de secuencias peptídicas *Protein* de NCBI (*The National Center for Biotechnology Information advances science and health*, de Estados Unidos).

En la sección Anexos, se encuentra el programa escrito para la determinación de Inmunógenos en secuencias V3. Se estudiaron 60 secuencias presentes en la base de datos.

Los parámetros de búsqueda del programa se centraron en identificar cualquier residuo en las posiciones farmacofóricas determinadas por la presencia de formadores de Puentes de Hidrógeno. No se encontró ninguna secuencia coincidente con estos parámetros de búsqueda.

Este resultado es concordante con el docking realizado a una secuencia estándar V3 en el receptor MHC clase II DR1 que reveló una muy baja afinidad del segmento V3 por DR1.

Entre los motivos principales de esta baja afinidad, se encuentran tanto la conformación terciaria de V3 la cual es semejante a una V, así como al hecho de que las secuencias V3 de gp120 todas carecen de la presencia de alguno de los formadores de Puentes de Hidrógeno importantes para el enlace a DR1.

Cabe resaltar que para que una secuencia peptídica pueda estimular la creación de anticuerpos, también se necesita que el receptor de la célula B o CD4 pueda reconocer el segmento ligándose exitosamente en una complejo Receptor B-peptido-DR1. Los detalles se estudian a continuación.

Para la determinación de las secuencias peptídicas que pueden ser utilizadas como potenciales inmunógenos, fue necesario realizar un análisis farmacofórico sobre los grupos químicos funcionales presentes en las cadenas R de los aminoácidos presentes en el sitio activo de DR1 y que entran en contacto directo con las secuencias peptídicas que crean inmunidad.

En el trabajo de Zavala y colaboradores en 2004, se determinaron las posiciones de aminoácidos farmacofóricamente importantes. Seguidamente, se estudió cuáles de estos aminoácidos pueden tener aminoácidos farmacofóricamente equivalentes para ser substituidos en estas posiciones con el fin de "mimetizar" el péptido V3 original con uno no nativo, que posee diferentes aminoácidos y que es capaz de ligarse efectivamente a DR1 y estimular la producción de un anticuerpo que neutralice a este péptido y a la secuencia V3.

A continuación se presenta una secuencia gag que posee una conocida actividad inmune.

GAG PRO GLU VAL* ILE PRO MET* PHE SER* ALA LEU SER* GLU GLY PG 13 AA

Donde gag tiene 13 aminoácidos y se ha comprobado que se enlaza exitosamente a DR1.

Se pueden añadir otros 3 aminoácidos para complementar la secuencia normal de 16 aminoácidos que se enlazan a DR1 haciendo un pg 16.

Pg13 es inactivo, a pesar de que contiene las posiciones clave y que se enlaza exitosamente a DR1. La falta de éxito, probablemente se encuentra en el intercambio peptídico entre DR1 y TCells.

Equivalencias importantes para DR1

Grupos R

VALINA: -CH CH₃ CH₃

METIONINA: -CH₂ CH₂ S CH₃

SERINA: CH (NH₂) CH₂ OH

EQUIVALENTES:

ILE LEU ALA

PHE CYS TRP HIS

THR CYS ASP GLU ASN

Diseño de SEQ 3.

La secuencia objetivo de VIH-1 estudiada fue la región variable 3 de gp120.

Dentro de esta, se tomó una secuencia previamente reportada por X.JIANG y sus colaboradores en 2010, en el archivo .pdb presente en Protein Data Bank bajo el código 3MLZ y que se obtuvo por medio de análisis por difracción de rayos X.

De este se extrajo la siguiente secuencia:

V3 THR ARG LYS GLY ILE ILE GLY PRO ARG GLY ALA PHE THR ALA THR GLY GLN ILE THR GLY ASP.

De la misma manera, se extrajo una secuencia de un segmento gag de VIH-1, el cual estaba presente en el archivo 1SJH.pdb también presente en Protein Data Bank y provisto por Z. ZAVALA-RUIZ, del cual también se extrajo la estructura tridimensional virtual de HLA-DR1. La secuencia gag fue la siguiente:

GAG PRO GLU VAL* ILE PRO MET* PHE SER* ALA LEU SER* GLU GLY

Donde el signo (*) resalta las posiciones con grupos farmacofóricos importantes para el correcto enlace proteína-ligando.

Condiciones:

Para DR1

P1 y P6 deben ser hidrofobicos, P4, P7 y P9 pueden contribuir, estos atributos son específicos para la secuencia GAG estudiada por Zavala-Ruiz, sin embargo se decidió utilizarlos como base para la incorporación de V3.

Para el correcto enlace Células T-SEQ 3:

“La remoción de residuos adicionales de tanto las terminaciones C o N de la secuencia gag derivada (de longitud 16 aminoácidos) PEVIPMFSALSEGATP (Gag[PP16]) resulta en una abrogación de la activación de las células T” (Zavala *et al.* 2004).

“La horquilla C-terminal es requerida por la activación de las células T. La sustitución de Alanina por las posiciones 1, 2 5 y 13 tienen dramáticos efectos en la adhesión del péptido.” (Zavala *et al.* 2004).

Las anteriores limitantes se encuentran en contexto con la formación de Puentes de Hidrógeno que estabilizan el péptido huésped en HLA-DR1, por lo cual se estudió para el diseño de la secuencia V3 entrante, tratar de conservar la presencia de estos Puentes de Hidrógeno en las posiciones mencionadas, como también la presencia de grupos lipofílicos que puedan interactuar favorablemente con el sitio activo de la enzima receptora.

Al analizar en detalle las interacciones lipofílicas de los segmentos determinantes del residuo GAG dentro de DR1, se puede observar que:

Las interacciones de Serina 44 (P9), tienen contactos lipofílicos cercanos con MET73, TRP9 y TRP61.

Sin embargo, los Puentes de Hidrogeno que forma SER44 se describe de la siguiente forma:

NH dador a C=O en ASN69.

ASN69 aceptor a NH dador en SER44.

Entre las interacciones de SER 41 (P6) la más importante es el Puente de Hidrógeno formado por:

OH dador en SER42 a A/ASP66 EN OCO₂.

Las interacciones MET 39 con ASN 62 y GLN 9 también son de formación de Puentes de Hidrogeno. Estas son:

ASN 62 Nam H dador a O aceptor en Met39.

GLN 9 Nam H dador a O aceptor en MET 39.

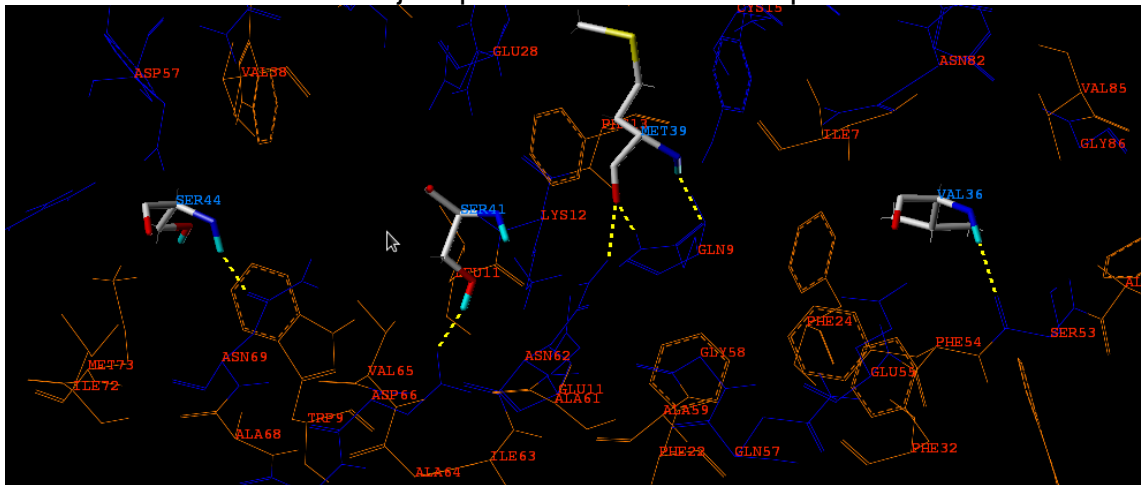
GLN 9 O=C aceptor de H Nam dador en MET 39.

Las interacciones en VAL 36 de Puentes de Hidrógeno encontradas fueron con SER 53 en gag:

SER53 O=C aceptor de H Nam en VAL 36.

Sin embargo en VAL 36 también es evidente la interacción alifática de su grupo R con VAL 85 y con GLN9 en gag.

Gráfica 32 Formación de puentes de hidrógeno entre GAG de VIH-1 y HLA-DR1. Aminoácidos en color azul representan cadenas R polares. Aminoácidos en color Naranja representan cadenas R apolares.



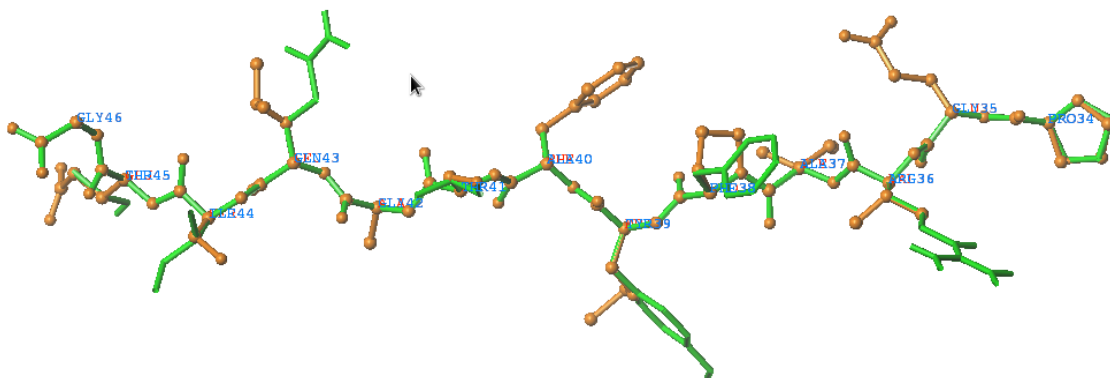
Superposición de Secuencias

gag	PRO GLU VAL* ILE PRO MET* PHE SER* ALA LEU SER* GLU GLY
v3-01	PRO GLY ARG- ALA PHE TYR+ ALA THR+ GLY GLN ILE- THR GLY

El signo (-) significa alguna discordancia, el signo (+), acierto relativo, (?) no se ha estimado el efecto de esta cadena lateral.

En el caso Valina-Arginina, en ambos existe la posibilidad de formar Puentes de Hidrógeno, sin embargo Arginina es considerablemente diferente, además de que arginina normalmente es un donador de Hidrógeno.

Gráfica 33 Superposición de Secuencias durante el Diseño de SEQ 3, V3-GAG de VIH-1.



En verde se aprecia V3, mientras que en color naranja GAG, las líneas verdes con puntos naranja son los átomos coincidentes entre ambas secuencias. El esqueleto aminoacídico de V3 ha sido forzado a coincidir con la estructura terciaria de GAG.

Entre Metionina y Tirocina, ambos poseen capacidades relativas como donantes, Tirocina posee un grupo fenilo que la hace hábil para interactuar en ambientes lipofílicos y además tiene un OH que es un buen dador para formar Puentes de Hidrógeno.

Serina, que posee un grupo alcohol CH_2OH , encuentra una diferencia volumétrica significativa comparada contra THR.

El caso más discrepante podría ser la segunda molécula de Serina, que tiene por diferencia a una Isoleucina, la cual es totalmente hidrófoba.

V3-M03 (SEQ3).

V3-M03 es el mutante diseñado en función de la secuencia de V3. V3-M03 contiene 1 mutación que es ILE/SER.

La Isoleucina en posición 12 se ha sustituido por un grupo formador de Puentes de Hidrógeno, adicionalmente se ha utilizado ASP para extender la longitud de la secuencia a 14 aminoácidos, de esta manera se ha logrado mejorar significativamente la habilidad de enlace del péptido V3 a DR1.

Además, esta secuencia evade el problema estructural geométrico referente a la forma de V del segmento variable 3 de gp120.

La forma no lineal del mismo se considera como uno de los mayores problemas de estabilidad-probabilidad para enlazarse de V3 a DR1.

v3-01	PRO GLY ARG- ALA PHE TYR+ ALA THR+ GLY GLN ILE- THR GLY
V3-M03	PRO GLY ARG? ALA PHE TYR+ ALA THR* GLY GLN <u>SER</u> THR GLY ASP
V3-M03inverso	ASP GLY THR- SER GLN GLY- THR ALA- TYR PHE ALA- ARG GLY PRO
Refx	PRO PRO SER* GLN GLU ALA- SEP LEU- LYS GLU TYR* ALA PRO PRO ALA

Se ha utilizado otro esquema de enlace expresado en la secuencia Refx que pertenece a una secuencia extraída de un péptido enlazado exitosamente a DR1 en donde no se observan las típicas posiciones que forman Puentes de Hidrógeno previamente estudiadas en gag, y que sin embargo es muy estable.

Este nuevo esquema de enlace, que fue mimetizado en V3-M03, resultó en la formación de 5 Puentes de Hidrógeno que en teoría alcanzan una gran estabilidad. GAG posee en términos generales, una estabilidad mayor (ver Tabla 5).

Las colisiones de los confórmers de V3-M03 pueden interpretarse como una menor habilidad para encajar apropiadamente del péptido mutante respecto a GAG, V3 incluso encaja mejor que el péptido GAG, pero V3 no tiene las probabilidades de formación de enlaces estables que tiene GAG, por esto GAG es mejor evaluado en consenso respecto a V3.

V3-M03 se encuentra en un punto intermedio mostrando la segunda conformación de este como muy mala con -8 puntos en sus evaluaciones de choque donde el valor óptimo es 0.

La evaluación de choque de V3-M03 se ve compensada por las evaluaciones fisicoquímicas que miden las energías internas y de enlace de Puentes de Hidrógeno (Punteos D y G, tablas 7 y 8).

Estas evaluaciones son determinantes para la predicción teórica de la habilidad de ligarse de V3-M03 a DR1.

El punteo D, que relaciona las interacciones electrostáticas entre V3-M03 y DR1 en forma global, se encuentra en la escala de -160 kcal/mol para V3-M03, -500 para GAG y -40 para V3, siendo V3 el menos estable debido a que es el que posee la menor energía libre de enlace.

De esta forma, es probable comprender la capacidad que posee V3 para encontrar interacciones electrostáticas favorables respecto a GAG y a V3.

El punteo G, que es un término que relaciona directamente la energía interna y la fuerza de enlace de Puentes de Hidrógeno, rinde un valor promedio de -420 unidades para V3-M03, alrededor de -500 para GAG y -40 para V3.

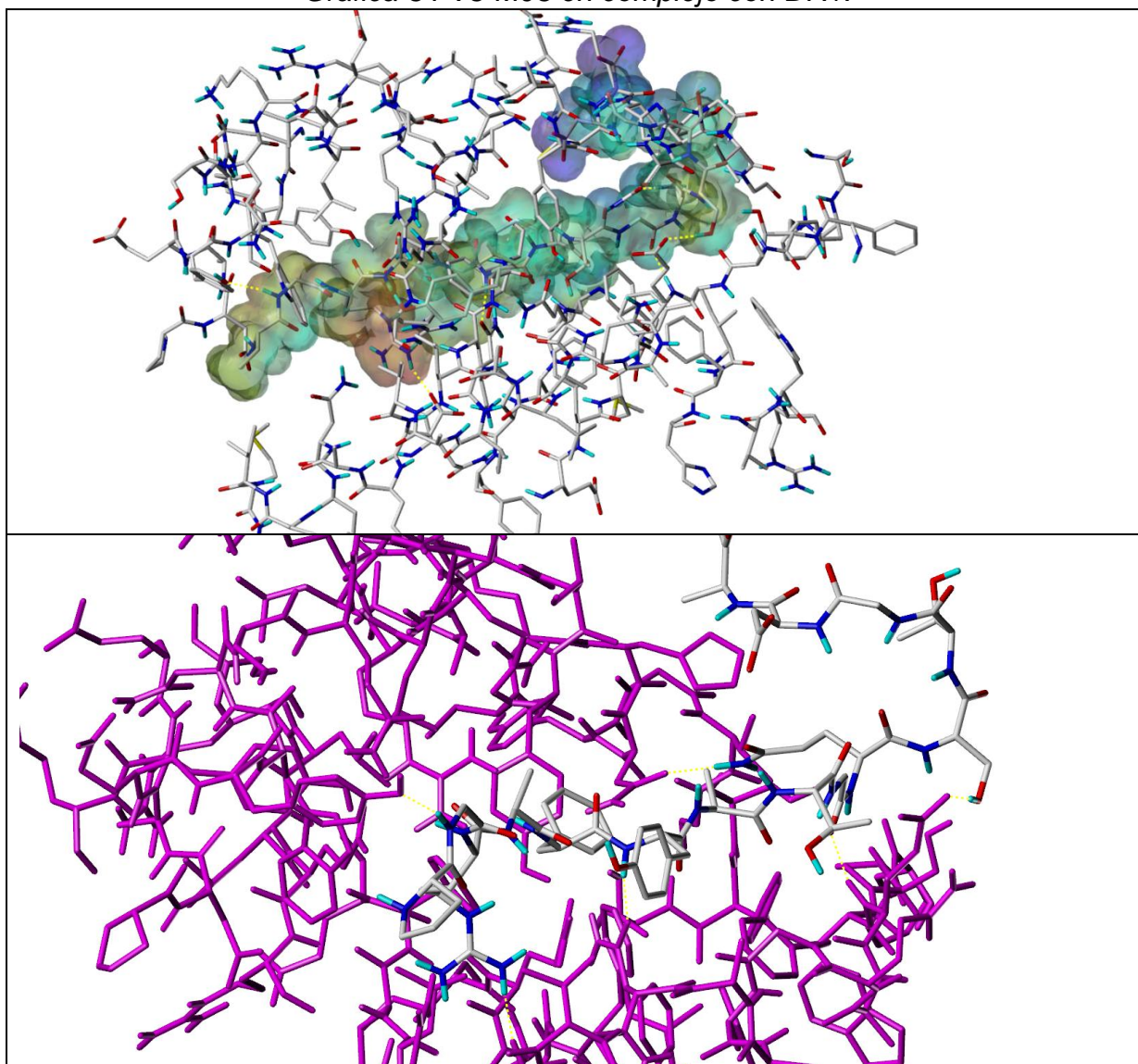
Estos datos muestran de forma más clara, que es posible teóricamente alcanzar una estabilidad de enlace para V3-M03 muy semejante al péptido GAG, lo que describe a este mutante como un potencial péptido capaz de crear una respuesta inmune.

Los valores estadísticos globales de evaluación para V3-M03 se reflejan en los punteos globales para los 20 mejores confórmeros de los 3 péptidos (Tabla 9).

En esta tabla, puede observarse que 11 de los 20 confórmeros del péptido GAG poseen las 5 evaluaciones fisicoquímicas con un punteo excelente, V3 solo posee 1, y V3-M03 posee 4.

A pesar de que la evaluación global parece mala para V3-M03, es necesario recalcar que en esta evaluación global se le otorga igual importancia a todas las evaluaciones, pero las más determinantes para la formación de enlace en parámetros fisicoquímicos pueden ser el Punteo G y D.

Gráfica 34 V3-M03 en complejo con DR1.



Arriba de la grafica 34: Se muestra únicamente el sitio activo de DR1 en enlace con V3-M03. V3-M03, que está cubierto por un campo de van der Waals mapeado con un campo electrostático.

Abajo: Sitio Activo de DR1 (color morado) en enlace con V3-M03, sección lateral. Puede observarse que V3-M03 forma 5 Puentes de Hidrógeno con DR1 y que V3-M03 se encuentra ubicado en una posición horizontal respecto a la abertura que crea el sitio activo de DR1. Puede observarse también que V3-M03 no es lineal, una parte del péptido sale de DR1, esto es conveniente puesto que puede facilitar la formación del complejo DR1-V3-M03-Receptor de células B/T.

Modelaje de V3.

El modelaje de SEQ3 se realizó dentro del proceso de Docking, debido a que el subprograma Surfex-dock incorporado en SYBYL X (de Tripos) permite realizar un pre-modelaje y un post-modelaje a las estructuras tanto ligando como enzima utilizando el algoritmo POWELL desarrollado por el mismo programa.

Los detalles de las minimizaciones energéticas realizadas por SYBYL se observan en la sección de resultados:

El modelaje de SEQ 3, en donde se muestran los detalles del docking para la secuencia GAG, la cual también se sometió a docking y modelaje como punto de referencia para la secuencia V3 estudiada.

Docking de V3.

Utilizando Surfex-Dock (subprograma de SYBYL X), se determinó que el segmento Arginina de la secuencia V3 estudiada, provocó múltiples colisiones internas dentro del sitio del ligando, por lo que en teoría, indicaría que el péptido/ligando podría ser expulsado de la ranura de DR1.

Surflex-Dock fue hábil al predecir correctamente la conformación terciaria mostrada por la secuencia de 13 aminoácidos extraída de V3 que está en concordancia con los datos experimentales obtenidos por cristalografía de rayos X.

Los resultados de la comparación de *docking* realizados tanto a GAG como al segmento V3 de 13 aminoácidos, se muestran en las Tablas 5-9.

Es necesario crear más diseños de secuencias que mimeticen exitosamente a V3 y que sean hábiles de unirse, tanto a DR1 como a los receptores de los linfocitos T. Existe el problema de que una secuencia hábil de enlazarse a DR1, puede no serlo para enlazarse a los receptores de las células T/B y esta investigación solamente se ha enfocado en la relación péptido-DR1.

Basándose en el punteo global clasificado por SYBYL para los péptidos evaluados (Tabla 9), el índice marca que en V3 solamente se ha obtenido una conformación estable de 20 mejores seleccionadas, mientras que GAG que es una estructura obtenida por cristalografía de Rayos X y experimentalmente corroborada como estable, Surfex-Dock predijo coherentemente que 12 de 18 de sus conformaciones más probables son estables.

Esto se puede interpretar como la necesidad de una mejora en la secuencia V3. Como se ha expuesto antes, ARG puede ser uno de los aminoácidos responsables de esta inestabilidad teórica, sin embargo la prueba de la inestabilidad ocasionada

por la falta de formación correcta de Puentes de Hidrógeno en puntos farmacofóricos clave se observa en las primeras dos filas de cada una de las tablas 5-8 en donde se han evaluado los parámetros fisicoquímicos y estéricos de este docking.

Por ejemplo, al observar el Punteo D (Tabla No. 8) se observan los valores de las primeras dos filas para V3 y para GAG, la diferencia de energía interna de enlace es superior a -600 unidades, que se considera como una diferencia muy notable (Para una revisión bibliográfica de este tema consultar referencias 61-64).

Resultados del Docking SEQ2- Langerina.

A- Epítotos en gp120 para el receptor Langerina.

Descripción de las propiedades bioquímicas y farmacofóricas de gp120.

El análisis de gp120 se ha desarrollado mediante el mapeo topológico de la enzima utilizando varios algoritmos matemáticos para describir la relativa actividad, tanto bioquímica como farmacofórica de gp120.

Los parámetros se encuentran representados en la Gráfica 13, donde cabe resaltar que el potencial lipofílico general de gp120 es neutro, el segmento V3 es relativamente neutral, tomando en cuenta las cargas electrostáticas superficiales.

Gp120 posee moléculas de manosa en su superficie, que están ligadas a gp120. Estas estructuras se aprecian en la Gráfica 14, señaladas en color rojo, y éstas son las responsables del reconocimiento del receptor Langerina presente en las células de Langerhans.

Captura de VIH-1 por medio de las Células Dendríticas:

La captura se lleva a cabo principalmente por dos tipos de receptores:

- Fc-receptors
- Receptores tipo Lectina.

Adicionalmente, es necesario indicar que interviene en la superficie de las células dendríticas el receptor CD4. La captura de VIH no está determinada por un solo tipo de receptor, sino por la colaboración de estos.

Algunos datos parecen indicar que la colaboración de CD4 en la captura de VIH induce a la infección.

Por otra parte, la colaboración de los receptores tipo Lectina pueden inducir a la transfección de Linfocitos por medio de las células dendríticas. Los receptores tipo Lectina que intervienen en estos procesos son dos:

- DC-SIGN (puede encontrarse también bajo el nombre DCSIGNR).
- Langerina (CD207).

El receptor Langerina se encuentra presente en las Células de Langerhans, que es un receptor de reconocimiento de patrones asociados a patógeno para manosa. Mediante este, las células de Langerhans reconocen al VIH-1 que posee manosa en gp120.

Las células dendríticas en general, procesan virus mediante la endocitosis posterior al anclaje de estos a los receptores asociados a patógenos. TLR1-3 parecen estar dedicados a la captura de otra serie de patógenos como bacterianos, fúngicos, etc.

Una vez que un virus ha sido endocitado, procede la formación del endosoma dentro del cual se degrada el virus y es liberado el código genético que es ssRNA (single strand RNA).

Posterior a la liberación de este ssRNA procede la captura por medio de TLR-8, el cual es un receptor específico para ssRNA.

El enlace de TLR-8 activa una señalización específica y la liberación de interferones (I Wu et al. 2006).

Las estructuras de manosa encontradas la cubierta de gp120 son:

- Man9GlcNAc2
- Man1-Man2

Las estructuras de ambas secuencias fueron obtenidas de los archivos tipo *protein data bank* generados mediante cristalografía de Rayos X y reportados en el informe de D. A. Calarese y sus colaboradores en 2003 (ver Gráfica 15).

Las posiciones de gp120 que poseen estructuras manosa son descritas en la Gráfica 14 en estructura de líneas rojas.

Propiedades Físicoquímicas de SEQ2 (Manosa).

Se realizó una minimización energética molecular para Man9GlcNAc2, y se han realizado los cálculos mecano-cuánticos para determinar Entropía, Capacidad Calorífica, Energía Interna, etc. (Ver Tabla 10).

El resultado de este modelaje ha sido aplicado para obtener información farmacofórica de estos compuestos.

Descripción farmacofórica de SEQ 2.

Se han obtenido descriptores farmacofóricos utilizando el programa SYBYL de Tripos y que se pueden observar en la Tabla 11.

La tabla muestra que estas azúcares no tienen buenas propiedades farmacofóricas y es debido a la falta de grupos donadores y pobre cantidad de aceptores. De cualquier forma, se considera que en el caso de MAN1_MAN2 su peso molecular es muy inferior al ideal (entre 500 y 700 umas), lo cual lo hace un mal grupo farmacofórico.

La necesidad de evaluar las características farmacofóricas y fisicoquímicas de las estructuras manosa, radica en el hecho de que estas son importantes para el reconocimiento de las células de Langerhans.

Se estima que es un potencial objetivo para el diseño de vacunas, desarrollar patrones que sean reconocidos por los receptores de estas células dendríticas con el fin de poder estudiar cómo controlar el procesamiento de antígenos dentro de estas células, para lo cual, estas estructuras manosa bien pueden servir como una "llave de acceso" al sistema de procesamiento antigénico, pues estas azúcares no solamente son un patrón molecular reconocido por estos receptores, sino también

pueden activar la producción de interleucinas e interferones, potenciando la respuesta inmune.

Adicionalmente, se han mapeado propiedades para Man9 en las gráficas 16-21, de cualquier manera, la complejidad de las estructuras de manosa se considera farmacofóricamente limitada, puesto que estas están compuestas básicamente por grupos alcohol alifático y éter.

También se han descrito las propiedades fisicoquímicas teóricas para Man9GlcNac2, obteniendo los siguientes resultados mediante el programa Gaussian 2009. Se han realizado los procesos de minimización y cálculo de frecuencias para Man9GlcNac2, tipo PM3. Estos resultados han servido para construir los mapas tridimensionales farmacofóricos para este compuesto.

Docking SEQ2 Manosa-Langerina.

La búsqueda del sitio activo para la SEQ2, que se ha definido como una secuencia de estructuras de manosas en su respectivo receptor que es Langerina, y no como una secuencia peptídica.

Dos grupos de investigación paralelos han presentado resultados experimentales sobre el estudio de complejos Langerina-Manosa, por medio de difracción de Rayos X. Los datos obtenidos por Feinberg & Taylor y los reportados por Skerra & Schiefner están en concordancia con los datos teóricos obtenidos por nosotros, en donde se ha realizado un "blind docking", que es una búsqueda a ciegas que ha determinado exitosamente el punto de unión enzima-ligando (Gráfica 30 y Tablas 12-14). Aunque las conformaciones encontradas por el programa Surflex-Dock no han sido óptimas, debido a que no se ha definido el Calcio dentro de la búsqueda. Sin embargo, la energía interna del enlace enzima-ligando en general, puede apreciarse en la tabla 13 que es buena, y a pesar de que las conformaciones no son las óptimas y a la carencia de definición del Calcio dentro del tipo de docking realizado, los valores de choque (crash) e índices polares de interacción enzima-ligando, se consideran como buenos.

La conformación óptima se estima es la propuesta por los archivos pdb 3P5D-I y 3P7F-H, que son los resultados de Feinberg H. & Taylor M. reportados en diciembre de 2010 y de Skerra A. & Schiefner y que han sido publicados en Protein Data Bank en estas series de archivos.

9. CONCLUSIONES

9.1 Se ha encontrado que en el segmento V3 de gp120 del Virus de Inmunodeficiencia Humana, existe una carencia de puntos farmacofóricos clave para enlazarse a los receptores tipo MHC II DR1. Esto dificulta la habilidad del segmento V3 para ser un péptido estimulante de una respuesta inmune eficaz.

9.2 Sesenta (60) segmentos V3 de gp120 de diferentes cepas, han sido estudiados en su habilidad de ligarse a DR1. Todos ellos forman complejos V3-DR1 altamente inestables al sitio de enlace de DR1 con respecto a una secuencia de referencia GAG de VIH-1 conocida por crear respuesta inmune a través de DR1.

9.3 Ha sido necesario mimetizar el péptido V3 con un homólogo que sea capaz de ligarse a al receptor MHC clase II DR1 de las células dendríticas y/o de Langerhans. Sin embargo, dicho péptido debe ser capaz no solo de cumplir con los puntos farmacofóricos más importantes de enlace, sino también sortear el quiebre en forma de V que posee la estructura terciaria del segmento V3 y a su vez, este segmento debe ser capaz de ligarse a los puntos clave que existen en los receptores de células Th+ CD4 y/o B.

9.4 El péptido mutante de V3 diseñado, teóricamente se enlaza al receptor MHC clase II DR1 con una eficiencia semejante a la que se enlaza el péptido GAG y en donde se ha utilizado una descripción farmacofórica diferente a la del péptido GAG, logrando formar al menos 5 Puentes de Hidrógeno teóricos.

9.5 Se han encontrado una serie de coadyuvantes sintéticos que estimulan el receptor tipo Toll-8. Estos se utilizan actualmente en el diseño de vacunas como potenciadores de la respuesta inmune.

9.6 CL075 es uno de los estimulantes sintéticos de TLR-8 que es capaz de enlazarse *in silico*. El modelo virtual creado por homología de secuencias de TLR-8 posee una estructura con forma de herradura que enlaza CL075 en el perímetro interno de TLR8. Este modelo propone que dicho perímetro es rico en aminoácidos altamente polares como Arginina y Asparagina, los cuales facilitan la unión de secuencias virales simples de ARN ligándose por medio de los segmentos Uracilo de estas.

9.7 Se han estudiado los segmentos manosa presentes en la cobertura exterior de gp120. Dichos segmentos son hábiles de ligarse al receptor Langerina presente en las células de Langerhans. Dos grupos de investigación han presentado resultados de cristalografía de Rayos X de los complejos manosa-Langerina. Estos coinciden con los resultados teóricos aquí reportados.

9.8 Se propone que los segmentos de manosa presentes en la cobertura exterior de gp120, pueden ser un objetivo importante en el desarrollo de vacunas contra el VIH, puesto que el receptor Langerina es parte de los receptores de reconocimientos de patrones moleculares patógenos. Es posible que estos receptores sean una clave para el control del procesamiento antigénico en células dendríticas tipo Langerhans.

9.9 Las interacciones entre la secuencia peptídica diseñada y el receptor DR1 han quedado descritas por la estabilidad del péptido diseñado para ligarse al receptor. Las interacciones entre la secuencia peptídica diseñada y los segmentos manosa y/o la molécula CL075 son de formación de puentes de hidrógeno que se pueden disolver en medio ácido, por lo que se estima que estas moléculas no tienen interacción química relevante entre sí desde que en los gránulos de Birbeck las secreciones de lisozimas son ácidas.

9.10 Se concluye que la secuencia diseñada y las moléculas encontradas como receptores para TLR8 y la Langerina no deben unirse debido a que la unión de estas puede generar impedimento estérico y/o la inhabilidad completa del péptido para interactuar con el receptor. Se estima que la mejor manera de hacer un complejo de las moléculas creadas es utilizar otro mecanismo como la integración.

10. RECOMENDACIONES

10.1 Se recomienda estudiar otros segmentos importantes para la infección VIH-Linfocitos Th +CD4 como por ejemplo segmentos en gp41. Esto debido a que, la dificultad natural existente en DR1 para ligarse a segmentos V3 minimiza las probabilidades de estimular en forma natural el desarrollo de un anticuerpo capaz de neutralizar a V3 y por tanto a VIH. El estudio de mimética de péptidos es una alternativa que puede contribuir a hacer V3 un objetivo exitoso. Se considera que V3 sigue siendo uno de los objetivos favoritos para el desarrollo de vacunas por su alta importancia en el comienzo en el proceso de infección y por su relativa vulnerabilidad en exposición dentro de la estructura externa de VIH.

10.2 Se recomienda estudiar la posibilidad de desarrollar nano-cápsulas con receptores manosa que contengan en su interior un péptido de diseño para estimular la respuesta inmune. La presencia de un coadyuvante como CL075 o una secuencia de uracilos es de suma importancia. Otros investigadores han comprobado que una secuencia peptídica por sí sola no crea una respuesta inmune. Los estimulantes de TLR8 se necesitan para estimular la diferenciación de células B y linfocitos Th2.

10.3 Se considera posible también desarrollar investigación a partir del diseño de nuevos ligandos para el receptor manosa de las células de Langerhans. Se considera que esta es una potencial puerta de acceso para el desarrollo de nuevos métodos de estímulo de inmunidad adaptativa. Dichos ligandos podrían ser utilizados como complementos dentro de nano-cápsulas, o simplemente como segmentos de moléculas de mayor tamaño. Otros receptores en las células dendríticas también pueden ser críticos para este objetivo.

10.4 Es recomendable hacer un estudio teórico del enlace de estos péptidos aquí descritos a los receptores de células Th CD4 y células B. El enlace de un péptido a un receptor DR1 no garantiza una respuesta inmune y es necesario detallar las habilidades farmacofóricas de los péptidos aquí estudiados respecto al receptor de linfocitos CD4.

11. BIBLIOGRAFÍA

Altfeld, M., M. M. Addo, E. S. Rosenberg, F. M. Hecht, P. K. Lee, M. Vogel, X. G. Yu, R. Draenert, M. N. Johnston, D. Strick, T. M. Allen, M. E. Feeney, J. O. Kahn, R. P. Sekaly, J. A. Levy, J. K. Rockstroh, P. J. Goulder, And B. D. Walker. 2003. Influence Of HLA-B57 On Clinical Presentation And Viral Control During Acute HIV-1 Infection. *AIDS* 17:2581–2591

Almeida, J. R., D. A. Price, L. Papagno, Z. A. Arkoub, D. Sauce, E. Bornstein, T. E. Asher, A. Samri, A. Schnuriger, I. Theodorou, D. Costagliola, C. Rouzioux, H. Agut, A. G. Marcelin, D. Douek, B. Autran, And V. Appay. 2007. Superior Control Of HIV-1 Replication By CD8₊ T Cells Is Reflected By Their Avidity, Polyfunctionality, And Clonal Turnover. *J. Exp. Med.* 204:2473–2485.

Akira, S., S. Uematsu, And O. Takeuchi. 2006. Pathogen Recognition And Innate Immunity. *Cell* 125:783–801.

Aguilar, A., Carrazana, Y. And Duarte, C. A. (2001) Impact Of Epitope Permutations In The Antibody Response Of Mice To A Multi-Epitope Polypeptide Of The V3 Loop Of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Biomol. Eng.* 18, 117–124

Bittle, J. L., Houghten, R. A., Alexander, H., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., Lerner, R. A., Rowlands, D. J. & Brown, F. (1982) *Nature (London)* 298, 30-33.

Bot, A., K. A. Smith, And M. Von Herrath. (2004). Molecular And Cellular Control Of T1/T2 Immunity At The Interface Between Antimicrobial Defense And Immune Pathology. *DNA Cell Biol.* 23:341–350.

Bette T. Korber,^{1,2*} Norman L. Letvin,³ And Barton F. Haynes⁴ (2009) MINIREVIEW T-Cell Vaccine Strategies For Human Immunodeficiency Virus, The Virus With A Thousand Faces *JOURNAL OF VIROLOGY*, Sept. 2009, P. 8300–8314 Vol. 83, No. 17

Bhattacharya, T., M. Daniels, D. Heckerman, B. Foley, N. Frahm, C. Kadie, J. Carlson, K. Yusim, B. McMahon, B. Gaschen, S. Mallal, J. I. Mullins, D. C. Nickle, J. Herbeck, C. Rousseau, G. H. Learn, T. Miura, C. Brander, B. Walker, And B. Korber. Founder Effects In The Assessment Of HIV Polymorphisms And HLA Allele Associations. *Science* 315:1583–1586. 2007.

Brumme, Z. L., C. J. Brumme, D. Heckerman, B. T. Korber, M. Daniels, J. Carlson, C. Kadie, T. Bhattacharya, C. Chui, J. Szinger, T. Mo, R. S. Hogg, J. S. Montaner, N. Frahm, C. Brander, B. D. Walker, And P. R. Harrigan. 2007. Evidence Of Differential HLA Class I-Mediated Viral Evolution In Functional And Accessory/Regulatory Genes Of HIV-1. *Plos Pathog.* 3:E94.

Carrascoza F., Cobar O. (2010) Diseño De Un Nuevo Fármaco Inhibidor De La Proteasa Presente En El Virus De Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 A Partir De 3 Antirretrovirales (Lopinavir, Darunavir, Tipranavir), Por Medio De Nanotecnología Computacional. Consejo Nacional De Ciencia Y Tecnología. Guatemala 2010.

Carrascoza, Vargas, Cobar. (2010) Elucidación Del Sitio De Reacción De Calyxaminas A Y B En La Acetilcolinesterasa Y Diseño De Un Fármaco Derivado De Calyxaminas A Y B Potencialmente Activo Contra El Alzheimer, Por Medio De Nanotecnología Computacional. Dirección General De Investigación USAC. Guatemala 2010.

Carrascoza F. (2009). Biochemical Description Of The Protein 66 (P66) Sub Domain Fingers Of The VIH-1 Reverse Transcriptase". Curso De Genética / Escuela De Biología/ Universidad De San Carlos De Guatemala 2009

Carter P (1986): Site-Directed Mutagenesis. *Biochem J* 1986, 237(1):1-7.

Conley, A. J., Conard, P., Bondy, S., Dolan, C. A., Hannah, J., Leanza, W. J., Marburg, S., Rivetna, M., Rusiecki, V. K., Sugg, E. E. Et Al. (1994) Immunogenicity Of Synthetic HIV-1 Gp120 V3-Loop Peptide-Conjugate Immunogens. *Vaccine* 12, 445–451

Carbone, F. R., And W. R. Heath.(2003). The Role Of Dendritic Cell Subsets In Immunity To Viruses. *Curr. Opin. Immunol.* 15:416–420.

De Jong, E. C., H. H. Smits, And M. L. Kapsenberg. (2005). Dendritic Cellmediated T Cell Polarization. *Springer Semin. Immunopathol.* 26:289–307.

Edwards AM, Arrowsmith CH, Christendat D, Dharamsi A, Friesen JD, Greenblatt JF, Vedadi M (2000): Protein Production: Feeding The Crystallographers And NMR Spectroscopists. *Nat Struct Biol* 2000, 7(Suppl):970-972.

Eichler J (2005): Synthetic Peptide Arrays And Peptide Combinatorial Libraries For The Exploration Of Protein-Ligand Interactions And The Design Of Protein Inhibitors. *Comb Chem High Throughput Screen* 2005, 8(2):135-143.

Emini, E. A., Schleif, W. A., Nunberg, J. H., Conley, A. J., Eda, Y., Tokiyoshi, S., Putney, S. D., Matsushita, S., Cobb, K. E., Jett, C. M. Et Al. (1992) Prevention Of HIV-1 Infection In Chimpanzees By Gp120 V3 Domain-Specific Monoclonal Antibody. *Nature* 355,728–730

Frank R (2002) : The SPOT-Synthesis Technique. Synthetic Peptide Arrays On Membrane Supports – Principles And Applications. *J Immunol Methods* 2002, 267(1):13-26.

Forsbach A. et al., 2008. Identification of RNA Sequence Motifs Stimulating Sequence-Specific TLR8-Dependent Immune Responses. *J. Immunol.*, 180: 3729-38

Fellay, J., K. V. Shianna, D. Ge, S. Colombo, B. Ledergerber, M. Weale, K. Zhang, C. Gumbs, A. Castagna, A. Cossarizza, A. Cozzi-Lepri, A. De Luca, P. Easterbrook, P. Francioli, S. Mallal, J. Martinez-Picado, J. M. Miro, N. Obel, J. P. Smith, J. Wyniger, P. Descombes, S. E. Antonarakis, N. L. Letvin, A. J. McMichael, B. F. Haynes, A. Telenti, And D. B. Goldstein. 2007. A Whole Genome Association Study Of Major Determinants For Host Control Of HIV-1. *Science* 317:944–947.

García Judith (2007). *Epidemióloga, FETP-GAP. Situación De La Epidemia De VIH-SIDA, Guatemala Enero 1984 - Octubre 2007* Centro Nacional De Epidemiología Guatemala, Octubre.

Galindo C (2007). *Informe Nacional Sobre Los Progresos Realizados En El Seguimiento A La Declaración De Compromiso Sobre El VIH Y SIDA – UNGASS Guatemala 2007*. Ministerio De Salud Pública Y Asistencia Social, Programa Nacional De Prevención Y Control De ITS, VIH Y SIDA. Guatemala 2007.

Geysen HM, Barteling SJ, Meloen RH (1985): Small Peptides Induce Antibodies With A Sequence And Structural Requirement For Binding Antigen Comparable To Antibodies Raised Against The Native Protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82(1):178-182.

Green, N., Alexander, H., Olson, O., Alexander, S., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G. & Lerner, R. A. (1982) *Cell* 28, 477-487.

Gorden, K. B., K. S. Gorski, S. J. Gibson, R. M. Kedl, W. C. Kieper, X. Qiu, M. A. Tomai, S. S. Alkan, And J. P. Vasilakos. (2005). Synthetic TLR Agonists Reveal Functional Differences Between Human TLR7 And TLR8. *J. Immunol.* 174:1259–1268.

Hopkins, P. A., And S. Sriskandan. (2005). Mammalian Toll-Like Receptors: To Immunity And Beyond. *J. Clin. Exp. Immunol.* 140:395–407. 828 Minireview Clin. Vaccine Immuno.

Halperin I, Wolfson H, Nussinov R (2003): Sitelight: Binding-Site Prediction Using Phage Display Libraries. *Protein Sci* 2003, 12(7):1344-1359.

H. Mario Geysen, Rob H. Meloent, And Simon J. Bartelint (1984) Use Of Peptide Synthesis To Probe Viral Antigens For Epitopes To Aresolution Of A Single Amino Acid (Antigenic Determinant/Foot-And-Mouth Disease Virus) *Biochemistry* Vol. 81, Pp. 3998-4002, July 1984

He X, Jabbari E (2006). Solid-Phase Synthesis Of Reactive Peptide Crosslinker By Selective Deprotection. *Protein Pept Lett.* 2006;13(7):715-8.

I Wu and Vineet N. KewalRamani Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination *L Nat Rev Immunol.* 2006 November; 6(11): 859–868.

Jiang, X., Burke, V., Totrov, M., Williams, C., Cardozo, T., Gorny, M.K., Zolla-Pazner, S., Kong, X.P. Conserved structural elements in the V3 crown of HIV-1 gp120. (2010) *Nat.Struct.Mol.Biol.* 17: 955-961.

Javaherian, K., Langlois, A. J., Mcdanal, C., Ross, K. L., Eckler, L. I., Jellis, C. L., Profy, A. T., Rusche, J. R., Bolognesi, D. P., Putney, S. D. Et Al. (1989) Principal Neutralizing Domain Of The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6768–6772

Kolaskar AS, Tongaonkar PC (1990): A Semi-Empirical Method For Prediction Of Antigenic Determinants On Protein Antigens. *FEBS Lett* 1990, 276(1–2):172-174.

Kapsenberg, M. L. (2003). Dendritic Cell Control Of Pathogen-Driven T-Cell Polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3:984–993.

Kopp, E., And R. Medzhitov. (2003). Recognition Of Microbial Infection By Toll-Like Receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 15:396–401.

Ken S. Rosenthal^{1*} And Daniel H. Zimmerman (2006) MINIREVIEW Vaccines: All Things Considered *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*, Aug. 2006, P. 821–829 Vol. 13, No. 8

Kaslow, R. A., M. Carrington, R. Apple, L. Park, A. Munoz, A. J. Saah, J. J. Goedert, C. Winkler, S. J. O'Brien, C. Rinaldo, R. Detels, W. Blattner, J. Phair, H. Erlich, And D. L. Mann. 1996. Influence Of Combinations Of Human Major Histocompatibility Complex Genes On The Course Of HIV-1 Infection. *Nat. Med.* 2:405–411.

Kausik CHAKRABORTY*, Venuka DURANI*, Edward Roshan MIRANDA*, Michael CITRON†, Xiaoping LIANG†, William SCHLEIF†, Joseph G. JOYCE*†1 And Raghavan VARADARAJAN*†‡1 (2006) Design Of Immunogens That Present The Crown Of The HIV-1 V3 Loop In A Conformation Competent To Generate 447 52D-Like Antibodies *Biochem. J.*

Lesley-Jane (1997) *Eales Immunology For Life Scientists Second Edition* University Of Surrey, Guildford. Editorial Willey. United Kindom 1997. Chapters 2,3,4,6.

Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. And Olson, A. J. (1998), Automated Docking Using A Lamarckian Genetic Algorithm And Empirical Binding Free Energy Function *J. Computational Chemistry*, **19**: 1639-1662

Moreau V, Granier C, Villard S, Laune D, Molina F (2006): Discontinuous Epitope Prediction Based On Mimotope Analysis. *Bioinformatics* 2006, 22(9):1088-1095.

Palucka, K., And J. Banchereau. (2002). How Dendritic Cells And Microbes Interact To Elicit Or Subvert Protective Immune Responses. *Curr. Opin. Immunol.* 14:420–431.

Pulendran, B., And R. Ahmed. (2006). Translating Innate Immunity Into Immunological Memory: Implications For Vaccine Development. *Cell* 124:849–863.

P. J. Goulder, T. Bhattacharya, D. E. Heckerman, B. T. Korber, And J. I. Mullins. 2008. HLA Class I-Driven Evolution Of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Proteome: Immune Escape And Viral Load. *J. Virol.* 82:6434–6446.

Pantophlet, R., Wilson, I. A. And Burton, D. R. (2003) Hyperglycosylated Mutants Of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Monomeric Gp120 As Novel Antigens For HIV Vaccine Design. *J. Virol.* 77, 5889–5901

Pantophlet, R. And Burton, D. R. (2003) Immunofocusing: Antigen Engineering To Promote The Induction Of HIV-Neutralizing Antibodies. *Trends Mol. Med.* 9, 468–473

Reineke U, Kramer A, Schneider-Mergener J (1999): Antigen Sequence and Library-Based Mapping Of Linear And Discontinuous Protein- Protein-Interaction Sites By Spot Synthesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999, 243:23-36.

Rousseau, C. M., M. G. Daniels, J. M. Carlson, C. Kadie, H. Crawford, A. Prendergast, P. Matthews, R. Payne, M. Rolland, D. N. Raugi, B. S. Maust, G. H. Learn, D. C. Nickle, H. Coovadia, T. Ndung'u, N. Frahm, C. Brander, B. D. Walker,

Rusche, J. R., Javaherian, K., Mcdanal, C., Petro, J., Lynn, D. L., Grimaila, R., Langlois, A., Gallo, R. C., Arthur, L. O., Fischinger, P. J. Et Al. (1988) Antibodies That Inhibit Fusion Of Human Immunodeficiency Virus-Infected Cells Bind A 24-Amino Acid Sequence Of The Viral Envelope, Gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 3198–3202

Richalet-Secordel, P. M., Deslandres, A., Plaue, S., You, B., Barre-Sinoussi, F. And Van Regenmortel, M. H. (1994) Cross-Reactive Potential Of Rabbit Antibodies Raised Against A Cyclic Peptide Representing A Chimeric V3 Loop Of HIV-1 Gp120 Studied By Biosensor Technique And ELISA. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 9, 77–87

Richalet-Secordel, P. M., Zeder-Lutz, G., Plaue, S., Sommermeyer-Leroux, G. And Van Regenmortel, M. H. (1994) Cross-Reactivity Of Monoclonal Antibodies To A Chimeric V3 Peptide Of HIV-1 With Peptide Analogues Studied By Biosensor Technology And ELISA. *J. Immunol. Methods* 176, 221–234

Schlaepfer Erika, Roberto F. Speck* (2008) Anti-HIV Activity Mediated By Natural Killer And CD8+ Cells After Toll-Like Receptor 7/8 Triggering *Plos ONE* | [Www.Plosone.Org](http://www.Plosone.Org) 1 April 2008 | Volume 3 | Issue 4 | E1999

Szklarz GD, Halpert JR (1997): Use Of Homology Modeling In Conjunction With Site-Directed Mutagenesis For Analysis Of Structurefunction Relationships Of Mammalian Cytochromes P450. *Life Sci* 1997, 61(26):2507-2520.

Sille, F. C. M., A. Visser, And M. Boes. (2005). T Cell Priming By Tissue-Derived Dendritic Cells: New Insights From Recent Murine Studies. *Cell. Immunol.* 237:77–85.

Stanfield, R. L., Gorny, M. K., Williams, C., Zolla-Pazner, S. And Wilson, I. A. (2004). Structural Rationale For The Broad Neutralization Of HIV-1 By Human Monoclonal Antibody 447-52D. *Structure* 12, 193–204

Sadegh-Nasseri et al. *Trends Immunol.* Author manuscript; available in PMC 2011 April 12.

Sadegh-Nasseri et al. Conformational heterogeneity of MHC class II induced upon binding to different peptides is a key regulator in antigen presentation and epitope selection. *Immunol Res.* Author manuscript; available in PMC 2011 April 12.

Tolman, R. L., Bednarek, M. A., Johnson, B. A., Leanza, W. J., Marburg, S., Underwood, D. J., Emini, E. A. And Conley, A. J. (1993) Cyclic V3-Loop-Related HIV-1 Conjugate Vaccines. Synthesis, Conformation And Immunological Properties. *Int. J. Pept. Protein Res.* 41, 455–466

U. Hobohm, M. Scharf, R. Schneider, C. Sander: "Selection of a representative set of structures from the Brookhaven Protein Data Bank," *Protein Science* 1992, 1, 409-417.

U. Hobohm and C. Sander: Enlarged representative set of protein structures, *Protein Science* 1994, 3, 522

Violaine Moreau, Cécile Fleury, Dominique Piquer, Christophe Nguyen, Nicolas Novali, Sylvie Villard, Daniel Laune, Claude Granier† And Franck Molina(2008) PEPOP: Computational Design Of Immunogenic Peptides *BMC Bioinformatics* 2008,

Wang, Y., M. Xu, M. Che, E. Von Hofe, A. Abbas, N. L. Kallinteris, X. Lu, Z. J. Liss, J. D. Forman, And G. G. Hillman. (2005). Curative Antitumor Immune Response Is Optimal With Tumor Irradiation Followed By Genetic Induction Of Major Histocompatibility Complex Class I And Class II Molecules And Suppression Of Ii Protein. *Hum. Gene Ther.* 16:187–199

Yan Xin Huang^{1,2}, Yong Li Bao^{*3}, Shu Yan Guo³, Yan Wang², Chun Guang Zhou² And Yu Xin Li^{*1,4}(2008) Software Pep-3D-Search: A Method For B-Cell Epitope Prediction Based On Mimotope Analysis *BMC Bioinformatics* 2008, :538

Zarixia Zavala-Ruiz†, Iwona Strug‡, Bruce D. Walker§, Philip J. Norris§, and Lawrence J. Stern A hairpin turn in a class II MHC-bound peptide orients residues outside the binding groove for T cell recognition. *PNAS* _ September 7, 2004 _ vol. 101 _ no. 36 _ 13279–13284

[Http://www.Biomedcentral.Com/1471-2105/9/538](http://www.Biomedcentral.Com/1471-2105/9/538)

[Http://www.Biomedcentral.Com/1471-2105/9/71](http://www.Biomedcentral.Com/1471-2105/9/71)

<http://www.sander.embl-heidelberg.de/pdbsel/explanation.html>

<http://www.invivogen.com/family.php?ID=244#groupe224>

12. ANEXOS

Descripción de las secuencias aminoacídicas de TLR8 modeladas hasta con el programa FUGUE

Cons.Sequence = Secuencia Consenso.
 gi = Secuencia Original de TLR8 humano.
 Model_s4_1 = Modelo exitosamente creado para estas secciones dentro de TLR8.

	1	11	21	31	41																																													
Cons.Sequence	M	K	E	S	S	L	Q	N	S	S	C	S	L	G	K	E	T	K	K	E	N	M	F	L	Q	S	S	M	L	T	C	I	F	L	L	I	S	G	S	C	E	L	C	A	E	E	N	F	S	R
gi	M	K	E	S	S	L	Q	N	S	S	C	S	L	G	K	E	T	K	K	E	N	M	F	L	Q	S	S	M	L	T	C	I	F	L	L	I	S	G	S	C	E	L	C	A	E	E	N	F	S	R
model_s4_1	-----																																																	

	51	61	71	81	91																																													
Cons.Sequence	S	Y	P	C	D	E	K	K	Q	N	D	S	V	I	A	E	C	S	N	R	R	L	Q	E	V	P	Q	T	V	G	K	Y	V	T	E	L	D	L	S	D	N	F	I	T	H	I	T	N	E	S
gi	S	Y	P	C	D	E	K	K	Q	N	D	S	V	I	A	E	C	S	N	R	R	L	Q	E	V	P	Q	T	V	G	K	Y	V	T	E	L	D	L	S	D	N	F	I	T	H	I	T	N	E	S
model_s4_1	-----																																																	

	101	111	121	131	141																																												
Cons.Sequence	F	Q	G	L	Q	N	L	T	K	I	N	L	N	H	N	P	N	V	Q	H	Q	N	G	N	P	G	I	Q	S	N	G	L	N	I	T	D	G	A	F	L	N	L	K	N	L	R	E	L	L
gi	F	Q	G	L	Q	N	L	T	K	I	N	L	N	H	N	P	N	V	Q	H	Q	N	G	N	P	G	I	Q	S	N	G	L	N	I	T	D	G	A	F	L	N	L	K	N	L	R	E	L	L
model_s4_1	-----																																																

	151	161	171	181	191																																												
Cons.Sequence	E	D	N	Q	L	P	Q	I	P	S	G	L	P	E	S	L	T	E	L	S	L	I	Q	N	N	I	N	I	T	K	E	G	I	S	R	L	I	N	L	K	N	L	Y	L	A	W	N	C	Y
gi	E	D	N	Q	L	P	Q	I	P	S	G	L	P	E	S	L	T	E	L	S	L	I	Q	N	N	I	N	I	T	K	E	G	I	S	R	L	I	N	L	K	N	L	Y	L	A	W	N	C	Y
model_s4_1	-----																																																

	201	211	221	231	241																																													
Cons.Sequence	F	N	K	V	C	E	K	T	N	I	E	D	G	V	F	E	T	L	T	N	L	E	L	L	S	L	S	F	N	S	L	S	H	V	P	P	K	L	P	S	S	L	R	K	L	F	L	S	N	T
gi	F	N	K	V	C	E	K	T	N	I	E	D	G	V	F	E	T	L	T	N	L	E	L	L	S	L	S	F	N	S	L	S	H	V	P	P	K	L	P	S	S	L	R	K	L	F	L	S	N	T
model_s4_1	-----VFETLTNLELLSLSFNSLSHVPPKLPSSLRKLFLSNT																																																	

	251	261	271	281	291																																												
Cons.Sequence	Q	I	K	Y	I	S	E	E	D	F	K	L	I	N	L	T	L	L	D	L	S	G	N	C	P	R	C	F	N	A	P	F	P	C	V	P	C	D	G	G	A	S	I	N	I	D	R	F	A
gi	Q	I	K	Y	I	S	E	E	D	F	K	L	I	N	L	T	L	L	D	L	S	G	N	C	P	R	C	F	N	A	P	F	P	C	V	P	C	D	G	G	A	S	I	N	I	D	R	F	A
model_s4_1	Q	I	K	Y	I	S	E	E	D	F	K	L	I	N	L	T	L	L	D	L	S	G	N	C	P	R	C	F	N	A	P	F	P	C	V	P	C	D	G	G	A	S	I	N	I	D	R	F	A

	301	311	321	331	341																																													
Cons.Sequence	F	Q	N	L	T	Q	L	R	Y	L	N	L	S	S	T	S	L	R	K	I	N	A	A	W	F	K	N	M	P	H	L	K	V	L	D	L	E	F	N	Y	L	V	G	E	I	A	S	G	A	F
gi	F	Q	N	L	T	Q	L	R	Y	L	N	L	S	S	T	S	L	R	K	I	N	A	A	W	F	K	N	M	P	H	L	K	V	L	D	L	E	F	N	Y	L	V	G	E	I	A	S	G	A	F
model_s4_1	F	Q	N	L	T	Q	L	R	Y	L	N	L	S	S	T	S	L	R	K	I	N	A	A	W	F	K	N	M	P	H	L	K	V	L	D	L	E	F	N	Y	L	V	G	E	I	A	S	G	A	F

	351	361	371	381	391																																													
Cons.Sequence	L	T	M	L	P	R	L	E	I	L	D	L	S	F	N	Y	I	K	G	S	Y	P	Q	H	I	N	I	S	R	N	F	S	K	L	L	S	L	R	A	L	H	L	R	G	Y	V	F	Q	E	L
gi	L	T	M	L	P	R	L	E	I	L	D	L	S	F	N	Y	I	K	G	S	Y	P	Q	H	I	N	I	S	R	N	F	S	K	L	L	S	L	R	A	L	H	L	R	G	Y	V	F	Q	E	L
model_s4_1	L	T	M	L	P	R	L	E	I	L	D	L	S	F	N	Y	I	K	G	S	Y	P	Q	H	I	N	I	S	R	N	F	S	K	L	L	S	L	R	A	L	H	L	R	G	Y	V	F	Q	E	L

	401	411	421	431	441																																													
Cons.Sequence	R	E	D	D	F	Q	P	L	M	Q	L	P	N	L	S	T	I	N	L	G	I	N	F	I	K	Q	I	D	F	K	L	F	Q	N	F	S	N	L	E	I	I	Y	L	S	E	N	R	I	S	P
gi	R	E	D	D	F	Q	P	L	M	Q	L	P	N	L	S	T	I	N	L	G	I	N	F	I	K	Q	I	D	F	K	L	F	Q	N	F	S	N	L	E	I	I	Y	L	S	E	N	R	I	S	P
model_s4_1	R	E	D	D	F	Q	P	L	M	Q	L	P	N	L	S	T	I	N	L	G	I	N	F	I	K	Q	I	D	F	K	L	F	Q	N	F	S	N	L	E	I	I	Y	L	S	E	N	R	I	S	P

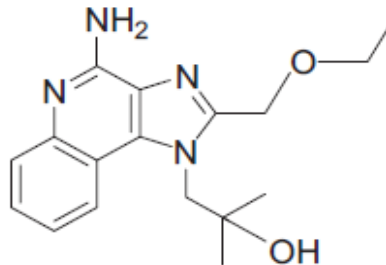
	451	461	471	481	491																																													
Cons.Sequence	L	V	K	D	T	R	Q	S	Y	A	N	S	S	S	F	Q	R	H	I	R	K	R	R	S	T	D	F	E	F	D	P	H	S	N	F	Y	H	F	T	R	P	L	I	K	P	Q	C	A	A	Y
gi	L	V	K	D	T	R	Q	S	Y	A	N	S	S	S	F	Q	R	H	I	R	K	R	R	S	T	D	F	E	F	D	P	H	S	N	F	Y	H	F	T	R	P	L	I	K	P	Q	C	A	A	Y
model_s4_1	L	V	K	D	T	R	Q	S	Y	A	N	S	S	S	F	Q	R	H	I	R	K	R	R	S	T	D	F	E	F	D	P	H	S	N	F	Y	H	F	T	R	P	L	I	K	P	Q	C	A	A	Y

Cons.Sequence gi model_s4_1	501 511 521 531 541 GKALDLSLNSIFFFIGPNQFENLPDIACLNLSANSNAQVLSGTEFSAI PHV GKALDLSLNSIFFFIGPNQFENLPDIACLNLSANSNAQVLSGTEFSAI PHV GKALDLSLNSIFFFIGPNQFENLPDIACLNLSANSNAQVLSGTEFSAI PHV
Cons.Sequence gi model_s4_1	551 561 571 581 591 KYLDLTNNRLDFDNASALTELSDLEVL DLSYNSHYFRIAGVTHHLEFIQN KYLDLTNNRLDFDNASALTELSDLEVL DLSYNSHYFRIAGVTHHLEFIQN KYLDLTNNRLDFDNASALTELSDLEVL DLSYNSHYFRIAGVTHHLEFIQN
Cons.Sequence gi model_s4_1	601 611 621 631 641 FTNLKVLNLSHNNIYTLTDKY NLESKSLVELV FSGNRDILWNDDDNRYI FTNLKVLNLSHNNIYTLTDKY NLESKSLVELV FSGNRDILWNDDDNRYI FTNLKVLNLSHNNIYTLTDKY -----
Cons.Sequence gi model_s4_1	651 661 671 681 691 SIFKGLKNLTRL DLSLNR LKHIPNEAFLNLPASL TELHINDNMLKFFNWT SIFKGLKNLTRL DLSLNR LKHIPNEAFLNLPASL TELHINDNMLKFFNWT -IFKGLKNLTRL DLSLNR LKHIPNEAFLNLPASL TELHINDNMLKFFNWT
Cons.Sequence gi model_s4_1	701 711 721 731 741 LLQQFPRLELLDLRGNKLLFL TDSLSDFTSSLR TLLL SHNRISHLPSGFL LLQQFPRLELLDLRGNKLLFL TDSLSDFTSSLR TLLL SHNRISHLPSGFL LLQQFPRLELLDLRGNKLLFL TDSLSDFTSSLR TLLL SHNRISHLPSGFL
Cons.Sequence gi model_s4_1	751 761 771 781 791 SEVSSLKHLDLSSNLLKTINKSALETKT TTKLSMLELHG NPFECTDIGD SEVSSLKHLDLSSNLLKTINKSALETKT TTKLSMLELHG NPFECTDIGD SEVSSLKHLDLSSNLLKTINKSALETKT TTKLSMLELHG NPFECTDIGD
Cons.Sequence gi model_s4_1	801 811 821 831 841 FRRWMDEHLNVKI PRLVDVICASPGDQRGKSIVSLELTT CVSDVTAVILF FRRWMDEHLNVKI PRLVDVICASPGDQRGKSIVSLELTT CVSDVTAVILF FRRWMDEHLNVKI PRLVDVICASPGDQRGKSIVSLELTT -----
Cons.Sequence gi model_s4_1	851 861 871 881 891 FFTTFFITTMVMLAALAHHLFYWDVWFIY NVCLAKVKGYRSLSTSQT FYDA FFTTFFITTMVMLAALAHHLFYWDVWFIY NVCLAKVKGYRSLSTSQT FYDA -----
Cons.Sequence gi model_s4_1	901 911 921 931 941 YISYDTKDASVTDWV INELRYHLEESRDKNVLLCLEERDWD PGLAIDNL YISYDTKDASVTDWV INELRYHLEESRDKNVLLCLEERDWD PGLAIDNL -----
Cons.Sequence gi model_s4_1	951 961 971 981 991 MQSINQSKKTVFVLT KKYAKSWNFKTA FYLALQRLMDENMDV IIFILLEP MQSINQSKKTVFVLT KKYAKSWNFKTA FYLALQRLMDENMDV IIFILLEP -----
Cons.Sequence gi model_s4_1	1001 1011 1021 1031 1041 VLQHSQYLRLRQRICKSSILQWPDNPKAEG LFWQTLRNVVLTENDSR YNN VLQHSQYLRLRQRICKSSILQWPDNPKAEG LFWQTLRNVVLTENDSR YNN -----
Cons.Sequence gi model_s4_1	1051 MYVDSIKQY MYVDSIKQY -----

Dentro del cuadro anterior puede observarse en la Secuencia Consenso que los aminoácidos modelados están resaltados en negrilla.

Otros ligandos sintéticos que son capaces de ligarse a TLR-8

R848



R848 es un compuesto imidazoquinolina de potente actividad antiviral. Esta molécula sintética de bajo peso molecular, activa a las células inmunes dependientes a través de la vía de señalización TLR7/TLR8MyD88_{1,2}. Recientemente, se demostró que R848 desencadena la activación de NF-κB en las células que expresan TLR-8 cuando se combina con poli (dT) 3.

5'-GCCCGUCUGUUGUGUGACUC-3' (20 mer).

Es una cadena oligonucleótida de cadena ARN simple cubierta con fosfotiolato, rica en secuencias GUssARN40, es también conocida como un R-1075 y es derivada de HIV-1.

5'-UGUCCUCAAUGUCCUCAA-3' (20 mer)

Esta es una cadena de secuencia ARN corta (<30 bp) que contiene dos copias de 9 secuencias fusionadas de GUCCUCAA. Esta secuencia tiene un "motif putativo" inmunoestimulador reconocido por el TLR-8 humano y del TLR-7 del ratón que induce la producción de interferones tipo 1 (65).

5'-UUGUUGUUGUUGUUGUUGU-3' (20 mer)

Contiene 6 repeticiones de la secuencia UUGU, identificada como el mínimo "motif" responsable de la inmunoactividad de ssRNA40

También contiene 6 repeticiones de la secuencia motif UUGU, identificada como un motif terminal responsable por la inmunoactividad de la secuencia **5'-GCCCGUCUGUUGUGUGACUC-3'**.

Fuente de Información (Ref. 66).

Programa para la determinación de Inmunógenos basados en DR1. Aplicable a secuencias GAG y V3 de VIH-1.

=====

/* PROGRAMA ANALISIS AMINOACIDICO SECUENCIAL PARA DESARROLLO DE POTENCIALES INMUNOGENOS**/

```

/// Para compilar> cc AnalisisFASTA.c FastREV.c -I. -o AnalisisFASTA
//postivo = (chekeo == "ILE") ? "ILE": (chekeo == "VAL") ? "VAL" : (chekeo
== "LEU") ? "LEU": NULL;
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <string.h>

#include "aa.h"

int l, trans;
int order;
char dir1 [100], dir2[100];
char compstr;
char eol;
char *title;
char line[100];

int cargando ();

int analizando ();

int copiar (int trans, int l);

int clock ();

int clock ( ){
int j;

for (j = 0; j < 50 ; j ++ ) {

    if ( (
        strcmp ( "I\0", &V3[j][0]) == 0
        || strcmp ( "V\0", &V3[j][0]) == 0
        || strcmp ( "L\0", &V3[j][0]) == 0
        || strcmp ( "A\0", &V3[j][0]) == 0

    )
    &&
    (
        strcmp ( "F\0", &V3[j+3] [0] ) == 0
    || strcmp ( "M\0", &V3[j+3] [0] ) == 0
    || strcmp ( "C\0", &V3[j+3] [0] ) == 0
    || strcmp ( "W\0", &V3[j+3] [0] ) == 0
    || strcmp ( "H\0", &V3[j+3] [0] ) == 0
    )
    &&
    (
        strcmp ( "T\0", &V3[j+5] [0]) == 0
    || strcmp ( "S\0", &V3[j+5] [0]) == 0
    || strcmp ( "C\0", &V3[j+5] [0]) == 0
    || strcmp ( "D\0", &V3[j+5] [0]) == 0
    || strcmp ( "Q\0", &V3[j+5] [0]) == 0
    || strcmp ( "N\0", &V3[j+5] [0]) == 0
    )
    &&
    (
        strcmp ( "T\0", &V3[j+8][0]) == 0

```



```

|| strcmp ( "S\0", &V3[j+8][0]) == 0
|| strcmp ( "C\0", &V3[j+8][0]) == 0
|| strcmp ( "D\0", &V3[j+8][0]) == 0
|| strcmp ( "Q\0", &V3[j+8][0]) == 0
|| strcmp ( "N\0", &V3[j+8][0]) == 0
    )
    == 0

    )
    {
        l = 1;
        trans = j;

    } else {l = 0;}
}
return (l);
}

int copiar (trans, order ){

    if (order == 1){

        printf ("\nLA CONDICION SE HA CUMPLIDO, L = %d
\n", l);

        strcpy (&v3RR [0] [0], &V3[trans-2] [0]);
        strcpy (&v3RR [1] [0], &V3[trans-1][0]);
        strcpy (&v3RR [3] [0], &V3[trans][0]);
        strcpy (&v3RR [4] [0], &V3[trans + 1][0]);
        strcpy (&v3RR [5] [0], &V3[trans +2][0]);
        strcpy (&v3RR [6] [0], &V3[trans +3][0]);
        strcpy (&v3RR [7] [0], &V3[trans +4][0]);
        strcpy (&v3RR [8] [0], &V3[trans +5][0]);
        strcpy (&v3RR [9] [0], &V3[trans +6][0]);
        strcpy (&v3RR [10] [0], &V3[trans +7][0]);
        strcpy (&v3RR [11] [0], &V3[trans +8][0]);
        strcpy (&v3RR [12] [0], &V3[trans +9][0]);
        strcpy (&v3RR [13] [0], &V3[trans +10][0]);
        strcpy (&v3RR [14] [0], &V3[trans +11][0]);
        strcpy (&v3RR [15] [0], &V3[trans +12][0]);
        strcpy (&v3RR [16] [0], &V3[trans +13][0]);

    }

return (0);

}

int analizando () {

    int k ;

    printf ("%s \n", title );
    fprintf (resultados, "%s ", title );

    printf ("v3RR_%d \t", trans);

```

```

        fprintf (resultados, "\nv3RR_%d \t", trans );

        for (k = 0 ; k <30 ; k ++ ) {

            printf ("%c ", v3RR[k][0]);
            fprintf (resultados, "%c ", v3RR[k][0]);

        }

        printf ("\n ");
        fprintf (resultados, "\n" );
        printf ("la posicion PARCIAL trans fue >  %d \n", trans);

    printf ("\n");
    printf ("la posicion final trans fue >  %d \n", trans);

    return (0);
}

int cargando (){
    int j, order, vclock ;

    char analizarChar;

    /* SECCION PARA EXPORTAR EL PROGRAMA A CUALQUIER .FASTA
    printf ("Ingresa el nombre del archivo .FASTA a analizar:\n ");
    scanf ("%s", dir1);
    printf ("Ingresa el nombre del archivo OUTPUT a analizar:\n ");

    scanf ("%s", dir2);
    */

    archivoSEQ = fopen("/home/dir/padres.fasta", "r");
    resultados = fopen ("/home/dir/output", "w");

    if (archivoSEQ != NULL) {
        while (!feof (archivoSEQ)) {

            analizarChar = fgetc(archivoSEQ);
            if (analizarChar == '>') {

                title = fgets(line, 100, archivoSEQ);
                printf (>%s \n", title);
                fprintf (resultados, "%s \n", title);
            }
            else {
                printf ("\nOriginal");
                fprintf (resultados, "\nOriginal");

                for (j = 0; j < 20; j ++ ) {

```

```

        fscanf (archivoSEQ, "%c", &V3[j][0]);
        fprintf (resultados, "%c", V3[j][0]);
        printf ("%c", V3[j][0]);
        if(analizarChar == '\n') { break;}

    }
}

vclock =    clock();

if (vclock == 1) {

    printf ("\nexiste identidad en:\n");
    order = 1;
    copiar (trans, order);

}

    analizando ();

    analisisREV ();

}

}
    if (archivoSEQ == NULL) {printf ("FALLO AL ABRIR EL ARCHIVO");
return (1);};

return (0);
}

int main (void) {
    cargando ();

    printf("\n=====fin del programa=====\\n");

    fclose(archivoSEQ);

    fclose(resultados);

    return (0);
} //fin.

```