

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL ANTICUERPO FAB G17.12 CON LA
MSP-1₁₉ DE *PLASMODIUM VIVAX* EMPLEANDO MODELADO MOLECULAR,
SELECCIÓN Y SÍNTESIS DE LOS PÉPTIDOS INVOLUCRADOS EN LA
INTERACCIÓN CON POSIBLE PROPIEDAD ANTIGÉNICA**

Trabajo Especial de Grado,
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
por la Br. Adriana Natalia Gauna
Santander, para optar al título de
Licenciado en Química.

Caracas, Febrero 2009

Los abajo firmantes, asignados por la Universidad Central de Venezuela como integrantes del jurado examinador de Trabajo Especial de Grado titulado “Estudio de la interacción del anticuerpo FabG17.12 con la MSP-1₁₉ de *Plasmodium vivax* empleando modelado molecular, selección y síntesis de los péptidos involucrados en la interacción con posible propiedad antigénica” presentado por la Br. Adriana Natalia Gauna Santander, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudio para optar por el título de Licenciado en Química.

Dra. Maria Luisa Serrano
Directora

Dr. Emilio Squitieri
Director

Dra. Tania Córdova
Jurado

Dr. Carlos Marquez
Jurado

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, mis agradecimientos a Dios por darme una familia maravillosa, la oportunidad de estudiar y por siempre escucharme.

A mis padres, a ustedes les debo mis logros. A mi madre, por ser mi confidente, mi guía y la voz que me da calma en medio de momentos difíciles, gracias por tu apoyo incondicional y tu constancia. A mi padre, mi adoración, el hombre que me ha ayudado a ser quien soy, gracias por ser el mejor padre que alguien puede desear y por hacerme lo suficientemente fuerte para seguir adelante ahora que no estás con nosotros.

A mis hermanos, Anibal y Andrés, mis mejores amigos. Gracias por siempre protegerme y quererme y por aguantar las noches de traspaso y estrés. Gracias también a Milagros por regalarme, junto con Andrés, mi mayor alegría: mi sobrino, Andrés Eduardo.

Gracias a mi abuela Gladys, primos y tíos. De ti abuela dicen que heredé mucho, espero haber heredado esa calidad humana y amor por tu trabajo.

A mi flaco, Jesús, por no dejarme flaquear, por siempre confiar en mí y en mis capacidades y por darme apoyo cuando lo necesité. Gracias por ser ese alguien especial que me ha acompañado durante casi toda mi carrera.

A mis amigos, los queridos Niños Inocentes Jessica, Neydher, Ana Javier, Nelson, Eloy, Bernardo, Esmeralda, Miguel, María de los Ángeles, Felaurys, Sheerly y Anelisse. Gracias por ser los mejores amigos que alguien puede tener y por estar siempre ahí, en las buenas y en las malas.

Gracias a Daniela Rojas, Samuel Salazar, Mariela Navarro, Érika Velazquez, Fiona Zullo, Luis Daniel Ávila, José Cornejo y todos aquellos que estuvieron junto a mí durante mi formación académica.

A mis tutores, los doctores Maria Luisa Serrano y Emilio Squitieri, gracias por todo el apoyo y enseñanzas, por guiarme hasta la culminación de este trabajo y por ofrecerme su amistad.

A Nury Rivero, Jennifer De Freitas, Harold Gómez, Jholeisa Herrera, Karina González y Angelita Lorenzo por ofrecerme su ayuda siempre que fue necesaria durante la realización de este trabajo y por la amistad brindada.

A las profesoras Patricia Bassi y Maria Eugenia Avilan por su guía y ayuda.

A la Universidad Central de Venezuela, a la Facultad de Ciencias, al laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Farmacia, a mis profesores y a todas las personas que contribuyeron a la culminación exitosa de mi carrera.

RESUMEN

En el presente Trabajo Especial de Grado se realizó un estudio de modelado molecular (Docking) del complejo de la proteína MSP1₁₉ de *P.vivax* con la región Fab del anticuerpo G17.12. Este complejo se construyó a partir de la estructura cristalina del anticuerpo reportada por Pizarro y col.^[38] para el complejo PfMSP1₁₉/FabG17.12 (pdb:1ob1) y la estructura de la MSP1₁₉ de *P.vivax* previamente modelada por homología por Serrano y col.^[36]

El estudio docking se llevó a cabo empleando el programa o software libre PatchDock, el cual realiza la aproximación de cuerpo rígido para obtener las estructuras iniciales del complejo entre la PvMSP1₁₉ y el FabG17.12. Luego se empleó el programa FireDock y RosettaDock para el refinamiento de las soluciones obtenidas.

Este estudio reveló que el complejo más estable entre la PvMSP1₁₉ y el FabG17.12 tiene una energía de -336,33 KCal/mol, donde se establecen un total de ochenta y seis interacciones entre las especies involucradas.

Basándonos en este modelo del complejo se determinó que la región de interacción de la PvMSP1₁₉ se extiende desde Met 1 hasta Asp 9 y luego desde Asn 11 hasta Arg 20, en la región N-Terminal; región que también es similarmente reconocida en el complejo reportado para *P.falciparum*. Adicionalmente se observa otra región de interacción comprendida entre Ser 89 y Ser 91 y desde Glu 80 hasta Glu 84, en la región C-Terminal. Dentro de las interacciones consideradas se enumeran las atractivas y repulsivas de van der Waals, la formación de puentes de hidrógeno, solvatación y un término que incluye la frecuencia estadística de interacción entre pares de aminoácidos.

De los fragmentos de interacción determinados, se escogió para su síntesis un fragmento de dieciséis aminoácidos ubicado en la región N-Terminal de la PvMSP1₁₉ que va desde la His 5 hasta la Arg 20 y que incluye un puente disulfuro

entre la Cys 7 y la Cys 18 con la finalidad de obtener un péptido con una estructura tridimensional similar a la del fragmento correspondiente dentro de la proteína.

La síntesis se llevó a cabo manualmente en fase sólida por la estrategia Fmoc/tBu, empleando la resina cloruro de 2-clorotritilo y mezcla activante HOBT/TBTU. El espectro de masas indicó que la síntesis del péptido lineal se llevó a cabo adecuadamente; sin embargo el proceso de oxidación con yodo de las cisteínas (protegidas con el grupo Acm) para dar lugar a la formación del puente disulfuro, no ocurrió como era esperado.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten ampliar el estudio en la búsqueda de un antígeno o grupo de antígenos contra la infección causada por el *Plasmodium vivax* en pro de avanzar hacia una futura vacuna contra la Malaria.

INDICE GENERAL

Índice de figuras	1
Índice de tablas	5
Abreviaturas	6
Introducción	8
Marco Teórico	11
• Malaria.....	11
- Ciclo de vida del <i>Plasmodium</i>	15
- Tratamiento de la malaria.....	16
- Desarrollo de una vacuna contra la malaria.....	18
• Péptidos.....	24
- Péptidos: definición, clasificación y nomenclatura.....	24
- Estructura de los péptidos y proteínas.....	26
• Síntesis de péptidos en fase sólida.....	27
- Esquema de Protección.....	29
- Formación del enlace peptídico.....	35
- El fenómeno de la racemización.....	38

• Docking, evaluación de la interacción ligando-receptor.....	40
- Representación del sistema.....	41
- Búsqueda del espacio conformacional.....	42
- Jerarquización de las soluciones potenciales.....	43
- PatchDock.....	47
- FireDock.....	49
- RosettaDock.....	53
Antecedentes.....	59
Objetivos.....	73
Metodología Experimental.....	74
• Estudio Docking y selección de fragmentos a sintetizar.....	74
• Síntesis, purificación y caracterización del fragmento peptídico escogido.....	80
Resultados y Discusiones.....	87
• Estudio Docking y selección de fragmentos a sintetizar.....	87
• Síntesis, purificación y caracterización del fragmento peptídico escogido.....	104
Conclusiones.....	112
Recomendaciones.....	114

Referencias Bibliográfica.....	115
Glosario de términos.....	121
Anexos.....	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución global de la Malaria. Fuente: Organización Mundial de la Salud.....	12
2	Distribución de las áreas maláricas en Venezuela.....	13
3	Casos de Malaria en Venezuela 1995-2005.....	14
4	Fórmula parasitaria del <i>Plasmodium</i> en Venezuela (2005).....	14
5	Derivados quinolónicos.....	16
6	Antifolatos.....	17
7	Estructura de la Artemisinina.....	17
8	Reacciones específicas entre anticuerpos y antígenos.....	19
9	Antígenos identificados en las diferentes etapas de la infección producida por <i>Plasmodium</i>	21
10	Representación del merozoíto y algunas proteínas implicadas en la invasión a los glóbulos rojos.....	22
11	Estructura general de un péptido.....	24
12	Estructura de las proteínas: estructura primaria, secundaria y terciaria.....	26
13	Resina de Merrifield.....	28
14	Protectores usuales de la función α -amino en síntesis en fase sólida.....	30
15	Esquema de síntesis empleando la estrategia Boc/Bzl.....	31
16	Esquema de síntesis empleando la estrategia Fmoc/ tBu.....	32
17	Grupos protectores de función carboxilo comúnmente empleados para las estrategias Boc/Bzl y Fmoc/tBu.....	33
18	Formación del enlace éster para la fijación del aminoácido al soporte sólido.....	34
19	Formación del enlace peptídico.....	35
20	Métodos de activación y acoplamiento.....	36

Figura	Página
21 Sales de fosfonio más empleadas en síntesis en fase sólida.....	37
22 Sales de aciluronio más empleadas en síntesis en fase sólida.....	38
23 Mecanismos de racemización.....	39
24 (a) Representación gráfica de la topología de la superficie de una proteína (b) Secciones geométricas: las secciones están en colores claros y la proteína en color oscuro.....	48
25 Esquema del proceso de refinamiento llevado a cabo por FireDock.....	49
26 Esquema del proceso de refinamiento llevado a cabo por RosettaDock.....	53
27 Representación esquemática de los parámetros usados para describir la geometría del puente de hidrógeno.....	56
28 Representación esquemática de la proteína MSP-1.....	60
29 Secuencia de aminoácidos de las proteínas híbridas sintetizadas.....	61
30 Inhibición de la invasión del merozoíto al glóbulo rojo por el mAb 12.10 para las cepas de <i>P. falciparum</i> T9-94 y T9-96.....	65
31 Estructura primaria de la PvMSP-1.....	68
32 Alineación de secuencias de aminoácidos de MSP-1 ₁₉ para <i>P. vivax</i> , <i>P. cynomolgi</i> , <i>P. knowlesi</i> y <i>P. falciparum</i>	69
33 a) Modelo de la PvMSP1 ₁₉ . b) Aminoácido variantes entre la PcMSP1 ₁₉ y la PvMSP1 ₁₉	70

Figura	Página
34 Vistas ortogonales de la cadena principal del complejo PfMSP1 ₁₉ /FabG17.12, mostrándose el antígeno y los dominios variables del anticuerpo (V _L y V _H).....	71
35 Interfase entre el anticuerpo FabG17.12 y la PfMSP1 ₁₉	72
36 Ejemplo del trabajo enviado a PatchDock para reproducción del complejo entre la PfMSP1 ₁₉ y el anticuerpo FabG17.12.....	75
37 Ejemplo del trabajo enviado a PatchDock para la obtención del complejo entre la PvMSP1 ₁₉ y el anticuerpo FabG17.12.....	77
38 Ejemplo del trabajo enviado a RosettaDock para el refinamiento del complejo PvMSP1 ₁₉ -Fab G17.12.....	78
39 Método de jeringa empleado para la síntesis del péptido.....	82
40 (a) Estructura obtenida para el complejo PfMSP1 ₁₉ -Fab G17.12. (b) Superposición de la estructura reportada y la obtenida para el complejo. Naranja: PfMSP1 ₁₉ , modelo. Amarillo: PfMSP119, estructura cristalina. Verde: Fab G17.12, cadena liviana. Azul: Fab G17.12, cadena pesada.....	88
41 Estructura del complejo PvMSP1 ₁₉ -Fab G17.12 obtenida por diez análisis empleando PatchDock y FireDock. : PvMSP1 ₁₉ . Verde: Fab G17.12, cadena liviana. Azul: Fab G17.12, cadena pesada.....	89
42 Primeras diez estructuras de menor energía.....	91
43 Gráfico de la energía de las mil estructuras generadas durante la corrida en RosettaDock en función de la distancia respecto a la estructura de partida.....	92

Figura	Página
44 (a) Estructura del complejo refinada por RosettaDock. (b) Superposición entre la estructura reportada por FireDock y la refinada por RosettaDock. : PvMSP1 ₁₉ , RosettaDock. Amarillo: PvMSP1 ₁₉ , FireDock.....	92
45 Gráfico y estadísticas de Ramachandran para el complejo final refinado.....	94
46 Representación de van der Waals del complejo.....	95
47 Interacciones entre la proteína PvMSP1 ₁₉ y las cadenas de la región variable del anticuerpo G17.12 y aminoácidos implicados en las mismas.....	98
48 Puentes de Hidrógeno formados entre la PvMSP1 ₁₉ y el FabG17.12.....	99
49 Interacción π - π entre la His-5 de la PvMSP1 ₁₉ con el Trp-50 de la cadena pesada del anticuerpo.....	100
50 Aminoácidos de la PvMSP1 ₁₉ que muestran interacción con las cadenas de la región variable del anticuerpo G17.12.....	101
51 Superposición de la MSP1 ₁₉ de las especies de <i>Plasmodium vivax</i> y . Naranja: PvMSP1 ₁₉ . Morando: PfMSP1 ₁₉	102
52 Fragmento peptídico de la PvMSP1 ₁₉ escogido para su síntesis en base al estudio computacional.....	103
53 Representación de van der Waals del complejo. El péptido escogido para la síntesis se encuentra representado por el color de sus átomos.....	104
54 Estructura de la resina cloruro de 2-clorotritilo.....	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Tabla de algunos aminoácidos, su nombre y abreviatura.....	25
2	Parasitemia obtenida en los voluntarios días después de la infección.....	62
3	Respuesta inmune humoral causada por péptidos análogos al 1585 en monos <i>Aotus</i>	64
4	Inhibición de la invasión de <i>P. falciparum</i> con mAb 4H9/19. P es el nivel de significancia de la diferencia entre el control y el valor del ensayo.....	66
5	Energía total y términos energéticos de la solución número uno arrojada por FireDock para el complejo PfMSP1 ₁₉ -FabG17.12.....	89
6	Energía total y términos energéticos de la solución número uno arrojada por FireDock para el complejo PvMSP1 ₁₉ -FabG17.12 en las diez réplicas del análisis.....	90
7	Energía total y términos energéticos de la solución número uno arrojada por RosettaDock para el complejo PvMSP1 ₁₉ -FabG17.12.....	93
8	Valor comparativo de la energía de Lennard-Jones esperada con la calculada para los primeros diez aminoácidos de la PvMSP1 ₁₉	96
9	Tiempo de vida media de la eliminación del grupo Fmoc.....	106
10	Rendimiento de la síntesis del péptido.....	108

ABREVIATURAS

AA: Aminoácido.

Acm: Acetamidometilo.

AMA-1 : apical membrane antigen 1

Boc: terc-butoxicarbonilo.

BOP: hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris(dimetilamino)fosfonio.

CDR: complementarity determining regions.

CSP: circumsporozoite protein

DBA: Duffy binding antigen.

DCM: diclorometano

DIPEA: N,N-diisopropiletilamina

DMS: sulfuro de dimetilo

EBA: erythrocyte-binding antigen.

E.M.: Espectrometría de masas.

Fab : antigen binding fragment.

Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonilo

GLURP: glutamate rich-protein

HATU: Hexafluorofosfato de N-dimetilamino-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-ilmetileno-N-metilmetanaaminio.

HBTU: Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio

HMP: p-alcoxibencilo

HOBT: N-Hidroxibenzotriazol.

HPLC: High performance liquid chromatography

LSA: liver stage antigen.

McAb: monoclonal antibody

MSP: merozoite surface protein

PAM: p-alquilbencilo

PfEMP1: erythrocyte falciparum protein 1

Pfs: falciparum ookinete surface protein

PyBOP: hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidino)fosfato.

Pvs: vivax ookinete surface protein.

RESA: ring-stage infected-erythrocyte surface antigen

RMSD: Root mean squared deviation.

SALSA: sporozoite and liver stage antigen.

SERA : serine repeat antigen

STARP: sporozoite threonine and asparagine rich protein

TBTU: tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio

TFA: ácido trifluoroacético

INTRODUCCIÓN

La malaria es por mucho la enfermedad tropical parasitaria más importante del mundo, causando mayor número de muertes de niños menores de 5 años que cualquier otra enfermedad, especialmente en África. Alrededor de los años 1900, la malaria en humanos presentó un comportamiento endémico en todos los continentes excepto Antártica. Pero en 1950, los programas de control basados en el uso de insecticidas lograron la eliminación de la enfermedad en Norte América, Europa y Australia. Sin embargo, esta sigue afectando África, el sur-este de Asia y la región Pacífica, donde vive más del 40% de la población mundial ^[1]. De esta manera, alrededor de 2,5 billones de personas se encuentran en riesgo de contraer malaria, las cuales más de 500 millones desarrollan severamente la enfermedad y más de 1 millón muere por los efectos de la misma cada año ^[2].

El uso de insecticidas, el diagnóstico a tiempo y el tratamiento adecuado son los elementos básicos en el control de la malaria; pero el uso inapropiado de drogas antimaláricas en el siglo pasado contribuyó a que el *Plasmodium* (parásito responsable de la transmisión de la enfermedad) creara resistencia al tratamiento con Cloroquina, aumentando el riesgo de muerte. Además las nuevas drogas antimaláricas derivadas de la artemisinina son muy costosas para los países que afecta esta enfermedad. Por ello, el desarrollo de una vacuna segura, económica y efectiva es de gran importancia en la salud pública global.^{[1], [2]}

Conseguir protección inmunitaria para la malaria parece ser posible, a juzgar por la inmunidad natural contra el parásito desarrollada con la exposición frecuente a la enfermedad y que dicha inmunidad puede ser transmitida por la transferencia pasiva de anticuerpos. No obstante, el proceso de desarrollo de una vacuna contra la malaria continúa siendo lento, en parte debido a que el *Plasmodium* tiene más de 5200 genes que podrían codificar el antígeno apropiado y a que estos antígenos se expresan de maneras diferentes durante el ciclo de vida del parásito. Por estas razones se cree que una vacuna eficiente contra la malaria podría incluir múltiples

antígenos y atacar múltiples etapas del ciclo de vida del *plasmodium*, haciendo frente a los problemas de la variación genética y alcanzando la inducción de inmunidad en las poblaciones genéticamente heterogéneas. Sin embargo, el riesgo de interferencia entre los componentes de la vacuna y el aumento de la reactogenicidad de la formulación son factores que deben ser tomados en cuenta ^[1].

Por otro lado no hay duda que, al pasar de los años, los importantes avances en biología molecular y en el desarrollo de nuevas tecnologías, han producido cambios significativos dentro de las ciencias biomédicas donde los péptidos desempeñan un papel importante en muchos de estos procesos ^[3]. La última década ha sido testigo del gran desarrollo en la química de péptidos; no solo respecto a su aislamiento, síntesis, identificación de su estructura y esclarecimiento de su mecanismo de acción, sino también respecto a su aplicación como herramientas dentro de las ciencias de la vida. De esta manera los péptidos han demostrado ser de interés no sólo en bioquímica, sino también en química, biología, farmacología, química de los medicamentos, biotecnología, y en la tecnología genética. ^[4]

En la síntesis de péptidos, la obtención de un enlace peptídico entre dos aminoácido no plantea, en sí misma, problemas especiales. Una de las principales dificultades reside en el hecho de que los reactivos necesarios para formar dicho enlace pueden también reaccionar con otros grupos funcionales presentes en la cadena lateral, tales como el grupo amino libre, el grupo carboxilo y ciertos grupos R. Otras dificultades están relacionadas con la purificación de los productos y el rendimiento porcentual ^[3]. Clásicamente, y desde los trabajos pioneros de Fischer y Curtius, todo el proceso asociado a la síntesis de péptidos tenía lugar en solución. Hasta que, en 1963, Merrifield describió el método de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), con el cual los excesos de reactivos y una gran mayoría de productos secundarios se pueden eliminar con mayor facilidad, minimizándose las pérdidas por manipulación ^[5].

Los péptidos sintéticos se han convertido en candidatos a vacunas para el control de enfermedades tanto virales como parasitarias y han demostrado tener alta capacidad inmunológica en estudios en animales y humanos. Por lo tanto, constituyen la base hacia la obtención de vacunas química y estructuralmente definidas, así como también seguras y menos costosas ^[6].

MARCO TEÓRICO

Malaria:

La Malaria o paludismo es la afección producida por cualquiera de las cuatro especies de parásitos del género *Plasmodium* capaces de infectar al ser humano (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*) aunque nos referiremos principalmente a las dos primeras especies por su frecuencia y trascendencia.^[7]

Esta enfermedad es transmitida por la picadura de mosquitos del género *Anopheles* infectados con *Plasmodium*. Solamente las hembras se alimentan de sangre (son hematófagas), por lo que son las responsables de la transmisión de la enfermedad; tienen hábitos nocturnos o crepusculares y son capaces de infectarse y de permitir el ciclo esporogónico completo de *Plasmodium*.^[8]

Una vez iniciada la infección, existe un lapso variable que habitualmente está entre una semana y tres meses (período de incubación clínica), en el cual el paciente no presenta ninguna manifestación atribuible a la infección en progreso. La enfermedad se inicia comúnmente con fiebre de características diversas, malestar general, dolor de cabeza, decaimiento marcado y trastornos digestivos (náuseas, vómitos y diarrea). En algunos casos, el episodio febril dura pocas horas, y es precedido de escalofríos intensos y seguido por sudoración profusa con debilidad marcada (astenia), proceso que se repite cada 48 ó 72 horas, según la especie del parásito involucrado. Tales síntomas pueden fácilmente ser confundidos con un episodio de influenza (gripe) u otras enfermedades, de evolución benigna. Sin embargo, el deterioro clínico de un paciente infectado por algunas de las especies de *plasmodium* (*P. falciparum*, por ejemplo), puede ser brusco y dramático, con un rápido aumento en el número de parásitos presentes en la sangre. Eventualmente, dichos pacientes pueden desarrollar complicaciones graves que afectan el funcionamiento de diversos órganos y sistemas, tales como riñón, pulmón, cerebro, etc. La Malaria cerebral es una de las complicaciones más frecuentes y serias, asociándose con la aparición de delirium y coma progresivo, el cual desemboca en

la muerte del paciente en un período relativamente corto de tiempo si no se administra atención médica adecuada [7].

En cuanto a la distribución global de dicha enfermedad, a finales de 2004 había zonas de riesgo de transmisión de malaria en 107 países y territorios, y unos 3.200 millones de personas vivían en zonas de riesgo de transmisión del paludismo. Esto demuestra que la malaria no es un problema exclusivo de los países tropicales sino un problema global, tal como se muestra en la siguiente figura [2]:

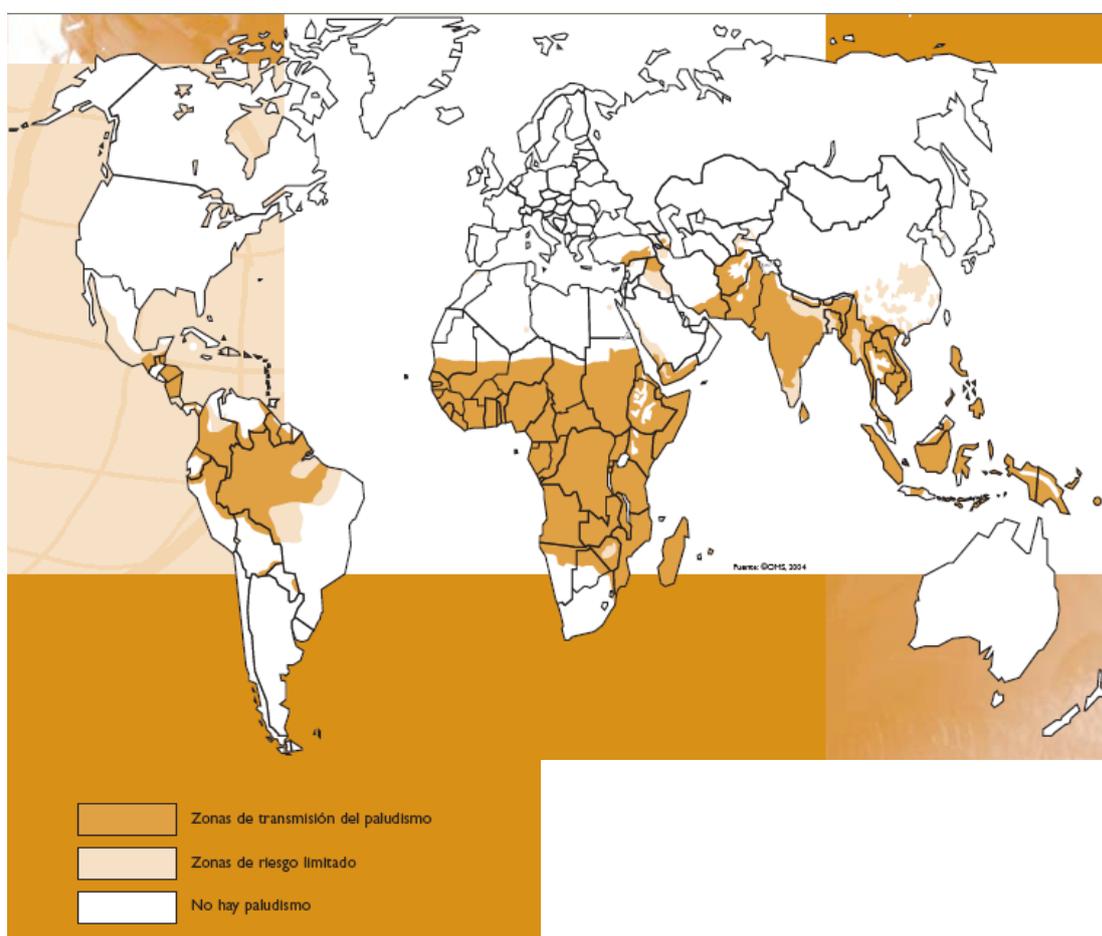


Figura 1. Distribución global de la Malaria. Fuente: Organización Mundial de la Salud.

En Venezuela los estados en los cuales durante las últimas tres décadas se ha originado la mayor parte de esta enfermedad son: Bolívar, Sucre y Amazonas (figura 2), mostrando un comportamiento de características epidémicas en la transmisión en los estados Bolívar y Amazonas. En estos dos estados, un nuevo auge en la explotación minera en áreas boscosas húmedas, las cuales presentan condiciones ecológicas muy favorables para la persistencia y longevidad de especies anofelinas vectoras de Malaria, ha influido significativamente en el incremento de la transmisión de la enfermedad.

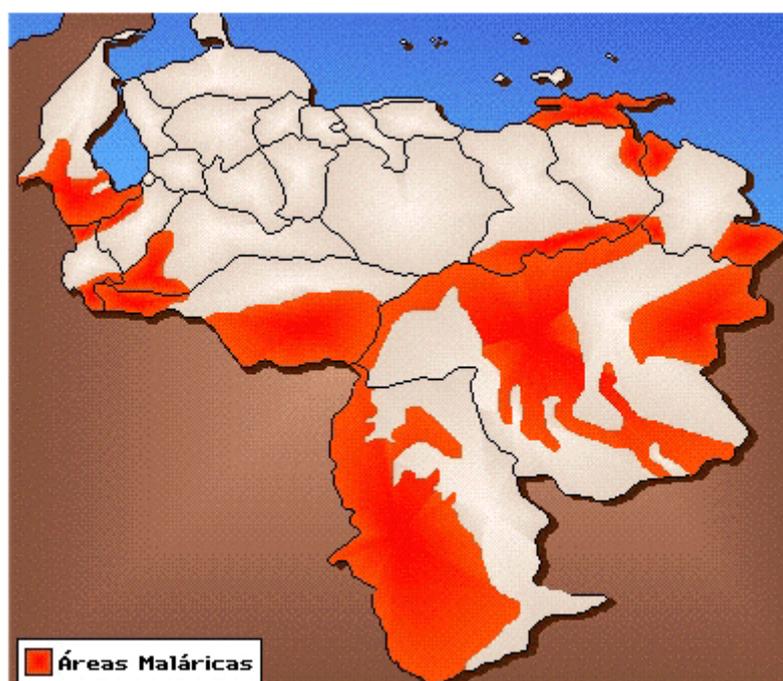


Figura 2. Distribución de las áreas maláricas en Venezuela ^[7].

Así, el número de casos reportados anualmente en Venezuela durante la última década se ha mantenido por encima de los 20.000 (figura 3); con una marcada predominancia del *P. vivax* en la fórmula parasitaria, representando consistentemente más del 80% de los casos diagnosticados, seguido del *P. falciparum* que está involucrado en aproximadamente el 14% de las infecciones y el *P. malariae* con un valor cercano a 0,1%. Por otro lado, están las infecciones mixtas que representan un 0,4% (figura 4).^[7]

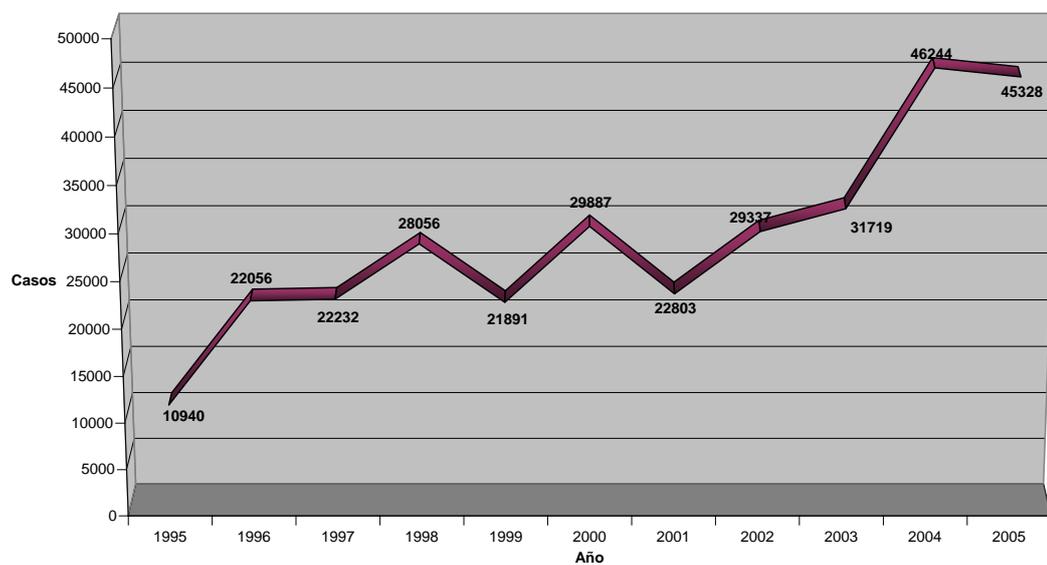


Figura 3. Casos de Malaria en Venezuela 1995-2005. Fuente: Dep. de Estadística. Div. de Epidemiología. Dirección de Vigilancia Epidemiológica Sanitario Ambiental.

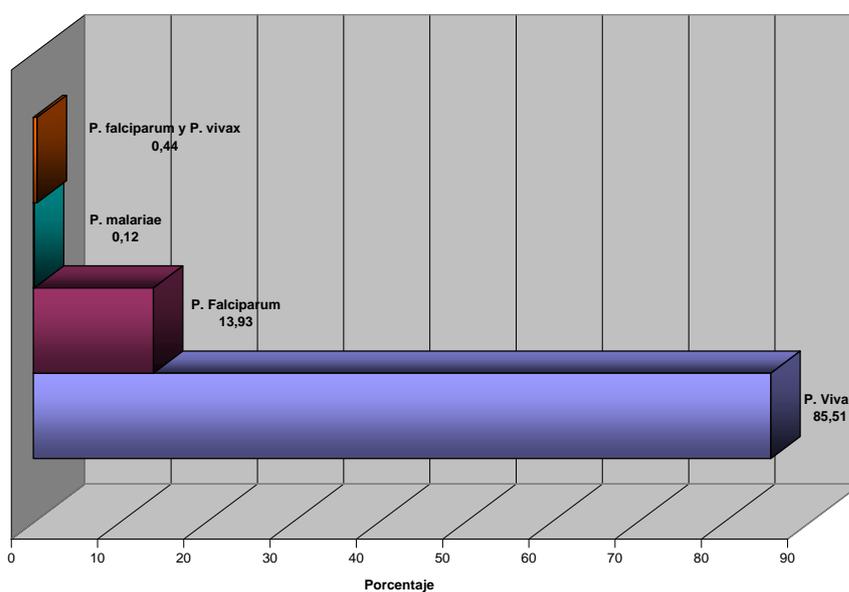


Figura 4. Fórmula parasitaria del *Plasmodium* en Venezuela (2005). Fuente: Dep. de Estadística. Div. de Epidemiología. Dirección de Vigilancia Epidemiológica Sanitario Ambiental.

Ciclo de vida del *Plasmodium*

El ciclo de vida del *Plasmodium* se inicia con una etapa esporogónica o sexual que sucede en la hembra del género *anopheles*. Ellas al picar enfermos maláricos obtienen sangre con formas sexuadas que van a su estómago donde luego de algunas transformaciones morfológicas sucede la fecundación y resulta el huevo o cigote. Tras diversas transformaciones el cigote pasa a ooquineto, luego a ooquiste, éste al estallar libera esporozoítos que se sitúan en las glándulas salivales y son inoculados al ser humano.

De esta manera, comienza el ciclo esquizogónico o asexual donde el hombre recibe los esporozoítos y, circulan en la sangre media hora y se alojan en el hígado. Dentro de los hepatocitos los esporozoítos se convierten en esquizontes tisulares, maduran y en seis a doce días se rompen y liberan a la circulación numerosos merozoítos tisulares que invaden los eritrocitos. En este momento del ciclo sucede la primera y notable diferencia entre las dos especies: los merozoítos salen todos a la circulación y en cambio en el *vivax* algunos esporozoítos, genéticamente determinados, quedan latentes en el hepatocito durante un tiempo variable (semanas, meses e incluso años). Son los llamados hipnozoítos y explican las recaídas por *vivax* en etapas posteriores.

A nivel del glóbulo rojo (fase eritrocítica) los merozoítos pasan a trofozoítos (anillos) y luego a esquizontes (rosetas). A este nivel sucede la segunda y muy importante diferencia entre las dos especies: el glóbulo rojo parasitado por el *vivax* no sufre mayores deformaciones y/o alteraciones estructurales; en cambio, aquel parasitado por *falciparum* presenta deformaciones o protuberancias en su exterior y otras modificaciones, de modo que todo ello conduce a mayor adherencia del eritrocito parasitado al endotelio de los capilares profundos de las vísceras, provocando entonces una trombosis capilar tras la cual sobreviene la anoxia, isquemia y necrosis de los tejidos comprendidos.

Teóricamente cada 48 horas sucede hemólisis con liberación de merozoítos (malaria terciaria benigna del *vivax*, maligna del *falciparum*) que invaden nuevos glóbulos rojos pero algunos se transforman en gametocitos para iniciar otro ciclo sexual. [9]

Tratamiento de la malaria

Ninguna de las drogas antimaláricas disponibles actúa sobre todos los estadios del ciclo vital del parásito del paludismo para inhibir o matar al mismo, adicionalmente esto depende de la especie de *Plasmodium*. Las drogas disponibles para el tratamiento de la malaria incluyen:

- Derivados quinolínicos: Cloroquina, quinina, mefloquina y primaquina. Estos derivados son esquizonticidas muy eficaces (etapa eritrocítica asexual) y gametocidas (etapa eritrocítica sexual) contra *P.vivax*, *P.malariae* y *P.ovale*. La primaquina, adicionalmente, tiene acción sobre los hipnozoítos.

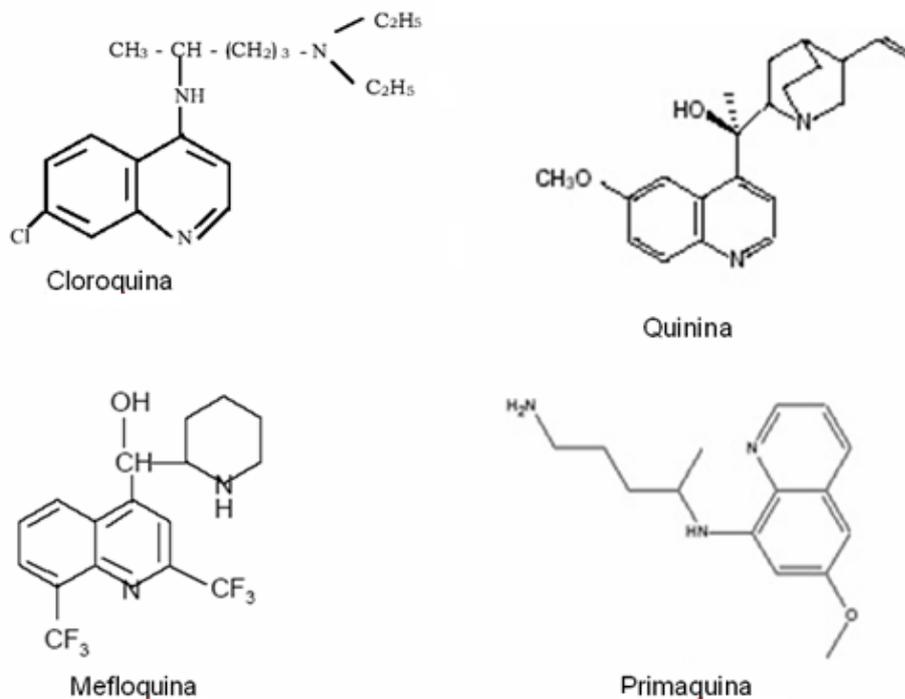


Figura 5. Derivados quinolínicos.

- Antifolatos: Pirimetamina, cicloguanil, sulfonamidas, dapsona y la combinación pirimetamina-sulfadoxina. Estas drogas antimaláricas tienen acción sobre la forma intrahepática del parásito (etapa pre-eritrocítica), excluyendo los hipnozoitos. La pirimetamina es además gametocida, con lo cual previene la transmisión por el mosquito.

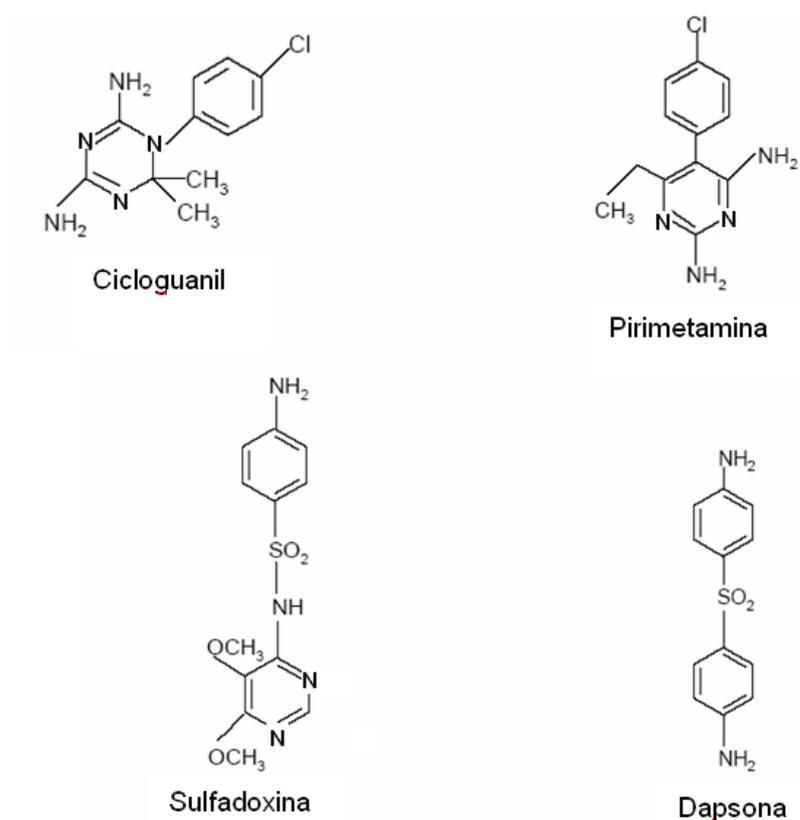


Figura 6. Antifolatos.

- Derivados de la artemisinina: Artemisinina, artemeter y artesunato. Estas drogas antimaláricas son esquizonticidas muy eficaces y gametocidas contra *P.falcíparum*^[10]

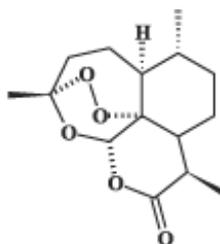


Figura 7. Estructura de la Artemisinina.

Por su efectividad, rapidez de acción y seguridad, la cloroquina continúa siendo la droga de elección, si los parásitos causantes de la infección son sensibles. Así, en la infección por *P. vivax*, *P. malariae* y *P. falciparum*, el esquema de tratamiento recomendado en Venezuela para pacientes adultos es:

- Cloroquina: Droga ideal como esquizonticida, es decir, que erradica las formas eritrocíticas y, por lo tanto, mejora clínicamente al paciente ^[9].
- En el caso específico de *P. vivax*, se logra una cura radical (eliminación de las formas tisulares persistentes causantes de las recaídas) mediante la administración diaria de primaquina oral durante 14 días.

Los derivados de la artemisinina pueden tener ventajas sobre las quinolinas para el tratamiento de la malaria severa debido a que actúan rápidamente y de manera efectiva contra los parásitos de malaria resistentes a la cloroquina.

Desafortunadamente, no existe un medicamento o combinación ideal que pueda ser utilizado en forma segura en todos los pacientes con Malaria. Los medicamentos habitualmente empleados no muestran el mismo efecto sobre los múltiples estadios del parásito, ni sobre todas las especies y cepas de *Plasmodium*. Igualmente, el empleo de algunos medicamentos está limitado por la ocurrencia de efectos tóxicos colaterales y la existencia de cepas resistentes al tratamiento, en diversas regiones del mundo ^[7].

Desarrollo de una vacuna contra la malaria

El incremento de la resistencia de los parásitos de la malaria a los diferentes fármacos antimaláricos y a las medidas de control vectorial ha creado la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para atacar la enfermedad. Entre ellas el desarrollo de vacunas antimaláricas. Muchos autores piensan que el desarrollo de una vacuna contra la malaria es posible porque se puede adquirir inmunidad contra la Malaria como resultado de la exposición natural a la infección. También se ha

demostrado que se puede inducir protección contra la infección en modelos animales y en humanos voluntarios ^{[11], [12]}.

El concepto clásico de vacuna se basa en que éstas son capaces de estimular el sistema inmunológico de una forma específica para una proteína antigénica (antígeno) determinada, virus o bacteria, para producir anticuerpos específicos. La región o fragmento de la proteína antigénica que es reconocida por un anticuerpo se conoce como epítipo (figura 8).

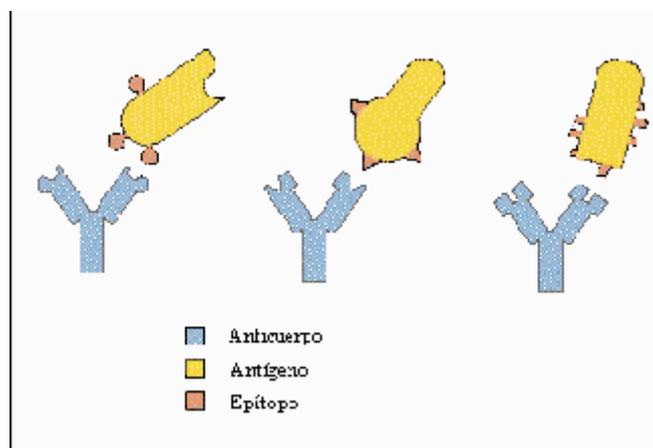


Figura 8. Reacciones específicas entre anticuerpos y antígenos ^[13].

Desde hace años las campañas de vacunación constituyen una práctica médica habitual y rutinaria y, hasta hoy, han sido altamente efectivas en el control de determinadas infecciones administrándose en individuos sanos con la intención de prevenirles en una eventual infección, pero a pesar de ello se sigue investigando para encontrar vacunas más eficaces para las enfermedades ya conocidas ^[13].

Muchas vacunas exitosas han sido generadas contra aquellos virus que causan una infección aguda autolimitada seguida de una inmunidad de larga duración. Para estos virus la meta es conseguir imitar la infección natural.

Por otro lado, la respuesta inmune natural es insuficiente para ciertos patógenos causantes de infecciones crónicas, para cuyo caso son necesarios

nuevos métodos de diseño que puedan conducir a la obtención de vacunas más potentes. De esta manera, las vacunas de péptidos sintéticos intentan inducir anticuerpos con más de un epítipo de células B, aunque los epítipos de células T también son incluidos en algunas vacunas.

Los péptidos sintéticos han demostrado que pueden ser altamente inmunogénicos, tanto en modelos animales como en humanos voluntarios, adicionalmente tienen la ventaja de ser químicamente y estructuralmente definidos, seguros y económicos.

La primera vacuna contra la malaria basada en péptidos sintéticos fue la SPf66, desarrollada hace 20 años por el Dr. Patarroyo y colaboradores en base a proteínas aisladas del eritrocito humano infectado. La vacuna fue probada en miles de voluntarios, pero su eficacia para conferir protección inmunitaria fue limitada ^[6].

La obtención de una vacuna eficaz contra la malaria es una prioridad y, tradicionalmente, su búsqueda se ha enfocado en la identificación de antígenos que podrían servir como objetivos para producir una respuesta inmune de alguna de las diferentes etapas de la infección producida por *plasmodium*, bien sea la etapa pre-eritrocítica, la asexual eritrocítica o la etapa sexual.

Los antígenos identificados para la etapa pre-eritrocítica pueden generar anticuerpos capaces de neutralizar los esporozoitos y prevenir su invasión al hígado, así como promover una respuesta inmune que interfiera con la multiplicación intra-hepática del parásito, por ejemplo, matando el hepatocito infectado. Uno de los antígenos más estudiados para esta etapa es el CSP (Proteína de Superficie del Circumsporozoito).

Por otro lado, los antígenos que intervienen en la etapa asexual eritrocítica tienen como objetivo generar anticuerpos que inactiven al merozoíto, así como inducir la respuesta inmunológica necesaria para inhibir el desarrollo del parásito

dentro los glóbulos rojos. Por el decrecimiento exponencial de la multiplicación del merozoíto, este tipo de vacunas podrían ser las más ampliamente utilizadas para reducir la incidencia de la enfermedad en los países endémicos. Dentro de estos antígenos se pueden enumerar: MSP-1 y -2, RESA, AMA-1, GLURP, SERA, LSA-1 y -3, SALSA, STARP, EBA-175, EBA-140, EBA-181, DBA, RAP 1, RAP 2, ABRA y el PfEMP1.

Finalmente, se encuentran los antígenos correspondientes al ciclo sexual del parásito, ellos no prevendrían la enfermedad o infección en del individuo vacunado, pero sí la transmisión del parásito a un nuevo hospedador. Ejemplo de estos antígenos son: Pfs 25, Pfs 28 para el *P. falciparum* y sus análogos del *P. vivax*, Pvs 25 y Pvs 28, así como Pfs 48/45 y Pfs 230 ^[1]. En la siguiente figura se puede observar esquemáticamente los antígenos ya mencionados según la etapa del ciclo de vida del parásito de la malaria en que actúan:

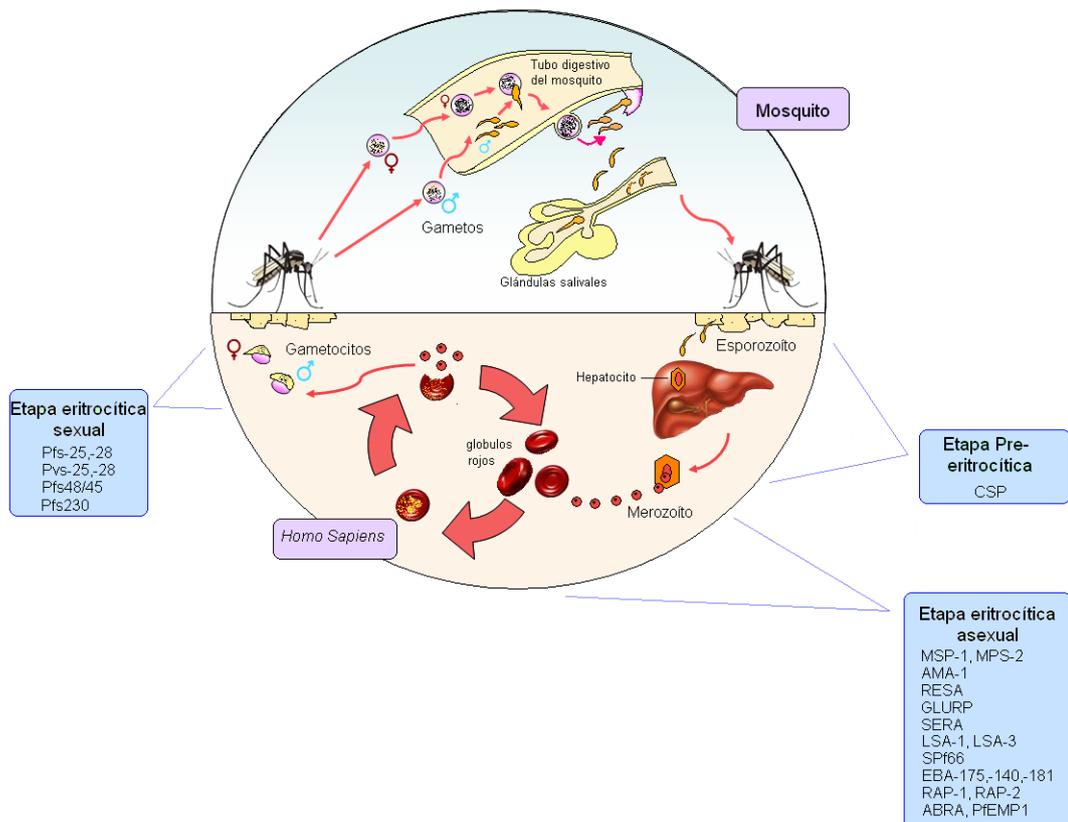


Figura 9. Antígenos identificados en las diferentes etapas de la infección producida por *Plasmodium* ^[1]

La etapa en que ocurre la invasión de los glóbulos rojos por parte de los merozoítos ha recibido especial atención en los últimos años. Muchas proteínas se encuentran involucradas en dicho proceso de invasión (MSP-1, MSP-2, EBA-175, SERA, RESA, AMA-1, HRP-II y ABRA) y el conocimiento de su estructura ha llevado a hallar las modificaciones necesarias para obtener una serie de péptidos análogos con diferente comportamiento inmunológico como consecuencia de la adopción de una estructura específica bioactiva. En la siguiente figura se muestran una serie de antígenos de la malaria presentes en el merozoíto ^[6]:

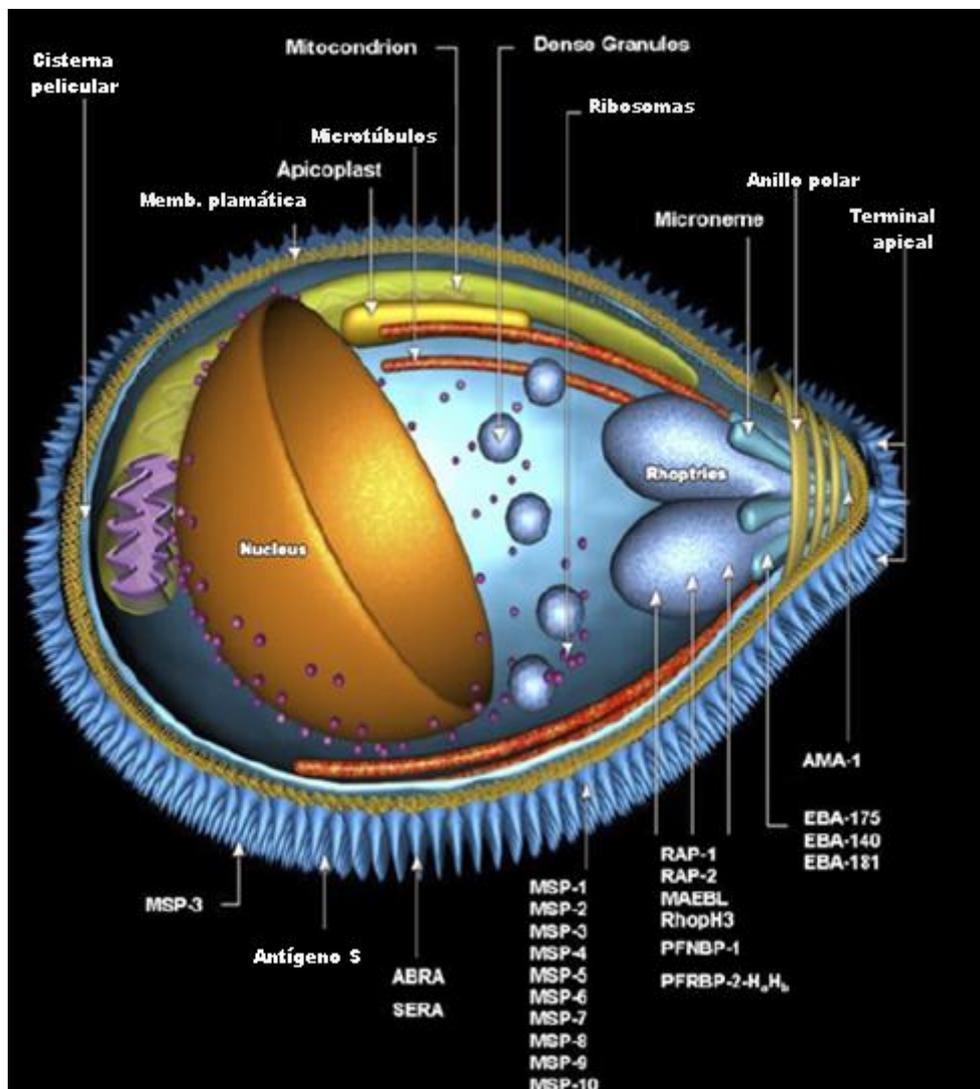


Figura 10. Representación del merozoíto y algunas proteínas implicadas en la invasión a los glóbulos rojos ^[6].

Con la introducción de nuevas vacunas basadas en péptidos sintéticos lo que se busca es obtener respuesta inmunitaria mediada por el reconocimiento del antígeno por parte de las células B. De esta manera, el diseño racional de vacunas se enfoca, como paso inicial, en la identificación de los fragmentos o epítomos en las proteínas antigénicas capaces de ser reconocidas por los anticuerpos.

El primer método para predecir epítomos de células B, basado en el análisis de la secuencia, fue desarrollado por Hopp y Woods, quienes plantearon la hipótesis de que los determinantes antigénicos son hallados en las regiones de las proteínas que tienen un alto grado de exposición al solvente. En este método, Hopp y Woods asignaron a cada aminoácido en una secuencia su tendencia hidrofílica, obteniéndose buenos resultados para grupos de seis aminoácidos.

Luego de este resultado prometedor, una serie de métodos han sido diseñados con el propósito de predecir o escoger epítomos lineales usando combinaciones de aminoácidos con ciertas tendencias, tales como accesibilidad al solvente, flexibilidad e hidrofiliidad. No obstante, estudios experimentales han demostrado que solo hay una débil correlación entre los perfiles de secuencias generados por el uso de dichas tendencias de los aminoácidos y la localización conocida de los epítomos lineales, y dada la complejidad de la interacción antígeno-anticuerpo, esto no es un resultado sorprendente.

El desarrollo de métodos más sofisticados puede llevar a una mejor predicción de los epítomos de células B. Existen tres maneras de enfocar este estudio: la primera es mediante el uso de la secuencia para predecir la estructura local de la proteína, la segunda es mediante el conocimiento y uso de la estructura tridimensional de la proteína y, por último, mediante el conocimiento de la estructura del complejo antígeno-anticuerpo; siendo esta última la metodología más idónea para el reconocimiento de epítomos ^[14].

Una vez identificado el posible epítipo, la identificación final es posible mediante la síntesis de algunos fragmentos (péptidos) y la evaluación de su respuesta antigénica.

Péptidos

Péptidos: definición, clasificación y nomenclatura

Los péptidos, formalmente hablando, son polímeros de aminoácidos conectados por enlaces amida (enlace peptídico) entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente.

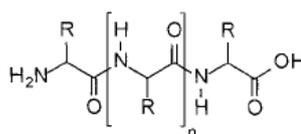


Figura 11. Estructura general de un péptido ^[8].

Los péptidos son clasificados con números griegos como di-, tri-, tetra-, penta-, octa-, nona-, decapeptidos, etc., de acuerdo con el número de aminoácidos incorporados y en péptidos más grandes el prefijo griego es reemplazado por cifras arábicas; por ejemplo, un decapeptido puede ser llamado 10-péptido.

Formalmente, los péptidos que contienen menos de diez aminoácidos son clasificados como oligopéptidos y aquellos que poseen entre diez y cien aminoácidos son llamados polipéptidos. Sin embargo, desde el punto de vista químico la diferenciación entre polipéptidos y proteínas es ambigua. De acuerdo con la nomenclatura aceptada, el término “oligopéptido” corresponde a aquellos péptidos que contengan menos de quince aminoácidos, “polipéptidos” entre quince y cincuenta aminoácidos y la expresión “proteína” es usada para derivados que contengan más de cincuenta aminoácidos.

La nomenclatura formalmente considera a los péptidos como N-acil-aminoácidos. Solo el aminoácido correspondiente el grupo carboxilo terminal de la cadena peptídica permanece con su nombre original sin sufijo y a los demás se le adiciona la terminación "il" al nombre original. Una simplificación de la fórmula del péptido es lograda con un código de tres letras para los aminoácidos y la secuencia usualmente es escrita horizontalmente, comenzando por el grupo amino terminal del lado izquierdo y el grupo carboxilo del aminoácido terminal del lado derecho ^[4].

En la siguiente tabla se muestra una serie de aminoácidos, su estructura, nombre y abreviatura:

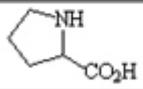
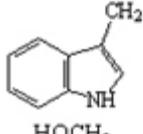
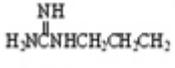
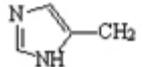
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{R}-\text{CH}-\text{CO}_2\text{H} \end{array}$	Nombre	Abrev	
H	Glicina	Gly	G
CH ₃	Alanina	Ala	A
(CH ₃) ₂ CH	Valina	Val	V
(CH ₃) ₂ CHCH ₂	Leucina	Leu	L
CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)	Isoleucina	Ile	I
CH ₃ SCH ₂ CH ₂	Metionina	Met	M
	Prolina	Pro	P
PhCH ₂	Fenilalanina	Phe	F
	Triptófano	Trp	W
HOCH ₂	Serina	Ser	S
CH ₃ CH(OH)	Treonina	Thr	T
HSCH ₂	Cisteína	Cys	C
	Tirosina	Tyr	Y
H ₂ NC(O)CH ₂	Asparagina	Asn	N
H ₂ NCOCH ₂ CH ₂	Glutamina	Gln	Q
HO ₂ CCH ₂	Ácido aspártico	Asp	P
HO ₂ CCH ₂ CH ₂	Ácido glutámico	Glu	E
H ₂ N(CH ₂) ₄	Lisina	Lys	K
	Arginina	Arg	R
	Histidina	His	H

Tabla 1. Tabla de algunos aminoácidos, su nombre y abreviatura.

Estructura de los péptidos y proteínas

De acuerdo con Linderstrom-Lang, la descripción estructural de las proteínas puede ser considerada en cuatro niveles de organización (figura 12): (1) una estructura primaria, la cual comprende el número y secuencia de aminoácidos conectados consecutivamente por enlaces peptídicos dentro de la cadena; (2) una estructura secundaria, la cual describe el arreglo tridimensional de la espina dorsal del péptido y que puede ser de dos formas: hoja plegada β o hélice α ; (3) una estructura terciaria referente el arreglo tridimensional o la forma de la cadena peptídica como consecuencia de la interacción intramolecular entre elementos de la estructura secundaria; y (3) una estructura cuaternaria (no mostrada en la figura 12) se refiere al arreglo espacial de dos o más cadenas polipeptídicas asociadas por interacciones no covalentes. [4]

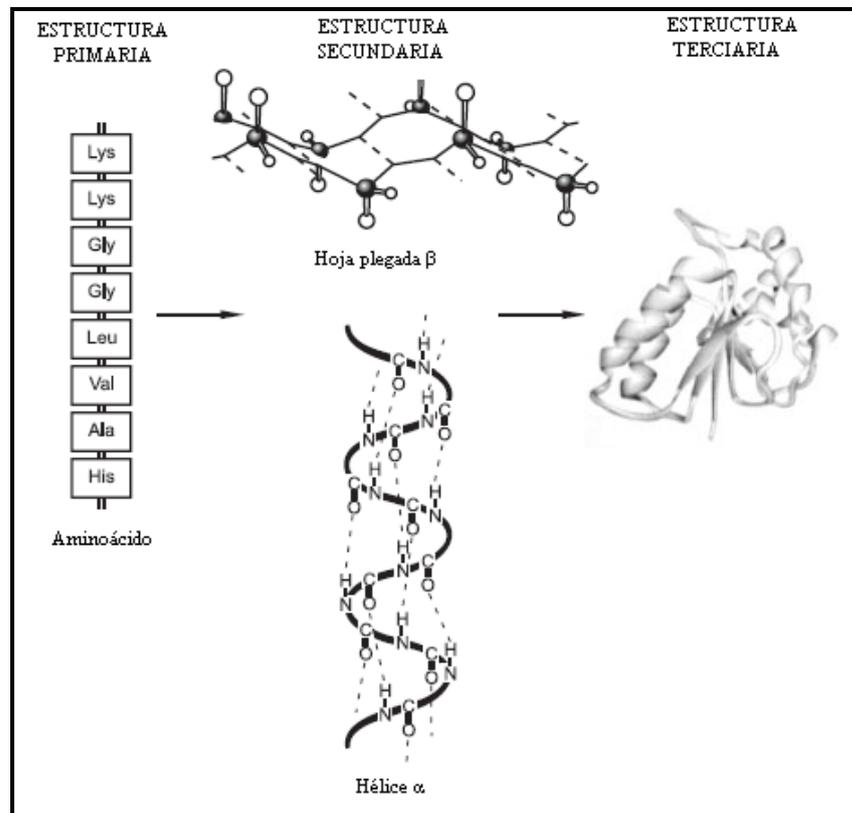


Figura 12. Estructura de las proteínas: estructura primaria, secundaria y terciaria [4].

Síntesis de péptidos en fase sólida

La síntesis de péptidos se podría explicar, a un nivel muy básico, como la formación química repetida de enlaces amida con el fin de conectar funciones amina y carboxilo de L- α -aminoácidos adyacentes. Sin embargo, esta definición no permite adivinar la complejidad y al mismo tiempo riqueza asociada con este campo de la ciencia. Como su nombre bien indica todos los L- α -aminoácidos tienen al menos dos funciones y, por lo tanto, para forzar que el enlace peptídico tenga lugar por las funciones deseadas, todas las restantes deberán estar protegidas. Luego, la formación de posteriores enlaces amida requerirá, en primer lugar, la eliminación de uno de los grupos protectores que bloquean la función que va a formar parte del nuevo enlace peptídico. Además, si se toma en cuenta que muchos de los aminoácidos codificados tienen una tercera función en la cadena lateral, se puede comprobar que, a parte de disponer de métodos eficaces para llevar a cabo la reacción de formación del enlace peptídico, la síntesis de péptidos requiere una correcta manipulación de los grupos protectores.

Los métodos para la síntesis de péptidos se dividen en dos categorías: lineal y convergente. La síntesis lineal se basa en la elongación secuencial, aminoácido tras aminoácido, de la cadena peptídica. Esta elongación se realiza, al contrario de lo que ocurre en el ribosoma, desde el extremo C-terminal al N-terminal, para evitar, tal como se comentará más adelante, la pérdida de quiralidad. En la estrategia convergente las unidades que intervienen no son aminoácidos protegidos, sino péptidos igualmente protegidos. La etapa final de eliminación de los grupos protectores es común en ambas estrategias ^[5].

La síntesis de péptidos en solución ha mostrado un éxito notable en la preparación de péptidos pequeños. Sin embargo, este procedimiento no funciona de manera adecuada en síntesis de péptidos de mayor tamaño debido a dificultades técnicas en el proceso de purificación del producto ^[15].

Por ello, en 1963, Merrifield ^[15] describió el método de síntesis de péptidos en fase sólida, en el cual el protector de la función carboxilo del C-terminal se encuentra unido de forma covalente a un polímero y, por lo tanto, el componente que contiene este extremo es insoluble en los disolventes que se usan en el proceso sintético. Así, los excesos de reactivo y la gran mayoría de los productos secundarios se pueden eliminar por simple filtración y lavado del polímero que contiene el péptido en crecimiento, además se minimizan las pérdidas por manipulación y todo el proceso sintético es automatizable ^[5].

Los principales requerimientos para que un polímero pueda considerarse apropiado para este procedimiento es que sea insoluble en los solventes usados durante la síntesis, que sea físicamente estable y que contenga un grupo funcional tal que el primer aminoácido pueda ser firmemente anclado a través de un enlace covalente ^[13]. Además, las resinas tienden a aumentar su volumen en contacto con los solventes y este hecho es clave para el buen desarrollo de la síntesis ^[16].

En los últimos años se han desarrollado un gran número de matrices poliméricas para la síntesis de péptidos ^[17]. Sin embargo, desde los trabajos iniciales de Merrifield ^[15], el soporte sólido más utilizado es un polímero microporoso de estireno que contiene 1% de p-divinilbenceno. Esta matriz consiste en una cadena de metileno con grupos fenilo enlazados a los átomos de carbono intercalados y con enlaces formados por la inserción de anillos fenilos entre las dos cadenas, como se muestra en la figura 13. Finalmente se lleva a cabo una reacción de clorometilación para incorporar el grupo funcional deseado ^[17].

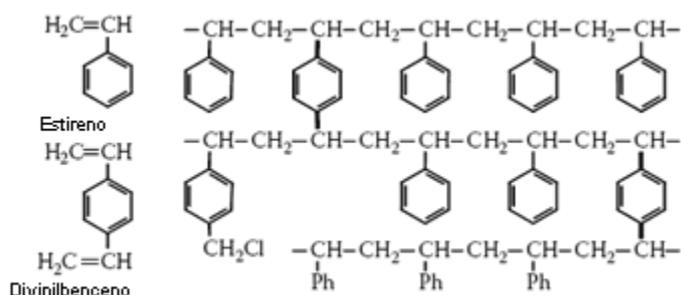


Figura 13. Resina de Merrifield ^[17]

No obstante, también se vienen empleando otros tipos de soporte sólido, tales como los soportes de poliamida, que consisten generalmente de un polímero de dimetilacrilamida, N,N-bisacriloiletilenediamina y del éster metílico de acrilolsarcisina; y los soportes de polietilenglicol insertado sobre poliestireno ^[5].

Esquema de protección

Como se mencionó anteriormente, la formación controlada de un enlace peptídico entre dos aminoácidos requiere que todos los grupos funcionales presentes en las dos moléculas, excepto los dos que vayan a formar el enlace, estén protegidos. Una vez formado el enlace, y antes de la incorporación del siguiente aminoácido o péptido, se debe eliminar la protección del grupo funcional que va a permitir el crecimiento de la cadena peptídica. Por último, y al final del proceso sintético, todos los grupos funcionales se deben liberar de sus grupos protectores. Así, podemos decir que el esquema de protección es crucial para poder concluir con éxito la síntesis de un péptido.

En la síntesis secuencial existen dos tipos diferentes de grupos protectores. Por un lado, está aquel tipo que enmascara al grupo funcional que va dar lugar al nuevo enlace peptídico y que, por lo tanto, se debe eliminar en cada ciclo sintético y se denomina “protector temporal”. Como normalmente todas las síntesis de este tipo se llevan a cabo en la dirección C a N, este protector temporal es el de la función α -amina. Por otro lado, están los “protectores permanentes”, que deben ser estables durante todo el proceso sintético y que se eliminan al final del mismo. Entre éstos podemos diferenciar al de la función carboxilo del aminoácido C-terminal y los de las funciones laterales de los aminoácidos trifuncionales. En la metodología de fase sólida el protector de la función carboxilo C-terminal está unido de forma covalente al soporte polimérico insoluble.

Como se explicará más adelante, la naturaleza química del grupo protector de la función N^{α} -amina marca la estrategia para la elaboración de la cadena

peptídica, ya que los protectores permanentes deben ser estables a las condiciones utilizadas para eliminar repetidas veces el protector temporal. A su vez estos protectores permanentes deben ser eliminados eficazmente en la última etapa.

En una estrategia convergente (acoplamiento de péptidos protegidos) ^[5] se introduce una nueva variante. El protector de la función carboxilo del aminoácido C-terminal debe eliminarse antes de realizar el acoplamiento de este péptido con el siguiente péptido protegido. Este protector debe ser estable durante la elongación de la cadena, pero a su vez su eliminación debe dejar inalterados tanto al protector de la función N^α-amina, como los protectores de las cadenas laterales. En este caso este protector de la función carboxilo del aminoácido C-terminal se denomina “semi-permanente” ^[5].

- **Protección de la función N^α-amina:**

Aunque existe una gran variedad de excelentes grupos protectores de las funciones amino, en síntesis de péptidos se han utilizado casi exclusivamente protectores del tipo uretano. Estos protectores, como se explicará más adelante, confieren una resistencia notable a la racemización del carbono en α cuando el grupo C^α-carboxilo se encuentra activado. Concretamente, los grupos tert-butoxicarbonilo (Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) son la base de los dos principales esquemas de protección en la metodología de fase sólida (figura 14).

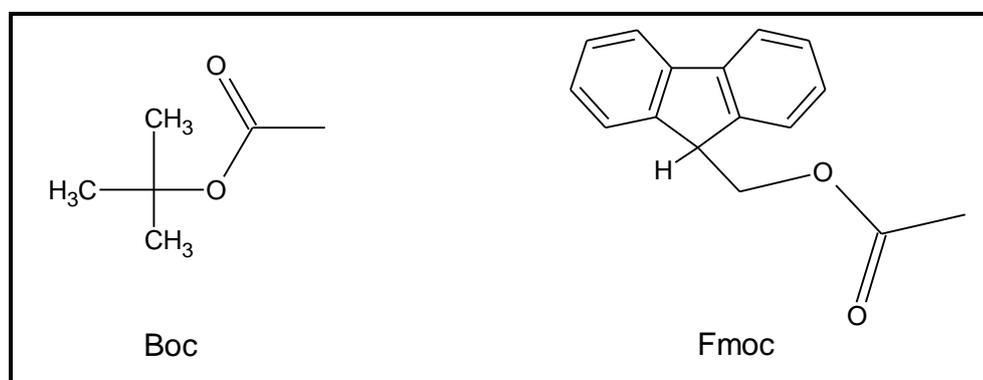


Figura 14. Protectores usuales de la función α -amino en síntesis en fase sólida ^[5].

El grupo Boc se elimina mediante una acidólisis con ácidos de fuerza moderada (33% de TFA en DCM), seguida de una neutralización (normalmente 5% de DIPEA en DCM) para liberar la amina. Esto implica que los protectores permanentes que se utilizan conjuntamente con el Boc deben ser estables en estas condiciones. Por ello se utilizan para las funciones de las cadenas laterales los protectores tipo bencilo (Bzl), los cuales requieren para su eliminación el empleo de ácidos más fuertes como el fluoruro de hidrógeno anhidro ^[5] (figura 15)

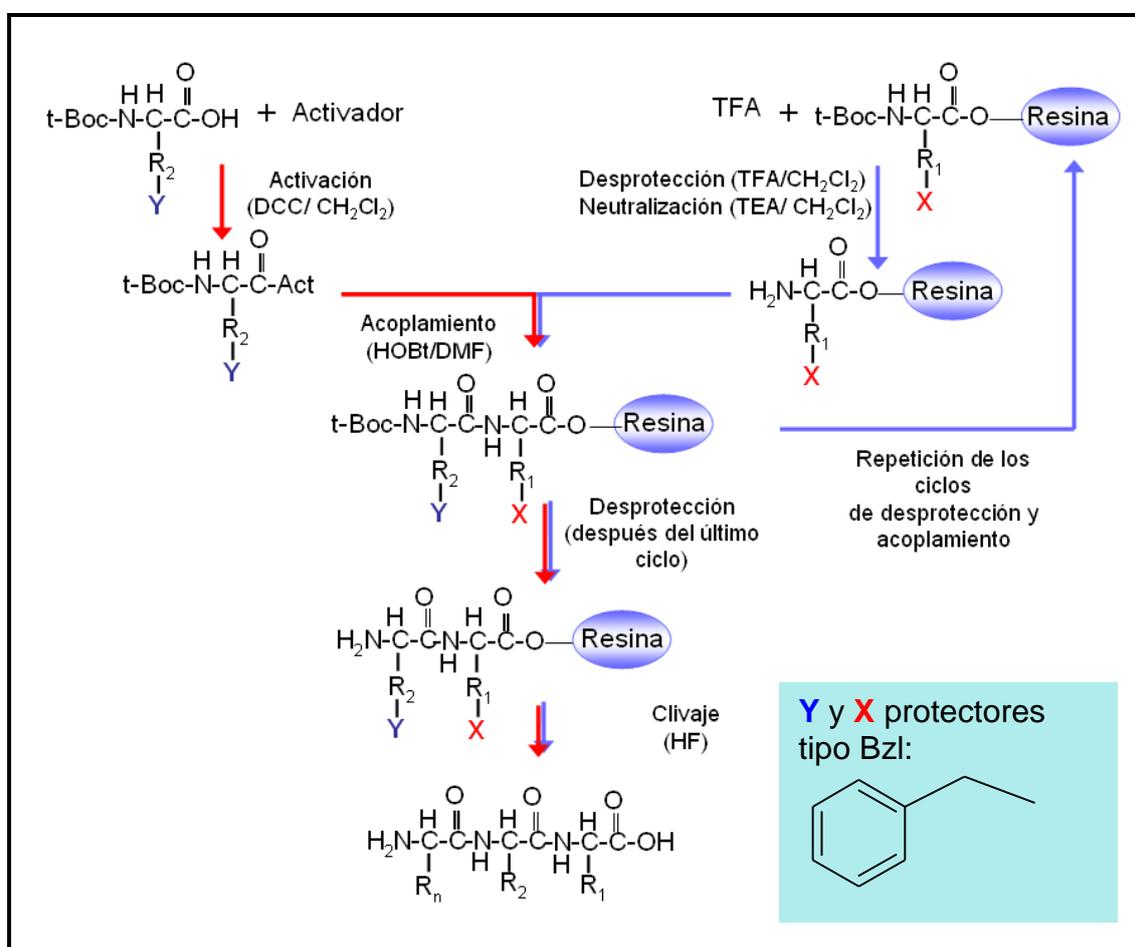


Figura 15. Esquema de síntesis empleando la estrategia Boc/Bzl. ^[5]

Por otro lado, el grupo Fmoc se elimina con bases de fuerza moderada (20% de piperidina en DMF), a través de una reacción de β -eliminación. Esto permite que para las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales se puedan utilizar protectores basados en el grupo terc-butilo (tBu), que son lábiles en presencia de ácidos tipo trifluoroacético ^[5] (figura 16).

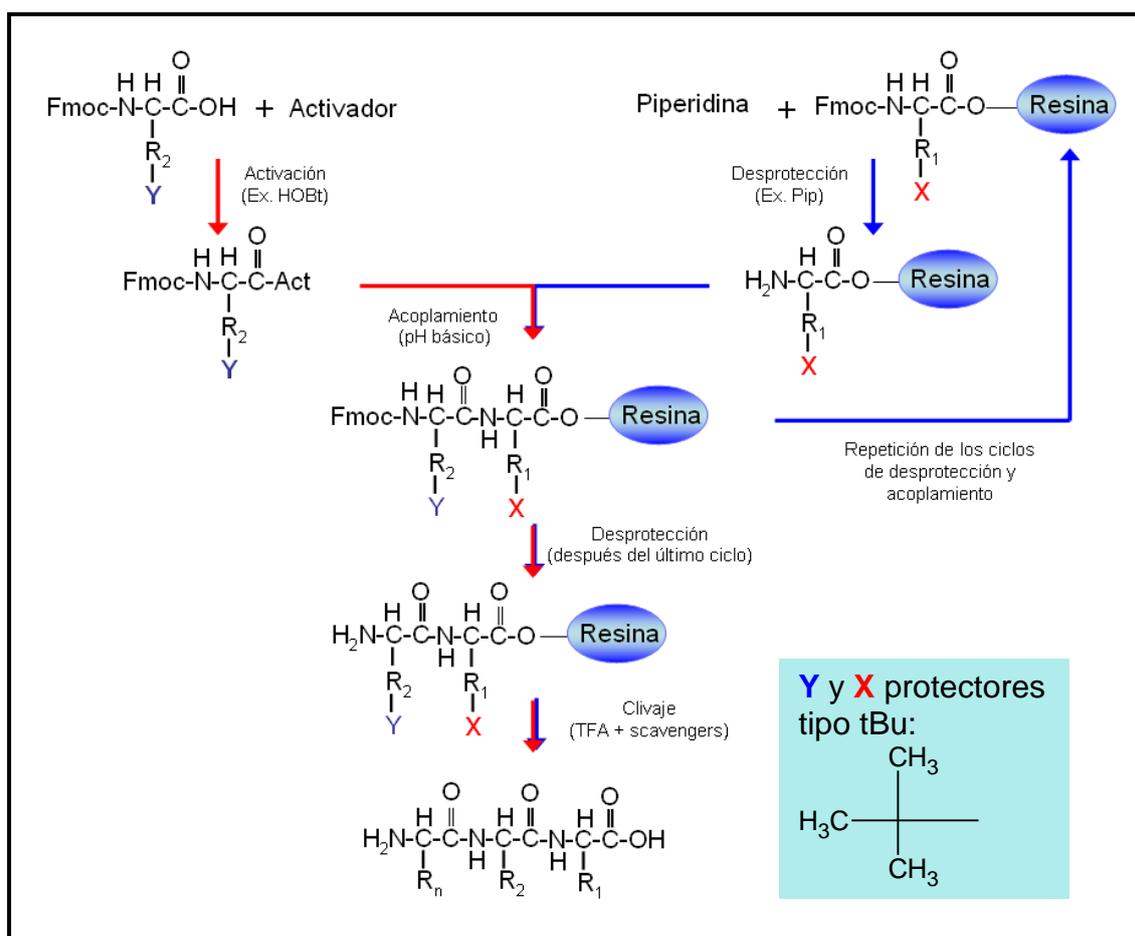


Figura 16. Esquema de síntesis empleando la estrategia Fmoc/ tBu. ^[5]

En ambos esquemas se puede observar que el grupo protector α -amino se elimina antes de la unión del siguiente aminoácido, sin afectar la protección de la cadena lateral. En ello, la estrategia denominada Fmoc/tBu, tiene una ventaja adicional sobre la Boc/Bzl y es el que utiliza protectores del tipo ortogonal, es decir, que se eliminan mediante dos reacciones químicas diferentes. Esto, además, permite que se pueda, si es necesario, forzar las condiciones para eliminar uno de

ellos en presencia del otro, consiguiendo con ello una versatilidad que se puede aplicar para la síntesis de péptidos de estructura compleja ^[5].

- **Protección de la función C^α-carboxilo:**

En la estrategia en fase sólida, este protector expresa la unión de la cadena peptídica al soporte polimérico. Un aspecto importante en esta estrategia es cómo llevar a cabo esta unión y la manera óptima es a través de un conector (handler), el cual es un compuesto bifuncional que sirve para unir la cadena peptídica en crecimiento al soporte a través de dos grupos funcionales. Para el caso de la síntesis de péptidos-ácido, el handler debe llevar incorporado el primer aminoácido debidamente protegido. Por lo tanto, en toda síntesis en fase sólida se pueden distinguir tres partes: el soporte polimérico, el espaciador y el péptido en crecimiento.

No hay duda de que los protectores permanentes de la función C^α-carboxilo más comunes para la preparación de péptidos-ácido en fase sólida son las resina del tipo bencilo: p-alquilbencilo (PAM) para la estrategia Boc/Bzl y p-alcoxibencilo (HMP) para la estrategia Fmoc/tBu. Ambos llevan incorporados el primer aminoácido protegido ^[5] (figura 17)

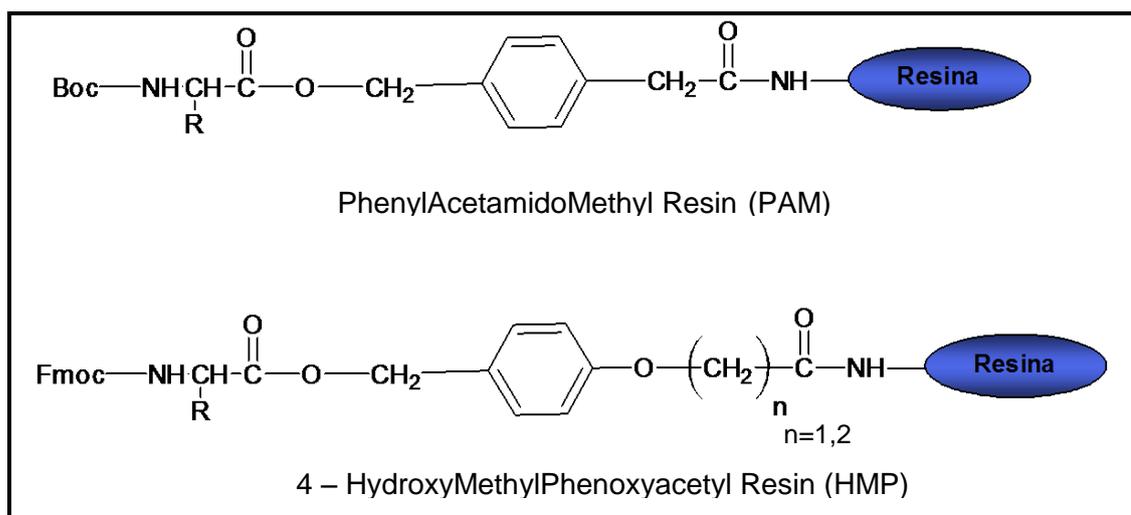


Figura 17. Grupos protectores de función carboxilo comúnmente empleados para las estrategias Boc/Bzl y Fmoc/tBu. ^[5]

La resina PAM es superior a la tradicional resina de Merrifield de ésteres bencílicos poliméricos, ya que ésta no es totalmente estable a los tratamientos con TFA necesarios para eliminar en cada ciclo sintético el protector Boc. Al final de la síntesis la separación del péptido de la resina y la eliminación de los protectores de las cadenas laterales tiene lugar por acidólisis con una combinación de (DMS)-HF en una proporción 3:1 conteniendo un 10% de p-cresol. Por otro lado, para la estrategia Fmoc/tBu, la separación de la resina HMP del péptido se lleva a cabo con buenos rendimientos en TFA en presencia de un 10% de capturadores de cationes, condiciones que sirven para eliminar todos los protectores tipo tBu de las cadenas laterales.

En estos dos espaciadores la formación del enlace éster tiene lugar normalmente mediante una sustitución nucleofílica por parte del carboxilato del aminoácido sobre el correspondiente bromo o clorobencilderivado ^[5], como se observa en la siguiente figura.

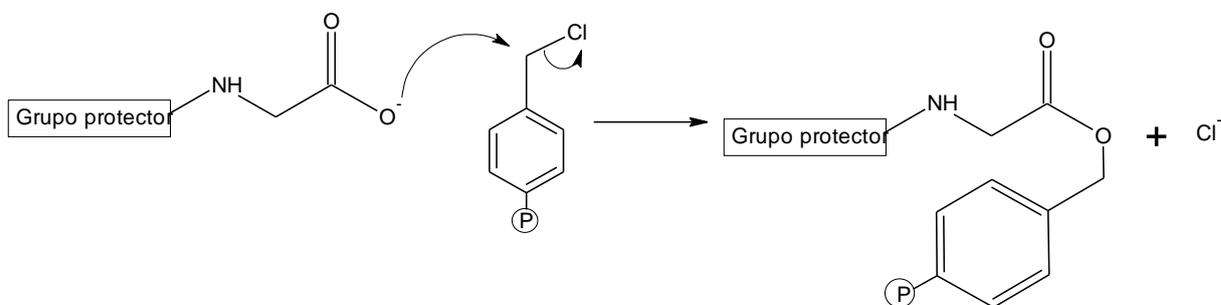


Figura 18. Formación del enlace éster para la fijación del aminoácido al soporte sólido. ^[5]

Formación del enlace peptídico

La formación del enlace peptídico ocurre por un ataque nucleofílico del grupo amino (nucléofilo) a un grupo carboxilo, involucrando un intermediario tetraédrico; seguida de una reacción de eliminación. Sin embargo, los ácidos carboxílicos reaccionan a temperatura ambiente con las aminas para formar sales de amonio en lugar de una carboxamida. Debido a esto, el componente carboxílico del aminoácido debe ser activado previamente para la formación del enlace peptídico. Además, la reacción de acoplamiento debe llevarse a cabo bajo condiciones no tan severas y a temperatura ambiente.

La activación del componente carboxilo es lograda incrementando la electrofilicidad del átomo de carbono por la introducción de un grupo atractor de electrones. Esto favorece el ataque nucleofílico por parte del componente amino, para formar un intermediario tetraédrico y culminar la reacción por la disociación del grupo dejante Y (figura 19) ^[4].

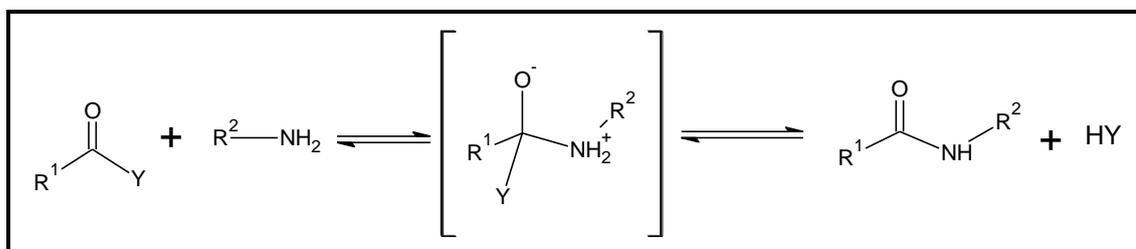


Figura 19. Formación del enlace peptídico ^[4]

Así, la variedad de grupos dejantes Y provee una serie de métodos de activación del componente carboxilo para la formación del enlace peptídico, como puede observarse en la siguiente figura 20.

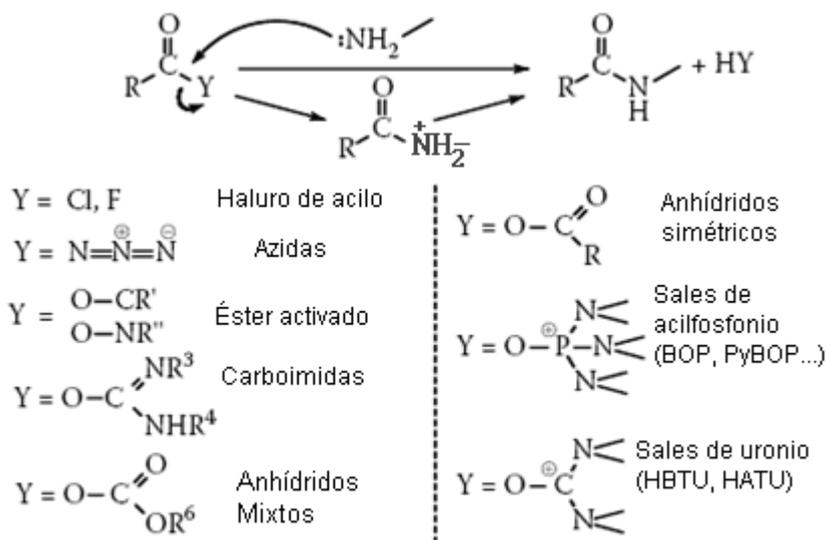


Figura 20. Métodos de activación y acoplamiento ^[17]

Las formas más comunes de activación del ácido aparecen en la figura 20 en orden creciente de complejidad, el cual también corresponde, con la excepción de los anhídridos mixtos, al orden de disponibilidad. La fracción activante Y está compuesta bien sea por un átomo de halógeno, un grupo azido, un átomo de oxígeno unido a un carbono sp^2 (O-C=), un catión en un átomo de carbono (O-C)⁺ o de fósforo (O-P)⁺, o un átomo de nitrógeno adyacente a un átomo con doble enlace (O-N-X=).

Algunas formas activadas son mucho más estables que otras y tres diferentes tipos son distinguibles. Algunas son considerablemente estables tales como los ésteres activados; otros de estabilidad intermedia tales como haluros de acilo, grupo azido o anhídridos mixtos que pueden ser o no aislados; y por último los indicados en la figura 20 con paréntesis, que no son ni aislables ni detectables. De esta manera, la activación puede llevarse a cabo bien sea en presencia o ausencia del grupo amino (nucléfilo). La activación en ausencia del nucleófilo es conocida como preactivación y es empleada cuando el grupo activado tiene la estabilidad suficiente para su aislamiento. Por otro lado, cuando la especie activada no es lo suficientemente estable, el acoplamiento es, en efecto, por la adición de un

compuesto a la mezcla de los dos reactantes y este compuesto es conocido como agente acoplante ^[17].

En síntesis en fase sólida se emplean más frecuentemente sales de acilfosfonio y sales de uronio. De los primeros de estos reactivos, destacan el BOP y el PyBOP que llevan incorporados en la molécula un equivalente de benzotriazol y la especie acilante final es el éster de benzotriazol. Tal como se muestra en el mecanismo descrito en la figura 21, la activación debe realizarse en presencia de una base que sirva para desprotonar el ácido carboxílico, que a su vez ataca a la sal de fosfonio, dando lugar a la sal de acilfosfonio, la cual evoluciona hacia el éster activo ^[5].

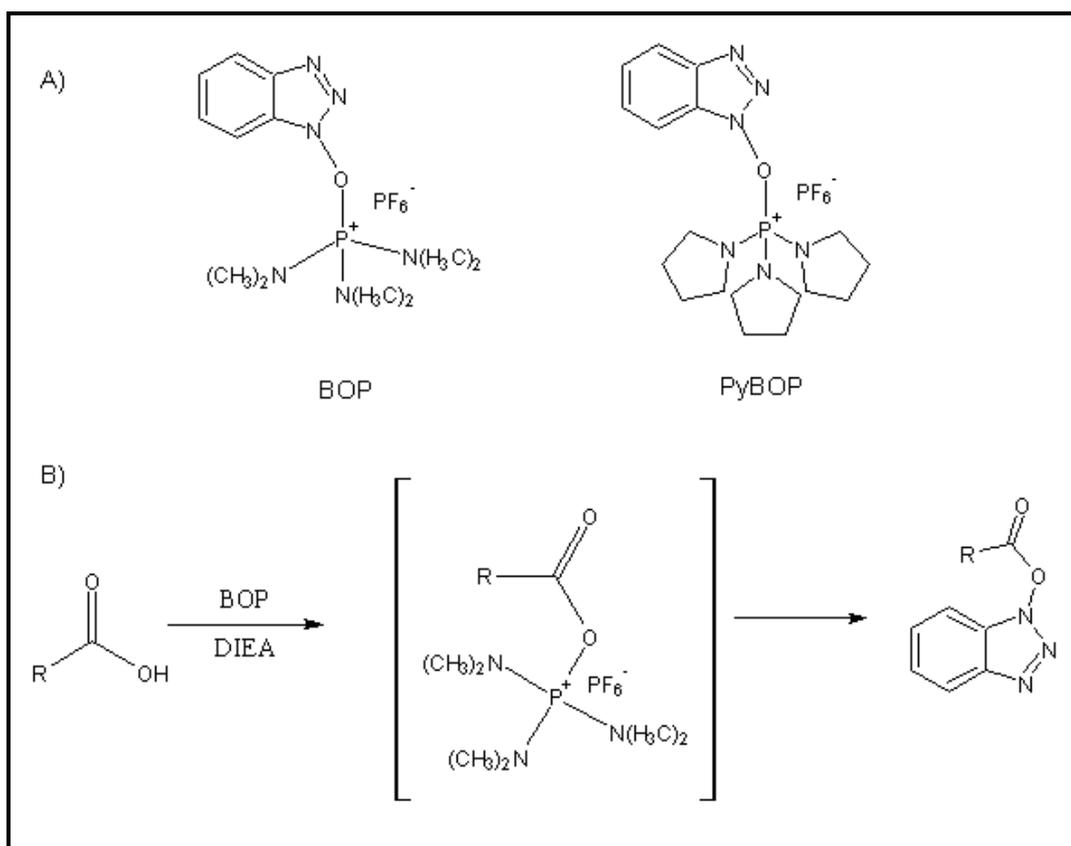


Figura 21. a) Sales de fosfonio más empleadas en síntesis en fase sólida; b) mecanismo de formación del éster activo ^[5]

Acerca de las sales de uronio, estos son derivados análogos a las sales de fosfonio, pero con un átomo de carbono en lugar de fósforo. Dentro de los más comunes se encuentran el HBTU y el HATU ^[5] (figura 22).

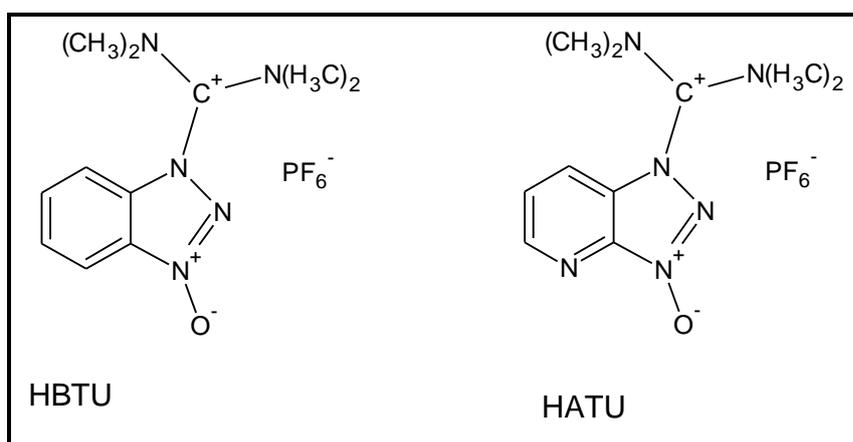


Figura 22. Sales de aciluronio más empleadas en síntesis en fase sólida ^[5]

El fenómeno de la racemización

Una característica fundamental de todo método de acoplamiento es que, a parte de dar lugar a la formación del enlace peptídico con buen rendimiento, mantenga la integridad de la cadena peptídica en crecimiento, en particular del centro quiral en α respecto al grupo carboxilo activado. Esta dualidad buen rendimiento/ausencia de racemización, es muchas veces difícil de obtener, puesto que normalmente los mejores métodos de acoplamiento son los que proporcionan al C-carbónico un buen grupo saliente y éste tanto favorece la formación de oxazolonas como aumenta la acidez del protón en el carbono α respecto al propio grupo carboxilo activado, los cuales son precisamente los mecanismos por los que tiene lugar la racemización (figura 23).

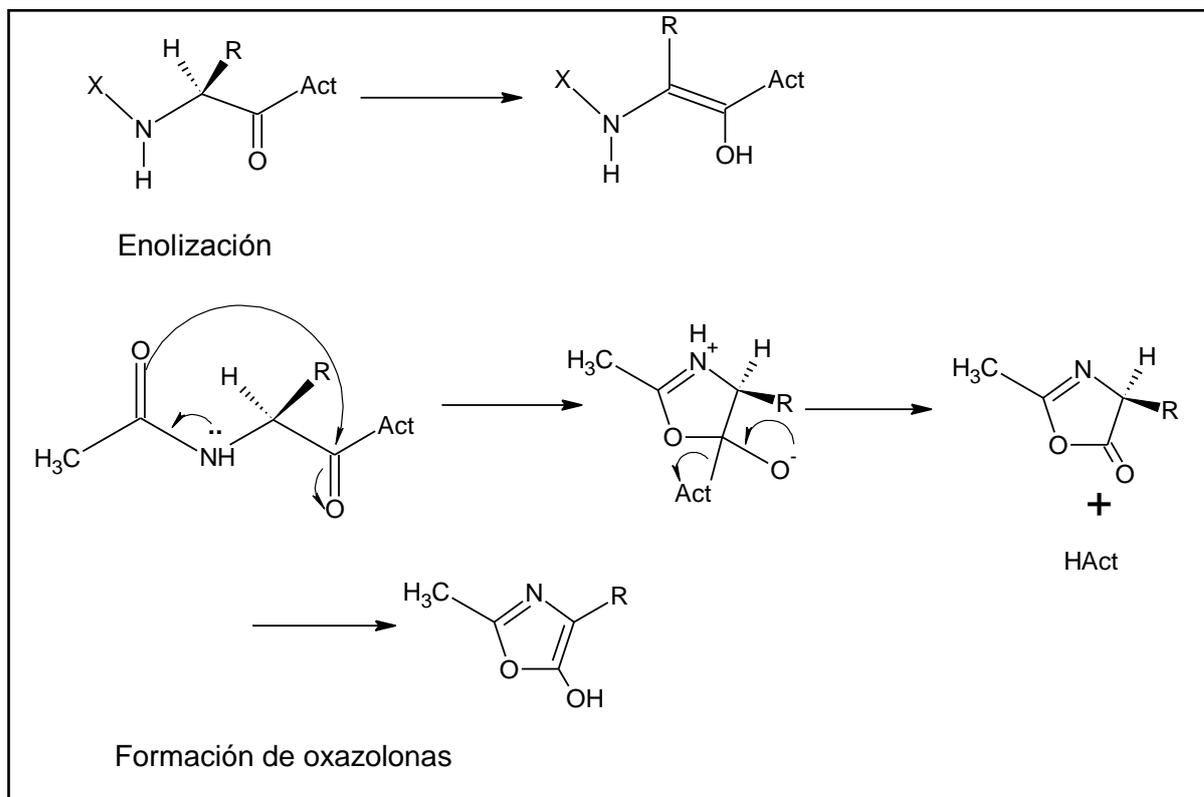


Figura 23. Mecanismos de racemización ^[5]

Sin embargo, la existencia de grupos atrayentes de electrones (-CO-OR) en protectores tipo uretano (Boc, Fmoc) hace que la tendencia a formar la oxazolona sea menor y que, por lo tanto, el riesgo de racemización cuando este tipo de protector se utiliza sea prácticamente nulo ^[5].

Docking, evaluación de la interacción ligando-receptor:

La aplicación de métodos computacionales para el estudio de la formación de complejos intermoleculares ha sido objeto de intensa investigación en la última década, ya que es ampliamente aceptado que la actividad de los fármacos es obtenida a través de la unión de una molécula ligando a otra molécula receptora. En este sentido, la predicción del complejo intermolecular es de vital importancia para el desarrollo de nuevos fármacos y el docking ha sido una importante herramienta en el diseño de los mismos ^[18].

El término docking es usado para el esquema computacional que intenta hallar la “mejor” correlación, espacial y energética, entre dos moléculas: un receptor y un ligando ^[19].

La forma más simple de docking se conoce como *bound docking*, relativo al esquema computacional en que se tiene un complejo co-cristalizado de las dos moléculas y se separan artificialmente para luego reconstruir el complejo original. El objetivo, en cambio, es más difícil para el docking predictivo, también conocido como *unbound docking*, que emplea las estructuras nativas o pseudos-nativas del ligando y del receptor. La complejidad adicional del docking predictivo respecto al *bound docking* se deriva de los cambios conformacionales que tienen lugar entre la estructura acomplejada y la no acomplejada ^{[19], [20]}.

Existen tres etapas determinantes en el docking: (1) representación del sistema, (2) búsqueda del espacio conformacional, y (3) jerarquización de las posibles soluciones. Estos tres aspectos están mutuamente interrelacionados, debido a que la escogencia de la representación del sistema definirá el tipo de algoritmos de búsqueda y las formas de jerarquización de las posibles soluciones ^[19].

Representación del sistema

En este paso se introduce al programa computacional las moléculas con las cuales se va a realizar el docking; sin embargo, reproducir el espacio conformacional para una macromolécula, por ejemplo una proteína es una tarea particularmente difícil y siempre necesita alguna aproximación. En este sentido, los procedimientos de docking pueden ser clasificados en tres categorías dependiendo del nivel de dicha aproximación: (1) docking de cuerpos rígidos: ligando y receptor se tratan como cuerpos rígidos; (2) docking semi-flexible: solo el ligando (molécula más pequeña) es considerado flexible, y (3) docking completamente flexible: ambos, ligando y receptor, se tratan como moléculas flexibles ^[21].

Las proteínas son moléculas altamente flexibles que existen en una serie de estados conformacionales separados por barreras energéticas relativamente bajas. En las proteínas se observan tres tipos de cambios conformacionales; el primero implica movimientos rápidos a pequeña escala que involucran principalmente a las cadenas laterales; el segundo se deriva de movimientos lentos a mayor escala de dominios enteros de la proteína, donde dichos dominios se encuentran unidos por enlaces flexibles; y finalmente, el tercer tipo se refiere a “desórdenes” de la proteína. Cabe destacar, que de estos tres tipos de movimientos mencionados, el segundo es que el tiene mayor importancia pues se cree que juega un papel importante en el momento de formarse el complejo ligando-receptor. ^{[19], [21]}.

Frecuentemente, debido a la flexibilidad molecular, los procedimientos y algoritmos en docking están divididos en docking proteína-proteína y docking proteína-fármaco. La razón fundamental de esta división es que los fármacos, al ser moléculas pequeñas, con frecuencia sufren mayores cambios conformacionales y son computacionalmente más asequibles en comparación con un sistema tan grande como lo es el proteína-proteína. Por ello, es común tratar el problema de los complejos proteína-proteína como cuerpos rígidos con solo seis grados de libertad: tres rotacionales y tres traslacionales ^[19].

Búsqueda del espacio conformacional

El docking es computacionalmente difícil porque hay muchas maneras de acoplar dos moléculas diferentes, puesto que el número de posibilidades crece exponencialmente con el tamaño de los componentes. Así, combinar todas las secciones de interés de la superficie de una molécula de proteína con todas las secciones de una segunda molécula toma sobre el orden de 10^7 pruebas ^[19].

Las herramientas de docking disponibles en la actualidad difieren en ciertos aspectos tales como la descripción de las interacciones moleculares, los algoritmos usados y el tiempo promedio de procesamiento por molécula. Los algoritmos pueden ser agrupados, según el tipo de aproximación empleada, en determinísticos y estocásticos. Los algoritmos determinísticos son reproducibles, mientras que los algoritmos estocásticos incluyen un factor de azar y, por lo tanto, no son del todo reproducibles.

Dentro de los algoritmos más empleados para docking podemos destacar:

- **Método de construcción por incremento:** Éste es un algoritmo del tipo determinístico en el que el ligando no es trabajado como un todo, sino que es dividido en fragmentos y progresivamente reconstruido dentro del sitio activo del receptor.

- **Algoritmo Genético:** Éste es un algoritmo que busca imitar el proceso evolutivo por la manipulación de una base de datos de estructuras llamadas cromosomas, donde cada una codifica una posible solución al problema a resolver, es decir, una posible conformación del complejo proteína-ligando.

- **Búsqueda Restringida:** Este algoritmo, el cual es del tipo determinístico, es caracterizado por la imposición de restricciones a fin de que el proceso de búsqueda se dirija a regiones más complejas. Estas restricciones toman la forma de una lista

tabú que reserva un número de soluciones previamente visitadas, induciendo la exploración de nuevos espacios de búsqueda.

- **Simulaciones de Monte Carlo y por “Simulated Annealing”:** Simulated Annealing es una simulación de dinámica molecular en la cual el sistema se lleva inicialmente a una alta temperatura y luego es enfriado a intervalos de tiempos regulares por un decrecimiento simulado de dicha temperatura, atrapando al sistema en la conformación del mínimo local más cercano y, de esta manera, llevándose a cabo un muestreo determinístico del espacio conformacional. La desventaja de esta simulación es que el resultado depende de la colocación inicial del ligando y que el algoritmo no explora la solución espacial de forma exhaustiva. En la búsqueda por Monte Carlo, el espacio conformacional es, en cambio, muestreado por movimientos al azar; es decir, siguiendo un algoritmo del tipo estocástico.

- **Métodos por ajuste de forma:** Es un método determinístico y rápido de docking en el cual se estima la complementariedad estérica y electrostática de la conformaciones del ligando en la proteína de interés ^[21].

Jerarquización de las soluciones potenciales

Los algoritmos de búsqueda pueden generar un inmenso número de soluciones poco manejable desde el punto de vista práctico (cerca de 10^9) y el propósito de las funciones de puntuación (*scoring functions*) es discriminar entre soluciones, también llamadas “poses”, con bajo valor de RMSD (Root mean squared deviation) respecto al complejo cristalino en un tiempo computacional razonable ^[19]. También, se suelen emplear funciones de puntuación durante el proceso de docking que sirven como funciones de ajuste en la optimización de la colocación del ligando ^[21].

La función de evaluación o puntuación evalúa, a través del uso de algoritmos computacionales, la complementariedad estérica y química entre los ligandos y los

receptores, lo que puede resumirse como: a) evaluación del “número de contactos” totales que pueden establecerse entre cada pareja de átomos del sitio activo y del ligando en una orientación particular de éste; se considera formado un contacto cuando un átomo del ligando y otro del sitio de unión se encuentran a una distancia menor o igual a la de un valor umbral (generalmente 5 Å). b) si la forma geométrica del ligando es complementaria a la de la cavidad, una orientación adecuada generará un gran número de contactos y se le asignará un puntaje alto; habiendo penalizaciones por el traslape de cualquier átomo del ligando con los de la proteína para evitar así interacciones no realistas y c) evaluación de las interacciones química no enlazantes (puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, etc.) [22], [23]

La mayoría de las funciones de puntuación que se emplean en la actualidad son consistentes con la hipótesis de que la energía libre de unión puede ser escrita como una sumatoria de términos que contribuyen a la formación del complejo. Una ecuación completa de este tipo puede ser escrita de la siguiente manera:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{solvent}} + \Delta G_{\text{conf}} + \Delta G_{\text{int}} + \Delta G_{\text{rot}} + \Delta G_{\text{tr}} + \Delta G_{\text{vib}} ; \quad (\text{Ec. 1})$$

$\Delta G_{\text{solvent}}$ contempla la contribución por parte del solvente a la energía libre de unión. Esta contribución surge de las interacciones del solvente con el ligando, la proteína y el complejo ligando-proteína, aunque por lo general se emplea como aproximación la ausencia de moléculas de solvente. El término ΔG_{conf} surge de los cambios conformacionales que sufren el ligando y la proteína durante el acoplamiento, esto es particularmente difícil de estimar para la proteína. ΔG_{int} contempla la contribución de las interacciones electrostáticas y de van der Waals entre la proteína y el ligando. ΔG_{rot} considera la penalización asociada a la rigidez en la rotación interna de la proteína y el ligando. ΔG_{tr} se debe a la pérdida de grados de libertad traslacionales y rotacionales que surge de la asociación de dos moléculas para dar lugar a una sola. Por último, ΔG_{vib} es la energía libre debida cambios en los

modos vibracionales, sin embargo, su contribución es difícil de calcular y usualmente es ignorada [24].

Existen varias funciones de puntuación con diferentes niveles de aproximación, dentro de ellas se encuentran aquellas funciones basadas en Campos de Fuerza. Estas funciones consideran los términos no enlazantes de la mecánica molecular clásica. Un potencial de Lennard-Jones describe las interacciones de van der Waals, mientras que la energía de Coulomb describe el componente electrostático de la interacción. De esta manera, la energía de interacción no enlazante toma la siguiente forma:

$$E = \sum_{i=1}^{\text{Lig}} \sum_{j=1}^{\text{Rec}} [(A_{ij} / r_{ij}^{12}) - (B_{ij} / r_{ij}^6) + 332 (q_i q_j / D r_{ij})] ; \quad (\text{Ec. 2})$$

donde A_{ij} y B_{ij} son parámetros de repulsión y atracción de van der Waals entre dos átomos i y j que se encuentran a una distancia r_{ij} ; q_i y q_j son las cargas puntuales de los átomos; D es la constante dieléctrica del medio y 332 es un factor que convierte la energía electrostática a unidades de kilocaloría por mol [21].

Estas funciones pueden ser usadas en el proceso de docking y en la puntuación, sin embargo, solo proveen algunas contribuciones de las contempladas en la Ec.1.

Un avance importante en el desarrollo de las funciones de puntuación fue la introducción por parte Böhm [25], en el año 1994, de una ecuación que emplea una serie de términos que describen propiedades que se conoce que son importantes en la unión de los fármacos. La función original tiene la siguiente forma:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_o + \Delta G_{\text{hb}} \sum_{\text{Pte H}} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{ionic}} \sum_{\text{Int. ionicas}} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{lipo}} |A_{\text{Lipo}}| + \Delta G_{\text{rot}} N_{\text{rot}} ; \quad (\text{Ec. 3})$$

Esta función incluye contribuciones por puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, interacciones lipofílicas y la pérdida de libertad conformacional del ligando. Los puentes de hidrógeno y los términos iónicos tienen una alta dependencia con la interacción geométrica y las desviaciones importantes de la geometría ideal son, por ende, penalizadas. Por otro lado, el término lipofílico es proporcional al área de la superficie de contacto (A_{lipo}) entre la proteína y el ligando, donde no se encuentren involucrados átomos polares. Finalmente, el término entrópico conformacional es directamente proporcional al número de enlaces capaces de rotar en el ligando (N_{rot}) [24].

Una regresión multilinear es realizada para optimizar los coeficientes de la ecuación 3 y así darle el peso apropiado a cada término, para ello se emplean una serie de complejos proteína-ligando de los cuales se conocen su afinidad enlazante y su estructura 3D. Entonces, es de esperar que estas funciones sean aplicables sólo a proteínas similares a aquella empleada en los complejos de referencia en la inclusión de parámetros [21].

Una estrategia alternativa, consiste en una aproximación denominada método basado en conocimiento [21]. Esta función aporta la energía libre $A(r)$ de la interacción de un par de átomos del complejo ligando-proteína como una función de su separación, considerándose análisis estadísticos de la distribución observada en complejos ligando-proteína conocidos. Esto se encuentra resumido en la siguiente ecuación [24]:

$$A(r) = -k_B T \ln g_{ij}(r) ; \quad (\text{Ec. 4})$$

donde K_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y $g_{ij}(r)$ la función de distribución de los pares de átomos i y j , la cual es calculada a través el número de oportunidades en que el par ij se encuentran a cierta distancia r en la base de datos [18]. Una ventaja de este método es que toma en cuenta efectos físicos que son difíciles de considerar por otros métodos [21].

A pesar de los esfuerzos en hallar mejores funciones de puntuación, no existe aún una función hábil para reproducir afinidades de enlace experimentales, con un error aceptable, para una amplia variedad de complejos ligando-proteína. Un avance interesante es la introducción de esquemas de “consensus scoring”, en los cuales los resultados de más de una función de puntuación se combinan para obtener mejores soluciones que cuando se emplean funciones de puntuación individuales [24].

Existen en la actualidad una serie de programas disponibles a través de servidores web para llevar a cabo estudio de docking proteína-proteína. Dos de estos programas ampliamente usados conjuntamente en investigación son PathDock y FireDock. Donde PatchDock arroja una serie de soluciones iniciales, las cuales luego serán refinadas por FireDock. Adicionalmente, para el refinamiento final de las soluciones iniciales, puede emplearse RosettaDock. A continuación se muestra un esquema más detallado de los procedimientos y algoritmos empleados por estos programas.

PatchDock:

En el caso del docking proteína-proteína se suele iniciar el estudio empleando la aproximación de cuerpos rígidos. En este sentido PatchDock^[20] (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) representa la superficie de las proteínas a través de puntos discretos de interés, como se muestra en la figura 24(a). Luego se procede a la búsqueda de secciones de la superficie de la proteína con formas geométricas características: cóncavas, convexas y/o planas como se muestra en la figura 24(b) ^[20].

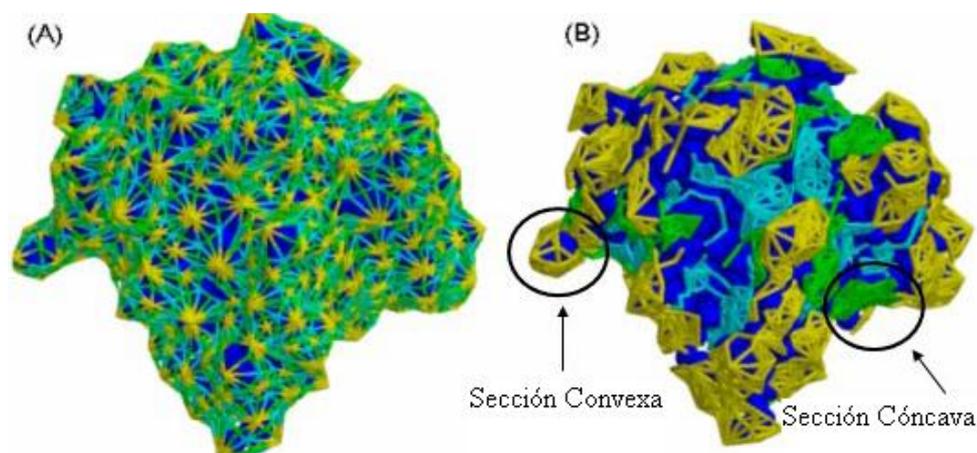


Figura 24. (a) Representación gráfica de la topología de la superficie de una proteína; (b) Secciones geométricas: las secciones están en colores claros y la proteína en color oscuro [20]

Adicionalmente, el éxito del docking puede ser significativamente mejorado por la determinación del sitio activo de la molécula. El conocimiento del sitio de unión de por lo menos una de las moléculas, reduce enormemente el espacio de posibles interacciones y, en este sentido, existen ciertas diferencias al estudiar las interacciones de los complejos, por ejemplo, en el docking enzima-inhibidor el algoritmo restringe la búsqueda a las cavidades de la enzima; y en el caso del docking antígeno-anticuerpo, el algoritmo detecta la región determinante de complementariedad (CDR) en el anticuerpo. [20]

Una vez que se ha introducido al sistema la estructura de las dos proteínas con las cuales se realizará el docking y se ha indicado el tipo de complejo deseado, PatchDock procede a la búsqueda del espacio conformacional por un algoritmo de “complementariedad geométrica” en el cual se busca correlacionar los puntos críticos del ligando con los puntos críticos del receptor ubicados en las regiones de interés. [20]

Luego de esto, cada una de las posibles soluciones arrojadas en el paso anterior, son evaluadas por una función de puntuación que considera tanto el ajuste

geométrico como la energía de solvatación atómica. Finalmente, un *clustering* por RMSD es aplicado para descartar soluciones redundantes ^[20].

FireDock:

FireDock ^[26] (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/>), como su nombre lo indica, es un método que refina y re-evalúa las soluciones obtenidas por docking de cuerpos rígidos. Como se mencionó anteriormente, estas soluciones de partida son generadas empleando PatchDock.

FireDock optimiza estas soluciones permitiendo cierta flexibilidad para las cadenas laterales y ciertos movimientos entre los cuerpos rígidos, la figura 25 muestra el esquema de optimización y evaluación empleado por FireDock ^[26].

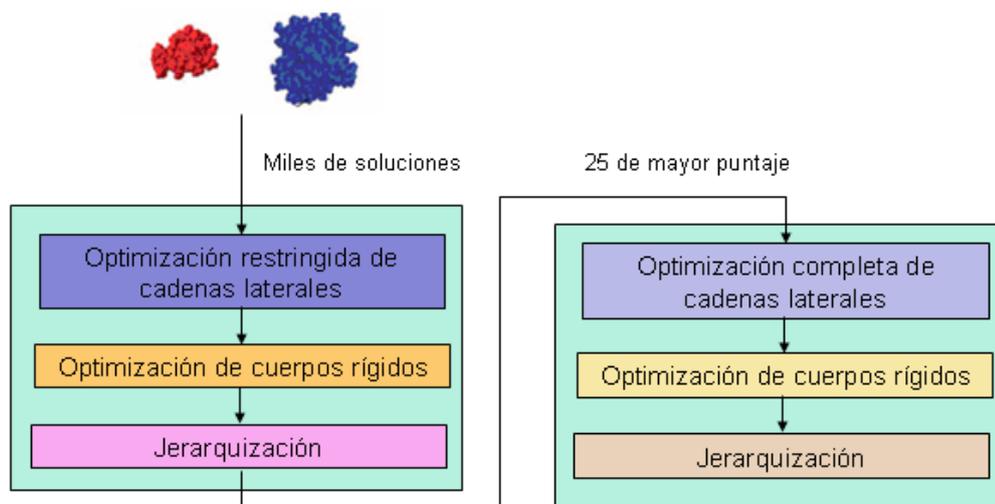


Figura 25. Esquema del proceso de refinamiento llevado a cabo por FireDock. ^[25]

Cada una de las miles de soluciones arrojadas por PatchDock son inicialmente refinadas en sus cadenas laterales, restringiéndose únicamente a las cadenas laterales pertenecientes a los aminoácidos ubicados en la interfase entre las dos especies. Esta flexibilidad de las cadenas laterales es modelada por rotámeros alojados en bancos de datos (Dunbrack backbone-dependent rotamer Library) y su optimización es llevada a cabo por “integer linear programming” ^[26].

Seguido a esto, la posición relativa del antígeno en el anticuerpo es también refinada minimizando la función de puntuación por Monte Carlo y las soluciones refinadas son nuevamente jerarquizadas ^[26].

Finalmente, las 25 primeras soluciones de esta última jerarquización son nuevamente refinadas por una optimización de las cadenas laterales, pero ahora de todo el complejo; y una segunda minimización por Monte Carlo de la ubicación relativa del ligando en el receptor. Luego, una última jerarquización nos aporta las mejores soluciones ^[26].

A continuación se muestra los términos que conforman la función de puntuación empleada por FireDock:

- **Energía de solvatación:** La energía libre de solvatación es estimada por un potencial de la forma:

$$E_{\text{sol}} = \sum_i \sum_j e_{ij} ; \quad (\text{Ec. 5})$$

donde el parámetro e_{ij} es definido como el cambio de energía libre efectivo cuando una interacción entre dos átomos del tipo i y j es reemplazado por una interacción del tipo soluto-solvente ^[26].

- **Energía electrostática:** La contribución electrostática es aproximada por energías Coulómbica entre pares de átomos, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$E_{\text{elec}} = \sum_{i,j} 332.0637 \frac{q_i q_j}{\epsilon \tilde{d}_{ij}} = \sum_{i,j} 332.0637 \frac{q_i q_j}{\tilde{d}_{ij}^2} ; \quad (\text{Ec. 6})$$

donde q_i y q_j son las cargas de los átomos i y j , respectivamente.

• **Energía interna:** La fuente principal de energía interna es la deformación molecular de las especies debido a la unión. Esto incluye movimientos *stretching*, movimientos en los ángulos de enlace y en los ángulos torsionales. Sin embargo, en FireDock únicamente se permite deformaciones en los ángulos torsionales producto de la optimización de los rotámeros. Este término de energía de torsión está reflejado en la frecuencia de los rotámeros derivada de la librería Dunbrack ^[26]:

$$E_{\text{rot}}(i_r) = -\log \frac{S(i, r, \phi_i, \psi_i)}{S(i, r_{\text{unb}}, \phi_i, \psi_i)} ; \quad (\text{Ec. 7})$$

donde $S(i, r, \phi_i, \psi_i) = P(i, r, \phi_i, \psi_i)$, lo cual representa la probabilidad que tiene un rotámero r en aparecer para el residuo i con ángulos ϕ_i y ψ_i . Adicionalmente, la conformación no-enlazante del residuo también es considerada por el término $S(i, r_{\text{unb}}, \phi_i, \psi_i) = P(i, r_{\text{max}}, \phi_i, \psi_i) + 0.3$ donde r_{max} es el rotámero más frecuente para el residuo i ^[26].

• **Puentes de hidrógeno y puentes disulfuro:** La contribución por puente de hidrógeno es calculada por una expresión de la forma:

$$E_{\text{HB}} = 5 \left(\frac{r_0}{d_{ij}} \right)^{12} - 6 \left(\frac{r_0}{d_{ij}} \right)^{10}, \quad 2.74 \text{ \AA} < d_{ij} < 3.5 \text{ \AA} ; \quad (\text{Ec. 8})$$

En Ec.(8) d_{ij} es la distancia existente entre los átomos y $r_0 = 2.9 \text{ \AA}$ es la distancia de interacción óptima.

Por otro lado, los puentes disulfuro contribuyen con -1 unidades de energía y esta contribución es considerada para todos los pares S-S de la interfase que se encuentren a distancias entre 1.9 y 2.1 \AA ^[26].

• **Interacciones de Van der Waals:** La energía de van der Waals entre dos átomos i y j es definida por un potencial tipo Lennard-Jones:

$$E_{\text{vdW}}(a_i, a_j) = \varepsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - 2 \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right), \quad \text{for } r_{ij} > 0.6\sigma_{ij} ; \quad (\text{Ec. 9})$$

Aquí el parámetro σ_{ij} es la suma de los radios atómicos y el parámetro ε_{ij} representa el mínimo de potencial [26].

• **Interacciones π - π e interacciones alifáticas:** Es conocido que las interacciones π - π y las interacciones hidrofóbicas son de mucha importancia en la estabilidad de los complejos proteína-proteína. Recientemente, Crowley y col. [27] demostraron que las interacciones catión- π tienen también una contribución importante a la interfase proteína-proteína.

- Interacciones π - π : Estas interacciones ocurren entre residuos aromáticos tales como Phe, Tyr, His, Trp y Pro.
- Interacciones catión- π : Estas interacciones ocurren entre aminas positivas como Lys y Arg con la nube pi de los aminoácidos aromáticos como Phe, Tyr, Trp.
- Interacciones alifáticas: Estas interacciones ocurren entre los pares alifáticos Leu, Ile y Val.

Misura y col. [28] hallaron que para estas interacciones existe una orientación y una distancia adecuada. Sin embargo, en FireDock no se considera la orientación y se emplea solo el criterio de distancia ente los centro planares. Si la distancia está entre 5.5 y 6.5 Å, entonces la contribución a la energía es de -1.5ue; y si la distancia está entre 6.5 y 7.5 Å, la contribución es más débil igual a -0.5 ue [26].

RosettaDock:

RosettaDock^[29] (<http://rosettadock.graylab.jhu.edu/>) es otro método disponible a través de un servidor web que permite refinar estructuras a partir de un complejo de partida. La figura 26 muestra un esquema del algoritmo empleado por RosettaDock para llevar a cabo la optimización de las soluciones ^[29].

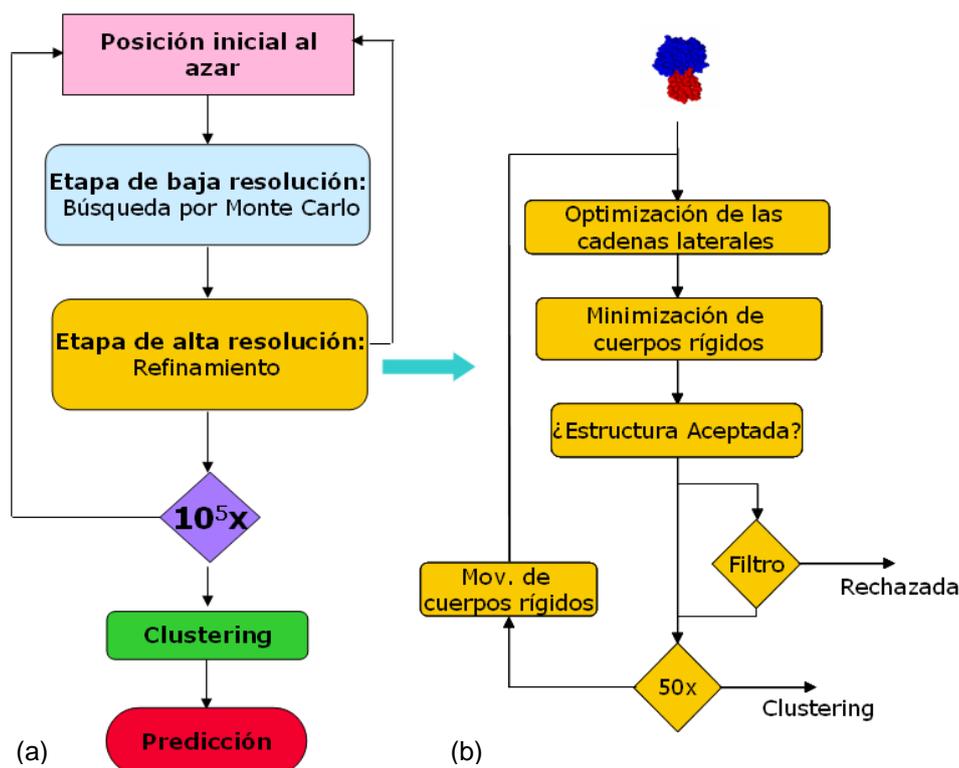


Figura 26. Esquema del proceso de refinamiento llevado a cabo por RosettaDock. ^[29]

Como se observa en el esquema, el proceso de refinamiento de las soluciones se lleva a cabo en dos etapas: Una de baja resolución y otra de alta resolución.

En la etapa de baja resolución (figura 26a) se emplea una búsqueda conformacional por Monte Carlo, trasladando y rotando una de las estructuras al rededor de la superficie de la otra a través de la realización de 500 movimientos de cuerpo rígido al azar. El tamaño del paso es ajustado continuamente con un valor

inicial de 0.7Å para los movimientos traslacionales y de 5° para los movimientos rotacionales. En esta fase se hace una representación reducida de las cadenas laterales como únicos pseudo-átomos ^[29].

En la etapa de alta resolución (figura 26b), las cadenas laterales son consideradas de forma explícita vía rotámeros en la estructura de las proteínas y los átomos de hidrógeno polares son descritos de tal manera de permitir la posible formación de puentes de hidrógeno. Luego, la óptima combinación de los rotámeros es hallada a través de un proceso de búsqueda vía *simulated-annealing* de Monte Carlo.

Una vez que se han optimizado las cadenas laterales, la ubicación relativa de los cuerpos rígidos se optimiza nuevamente. El gradiente de la función de puntuación determina la dirección de partida y un proceso de minimización por el algoritmo Davison-Fletcher-Powell quasi-Newton halla el mínimo local de la función de energía ^[29].

La optimización simultánea de las conformaciones de las cadenas laterales y de la posición de los cuerpos rígidos es repetido un total de 50 veces y en cada uno de estos ciclos la energía final e inicial son comparadas y la estructura es aceptada y llevada a *clustering* o rechazada de acuerdo con el criterio estándar de Metropolis. Dicho criterio establece que la estructura creada es aceptada si la misma posee una energía igual o inferior a la estructura inicial; de poseer la nueva estructura una energía superior a la de partida, la misma es aceptada con una probabilidad que viene expresada por la ecuación de Boltzmann:

$$p = \text{Exp}(-E_j/kBT) \quad (\text{Ec. 10})$$

Después de cada ciclo de la etapa de alta resolución, la posición de una de las proteínas es perturbada al azar trasladándose 0.1Å en cada dirección del espacio cartesiano y rotando 0,05° alrededor de cada eje cartesiano. Finalmente,

una vez que haya ocurrido el último ciclo la conformación de menor energía es minimizada una vez más para tener una tolerancia final de 0,02 unidades de energía [29].

Luego del último ciclo de esta etapa, la conformación de menor energía pasa por una minimización adicional y el proceso completo (Etapa de baja y alta resolución) es repetido un total de 10^5 veces de donde se obtienen un cúmulo de soluciones que van a un proceso de *clustering* final donde las estructuras con una desviación inferior a los 2.5Å son consideradas como una misma solución.

A continuación se muestran los términos de la función de puntuación empleada por RosettaDock. Esta, al igual que en el algoritmo, se divide en una función de puntuación de baja resolución y otra de alta resolución [29].

- **Función de puntuación de baja resolución:** La función de puntuación de baja resolución viene dada por términos que consideran al ambiente de los aminoácidos y la probabilidad de encontrar pares de ellos que interactúen entre sí (E_{env} , E_{pair}), así como también términos que incluyen contactos y choques entre aminoácidos ($E_{contact}$, E_{bump})

$$E = E_{env} + E_{pair} + E_{bump} + 2E_{contact} + E_{align} \quad (\text{Ec. 11})$$

Adicionalmente, puede usarse información biológica reportada para ensayar la probabilidad de que la estructura sea correcta por lo que se adiciona el término de alineación (S_{align}) que puede, por ejemplo, indicar que cierta región de aminoácidos es conservada y que probablemente puede estar involucrada en la unión. Para la descripción de este término, se emplean complejos reportados del tipo antígeno-anticuerpo [29].

- **Función de puntuación de alta resolución:** La función de puntuación empleada en la etapa de alta resolución incluyen términos tales como interacciones de van der Waals, solvatación, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y

adicionalmente un término de energía interna. Los términos de interacciones de van der Waals, electrostáticas y energía interna son los mismos que para la función de puntuación de FireDock por lo que no serán especificados en esta sección. Sin embargo, si existen diferencias en la manera que se consideran la energía de solvatación y la formación de puentes de hidrógeno, como se explica a continuación [29].

- Puentes de Hidrógeno: La energía por la formación de puentes de hidrógeno consiste en un término dependiente de la distancia $E(\delta_{HA})$ y tres términos angulares: $E(\Theta)$ dependiente del ángulo del átomo de hidrógeno, $E(\Psi)$ dependiente del ángulo del átomo receptor respecto al puente y $E(X)$ dependiente del ángulo diedral en los puentes de hidrógeno que involucren aceptores hibridizados sp^2 (figura 27). [30]

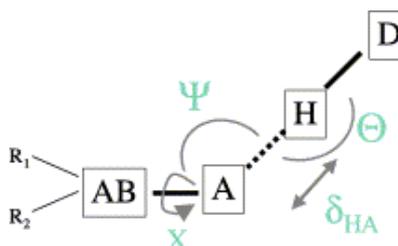


Figura 27. Representación esquemática de los parámetros usados para describir la geometría del puente de hidrógeno [30].

Finalmente, la energía total (E_{HB}) viene dada por la combinación lineal de los cuatros términos:

$$E_{HB} = W_{HB} [E(\delta_{HA}) + E(\Theta) + E(\Psi) + E(X)] ; \quad (\text{Ec. 12})$$

donde W_{HB} es el peso relativo de término de puente de hidrógeno respecto a los otros términos de la función de energía. [27]

- Energía de solvatación: Esta energía es incluida de dos formas diferentes. Primero, se emplea un modelo de solvatación implícita y luego se realiza un segundo cálculo de la energía de solvatación para minimizar el área de superficie

hidrofóbica. Debido a la dificultad del cálculo, este segundo término es considerado únicamente para la discriminación final. [29]

Finalmente, la función de puntuación de alta resolución resulta de la combinación lineal de la energía de van der Waals atractiva y repulsiva ($E_{vdw_{atr}}$, $E_{vdw_{rep}}$), la energía de solvatación implícita (E_{sol}), un término de energía de solvatación basado en el área de superficie (E_{sasa}), un término energético por formación de puentes de hidrógeno (E_{HB}), la energía interna producto de los rotámeros de las cadenas laterales (E_{rot}), un término que contempla la frecuencia estadística con que los pares de aminoácidos interactúan (E_{pair}) y un término de energía electrostática sub-dividida en atractiva y repulsiva a corta y larga distancia ($E_{a_{elec_c}}$, $E_{r_{elec_c}}$, $E_{a_{elec_l}}$, $E_{r_{elec_l}}$). Estos términos de la función de puntuación, que has sido explicados anteriormente, tienen diferente peso (ω) dentro de dicha función cuando la misma se está empleando en la fase de optimización de las cadenas laterales, en la fase de minimización o en la fase de jerarquización. [29]

$$E_{tot} = \omega_{vdwa} E_{vdw_{atr}} + \omega_{vdwr} E_{vdw_{rep}} + \omega_{sol} E_{sol} + \omega_{sasa} E_{sasa} + \omega_{hb} E_{HB} + \omega_{rot} E_{rot} + \omega_{pair} E_{pair} + \omega_{aec} E_{a_{elec_c}} + \omega_{rec} E_{r_{elec_c}} + \omega_{ael} E_{a_{elec_l}} + \omega_{rel} E_{r_{elec_l}} \quad (Ec. 13)$$

En cuanto al archivo de salida de RosettaDock Server, este se caracteriza por aportar información adicional que facilita en análisis tales como un gráfico de energía de las 1000 estructuras creadas en función de su desviación RMSD respecto a la estructura de partida que permite hacer una estimación cualitativa de la calidad de la corrida [29].

Adicionalmente, para cada estructura, RosettaDock aporta un archivo PDB el cual contiene información valiosa tal como: (1) coordenadas de los átomos en el complejo; (2) una lista con los términos de las funciones de puntuación de baja y alta resolución; (3) una tabla de las energías por aminoácido en el complejo con su respectivo valor total al final de dicha tabla; (4) una tabla comparativa de Energía calculada menos Energía esperada por aminoácido además de un término que

expresa el grado en el que se compacta cada aminoácido dentro del complejo; (5) una lista de Energía total calculada menos la Energía total esperada en los diferentes ambientes del complejo: aminoácidos de la superficie, aminoácidos no expuestos y aminoácidos expuestos; (6) una tabla de la energía de interacción entre los pares de aminoácidos implicados en la interfase; (7) una tabla que muestra la resta de los ángulos Ψ , Φ y ω iniciales menos los finales para cada aminoácido; (8) una lista de las coordenadas de los centroides de las moléculas receptora y ligado; y (9) los valores absolutos de los ángulos Ψ , Φ y ω de cada aminoácido en el complejo. ^[29]

ANTECEDENTES

La MSP-1 es una proteína ubicada sobre la superficie del merozoíto en todas las especies de *Plasmodium* estudiadas hasta el presente. Esta proteína es sintetizada como un precursor de entre 185 y 215 KDa, dependiendo de la especie, tal como lo demostraron **Holder A. A. y Freeman R.R.**,^[31] en el año 1982, quienes biosintetizaron y caracterizaron una serie de antígenos asociados con la etapa eritrocítica del *plasmodium falciparum*.

De este estudio, una proteína de 195 kDa fue el antígeno predominantemente reconocido por el suero de humanos inmunes y también por el anticuerpo monoclonal del murinae (sub-familia de ratas y ratones) 89.1. Dicho anticuerpo también reconoció una serie de polipéptidos de menor peso molecular, de los cuales uno de 83 kDa resultó ser el más significativo de ellos^[31]. Todo esto sugirió la ocurrencia de un proceso de un clivaje de la MSP-1 para dar lugar a proteínas de menor tamaño.

En el año 1992, una vez más, **Holder A.A, Blackman M.J y col.**^[32] realizaron un análisis del mencionado clivaje. En la superficie del merozoíto se identificaron cuatro fragmentos unidos en un complejo no covalente, con tamaños aproximados de 83 KDa, 28-30 kDa, 38 kDa y 42 kDa, los cuales fueron llamados por conveniencia MSP1₈₃, MSP1₃₀, MSP1₃₈ y MSP1₄₂, respectivamente.^[32]

Sin embargo, solo un fragmento de 19 kDa (región C-terminal de la MSP1₄₂) es llevado al interior del glóbulo rojo, junto con el merozoíto, durante el proceso de invasión. Por ende, Holder y col. se preguntaron qué sucedía con el fragmento restante de la MSP1₄₂. Para ello se investigó, mediante el uso del antígeno monoclonal X509, el proceso secundario de la MSP1₄₂ detectándose la liberación, desde la superficie del merozoíto, de un producto de unos 33kDa. Esto evidenció la ocurrencia de un segundo evento proteolítico para producir otros dos fragmentos: el MSP1₃₃ y el MSP1₁₉ (figura 28).^[32]

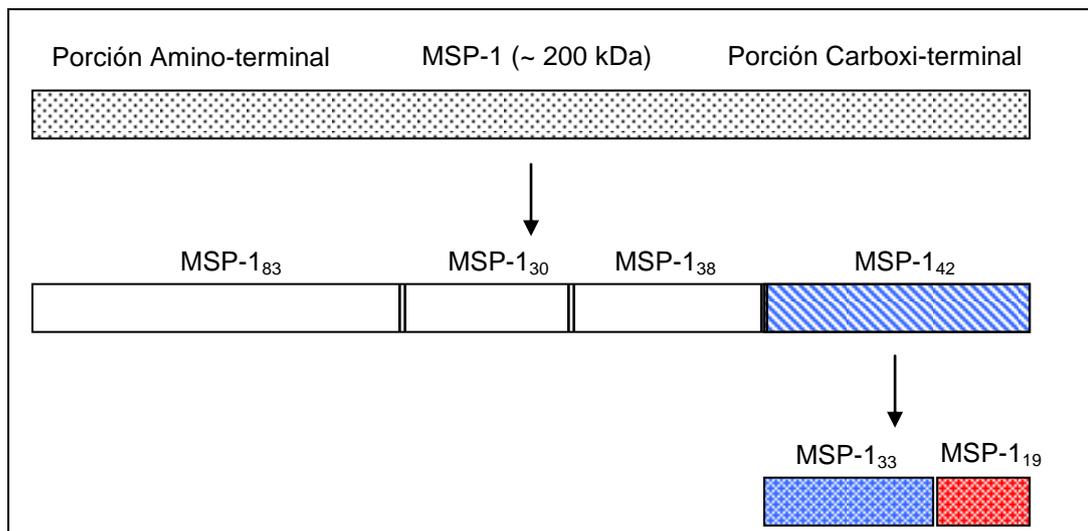


Figura 28. Representación esquemática de la proteína MSP-1

La MSP-1 es una de las proteínas del parásito que ha suscitado más interés debido a que varias de sus regiones han demostrado tener propiedades antigénicas. Un ejemplo es el llamado epítipo 83.1, correspondiente a los residuos desde 43 al 53 de la MSP-1 de *Plasmodium*, el cual, junto con secuencias derivadas del área central de la CSP, es uno de los componentes de la vacuna SPf(66) sintetizada y estudiada por **Patarroyo y col** ^[33], en el año 1988.

En este estudio se diseñaron dos proteínas híbridas que contenían epítipos que inducían a una parcial o total protección en monos *Aotus* experimentalmente infectados. Estas proteínas recibieron el nombre de SPf(66) y SPf(105) y sus secuencias son mostradas en la figura 29. ^[33]

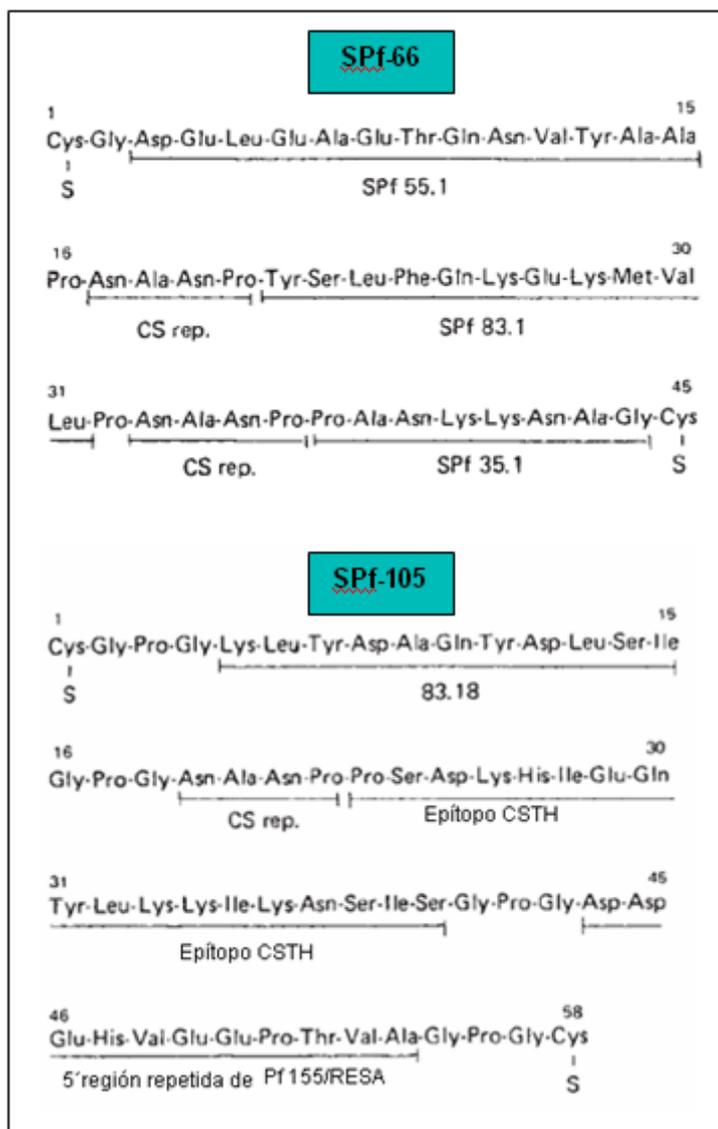


Figura 29. Secuencia de aminoácidos de las proteínas híbridas sintetizadas. [33]

La seguridad, inmunogenicidad y protección de la SPf(66) y SPf(105) fue previamente estudiada en monos y no hubo evidencia de comportamiento patológico. Una vez hechas estas pruebas, Patarroyo y su equipo iniciaron un estudio en trece voluntarios, soldados de las Fuerzas Militares Colombianas. [33]

Los voluntarios fueron divididos en grupos: cinco voluntarios (D.A., J.C., W.B., W.G. y L.C.) recibieron dosis de SPf(66); cuatro (H.A., J.S., E.O. y H.B.) recibieron dosis de SPf(105); otros tres sirvieron de control y solo recibieron solución salina de

la cepa a estudiar (A.C., J.D. y C.B.); y un voluntario (J.E.) sirvió de receptor pasivo de una cepa pasajera de *P. falciparum*. Cabe destacar que todos los voluntarios recibieron solución salina de eritrocitos infectados de una cepa *P. falciparum* sensible a la sulfadoxina y a la pirimetamina. De su seguimiento se obtuvieron los siguientes resultados:

	Porcentaje de parasitemia días después de la infección													
	5		6		7		8		9		10		11	
	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.
SPF(66)30														
W.B.	0	0	0	0	0.002	0.007	0	0	0	0	0	0	0	0
W.G.	0.015	0.036	0.040	0.002	0.440	0.289	0.020	0	0.171	0.368	0.019	0.006	0.190	0.120
L.C.	0	0.034	0.008	0	0.052	0.142	0.030	0.002	0.214	0.465	0.011	0.006	0.051	0.175
D.A.	0.006	0.010	0.028	0.011	0.410	0.400	0.066	0.007	0.288	0	0.014 ^T			
J.C.	0	0.006	0.007	0	0.002	0.171	0.183	0.002	0.078	2.150 ^T				
SPf(105)20														
H.A.	0	0.005	0.02	0	0.016	0.103	0.118	0.004	0.330	0.236	0.092	0.027	0.022	0.660
J.S.	0.010	0.180	0.025	0	0.002	0.220	0.013	0.005	0.603	0.660	0.011	0.02	0.384	0.420
E.O.	0	0.006	0.002	0.004	0.015	0.112	0.100	0.005	1.200 ^T					
H.B.	0.002	0.100	0.054	0.002	0.110	0.400	0.460	0.008	2.120 ^T					
Controles														
A.C.	0	0.032	0.022	0.007	0.016	0.270	0.150	0	0.115	1.600 ^T				
J.D.	0	0.033	0.026	0.005	0.008	0.870	0.780	0.017	4.260 ^T					
C.B.	0	0.120	0.072	0	0.300	2.300 ^T								
J.E.	0.008	0.100	0.115	0.010	1.700	3.600 ^{T*}								
	12		13		14		15	16	17	18	19	20	21	22
	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.								
SPF(66)30														
W.B.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W.G.	0.015	0.166	0.292	0.094	0.075	0.072	0.001	0	0.020	0.030	0	0.020	0	0
L.C.	0.130	0.013	0.120	0.242	0.060	ND	0.02	0.116	0.064	0	0	0	0	0
SPf(105)20														
H.A.	0.110	0.180	0.486	0.500	0.354	0.675 ^T								
J.S.	0.06	0.190	1.050 ^T											

Tabla 2. Parasitemia obtenida en los voluntarios días después de la infección. [33]

En la tabla se puede ver que, en general, se obtuvo una mayor respuesta inmunológica por parte de la SPf(66), con la cual sólo uno de los cinco voluntarios mostró una parasitemia superior al 0,5% al noveno día del estudio (D.A. salió del programa), teniendo esto mayor trascendencia al comparar con los valores obtenidos para los voluntarios de control. Sin embargo, su eficiencia no fue lo suficientemente significativa como para considerarla una vacuna exitosa debido a que, según estudios recientes, posee baja inmugenicidad e induce una respuesta humoral inmune temporal de aproximadamente seis meses. [33]

Una de estos estudios fue realizado por **Nikodem D. P. y col.** ^[34], en el año 2000, quienes estudiaron una región de 115 aminoácidos localizada en el medio del fragmento MSP-1₃₈. El objetivo de este estudio fue elucidar cualquier función de dicha región en la invasión del parásito al eritrocito para así definir si puede o no ser considerada un posible antígeno para el desarrollo de una vacuna.

Para ello, se generaron anticuerpos policlonales de esta región y se investigó su habilidad para inhibir la invasión del parásito, demostrándose no sólo que la P115MSP-1 es altamente antigénica, sino que los anticuerpos fueron efectivos en la prevención de la invasión in vitro. ^[34]

Adicionalmente, se demostró que la P115MSP-1 es reconocida por sueros de individuos en Cameroun, una región Africana endémica para malaria, indicando que estos dominios, o parte de ellos, son generados naturalmente en individuos infectados. ^[34]

Sin embargo, los mayores esfuerzos se han realizado sobre la unidad de 42 kDa y sobre el fragmento de 19 kDa que, como ya se mencionó, se derivan de la porción C-terminal de la proteína durante su procesamiento.

En este sentido, el año 2001, **Espejo F. y col** ^[35], estudiaron una secuencia localizada en la porción N-terminal del fragmento de 42kDa, que corresponde al péptido 1585 (EVLYLKPLAGVYRSLKKQLE), del cual la evidencia sugiere que tiene una muy pobre o ninguna respuesta antigénica. El objetivo de dicho trabajo fue introducir cambios en la estructura de este péptido por sustitución de aminoácidos y correlacionar dicha sustitución con el grado de protección inmunitaria conferida a monos *Aotus*.

El primer paso en el diseño de esta serie de péptidos análogos al 1585 fue el reconocimiento de los aminoácidos críticos en el proceso de unión al glóbulo rojo.

Estos aminoácidos resultaron ser: L5, K6, P7, A9 y S14 (EVLYLKPLAGVYRSLKKQLE).^[35]

La tabla 2 muestra las secuencias para el péptido 1585 y sus análogos sustituidos, los cuales han sido clasificados en tres grupos:

- Grupo A: comprende péptidos análogos de sustitución por glicina, de los cuales los péptidos 5187, 5188 y 5189 (correspondientes a la sustitución de aminoácidos implicados en la unión al glóbulo rojo) mostraron tener propiedades inmunogénicas.
- Grupo B: comprende una serie de péptidos donde los residuos fueron sustituidos por aminoácidos de masa similar pero polaridad diferente, obteniéndose entre un 16 y 50% de protección inmunológica.
- Grupo C: Aquellos donde no se obtuvo respuesta inmunitaria alguna.^[35]

Polymerized peptide No.	Peptide sequence																	Prot	Group			
1585	E	V	L	Y	L	K	P	L	A	G	V	Y	R	S	L	K	K	Q	L	E	0/5	
5187	-	-	-	-	G	K	P	-	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	1/4	A
5188	-	-	-	-	L	G	P	-	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	1/4	A
5189	-	-	-	-	L	K	G	-	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	1/4	A
6187	-	-	-	-	L	K	P	G	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	0	A
6177	-	-	-	-	L	K	P	-	A	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	0	A
13450	-	-	-	-	L	L	D	-	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	2/4	B
22806	-	-	-	-	L	L	D	-	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	2/9	B
10014	-	-	-	-	H	V	P	-	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	2/4	B
22768	-	-	-	-	H	L	P	-	A	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	1/10	B
11860	-	-	-	-	H	M	P	-	G	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	2/6	B
22770	-	-	-	-	H	L	P	-	G	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	2/9	B
13454	-	-	-	-	L	M	S	-	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	0/5	C
14448	-	-	-	-	H	M	D	-	G	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	0/3	C
14496	-	-	-	-	H	M	D	-	S	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	0/4	C
13724	-	-	-	-	H	V	T	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	0/5	C
12896	-	-	-	-	H	V	P	-	S	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	0/5	C
12898	-	-	-	-	H	V	P	-	G	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	0/5	C
15954	-	-	-	-	L	M	D	-	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	0/3	C
15956	-	-	-	-	L	M	P	-	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	0/4	C
15958	-	-	-	-	L	K	D	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	0/6	C
15960	-	-	-	-	L	M	D	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	0/4	C
13728	-	-	-	-	N	L	D	-	G	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	0/5	C
13452	-	-	-	-	L	I	D	-	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	0/50	C

Tabla 3. Respuesta inmune humoral causada por péptidos análogos al 1585 en monos *Aotus*.^[35]

En la búsqueda de vacunas más poderosas, los anticuerpos monoclonales (McAb) han sido una herramienta importante en el estudio de la MSP-1. La porción C-terminal de 19 kDa es actualmente un importante candidato para el desarrollo de una vacuna contra la etapa eritrocítica del ciclo de vida del parásito ya que se ha determinado que anticuerpos monoclonales se unen específicamente a esta región de la proteína.

En este sentido, **Blackman J. M y col.** ^[36], en el año 1990, emplearon una serie de anticuerpos monoclonales para hacerle el seguimiento a los fragmentos de la MSP-1 de *P. falciparum* durante la invasión al eritrocito y se determinó que, en efecto, solo el fragmento de 19 kDa es detectable en el nuevo eritrocito invadido.

Por otro lado, se demostró que la invasión fue inhibida por los anticuerpos monoclonales 12.8 y 12.10, específicos para la PfMSP-1₁₉. En la siguiente figura se muestra los resultados para dos cepas diferentes del parásito (T9-94 y T9-96) empleando el anticuerpo 12.10 como inhibidor y el mAb 13.3 como control. En dicha figura se observa que, a 500 µg/mL, el anticuerpo inhibe la invasión en un 72% para la cepa T9-94 y en un 50% para la cepa T9-96. ^[36]

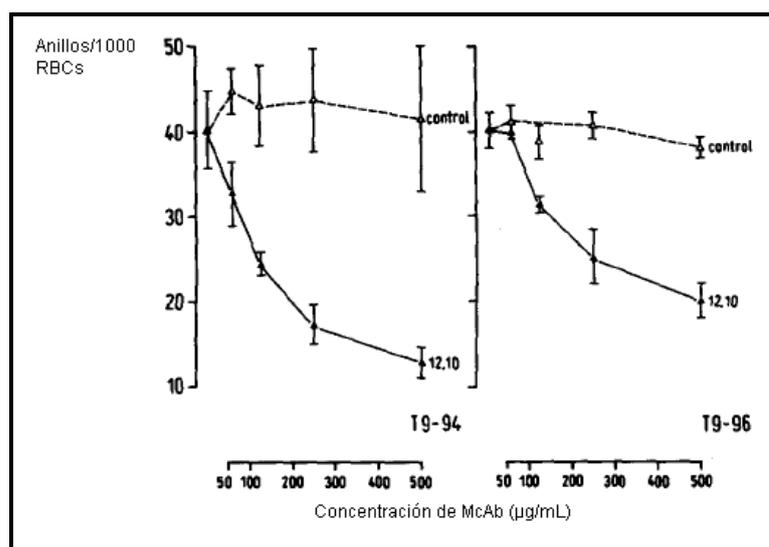


Figura 30. Inhibición de la invasión del merozoíto al glóbulo rojo por el mAb 12.10 para las cepas de *P. falciparum* T9-94 y T9-96 (Control: MAb 13.3) ^[36]

Continuando con el estudio del reconocimiento de fragmentos de la PfMSP-1 por parte de anticuerpos monoclonales, **Cooper J.A., Cooper L.T. y Saul A.J** ^[37], en el año 1991, estudiaron las regiones de esta proteína más ampliamente reconocidas por una serie anticuerpos provenientes de roedores.

En este estudio se concluyó que la región más antigénica corresponde al fragmento de 19 kDa, el cual es reconocido por doce de los diecinueve anticuerpos monoclonales empleados. Uno de estos anticuerpos, el 4H9/19, reconoce un epítipo cerca de la región C-terminal y llamó especialmente la atención pues fue el único que inhibió significativamente el proceso de crecimiento y/o invasión del parásito en los ensayos in vitro. ^[37] Los resultados de varios de estos ensayos son resumidos en la Tabla 4.

Ensayo	Concentración del anticuerpo (mg/mL)	Anticuerpo Control	Anticuerpo ensayado	% de inhibición	P
1a	0.719	31.5 +/- 0.7	28.2 +/- 1.5	10	0.05
2a	0.364	76.7 +/- 8.8	60.9 +/- 5.8	20	0.05
3b	1.407	199.2 +/- 12.3	117.4 +/- 7.2	41	0.001
4b	1.407	484.3 +/- 16.8	361.3 +/- 8.2	25	0.001
5b	1.407	454.5 +/- 9.2	403.3 +/- 12.4	11	0.001
6b	1.407	274.9 +/- 15.0	195.0 +/- 10.5	29	0.001
7b	1.407	317.1 +/- 15.5	215.7 +/- 10.1	32	0.001
8b	1.407	83.8 +/- 7.0	93.1 +/- 9.3	-	-
9b	1.407	101.1 +/- 4.3	104.2 +/- 4.0	-	-
10b	1.407	259.8 +/- 8.7	199.2 +/- 5.4	23	0.001
11b	1.407	431.0 +/- 23.7	314.6 +/- 5.5	27	0.001
12b	1.407	295.3 +/- 20.5	203.8 +/- 11.1	31	0.001
13b	1.407	484.5 +/- 33.8	249.6 +/- 11.3	48	0.001
14b	1.407	564.3 +/- 59.6	307.9 +/- 3.8	45	0.002
15b	1.407	764.6 +/- 59.6	508.2 +/- 3.8	33	0.002
16b	0.460	1.9 +/- 0.1	1.3 +/- 0.1	30	0.001
17b	0.460	4.8 +/- 0.5	3.1 +/- 0.3	34	0.001
18b	1.670	5.4 +/- 0.2	4.0 +/- 0.2	27	0.001
19b	1.670	4.8 +/- 0.3	3.9 +/- 0.2	20	0.001

Tabla 4. Inhibición de la invasión de *P. falciparum* con mAb 4H9/19. P es el nivel de significancia de la diferencia entre el control y el valor del ensayo. ^[37]

En esta tabla se puede observar que los niveles de inhibición varían entre el 10 y el 48% a concentraciones de 0,3 a 1,4 mg/mL del anticuerpo. La falta de inhibición por parte de dos de los ensayos realizados (8b y 9b), no se logró explicar. ^[37]

Ampliando el estudio de la MSP-1 para *P. vivax*, **Portillo H.A. y col.** ^[38], en el año 1991, reportaron la secuenciación de la misma. Este gen, al que llamaron Pv200, se encuentra codificado por un polipéptido de 1726 aminoácidos y tiene características similares a los genes MSP-1 de otras especies del *Plasmodium*.

Una porción de la PvMSP-1 (cepa de Belem) ha sido previamente caracterizada y en dicho trabajo se presentó la estructura primaria completa, la cual reportaron como se muestra en la figura 31.

Mucho después, en el 2006, **Serrano M. L., Perez H. A. y Medina J. D.**^[39], modelaron la estructura tridimensional del fragmento C-terminal 19 kDa de la proteína PvMSP-1 por homología con el mismo fragmento de la PcMSP-1, para luego refinar dicha estructura por dinámica molecular.

Para este estudio se alineó la secuencia del PvMSP-1₁₉ (cepa de Belem estudiada por **Portillo** en 1991 y señalada en naranja en la figura 28 con la secuencia de proteínas MSP-1₁₉ de otras especies de *Plasmodium* cuyas estructuras cristalinas son conocidas, estas son: *P. cynomolgi*, *P. knowlesi* y *P. falciparum*. De donde la estructura del PcMSP-1₁₉ fue la seleccionada como plantilla para generar el modelo, debido a su similitud con la secuencia del PvMSP1₁₉^[39] (figura 32)

Dominio-1		1	10	20	30	40
Q02569	MSSEHTCIDT--NVPD	NAACYRYLDGM----	EEWRCLLTF---	KEEGGKCVPGSNV		
B9W	MSSEHRCIDT--NVPENA	ACYRYLDGT----	EEWRCLLYF---	KEDAGKCVAPNM		
1N1I	-SSAHCIDT--NVPENA	ACYRYLDGT----	EEWRCLLGF---	KEVGGKCVPA-SI		
1CEJ	NISQHQCVK--KQCPQNSG	CFRHLD----	BREECKLLNY---	KQEGDKCVENPNP		
Dominio-1		50	60	70	80	90
Q02569	-----TCKDNNGGCAPEAECK	MTD-----	SNKIVCKCTKEGSEPLFEGVFCSSS			
1B9W	-----TCKDKNGGCAPEAECK	MND-----	KNEIVCKCTKEGSEPLFEGVFCSHH			
1N1I	-----TCEENNGGCAPEAECT	MDD-----	KKEVECKCTKEGSEPLFEGVFC-			
1CEJ	-----TCNENNGGCDADAKCTEEDSGSNGKKIT	CECTKPD	SYPLFDGIFC	SSSN		

Figura 32. Alineación de secuencias de aminoácidos de MSP-1₁₉ para *P. vivax* (Q02569), *P. cynomolgi* (1B9W), *P. knowlesi* (1N1I) y *P. falciparum* (1CEJ).^[39]

Se generaron un total de cinco modelos y el escogido fue aquel que mostró una mayor puntuación y un menor valor de rmsd con respecto a la estructura cristalina del PcMSP1₁₉ (figura 33).

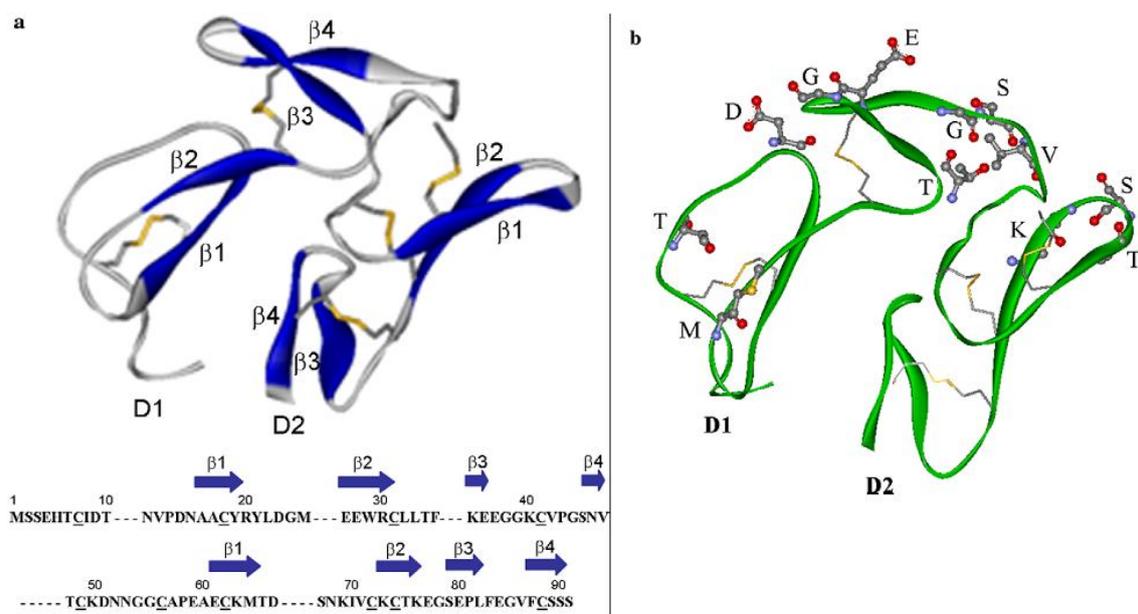


Figura 33. a) Modelo de la PvMSP1₁₉. b) aminoácido variantes entre la PcMSP1₁₉ y la PvMSP1₁₉^[39]

Adicionalmente, **Serrano M. L.**, en su Tesis Doctoral^[40], seleccionó en base al modelo, fragmentos que pudieran ser accesibles a los anticuerpos y se prepararon los péptidos sintéticos correspondientes. Finalmente, se examinó la respuesta de los anticuerpos con el propósito de evaluar la presencia de epítomos distribuidos a lo largo de la secuencia de este fragmento. Tres péptidos fueron altamente reconocidos por el plasma de los pacientes indígenas indicando la posible presencia de epítomos B.

En el 2003, **Pizarro J. C., Chitarra V., Verger D. y col.**^[41], describieron la estructura de la MSP-1₁₉ para *P.falcíparum*, así como su complejo con el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal G17.12, el cual reconoce 13 residuos de dicha proteína. Cabe destacar que, pesar de que el epítomo incluye residuos que han sido reconocidos por anticuerpos inhibitorios de la invasión en otras investigaciones, el G17.12 no inhibe la invasión del merozoíto al glóbulo rojo.

La estructura cristalina está formada por dos moléculas que consisten en el fragmento Fab del anticuerpo, con 215 y 219 aminoácidos para la cadena liviana y la pesada, respectivamente; y la proteína PfMSP-1₁₉ con 95 aminoácidos.

Se estableció que el Fab G17.12 reconoce un epítipo discontinuo en la estructura del PfMSP-1₁₉, con aminoácidos que interaccionan a distancias menores a los 4,0 Å. Esto incluye los segmentos de aminoácidos 8-11, 13-14, 24-26, el aminoácido 28 y el segmento 38-39 del antígeno. Como se puede observar en la figura 34, dichos aminoácidos se encuentran en un “codo” de la estructura de la PfMSP-1₁₉.^[41]

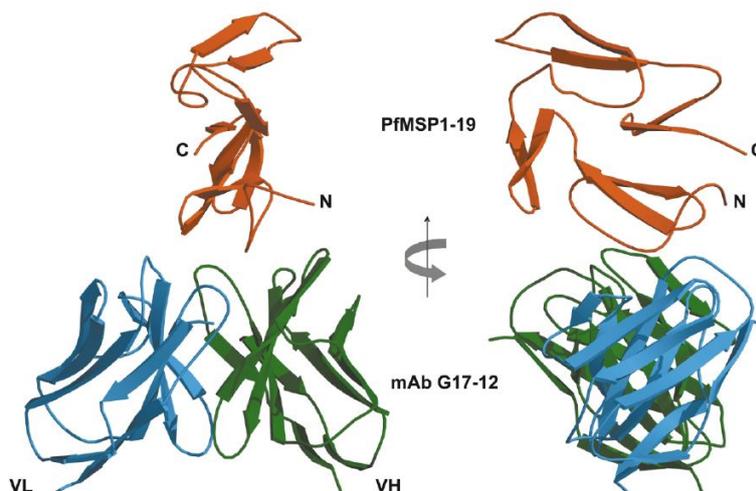


Figura 34. Vistas ortogonales de la cadena principal del complejo PfMSP1₁₉/FabG17.12, mostrándose el antígeno y los dominios variables del anticuerpo (V_L y V_H)^[41]

En este estudio se determinó que el sitio de unión al antígeno posee una forma cóncava y que una zona considerablemente importante de la región hipervariable del anticuerpo hace contacto directo con la PfMSP-1₁₉ (figura 35). Por otro lado, se concluyó que las interacciones polares juegan un papel predominante en la formación del complejo; con un total de doce puentes de hidrógeno, nueve formados con la zona variable de la cadena pesada del anticuerpo (V_H) y tres con una zona análoga en la cadena liviana (V_L); además de dos enlaces salinos, ambos formados con V_H. Con esto se estableció que, en la alta afinidad del G17.12 con la PfMSP1₁₉, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo contribuye con 65% de las interacciones.^[41]

En la siguiente figura, los dos componentes del complejo han sido separados para mostrar las superficies de contacto para G17.12 (a la izquierda) y para PfMSP-1₁₉ (a la derecha). También se observan las cadenas laterales de

los aminoácidos de contacto, los cuales para el anticuerpo se denotan con verde los pertenecientes a V_L y con rojo los pertenecientes a V_H ; por otro lado, en el caso del antígeno se emplearon estos mismos colores para los aminoácidos en contacto con V_L y V_H , respectivamente.

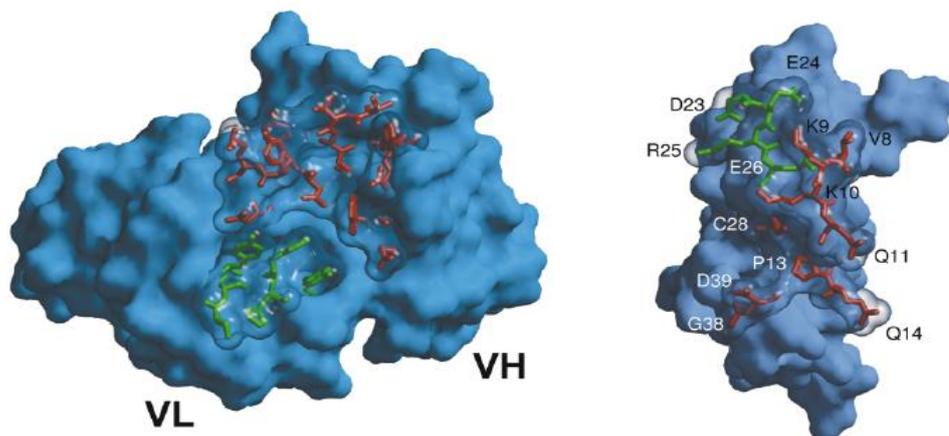


Figura 35. Interfase entre el anticuerpo FabG17.12 y la PfMSP-1₁₉.^[41]

OBJETIVOS

Objetivo General:

El objetivo principal de este Trabajo Especial de Grado es modelar el complejo de la proteína MSP1₁₉ de *Plasmodium vivax* con el anticuerpo FabG17.12 y estudiar las interacciones pertinentes, para luego sintetizar los péptidos involucrados en tales interacciones, y que se espera puedan tener propiedades antigénicas induciendo una respuesta inmunológica contra el parásito *P. vivax*, causante de la malaria.

Objetivos Específicos:

- Realizar el estudio de la interacción entre la proteína PvMSP-1₁₉ y el anticuerpo FabG17.12 a través de herramientas de modelado molecular (docking) y determinar la estructura probable del complejo antígeno-anticuerpo
- Identificar la(s) región(es) de la PvMSP-1₁₉ involucradas en la interacción con el anticuerpo y seleccionar fragmentos de dichas regiones.
- Llevar a cabo la síntesis en fase sólida de péptidos correspondientes a el o los fragmentos seleccionados.
- Determinar el grado de pureza del o los péptidos sintetizados mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y purificarlos de ser necesario.
- Caracterizar el o los péptidos sintetizados mediante espectrometría de masa (E.M.)

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Estudio Docking y selección de fragmentos a sintetizar:

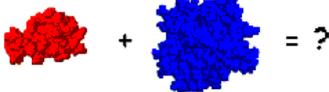
Los cálculos y los análisis de los complejos modelados se realizaron empleando los programas: PatchDock, FireDock, RosettaDock y AD IT Validation Server a través de sus servidores web. Se empleó Swiss-PdbViewer 3.7 para los cálculos de superposición y de RMSD y DSViewer 5.0 para la visualización y representación gráfica de las estructuras.

Se llevó a cabo el estudio docking entre la proteína antigénica PvMSP1₁₉ y la región variable del anticuerpo G17.12 empleando los programas PatchDock, FireDock y RosettaDock a través de sus servidores disponibles en la web. Previamente, con la finalidad de validar las condiciones del análisis se reprodujo la estructura del complejo ya reportado entre la PfMSP1₁₉ y el anticuerpo FabG17.12 (PDB: 1ob1) empleando PatchDock y FireDock. A continuación se explica más detalladamente el estudio computacional llevado a cabo:

Modelado del complejo reportado: PfMSP1₁₉-Fab G17.12.

Se enviaron a PatchDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock>) las estructuras de la PfMSP1₁₉ y del Fab G17.12 referenciadas por su código PDB, se especificó que el complejo esperado es de la forma Antígeno-Anticuerpo y se empleó un *clustering* de 4 Å de RMSD; tal como se muestra en la figura:



PATCHDOCK  = ?

Molecular Docking Algorithm Based on Shape Complementarity Principles

Type PDB codes of receptor and ligand molecules or upload files in PDB format

Receptor Molecule:

Ligand Molecule:

e-mail address:

Clustering RMSD:

Complex Type:

Figura 36. Ejemplo del trabajo enviado a PatchDock para reproducción del complejo entre la PfMSP1₁₉ y el anticuerpo FabG17.12.

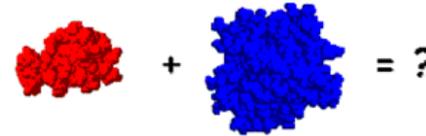
Donde el receptor es la región Fab del anticuerpo G17.12, específicamente las cadenas D y E del archivo PDB (1ob1:DE), mientras que el ligando es la proteína PfMSP1₁₉, específicamente la cadena F del archivo PDB (1ob1:F).

Las primeras 500 soluciones obtenidas del análisis de PatchDock fueron enviadas a FireDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock>) para su refinamiento (Anexo I, p.124). La primera solución producto de esta re-evaluación se comparó con la solución reportada, empleando para ello el programa Swiss-PdbViewer 3.7; esto se realizó superponiendo las estructuras de los anticuerpos con la función “Fit molecules”, usando únicamente los C α . Luego se determinó el valor de RMSD entre el complejo reportado y el obtenido.

Determinación y estudio del complejo de la PvMSP1₁₉ con la región Fab del anticuerpo G17.12.

Se enviaron a PatchDock las estructuras de la PvMSP1₁₉ y del Fab G17.12. La primera estructura fue asignada como un archivo PDB y la segunda fue referenciada por su código PDB de las bases de datos (1ob1:DE). Se especificó que el tipo de complejo esperado es de la forma Antígeno-Anticuerpo y se empleó un *clustering* de 4 Å de RMSD. Tal como se observa en la figura 37.

PATCHDOCK



Molecular Docking Algorithm Based on Shape Complementarity Principles

[\[About PatchDock\]](#) [\[Web Server\]](#) [\[Download\]](#) [\[Help\]](#) [\[FAQ\]](#) [\[References\]](#)

Type PDB codes of receptor and ligand molecules or upload files in PDB format

<p>Receptor Molecule:</p> <p>Ligand Molecule:</p> <p>e-mail address:</p> <p>Clustering RMSD:</p> <p>Complex Type:</p>	<p><input type="text" value="1ob1:DE"/></p> <p><input type="text"/></p> <p><input type="text" value="adrygauna@gmail.com"/></p> <p><input type="text" value="4.0"/></p> <p><input type="text" value="Antibody-antigen"/></p>	<p>(PDB:chainId e.g. 2kai:AB) or upload file: <input type="text"/> <input type="button" value="Examinar..."/></p> <p>(PDB:chainId e.g. 2kai:I) or upload file: <input type="text" value="C:\Documents & Settings\adrygauna\My Documents"/> <input type="button" value="Examinar..."/></p> <p>(the results are sent to this address)</p>
--	--	---

Be sure to give receptor and ligand in the corresponding order!

Figura 37. Ejemplo del trabajo enviado a PatchDock para la obtención del complejo entre la PvMSP1₁₉ y el anticuerpo Fab G17.12

Las primeras 1000 soluciones obtenidas de PatchDock fueron enviadas a FireDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/>) y refinadas, repitiéndose este análisis un total de diez veces con la finalidad de observar la tendencia estadística del estudio (Anexo II, p.125). Una vez realizados todos los análisis se compararon las primeras soluciones obtenidas en cada caso, empleando para ello el programa Swiss-PdbViewer 3.7; esto se realizó mediante la superposición geométrica de las estructuras con la función “Fit molecules”, usando únicamente los C α . Luego se determinó el valor de RMSD entre los complejos.

La estructura determinada como promedio de los diez análisis anteriores se envió a RosettaDock (<http://rosettadock.graylab.jhu.edu>) para un proceso de refinamiento final. La estructura se envió como un “combined input file”, tal como se muestra en la figura 38.



The screenshot shows the RosettaDock Server web interface. At the top, there is a blue header with the text "RosettaDock Server". Below the header, there is a navigation bar with links: [Home], [Queue], [Submit task], and [Documentation]. The main heading is "Submit a new local docking job". Below this, there is a form with the following fields and text:

- Email:
- See the [documentation](#) for tips on creating input structures for submission.
- There are two job submission methods:
 - Combined Input File
- Protein names:
- Combined pdb file:
- Docking partners should be separated by a 'TER' line, with no other 'TER' lines in the file.

Figura 38. Ejemplo del trabajo enviado a RosettaDock para el refinamiento del complejo PvMSP1₁₉-Fab G17.12

Se escogió el complejo de menor energía para el análisis de resultados y se determinó el valor de RMSD entre este complejo refinado y la estructura determinada por FireDock. Se estudió el gráfico suministrado por RosettaDock de la energía de las estructuras creadas en función del valor de RMSD respecto al

complejo de partida, así como el archivo PDB para dicha estructura final (Anexo III, p 126), donde se estudió en detalle los términos energéticos de la función de puntuación de alta resolución, las interacciones en la interfase y los aminoácidos implicados en las mismas. (Anexo IV, p.129).

Para visualizar algunas de las interacciones, tales como los puentes de hidrógeno y las interacciones π - π (ésta última no es considerada por RosettaDock) se expandieron las cadenas laterales de los aminoácidos implicados, empleando para ello el programa DS ViewerPro 5.0. Dicho programa también fue empleado para realizar el cálculo correspondiente a la representación de van der Waals de las estructuras con el fin de visualizar la complementariedad geométrica entre las mismas.

Con la intención de validar geoméricamente la estructura del complejo, se determinó el gráfico Ramachandran del complejo final empleando AD IT Validation Server (<http://pdbdep.protein.osaka-u.ac.jp/validate/>) y se estudiaron las estadísticas correspondientes a dicho gráfico.

Adicionalmente, para facilitar el entendimiento del complejo obtenido en este trabajo, se llevó a cabo la superposición de la estructura tridimensional de la MSP1₁₉ de *P. vivax* con la de *P. falciparum*, empleando para ello la función "fit molecules" del programa Swiss-PdbViewer, usando únicamente los C α para luego determinar el RMSD entre dichas estructuras.

En base a los fragmentos de la PvMSP1₁₉ implicados en las interacciones con las cadenas del anticuerpo, se escogió un péptido de dieciséis aminoácidos para ser sintetizado.

Síntesis, purificación y caracterización del fragmento peptídico escogido:

Instrumentos, materiales y reactivos.

Los Fmoc-aa y la mayoría de los reactivos empleados para la síntesis en fase sólida de los péptidos son de Iris Biotech y la síntesis se realizó de forma manual.

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) analítica se realizó en un cromatógrafo Waters (Milford, Mass) modelo 600 LCD controlado por el programa Millennium 32, equipado con un detector de absorbancia con arreglo de diodos (modelo 996), empleando una columna Aqua 5 μ , C18, 125 Å (30 x 4,6 mm, Phenomenex). La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) semi-preparativa se realizó empleando el mismo equipo y una columna Luna 5 μ , C18, 100 Å (250 x 10,0 mm, Phenomenex).

El análisis de masas fue realizado en un sistema de Trampa de Iones Lineal 3200 QTRAP (Applied Biosystem).

Reactivos y solventes:

1-Hidroxibenzotriazol (HOBT)	Iris Biotech
Acetonitrilo (HPLC)	B & J Brand
Ácido Ascórbico	Riedel-de Haën
Ácido Clorhídrico al 36%	EM Science
Ácido Trifluoroacético (TFA)	Iris Biotech
Alcohol isopropílico (IPA)	Mallinckrodt
Azul de Bromofenol	Riedel-de Haën
Cloruro de 2-clorotritilo (Soporte sólido)	Iris Biotech
Diclorometano (DCM)	Sigma Aldrich
Dimetilformamida (DMF), grado síntesis de péptidos	Iris Biotech
Eter etílico	Riedel-de Haën
Metanol HPLC	B & J Brand
N,N-diisopropiletilamina (DIPEA)	Iris Biotech
N-metilpirrolidona (NMP)	Iris Biotech
tetrafluoroborato de O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU)	Iris Biotech
Piperidina (PIP), N-metilpiperidina.	Sigma Aldrich
Yodo metálico	Riedel-de Haën
AA 9-Fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) empleados: Alanina, Ala; Arginina (2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonil), Arg(Pbf); Asparagina(Tifenilmetil), Asn(Trt); Ácido aspártico(t-Butoxi), Asp(OtBu); Cisteína(Acetaamidometil), Cys(Acm); Histidina (Trifenilmetil), His(Trt); Isoleucina, Ile; Prolina, Pro; Treonina(t-Butoxi), Thr(tBu); Tirosina(t-Butoxi), Tyr(tBu).	Iris Biotech

Procedimiento para la síntesis del péptido escogido

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
 Secuencia del péptido escogido: H T C I D T N V P D N A A C Y R

El péptido, con una longitud de dieciséis aminoácidos, fue sintetizado como carboxilo en su porción C-terminal, acetilado en su porción N-terminal y posteriormente ciclado mediante la formación de un puente de disulfuro entre las Cisteínas 3 y 14. El mismo fue preparado de forma manual combinando la síntesis en fase sólida Fmoc (9-fluorenilmetilcarbonil) y la mezcla activante Resina: AA: HOBT: TBTU: DIPEA en las proporciones 1: 4: 4: 4: 8.

La síntesis se realizó dentro de una jeringa plástica (Figura 39) en la cual estaba contenida la resina sólida. En la parte inferior de la jeringa se colocó un anillo plástico que protege la resina y que fija en su lugar al filtro de placa porosa, el cual cumple la función de mantener la resina dentro de la jeringa en los procesos sucesivos de toma y descarte de las soluciones empleadas durante la síntesis.

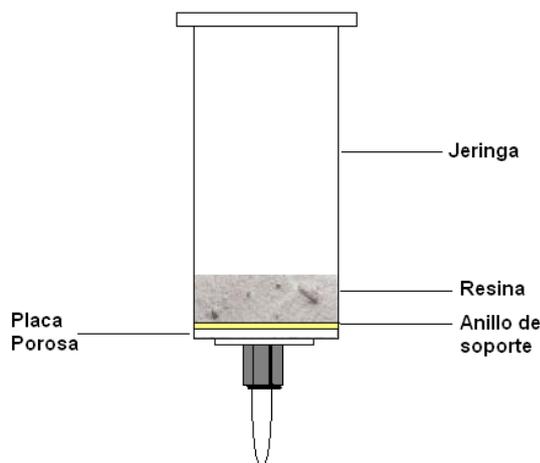


Figura 39. Método de jeringa empleado para la síntesis del péptido

Como soporte sólido se empleó la resina cloruro de clorotritilo (100mg), la cual se solvató con diclorometano (DCM), guardado sobre tamíz, durante tres horas y se lavó con N,N-dimetilformamida (DMF) cuatro veces durante diez minutos. Luego

se procedió al acople del primer aminoácido empleando una sustitución de 0,5mmol/g y, por tratarse de la resina cloruro de 2-clorotritilo, el primer acople no amerita activantes por lo que simplemente se empleó una mezcla Resina: AA: DIPEA en las proporciones 1: 1: 4 durante tres horas y treinta minutos. Una vez acoplado el primer aminoácido se procedió al bloqueo de los sitios activos aún disponibles en la resina, esto se realizó a través de una mezcla DCM: MeOH: DIPEA en las proporciones 17: 2: 1 seguido del siguiente ciclo de lavados de la resina-peptido: CH₂Cl₂ x 1 min x 3 veces; DMF x 1 min x 2 veces; CH₂Cl₂ x 1 min x 2 veces.

Las posteriores reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo con la proporción arriba indicada y los tiempos de dichas reacciones fueron determinados por seguimiento de las mismas a través de un ensayo cualitativo con azul de bromofenol y por ensayo de ninhidrina en los casos en que el primero resultase dudoso. Los lavados sucesivos de la resina-peptido luego de culminar un ciclo de acople se realizaron como sigue: DMF x 1min x 3 veces; i-pro-OH x 1min x 1 vez; CH₂Cl₂ x 1 min x 2 veces; DMF x 1 min x 1 vez. Al último lavado se le realiza el ensayo de azul de bromofenol para verificar la total remoción de la mezcla activante antes de realizar el ensayo a la resina para verificar la culminación del acople.

La desprotección de los α aminoácidos, protegidos con el grupo Fmoc, se realizó con N-metilpiperidina (al 20% en DMF tres veces durante 20 minutos) en la mayoría de los casos y con piperidina (al 20% en DMF cuatro veces durante 25 minutos aprox.) para la desprotección de los aminoácidos Asp 5, Pro 9 y Asp 10. Los lavados sucesivos de la resina-peptido una vez culminado un ciclo de desprotección se realizaron como sigue: DMF x 1 min x 5 veces; i-pro-OH x 1 min x 3 veces; CH₂Cl₂ x 1 min x 3 veces; DMF x 1min x 1 vez. Al último lavado se le realiza el ensayo de azul de bromofenol para verificar la total remoción de la N-metilpiperidina o piperidina, según sea el caso.

Una vez acoplado el último aminoácido, éste se desprotegió como se ha indicado anteriormente y se acetiló con una mezcla anhídrido acético: DCM: DMF:

DIPEA en las proporciones 3: 8: 8: 1 por veinte minutos un total de tres veces y se realizaron múltiples lavados con DCM, DMF y isopropanol.

El péptido fue ciclado aún unido a la resina mediante la formación de un puente disulfuro entre las Cys-3 y Cys-14, protegidas con el grupo Acm. Para ello la resina-péptido fue suspendida en una solución acuosa al 50% en metanol; se añadieron 10mL de una solución 1M de HCl y 10 mL de una solución 0,1M de I₂ en metanol. Se dejó reaccionar por agitación vigorosa en la oscuridad durante 3 h y se detuvo la reacción por adición de una solución 1M de ácido ascórbico hasta la desaparición total de la coloración causada por el yodo. Finalmente, se filtró la resina-péptido y se lavó con solución 50% en metanol, DCM y DMF hasta que la resina lució una coloración blanca.

Luego, el péptido se liberó de la resina y simultáneamente se retiraron los grupos protectores de las cadenas laterales por tratamiento con 1,5 mL de una solución al 5% de ácido trifluoroacético(TFA) en agua durante 3 h a temperatura ambiente. Se filtró la resina y se lavó con agua y pequeñas porciones de acetonitrilo para luego agregar 25 mL de eter etílico frío. El péptido crudo, disuelto en agua, fue liofilizado un total de tres veces obteniéndose un sólido de color blanco.

Cabe destacar que previo a la formación del puente disulfuro, una porción del péptido se liberó de la resina en su forma lineal por el mismo procedimiento mostrado arriba (condiciones bajo las cuales los grupos Acm permanecen intactos) y fue liofilizado un total de tres veces obteniéndose un sólido blanco. La pureza de este péptido lineal, aún protegido en sus cisteínas con grupos Acm, fue determinada por HPLC analítica en fase reversa empleando un gradiente lineal de 10-80% acetonitrilo en agua y 0,1% TFA durante 30 min con un flujo 1 mL/min. (Anexo V, p.134)

Por otro lado, el péptido final fue purificado por HPLC semi-preparativa (Anexo VI, p.134) en fase reversa empleando un gradiente lineal de 15-80%

acetonitrilo en agua y 0,1% TFA durante 30 min y 10 min con una fase móvil de 80% acetonitrilo con un flujo de 3 mL/min.

El análisis de masas (Anexo VIII, p.136) fue realizado en un sistema de Trampa de Iones Lineal 3200 QTRAP (Applied Biosystem). El péptido fue disuelto en una solución de Agua:Acetonitrilo: Acido Fórmico en proporciones 70: 30: 0,01%-MeOH Todos los análisis fueron realizados utilizando una fuente "Turbo Ion Spray" en modo positivo: A) ESI-MS fue realizado mediante infusión directa con una velocidad de flujo de 10 μ L/min B) gas nebulizador, gas cortina, gas de secado y gas de colisión: N₂ C) Voltaje de IonSpray: 5500 V D) El potencial de "declustering" fue de 70 V y la energía de colisión de 10 V. La adquisición de los datos fue realizada escaneando la relación masa/carga (m/z) desde 500 a 1700 uma.

Ensayo cualitativo de Azul de Bromofenol:

El ensayo fue realizado por la adición de una solución al 1% de azul de bromofenol en etanol sobre la resina-péptido. Una coloración azul o verde se debe a la presencia de grupos amino libres lo que indica que la reacción de acoplamiento no ha culminado y que se amerita mayor tiempo de reacción, preferiblemente con solución fresca de aminoácido.

Ensayo de Ninhidrina:

Este ensayo fue realizado por la adición de tres gotas de una solución de ninhidrina al 5% en etanol sobre una pequeña cantidad de resina-péptido dentro de un pequeño tubo de ensayo, luego el tubo es calentado a 100°C durante 5 min. La aparición de una coloración azul-verdosa sobre la resina se debe a la presencia de amina libre lo que indica que la reacción de acoplamiento no ha culminado y que se amerita mayor tiempo de reacción, preferiblemente con solución fresca de aminoácido. Es posible, sin embargo, que algunos aminoácidos como la serina, el

ácido aspártico o la asparagina no muestren la coloración azul oscuro que se espera cuando existen grupos aminos libre.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Estudio Docking y selección de fragmentos a sintetizar:

El Docking es una herramienta computacional de gran utilidad para la predicción de la estructura de un complejo entre dos moléculas: Una molécula receptora y una molécula ligando. En caso es específico de este trabajo, la molécula ligando consiste en la estructura tridimensional modelada por homología de la proteína antigénica MSP1₁₉ del *Plasmodium vivax*; y la molécula receptora consiste en la región Fab del anticuerpo G17.12, cuya estructura se encuentra reportada como un complejo con la MSP1₁₉ de *Plasmodium*. Como podemos ver, el complejo esperado es del tipo antígeno-anticuerpo, donde se facilita considerablemente el análisis debido a que existe una región determinada en los anticuerpos la cual es la encargada del reconocimiento del antígeno.

Con la intención de validar las condiciones del análisis, primero se intentó reproducir la estructura ya reportada del complejo entre la MSP1₁₉ para *P.* y el anticuerpo FabG17.12 empleando PatchDock y FireDock. Del análisis en conjunto de estos dos programas, se obtuvo como primera solución la estructura mostrada en la figura 40A; y al superponer las cadenas del anticuerpo de la estructura obtenida con las de la estructura reportada por Pizarro y col. ^[41], se tiene un valor de RMSD de la posición relativa de los ligandos de apenas 1,64 Å (figura 40B); lo que nos indica que, en efecto, se pudo reproducir satisfactoriamente el complejo reportado.

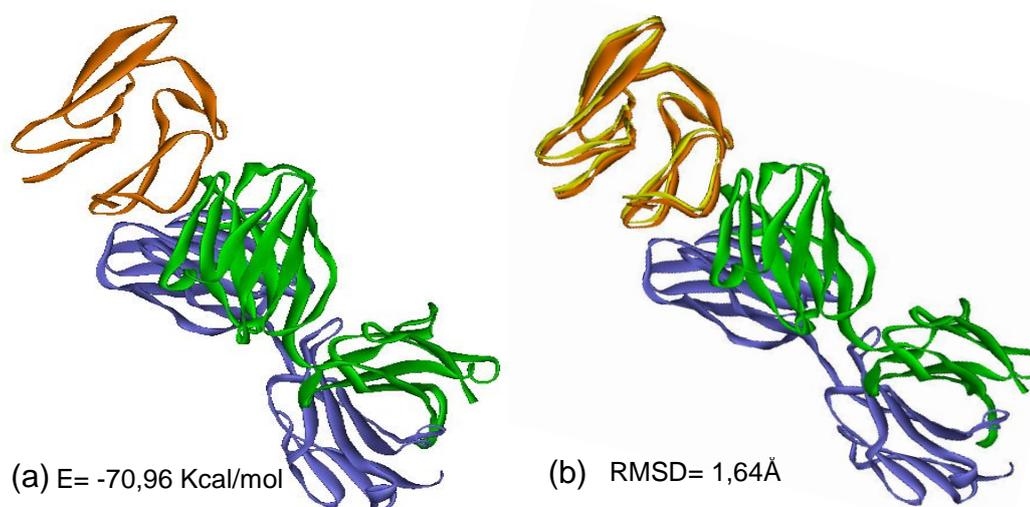


Figura 40. (a) Estructura obtenida para el complejo PfMSP1₁₉-Fab G17.12. (b) Superposición de la estructura reportada y la obtenida para el complejo. Naranja: PfMSP1₁₉, modelo. Amarillo: PfMSP119, estructura cristalina. Verde: Fab G17.12, cadena liviana. Azul: Fab G17.12, cadena pesada

Dicha estructura posee una energía total de -70.96 Kcal/mol según la función de puntuación empleada por FireDock y la contribución de los términos energéticos considerados (Anexo I, p.124), nos indica que las interacciones atractivas de van der Waals y electrostáticas juegan un papel fundamental en la estabilización del complejo, seguidas de la formación de puentes de hidrógeno (Tabla 5). Adicionalmente, se observa que existen interacciones entre aminoácidos aromáticos, lo que también contribuye a la estabilización de la estructura.

T. energético	Contribución (Kcal/mol)	T. energético	Contribución (Kcal/mol)
EVdW _{atrac}	-42,72	E _a _{elec_l}	-8,65
EVdW _{rep}	9,50	E _r _{elec_l}	0,00
E _{sol}	8,11	E _{HB}	-8,26
E _{rot}	18,42	E _{π-π}	-1,5
E _a _{elec_c}	-48,48	E _{cat-π}	0,00
E _r _{elec_c}	0,00	E _{aliph}	0,00
E total= -70,96 Kcal mol			

Tabla 5. Energía total y términos energéticos de la solución número uno arrojada por FireDock para el complejo PvMSP1₁₉-FabG17.12.

Una vez validadas las condiciones del análisis, se procedió a la obtención del complejo entre la MSP1₁₉ del *P. vivax* con el anticuerpo FabG.17.12. Para ello se empleó la misma combinación de los programas PatchDock y FireDock, repitiéndose el análisis en conjunto un total de 10 veces, con lo cual se obtuvo la estructura mostrada en la figura 41, producto de la superposición de las réplicas con una desviación de RMSD de 0 Å entre ellas. Esto nos indica que el trabajo en conjunto de PatchDock con FireDock es altamente reproducible, aportando una única solución.

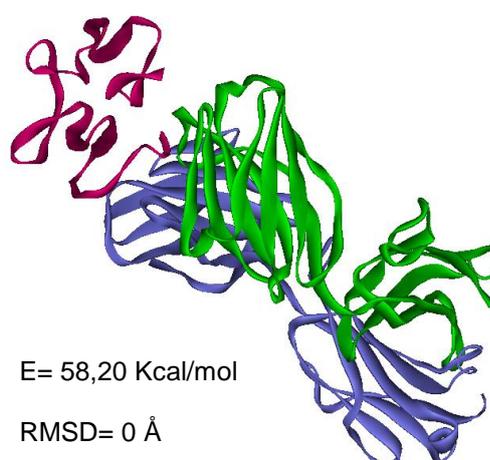


Figura 41. Estructura del complejo PvMSP1₁₉-Fab G17.12 obtenida por diez análisis empleando PatchDock y FireDock. Fucsia: PvMSP1₁₉. Verde: Fab G17.12, cadena liviana. Azul: Fab G17.12, cadena pesada.

Esta estructura mostró tener una energía total de 58,20 Kcal/mol según la función de puntuación empleada por FireDock, y la contribución de los términos energéticos (Anexo II, p.125) nos indica que, al igual que en el complejo con *P.falciparum*, las interacciones atractivas de van der Waals y electrostáticas juegan un papel importante en la estabilización del complejo, seguidas de la formación de puentes de hidrógeno, así como las interacciones entre las nubes π de aminoácidos aromáticos (Tabla 6).

T. energético	Contribución (Kcal/mol)	T. energético	Contribución (Kcal/mol)
EVdW _{atrac}	-28,96	E _{a_{elec_l}}	-9,55
EVdW _{rep}	17,88	E _{r_{elec_l}}	0,00
Esol	-1,14	E _{HB}	-5,08
E _{rot}	20,45	E π - π	-1,5
E _{a_{elec_c}}	-55,62	E _{cat-π}	0,00
E _{r_{elec_c}}	0,00	E _{aliph}	0,00
E total= -58,20 Kcal mol			

Tabla 6. Energía total y términos energéticos de la solución número uno arrojada por FireDock para el complejo PvMSP1₁₉-FabG17.12 en las diez réplicas del análisis.

Con la finalidad de obtener una mejor estructura, se llevó a cabo un proceso de refinamiento adicional con RosettaDock cuyo archivo de salida muestra las primeras diez estructuras creadas en la corrida, donde se puede evidenciar una tendencia en la que nueve de estas diez estructuras son similares entre sí (Figura 42).

Adicionalmente, RosettaDock aporta un gráfico de energía de las estructuras creadas en función de su desviación geométrica, expresada en Armstrong, respecto a la estructura inicial; y, según explican Gray y col.^[29], si el mismo posee una forma de “chimenea” la corrida se considera como exitosa.

Para determinar si la forma corresponde o no a la de una “chimenea”, se escogen las cinco estructuras de menor energía y si al menos tres de ellas se encuentran a desviaciones menores a los 5Å, entonces la forma corresponde, en efecto, a una chimenea ^[27]. Bajo esta descripción, la corrida realizada para este trabajo se llevó a cabo con éxito, ya que la mayoría de complejos más estables corresponden a estructuras cercanas a la de partida, como se puede observar en la figura 43 donde las cinco mejores estructuras se encuentran resaltadas con cruces verdes.

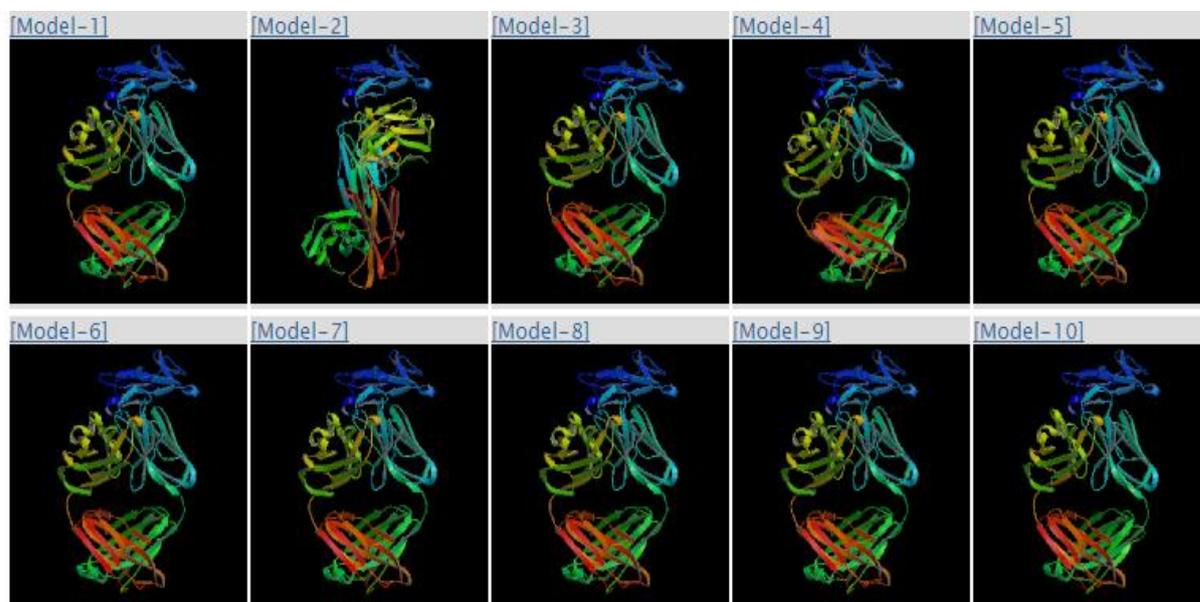


Figura 42. Primeras diez estructuras de menor energía.

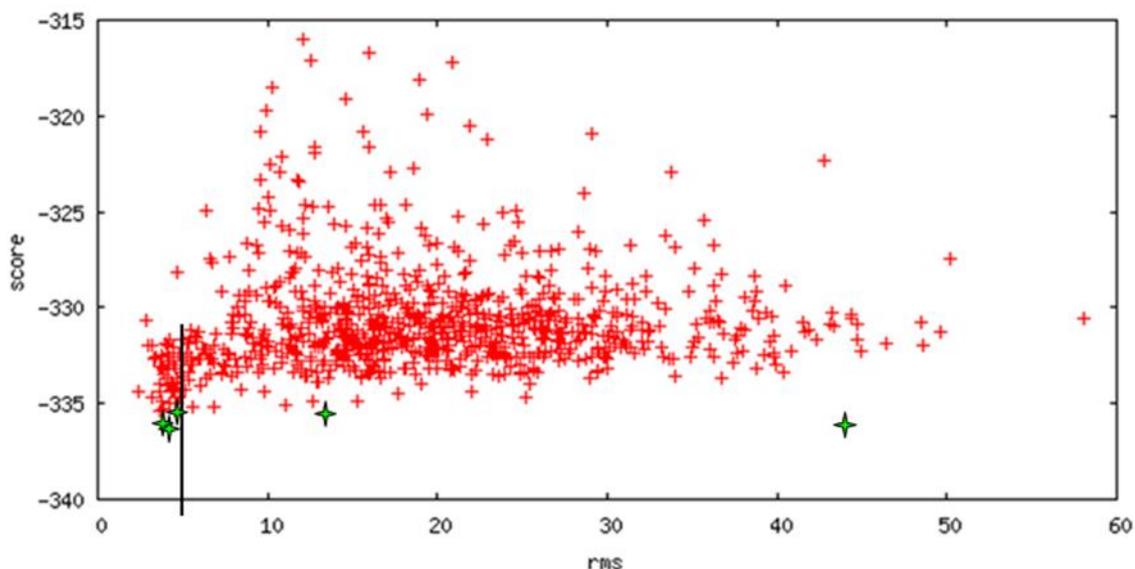


Figura 43. Gráfico de la energía de las mil estructuras generadas durante la corrida en RosettaDock en función de la distancia respecto a la estructura de partida.

De este cúmulo de estructuras, la primera solución fue escogida para nuestro estudio con una energía de $-336,33$ Kcal/mol y una desviación RMSD de $2,16$ Å respecto a la estructura reportada para el complejo por FireDock (Figura 44).

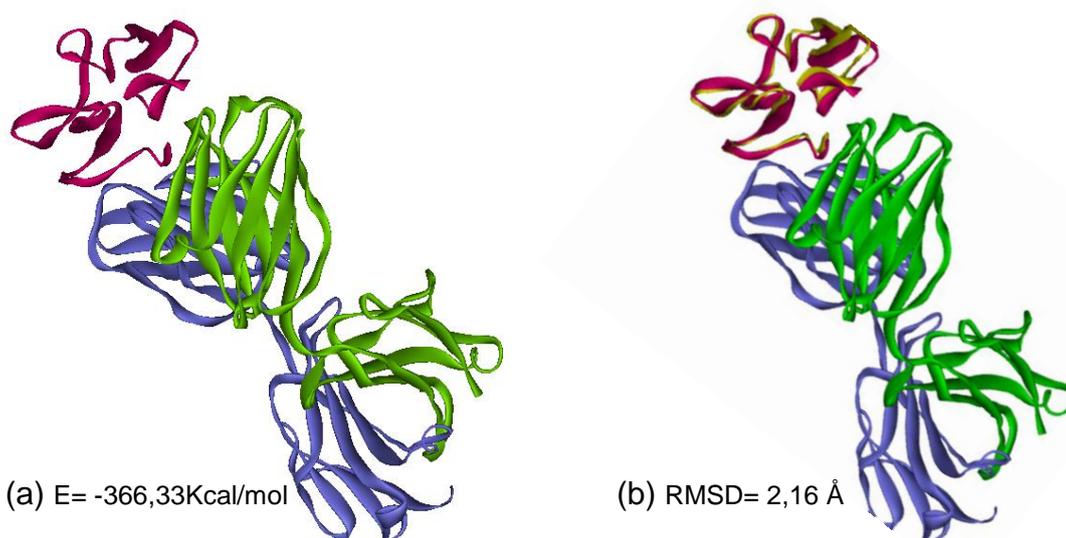


Figura 44. (a) Estructura del complejo refinada por RosettaDock. (b) Superposición entre la estructura reportada por FireDock y la refinada por RosettaDock. Fucsia: PvMSP1₁₉, RosettaDock. Amarillo: PvMSP1₁₉, FireDock.

El valor de la energía global del complejo y los términos de la función de alta resolución empleados por RosettaDock aparecen en el archivo de salida del programa y se encuentran resumidos en la tabla 7, donde una vez más se observa que el término de energía atractiva de van der Waals y la formación de puentes de hidrógeno juegan un papel importante en la estabilización del complejo y, en esta oportunidad, se considera un término que también contribuye a la estabilidad de la estructura y que contempla la frecuencia estadística de interacción entre determinados pares de aminoácidos.

Alta Resolución	
T. energético	Contribución (Kcal/mol)
EVdW _{atrac}	-1606,12
EVdW _{rep}	865,88
Esol	824,89
Esasa	311,14
Erot	408,44
E _{HB}	-305,5
E _{pair}	-73,63
E total= -336,33 Kcal mol	

Tabla 7. Energía total y términos energéticos de la solución número uno arrojada por RosettaDock para el complejo PvMSP1₁₉-FabG17.12.

Con la finalidad de validar geoméricamente la estructura final del complejo, se realizó el cálculo correspondiente al gráfico de Ramachandran del mismo, en el cual se muestra la combinación de los ángulos conformacionales psi (Ψ) y phi (Φ) de cada aminoácido en el complejo. Estos ángulos conformacionales muestran preferencia por ciertos valores que son estimados por consideraciones energéticas y que se encuentran almacenados en las bases de datos para las estructuras de las proteínas en su forma nativa. ^[42]

En el gráfico de Ramachandran, se resaltan en rojo las regiones permitidas o preferidas para los pares de ángulos psi/phi de los aminoácidos en el complejo, de lo que se presume que la estructura es válida geoméricamente si la mayoría de los aminoácidos se encuentran en las regiones favorecidas del gráfico y solo algunos en las regiones no permitidas del mismo. De estos aminoácidos, las glicinas y las prolina se pueden ubicar en las regiones reconocidas como “prohibidas” en el gráfico sin que esto afecte la validación geométrica de la estructura, ya que, la glicina no posee cadena lateral sino únicamente átomos de hidrógeno y, en el caso de la prolina, esta posee en su cadena lateral un anillo de cinco miembros formado con el grupo α -amino que restringe su rotación. [42]

En la figura 45 se muestra el gráfico de Ramachandran del complejo final y las estadísticas correspondientes, así como una imagen en la que se denotan los ángulos conformacionales de interés: psi y phi. En dicho gráfico se observa que una amplia mayoría de los aminoácidos se encuentran en las regiones favorecidas y las estadísticas corroboran que esto representa 79,6% de los aminoácidos no glicinas ni prolina del complejo. Por otro lado, se observa que apenas un 2,3% y un 1,1% de los residuos se encuentran en regiones poco favorecidas y prohibidas del gráfico, respectivamente. Esto nos permite entonces, validar geoméricamente la estructura obtenida en este trabajo.

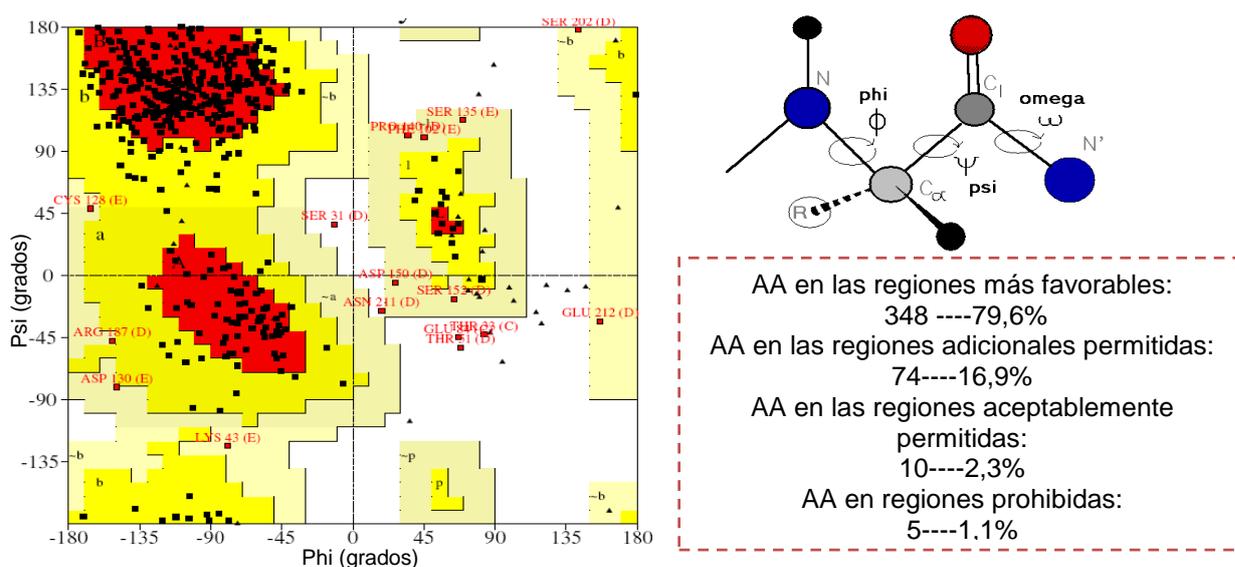


Figura 45. Gráfico y estadísticas de Ramachandran para el complejo final refinado.

Adicionalmente, el gráfico de Ramachandran nos aporta información acerca de la estructura secundaria o plegamiento de las proteínas dentro del complejo. En la figura 45 podemos observar que la mayoría de los aminoácidos se encuentran en la región permitida ubicada en la parte superior izquierda del gráfico, lo que indica que la estructura secundaria corresponde a la de hoja plegada beta.

Una vez validada por Ramachandran la estructura del complejo se procedió al estudio de la complementariedad geométrica entre la PvMSP1₁₉ y las cadenas del anticuerpo y para ello se representaron las moléculas por el radio de van der Waals de sus átomos (Figura 46). En esta representación, se logra observar como las moléculas se complementan entre sí en las cavidades de sus estructuras.

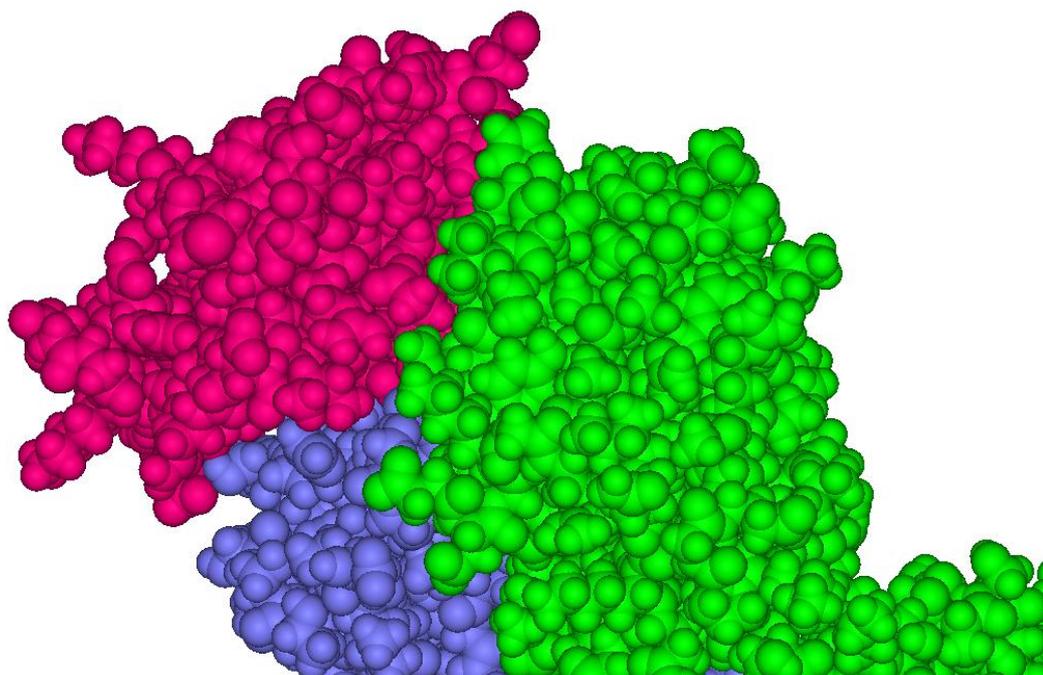


Figura 46. Representación de van der Waals del complejo.

Adicionalmente a lo ya mencionado, RosettaDock en su archivo de salida, suministra una serie de tablas y datos que nos permite estudiar con detalle la estructura (Anexo III, p.126). De estas tablas resulta particularmente interesante una de ellas en la que se compara el valor esperado de los términos energéticos con los

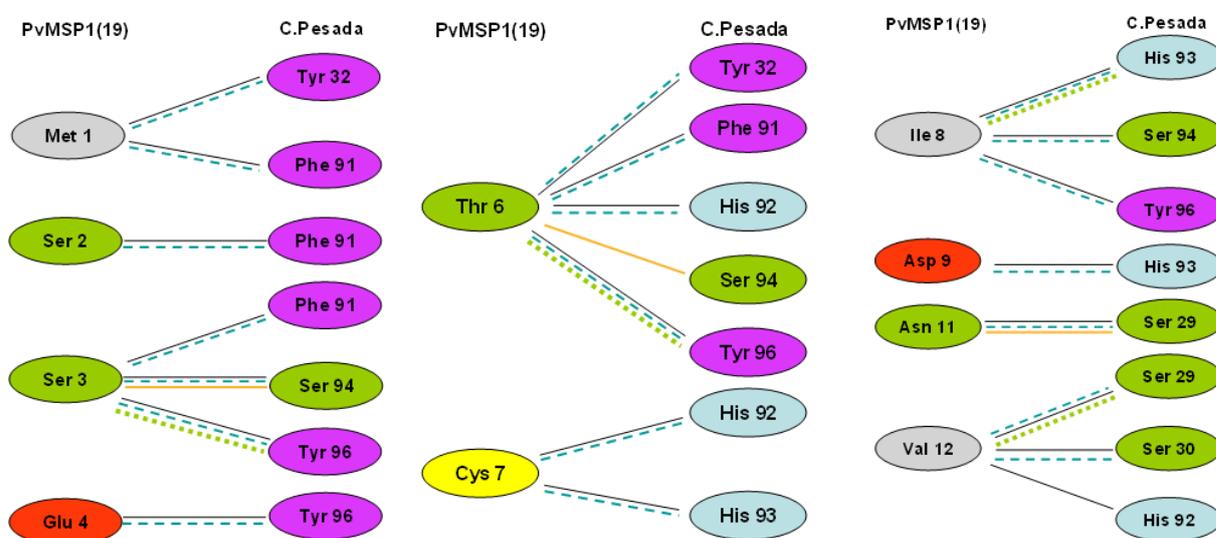
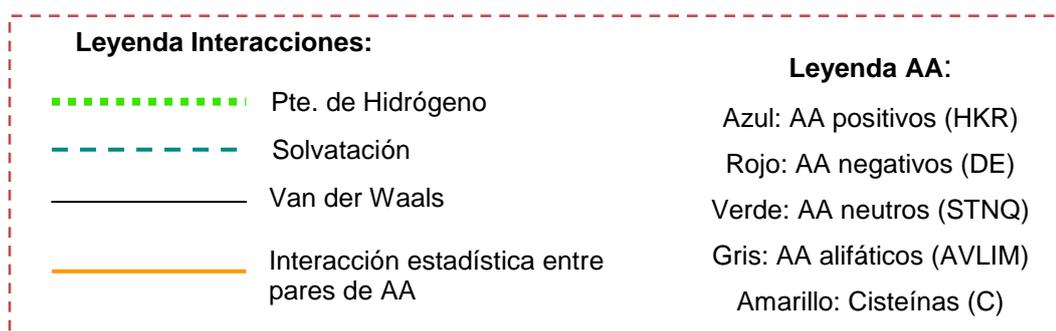
calculados para cada aminoácido del complejo. Específicamente el término correspondiente a la energía de Lennard-Jones, denotado con las siglas Eij, nos indica qué tan bien se encuentran “empaquetados” los aminoácidos dentro de la estructura y, según explica la documentación acerca del programa ^[43], un valor negativo o cercano a cero de este término señala que el aminoácido se encuentra bien acomodado dentro de la estructura. A continuación se muestra, por simplicidad, solo la fila Eij para los primeros diez aminoácidos de la PvMSP₁₉ donde se puede observar la tendencia de valores negativos o cercanos a cero.

AA de la PvMSP ₁₉	Eij
Met 1	0,4
Ser 2	-0,3
Ser 3	-0,7
Glu 4	-0,3
His 5	-1,1
Thr 6	0,4
Cys 7	-0,1
Ile 8	-0,5
Asp 9	0,5
Thr 10	0,5

Tabla 8. Valor comparativo de la energía de Lennard-Jones esperada con la calculada para los primeros diez aminoácidos de la PvMSP₁₉

Una tabla de gran utilidad, también aportada por RosettaDock, consiste en una lista de las interacciones consideradas por el programa en la interfase entre la PvMP₁₉ y las cadenas del anticuerpo FabG17.12, así como los aminoácidos implicados en dichas interacciones (Anexo IV, p.129). Esta información se muestran esquemáticamente en la figura 47, en la cual los aminoácidos están clasificados como positivos, negativos, neutros, alifáticos y cisteínas, y se muestran organizados de acuerdo a la cadena a la cual pertenecen. Por otro lado, las interacciones se

clasifican como de puentes de hidrógeno, solvatación y van der Waals, así como el término que considera RosettaDock de la frecuencia estadística, con la que determinados pares de aminoácidos interactúan según se encuentra almacenado en las bases de datos.



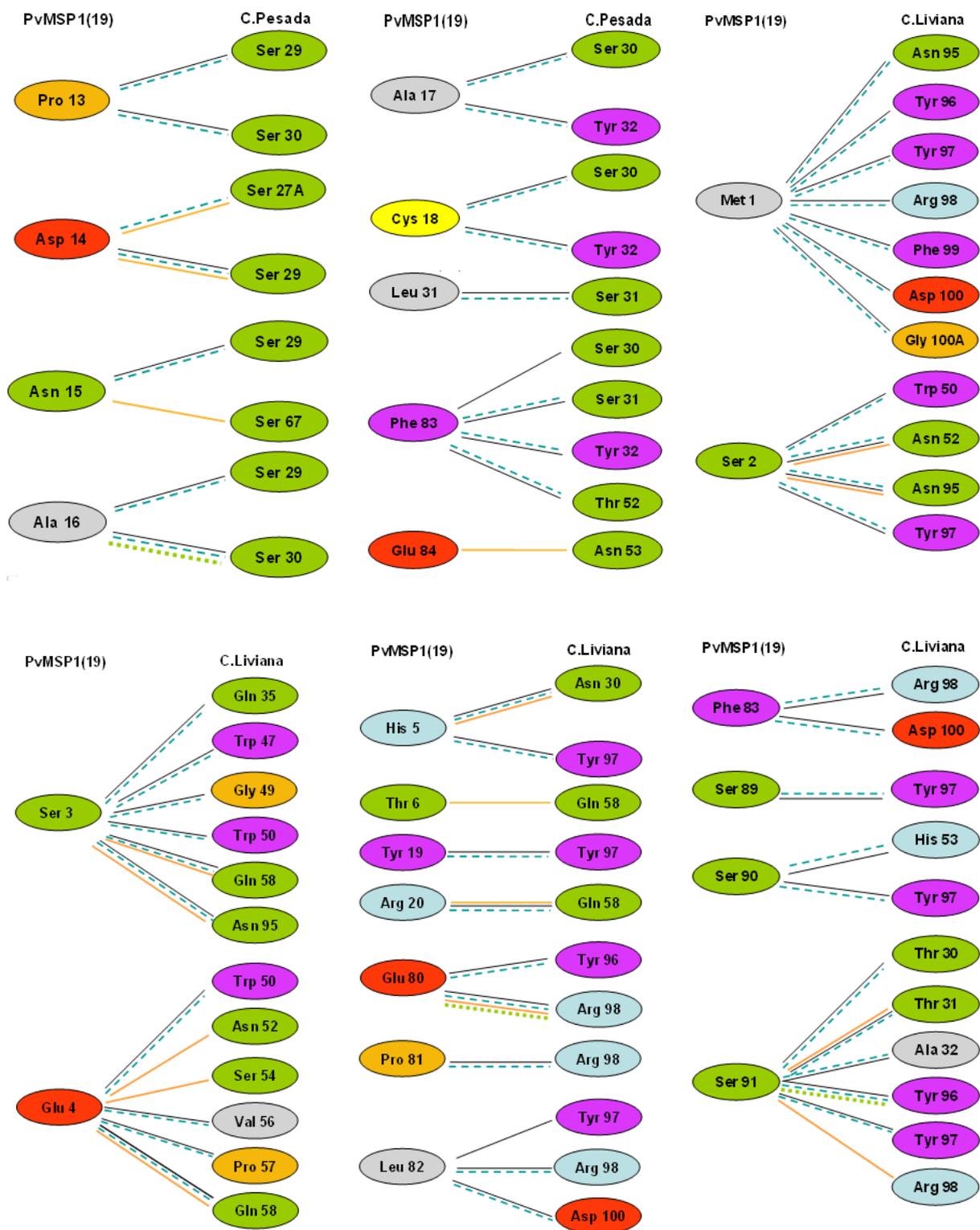


Figura 47. Interacciones entre la proteína PvMSP1₁₉ y las cadenas del la región variable del anticuerpo G17.12 y aminoácidos implicados en las mismas.

En la siguiente figura se muestran claramente los siete puentes de hidrógeno formados entre PvMSP1₁₉ y las cadenas del anticuerpo, así como los aminoácidos del antígeno implicados en los mismos.

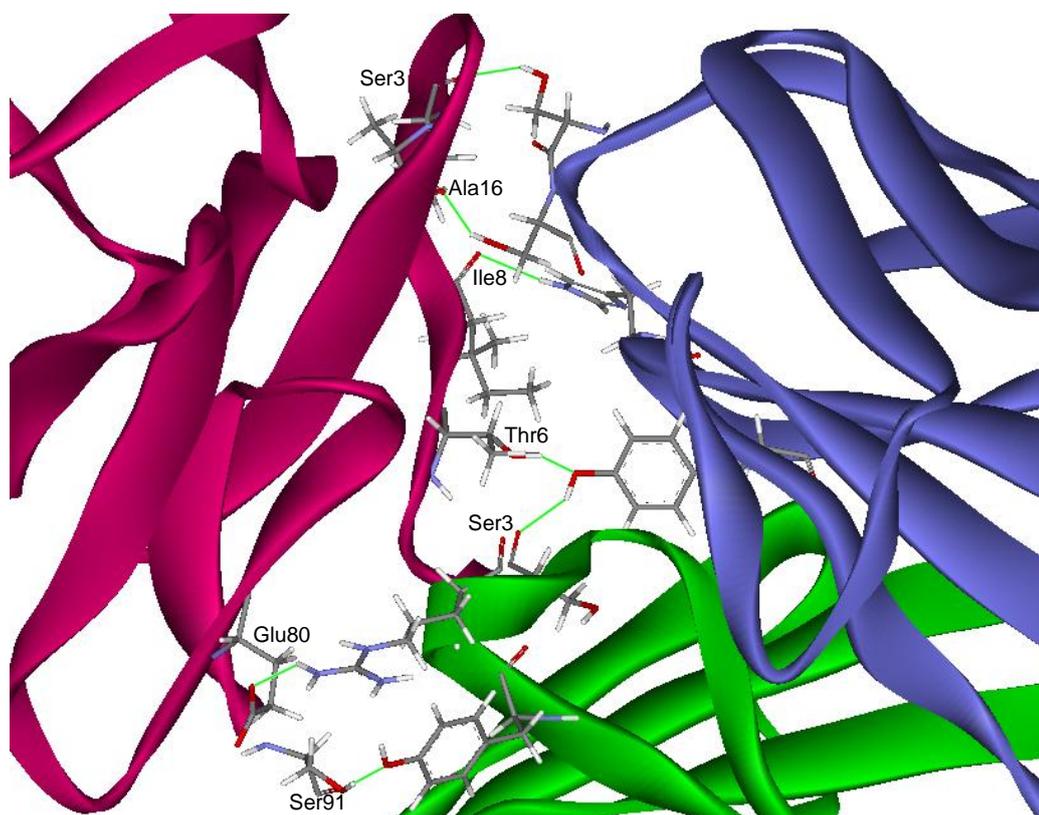


Figura 48. Puentes de Hidrógeno formados entre la PvMSP1₁₉ y el FabG17.12.

Adicional a las interacciones consideradas en el archivo de salida de RosettaDock, es importante incluir las interacciones π - π consideradas por FireDock, ya que, como se ha indicado anteriormente, este tipo de interacciones pueden ser importantes en la estabilización de complejos del tipo proteína-proteína. Al estudiar detalladamente las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos ubicados en la interfase se puede observar que la His 5 de la PvMSP1₁₉ pudiera establecer una interacción del tipo π - π con el Trp 50 de la cadena liviana del anticuerpo a una distancia de aproximadamente 6,7 Å (Figura 49) y que pareciera no haberse perdido durante el proceso de refinamiento realizado por RosettaDock. Esta interacción podría ser leve ya que no existe la orientación adecuada entre los centros planares.

Sin embargo, FireDock, tal como se explica en el Marco Teórico, considera esta energía únicamente basándose en criterios de distancia.

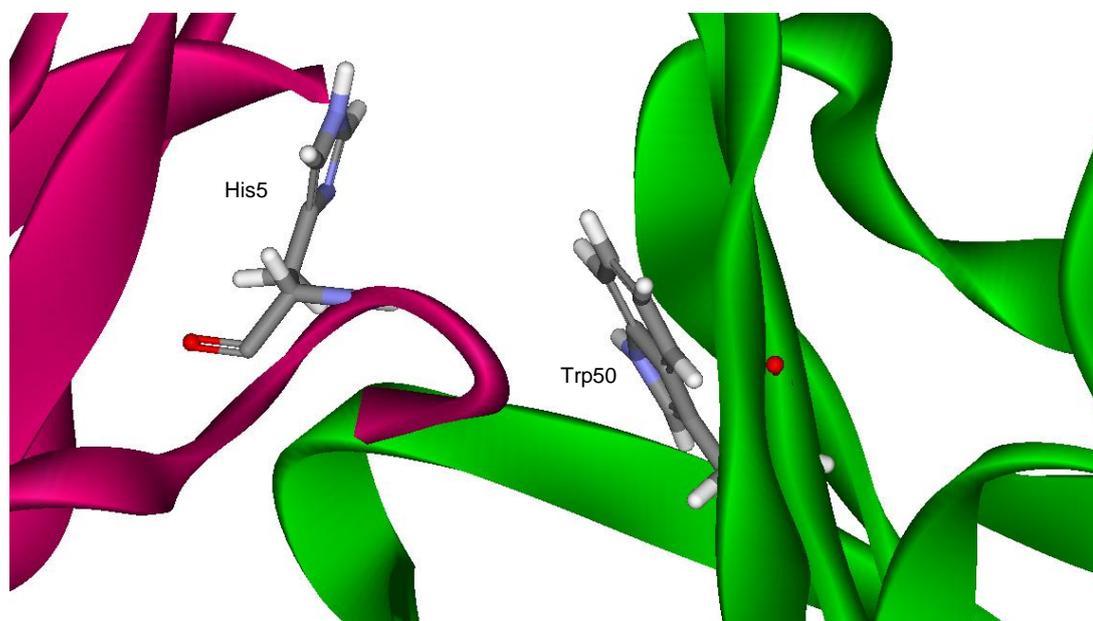


Figura 49. Interacción π - π entre la His 5 de la PvMSP1₁₉ con el Trp 50 de la cadena pesada del anticuerpo.

En general, se puede resumir que la PvMSP1₁₉ establece un total de ochenta y seis (86) interacciones con el anticuerpo FabG17.12, cuarenta y seis (46) de ellas establecidas con la cadena liviana del mismo y cuarenta (40) con la cadena pesada. De esta manera, el anticuerpo reconoce un epítipo discontinuo que va desde la Met 1 hasta el Asp 9, desde el Asp 11 a la Arg 20, pasando por la Leu 31, en la región N-Terminal de PvMSP1₁₉. También se observa el reconocimiento de otro epítipo discontinuo que va desde el Glu 80 a el Glu 84 y luego desde la Ser 89 hasta la Ser 91, en la región C-terminal. Dichos epítipos se encuentran resaltados en amarillo en la figura 50.

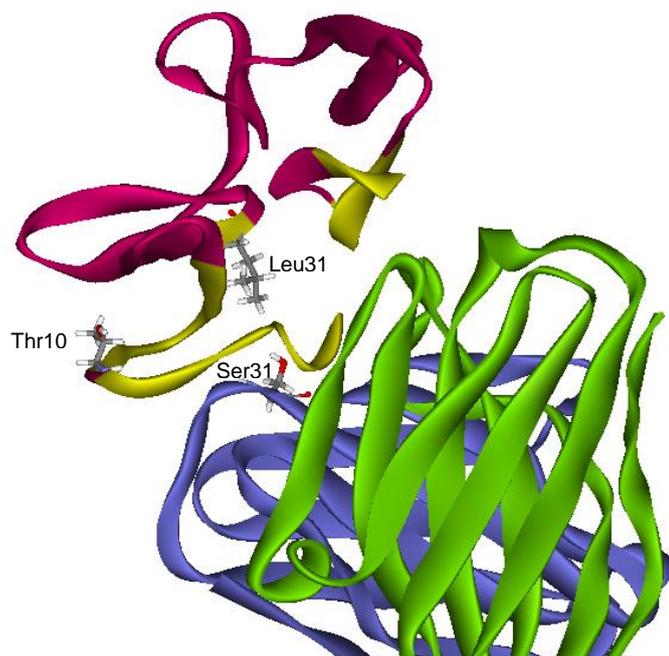


Figura 50. Aminoácidos de la PvMSP1₁₉ que muestran interacción con las cadenas de la región variable del anticuerpo G17.12.

Un aspecto interesante es el hecho de que la Thr 10 de la PvMSP1₁₉ no muestra interacción con el anticuerpo a pesar de que pareciera encontrarse disponible para ello al observar la estructura del complejo. Sin embargo, tal como lo muestra la figura 50, la cadena lateral del mismo se encuentra orientada en sentido contrario a la ubicación del anticuerpo, motivo por el cual no se observa interacción de ningún tipo.

Caso contrario es el de la Leu 31, la cual pareciera estar muy lejos para interaccionar con el anticuerpo. Sin embargo, la figura 50 nos muestra que la cadena lateral de la misma se encuentra orientada en dirección al anticuerpo permitiendo que haya interacción con la Ser 31 de la cadena pesada del mismo.

Finalmente, cabe destacar que para este estudio, como se ha mencionado anteriormente, se partió de la estructura del anticuerpo como un complejo con otra proteína antigénica, más específicamente una proteína de estructura y características similares a la molécula ligando de nuestro análisis. Incluso, ambas

proteínas son el mismo fragmento de 19kDa de la MSP1 (merozoite surface protein-1), pero de especies de *Plasmodium* diferentes. La similitud estructural puede observarse en la siguiente figura:

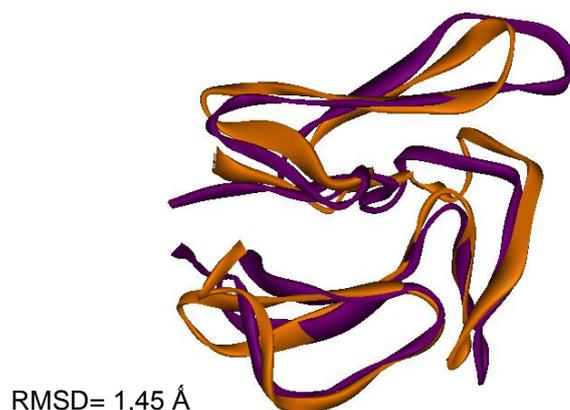


Figura 51. Superposición de la MSP1₁₉ de las especies de *Plasmodium*. Naranja: PvMSP1₁₉. Morando: PfMSP1₁₉

Como consecuencia de esto, es de esperarse que probablemente las regiones identificadas por el anticuerpo en ambas proteínas fueran similares. En efecto, existe cierta similitud en los fragmentos identificados en la región N-Terminal. Sin embargo, debido a un cambio en la orientación de la MSP1₁₉ del *P.vivax* respecto a la de *P.falcíparum*., en la primera se observa un reconocimiento en la región C-terminal que no se observa en la de *P.falcíparum*. De manera similar, en la estructura reportada para *P.falcíparum* aparece una región de reconocimiento entre 24 y 28 que no aparece en la estructura para *P.vivax*.

El principal objetivo de realizar este estudio docking entre PvMSP1₁₉ y la región Fab del anticuerpo G17.12 es la obtención de una estructura hipotética que nos permita seleccionar las regiones principales de interacción para llevar a cabo la síntesis de estos fragmentos peptídicos correspondiente. En base a esto, se propone al siguiente péptido a sintetizar:

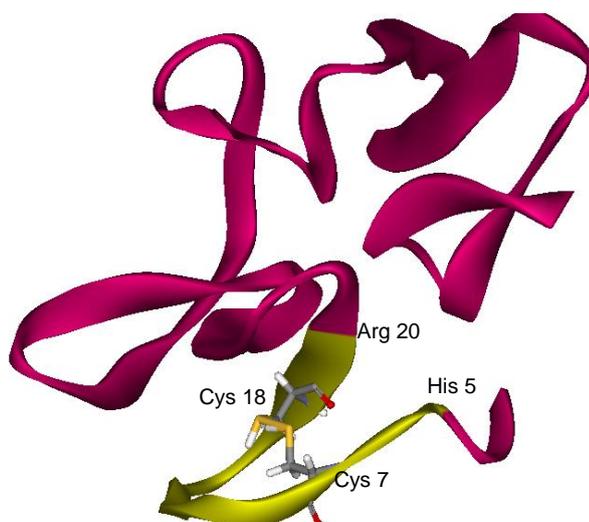


Figura 52. Fragmento peptídico de la PvMSP1₁₉ escogido para su síntesis en base al estudio computacional.

Dicho péptido, mostrado en amarillo en la figura 52, está compuesto por los aminoácidos que están comprendidos entre la His 5 y la Arg 20, yendo desde la región N-terminal a C-terminal del péptido, respectivamente. Como podemos observar, este péptido posee un puente disulfuro formado entre la Cys 7 y la Cys 18 (numeración dentro de la proteína) que obliga a la formación de la vuelta que se observa en el complejo y que puede contribuir a la respuesta antigénica del péptido. Tal como indica Patarroyo y col.^[6], la estructura secundaria de un péptido sintético puede ser inducida para promover un mayor reconocimiento por parte del anticuerpo.

A modo ilustrativo, a continuación se muestra el péptido a sintetizar dentro de la estructura del complejo en su representación de van der Waals. Esto nos permite identificar aún más la importancia de este fragmento en el reconocimiento de la proteína antigénica por parte del anticuerpo.

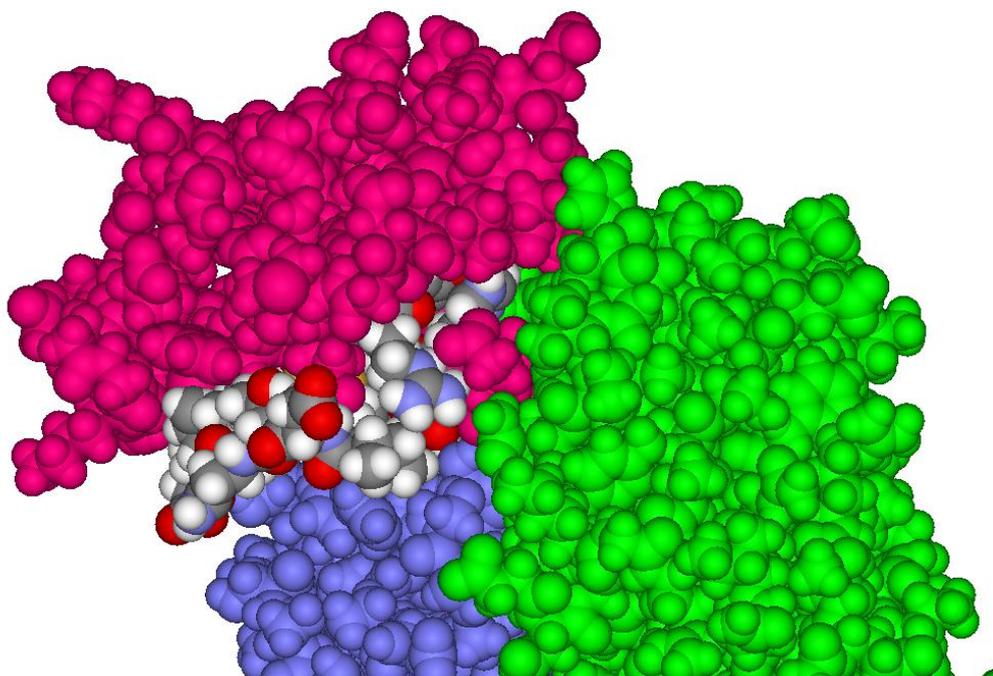


Figura 53. Representación de van der Waals del complejo. El péptido escogido para la síntesis se encuentra representado por el color de sus átomos.

Síntesis, purificación y caracterización del fragmento peptídico escogido:



La síntesis del péptido se realizó en fase sólida bajo la estrategia Fmoc/tBu empleando como soporte la resina cloruro de 2-clorotritilo cuya estructura es:

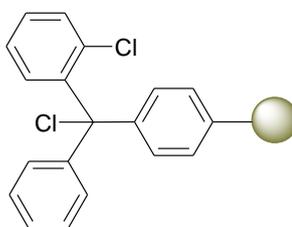


Figura 54. Estructura de la resina cloruro de 2-clorotritilo.

* La síntesis se llevó a cabo desde la región C-Terminal a la N-Terminal por lo que el orden de acoplamiento es inverso a esta numeración.

La resina empleada para esta síntesis ofrece una serie de ventajas tales como: (1) es una resina económica y reciclable, (2) la reacción de acoplamiento del primer aminoácido transcurre con rapidez por sustitución nucleofílica, y (3) no necesita activación del primer aminoácido a acoplar por lo que se evita racemización del mismo. Sin embargo, posee una desventaja y es el hecho de que es muy sensible al agua por lo que los solventes y reactivos deben estar secos, particularmente en la fase de hinchamiento de la resina y acoplamiento del primer aminoácido. ^[44]

En cuanto a la mezcla acoplante empleada: HOBT/ TBTU, ésta también ofrece una serie de ventajas: (1) tiempos de activación cortos, (2) evita en gran medida la racemización y, (3) permite el acoplamiento de aminoácidos impedidos estéricamente. ^[44]

Al iniciar la síntesis, se empleó una sustitución a la resina inferior a la comúnmente usada (generalmente de 0,7mmol/g) debido a que posteriormente se pretendía llevar a cabo la formación de un puente disulfuro intramolecular con el péptido aún unido a la resina y, para favorecer la formación del péptido cíclico, es necesario que las cadenas peptídicas se encuentren distantes entre sí.

Luego de acoplado el primer aminoácido, se empleó una solución de metanol en medio básico para bloquear, a través de una sustitución nucleofílica, los sitios activos de la resina que no hubiesen sido previamente ocupados por el aminoácido. Este procedimiento se realiza con la intención de evitar que el siguiente aminoácido a acoplar ocupe estos sitios, obteniéndose así péptidos no deseados de menor longitud.

En los protocolos de síntesis de péptidos en fase sólida por la estrategia Fmoc/tBu suele reportarse el uso de piperidina para las desprotecciones sucesivas de los grupos amino. Sin embargo, debido a que la piperidina es una sustancia actualmente controlada, nos vimos obligados a emplear N-metilpiperidina como

sustituto para la desprotección de la mayoría de los aminoácidos. Ésta metodología mostró buenos resultados hasta que se procedió a la desprotección del Asp 10, el cual se encontraba unido a la Asn 11. En este punto, el ensayo de azul de bromofenol indicó que el aminoácido se encontraba aún protegido, a pesar de que se intentó repetidas veces el procedimiento de desprotección, incluso duplicando el tiempo de reacción.

Este hecho se le puede atribuir a que la asparagina (R) y el ácido aspártico (D) son aminoácidos voluminosos, y que juntos implican impedimentos estéricos importantes que impiden que la N-metilpiperidina, con el grupo metilo unido al nitrógeno, retire de forma eficiente el grupo Fmoc. En este sentido, Hachmann y col.^[45], determinaron los tiempos de vida media de la reacción de eliminación del grupos Fmoc para varios derivados de la piperidina (Tabla 9). Este trabajo sugiere que la presencia de un metilo cercano al grupo amino implica un impedimento estérico que aumenta el tiempo necesario para la remoción total del grupo Fmoc. Entonces, si dicho efecto es observado para la 2-metilpiperidina, es de esperarse que para la N-metilpiperidina el impedimento sea aún mayor y los tiempos de reacción sean muy largos, especialmente para aminoácidos impedidos como es el caso de este trabajo.

Reactivo	T _{1/2} (min)
Piperidina	2,0
2-metilpiperidina	3,0
3-metilpiperidina	1,9
4-metilpiperidina	2,0
4-metilpiperazina	7,8

Tabla 9. Tiempo de vida media de la eliminación del grupo Fmoc.^[45]

Debido a este inconveniente, fue necesario reanudar la síntesis desde el comienzo bajo la misma metodología hasta llegar al acople del Asp 10, donde se empleó para la desprotección una solución de piperidina al 20% en DMF. Este procedimiento fue también aplicado para la desprotección de otros aminoácidos en los que se podría esperar el mismo problema, tales como la Pro 9 y el Asp 5.

Adicionalmente, con la finalidad de estudiar más en detalle lo ocurrido, decidimos estandarizar el tiempo necesario para la eliminación del grupo Fmoc en aminoácidos impedidos estéricamente empleando N-metilpiperidina. Para ello tomamos una pequeña porción de la resina-péptido una vez acoplado el Asp 10 y la hicimos reaccionar con N-metilpiperidina a intervalos de media hora, luego de los cuales la resina era lavada y examinada por el ensayo de azul de bromofenol. Este análisis determinó que el tiempo necesario para completar la reacción de desprotección con N-metilpiperidina es aproximadamente cuatro veces superior a cuando se emplea una solución de piperidina.

Una vez acoplados todos los aminoácidos, se procedió a la acetilación en la porción N-Terminal y antes de llevar a cabo la formación del puente disulfuro, fue retirado de la resina y liofilizado una pequeña porción del péptido por tratamiento con TFA, condiciones bajo las cuales las protecciones Acm de las cisteínas permanecen intactas. Esto se hizo con la intención de realizar una HPLC analítica que permita verificar la pureza del péptido hasta este punto y, como se puede observar en el Anexo V, p. 134, el péptido lineal con los dos grupos protectores de las cisteínas (Acm) posee alta pureza, por lo que se decidió continuar con la oxidación del péptido sin mayor purificación.

Con el resto de la resina-péptido, se procedió a la reacción de formación del puente disulfuro entre las cisteínas 3 y 14 a través de una oxidación con yodo, manteniéndose el péptido aún unido a la resina. Las cisteínas fueron protegidas con grupos Acm debido a que estos son removidos por el tratamiento con yodo, con la formación simultánea del puente disulfuro, sin que se vean afectadas las

protecciones de las cadenas laterales restantes ni la unión del péptido a la resina. De esta manera se disminuye las posibles reacciones colaterales, tales como una migración del grupo Acm a la cadena lateral de la treonina o la iodación de la tirosina. ^{[46], [47]}

Cabe destacar que la formación de puente disulfuro en fase sólida se encuentra reportada con trifluoroacetato de talio (III) con la resina suspendida en DMF, procedimiento que al parecer a dado muy buenos resultados realizando simultáneamente el paso de desprotección y oxidación. En cambio, para la formación de puentes disulfuro en solución hay una gama más amplia de procedimientos disponibles tales como: (1) la remoción del grupo Acm con Hg(II) o Ag(I) seguida de la oxidación con O₂; (2) el tratamiento con I₂ en una solución de metanol o ácido acético en agua; y (3) el tratamiento con trifluoroacetato de talio (III), también disponible en solución ^[48]. Sin embargo, dada la falta del reactivo de Talio, se decidió llevar a cabo el procedimiento con yodo reportado para la reacción en solución, adaptándolo a la reacción sobre la resina.

Una vez llevado a cabo el procedimiento correspondiente a la formación del puente disulfuro, se clivó el péptido de la resina por tratamiento con TFA y se liofilizó, obteniéndose 9 mg de un sólido blanco y un rendimiento de apenas 9,82% (Tabla 10).

Masa Teórica	91,648 mg
Masa Experimental	9 mg
Rendimiento Porcentual	9,82%

Tabla 10. Rendimiento de la síntesis del péptido

El bajo rendimiento obtenido en la síntesis se puede atribuir a una serie de factores, tanto propios de la síntesis en fase sólida como relacionados a las condiciones de trabajo y a la naturaleza de la secuencia. Antes que nada, debemos

tomar en cuenta que la síntesis planteada en este trabajo implica dos pasos sintéticos por aminoácido: uno de acople y uno de desprotección de la función amino; y, dado que el péptido escogido tiene una longitud de dieciséis aminoácidos, podemos verificar que se trata de una síntesis de aproximadamente treinta y dos pasos.

Más allá de eso, el paso de hinchamiento de la resina y acople del primer aminoácido son clave para el éxito de la síntesis. Estos son pasos que dependen fuertemente de una agitación eficiente y es posible que el sistema escogido no fuese el más adecuado. A esto se le suma el hecho de haber empleado una sustitución a la resina inferior a la comúnmente usada y que, si verificamos en la secuencia mostrada anteriormente, el primer aminoácido a acoplar consistió en una arginina (R), el cual posee un impedimento estérico importante y que suele ameritar tiempos de acople largos.

Adicional a lo anteriormente expuesto, la reacción de acoplamiento del primer aminoácido no puede ser monitoreada por los ensayos cualitativos de azul de bromofenol o ninhidrina, empleados en este trabajo. Únicamente podemos saber si ha ocurrido o no la reacción de acoplamiento una vez que el resto de los sitios activos de la resina han sido bloqueados y el primer aminoácido ha sido desprotegido, mostrándose una coloración azul ante el ensayo con azul de bromofenol. No obstante, este ensayo positivo no nos indica el grado de sustitución de la resina, que al parecer fue bajo a pesar de que se empleó un tiempo de acople superior a las dos horas para el primer aminoácido.

Una vez pesado el producto obtenido se procedió a su purificación y para ello se realizó una HPLC semi-preparativa (Anexo VI.1, p.135), que mostró la aparición de algunas bandas de impurezas, producto de la manipulación. El tiempo de retención del primer pico sugiere que éste corresponde al péptido deseado, el cual fue aislado con facilidad. Sin embargo, debido a problemas técnicos del equipo de HPLC durante el proceso de purificación, hubo una pérdida importante del producto.

El péptido puro fue liofilizado y pesado obteniéndose un total de 3 mg de un sólido blanco al cual se le realizó un espectro de masas para su identificación. El espectro muestra que el péptido posee un peso molecular de 1976,94 g/mol (Anexo VIII.2, p.137), el cual no coincide con el valor esperado de 1832,96 g/mol. Sin embargo, la diferencia del valor obtenido respecto al esperado coincide con la masa correspondiente a dos grupos acetoamidometilo (Acm), protectores de las cadenas laterales de las dos cisteínas presentes en la secuencia. Esto nos indica que todos los acoples ocurrieron según lo esperado pero, desafortunadamente, el puente disulfuro no se logró formar. En su lugar, los grupos protectores Acm permanecieron unidos a las cisteínas y, dado que dicho grupo es estable en TFA, la unión perduró aún después del proceso de clivaje.

Adicionalmente, el espectro, en su relación masa/carga (Anexo VIII.1, p.137), muestra un pico en 989,80 m/z, que coincide con el valor $M+2$ del péptido con los dos grupos Acm ($\sim 1976,94 + 2/2$). Esto concuerda con el hecho de que el espectro fue tomado en modo positivo y que existe la presencia de dos aminoácidos con cadenas laterales capaces de protonarse; a saber, Arginina (R) e Histidina (H). También aparece un pico en 918,7 m/z (Anexo VIII.3, p.138), que coincide con el valor $M+2$ del péptido oxidado ($\sim 1932,97 + 2/2$); sin embargo, este pico posee menor tamaño y se encuentra en medio de la zona de mayor ruido.

No obstante, el espectro muestra una serie de señales que indican la presencia de impurezas. Para determinar la importancia de dichas impurezas se procedió a la determinación de la pureza espectral del pico de interés en el cromatograma de la HPLC semi-preparativa. En este análisis, se comparan los espectros UV-Visible de varias secciones del pico con el espectro correspondiente al ápice del mismo y se detectan diferencias espectrales ante la presencia de impurezas. Este estudio reveló la existencia de dos impurezas en el pico cromatográfico correspondiente al péptido, una ubicada al inicio del pico y otra al final del mismo, donde el punto de mayor impureza corresponde al señalado con la letra M en el cuadro superior izquierdo del gráfico de pureza, ubicado

aproximadamente en 6,25 minutos (Anexo VII, p.136). Lamentablemente, la resolución no es suficiente como para lograr eliminar estas impurezas por completo; sin embargo, las mismas se encuentran en muy baja proporción respecto al péptido de interés.

CONCLUSIONES

- Se logró reproducir con éxito la estructura cristalina reportada por Pizarro y col.^[41] de la MSP1₁₉ de *Plasmodium* con la región Fab del anticuerpo G17.12.
- Se obtuvo un modelo para la estructura del complejo entre la MSP1₁₉ de *Plasmodium vivax* con la región Fab del anticuerpo G17.12 cuya energía global fue de -336,33 Kcal/mol.
- Las interacciones atractivas de Van der Waals y la formación de puentes de hidrógeno juegan un papel fundamental en la estabilización del complejo.
- El 79,6% de los aminoácidos, no Glicinas ni Prolinas, del complejo se encuentran dentro de las regiones del gráfico de Ramachandran más favorecidas, permitiéndose así la validación geométrica de la estructura.
- Al estudiar la estructura del complejo en su representación de van der Waals, se observa que existe una importante complementariedad geométrica entre la PvMSP1₁₉ y las cadenas del anticuerpo Fab G17.12.
- La PvMSP1₁₉ establece un total de ochenta y seis (86) interacciones con el anticuerpo FabG17.12, cuarenta y seis (46) de ellas establecidas con la cadena liviana del mismo y cuarenta (40) con la cadena pesada.
- El anticuerpo reconoce dos epítopos discontinuos, uno ubicado en la región N-terminal que comprende los aminoácidos entre la Met 1 y el Asp 9, desde el Asp 11 a la Arg 20 y pasando por la Leu 31; y otro ubicado en la región C-terminal que va desde el Glu 80 a el Glu 84 y luego desde la Ser 89 hasta la Ser 91.

- El anticuerpo Fab G17.12 reconoce epítomos semejantes, ubicados en la región N-Terminal, para las proteínas MSP1₁₉ de *Plasmodium vivax* y *falcíparum*.
- El epítomo identificado en la región C-Terminal de la MSP1₁₉ para *P. vivax* no es hallado en el complejo con la proteína análoga para *P. falcíparum*.
- En la estructura reportada para *P. falcíparum* aparece una región de reconocimiento entre 24 y 28 que no aparece en la estructura para *P. vivax*.
- Se escogió para su síntesis un péptido compuesto por los aminoácidos que están comprendidos entre la His 5 y la Arg 20 de la PvMS1₁₉ con un puente disulfuro entre las Cys 7 y la Cys 18 (numeración dentro de la proteína).
- El acople de los dieciséis aminoácidos se logró llevar a cabo con éxito aunque no se logró formar el puente disulfuro deseado a través de una oxidación con yodo sobre la resina.

RECOMENDACIONES

- Repetir la síntesis del péptido planteado en este trabajo, teniendo especial cuidado en la fase inicial de dicha síntesis y en la formación del puente disulfuro. Se sugiere añadir un aminoácido que no modifique significativamente la naturaleza del péptido como una Ala, antes de la Arg-1. Además se recomienda emplear 3-metilpiperidina para la desprotección de la función amino.
- Probar otras técnicas y procedimientos para la formación de puentes disulfuro sobre resina.
- Realizar los ensayos biológicos de reconocimiento por parte de anticuerpos de *Plasmodium vivax* y al péptido propuesto en este trabajo.
- Llevar a cabo un estudio computacional exhaustivo del péptido planteado en este trabajo, con la finalidad de verificar si el mismo conserva la estructura tridimensional que posee el fragmento correspondiente dentro de la proteína.
- Realizar la síntesis del fragmento de interacción ubicado en la región C-Terminal de la PvMSP1₁₉ y realizarle los ensayos biológicos de reconocimiento por parte de anticuerpos de *Plasmodium vivax*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Girard M., Reed Z., Friede M., Kieny M. (2007). **A review of human vaccine research and development: Malaria**. *Vaccine*.25: 1567-1580
2. www.who.int/en. (2008, marzo). **Global Malaria Programme (GMP)**. [En Línea]. <http://www.who.int/malaria>
3. Capitillo D. (2006). **Síntesis y funcionalización de un copolímero de estireno y divinilbenceno y su posible aplicación como soporte en la síntesis en fase sólida**. Seminario de Investigación. Facultad de Ciencias. UCV.
4. Sewald N., Jakubke H. D (2002). **Peptides: Chemistry and Biology**. Wiley-VCH. Weinheim, Alemania. p 5.
5. Abreu D., Rivas L. (1997) **Péptidos en biología y biomedicina**. Consejo superior de investigaciones científicas. Madrid, España. p 43
6. Patarroyo E. M., Lozano J. M. (2007). **A rational strategy for a malarial vaccine development**. *Microbes and infection*. 9: 751-760
7. caibco.ucv.ve. (2008, marzo). **Malaria en Venezuela**. [En Línea]. <http://caibco.ucv.ve/caibco/MALARIA/Malaria.htm>
8. www.anlis.gov.ar. (2008, marzo). **Malaria o Paludismo**. [En Línea]. <http://www.anlis.gov.ar/consulta/infecciosas/malaria/malaria.htm>
9. Correa J. A., Gomez J. F., Posada R. (1999). **Infectología y neumonología**. Segunda edición. Corporación para investigaciones biológicas. Tomo II. Medellín, Colombia. p 833

10. Chassaing, J. A. (2001). **Malaria y fármacos antimaláricos**. Rev. Soc. Ven. Microbiol. vol.21, no.2, p.85-88. ISSN 1315-2556.
11. Arévalo-Herrera, M., Herrera, S. (2001). **Plasmodium vivax malaria vaccine development**. Mol.Immunol. 38: 413-455.
12. Carvalho, L.J.M., Daniel-Ribeiro, Goto., H. (2002). **Malaria Vaccine: Candidate Antigens, Mechanisms, Constraints and Prospects**. Scand.J.Immunol. 56:327-343.
13. Liras A. (2004). **Vacunas: Nuevos conceptos. Parte I**. FED Hemo. Número 33. p 36-37
14. Lund O., Nielsen M., Lundegaard C., Keçmir C., Brunak S., (2005) **Inmunological Bioinformatic**. Inglaterra. p 187
15. Merrifield R. B. (1963) **Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a Tetrapeptide**. J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154.
16. Perez M. T. (2007). **Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV)**. Trabajo especial de grado. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
17. Benoiton N. L.(2006) **Chemistry of peptide synthesis**. Taylor & Francis. Canadá. p 25.
18. Teodoro M., Phillips G., Kavraki L. (2001) **Molecular Docking: A Problem With Thousands Of Degrees Of Freedom**. International Conference on Robotics and Automation.

19. Halperin I., Ma Buyong, Wolfson H., Nussinov R. (2002). **Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and Guide to Scoring Functions.** PROTEINS: Structure, function, and genetic. 47: 409-443.
20. Duhovny D., Nussinov R., Wolfson H (2002). **Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules.** Springer-Verlag. 2452: 185-200.
21. Holtje H. D., Sippl W., Rognan D., Folkers G. (2002). **Molecular Modeling: Basic Principles and Applications.** Segunda edición. Wiley-VCH. Alemania. p 145
22. Gabb H., Jackson R., Sternberg M. (1997). **Modelling Protein Docking using Shape Complementarity, Electrostatics and Biochemical Information.** J. Mol. Biol. 272: 106-120
23. Terp G. E., Johansen B. N., Chistensen I. T., Jørgensen F. S. (2002) **A new concept for multidimensional selection of ligand conformations (MultiSelect) and multidimensional scoring (MultiScore) of protein-ligand binding affinities.** Curr Med Chem. 8: 967-761
24. Leach A. R., Gillet V.J. (2007). **An Introduction to Chemoinformatics.** Revised Edition. Springer. Germany. p159.
25. Böhm H.J. (1994). **The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure.** J. Comput.-Aided Mol. Des. 8: 243-256.
26. Andrusier N., Nussinov R., Wolfson H (2007). **FireDock: Fast interaction refinement in molecular docking.** Proteins. 69:139-159.
27. Crowley PB, Golovin A. (2005). **Cation- π interactions in protein-protein interfaces.** Proteins. 59: 231-239.

28. Misura K.M., Morozov A.V., Baker D. (2004). **Analysis of anisotropic sidechain packing in proteins and application to high-resolution structure prediction.** J Mol Biol. 342:651-664.
29. Gray J., Moughon S., Wang C., Schueler F., Kuhlman B., Rohl C., Baker D. (2003) **Protein–Protein Docking with Simultaneous Optimization of Rigid-body Displacement and Side-chain Conformations.** J. Mol. Biol. 331:281-299.
30. Kortemme T., Morozov A., Baker D. (2003). **An Orientation dependent Hydrogen Bonding Potential Improves Prediction of Specificity and Structure for Proteins and Protein–Protein Complexes.** J. Mol. Biol. 326:1239-1259.
31. Holder, A.A., Freeman, R.R. (1982). **Biosynthesis and processing of a *Plasmodium* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody.** J.Exp.Med. 156: 1528-1538.
32. Holder, A.A., Blackman, M.J., Burgnaus, P.A., Chappel, J.A., Ling, I.T., McCallum-Deighton, N., Sahi, S. (1992). **A malaria merozoite surface protein (MSP-1)-structure, processing and function.** Mem.Inst.Oswaldo Cruz. 87, (Suppl.III), 37-42.
33. Patarroyo, M.E., Amador, R., Clavijo, P., Moreno, A., Guzmán, F., Romero, P., Tascon, R., Franco, A., Murillo, L.A., Ponton, G., Trujillo, G. (1988). **A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium* malaria.** Nature 332:158-161.

34. Nikodem, D.P., Davidson, E.A. (2000). **Identification of a novel antigenic domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 that specifically binds to human erythrocytes and inhibits parasite invasion, in vitro.** Mol.Biochem.Parasitol. 108: 79-91
35. Espejo, F., Cubillos, M., Salazar, L.M., Guzmán, F., Urquiza, M., Ocampo, M., Silva, Y., Rodríguez, R., Lioy, E., Patarroyo, M.E. (2001). **Structure, Immunogenicity, and Protectivity Relationship for the 1585 Malarial Peptide and Its Substitution Analogues.** Angew.Chem.Int.Ed. 40: 4654-4657.
36. Blackman J.M., Heidrich H-G., Donachie S., McBride J.S. y Holder A. (1990). **A Single Protein Remains on the Parasite During Red Cell Invasion and Is the Target of Invasion-inhibiting Antibodies.** The Journal of Experimental Medicine. 172: 379-382.
37. Cooper J.A., Cooper L. T. y Saul A.J. (1992). **Mapping of the region predominantly recognized by antibodies to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSA 1.** Molecular and Biochemical Parasitology. 51: 301-312.
38. Portillo, H.A., Longacre, S., Khouri, E., David, P.H. (1991). **Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species.** Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 88: 4030-4034.
39. Serrano M. L., Pérez H. A., Medina J. D. (2006). **Structure of C-terminal fragment of merozoite surface protein-1 from *Plasmodium vivax* determined by homology modeling and molecular dynamics refinement.** Bioorganic & Medical Chemistry. 14: 8359-8365

40. Serrano M. L. (2004). **Determinación de la estructura tridimensional de moléculas peptídicas a través de modelado molecular.** Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia. UCV.
41. Pizarro J. C., Chitarra V., Verger D., Holm I., Pêtres S., Dartevelle S., Nato F., Longacre S. y Bentley G. A. (2003). **Crystal Structure of a Fab Complex Formed with PfMSP1-19, the C-terminal Fragment of Merozoite Surface Protein 1 from *Plasmodium falciparum*: A Malaria Vaccine Candidate.** J. Mol. Biol. 328: 1091-1103.
42. www.charite.de (2008, Noviembre). **Ramachandran.** [En línea]. <http://www.charite.de/ch/medgen/compgen/ramachandran>
43. rosettadock.graylab.jhu.edu (2008, Noviembre). **RosettaDock Server Documentation.** [En línea]. <http://rosettadock.graylab.jhu.edu/documentation>.
44. www.biologie.uni-erlangen.de. (2008, Diciembre) **Solid phase peptide Synthesis (SPPS).** [En Línea]. <http://www.biologie.uni-erlangen.de/mibi/lectures/vorlesungen/MolSci/Peptidsynthese.pdf>
45. Hachmann J., Lebl M. (2006). **Alternative to Piperidine in Fmoc Solid-Phase Synthesis.** J. Comb. Chem., 8: 149-149
46. Lamthanh H., Roumestand C., Deprun C., Ménez A. (1993). **Side reaction during the deprotection of (S-acetamidomethyl)cysteine in a peptide with a high serine and threonine content.** Int J Pept Protein Res. 41:85-95.
47. Lamthanh H., Virelizier H., Frayssinhes D. (1995). **Side reaction of S-to-N acetamidomethyl shift during disulfide bond formation by iodine oxidation of S-acetamidomethyl-cysteine in a glutamine-containing peptide.** Pept Res. 8:316-320.
48. Catálogo año 2000 de Novabiochem. Alemania. Pág 6.21.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Términos en inmunología:

Adyuvantes: Sustancias que cuando se mezclan con un antígeno, mejoran su inmunogenicidad.

Anticuerpos: Proteínas producidas por el sistema inmune en respuesta a la presencia de sustancias extrañas potencialmente dañinas que pueda ser una amenaza para el organismo.

Anticuerpos monoclonales: Anticuerpos que han sido producidos artificialmente contra un antígeno específico.

Antígenos: Sustancias extrañas que se unen a los anticuerpos y que inducen respuesta inmunitaria específica.

Eritrocitos: Sinónimo de glóbulos rojos.

Hepatocitos: Células del hígado.

Inmunidad: Reacción del cuerpo a sustancias extrañas, incluyendo a los microorganismos así como las macromoléculas tales como proteínas, polisacáridos, sin que dicha reacción tenga una repercusión fisiológica o patológica.

Inmunidad específica: Inmunidad estimulada tras la exposición a agentes infecciosos y presenta una respuesta específica que tiene la capacidad de generar memoria inmunitaria.

Inmunidad humoral: Inmunidad específica donde participan moléculas de la sangre que son las responsables de reconocer y eliminar a los antígenos.

Inmunogenicidad: Propiedad que permite a una sustancia inducir una respuesta inmune detectable.

Linfocitos: Componentes de la inmunidad específica y sus productos son los anticuerpos.

Linfocitos B: Células de la inmunidad humoral, los cuales responden a la presencia de antígenos extraños transformándose en células productoras de anticuerpos.

Parasitemia: Contenido cuantitativo de parásitos en la sangre. Es usada como una medida de la carga parasitaria en el organismo y como un indicativo del grado de infección.

Reactogenicidad: Capacidad de los fármacos o vacunas para producir reacciones adversas.

Rmsd: Es la medida de la distancia promedio entre cadenas principales de proteínas superpuestas.

Términos en Docking:

Virtual screening: Evaluación automática de una biblioteca considerablemente grande de compuestos. (Walters y col.)

Enlace salino: Enlace iónico relativamente débil entre las cadenas laterales cargadas negativa y positivamente de una proteína. Además contribuye a la estabilidad de la estructura.

Estructura nativa: Estructura de una molécula cuando está libre en solución, en su estado no acomplexado.

Estructura Pseudo-nativa: Estructura de la molécula cuando está acomplexada a otra, diferente a la usada para el docking.

ANEXO I

Términos energéticos de las primeras diez soluciones obtenidas por FireDock para el complejo PfMSP1₁₉-Fab G17.12.

	E total	EVdW _{atrac}	EVdW _{rep}	Esol	Erot	Ea _{elec_c}	Er _{elec_c}	Ea _{elec_l}	Er _{elec_l}	E _{HB}	E _{π-π}	E _{cat-π}	E _{aliph}
1	-70,96	-42,72	9,50	8,11	18,42	-48,48	0,00	-8,65	0,00	-8,26	-1,50	0,00	0,00
2	-57,04	-27,17	14,99	-1,15	21,27	-27,20	0,00	-2,56	0,00	-6,29	-9,00	0,00	0,00
3	-56,76	-38,32	22,91	0,94	21,30	-7,90	0,00	-9,81	11,96	-10,10	-4,50	0,00	0,00
4	-49,86	-28,21	17,50	4,36	21,37	-109,56	14,07	-5,75	16,84	-7,24	-1,50	0,00	-1,50
5	-4,59	-24,61	7,14	0,15	19,25	-30,50	0,00	0,00	0,00	-3,96	-4,00	-1,50	0,00
6	-42,74	-20,66	6,59	-0,69	21,18	-19,33	0,00	-5,75	4,20	-1,50	-9,00	0,00	0,00
7	-42,64	-23,32	10,42	0,78	19,57	-34,38	2,83	-3,57	9,31	-2,76	-10,00	0,00	0,00
8	-42,58	-34,22	25,50	9,24	18,09	-21,20	0,00	-8,78	1,92	-8,43	-3,00	-1,50	0,00
9	-40,66	-32,65	28,89	2,42	17,12	0,00	0,00	-14,15	4,68	-4,47	-3,00	0,00	-0,50
10	-37,79	-23,05	8,34	3,21	18,86	-25,60	34,31	-2,43	4,41	-6,75	-9,00	0,00	0,00

*Leyenda:

EVdW_{atrac}, EVdW_{rep}: Atractiva y repulsiva de van der Waals; Esol: Energía de solvatación; Erot: Energía interna; Ea_{elec_c}, Er_{elec_c}: Electrostática atractiva y repulsiva a corta distancias; Ea_{elec_l}, Er_{elec_l}: Electrostática atractiva y repulsiva de larga distancia; E_{HB}: Puentes de hidrógeno; E_{π-π}, E_{cat-π}, E_{aliph}: Interacciones π-π, interacciones catión-π y interacciones alifáticas.

ANEXO II

Términos energéticos de las primeras diez soluciones obtenidas por FireDock para el complejo PvMSP1₁₉-Fab G17.12.

	E total	EVdW _{atrac}	EVdW _{rep}	Esol	Erot	Ea _{elec_c}	Er _{elec_c}	Ea _{elec_l}	Er _{elec_l}	E _{HB}	Eπ-π	Ecat-π	Ealiph
1	-58,20	-28,96	17,88	-1,14	20,45	-55,62	0,00	-9,55	0,00	-5,08	-1,50	0,00	0,00
2	-56,58	-26,30	13,13	-1,98	25,24	-64,91	0,00	-5,47	1,94	-4,60	-1,50	0,00	0,00
3	-55,57	-25,30	9,92	-1,96	23,30	-54,39	0,00	-8,39	1,77	-4,06	-1,50	0,00	0,00
4	-54,94	-35,26	15,45	4,23	17,54	-17,93	0,00	-10,84	5,74	-6,92	-5,00	0,00	0,00
5	-53,97	-31,51	13,27	1,47	25,45	-30,67	0,00	0,00	0,00	-2,78	-3,50	0,00	1,50
6	-53,11	-38,16	24,12	7,33	21,84	0,00	0,00	0,00	0,00	-10,85	-8,00	-1,50	0,00
7	-51,57	-37,15	26,46	7,00	19,49	0,00	0,00	0,00	0,00	-11,54	-8,00	-1,50	0,00
8	-50,08	-24,47	14,05	-7,77	17,93	-32,86	17,41	-8,00	7,88	-3,87	-2,00	0,00	0,50
9	-48,74	-29,41	14,84	0,61	19,13	-3,91	0,00	-2,31	3,30	-4,47	-1,50	-3,00	0,00
10	-47,01	-27,49	16,15	-1,43	24,12	-16,63	0,00	-6,02	0,00	-3,27	-3,00	0,00	0,00

*Ver leyenda Anexo I

**Estos resultados permanecieron invariables en los diez análisis.

ANEXO III

Archivo de salida de RosettaDock.

Por simplicidad solo se mostraran las primeras diez filas de cada tabla. Únicamente la tabla de interacciones entre aminoácidos se muestra completamente en el anexo IV.

(1) Tabla de coordenadas de los átomos en el complejo:

ATOM	1	N	MET	C	1	-11.384	18.645	51.285	1.00	0.00
ATOM	2	CA	MET	C	1	-12.415	19.712	51.211	1.00	0.00
ATOM	3	C	MET	C	1	-13.687	19.144	50.517	1.00	0.00
ATOM	4	O	MET	C	1	-13.611	18.749	49.351	1.00	0.00
ATOM	5	CB	MET	C	1	-11.867	20.924	50.461	1.00	0.00
ATOM	6	CG	MET	C	1	-12.809	22.119	50.421	1.00	0.00
ATOM	7	SD	MET	C	1	-12.256	23.403	49.281	1.00	0.00
ATOM	8	CE	MET	C	1	-10.693	23.863	50.023	1.00	0.00
ATOM	9	H	MET	C	1	-10.690	17.927	51.335	1.00	0.00
ATOM	10	HA	MET	C	1	-12.700	20.023	52.216	1.00	0.00

(2) Tabla de las energías por aminoácido en el complejo con su respectivo valor total al final:

res	aa	Eatr	Erep	Esol	Eh2o_sol	Eaa	Edun	Eintra	Ehnd_bb	Ehnd_sc	Epair	Eref	Egb	Eh2o	Eh2o_hb	Ecst	Eres
1	MET	-4.8	0.6	1.7	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.7
2	SER	-4.1	0.3	2.8	0.0	-0.2	0.9	0.0	-0.4	-0.4	-0.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.8
3	SER	-4.2	0.3	2.4	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	-0.5	-0.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.9
4	GLU	-4.3	0.0	3.3	0.0	-0.3	2.8	0.0	0.0	-1.1	-0.5	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.9
5	HIS	-6.1	0.2	3.5	0.0	0.0	1.3	0.0	-0.6	-0.4	-0.3	-0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.8
6	THR	-3.4	0.2	2.4	0.0	-0.2	0.1	0.0	-0.4	-0.4	-0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	-2.1
7	CYS	-2.5	0.1	1.7	0.0	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	-4.0	-1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	-2.6
8	ILE	-3.2	0.2	2.3	0.0	-0.6	0.6	0.0	0.0	-0.5	0.0	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.9
9	ASP	-1.6	0.0	1.4	0.0	0.1	0.3	0.0	0.0	-0.3	0.1	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.7
10	THR	-2.1	0.1	1.5	0.0	-0.1	0.2	0.0	0.0	-0.4	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.0
totals		-1606.1	865.9	824.9	0.0	-52.7	408.4	0.8	-232.2	-73.3	-73.6	65.1	0.0	0.0	0.0	0.0	-3.0

(3) Tabla comparativa de Energía calculada menos Energía esperada por aminoácido además de un término que expresa el grado en el que se compacta cada aminoácido dentro del complejo:

res	chain	aa	nb	Eatr	Erep	Esol	Eaa	Edun	Eintra	Ehbnd	Epair	Elj	Eres	SASApack	res_rms	sasaprob
1	C	MET	26	0.1	0.2	-0.2	0.1	-1.3	0.0	1.2	0.0	0.4	-0.4	19.08	1.20	0.006
2	C	SER	27	-0.4	0.1	0.4	-0.2	0.1	0.0	0.5	-0.2	-0.3	0.4	10.99	1.22	0.044
3	C	SER	23	-0.8	0.1	0.1	0.1	-0.1	0.0	0.7	-0.2	-0.7	0.2	3.24	1.20	0.404
4	C	GLU	20	0.0	-0.3	0.4	-0.2	0.6	0.0	0.3	-0.1	-0.3	0.5	8.22	1.11	0.142
5	C	HIS	21	-0.8	-0.3	0.7	0.0	-0.2	-0.1	0.1	-0.2	-1.1	-0.8	7.21	1.11	0.294
6	C	THR	24	0.5	-0.1	0.0	-0.2	-0.4	0.0	0.4	0.0	0.4	0.4	14.28	1.15	0.010
7	C	CYS	21	0.8	-0.8	-0.2	0.0	-0.3	0.0	0.9	-4.0	-0.1	-3.7	3.59	1.26	0.331
8	C	ILE	12	-0.4	-0.1	1.1	-0.5	-1.0	-0.2	0.1	0.0	-0.5	-1.1	11.02	1.40	0.033
9	C	ASP	10	0.7	-0.2	-0.3	0.2	-1.3	0.0	0.2	0.2	0.5	-0.5	0.81	1.59	0.404
10	C	THR	14	0.6	-0.1	-0.2	0.1	-0.5	0.0	0.3	0.1	0.5	0.4	6.33	1.64	0.092

(4) Lista de Energía total calculada menos la Energía total esperada en los diferentes ambientes del complejo: aminoácidos de la superficie, aminoácidos no expuestos y aminoácidos expuestos

	Eatr	Erep	Elj
buried	0.4	1.1	1.5
middle	0.6	0.8	1.4
surfac	0.4	2.2	2.7

(5) Tabla de la energía de interacción entre los pares de aminoácidos implicados en la interfase (Esta aparece completa en el Anexo IV)

(6) Tabla de la resta de los ángulos Ψ , Φ y ω iniciales menos los finales para cada aminoácido:

res	aa	chi1	chi2	chi3
1	MET	10.27	33.36	128.41
2	SER	136.03	120.00	0.00
3	SER	126.50	120.00	0.00
4	GLU	97.69	106.51	45.46
5	HIS	4.82	12.30	0.00
6	THR	2.90	120.00	0.00
7	CYS	0.00	0.00	0.00
8	ILE	3.00	126.96	0.00
9	ASP	0.00	0.00	0.00
10	THR	0.00	0.00	0.00

(7) Lista de las coordenadas de los centroides de las moléculas receptora y ligado:

docking part1_centroid	(-4.982,	28.513,	53.490)
docking part2_centroid	(-12.018,	-9.381,	37.123)
docking centroid_bond	(7.036,	37.894,	16.368)
docking contact_point	(-8.500,	9.566,	45.307)
docking_normal	(0.168,	0.905,	0.391)
docking_parallel1	(0.986,	-0.154,	-0.067)
docking_parallel2	(0.000,	0.397,	-0.918)

(8) Tabla de valores absolutos de los ángulos Ψ , Φ y ω de cada aminoácido en el complejo:

res	aa	chi1	chi2	chi3
1	MET	-175.562	-169.454	-62.188
2	SER	76.995	180.000	0.000
3	SER	-61.102	60.000	0.000
4	GLU	-166.237	-77.591	-48.375
5	HIS	-71.215	161.697	0.000
6	THR	58.590	179.995	0.000
7	CYS	-71.407	0.000	0.000
8	ILE	-57.435	-61.848	0.000
9	ASP	-72.598	-12.399	0.000
10	THR	-59.607	59.996	0.000

ANEXO IV

Términos de energía de interacción de la interfase en el complejo final PvMSP1₁₉-FabG17.12 refinado por RosettaDock y aminoácidos implicados.

En las siguientes tablas se muestran los términos de energía de interacción entre los pares de aminoácidos (aminoácido 1 y 2). Los aminoácidos se encuentran referenciados primero por la cadena a la cual pertenece, bien sea la PvMSP1₁₉ (Cadena C), la cadena pesada del FabG17.12 (Cadena D) o la cadena liviana del FabG17.12 (Cadena E), luego por el número del aminoácido dentro de la cadena implicada y finalmente por la abreviatura del nombre del aminoácido. Por ejemplo, en la primera fila se lee que la Met-1 de la PvMSP1₁₉ interactúa con la Tyr-32 de la cadena pesada del anticuerpo.

Los términos contribuyentes a la interacción son:

Eatrac: Energía atractiva de Lennard-Jones.

Erep: Energía repulsiva de Lennard-Jones.

Esol: Energía de solvatación.

Ehbd: Energía por formación de puente de Hidrógeno.

Epair: Interacción estadística entre pares de AA.

*estas son las siglas con las que se encuentran los términos en el archivo de salida de RosettaDock.

res1	aa1	res2	aa2	total	Eatr	Erep	Esol	Ehbnd	Epair	Egb	Ecst	Eplane	Eh2o	Eh2o_hb
C	1	MET D	32 TYR	-0.23	-0.60	0.00	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	1	MET D	91 PHE	-0.15	-0.32	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	1	MET E	95 ASN	0.06	-0.11	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	1	MET E	96 TYR	0.00	-0.03	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	1	MET E	97 TYR	-0.88	-1.28	0.04	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	1	MET E	98 ARG	-0.02	-0.03	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	1	MET E	99 PHE	-0.02	-0.03	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	1	MET E	100 ASP	0.76	-0.85	1.02	0.59	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	1	MET E	100A GLY	-0.06	-0.12	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	2	SER D	91 PHE	-0.22	-0.26	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	2	SER E	50 TRP	-0.58	-0.98	0.01	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	2	SER E	52 ASN	-0.02	-0.09	0.00	0.17	0.00	-0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	2	SER E	95 ASN	0.11	-0.57	0.05	0.72	0.00	-0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	2	SER E	97 TYR	-0.46	-1.18	0.08	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	3	SER D	91 PHE	-0.25	-0.84	0.11	0.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	3	SER D	94 SER	-0.10	-0.01	0.00	0.03	0.00	-0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	3	SER D	96 TYR	-1.33	-1.10	0.00	0.72	-0.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	3	SER E	35 GLN	0.02	-0.11	0.00	0.20	0.00	-0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	3	SER E	47 TRP	-0.21	-0.52	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	3	SER E	49 GLY	0.00	-0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	3	SER E	50 TRP	-1.16	-2.86	0.54	1.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	3	SER E	58 GLN	-0.60	-0.81	0.00	0.24	0.00	-0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	3	SER E	95 ASN	-0.06	-0.26	0.00	0.34	0.00	-0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	4	GLU D	96 TYR	0.01	-0.01	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	4	GLU E	50 TRP	-0.80	-1.08	0.00	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	4	GLU E	52 ASN	-0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	4	GLU E	54 SER	-0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

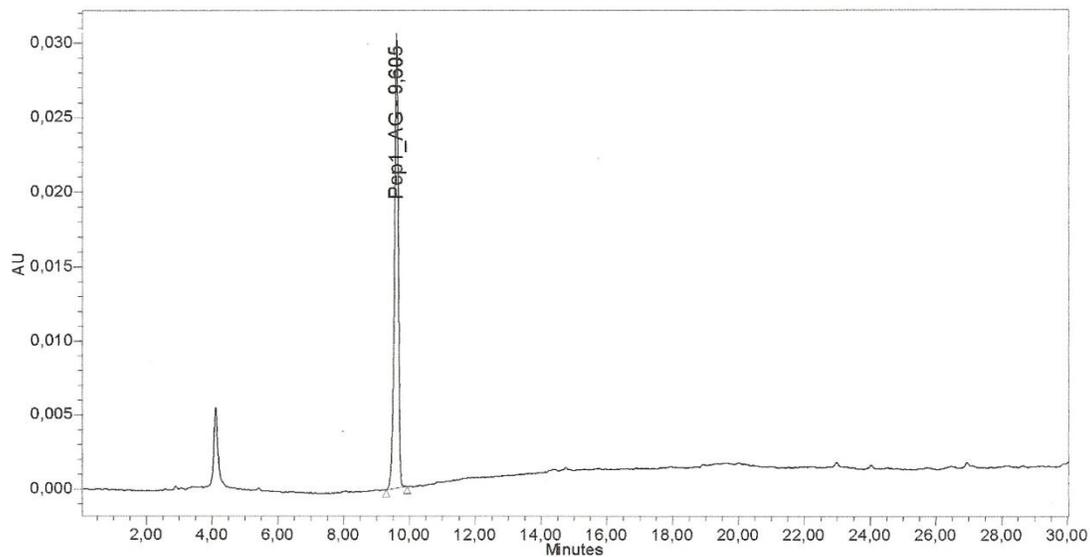
	res1	aa1	res2	aa2	total	Eatr	Erep	Esol	Ehbnd	Epair	Egb	Ecst	Eplane	Eh2o	Eh2o hb
C	15	ASN	D	67	SER	-0.03	0.00	0.00	0.00	-0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	16	ALA	D	29	SER	-0.10	-0.39	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	16	ALA	D	30	SER	-0.31	-0.52	0.00	0.42	-0.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	17	ALA	D	30	SER	-0.06	-0.25	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	17	ALA	D	32	TYR	-0.21	-0.38	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	18	CYS	D	30	SER	0.02	-0.08	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	18	CYS	D	32	TYR	0.00	-0.02	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	19	TYR	E	97	TYR	0.00	-0.03	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	20	ARG	E	58	GLN	-0.12	-0.30	0.00	0.35	0.00	-0.16	0.00	0.00	0.00	0.00
C	26	GLU	D	93	HIS	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	31	LEU	D	31	SER	0.02	-0.04	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	80	GLU	E	96	TYR	0.02	-0.10	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	80	GLU	E	98	ARG	-1.14	-1.22	0.00	1.35	-0.79	-0.47	0.00	0.00	0.00	0.00
C	81	PRO	E	98	ARG	0.01	-0.32	0.00	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	82	LEU	E	97	TYR	-0.97	-1.02	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	82	LEU	E	98	ARG	-0.01	-0.04	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	82	LEU	E	100	ASP	0.08	-0.06	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	83	PHE	D	30	SER	-0.01	-0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	83	PHE	D	31	SER	-0.08	-0.37	0.00	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	83	PHE	D	32	TYR	-0.45	-0.62	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	83	PHE	D	50	THR	-0.61	-0.52	0.00	-0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	83	PHE	D	53	ASN	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	83	PHE	E	97	TYR	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	83	PHE	E	98	ARG	0.00	-0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	83	PHE	E	100	ASP	0.18	-0.41	0.00	0.59	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	84	GLU	D	53	ASN	-0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
C	89	SER	E	97	TYR	0.00	-0.03	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	90	SER	E	53	HIS	0.04	-0.03	0.00	0.04	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00
C	90	SER	E	97	TYR	-0.38	-0.83	0.00	0.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

res1	aa1	res2	aa2	total	Eatr	Erep	Esol	Ehbnd	Epair	Egb	Ecst	Eplane	Eh2o	Eh2o_hb
C	91	SER E	28 THR	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	91	SER E	30 THR	-0.10	-0.22	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	91	SER E	31 THR	0.41	-1.27	0.68	1.14	0.00	-0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	91	SER E	32 ALA	-0.02	-0.12	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	91	SER E	96 TYR	-0.61	-0.69	0.03	0.71	-0.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	91	SER E	97 TYR	-0.49	-0.81	0.00	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	91	SER E	98 ARG	-0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ANEXO V

Cromatograma HPLC del péptido crudo antes de la reacción de oxidación.

Sample Name:	Pep1_AG	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	11/11/2008 17:23:59
Vial:	1	Acq. Method Set:	peptidosMS
Injection #:	1	Date Processed:	13/12/2008 15:48:10
Injection Volume:	1,00 ul	Processing Method:	peptidosMP
Run Time:	30,0 Minutes	Channel Name:	Wv In Ch1
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr:	PDA 305,0 nm

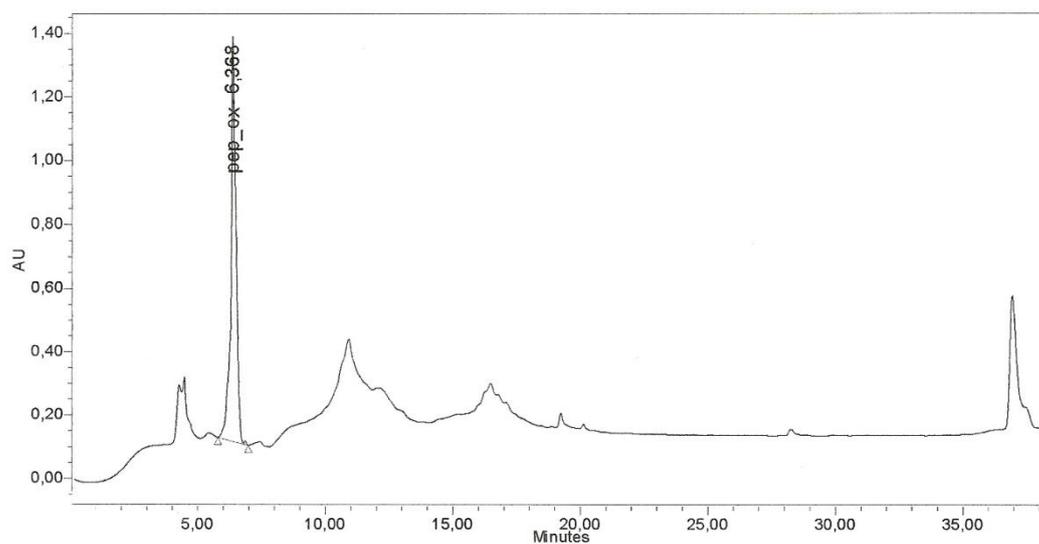


Gradiente: 10-80% acetonitrilo en agua en 30 min.

ANEXO VI

Cromatograma HPLC del péptido luego de la reacción de oxidación.

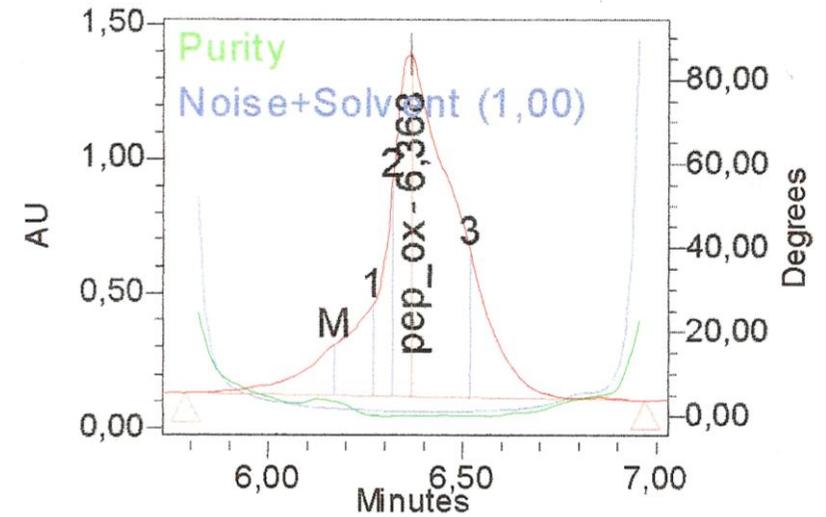
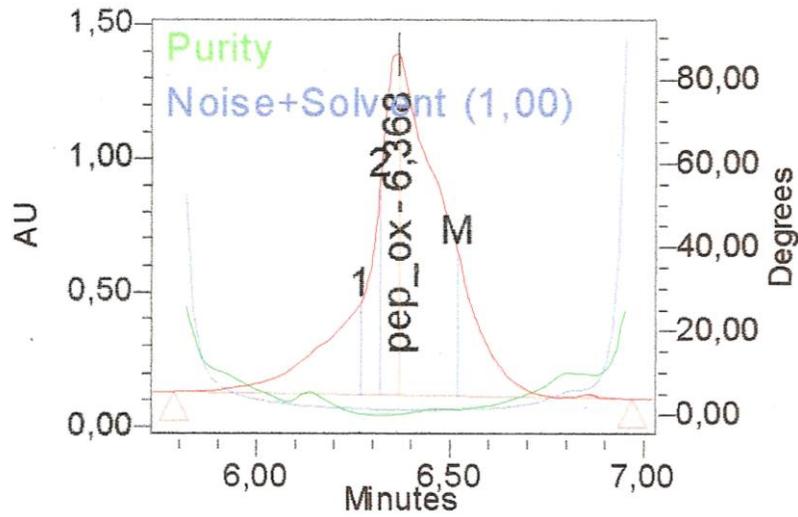
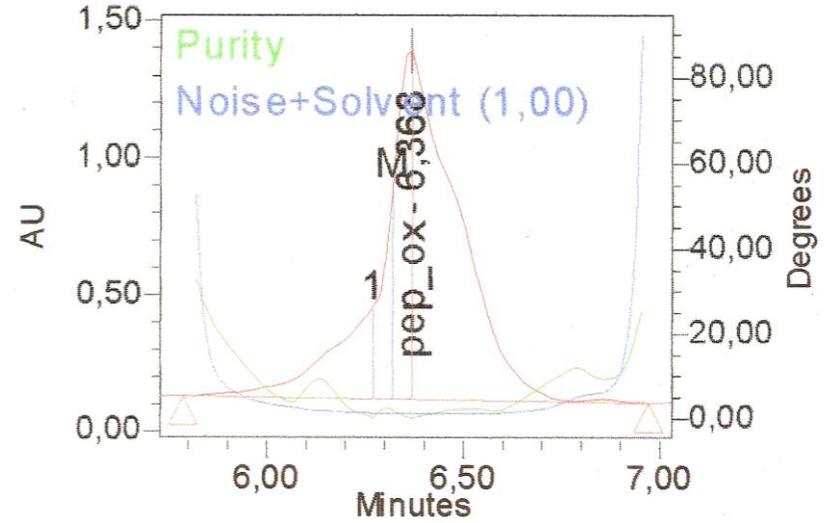
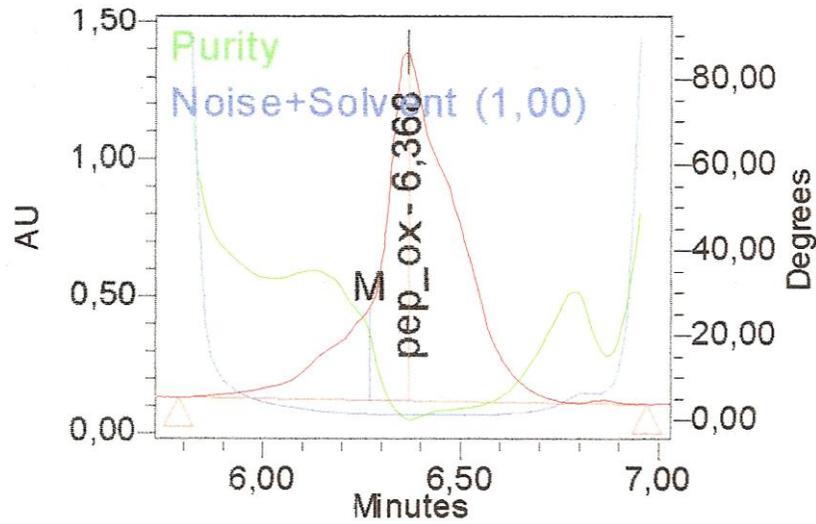
Sample Name:	pepAGox_80_luna_dia3	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	16/12/2008 15:59:09
Vial:	1	Acq. Method Set:	peptidos1
Injection #:	1	Date Processed:	27/01/2009 15:28:17
Injection Volume:	1,00 ul	Processing Metho	peptidosMS217
Run Time:	40,0 Minutes	Channel Name:	Wv In Ch1
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr	PDA 217,0 nm



Gradiente: 15-80% acetonitrilo en agua en 30min.

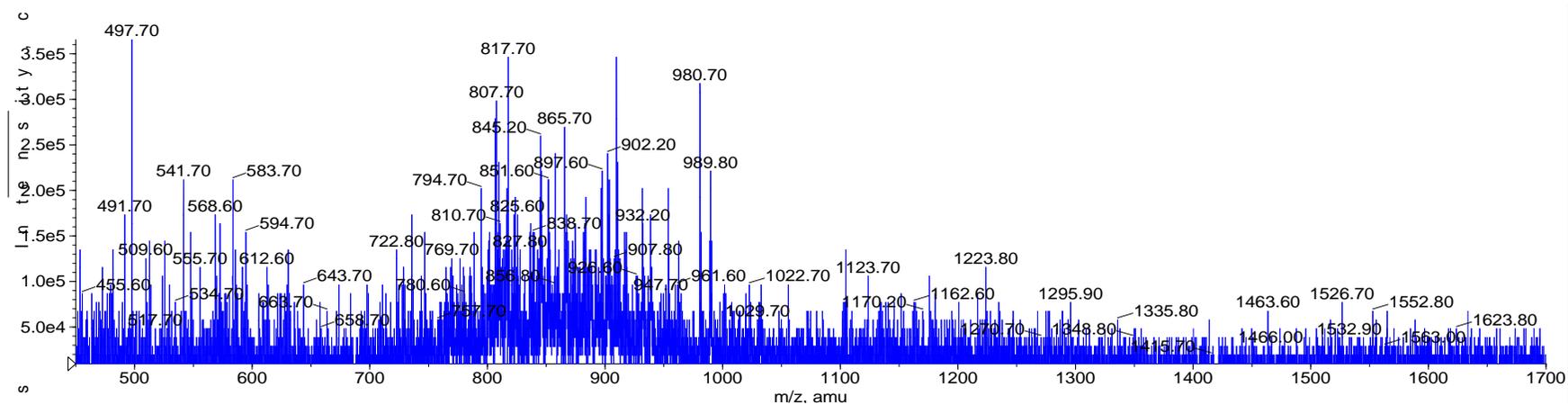
ANEXO VII

Pureza del pico cromatográfico del péptido

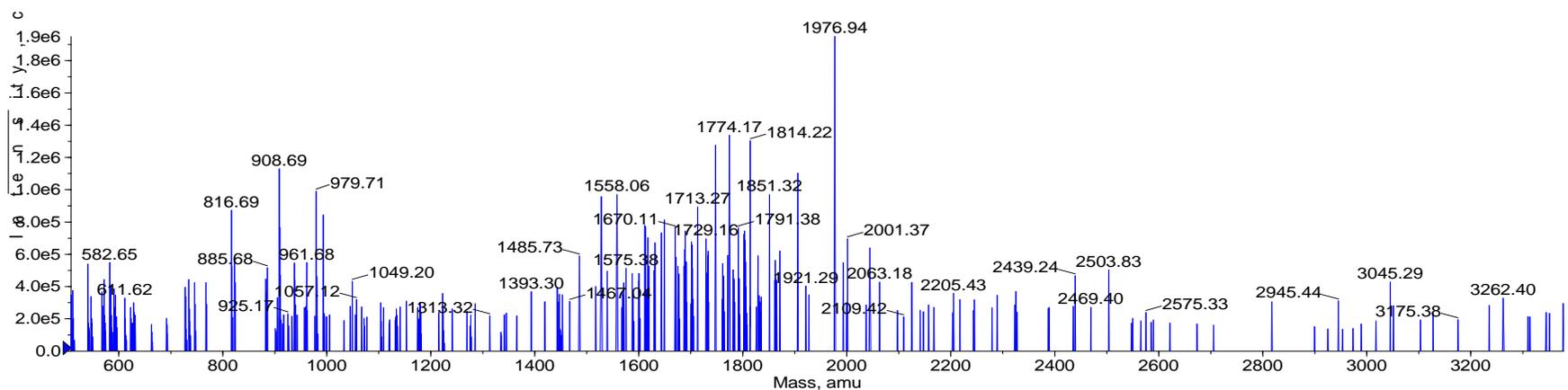


ANEXO VIII

(1) Espectro de masa/carga del producto final.



(2) Espectro de masa del producto final.



(3) Acercamiento en la región 912-923 m/z