

MODIFICACIÓN DEL ESQUELETO PEPTÍDICO DE FRAGMENTOS DE LA PROTEÍNA MSP-1 DEL *Plasmodium falciparum*: SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE PSEUDOPÉPTIDOS AMIDA REDUCIDA

BACKBONE MODIFICATION OF *Plasmodium falciparum*'s MSP-1 PEPTIDE FRAGMENTS: SOLID PHASE SYNTHESIS OF REDUCED AMIDE PSEUDOPEPTIDES

José Manuel Lozano^{1*}, Luz Mary Salazar*, Carlos Parra*, Nubia Barrera*, Fanny Guzmán*, José Libardo Torres-Castellanos** y Manuel Elkin Patarroyo*,***

Recibido: 17/02/02 – Aceptado: 30/06/03

RESUMEN

Los estadios asexuales sanguíneos del *Plasmodium falciparum* constituyen un blanco natural para el desarrollo de vacunas antimaláricas debido a la gran cantidad de antígenos expresados en su superficie que están implicados en el proceso de invasión del parásito a glóbulos rojos, desencadenando la enfermedad en el hospedero humano. Uno de estos antígenos es la proteína de superficie del merozoito MSP-1, una glicoproteína de 195 kDa en su forma madura. Recientemente se identificaron los péptidos de esta proteína con alta capacidad de unión a glóbulos rojos (GR). Entre todos ellos, el péptido sintético codificado 1585, cuya estructura primaria ¹²⁸²EVLYLKPLAGVYRSLKKQLE¹³⁰¹ perte-

necce al amino terminal del fragmento de 42 kDa de la proteína MSP-1, mostró propiedades de unión específica a GR. Posteriormente, se identificó el motivo de unión cuya secuencia de aminoácidos es LKP-A. Con el objeto de evaluar el papel del enlace peptídico en la modulación estructural del esqueleto peptídico se diseñaron pseudopéptidos amida reducida, mediante la sustitución de enlaces peptídicos normales de la forma [CO-NH] del motivo de unión a GR por el enlace Ψ[CH₂NH]. De esta manera se obtuvieron formas monoméricas y poliméricas pseudopeptídicas del 1585. En este estudio reportamos algunas de las propiedades físicas y químicas de los pseudopéptidos análogos del 1585.

¹ Autor correspondiente. Correo electrónico: jm_lozano@fidic.org.co /jotalozano@hotmail.com

* Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Carrera 50 No. 26-00, Bogotá, Colombia.

** Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

*** Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

Palabras clave: enlace peptídico, esqueleto peptídico, pseudopeptido, estructura tridimensional

ABSTRACT

Due to the number of surface antigens expressed in *Plasmodium falciparum* asexual stages which are associated to red blood cell (RBC) invasion and so causing human malaria infection, these erythrocyte parasite forms are thus, a natural target for malarial vaccine development. One of such antigens is the Merozoite Surface Protein-1 (MSP-1). This is a 195 kDa glycoprotein in its mature expressed form. Recently, MSP-1 high binding capacity peptides to RBC were identified. Amongst all of them, the synthetic so called 1585 peptide, whose primary structure ¹²⁸²EVLYLKPLAGVYRSLKKQLE¹³⁰¹ belongs to the MSP-1's 42 kDa fragment amino termini, shown specific high binding ca-

capacity to RBCs. Thereafter, the 1585 peptide LKP-A high binding motif was identified. To assess the role of such binding motif peptide bonds respect to backbone structure modulation, a set of reduced amide pseudopeptides were designed and synthesised. Thus, a single natural [CO-NH] peptide bond was replaced by a Ψ[CH₂-NH], isoster bond. Then, 1585 pseudopeptide monomer as well as polymeric forms were obtained. In this work we report some physical and chemical properties of such 1585 surrogates.

Key words: Peptide bond, peptide backbone, pseudopeptide, tridimensional structure.

INTRODUCCIÓN

El *Plasmodium falciparum*, agente causal de la mayoría de los casos de malaria en el mundo, tiene un ciclo de vida complejo, el cual involucra dos hospederos:

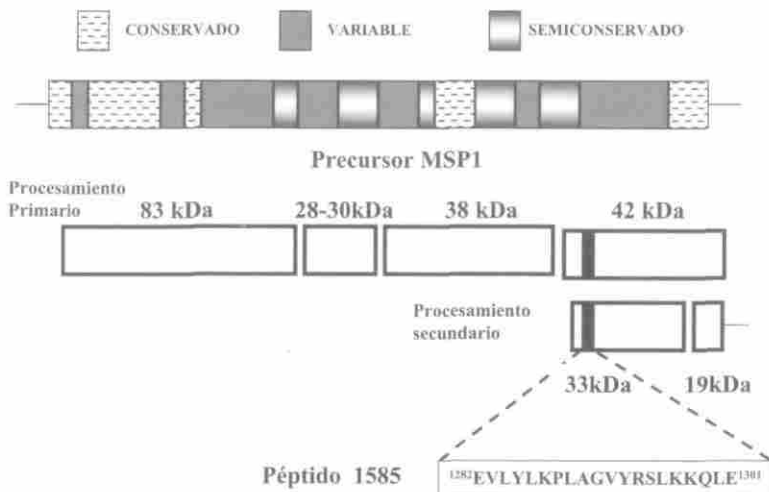


Figura 1. Organización estructural de la proteína MSP-1 del *Plasmodium falciparum* y localización del péptido 1585 (MSP-1¹²⁸²⁻¹³⁰¹).

la hembra del mosquito *Anopheles* y un ser humano susceptible de contraer la enfermedad. Los estadios asexuales sanguíneos del parásito constituyen un blanco natural para el desarrollo de vacunas antimaláricas debido a la gran cantidad de antígenos expresados en su superficie, y que a su vez estén implicados en el proceso de invasión del parásito a glóbulos rojos desencadenando la enfermedad en el hospedero humano.

Uno de estos antígenos es la proteína de superficie del merozoito-1 MSP-1, una glicoproteína de 195 kDa, cuya forma precursora sufre un procesamiento proteolítico primario hacia fragmentos de 83 kDa, 30 kDa, 38 kDa y 42 kDa, un segundo procesamiento proteolítico del fragmento de 42 kDa que libera un fragmento de 33 kDa, y un fragmento de 19 kDa que permanece unido a los merozoitos (1) como se observa en la figura 1.

Los fragmentos liberados en los dos procesos permanecen asociados de manera no covalente sobre la superficie de los merozoitos durante el proceso de invasión a sus células blanco. Recientemente se identificaron los péptidos de la MSP-1 con alta capacidad de unión a glóbulos rojos (GR). Entre todos ellos, el péptido sintético codificado 1585, cuya estructura primaria EVLYLKPLAGVYRSLKKQLE pertenece al amino terminal del fragmento de 42 kDa, mostró propiedades de unión específica a GR y posteriormente se identificó el motivo de unión del 1585 cuya secuencia de aminoácidos es LKP-A(2).

El objetivo en el diseño de pseudopéptidos es el enlace peptídico. Por inversión del enlace peptídico y manteniendo la quiralidad del carbono α se

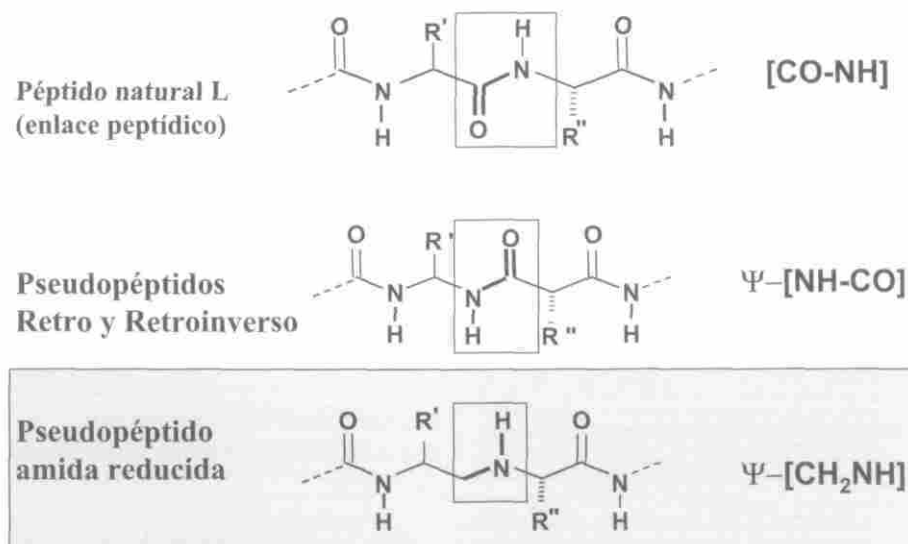


Figura 2. Algunas formas isostéricas del enlace peptídico $[\text{CO}-\text{NH}]$.

obtiene un pseudopéptido Retroinverso, si se invierte la quiralidad se obtendrá un pseudopéptido Retro. Al sustituir el átomo de oxígeno del carbono carbonílico del enlace peptídico por dos átomos de hidrógeno se obtiene un pseudopéptido amida reducida (parte inferior) (3) como se puede observar en la figura 2.

Con el objeto de evaluar el papel del enlace peptídico en la modulación estructural del esqueleto peptídico se diseñaron pseudopéptidos amida reducida, mediante la sustitución de enlaces peptídicos normales de la forma [CO-NH] del motivo de unión a GR por el enlace Ψ [CH₂-NH], como se observa en la Figura 3. De esta manera se obtuvieron formas monoméricas y poliméricas pseudopeptídicas del 1585 (MSP-1¹²⁸²⁻¹³⁰¹), las primeras se emplearon para estudio de sus propiedades químicas y físicas, y las formas poliméricas para estudios biológicos y bioquímicos. En el presente estudio reportamos algunas de las propiedades químicas y físicas de los pseudopéptidos análogos del 1585.

En la figura 3 se observa la posición de los enlaces peptídicos normales del motivo de unión al glóbulo rojo (GR) del péptido 1585 de la proteína MSP-1 del *P. falciparum* a ser sustituidos por enlaces isostéricos del tipo amida reducida a partir de su estructura primaria. Las flechas destacan desde el N hacia C terminal el enlace entre K₁₂₈₇-P₁₂₈₈ para originar el

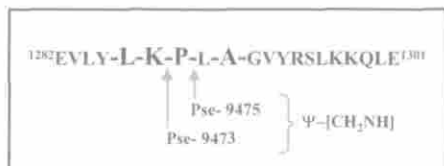


Figura 3. Selección de enlaces peptídicos a modificar en el péptido 1585 (MSP-1¹²⁸²⁻¹³⁰¹).

Pse-9473, y el enlace entre P₁₂₈₈-L₁₂₈₉ para originar el Pse-9475. Ambos pseudopéptidos amida reducida se sintetizaron en forma de monómero y polímero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis de pseudopéptidos amida reducida y determinación estructural

Derivados *N*-metoxi-*N*-metil- α -(*t*-Boc-amino)-carboxamidas y α -*t*-Boc-Aminoaldehídos

Para la obtención de cuatro pseudopéptidos amida reducida Ψ -[CH₂-NH], dos en forma monomérica y dos en forma polimérica, se prepararon los α -*N*-*t*-Boc-aminoaldehídos derivados de los aminoácidos comerciales protegidos α -*N*-*t*-Boc en dos etapas, empleando para ello estrategias en fase líquida tal como está descrito en la literatura (4). Inicialmente los α -*N*-*t*-Boc-aminoácidos se transformaron a sus correspondientes *N*,*O*-dimetilcarboxamidas, los cuales se trataron posteriormente con LiAlH₄ para producir su correspondiente aldehído. Cada producto inter-medio, así como cada derivado, se caracterizó por RMN-1H y ¹³C. En ambos casos se muestra la caracterización de los dos derivados obtenidos para los residuos de Lisina (Lys) y Prolina (Pro), incluido el análisis por espectroscopia infrarroja (IR) para los productos finales.

Caracterización de los derivados *N*-metoxi-*N*-metil- α -(*t*-Boc-amino)-carboxamidas

N-*t*-Boc-Lys-*N*-(OCH₃)CH₃; rendimiento: 98%; Rf. 0,65 (acetato de etil-

lo/hexano 2:1). RMN-¹H, δ (ppm) (CDCl₃/TMSint): 1,45 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1,5 (d, 2 H, γ -H), 1,6 (d, 2 H, δ -H), 1,8 (d, 2 H, β -H), 3,10 (d, 2 H, ϵ -H), 3,25 (s, 3 H, N-CH₃), 3,80 (s, 3 H, OCH₃), 4,41 (dd, 1 H, α H), 8,01 (s, 1 H, NH), 7,14-7,30 (m, 5 H aromáticos del grupo protector Cl-Z). Aspecto oleoso, incoloro, inodoro.

N-t-Boc-Pro-N-(OCH₃) CH₃: rendimiento: 97,5%; Rf. 0,55 (acetato de etilo/hexano 2:1). RMN-¹H, δ (ppm) (CDCl₃/TMSint): 1,45 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2,0 (d, 2 H, γ -H), 2,12 (s, 1 H, β -H), 3,25 (s, 3 H, N-CH₃), 3,7 (d, 2 H, δ -H), 3,80 (s, 3 H, OCH₃), 4,41 (dd, 1 H, α H). Aspecto oleoso, tenuemente amarillo, inodoro.

Caracterización de los productos aldehído obtenidos

N-t-Boc-Lys-H: rendimiento 75,4%; Rf. 0,46 (acetato de etilo/hexano 2:1). RMN-¹H, δ (ppm) (CDCl₃/TMSint): 1,45 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1,5 (d, 2 H, γ -H), 1,6 (d, 2 H, δ -H), 1,8 (d, 2 H, β -H), 3,10 (d, 2 H, ϵ -H), 4,41 (dd, 1 H, α H), 8,01 (s, 1 H, NH), 7,14-7,30 (m, 5 H, aromáticos del grupo protector Cl-Z), 9,61 (s, 1 H CHO). RMN-¹³C (CDCl₃/TMSint): δ = 200 ppm (C-I, CHO). Producto oleoso, de color levemente amarillo, de olor característico.

I.R. (película): ν (cm⁻¹) = 2934,16, 1694,16, 1522,52, 1366,32, 1248,68, 1164,79, 1041,37, 753,07.

N-t-Boc-Pro-H: rendimiento 78,6%; Rf. 0,5 (acetato de etilo/hexano 2:1). RMN-¹H, δ (ppm) (CDCl₃/TMSint): 1,45 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2,0 (d, 2 H, γ -H), 2,12 (s, 1 H, β -H), 3,7 (d, 2 H, δ -H), 4,41 (dd,

1 H, α H), 9,64 (s, 1 H CHO). RMN-¹³C (CDCl₃/TMSint): δ = 200 ppm (C-I, CHO). Producto oleoso, de color rojizo, de olor característico.

I.R. (película): ν (cm⁻¹) = 2973,70, 1694,16, 1391,39, 1365,35, 1161,90, 1120,44, 997,98, 918,91, 773,32.

Síntesis en fase sólida de los análogos amida reducida

Los péptidos se sintetizaron empleando las metodologías estándar para la síntesis de péptidos en fase sólida mediante la estrategia *t*-Boc (5, 6) y los pseudopéptidos del 1585 mediante modificaciones reportadas previamente (4). La pureza de cada molécula se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC-FR provista de una columna de 5 μ m y 90Å de porosidad con un gradiente lineal de 0-70% AcN durante 30 min, con un flujo de elución de 1,0 ml por min. Las cromatografías preparativas se realizaron empleando una columna RPC18 de 5 μ m y 300Å de porosidad con un gradiente lineal de 0-100% de AcN durante 45 min con un flujo de elución de 4,5 ml por min y detección a 210 nm.

Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF

Para identificar cada pseudopéptido se registraron espectros de masas empleando un equipo Bruker Protein TOF espectrofotómetro (Billerica, MA, USA). Los experimentos MALDI ("Matrix Assisted Laser Desorption Ionization") se realizaron usando la técnica TOF ("Time of Flight"), empleando las matrices y los procedimientos estándar.

Espectroscopía RMN bidimensional

Se emplearon 10 mg del liofilizado de cada pseudopéptido purificado, disueltos en 500ml de una solución acuosa que contenía TFED_3 al 30% tal como está descrito (7).

Los experimentos de RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker DRX-600 MHz, a 295 K, y la señal de agua se suprimió usando la estrategia NoesyPr1D. Los datos se procesaron y analizaron empleando el programa xwinmr 1.3 en estaciones de trabajo Silicon Graphics. Los sistemas de "spin" se identificaron mediante experimentos bidimensionales TOCSY (8) y COSY (9). Los experimentos NOESY (10) permitieron la asignación de señales de aminoácidos vecinos en el espacio. El tiempo de mezclado escogido fue 400 ms, y el ancho espectral 12 ppm en ambas dimensiones.

Cálculo de estructura molecular

Las distancias interprotónicas se calcularon a partir de los experimentos NOESY. Los volúmenes de los "cross-peaks" se ajustaron de acuerdo con la relación: $d_{ij}/d_{ref} = (V_{ij}/V_{ref})^{1/6}$ (11). Las distancias interprotónicas se calcularon empleando la distancia protónica δ - δ en la Pro7 como d_{ref} para el 1585 y sus análogos Pse-9473 y Pse-9475. Posteriormente, se generaron familias de estructuras mediante el procesamiento de los datos en estaciones de trabajo Indigo 2 para modelización molecular.

Los espectros 1D y 2D se procesaron usando el programa FELIX 97.0, y las familias estructurales se generaron mediante el procesamiento de datos con NMRchitect, por combinación de los pro-

gramas "distance geometry" (DGII) y anillamiento simulado. Las intensidades de los "cross-peaks" NOE se clasificaron en rangos, así: fuertes 1,8 Å-2,8 Å, medianos 2,8 Å-3,5 Å y débiles 3,5 Å-5,0 Å. Los ángulos dihédros y las asignaciones estereoespecíficas se ajustaron como está descrito (12). Los enlaces peptídicos se forzaron a configuración *trans* y los carbonos a a quiralidad L. Las estructuras obtenidas se refinaron y se seleccionaron aquellas con geometrías razonables y bajas violaciones a las restricciones de conformación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis e identificación de pseudopéptidos del 1585

Los pseudopéptidos $\Psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$ amida reducida derivados del péptido 1585 se diseñaron tomando como base la secuencia de aminoácidos de la proteína MSP-1 esquematizada en la Figura 1, en la cual se ubica la estructura primaria del fragmento correspondiente al péptido blanco de este estudio (MSP-1¹²⁸²⁻¹³⁰¹); éstos se codificaron como Pse-9473 (modificado entre los residuos K₁₂₈₇-P₁₂₈₈) y Pse-9475 (modificado entre los residuos P₁₂₈₈-L₁₂₈₉).

En la Figura 2 se observa la comparación directa entre la conformación de un péptido en su forma natural constituido por residuos de configuración L (en la parte superior de la misma) respecto a análogos pseudopeptídicos de los tipos Retro y Retroinverso, y en la parte inferior los análogos objeto de este estudio del tipo amida reducida Ψ -[CH₂-NH], resaltados por un marco sólido. Los enla-

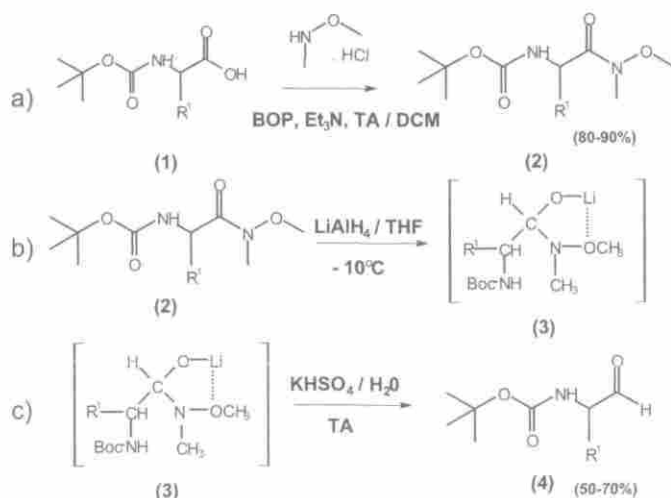


Figura 4. Síntesis de *N*-*t*-Boc-aminoaldehidos a partir de *N*-*t*-Boc-aminoácidos.

ces peptídicos seleccionados para su modificación se observan en la Figura 3. La letra griega Pse (Ψ) representa a la expresión Pseudo. Tales análogos se obtuvieron en cantidades normales con rendimientos mayores al 70%, de acuerdo con los procedimientos descritos en las Figuras 4 y 5. Cuando fue necesario, se purificaron por HPLC-FR preparativa hasta homogeneidad $\geq 98\%$. Todas las moléculas fueron solubles en agua. Las masas moleculares experimentales para cada molécula estuvieron acordes con los valores esperados; para el péptido no modificado 1585 se encontró experimentalmente una masa molecular relativa 2340,21 m/z (valor esperado: 2348,04 Da). Para el Pse-9473 se obtuvo un valor de 2334,79 m/z (valor esperado: 2334,0 Da) y para el Pse-9475 se obtuvo un valor de 2335,52 m/z (valor esperado: 2334,0 Da), como puede observarse en la Figura 6.

En la figura 4 se observa (a) el carbono carbonílico de un *N*-Boc- α -aminoaci-

do comercial **1** se protege con *N*,*O*-dimetilhidroxilamina formando así el derivado *N*,*O*-dimetilcarboxamida **2**. Posteriormente, la *N*,*O*-dimetilcarboxamida **2** se trata con LiAlH_4 a -10°C , para producir la sal de Litio **3**, como puede observarse en (b). La sal de Litio **3** se hidroliza en medio ácido a temperatura ambiente (TA) para dar lugar a la formación del *N*-*t*-Boc- α -aminoaldehido **4** como se observa en (c).

La síntesis de los enlaces isostéricos $\Psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$ se lleva a cabo mediante aminación reductiva *in situ*, luego de la condensación de los grupos CHO de **4** y el grupo amino libre de **5** (figura 5). Al realizar la desprotección y neutralización de la función amino del último residuo de la cadena peptídica, anclada previamente a la resina o soporte sólido, representado en la gráfica como una esfera gris **5**, se hace reaccionar con el *N*-*t*-Boc- α -aminoaldehido **4** obtenido en la etapa anterior (Figura 4) para formar el aducto **6**. Posteriormente, este intermediato se tra-

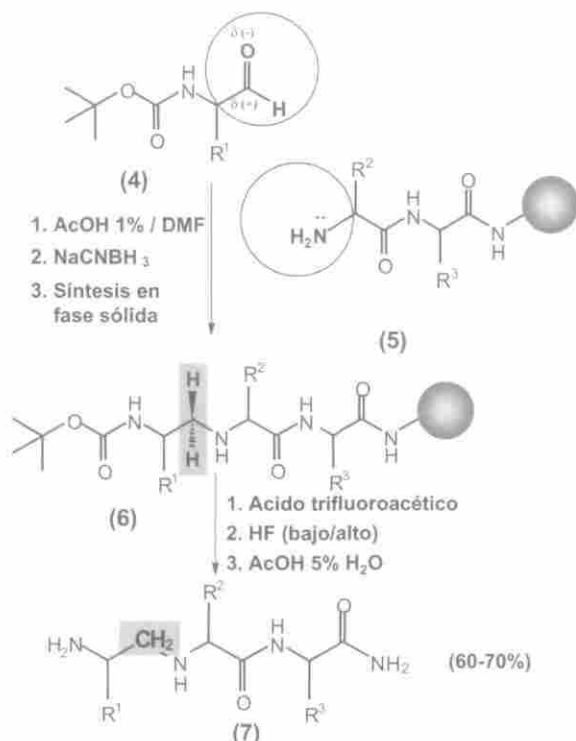


Figura 5. Síntesis en fase sólida de isómeros $\Psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$ amida reducida.

ta con NaCNBH₃ para reducir el ion iminio y formar el grupo metileno. Finalmente, el pseudopéptido 7 se obtiene mediante las estrategias normales de síntesis de péptidos en fase sólida como está descrito en la literatura.

En la figura 6 se observa: a) En la parte superior, el perfil cromatográfico (HPLC-FR) obtenido para el péptido no modificado 1585 (MSP-1¹²⁸²⁻¹³⁰¹) luego de la elución de una muestra de material liofilizado y reconstituido en solvente A en las condiciones descritas en Materiales y Métodos; en la parte inferior aparece el espectro de masas (MALDI) correspondiente. b) El Pse-9473 (K₁₂₈₇-P₁₂₈₈). c) El Pse-9475 (P₁₂₈₈-L₁₂₈₉). Los valores expe-

rimentales de la masa molecular en cada caso correspondieron con el valor esperado.

Estudios de identificación y caracterización de los pseudopéptidos del fragmento MSP-1¹²⁸²⁻¹³⁰¹ de malaria

Asignación de los espectros 2D-RMN protónicos

Los "cross-peaks" entre HN y el protón CH α se identificaron por análisis de los espectros COSY obtenidos en TFED₃ al 30% en H₂O. Los espectros TOCSY se emplearon para correlacionar los sistemas de "spin" de las cadenas laterales con los

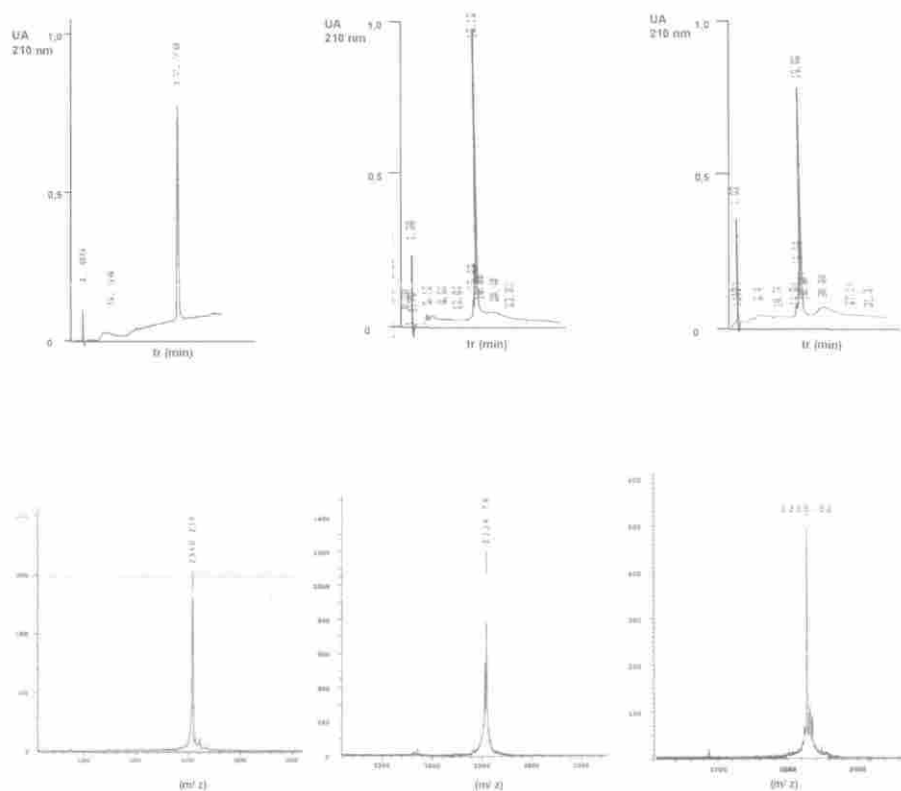


Figura 6. Caracterización e identificación de pseudopéptidos amida reducida de la proteína MSP-1.

“cross-peaks” NH-CH α . Para la asignación de estos sistemas se usó la estrategia propuesta por Wüthrich (12).

A partir de los espectros NOESY fue posible identificar las señales $d\alpha N(i, i+1)$ NOE de fuerte intensidad para la secuencia total de los pseudopéptidos. Los NOE vecinos en el espacio se detectaron debido a la presencia de las señales $d\alpha N(i, i+2)$; $d\alpha N(i, i+3)$; $d\alpha\beta(i, i+3)$ y $d\alpha N(i, i+4)$. Estas distancias secuenciales son la evidencia más im-

portante para la definición de las regiones α -helicales. Los datos muestran que existe una región helical entre los residuos V₁₁-Q₁₈ del Pse-9473 (Figuras 7a y 8b) y entre G₁₀-K₁₇ del Pse-9475 (Figuras 7b y 8c).

Los experimentos NOESY para ambos pseudopéptidos mostraron señales $d\alpha N(i, i+1)$ NOE fuertes para toda la molécula, que son característicos para cualquier secuencia peptídica (Figura 8a) y los NOE espaciales característicos de aminoácidos

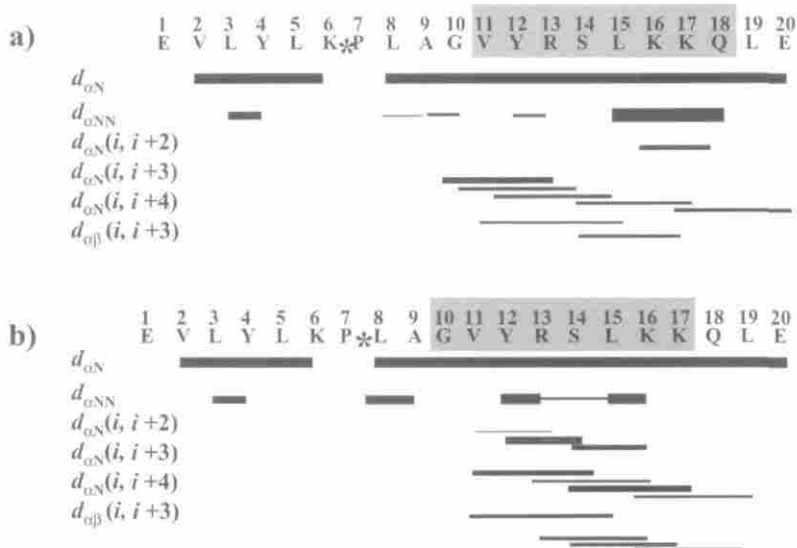


Figura 7. Resumen de las conectividades NOE para los pseudopéptidos amida reducida derivados del fragmento de la proteína MSP-1¹²⁸²⁻¹³⁰¹ (péptido 1585) del *P. falciparum*

vecinos en señales tipo $d_{\alpha N}(i, i+2)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ y $d_{\alpha N}(i, i+4)$. Los espectros NOESY de ambos pseudopéptidos mostraron “cross-peaks” fuertes en la región H_{α} - H_{β} , correspondiente a la interacción $H_{\alpha}K6 - H_{\delta}P7$. Este hallazgo indica una conformación preferencial *trans* producida durante el proceso de síntesis de ambos pseudopéptidos.

En la figura 7 se observa: a) Pseudopéptido Ψ -9473 (K_{1287} - P_{1288}). b) Ψ -9475 (P_{1288} - L_{1289}). Ambos fueron registrados en TFE al 30% a 295K. El asterisco indica el enlace modificado Ψ -[CH₂-NH] y la región ensombrecida corresponde a los elementos acordes con alpha helicoidalidad.

En la figura 8, se observa: a) Estructura tridimensional en solución, representativa del péptido no modificado

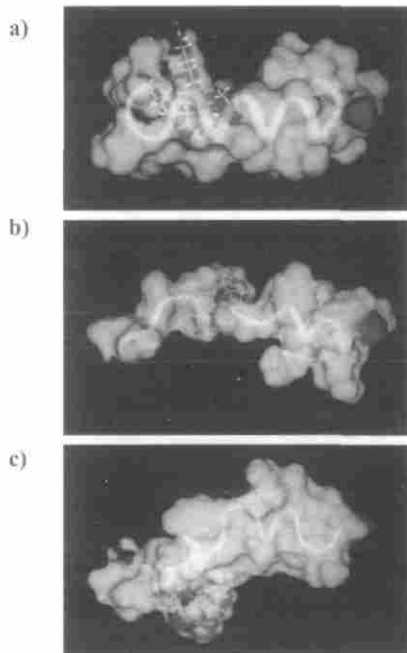


Figura 8. Relación entre la estructura 3D consenso entre el péptido no modificado 1585 (MSP-1¹²⁸²⁻¹³⁰¹) y sus dos análogos amida reducida Pse-9473 y Pse-9475

1585. b) Pseudopéptido $\Psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$ amida reducida Pse-9473. c) Pseudopéptido Pse-9475. El esqueleto peptídico de cada molécula se muestra en cinta color claro que indica la estructura molecular más representativa. La superficie accesible al agua de cada molécula se observa en transparencia.

Determinación estructural de pseudopéptidos

Luego de generar familias estructurales para cada una de las moléculas, se obtuvieron las estructuras consenso representativas para la estructura tridimensional de cada pseudopéptido, como se observa en la Figura 8. En ella se muestran las estructuras tridimensionales en solución, representativas del péptido no modificado 1585 en (a), del pseudopéptido $\Psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$ amida reducida Pse-9473 en (b), y del pseudopéptido Pse-9475 en (c). Cada estructura se caracteriza por tener el mínimo valor de energía posible y por cumplir con las restricciones de conformación permitidas. La introducción de un solo enlace isótero del tipo $\Psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$ amida reducida, no sólo indujo cambios estructurales fuertes en los análogos del péptido 1585 (MSP-1¹²⁸²⁻¹³⁰¹) sino que además, los dos nuevos grados de libertad debidos al grupo metileno al gobernar las propiedades conformacionales de este fragmento indujeron de manera sitio-dirigida nuevas propiedades inmunológicas a cada análogo (13).

CONCLUSIONES

En fase sólida se sintetizaron diferentes pseudopéptidos amida reducida derivados del fragmento de 42 kDa de la proteí-

na MSP-1 del *Plasmodium falciparum*. Tanto los análogos como el péptido nativo se caracterizaron por sus propiedades físicas y químicas mediante técnicas cromatográficas y espectrofotométricas de HPLC-FR, espectrometría de masas y RMN. Se identificaron plenamente los elementos de estructura secundaria para cada molécula mediante los análisis y el procesamiento computacional de los datos espectrales obtenidos y dinámica molecular restringida. La sustitución de un sólo enlace peptídico por un enlace $\Psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$ amida reducida produjo fuertes cambios estructurales en la conformación global de la molécula respecto a la no modificada y, de esta manera, se afectó el esqueleto peptídico de las mismas. Los datos aquí presentados, junto con los estudios sobre las propiedades biológicas de estas moléculas, permiten afirmar que la síntesis en fases líquida y sólida de este tipo de compuestos es factible arrojando rendimientos deseables en condiciones normales de laboratorio. Por sus propiedades químicas y físicas es posible pensar en la obtención de cantidades mucho mayores en escalas piloto e industrial hacia la obtención de nuevas moléculas candidatas a vacunas contra la malaria y otras enfermedades transmisibles.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Presidencia de la República de Colombia, a través del Ministerio de Protección Social. Agradecemos a la doctora Fabiola Espejo por permitirnos emplear para este trabajo la estructura tridimensional consenso del péptido no modificado 1585.

BIBLIOGRAFÍA

- Holder A.; Lockyer M. J.; Odink K. G. (1985). Primary structure of the precursor to the three major antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Nature* 317, 270-273.
- Urquiza M.; Rodríguez L.; Suárez J. et al. (1996). Identification *Plasmodium falciparum* MSP-1 peptides able to bind to human red blood cells. *Parasite Immunology* 18, 505-526.
- Guichard G.; Calbo S.; Muller S.; Kourilsky P.; Abastado J. P. (1995). Efficient binding of reduced peptide bond pseudopeptides to major histocompatibility complex class I molecule. *J. Biol. Chem.* 270, 26057-26064.
- Lozano J. M.; Espejo F.; Díaz D.; Salazar L. M.; Rodríguez J.; Pinzón C.; Calvo J. C.; Guzmán F.; Patarroyo M. E. (1998). Reduced amide pseudopeptide analogues of a malaria peptide possess secondary structural elements responsible for induction of functional antibodies which react with native proteins expressed in *Plasmodium falciparum* erythrocyte stages. *The Journal of Peptide Research* 52, (6):457-469.
- Merrifield R.B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149.
- Houghten R.A. (1985). General method for the rapid solid-phase peptide synthesis of the large number of peptides: specificity of antigen-antibody interactions of the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5131.
- Walgers R.; Lee T.; Cammers-Goodwin A. (1998). An indirect chaotropic mechanism for the stabilisation of helix conformation of peptides in aqueous trifluoroethanol and hexafluoro-2-propanol. *J. Am. Chem. Soc.* 12, 5073-5079.
- Piotto M.; Saudek K. V.; Sklenar V. (1992). Gradient tailored excitation for single quantum NMR spectroscopy of aqueous solution. *J. Biomol. NMR.* 2, 661-666.
- Rance M.; Sorensen O.; Bodenhausen G.; Wagner G.; Ernst R.; Wüthrich, K. (1983). Improved spectral resolution in COSY¹H-NMR spectra of proteins via Double Quantum Filtering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 479-485.
- Jeener J.; Meier B.; Backman P.; Ernst R. (1979). Investigation of enhance processes by two dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 71, 4546-4553.
- Plugariu C.; Stockner T.; Sterk H.; Haegenauer G. (1998). Conformational behaviour of the TraMheadpiece. *J. Peptide Res.* 51, 244-250.
- Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. 2nd edition. New York: Wiley and Sons, p. 207-215.
- Lozano J. M.; Alba M. P., Vanegas M.; Silva Y.; Torres-Castellanos J. L.; Patarroyo M. E. (2003). MSP-1 Malaria Pseudopeptide Analogs: Biological and Immunological Significance and Three-Dimensional Structure. *Biol. Chem.* 384, 71-82.