

Evaluación del efecto *in vitro* de anticuerpos inducidos por péptido-miméticos derivados del antígeno de superficie de merozoito-2 de *Plasmodium* en malaria causada por *Plasmodium yoelii* y *Plasmodium berghei* en ratones BALB/c

Liliana Patricia Lesmes¹, Gina Marcela Gallego^{2,3}, Luisa Fernanda Carreño^{1,2}, Johan Hoebeke⁴, José Manuel Lozano^{1,2,3}.

¹ Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

² Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), carrera 50 No. 26-20, Bogotá, D. C., Colombia.

³ Universidad del Rosario, Bogotá, D. C., Colombia.

⁴ UPR 9021, IBMC, CNRS, Universidad Louis Pasteur, Estrasburgo, Francia.

Correos electrónicos: jmlozanom@unal.edu.co, jm_lozano@fidic.org.co.

Recibido: 15 de septiembre de 2010.

Aceptado: 6 de noviembre de 2010.

RESUMEN

Con base en estudios realizados previamente en los cuales se identificaron los residuos críticos para la unión de la secuencia ²¹KNESKYSNTFINNAYNMSIR⁴⁰ del antígeno MSP-2 del *Plasmodium falciparum*, se diseñaron y sintetizaron dos secuencias de pseudopéptidos amida reducida en las cuales se sustituyó un enlace peptídico normal por su isómero ψ [CH₂-NH] entre los residuos fenilalanina-isoleucina y entre los residuos isoleucina-asparagina, para dar lugar a los análogos codificados ψ -128 (forma monomérica), ψ -129 (forma polimérica), ψ -130 (forma monomérica) y ψ -131 (forma polimérica). Con los péptido-miméticos obtenidos en forma de polímero se inmunizaron ratones BALB/c para generar anticuerpos monoclonales que presentaron isotipo IgM. Mediante ensayos controlados de inmunización *in vitro* se indujo el cambio isotipo de los clones reactivos aislados de los hibridomas obtenidos de manera reproducible. Las inmunoglobulinas aisladas se ensayaron por su capacidad funcional neutralizadora de la infección controlada *in vitro* de cepas de *Plasmodium* de roedores a glóbulos rojos. Los resultados obtenidos evidencian el

papel que pueden tener los anticuerpos inducidos por péptido-miméticos *Plasmodium* en ensayos de infección realizados en modelos animales de experimentación.

Palabras clave: péptido-mimético, anticuerpo, inmunización *in vitro*, actividad anti-*Plasmodium*.

SUMMARY

Assessment of the *in vitro* effect of antibodies induced by peptido-mimetics derived from the *Plasmodium* merozoite surface protein-2 in malaria caused by *P. berghei* and *P. yoelii* in BALB/c mice

Based on previous studies in which those residues being critical for *Plasmodium falciparum* binding to red blood cells (RBCs) through the antigenic sequence (²¹KNESKYSNTFINNAYNMSIR⁴⁰) from the merozoite surface antigen-2 (MSP-2) were identified, we have designed and synthesized two reduced amide pseudo peptide sequences based on the ³¹IN³² binding motif. Synthesized peptido-mimetics, possess each one a modified peptide bond that presented as a $\psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$ reduced amide isoster bond, to allowing the Phe-Ile modified amino acid pair allowing pseudo peptides coded ψ -128 (monomer form) and ψ -129 (polymer form) and the Ile-Asn modified amino acid pair for pseudo peptides coded ψ -130 (monomer form) and ψ -131 (polymer form). By using the polymer forms of both peptido-mimetics as immunogens, monoclonal antibodies were produced in BALB/c mice. These Ig showed an IgM isotype. The isotype antibody switching was lead by *in vitro* immunization of the original hybridomas. Isolated immunoglobulins were tested for their functional *in vitro* activity, on a infection controlled experiment of rodent *Plasmodium* strains infecting red blood cells. Obtained results reveal the role played by antibodies to peptido-mimetic in infection assays performed further on animal experimental models.

Key words: peptido-mimetic, antibody, *in vitro* immunization, anti-*Plasmodium* activity.

INTRODUCCIÓN

La malaria es la enfermedad parasitaria de mayor importancia para la salud mundial, es causada por una de las cinco especies del género *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y recientemente se describió el efecto del *P. knowlesi* como agente causal de infección por malaria en el humano (1). Históricamente, la malaria ha sido responsable de la muerte de más personas que ninguna otra enfermedad parasitaria y aún cuenta con altos índices de morbilidad y mortalidad (2). Se estima que más de 2,7 millones de personas, principalmente niños, mueren de malaria cada año, y una población de más de 2 billones vive en regiones endémicas para esta enfermedad (3). La malaria es el principal problema de salud pública de las regiones tropicales y subtropicales del mundo; pero debido a la resistencia a los insecticidas que viene presentando el vector transmisor (mosquitos del género *Anopheles*) y la expansión gradual de cepas del parásito resistentes a las drogas antimaláricas, esta infección se ha convertido en un problema global. Además, el fenómeno del calentamiento global afecta la distribución mundial de la malaria debido a la optimización de la transmisión endémica, incremento de la tasa de propagación en las regiones libres de la enfermedad y aumento en la densidad del mosquito vector (4, 5).

Igualmente, la malaria es un problema socioeconómico y de salud pública en regiones donde la enfermedad es endémica, ya que los países que la padecen presentan una baja tasa de crecimiento económico como consecuencia de numerosos factores, incluyendo efectos de la enfermedad sobre la fertilidad, crecimiento de la población, el ahorro y la inversión, la productividad del trabajador, ausentismo, mortalidad prematura y costos médicos (6).

En Colombia, que es uno de los países de América que presenta alta incidencia en malaria, en la última semana epidemiológica del 2010 se notificaron al sistema de vigilancia en salud pública (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud, un total de 199.107 casos, de los cuales, 1.411 fueron causados por malaria mixta, 32.664 por *P. falciparum*, 50 por *P. malariae*, 164.386 por *P. vivax*, 596 casos de malaria complicada y 23 muertes; las áreas de mayor riesgo incluyen la rivera baja del río Cauca, la costa pacífica, la rivera alta del río Sinú y el Urabá (7).

Por estas razones es necesario el desarrollo de una vacuna eficaz y alternativamente el desarrollo de nuevos métodos terapéuticos contra la malaria. En la consecución de estos objetivos, se han estudiado diversas proteínas del *Plasmodium falciparum*, entre las cuales se encuentra la proteína de superficie del merozoito MSP-2, también conocida como MSA-2 (8). Este antígeno de superficie de aproximadamente 30 kDa (9) a 45 kDa (10) está constituido por dos regiones genéticamente conservadas, una en el

extremo carboxi y una en el extremo amino, una región variable y dos regiones semi-conservadas en la región central, tal como se observa en la figura 1 (11).

Al realizar el análisis experimental mediante ensayos de unión de los péptidos derivados de la secuencia completa de la proteína MSP-2 a glóbulos rojos, se identificaron péptidos con alta afinidad de unión a los glóbulos rojos (de sus siglas en inglés *High activity binding peptides*, HABP), entre ellos la secuencia de aminoácidos del residuo 21 al 40, denominado 4044 (8). A este péptido se le identificaron los residuos críticos para la unión a glóbulos rojos y, basados en esta información, se sintetizaron dos nuevas secuencias en las cuales se modificaron los enlaces peptídicos con el propósito de evaluar posibles cambios en la estructura con la respuesta biológica frente a las ofrecidas por el péptido nativo 4044. En este trabajo se muestra el empleo de cuatro pseudopéptidos derivados del péptido 4044, a los cuales se les modificó en cada caso un solo enlace de origen natural tipo amida por un enlace modificado químicamente tipo amida reducida, con el objetivo de evaluar su papel frente a una infección por malaria murina *in vitro* e *in vivo*. Otro importante componente de este trabajo está constituido por los anticuerpos IgM e IgG de diferentes subclases y su efecto como potencial efecto anti-*Plasmodium in vitro*. Los péptido-miméticos diseñados de manera sitio-dirigida estimularon anticuerpos de isotipo IgM. Los hibridomas productores de estas inmunoglobulinas se inmunizaron *in vitro* para así inducir su cambio de isotipo. Estos clones fueron posteriormente caracterizados por su reactividad anti-*Plasmodium* y su efecto en un ensayo controlado demostró que inmunoglobulinas inducidas por estos péptido-miméticos específicamente inhibieron el desarrollo biológico de este patógeno, por lo que estas propiedades funcionales deberán comprobarse en ensayos *in vivo* para así poder inferir los posibles mecanismos moleculares involucrados en el efecto inmunoterapéutico de éstos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la modificación de los aminoácido-aldehídos y en la síntesis de los péptidos y pseudopéptidos se usaron L-aminoácidos protegidos en el amino α con el grupo t-Boc provenientes de Bachem (Torrance, CA, EE. UU.); (TBTU) *O*-(benzotriazol-1)-*N,N,N',N'*-tetrafluoroborato de tetrametiluronio, de Bachem (Torrance, CA, EE. UU.); éter etílico (Et_2O); acetato de etilo (EtOAc), n-hexano; trietil amina (TEA); e hidruro de litio y aluminio (Merck, Darmstadt, Alemania); diclorometano (DCM); y *N,N'*-dimetilformamida (DMF) (Panreac, Barcelona, España) y *O,N*-dimetil hidroxilamina-hidrocloreuro. Todos los solventes usados fueron grado analítico y el éter usado en la reducción se secó en el laboratorio por destilación con sodio metálico y bezofenona. Los solventes deuterados se obtuvieron de Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, EE. UU.).

Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina (TLC) se usó para monitorear la reacción de formación de la carboxamida, y para comparar por tiempo de retención el aminoácido con la carboxamida y el aminoaldehído; también fue útil para identificar impurezas en la reacción. El sistema de solventes usados para fenilalanina fue acetato de etilo: n-hexano (1:2) y para isoleucina fue acetato de etilo: n-hexano (1:1). El análisis se realizó por fluorescencia a longitud de onda corta UV (254 nm) o por reacción con ninhidrina.

Infrarrojo – transformada de Fourier (IR-TF)

Los espectros infrarrojos para todos los L-aminoácidos y sus derivados, se tomaron y se registraron en un espectrofotómetro Jasco FT/IR-460 plus (Tokio, Japón); las muestras se analizaron en una celda PIKE MIRacleTM AG ángulo de reflexión horizontal, ATR (Pike Technologies Madison, WI, EE. UU.).

Resonancia magnética nuclear de hidrógeno (¹H-RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno se obtuvieron y se registraron por disolución de 10 mg de suspensión oleosa o del material liofilizado en dimeilsulfóxido-D₆ (D, 99,9%) o cloroformo-D (D, 99,8%), y se realizaron 64 barridos en un espectrofotómetro Bruker DRX 500MHz a 300K (Darmstadt, Alemania).

Síntesis de péptido-miméticos del tipo amida reducida $\psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$

La síntesis de pseudopéptidos involucra síntesis orgánicas alternas, como lo es la reducción a aminoaldehído del aminoácido comprometido en el enlace modificado de la secuencia peptídica; la reducción de cada uno de los aminoácidos modificados usados en este trabajo se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por Fehrentz y Castro (12).

El procedimiento estándar para la reducción del grupo carbonilo del aminoácido involucra la síntesis de un intermediario (carboxamida), seguido de la reducción con LiAlH_4 sobre éter seco. Tal como lo describe la figura 2, esta síntesis tiene un rendimiento global cercano al 80% para la mayoría de los aminoácidos; a pesar de ser una síntesis bastante limpia y la cual presenta un bajo porcentaje de reacciones colaterales, se hace necesaria una caracterización tanto del aminoácido como de la carboxamida y del producto final; se empleó para la caracterización de nuestros compuestos técnicas analíticas como son, infrarrojo, ¹H-RMN, y cromatografía de capa fina (TLC).

Los resultados obtenidos de la caracterización para los aminoácidos modificados fenilalanina e isoleucina para la síntesis de los pseudopéptidos ψ -128 (F- $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]\text{-I}$), ψ -129 (F- $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]\text{-I}$, en forma polimérica), ψ -130 (I- $\psi\text{-}[\text{CH}_2\text{NH}]\text{-N}$) y ψ -131 (I- $\psi\text{-}[\text{CH}_2\text{NH}]\text{-N}$, en forma polimérica) se muestran a continuación.

La síntesis química de los cuatro pseudopéptidos se llevó a cabo empleando aminoácidos protegidos con el grupo t-Boc en el amino alfa, siguiendo el procedimiento de síntesis de péptidos en fase sólida descrito por Merrifield (13). El acople del aminoaldehído a la secuencia requiere unas condiciones de síntesis diferentes a las de un acople normal entre aminoácidos; es necesario mencionar que el tiempo de reacción de este acople es mayor al de un acople normal entre aminoácidos.

La reacción procede al disolver tres equivalentes del aminoaldehído en 2 mL de DMF/ácido acético al 1% y luego poner en contacto con la resina-péptido manteniendo agitación por un período de tres horas; terminado este tiempo, descartar la solución aminoaldehído/DMF y realizar lavados con DMF, IPA y DCM 3 mL de cada uno por un minuto. Preparar una solución de un equivalente de NaCNBH_3 en DMF/ácido acético al 1% y poner a reaccionar con ella la resina-péptido por una hora; finalizado este tiempo, se realizan los mismos lavados del paso anterior y se hace el test de ninhidrina; si el resultado es positivo (solución de color azul) se repite el procedimiento las veces que sea necesario hasta observar que aparentemente no hay grupos amino libres. Como ya se mencionó, esta reacción es un poco lenta, no es de extrañarse que se haga necesario repetir el acople aproximadamente cinco veces hasta obtener una reacción completa; sin embargo, no es recomendado dejar el acople períodos más largos a los sugeridos en este documento. Terminada la reacción de este acople, se desprotege el grupo amino y se continúa la síntesis de la forma tradicional.

Los pseudopéptidos utilizados para el estudio que se describe en este documento, son análogos a la secuencia del péptido denominado 4044, el cual corresponde —como ya se mencionó— a la región de aminoácidos 21 a 40 de la proteína MSP-2; en la tabla 1 se muestran dichas secuencias, sus respectivos códigos y caracterización.

Evaluación de afinidad relativa por BiaCore (resonancia plasmática de superficie) (11)

Las medidas se realizaron en un equipo Biacore-3000 (Uppsala, Suecia), el cual cuenta con un chip como sensor (CM5); se usaron los siguientes reactivos: EDC, NHS, etanolamina y como buffer de corrida se usó HBS-EP. Los péptidos 4044 y ψ -130 fueron inmovilizados en buffer acetato 10 mM pH 4,9 (100 $\mu\text{g/mL}$) a un flujo de 5 $\mu\text{L/min}$ por un período de 7 min; después se realizó la activación de CM5 vía grupos carbono carboxílicos con EDS y vía grupos amino con NHS por el mismo tiempo; luego de inmovilizados los péptidos, los canales se neutralizaron con etanolamina 1 M, pH 8, por 4 min con el mismo flujo. Los canales control son producidos por activación-desactivación en ausencia de péptido.

Los estudios de inhibición se realizaron manteniendo un flujo de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, en donde hubo una fase de asociación por 90 segundos, seguido de una fase de disociación por 60 segundos y una fase de regeneración por 30 segundos con 50 mM de HCl.

La concentración de anticuerpo monoclonal usada para la inmovilización del péptido 4044 fue de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la inmovilización de p130; las soluciones de IgM contenían concentraciones de péptido entre 42 y 0,164 μM y sin péptido para el control; los análisis se realizaron con ayuda del software sigma-plot.

Obtención de anticuerpos monoclonales anti- ψ -128 (129) y ψ -130 (131)

Las células del bazo de ratones BALB/c previamente inmunizados con los pseudo-péptidos ψ -129 y ψ -131, se fusionaron físicamente con células de la línea celular de mieloma murino X63Ag8, usando polietilenglicol 3000-3700 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos) de acuerdo con la metodología descrita anteriormente (11, 14), para obtener así hibridomas reactivos. Estos hibridomas se clonaron dos veces por dilución limitante. Después de una evaluación específica por ELISA y *Western blot*, los clones reactivos se expandieron en un volumen de cultivo mayor para la producción de estos anticuerpos a una escala mayor.

Cambio de isotipo por inmunización *in vitro* de hibridomas

Las células reactivas de los clones derivados de los pseudopéptidos ψ -129 y ψ -131 se distribuyeron de 100.000 células/pozo en una caja de 96 pozos de fondo plano, en medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 15%. Estas células se pulsaron cinco veces con 200 ng de su respectivo pseudopéptido inductor monómero (ψ -128 y ψ -130, respectivamente), diluido en RPMI 15% SFB a intervalos de ocho días por pulso. El cambio de isotipo se verificó a través del kit *monoclonal antibody isotyping* (HRP/ABTS) de Thermo Scientific (Rockford, IL, EE. UU.). Los sobrenadantes de los hibridomas productores de anticuerpos se recogieron periódicamente. Los anticuerpos presentes en los sobrenadantes provenientes del clon inducido por el ψ -128 (ψ -129) se codificaron como SN 6 y SN 7, y los anticuerpos de los sobrenadantes provenientes del clon inducido por el ψ -130 (ψ -131) se codificaron como SN: G, M, O y Q. Seguidamente se evaluó la reactividad de los anticuerpos presentes en cada uno de los sobrenadantes de los clones frente a lisado de *P. falciparum* cepa FCB2 por Western Blot.

Producción *in vivo* de anticuerpos monoclonales anti- ψ -129 y ψ -131

Con el objetivo de producir anticuerpos específicos en mayor cantidad, se empleó la estrategia de producción *in vivo* por inoculación vía intraperitoneal (ip) de los clones en ratones BALB/c para generar fluidos ascíticos. Para obtener este fluido ascítico enri-

quecido en anticuerpos monoclonales, la cavidad peritoneal de los ratones se irritó por inyección vía ip con 500 μ L de pristano (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EE. UU.). Ocho días después, a cada animal se le administró por la misma vía, 500 μ L de los clones celulares derivados de Ψ -129 y Ψ -131 (1.000.000 células) suspendidos en medio RPMI incompleto. Luego de ocho días, se recogió el fluido ascítico por punción abdominal; este fluido se centrifugó a 800 rpm durante 5 min, se inactivó y deslipidificó (11) para continuar con la purificación de los anticuerpos.

Purificación de inmunoglobulinas (Igs)

Los sobrenadantes provenientes de cultivo celular o de los fluidos ascíticos se sometieron a tratamiento con una solución saturada de sulfato de amonio al 80% para sedimentar la proteína presente en ellos. Posteriormente al proceso de centrifugación, los sobrenadantes se separaron cuidadosamente y el precipitado se reconstituyó en buffer Tris-HCl 10 mM pH 8,0; luego se dializó contra este mismo buffer empleando una membrana Spectra-pore® dialysis de 3500 MWCO (Houston, Texas, EE. UU.) a 4 °C. Después, los precipitados enriquecidos con anticuerpos y dializados se sometieron a cromatografía de intercambio aniónico débil usando DEAE-Sephadex A-25 resina (Pharmacia, Uppsala, Suecia) previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 empacada en una columna de vidrio de 50 mL. Sobre esta columna se sirvió la solución enriquecida en anticuerpo para permitir así su interacción con la resina. Posteriormente, las inmunoglobulinas se eluyeron de la columna por incremento progresivo en la fuerza iónica del buffer desde 50 mM, 100 mM y 500 mM de NaCl. Un total de cuatro volúmenes de columna (250 mL) se adicionó por paso, colectando fracciones de 10 mL a un flujo constante de 0,5 mL/min. La resina se reequilibró con buffer 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Todas las fracciones se caracterizaron por ensayos de reactividad Dot Blot directo para detección de inmunoglobulinas. Las fracciones reactivas se mezclaron en grupos o *pools* con base en tres criterios: su semejante perfil electroforético, su reactividad específica en ensayos de Dot Blot y en su contenido comparable en proteína total de acuerdo con el ensayo colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA). Estos grupos de fracciones se dializaron contra PBS pH 7,2 a 4 °C. La pureza de cada *pool* de fracciones se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y *Western blot* (15).

Estandarización de modelos de infección con malaria por *P. yoelii* y *P. berghei* en ratones BALB/c

Con el objetivo de establecer infección de malaria *in vivo* en ratones BALB/c (obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia), se descongelaron y activaron cepas de *P. yoelii* 17XL y *P. berghei* ANKA crio-preservadas en solución de Krebs (NaCl 0,85%, glucosa 5%, sorbitol 4,2% p/v).

Para ello se realizaron tres lavados con RPMI incompleto a 2.500 rpm durante 10 min y finalmente se administraron por vía intraperitoneal a tres ratones hembras de la cepa BALB/c de cinco semanas de edad, una cantidad definida de parásito resuspendido en 500 μ L de RPMI incompleto. A partir del sexto día de la posinfección, se evaluó la parasitemia diariamente con tinción de *Wright* en extendidos de sangre periférica. Una vez comprobados los niveles de parasitemia entre el 20% y 50%, se realizó un pase *in vivo* por administración ip de 1×10^5 glóbulos rojos parasitados para mantener así la viabilidad de la cepa del *Plasmodium* en estudio antes de ser empleada para los ensayos de infección controlada *in vitro*.

Para realizar el cultivo *in vitro* de estas cepas de malaria murina, se permitió que los ratones infectados alcanzaran niveles de parasitemia del 10%. Para la identificación del parásito, se realizó el recuento de glóbulos rojos parasitados en una cámara de Neubauer con tinción de naranja de acridina.

Actividad *in vitro* anti-*Plasmodium* de inmunoglobulinas inducidas por péptido-miméticos

Dada la importancia de tener modelos de infección *in vitro* de cepas de *Plasmodium* tanto humanas como de otras especies (roedores), el poder mantener en cultivo por períodos superiores a los diez días este tipo de patógenos parasitarios, motivó este trabajo el abordaje de esta problemática y, en consecuencia, se logró establecer eficientemente dos cultivos de cepas de *Plasmodium berghei* y *Plasmodium yoelii*.

Para ello, se efectuó una adaptación de condiciones estándar para el crecimiento *in vitro* *P. yoelii* y *P. berghei* (16-19). Por tanto, se tomaron 500 μ L de sangre de ratón infectado con parasitemia entre 7-10% en PBS - 0,1% citrato de sodio. Luego se centrifugó a 800 rpm durante 10 min. Se hicieron dos lavados con RPMI incompleto 0,1% citrato de sodio. Asépticamente, se adicionó al sedimento 2,5 mL de medio RPMI completo (20% de SFB, gentamicina 5 mg/mL, antibiótico antimicótico 1%). En cajas de cultivo celular de 24 pozos se adicionó a cada pozo 400 μ L de medio completo, 500 μ L de anticuerpos o controles y, finalmente, 100 μ L de glóbulos rojos parasitados o glóbulos rojos sanos, para un volumen final de 1.000 μ L/pozo. Se emplearon como controles de ensayo glóbulos rojos sanos, glóbulos rojos parasitados, cloroquina $2,83 \times 10^{-3}$ mM y EGTA 55,55 mM. Cada muestra se evaluó por duplicado. Este ensayo se incubó por 15 horas a 37 °C en cámara de gases suplementada con 90% N₂, 5% CO₂, 5% O₂. En los días 1, 4, 7, 10 y 14, se preparó una mezcla de 500 μ L de GR sanos y 7 mL de medio completo con el fin de adicionar 300 μ L de esta mezcla a cada uno de los pozos. Se evaluaron los porcentajes de parasitemia a diario a partir del segundo día por recuento en cámara de Neubauer con naranja de acridina, en una dilución 1/500. Por no existir evidencia previa a este trabajo, en este tipo de ensayos no se emplea otro tipo de contro-

les, como los anticuerpos monoclonales inducidos por otros antígenos con capacidad inhibitoria de la infección.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño, síntesis y caracterización estructural del péptido de alta unión 4044 del antígeno MSP-2 y de sus péptido-miméticos de tipo amida reducida

Como se observa en la figura 1, el péptido codificado como 4044 se ubica en el bloque 1 conservado genéticamente de la región amino terminal de la secuencia del antígeno MSP-2. El motivo de unión a glóbulos rojos definido por el par de residuos $^{30}\text{I-N}^{31}$ sirvió como base para el diseño para la sustitución sitio-dirigida de un solo enlace peptídico a la vez por el isómero $\Psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$, para dar lugar a los pseudopéptidos Ψ -128 (F-I) y Ψ -130 (I-N) y a sus correspondientes formas poliméricas Ψ -129 y Ψ -131, respectivamente.

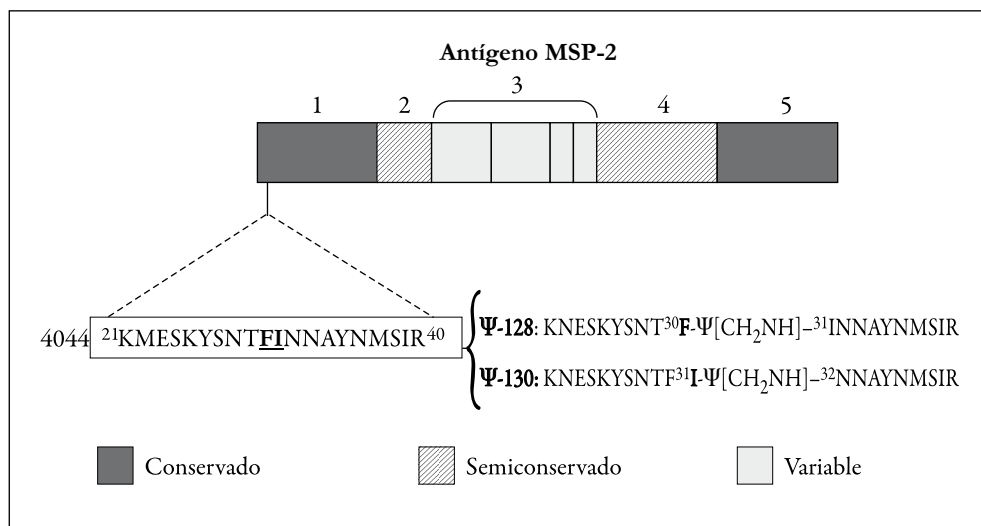


Figura 1. Organización estructural de la proteína MSP-2 y localización del péptido 4044. Los bloques de colores representan el polimorfismo de las distintas regiones de la proteína con base en su análisis genético. Se destaca el origen de la secuencia 4044 y se subrayan los residuos críticos de unión a los glóbulos rojos, así como el diseño de los péptido-miméticos denominados Ψ -128 y Ψ -130.

En la figura 2 se esquematiza el proceso sintético de transformación del aminoácido comercial fenilalanina Boc-L-Phe-OH hasta su forma aminoácido aldehído Boc-L-

Phe-H. Esta estrategia de dos etapas incluye la derivatización de compuesto (1) a su forma carboxamida (2) para proteger al carbono carbonílico del aminoácido el cual luego se trata con un agente reductor fuerte, el hidruro de litio y aluminio para dar lugar a la formación de un anillo parcial de cinco miembros que incluye al litio, el cual es posteriormente hidrolizado para generar la forma aldehído del aminoácido (3). Este proceso tiene un rendimiento global del 60-70% cuando se realiza con cualquier aminoácido, exceptuando los aminoácidos asparagina y glutamina (Asn y Gln), los cuales deben tratarse de manera diferente.

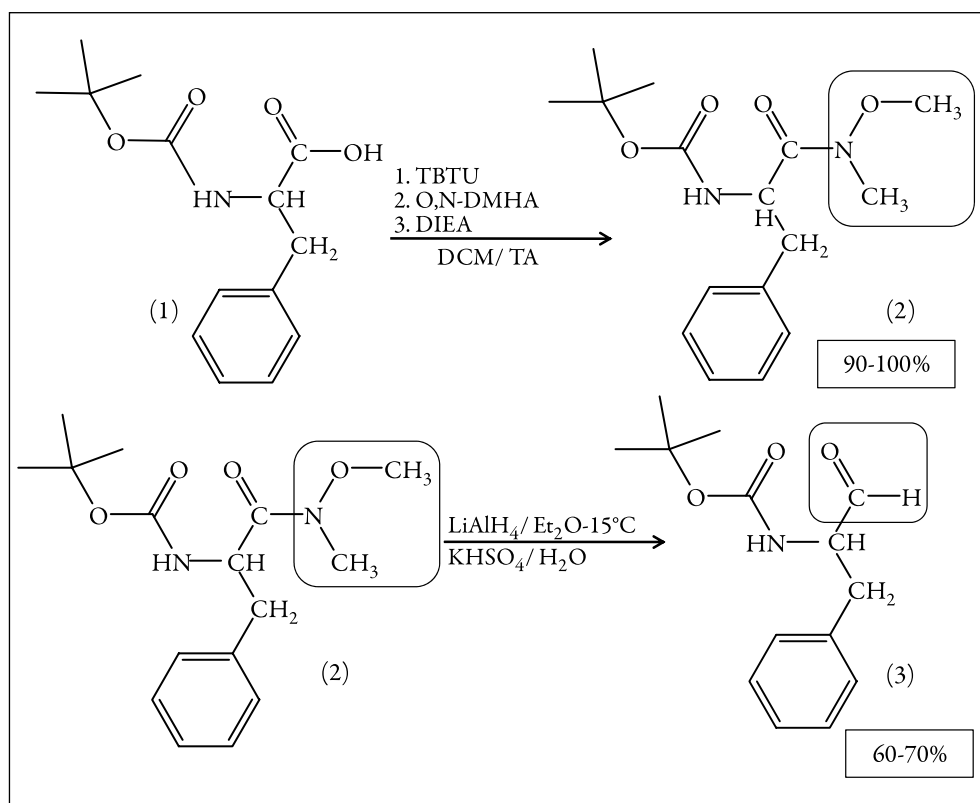


Figura 2. Derivatización de fenilalanina e isoleucina para la obtención de sus correspondientes t-Boc-L-aminoácido-aldehídos. (1) es el aminoácido comercial protegido en su función amino primario con el grupo t-Boc (*tert*-butiloxicarbonilo). (2) es el derivado carboxamida obtenido por condensación de *O,N*-dimetilhidroxilamina con el aminoácido (1) activado en su función de ácido carboxílico. (3) es la molécula objetivo t-Boc-L-aminoácido-aldehído obtenido por reducción selectiva de (2) con LiAlH_4 e hidrolizado con KHSO_4 1M.

Caracterización espectroscópica de aminoácido-aldehídos

Derivados de Boc-L-Phe

Boc-L-Phe-OH, Rf = 0,40 acetato de etilo: n-hexano (1:2).

¹H-NMR [dimetilsulfóxido-D6 (D, 99,9%)]: δ = 1,42 ppm (9H, C(CH₃)); δ = 2,66 ppm (2H, Hβ); δ = 5,76 ppm (1H, Hα); δ = 7,17 ppm (2H, H2-6-anillo); δ = 7,22 ppm (2H, H3-5-anillo); δ = 7,23 ppm (2H, H4-anillo); δ = 7,28 ppm (1H, NHα); δ = 2,5 ppm (m, 6H, dimetilsulfóxido).

FT-IR (sólido amorfo): ν(cm⁻¹) = 3.299,14, 3.246,12, 2.974,23, 1.707,43, 1.644,67, 1.496,54, 1.405,60, 1.359,34, 1.272,23, 1.156,45, 774,09.

Boc-L-Phe-N(CH₃)OCH₃, Rf = 0,50 acetato de etilo: n-hexano (1:2).

¹H-NMR [dimetilsulfóxido-D6 (D, 99,9%)]: δ = 1,39 ppm (9H, C(CH₃)); δ = 2,81 ppm (2H, Hβ); δ = 3,18 ppm (3H, N-(CH₃)); δ = 3,65 ppm (3H, N-O-(CH₃)); δ = 5,25 ppm (1H, Hα); δ = 7,19 ppm (2H, H2-6-anillo); δ = 7,24 ppm (2H, H3-5-anillo); δ = 7,25 ppm (2H, H4-anillo); δ = 7,28 ppm (1H, NHα); δ = 2,5 ppm (m, 6H, dimetilsulfóxido).

FT-IR (película oleosa): ν(cm⁻¹) = 3.299,14, 3.246,12, 2.974,23, 1.894,98, 1.657,14, 1.644,67, 1.496,54, 1.405,60, 1.359,34, 1.272,23, 1.156,45, 774,09.

Boc-L-Phe-H, Rf = 0,69 acetato de etilo: n-hexano (1:2).

¹H-NMR [dimetilsulfóxido-D6 (D, 99,9%)]: δ = 1,48 ppm (9H, C(CH₃)); δ = 2,81 ppm (2H, Hβ); δ = 5,01 ppm (1H, Hα); δ = 7,17 ppm (2H, H2-6-anillo); δ = 7,23 ppm (2H, H3-5-anillo); δ = 7,25 ppm (2H, H4-anillo); δ = 7,32 ppm (1H, NHα); δ = 9,63 ppm (1H, formilo); δ = 2,5 ppm (m, 6H, dimetilsulfóxido).

FT-IR (película oleosa): ν(cm⁻¹) = 3.360,43, 3.246,12, 2.974,23, 1.677,05, 1.644,67, 1.496,54, 1.405,60, 1.359,34, 1.272,23, 1.156,45, 774,09.

Derivados de Boc-L-Ile

Boc-L-Ile-OH, Rf = 0,66 acetato de etilo: n-hexano (1:1).

¹H-NMR [dimetilsulfóxido-D6 (D, 99,9%)]: δ = 0,94 ppm (3H, Hγ); δ = 0,97 ppm (3H, Hδ); δ = 1,20 ppm (2H, Hγ); δ = 1,45 ppm (9H, C(CH₃)); δ = 1,92 ppm (1H, Hβ); δ = 4,29 ppm (1H, Hα); δ = 7,25 ppm (1H, NHα); δ = 2,5 ppm (m, 6H, dimetilsulfóxido).

FT-IR (sólido amorfo): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3.352,65, 3.299,24, 2.963,19, 1.726,67, 1.699,54, 1.673,08, 1.530,43, 1.451,60, 1.412,79, 1.299,21, 1.160,34, 1.016,01, 776,44.

Boc-L-Ile-N(CH₃)OCH₃, Rf = 0,54 acetato de etilo: n-hexano (1:1).

¹H-NMR [dimetilsulfóxido-D6 (D, 99,9%)]: δ = 0,89 ppm (3H, H γ); δ = 0,93 ppm (3H, H δ); δ = 1,12 ppm (2H, H γ); δ = 1,43 ppm (9H, C(CH₃)); δ = 2,80 ppm (1H, H β); δ = 3,21 ppm (3H, N-(CH₃)); δ = 3,78 ppm (3H, N-O-(CH₃)); δ = 4,61 ppm (1H, H α); δ = 7,25 ppm (1H, NH α); δ = 2,5 ppm (m, 6H, dimetilsulfóxido).

FT-IR (polvo): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3.352,65, 3.299,24, 2.963,19, 1.699,54, 1.688,14, 1.654,77, 1.530,43, 1.451,60, 1.412,79, 1.299,21, 1.160,34, 1.016,01, 776,44.

Boc-L-Ile-H, Rf = 0,58 acetato de etilo: n-hexano (1:1).

¹H-NMR [dimetilsulfóxido-D6 (D, 99,9%)]: δ = 0,91 ppm (3H, H γ); δ = 0,94 ppm (3H, H δ); δ = 0,96 ppm (2H, H γ); δ = 1,45 ppm (9H, C(CH₃)); δ = 2,03 ppm (1H, H β); δ = 4,37 ppm (1H, H α); δ = 7,25 ppm (1H, NH α); δ = 9,66 ppm (1H, formilo); δ = 2,5 ppm (m, 6H, dimetilsulfóxido).

FT-IR (película oleosa): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 2.963,21, 1.693,09, 1.530,43, 1.451,60, 1.412,79, 1.299,21, 1.160,34, 1.016,01, 776,44.

En un proceso sintético realizado en fase sólida, el sintón (3) se incorpora a la cadena peptídica creciente *in situ*, para luego someterse a una segunda reducción en condiciones más suaves con cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃), para dar así lugar a los péptido-miméticos objetivo, tal como se ilustra en la figura 3. En *A* se esquematiza la secuencia del péptido-mimético ψ -128 y en *B* la del ψ -129 obtenidas mediante los procedimientos en fase sólida descritos. En la tabla 1 se pueden observar las características fisicoquímicas de las moléculas producidas para este estudio; es decir, el péptido nativo 4044 y sus análogos pseudopeptídicos en sus formas de monómero y polímero. Todas ellas reunieron las cualidades moleculares físicas y bioquímicas adecuadas para la realización de los experimentos inmunológicos.

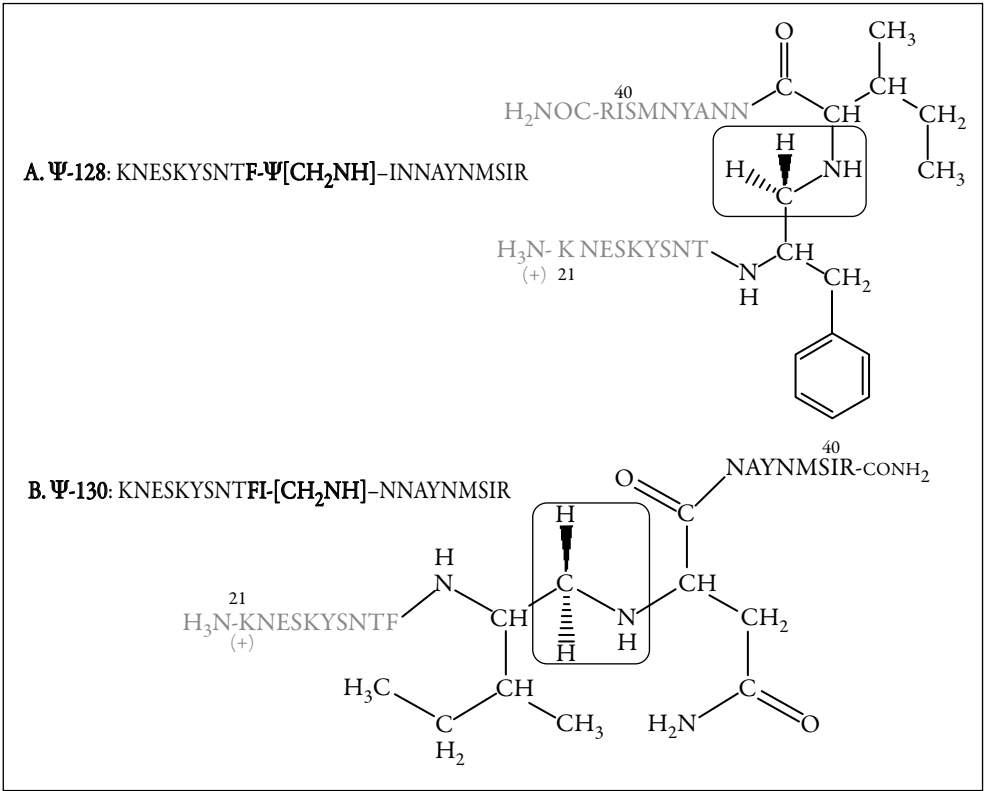


Figura 3. Síntesis en fase sólida de péptido-miméticos derivados del antígeno de malaria MSP-2. A. Péptido-mimético Ψ -128; B. Péptido-mimético Ψ -130.

Tabla 1. Características físicas y químicas del péptido MSP-2²¹⁻⁴⁰ y sus pseudopéptidos análogos.

Código	Secuencia de aminoácidos	PM esperado (Da)	Masa experimental m/z(uma)
4044	²¹ KNESKYSNTFINNAYNUSIR ⁴⁰	2.388,01	2.386,05
4306	CGKNESKYSNTFINNAYNMSIRGC	2.715,50	2.713,13
Ψ -128	KNESKYSNTF- Ψ [CH ₂ NH]-INNAYNMSIR	2.379,14	2.380,03
Ψ -129	CGKNESKYSNTF- Ψ [CH ₂ NH]-INNAYNMSIRGC	2.706,64	2.710,31
Ψ -130	KNESKYSNTFI- Ψ [CH ₂ NH]-NNAYNMSIR	2.379,14	2.380,09
Ψ -131	CGKNESKYSNTFI- Ψ [CH ₂ NH]-NNAYNMSIRGC	2.706,64	2.704,26

Seguidamente, este nuevo grupo de moléculas se caracterizó en cuanto a la presencia de elementos de estructura secundaria, mediante la técnica de dicroísmo circular (DC). El resultado de este análisis se observa en la figura 4, en la cual se muestran los perfiles obtenidos tanto para el péptido nativo no modificado 4044, como para sus análogos pseudopeptídicos Ψ -128 y Ψ -130 junto con sus correspondientes formas poliméricas Ψ -129 y Ψ -131, respectivamente. Como se puede observar, el péptido nativo 4044 y sus análogos presentan algunos rasgos estructurales propios de las hélices- α . Esto se evidencia por la presencia de dos valores mínimos de elipticidad molar en 208 nm y 222 nm, respectivamente; pero a la vez presentan rasgos de elementos estructurales más extendidos tipo hebra- β , evidenciando la presencia de un solo mínimo en 218 nm, además de regiones carentes de estructura. Por tanto, la preferencia estructural de estas moléculas es intermedia entre una hélice distorsionada y una hebra beta no estabilizada.

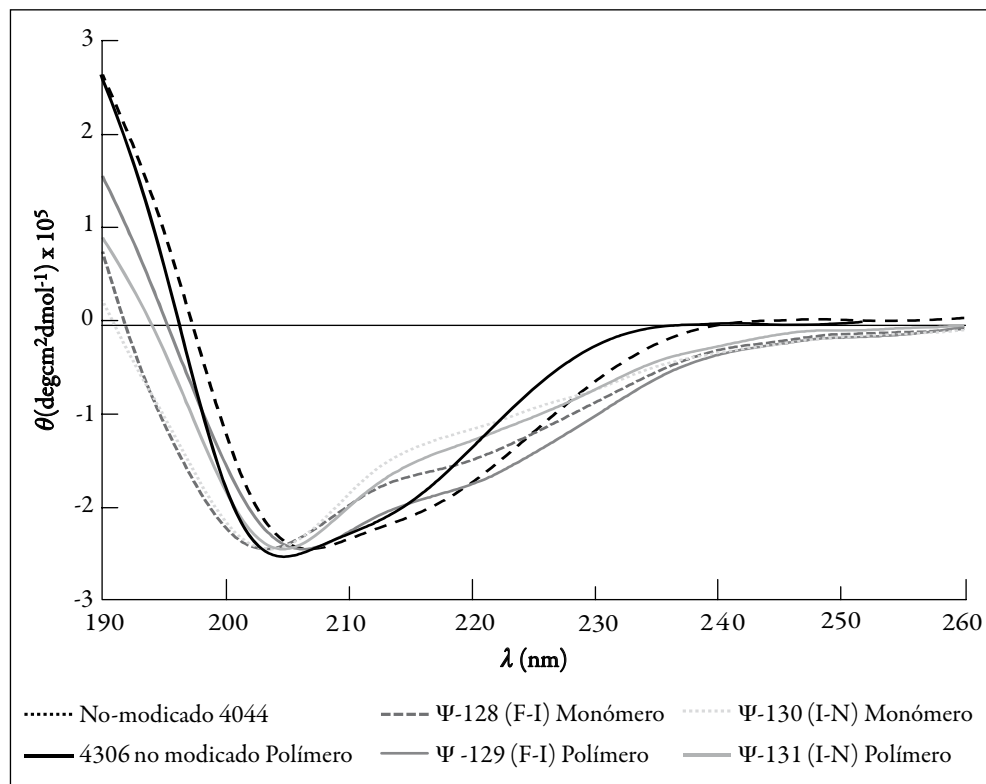


Figura 4. Caracterización de elementos de estructura secundaria de las moléculas en estudio por dicroísmo circular (DC). Efecto de la modificación Ψ -[CH₂NH] sobre el patrón de estructura secundaria del péptido MSP-2²¹⁻⁴⁰ (péptido nativo 4044) y sus análogos péptido-miméticos Ψ -128 y Ψ -130, así como sus formas poliméricas Ψ -129 y Ψ -131, respectivamente.

Producción de anticuerpos monoclonales contra los péptido-miméticos

Seguidamente se procedió a la producción de anticuerpos monoclonales inducidos por los péptido-miméticos Ψ -128 y Ψ -130. Se generó un grupo de hibridomas que en principio presentaron el isotipo pentavalente IgM. Estos hibridomas productores de inmunoglobulinas IgM sirvieron de base para realizar experimentos de inmunización *in vitro* para inducir el cambio de isotipos a formas de anticuerpos más simples pero con propiedades funcionales comparables o superiores a la inicial. Estas células inducidas se clonaron por dilución limitante.

En la tabla 2 se muestran los principales resultados obtenidos mediante este procedimiento y su versatilidad al inducir el cambio drástico de isotipos de IgM a IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, cuya actividad neutralizante de la infección por malaria fue evidente.

Tabla 2. Cambio de isotipo de los clones inducidos pos los pseudopéptidos Ψ -128 y Ψ -130 derivados del antígeno MSP-2²¹⁻⁴⁰ 4044.

Monó- mero	Polí- mero		isotipo inicial de hibridomas					Cambio de isotipo <i>in vitro</i> — aislamiento de inmunoglobulina					
		Clon	IgG1 %	IgG2a %	IgG2b %	IgG3 %	IgM %	Fracciones eluidas (fuerza iónica) mM	IgG1 %	IgG2a %	IgG2b %	IgG3 %	IgM %
Ψ-128	Ψ-129	6	0,00	0,00	0,00	5,70	94,30	50	6,00	13,80	11,86	62,53	5,78
								100	3,59	12,57	11,93	65,04	6,82
								500	4,10	15,30	8,39	61,30	10,85
		7	0,00	0,00	2,95	40,60	56,30	50	16,08	14,31	42,87	10,42	16,31
								100	17,28	17,87	36,93	13,15	14,77
								500	20,22	22,45	24,30	15,40	17,62
Ψ-130	Ψ-131	G	1,70	0,23	0,59	3,52	97,65	50	8,02	5,96	3,91	0,28	81,84
		M	1,25	0,00	0,33	1,95	96,50						
		O	0,16	0,00	0,23	1,88	97,70	100	6,08	9,23	7,45	0,025	77,22
		Q	0,00	0,00	0,18	5,30	94,50	500	3,52	2,39	1,81	0,00	92,28

Por otra parte, la versatilidad de este procedimiento de inducción del cambio del isotipo IgM a otros isotipos como IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, permitió obtener clones celulares definidos hacia formas reactivas de inmunoglobulinas con propiedades neutralizadoras de la infección controlada de cepas murinas de malaria en los ensayos en cultivo celular. Como se observa en la tabla 2, los porcentajes de conversión fueron superiores

al 60% para el clon inducido por el pseudopéptido Ψ -128 (Ψ -129) e inferiores al 10% para los clones generados por el pseudopéptido Ψ -130 (Ψ -131). Aunque en el segundo de los casos los porcentajes de conversión fueron relativamente bajos, inferiores al 10%, es evidente que el procedimiento de inducción de cambio es eficiente y potencialmente aplicable y susceptible de ser escalonado a niveles biotecnológicos.

Establecimiento de modelos de infección por malaria *in vitro*

La morfología propia de eritrocitos de ratones BALB/c infectados con las cepas de malaria de roedores *Plasmodium yoelii* 17XL y *Plasmodium berghei* ANKA, permitió controlar y caracterizar el ciclo eritrocítico de estas dos entidades por la presencia de los estadios sanguíneos del parásito, como la morfología de anillo, el trofozoito y el esquizonte maduro del parásito de la malaria de roedores. En condiciones controladas se logró mantener cada cultivo celular en etapas temporales hasta de un mes en ambos casos. Para realizar el ensayo de infección *in vitro*, se tomaron muestras de sangre de un ratón efectivamente infectado con la cepa del *Plasmodium* correspondiente y se establecieron ensayos de infección por duplicado tanto para los grupos control como para las muestras en estudio.

Una vez se logró establecer los modelos de infección en cultivo controlado *in vitro* y en ratones hembras de la cepa BALB/c *in vivo*, se procedió a realizar la evaluación de la actividad funcional de anticuerpos monoclonales inducidos por los péptido-miméticos derivados de la secuencia del péptido nativo 4044.

Los estudios para evaluar la actividad antiplasmodio *in vitro* realizados en cultivo controlado, demostraron un efecto neutralizador de la infección por malaria en ensayos por duplicado. En todos los casos, los porcentajes de parasitemia fueron inferiores a los manejados por el experimento control de infección normal en los glóbulos rojos parasitados con la cepa de *P. berghei*, tal como se observa en la figura 5A, luego de dos desafíos experimentales. El pico de parasitemia observado hacia el día 10, se debe al efecto del segundo desafío *in vitro* (véase figura 5).

La cepa de *P. yoelii* fue menos virulenta que en los ensayos *in vitro*, tal como se observa en la figura 5B. Todos los grupos administrados con anticuerpos controlaron mejor los niveles de parasitemia a excepción del grupo tratado con EGTA.

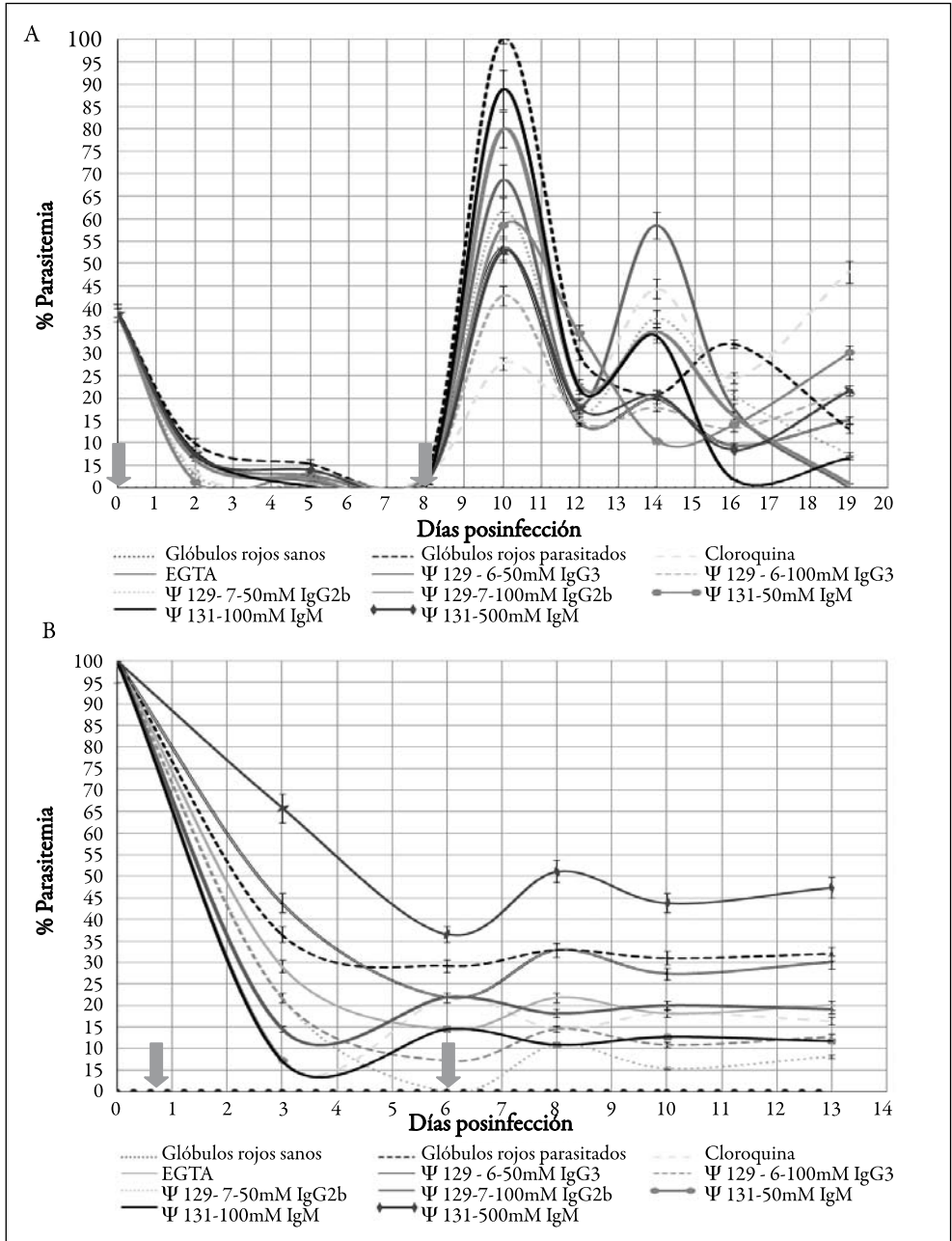


Figura 5. Actividad anti-*Plasmodium* *in vitro* de anticuerpos inducidos por los ψ-129 y ψ-131 derivados del antígeno MSP-2. A. Perfil de parasitemia de glóbulos rojos infectados con *P. berghei*; B. Perfil de parasitemia de glóbulos rojos infectados con *P. yoelii*. Las flechas indican los días en que se efectuó la infección experimental. La desviación estándar (SD) de ensayos por duplicado.

Dadas las evidencias funcionales de las inmunoglobulinas inducidas por los péptido-miméticos, se decidió realizar estudios fisicoquímicos para evaluar la afinidad del anticuerpo original IgM inducido por el pseudopéptido Ψ -128 (Ψ -129), gracias a la colaboración del laboratorio de inmunoquímica de péptidos de la Universidad Louis Pasteur en Estrasburgo, Francia.

Afinidad del anticuerpo monoclonal primario IgM inducido por el péptido-mimético Ψ -130

Debido a la multivalencia del anticuerpo monoclonal de isotipo IgM, se decidió estudiar la afinidad de éste, tanto por el péptido nativo 4044 como por uno de su péptido-mimético inductor Ψ -130, mediante un ensayo de inhibición de la unión del anticuerpo por cada uno de ellos. Así, tanto el péptido como el péptido-mimético se inmovilizaron sobre las placas de los *chips* del equipo BiaCore a una densidad alta de 10,3 ng/mm² para el péptido 4044 y 3,1 ng/mm² para el péptido-mimético Ψ -130. En estas condiciones, la velocidad de asociación se define básicamente por transferencia de masa y, en consecuencia, por la cantidad de sitios libres del analito que quedan en la solución. Esto permitió una estimación precisa de la constante de inhibición K_i del péptido. Como se muestra en la figura 6, el anticuerpo monoclonal IgM tuvo aproximadamente la misma afinidad tanto para el péptido nativo 4044 ($0,39 \pm 0,04 \mu\text{M}$) como para el pseudopéptido Ψ -130 ($0,94 \pm 0,12 \mu\text{M}$). Las constantes de inhibición heterólogas fueron $1,98 \pm 0,16 \mu\text{M}$ para el pseudopéptido y $1,27 \pm 0,04 \mu\text{M}$ para el péptido natural. Es importante señalar que la afinidad de la IgM parece ser menor por su inductor Ψ -130 (^{31}I -N 32) que por el péptido nativo no modificado 4044, lo cual demostró que este anticuerpo reconoce y se adapta con facilidad a la estructura 3D del péptido original.

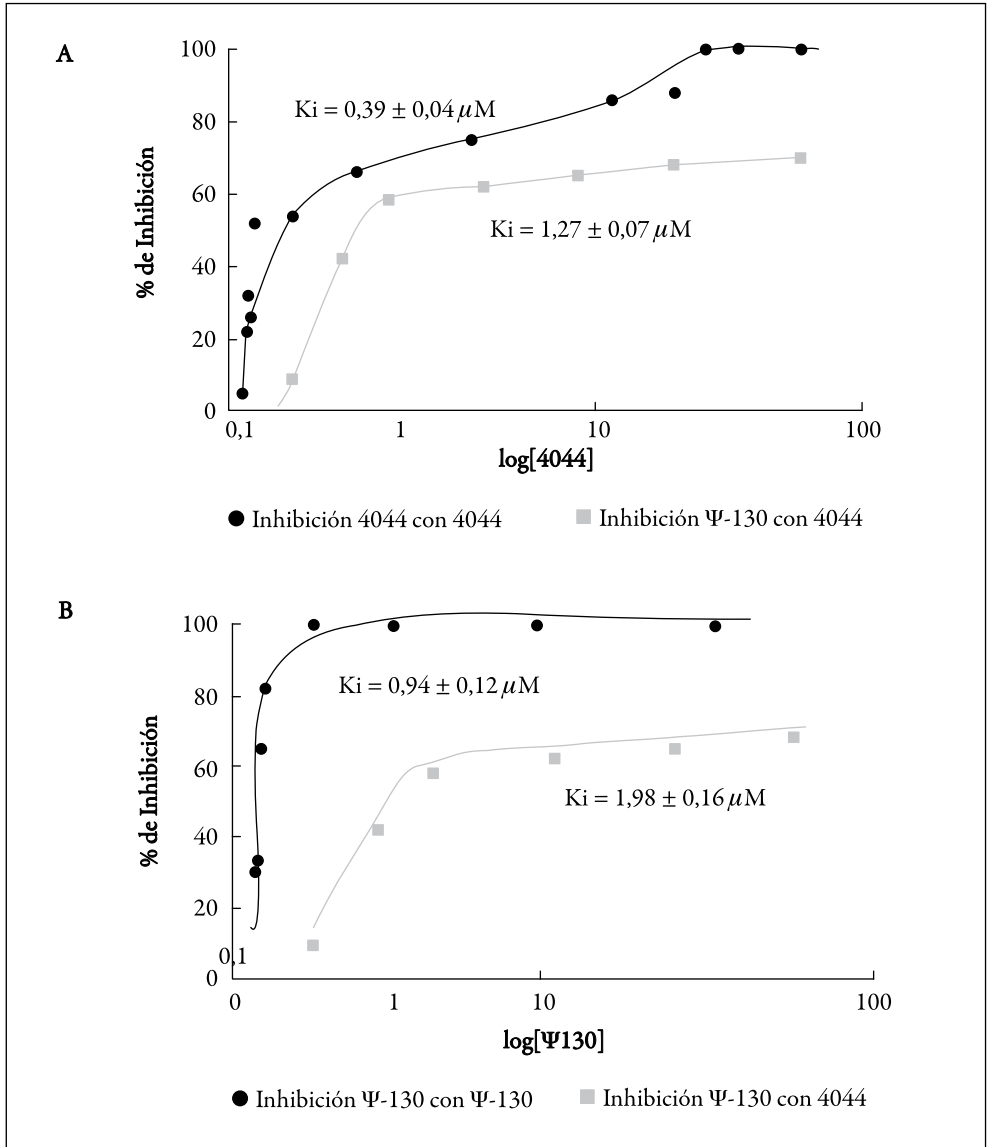


Figura 6. Interacción del anticuerpo monoclonal IgM inducido por el pseudopéptido Ψ -130. A. Inhibición de la unión IgM- Ψ -130 por el pseudopéptido Ψ -130 y de la unión IgM-4044 por el péptido nativo 4044 no modificado, representado en línea punteada; B. Unión del péptido 4044-IgM y su inhibición por el pseudopéptido Ψ -130.

CONCLUSIÓN

Las evidencias obtenidas en este estudio acerca de la funcionalidad *in vitro* de anticuerpos inducidos por pseudopéptidos diseñados de manera sitio-dirigida, permiten proponer a estos péptido-miméticos del tipo amida reducida como potenciales componentes candidatos a una formulación de una vacuna de subunidades contra la malaria. Este tipo de acercamiento experimental, tomando como base éste y otros antígenos de superficie del *Plasmodium*, permitirá evaluar más extensamente los datos reportados en este trabajo así como también sus propiedades *in vivo*. En consecuencia, la aplicación e implementación de modelos de infección *in vitro* de malaria de especies como roedores, aves y primates no humanos, constituye una valiosa herramienta para el estudio sistemático de nuevos medicamentos y candidatos a vacuna contra esta enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecemos al posgrado Interfacultades de Microbiología y a la maestría en Ciencias Farmacéuticas, Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. A los diferentes grupos funcionales de investigación de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). A la doctora Lilian Spencer-Valero del Departamento de Biología Celular de la Universidad Simón Bolívar (Caracas, Venezuela) por la donación de la cepa de *Plasmodium yoelii* 17XL, y a la doctora Silvia Blair del Laboratorio de Malaria, Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia) por la donación de la cepa de *Plasmodium berghei* ANKA. Especial agradecimiento al profesor Manuel Elkin Patarroyo, inspirador de las ideas desarrolladas en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. B. Singh, L.K. Sung, A. Matusop, A. Radhakrishnan, S.G. Shamsul, J. Cox-Singh, A. Thomas, D.J. Conway, A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings, *Lancet*, **363**(9414), 1017-1024 (2004).
2. R. Tuteja, Malaria the global disease, *FEBS Journal*, **274**(18), 4669 (2007).
3. S.I. Hay, C.A. Guerra, A.J. Tatem, A.M. Noor, R.W. Snow, The global distribution and population at risk of malaria: Past, present, and future, *Lancet Infect. Dis.*, **4**, 328 (2004).

4. P.E. Parham, E. Michael, Modeling the effects of weather and climate change on malaria transmission, *Environ. Health Persp.*, **118**(5), 620-626 (2010).
5. K.P. Paaijmans, S.S. Imbahale, M.B. Thomas, W. Takken, Relevant microclimate for determining the development rate of malaria mosquitoes and possible implications of climate change, *Malaria J.*, **9**(196), 1-8 (2010).
6. D. D'Alessandro, U. Olaleye, W. McGuire, P. Langerock, S. Bennett, M.K. Aikins, Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of an impregnated bednet programme, *Lancet*, **345**(8948), 479 (1995).
7. Instituto Nacional de Salud - SIVIGILA, Reporte semana 52 del 2010 [en línea]. Bogotá: SIVIGILA, URL: <http://www.ins.gov.co>, consultado en noviembre de 2010.
8. M. Ocampo, M. Urquiza, F. Guzmán, L.E. Rodríguez, J. Suárez, H. Curtidor *et al.*, Two MSA-2 peptides that bind to human red blood cells are relevant to *Plasmodium falciparum* merozoite invasion, *J. Peptide Res.*, **55**(3), 216-223 (2000).
9. C.G. Adda, V.J. Murphy, M. Sunde, L.J. Waddington, J. Schloegel, G.H. Talbo, K. Vingas, V. Kienzle, R. Masciantonio, G.J. Howlett, A.N. Hodder, M. Foley, R.F. Anders, *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is unstructured and forms amyloid-like fibrils, *Mol. Biochem. Parasit.*, **166**(2), 159-171 (2009).
10. J.A. Smythe, M.G. Peterson, R.L. Coppel, A.J. Saul, D.J. Kemp, R.F. Anders, Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **39**(2), 227-234 (1990).
11. J.M. Lozano, F.J. Montoya, J. Hoebeke, G.H. Cifuentes, M. Forero, M.E. Patarroyo, Antibodies induced by *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2-designed pseudopeptides possess neutralizing properties of the *in vitro* malarial infection, *Peptides*, **28**(10), 1954-1965 (2007).
12. J.A. Fherentz, B. Castro, An efficient synthesis of optically active α -(*t*-butoxycarbonylamino)-aldehydes from α -amino acids, *Synthesis*, **8**, 676-679 (1983).
13. R.B. Merrifield, Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149 (1963).
14. G. Kohler, C. Milstein, Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, *Eur. J. Immunol.*, **6**(7), 511-519 (1976).

15. J.M. Lozano, L.P. Lesmes, G.M. Gallego, M.E. Patarroyo, Protection against malaria is conferred by passive transferring rabbit F(ab)2' antibody fragments, induced by *Plasmodium falciparum* MSP-1 site-directed designed pseudopeptide-BSA conjugates assessed in a rodent model, *Mol. Immunol.*, aceptado para publicación.
16. M.E. Smalley, G.A. Butcher, The *in vitro* culture of the blood stages of *Plasmodium berghei*, *Int. J. Parasitol.*, **5**, 131-132 (1975).
17. B. Mons, C.J. Janse, J.J.A.B. Croon, H.J. van der Kayy, *In vitro* culture of *Plasmodium berghei* using a new suspension system, *Int. J. Parasitol.*, **13**(2), 213-217 (1983).
18. P.H. Lewis-Hughes, M.J. Howell, *In vitro* culture of *Plasmodium yoelii* blood stages, *Int. J. Parasitol.*, **14**(5), 447-451 (1984).
19. M. Ramaiya, Kamath, R. Vijayalaxmi, D.M. Renapurkar, Long-term *in vitro* cultivation of *Plasmodium berghei*, *Int. J. Parasitol.*, **17**(7), 1329-1331 (1987).