

DE LA PREDICCIÓN AL ANÁLISIS ANTIGÉNICO: TRAS LAS HUELLAS DE UN EPÍTOPE CONFORMACIONAL

por

Julio C. Calvo^{1,3*}, Juan C. Martínez², Manuel E. Patarroyo¹,
Arnold C. Satterthwait³.

Resumen

Calvo J.C., J.C. Martínez, M.E. Patarroyo & A.C. Satterthwait: De la predicción al análisis antigénico: Tras las huellas de un epítotope conformacional. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **27**(102): 133-140. 2003. ISSN 0370-3908.

Las células T responden a antígenos desnaturalizados o proteolizados, mientras la mayoría de anticuerpos contra proteínas nativas prefieren la conformación nativa, particularmente en proteínas globulares. Se ha observado que anticuerpos monoclonales contra la proteína Pfs25 de *P. falciparum*, bloquean la transmisión de la malaria del humano al mosquito. Uno de estos anticuerpos, el 4B7, se une débilmente al péptido lineal ILDTSNPVKT, para el cual se ha propuesto teóricamente una estructura en forma de bucle "beta-hairpin". Esta predicción se basa en estructuras de proteínas similares al factor de crecimiento epidermal por RMN y por el algoritmo de GORBTURN. Se sintetizaron péptidos lineales y con restricción conformacional a bucle para determinar cuál imitaba mejor el epítotope presente en la proteína Pfs25. Al titular por el ensayo de ELISA el anticuerpo 4B7 y un suero de conejo antigametos contra los péptidos, estos anticuerpos mostraron poca reacción con el péptido lineal y una fuerte reacción con un péptido con estructura en bucle.

Palabras clave: Epítotope conformacional, proteína Pfs25, *P. falciparum*, Análisis antigénico.

Abstract

While T cells respond to a denatured or proteolyzed antigen, most antibodies to native proteins prefer the native conformation, particularly in globular proteins. It has been found that monoclonal antibodies to Pfs25 protein of *P. falciparum* completely block malaria transmission from human sera to the *Anopheles* mosquito. One of these, 4B7, binds weakly to a linear peptide, ILDTSNPVKT, that maps to a predicted beta-hairpin loop. This prediction is based on NMR structures for epidermal

1 Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, Cra. 50 No. 26-00, Bogotá, D.C., Colombia.

2 Dpto. Química, Fac. Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

3* The Burnham Institute, La Jolla, CA 92037, USA. A quien se debe dirigir la correspondencia, e-mail jccalvo@eudoramail.com.

growth factor-like proteins and GORBTURN algorithm. Linear peptides and several loops were synthesized in order to determine which one best mimicked the corresponding epitope on Pfs25. The antibody 4B7 and a rabbit antiserum to *P. falciparum* gametes were titered against these peptides in ELISA. These antibodies showed little reaction with linear peptides, and a strong reaction with a loop.

Key words: Conformational epitopes, Pfs25 protein, *P. falciparum*, Antigenic analysis.

Introducción

Grandes esfuerzos se han llevado a cabo para emplear péptidos sintéticos en vacunaciones con la intención de producir anticuerpos (Lerner, 1983); sin embargo, no son muchos los resultados reportados que demuestren que la inoculación con péptidos de un patógeno pueda generar anticuerpos que protejan animales de subsecuentes infecciones (Beachey *et al.*, 1981; Patarroyo *et al.*, 1987). Una vacuna sintética efectiva requiere epítopes B y T en la construcción de la molécula. Mientras las células T responden a antígenos desnaturados o proteolizados, cuando son mostrados por células presentadoras de antígeno (Allen & Unanue, 1984), la mayoría de los anticuerpos contra proteínas nativas prefieren la conformación nativa (Sela, 1969). Esto es particularmente cierto para proteínas globulares. Por esta razón, la conformación y el arreglo espacial relativo de los segmentos constituyentes de un epítope B deben ser considerados para una mayor efectividad en la generación de anticuerpos que reconozcan a la proteína nativa (Jemmerson & Blankenfeld, 1989).

De la gran variedad de epítopes o determinantes antigénicos B en proteínas, sólo unas pocas estructuras han sido resueltas y, en algunas bucles superficiales, estos epítopes ocupan grandes áreas que comprenden entre 12-22 residuos de aminoácido. Un método que puede determinar la estructura completa de un epítope es la preparación de un complejo del fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal con su antígeno, su cristalización y la determinación de la estructura usando métodos de difracción de rayos X (Amit *et al.*, 1986; Sapphire *et al.*, 2001). En contraste con el consenso obtenido de las estructuras por rayos X de epítopes de proteínas, aún se encuentra en la literatura respaldo al concepto de que los epítopes en las proteínas consisten de segmentos de alrededor de 6 residuos de aminoácido, los cuales pueden ser imitados o rastreados utilizando péptidos sintéticos de una longitud similar.

Normalmente, los anticuerpos contra epítopes de proteínas son altamente específicos y tienen la habilidad de distinguir proteínas que sólo se diferencian en un aminoácido en la región de unión al anticuerpo

(Alexander *et al.*, 1983; Geysen *et al.*, 1985). Cambios estructurales, inducidos por desnaturalización o modificaciones químicas, pueden resultar en la pérdida total de la capacidad de unión de un antisuero con la conformación nativa de una proteína. El análisis de la secuencia de aminoácidos reveló que el espaciado de las cisteínas de la proteína Pfs25, una proteína de las fases sexuales del ciclo de vida del *P. falciparum* malaria, era similar al factor de crecimiento epidermal (FCE). Es aceptado que la reducción de la proteína causa la pérdida de su estructura secundaria y terciaria y, en el caso de los epítopes conformacionales, también se pierde la reactividad inmunológica (Kaslow *et al.*, 1988; Fries *et al.*, 1989). De ahí que una imitación molecular apropiada de los enlaces disulfuro pueda ser crítica para el correcto plegamiento de las secuencias que contienen los epítopes reconocidos por estos anticuerpos neutralizantes.

La proteína Pfs25 se expresa en la fase sexual del ciclo de vida del *P. falciparum*, cuando el parásito se encuentra en el hospedero mosquito. Esta proteína empieza a ser expresada en la superficie de los gametos en su fase final, es abundante en el cigoto y en el ooquinetos y empieza a desaparecer en el inicio de la fase de oocito. La importancia de esta proteína como antígeno blanco es su alta inmunogenicidad y la limitada diversidad antigénica, debido a que no se expresa cuando el parásito está en el hospedero humano sino en el mosquito; además, anticuerpos generados contra esta proteína han bloqueado en laboratorio la transmisión de la malaria del hombre al mosquito. El estudio de éste y otros antígenos de la fase sexual servirían en el desarrollo de una vacuna de bloqueo de la transmisión, la cual sería un componente clave en los programas de erradicación y control de la malaria.

Para comprender mejor la relación entre la conformación del péptido y la afinidad, se tomó para el diseño y la restricción la secuencia correspondiente al epítope de la proteína Pfs25 que se une al anticuerpo monoclonal neutralizante 4B7 (Van Amerongen *et al.*, 1989; Barr *et al.*, 1991). Para la predicción de la estructura del epítope se utilizó el programa GORBTURN versión 3.0 (Gibrat *et al.*, 1987; Wilmot *et al.*, 1988; Hutchinson *et al.*, 1994), el cual calcula la predicción de giros β basado en la secuencia de aminoácidos. El algoritmo hace uso de dife-

rentes potenciales de formación de giros b, basados en datos de estructura de proteínas obtenidas por cristalografía de rayos X y RMN, y de las preferencias diferenciales en la posición de aminoácidos en la secuencia que los diferentes tipos de giros b exhiben (tipos I, II, I', II', VIII y la categoría de giros No Específicos, NE, para los demás tipos). Este programa usa una ventana de 17 residuos de aminoácido en el algoritmo, lo cual lo hace más útil en la predicción de giros b en secuencias de proteínas que en péptidos cortos.

Basados en el algoritmo de predicción de estructura GORBTURN, se diseñaron y sintetizaron péptidos con restricción conformacional a bucle y el correspondiente péptido lineal. Para la síntesis de los péptidos con restricción conformacional a bucle se usó el método desarrollado por Satterthwait (Arrhenius & Satterthwait, 1990; Chiang *et al.*, 1992; Cabezas & Satterthwait, 1999), en el cual se reemplaza un puente de hidrógeno con un análogo (mimo) covalente, un enlace de hidrazona, que requiere la introducción de los ligandos J (ácido 5,5-dimetoxi-1-pentanóico) y Fmoc-Z(Act)-OH (ácido 1-propilideno-2-Fmoc-hidrazinoacético). Dado que los péptidos que se unen mejor a un anticuerpo lo hacen debido a que ajustan mejor sus formas espaciales, una mayor afinidad nos proporcionará un ensayo sencillo para identificar mimos conformacionales. El anticuerpo monoclonal 4B7 y un suero de conejo antigametos, obtenido al inocular en conejos gametos cultivados en sangre humana, se usaron para demostrar que un péptido conformacionalmente restringido a imitar la estructura tridimensional del epítipo reconocido por anticuerpos monoclonales neutralizantes, se une mejor que un péptido lineal.

Materiales y Métodos

Predicción de la estructura del epítipo conformacional. Para la predicción estructural se tomó la fracción de la proteína Pfs25 correspondiente al tercer dominio tipo FCE (46 residuos de aminoácido) con la secuencia LDTSNPVKT, identificada como objetivo del anticuerpo monoclonal 4B7, en el centro de la secuencia a analizar. Se tomó como base la predicción por el método GORBTURN, debido a que es un programa especializado en la predicción de estructura de secuencias con predominancia en estructuras en giros b. Adicionalmente se compararon los resultados con los obtenidos con el algoritmo de Chou-Fasman y el programa de Frecuencias de Thornton. Se construyeron modelos espaciales teniendo en cuenta los enlaces disulfuro característicos entre las cisteínas 1-3, 2-4 y 5-6 que presentan los dominios

tipo FCE, y las predicciones de la posición del giro b en la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo 4B7.

Síntesis de los péptidos. Los péptidos lineales y cíclicos (bucles) se sintetizaron en fase sólida. Se utilizaron los aminoácidos protegidos Fmoc-Asn, Fmoc-Asp(tBu), Fmoc-Cys(trt), Fmoc-Gln, Fmoc-Glu(tBu), Fmoc-Phe, Fmoc-Gly, Fmoc-Ile, Fmoc-Leu, Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Ser(Bu), Fmoc-Thr(Bu) y Fmoc-Val. Los péptidos se sintetizaron sobre una resina amida Rink (0.52 mmol/g; NovaBiochem) usando síntesis Fmoc estándar con DIC/HOBt como agentes acoplantes, siguiendo procedimientos ya descritos (Calvo *et al.*, 1999; Calvo & Satterthwait, 2000). Los péptidos se purificaron por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) y se caracterizaron por espectrometría de masas.

Prueba de ELISA. Como antígenos se usaron péptidos lineales, péptidos con restricción conformacional a bucle y una proteína recombinante Pfs25 producida en levaduras (yPfs25). Para llevar a cabo las pruebas de ELISA, los péptidos se acoplaron a maleimida-BSA activada (Pierce), siguiendo el protocolo del productor. Como primer anticuerpo se usaron el anticuerpo monoclonal neutralizante 4B7 y un suero policlonal de conejo antigameto. Del anticuerpo monoclonal neutralizante 4B7 se hicieron diluciones de 1/4000, 1/8000, 1/16000, 1/32000, 1/64000, 1/128000 y 1/256000. Del suero de conejo antigameto se hicieron diluciones de 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 y 1/640. Como segundo anticuerpo, para el ensayo con el anticuerpo monoclonal 4B7, se usó un suero anti-IgG (H+L) de ratón producido en cabras y para el ensayo con el suero de conejo antigameto, se usó un suero anti-IgG (H+L) de conejo producido en cabras, ambos purificados y acoplados a fosfatasa alcalina (Pierce). Para la detección se usó como sustrato de la fosfatasa alcalina el p-nitrofenilfosfato disódico (la reacción genera una coloración amarilla). El resultado se leyó en un titulador de ELISA a una longitud de onda de 405 nm. Como blanco se utilizó una línea de la placa de ELISA sin péptido y se tomó como resultado positivo para cada dilución (título) una diferencia en la densidad óptica de 0.2 con respecto al blanco.

Resultados y Discusión

El método de predicción usando el algoritmo de Chou-Fasman (figura 1), nos muestra la formación de estructuras en giro b sobrelapadas en los residuos DTSN (residuos 122-125) y TSNP (residuos 123-126). Este algoritmo se basa en el cálculo del producto derivado de las probabilidades del aminoácido en cada una de las cuatro posicio-

nes en el giro β , y del cálculo de la frecuencia de posiciones y parámetros conformacionales, sin especificar a qué tipo de giro β se refiere.

El método de predicción de frecuencias de Thornton (figura 1) nos muestra que en la secuencia DTSN (residuos 122-125) del epítipo existe un giro β tipo I. Este algoritmo se basa en potenciales conformacionales, potenciales posicionales y tipo de giro β , dependientes de potenciales posicionales, usando un conjunto de datos de predicción de giros β tipos I y II de 59 proteínas

El método de predicción GORBTURN (figura 1), nos muestra que existe la posibilidad de un giro β no específico (NE) en el segmento comprendido entre los residuos 123-126, TSNP, y un giro β tipo I entre los residuos 125-128, NPVK. Este programa usa una base de datos de 205 proteínas y puede diferenciar entre los giros β tipo I, I', II, II' y VIII, y usa la denominación NE (no específico) para los demás tipos.

Al comparar los resultados obtenidos del programa GORBTURN con el algoritmo de Chou-Fasman y el programa de frecuencias de Thornton (figura 1), se predice la existencia de dos posibles giros β superpuestos en las secuencias DTSN (Chou-Fasman y Thornton) y TSNP (Chou-Fasman y GORBTURN), pero al unir las dos cisteínas de la secuencia original (figura 2-a) se obtiene un giro β en la secuencia SNPV. Para el diseño de los

modelos se tomaron los giros β SNPV y TSNP, debido a que el primero se genera al unir naturalmente las cisteínas de la secuencia original y el segundo es obtenido por el método de predicción GORNTURN, el cual ha resultado ser más preciso para las proteínas con estructuras tipo FCE.

La predicción por cálculo es inferior a una predicción por homología, la cual es posible si una proteína homóloga con estructura terciaria conocida existe en la base de datos de proteínas (PDB). Con este fin se tomó como modelo la proteína del factor de crecimiento y transformación en humanos TGF α , la cual es una proteína típica del tipo FCE que puede ser tomada de la base de datos de proteínas (PDB, identificación: 4tgf). Se tomó el bucle B que estaba más expuesto al entorno, se colocaron en ella los aminoácidos de la proteína Pfs25 correspondientes al epítipo, se unieron las cisteínas por puentes disulfuro, se aplicó el modelo de los ligandos J y Z, y con los resultados de predicción de estructura para la secuencia se obtuvieron los diseños para la síntesis de los péptidos con restricción conformacional a bucle (figura 2).

Examinando el bucle-B del factor de crecimiento y transformación en humanos TGF α , una proteína típica del tipo FCE que puede ser tomada de la base de datos de proteínas (4tgf), este bucle forma una estructura conocida como "b-hairpin" (Kline *et al.*, 1990), el cual está ex-

Posición	106	120	131	151
Secuencia	PNECKNVTCGNGKCI <u>LDTSNPVKT</u> GVCSNIGKVPNVQDQNKCSKD			
	epítipo			
Método	Secuencia	Posición	Predicción de Estructura	
Chou-Fasman	DTSN	122-125	giro β	
	TSNP	123-126	giro β	
Thornton	DTSN	122-125	giro β tipo I	
GORBTURN	TSNP	123-126	giro β tipo NE	
	NPVK	125-128	giro β tipo I	

Figura 1. En la parte superior se muestra la secuencia del tercer dominio tipo FCE de la proteína Pfs25, y se encuentra subrayado el fragmento reconocido por el anticuerpo 4B7 (epítipo). En la parte inferior se muestra un resumen del análisis de estructura, por los tres métodos utilizados, para la secuencia del epítipo.

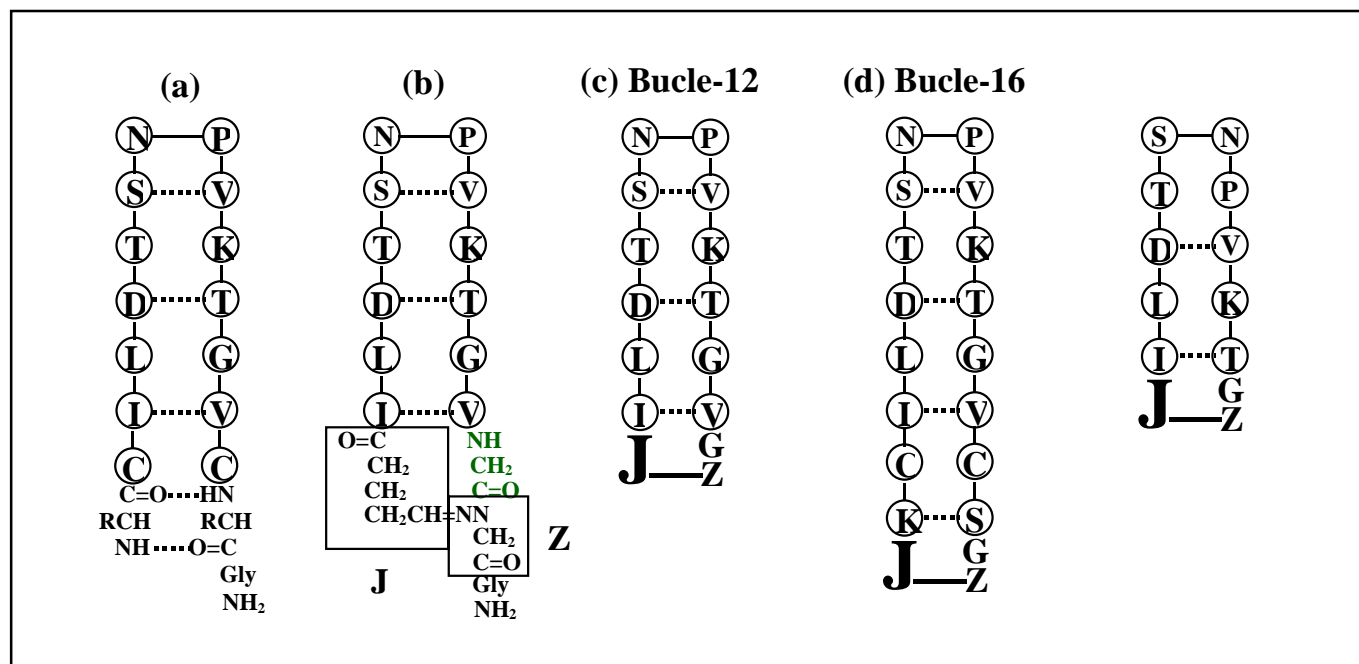


Figura 2. A partir de la secuencia original de la proteína Pfs25 (a), con los posibles enlaces de hidrógeno y el giro b SNPV, se reemplaza uno de los enlaces de hidrógeno de las cisteínas por el mismo covalente de hidrazona, bucle-12, usando los ligandos J y Z (b,c); el siguiente diseño es un bucle más largo, bucle-16, conservando el giro original (d). Por último se muestra el diseño del bucle-10 que contiene el giro b TSNP de la predicción GORBTURN (e).

puesta al solvente en una de sus caras mientras su lado opuesto está parcialmente oculto. Estos bucles se caracterizan por un patrón de residuos de cisteína en la base del bucle que definen las estructuras tipo FCE ya resueltas (enlaces disulfuro entre las cisteínas 1-3, 2-4 y 5-6, y la formación de puentes de hidrógeno entre las hebras b antiparalelas que forman los bucles “b-hairpin”). Con base en lo anterior, se decidió restringir conformacionalmente los péptidos del bucle B de la proteína Pfs25 (CILDTSNPVKTGVC) a “b-hairpins”, y se usó este prototipo de estructura como una guía para sustituir los enlaces de hidrógeno con los mimos covalentes de hidrazona

en la construcción de los modelos (como se indica en la figura 2).

Para la síntesis de los péptidos con restricción conformacional a bucle, se sintetizó un diseño que presentaba el giro b en la secuencia TSNP (predicción fuerte del algoritmo GORBTURN, bucle-10), y dos diseños que tomaban como base el giro b en la secuencia SNPV generado al unir naturalmente las cisteínas de la secuencia original (bucle-12, bucle-16). Adicionalmente, se sintetizaron como referencia los péptidos sin restricción conformacional (lineal-10, lineal-12) análogos a los di-

Tabla 1. Péptidos sintetizados para los ensayos de antigenicidad

Péptido	Residuos	Secuencia	Giro β
Lineal-10	10	Ac-G---ILDTSNPVKT-----GGC	
Bucle-10	10	J-----ILDTSNPVKT-----GZC	TSNP
Lineal-12	12	Ac-G---ILDTSNPVKTGV----GGC	
Bucle-12	12	J-----ILDTSNPVKTGV----GZC	SNPV
Bucle-16	16	J----KCILDTSNPVKTGVCS--GZC	SNPV

seños conformacionales. En la tabla 1 se muestran los péptidos sintetizados para el presente trabajo, en donde el número de residuos del bucle se refiere a los aminoácidos pertenecientes a la secuencia de la proteína y el símbolo Ac de los péptidos sin restricción conformacional indica que el péptido es acetilado en su función amino primaria.

Inicialmente, se llevó a cabo un ensayo de ELISA en donde se usaron como antígenos el bucle-10 (giro b en TSNP), su correspondiente péptido lineal-10, y la proteína recombinante yPfs25, frente al anticuerpo monoclonal ascítico 4B7. En el ensayo se observó una muy fuerte reacción del anticuerpo 4B7 con el bucle-10, una fuerte reacción con la proteína yPfs25, y muy poca reacción con el péptido lineal-10 (figura 3-a). No se tomaron diluciones menores a 1/4000 para este ensayo debido a que el bucle-10 presenta valores fuera del rango de lectura del lector de ELISA. Se determinaron títulos de anticuerpo de 256000 para el bucle-10, de 128000 para la proteína yPfs25 y de 1000 para el péptido lineal-10. Este resultado se puede interpretar como consecuencia de una mayor concentración de moléculas de la secuencia blanco del anticuerpo 4B7 en los 0.2 mg del bucle-10 que en la misma cantidad de microgramos de la proteína recombinante yPfs25.

Luego, se llevó a cabo un segundo ensayo de ELISA utilizando los antígenos bucle-10 (tomado como referencia), bucle-12 (giro b en SNPV), bucle-16 (giro b en SNPV) y el correspondiente péptido lineal-12, frente a un suero de conejo antigametos. No se utilizó la proteína yPfs25 debido a que presentaba valores de densidad óptica fuera del rango de lectura del lector de ELISA a diluciones menores a 1/2560, mientras el bucle-10 presentaba valores muy bajos a esta dilución, haciendo poco útil el trabajo a estas altas diluciones para comparar los bucles diseñados. En este ensayo se realizaron diluciones seriadas de 1/20 hasta 1/640 del suero de conejo antigametos y se observó una fuerte reacción del suero antigametos con el bucle-10, una reacción mediana con el bucle-12 y el bucle-16, y una baja reacción con el péptido lineal-12 (figura 3-b).

La preferencia conformacional del anticuerpo monoclonal ascítico 4B7, que reconoce el epítipo conformacional de la proteína Pfs25, y de los anticuerpos antigameto, presentes en el suero de conejo, por el bucle-10 fue claramente evidente. La importancia de lo observado radica en que se pueden alcanzar significativos incrementos en la antigenicidad cuando se constriñe el péptido a imitar la estructura en bucle tipo "b-hairpin" en la secuencia de la proteína Pfs25 reconocida por el anti-

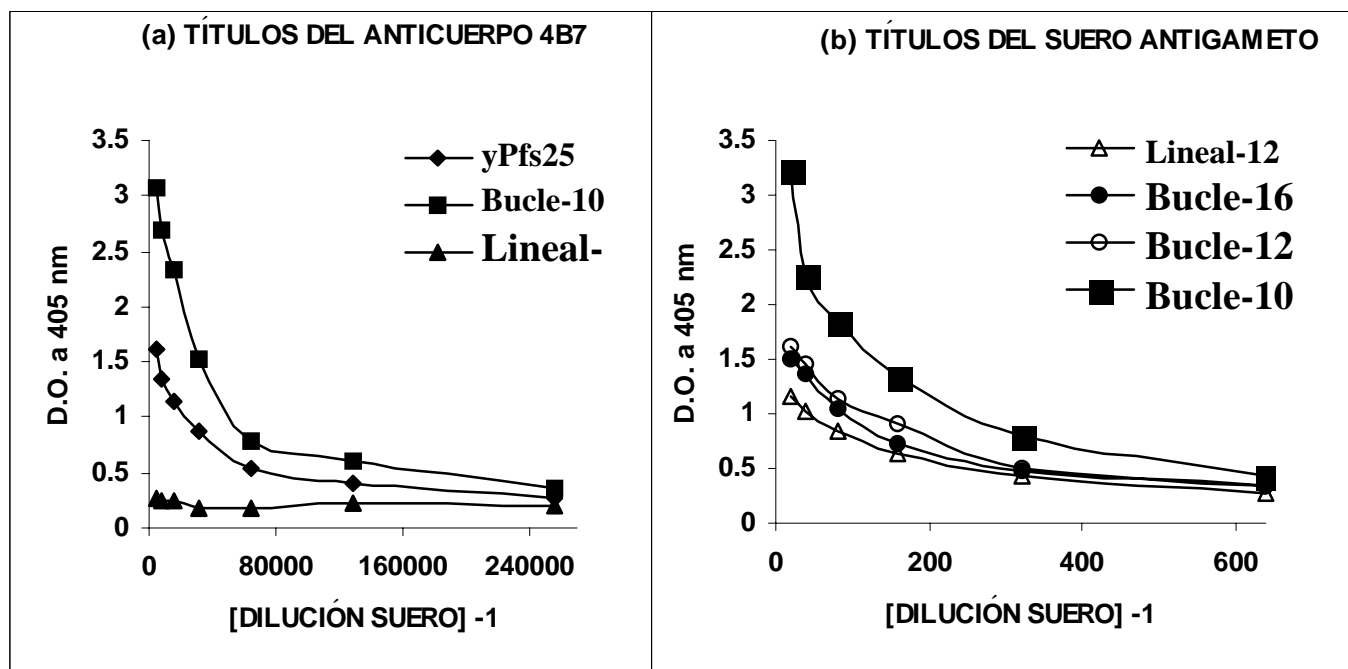


Figura 3. Títulos de ELISA del anticuerpo ascítico 4B7 (Fig. 2-a) y del suero de conejo antigameto (Fig.2-b) con péptidos lineales y con restricción conformacional a bucle unidos a maleimida-BSA.

cuerpo. Adicionalmente, el anticuerpo monoclonal ascítico neutralizante 4B7 se une mejor al bucle-10 diseñado y sintetizado con base en la predicción del algoritmo GORBTURN. Esto demuestra que se puede utilizar este algoritmo de predicción como herramienta útil para sintetizar péptidos con restricción conformacional a bucle que puedan ser distinguidas por un anticuerpo. Sin embargo, los bucles en general y los del tipo "b-hairpin" en particular, pueden venir en muchas formas y no hay garantía de que nuestro modelo haya identificado la mejor estructura objetivo de los anticuerpos. Esto nos lleva a deducir que existe la posibilidad de identificar un mejor mimo de la estructura objetivo a través de una sustitución sistemática de todos los posibles puentes de hidrógeno susceptibles de ser reemplazados con mimos covalentes de hidrazona.

Del presente trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones: (i) que el bucle-10 fue el mejor mimo conformacional del epítipo de la proteína nativa Pfs25; (ii) que los perfiles de unión a péptidos lineales y con restricción conformacional se pueden usar para caracterizar la respuesta inmune a epítopes específicos neutralizantes; (iii) que el método de predicción de estructura GORBTURN es una buena herramienta para usar como guía en el diseño y síntesis de péptidos con restricción conformacional a bucle.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a David C. Kaslow del N.I.H., Bethesda, MD, USA, por facilitar los anticuerpos utilizados. Este proyecto recibió el apoyo financiero de la Agency for International Development (DPE-5979-A-00-1035-00), to A.C.S.

Bibliografía

- Allen, P.M. & E.R. Unanue. 1984. Differential requirements for antigen processing by macrophages for lysozyme-specific T cell hybridomas. *J. Immunol.* **132**: 1077-1079.
- Alexander, H., Johnson, D.A., Rosen, J., Jerabek, L., Green, N., Weissman, I.L. & R.A. Lerner. 1983. Mimicking the alloantigenicity of proteins with chemically synthesized peptides differing in single amino acids. *Nature* **306**: 697-699.
- Amit, A.G., Mariuzza, R.A., Phillips, S.E.V. & R.J. Poljak. 1986. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science* **233**: 747-753.
- Arrhenius, T. & A.C. Satterthwait. 1990. *Peptides: structure and biology* (Proceedings of the 11th American Peptide Symposium). ESCOM, Leiden, pp. 870-872.
- Barr, P.J., Green, K.M., Gibson, H.L., Bathurst, I.C., Quakyi, I.A. & D.C. Kaslow. 1991. Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. *J. Exp. Med.* **174**: 1203-1208.
- Beachey, E.H., Seyer, J.M., Dale, J.B., Simpson, W.A. & A.H. King. 1981. Type-specific protective immunity evoked by synthetic peptide of *Streptococcus pyogenes* M protein. *Nature* **292**: 457-459.
- Cabezas, E. & A.C. Satterthwait. 1999. The hydrogen bond mimic approach: solid-phase synthesis of a peptide stabilized as an a-helix with a hydrazone link. *J. Amer. Chem. Soc.* **121**: 3862-3875.
- Calvo, J.C., Barrera, N.F., García, J.A., Guzmán, F., Espejo, F. & M.E. Patarroyo. 1999. Síntesis de la oxitocina en fase sólida usando terbutoxicarbonilo y fluorenilmetoxicarbonilo derivados. *Rev. Colomb. Quim.* **28**(1): 19-25.
- Calvo, J.C. & A.C. Satterthwait. 2000. Identificación de un epítipo conformacional en el extremo carboxilo de la proteína MSP-1 de *P. falciparum*. *Rev. Colomb. Quim.* **29**(2): 15-23.
- Chiang, L.C.; Cabezas, E.; Calvo, J.C. & A.C. Satterthwait. 1992. Peptides: biology and structure (Proceedings of the Chinese Peptide Symposium 1992). Du, Y., Tam, J.P. & Zhang, Y.S. (Eds.), ESCOM, Leiden, pp. 204-206.
- Fries, H.C., Lamers, M.B., Smits, M.A., Ponnudurai, T. & J.H. Meuwissen. 1989. Characterization of epitopes on the 25kD protein of the macrogametes/zygotes of *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol.* **11**: 31-45.
- Geysen, H.M., Barteling, S.J. & R.H. Meloen. 1985. Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 178-182.
- Gibrat, J.F., Garnier, J. & B. Robson. 1987. Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. New parameters and consideration of residue pairs. *J. Mol. Biol.* **198**: 425-443.
- Hutchinson, E.G. & J.M. Thornton. 1994. A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Protein Sci.* **3**: 2207-2216.
- Jemmerson, R. & R. Blankenfeld. 1989. Affinity consideration in the design of synthetic vaccines intended to elicit antibodies. *Molec. Immunol.* **26**(3): 301-307.
- Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. & L.H. Miller. 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**: 74-76.
- Kline, T.P., Brown, F.K., Brown, S.C., Jeffs, P.W., Kopple, K.D. & L. Mueller. 1990. Solution structures of human transforming growth factor a derived from 1h NMR data. *Biochemistry* **29**: 7805-7813.
- Lerner, R.A. 1983. Synthetic vaccines. *Scient. Am.* **248**(2): 66-74.
- Patarroyo, M.E., Romero, P., Torres, M.L., Clavijo, P., Moreno, A., Martínez, A., Rodríguez, R., Guzman, F. & E. Cabezas. 1987. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* **328**: 629-632.
- Saphire, E.O., Parren, P.W.H.I., Pantophlet, R., Zwick, M.B., Morris, G.M., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Stanfield, R.L.,

- Burton, D.R. & I.A. Wilson.** 2001. Crystal structure of a neutralizing human IgG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* **293**: 1155-59.
- Sela, M.** 1969. Antigenicity: some molecular aspects. *Science* **166**: 1365-1374.
- Van Amerongen, A., Sauerwein, R.W., Beckers, P.J.A., Melen, R.H. & J.H.E.T. Meuwissen.** 1989. Identification of a peptide sequence of the 25 kD surface protein of *P. falciparum* recognized by transmission-blocking monoclonal antibodies: implications for synthetic vaccine development. *Parasite Immunol* **11**: 425-428.
- Wilmot, C.M. & J.M. Thornton.** 1988. Analysis and prediction of the different types of beta-turn in proteins. *J. Mol. Biol.* **203**: 221-232.