

EFECTO DE LA POSICIÓN DEL ÁCIDO ASPÁRTICO EN LA SOLUBILIDAD Y EN LA ADSORCIÓN SOBRE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO DE UNA SERIE DE PÉPTIDOS ANÁLOGOS

por

Mary Trujillo^{1,2}, Luis A. Oviedo², Fanny Guzmán¹ & Julio C. Calvo^{3*}

Resumen

Trujillo, M., L. A., Oviedo, F. Guzmán & J. C. Calvo. Efecto de la posición del ácido aspártico en la solubilidad y en la adsorción sobre hidróxido de aluminio de una serie de péptidos análogos. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **29**(111): 283-288. 2005. ISSN 0370-3908.

Con el fin de analizar el fenómeno de la adsorción física de un péptido sobre hidróxido de aluminio, se sintetizaron dos series de análogos de una secuencia de 20 aminoácidos proveniente del fragmento de 42 kD de la proteína MSP-1 de *Plasmodium falciparum*, sustituyendo cada una de las posiciones por ácido aspártico o por lisina. Los resultados de estas modificaciones no mostraron una tendencia regular en la solubilidad o en la adsorción de los análogos. En la serie de ácido aspártico, el péptido de mayor adsorción es el correspondiente a la sustitución de la posición 6 y el de menor a la posición 5; sin embargo, no se observaron diferencias estructurales significativas entre estos dos análogos. La disminución de la adsorción de los análogos de la serie de lisina respecto a la secuencia original, indica que este fenómeno es dirigido principalmente por efectos electrostáticos.

Palabras claves: Adsorción, Hidróxido de aluminio, Solubilidad, Péptidos análogos, Ácido Aspártico.

Abstract

Two analogue series of a peptide sequence from the 42 kD fragment of *Plasmodium falciparum* MSP-1 protein were synthesized by systematically replacing each one of the positions by aspartic acid or lysine to study the physical adsorption phenomenon. Such modifications showed a non-regular tendency regarding solubility and adsorption data. The aspartic acid best adsorption data was obtained by substituting aspartic acid in position 6, and the worst in position 5; however, no significant structural differences were found between these analogue peptides. Decreasing adsorption values in the lysine analogue series, indicate that adsorption into aluminium hydroxide is predominantly guided by electrostatic effects.

Key words: Adsorption, Aluminium hydroxide, Solubility, Peptide analogues, Aspartic acid.

¹ Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC, Bogotá, D.C., Colombia.

² Dpto. Química, Fac. Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

^{3*} Grupo Proteoma, Lab. Biología-Química, Fac. Ciencias y Educación, Universidad Distrital Fco. José de Caldas, Cra. 4 No. 26-B-54, Bogotá, D.C., Colombia. A quien se debe dirigir la correspondencia: E-mail: deimary@yahoo.com / jccalvom@udistrital.edu.co

Introducción

Los adyuvantes que contienen aluminio, fosfato e hidróxido, son usados desde 1926 como adyuvantes en vacunas, demostrando ampliamente su seguridad; sin embargo, el mecanismo de su actividad inmunoestimuladora ha sido poco estudiado. Actualmente, son los únicos aprobados para formulaciones de uso humano y se considera que su actividad está relacionada con el grado de adsorción del antígeno. En las últimas décadas el grupo de Hem ha desarrollado un excelente trabajo sobre la estructura y las condiciones para la adsorción de proteínas sobre estos adyuvantes (Serna, 1977; Hem, 1984; Shirodkar, 1990; Callahan, 1991; Seeber, 1991-a,b; Al-Shakhshir, 1994, 1995-a,b), señalaron que el hidróxido de aluminio usado en las vacunas es un oxihidróxido de aluminio cristalino conocido como boemita, y el fosfato de aluminio un hidroxifosfato de aluminio amorfo (Rinella, 1995). Las propiedades de estos geles (tales como área superficial, carga superficial, composición química y estructura química) dependen en gran medida de los procesos de producción (Hem, 1995; Serna, 1978). Además, plantearon que las atracciones electrostáticas e hidrofóbicas y el intercambio de ligando representaban los principales mecanismos responsables de la adsorción de antígenos en los adyuvantes que contienen aluminio (Al-Shakhshir, 1995 a,b; Rinella, 1995).

Se ha planteado que conociendo el pI y el pH del antígeno y del adyuvante, se podría predecir el grado de adsorción que tiene lugar cuando se preparan vacunas (Serna, 1977; Seeber, 1991 b); sin embargo, el uso de estos valores puede no ser tan eficaz al predecir las propiedades físicas de una vacuna completa (Matheis, 2002), pues muchos factores pueden influir en el proceso fisicoquímico de adsorción del antígeno en la producción de vacunas adsorbidas. Por ello, ha surgido la necesidad de desarrollar nuevos diseños con el fin de introducir vacunas combinadas; sin embargo, existen vacíos sobre los mecanismos de muchas de las interacciones inmunológicas entre los componentes de estas vacunas. La óptima formulación de vacunas multivalentes puede requerir más de un tipo de adyuvante de aluminio, (Serna, 1977; Chang, 1997) y deben ser preparadas combinando los componentes adsorbidos individualmente, de tal forma que se obtenga una suspensión de la mezcla de adyuvantes (Matheis, 2002). Este procedimiento genera, sin embargo, interrogantes sobre el potencial de distribución de los antígenos y la adsorción de aniones fosfato, así como también sobre la estabilidad del producto.

En este trabajo se sintetizaron dos series de péptidos análogos a partir de la secuencia de un péptido ya registrado, de secuencia EVLYLKPLAGVYRSLKKQLE, del fragmento de 42 kD de la proteína MSP-1 (Espejo, 2001; Blackman, 1992). Las series se generaron al reemplazar sistemáticamente

cada uno de los aminoácidos de la secuencia objeto por ácido aspártico (Asp, D) o por lisina (Lys, K). La solubilidad y la adsorción sobre hidróxido de aluminio fueron analizadas para cada uno de los péptidos análogos obtenidos en ambas series, y no se encontró correlación entre ellas. La serie de análogos de Asp mostró un considerable incremento en la adsorción, en especial los péptidos donde la Lys en la posición 6 (análogo Asp-6) y la arginina de la posición 13 (análogo Asp-13) fueron reemplazados por ácido aspártico. La solubilidad del análogo Asp-5, en donde se reemplazó la Leu de la posición 5, fue mayor que la del análogo Asp-6; sin embargo, el análogo Asp-6 mostró los mejores resultados en el ensayo de adsorción, mientras que al análogo Asp-5 no mostró una apreciable adsorción en las mismas condiciones del ensayo. El análisis estructural por dicroísmo circular (CD) no reveló diferencias estructurales significativas entre estos dos análogos. Estos resultados sugieren que la carga electrostática local es la responsable de este comportamiento.

Materiales y métodos

Síntesis de las series de péptidos análogos. Con base en la secuencia del péptido 1585, EVLYLKPLAGVYRSLKKQLE, del fragmento de 42 kD de la proteína MSP-1 de malaria, se diseñaron dos series de péptidos reemplazando cada una de las posiciones en la secuencia original por Asp (D) en un caso y por Lys (K) en otro caso. La **Tabla 1** muestra las dos series de péptidos análogos obtenidas. El péptido 1585 y los correspondientes análogos de las serie de Asp y de Lys fueron sintetizados usando la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida por la estrategia t-Boc (Merrifield, 1963; Houghten, 1985). Los péptidos crudos obtenidos fueron purificados por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) usando una columna semipreparativa Vydac 218TP1022. La pureza de los péptidos fue verificada por RP-HPLC en una columna analítica Lichrosorb C18 (MERCK) usando un gradiente de 0%-70% B durante 30 minutos. El solvente A era 0.05% TFA en agua y el solvente B era 0.05% TFA en acetonitrilo. La masa molecular de los productos fue determinada en un espectrómetro de masas Bruker Protein MALDI-TOF.

Ensayo de solubilidad. La solubilidad de los péptidos análogos fue determinada por saturación de 1 mL de solución salina al 0.9% a 25°C y pH 7.0±0.1. El péptido disuelto fue medido en un espectrofotómetro Multicelda Labsystem Spectrofotometer usando ácido bicinconónico (Pierce) para análisis de proteínas (Smith, 1985; Wiechelman, 1988; Brown, 1989) siguiendo el protocolo estándar y construyendo curvas de calibración para cada uno de los péptidos análogos.

Adsorción. El tiempo de equilibrio para la adsorción del péptido 1585 sobre hidróxido de aluminio fue determinado

Tabla 1. Péptidos análogos sintetizados del péptido 1585 por la substitución sistemática con ácido aspártico (Asp, D) o con lisina (Lys, K) de cada uno de los aminoácidos de la secuencia original.

PEPTIDO	SECUENCIA
1585	EVLYLKPLAGVYRSLKKQLE
Asp-1	D VLYLKPLAGVYRSLKKQLE
Asp-2	EDLYLKPLAGVYRSLKKQLE
Asp-3	EV D LYLKPLAGVYRSLKKQLE
Asp-4	EVLY D LKPLAGVYRSLKKQLE
Asp-5	EVLY D KPLAGVYRSLKKQLE
Asp-6	EVLYL D PLAGVYRSLKKQLE
Asp-7	EVLYLK D LAGVYRSLKKQLE
Asp-8	EVLYLK P DAGVYRSLKKQLE
Asp-9	EVLYLK P L D GVYRSLKKQLE
Asp-10	EVLYLK P L A DVYRSLKKQLE
Asp-11	EVLYLK P L A G D YRSLKKQLE
Asp-12	EVLYLK P L A G V D R SLKKQLE
Asp-13	EVLYLK P L A G V D S L KKQLE
Asp-14	EVLYLK P L A G V R D L K KKQLE
Asp-15	EVLYLK P L A G V R S D K K QLE
Asp-16	EVLYLK P L A G V R S L D K K QLE
Asp-17	EVLYLK P L A G V R S L K D QLE
Asp-18	EVLYLK P L A G V R S L K D L E
Asp-19	EVLYLK P L A G V R S L K K D E
Asp-20	EVLYLK P L A G V R S L K K D L
Lys-1	K VLYLKPLAGVYRSLKKQLE
Lys-2	E K LYLKPLAGVYRSLKKQLE
Lys-3	EV K LYLKPLAGVYRSLKKQLE
Lys-4	EVL K LKPLAGVYRSLKKQLE
Lys-5	EVLY K KPLAGVYRSLKKQLE
Lys-6	EVLYLK K PLAGVYRSLKKQLE
Lys-7	EVLYLK K L A GVYRSLKKQLE
Lys-8	EVLYLK P K AGVYRSLKKQLE
Lys-9	EVLYLK P L K GVYRSLKKQLE
Lys-10	EVLYLK P L A K VYRSLKKQLE
Lys-11	EVLYLK P L A G K YRSLKKQLE
Lys-12	EVLYLK P L A G V K RSLKKQLE
Lys-13	EVLYLK P L A G V K S L KKQLE
Lys-14	EVLYLK P L A G V R K L K KKQLE
Lys-15	EVLYLK P L A G V R S K K K QLE
Lys-16	EVLYLK P L A G V R S L K K QLE
Lys-17	EVLYLK P L A G V R S L K K QLE
Lys-18	EVLYLK P L A G V R S L K K K L E
Lys-19	EVLYLK P L A G V R S L K K Q K E
Lys-20	EVLYLK P L A G V R S L K K Q L K

con 12 muestras de concentración 4 mg de péptido por mL de solución de NaCl al 0.9% y pH 7.0±0.1. La suspensión acuosa de hidróxido de aluminio (ALHYDROGEL) se añadió a cada una de las muestras de péptido en cantidad equivalente a 1.6 mg Al/mL (W.H.O., 1976), a una temperatura constante de 273 K. Las mezclas obtenidas se agitaron suavemente a 150 rpm durante el período de tiempo que duró el experimento. Inicialmente se tomaron muestras cada 10 min, durante la primera hora del ensayo y, posteriormente, cada hora hasta completar 6 horas, para evaluar la adsorción con respecto al tiempo. Las muestras fueron centrifugadas a 8,000 rpm y filtradas a través de una membrana de 0.22 µm para determinar la concentración del péptido antes y después del proceso de adsorción, usando ácido bicinónico (BCA),

tal como se describió en el ensayo de solubilidad. La cantidad adsorbida se determinó en mmol/mg de Aluminio, por la diferencia entre las concentraciones del péptido antes y después del proceso de adsorción.

El ensayo de adsorción para las dos series se llevó a cabo a las condiciones descritas, agitando las mezclas a 273 K por 30 min en un agitador helicoidal. Las isotermas de adsorción fueron graficadas a concentraciones de péptido en un rango entre 0.0 y 3.2 mmol/mL en NaCl al 0.9%, 273 K y pH 7.0±0.1. Cada muestra contenía una cantidad de adsorbente equivalente a 1.6 mg Al/mL. Cantidades conocidas de péptido análogo y de hidróxido de aluminio fueron mezcladas y agitadas por 30 min. Luego de centrifugadas, se determinó la concentración de proteína en el sobrenadante siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. La cantidad de péptido adsorbido se determinó por la diferencia en concentración en la solución antes y después del proceso de adsorción. La cantidad de péptido adsorbido por unidad de área superficial de adsorbente se ubicó gráficamente contra la concentración de péptido en solución después del paso de adsorción.

Dicroísmo circular (DC). Para el ensayo se tomaron volúmenes de 500 µL de muestra de péptido a una concentración de 0.1 mM en una mezcla de TFE-H₂O (3: 7). Los espectros fueron tomados en un espectropolarímetro JASCO J720, entre 190 y 260 nm.

Resultados y discusión

Análisis de los Péptidos. El análisis de los péptidos, después de la purificación, mostró un solo pico por RP-HPLC analítico, indicando una buena pureza, tal como se ilustra para los péptidos análogos Asp-5 y Asp-6 (**Figura 1A y 1B**). La masa molecular observada en el espectrómetro de masas MALDI-TOF esta en concordancia con los valores teóricos esperados. Los valores obtenidos (PM calculado; PM experimental) para los análogos Asp-5 (2,349.9; 2,354.1) y Asp-6 (2,334.9; 2,335.7) se muestran en la **Figura 1 (Figura 1C y 1D)**.

Los espectros de dicroísmo circular (DC) presentaron dos mínimos en 209 y 222 nm para todos los péptidos análogos de las dos series analizadas indicando la existencia de una estructura con tendencia helicoidal. En los análogos de las dos series estudiadas no se observó diferencia estructural significativa. Es interesante observar que los análogos Asp-5 y Asp-6, que presentaron comportamientos opuestos en adsorción, muestran la misma tendencia estructural hallada para el conjunto de análogos (**Figura 1E**).

Ensayo de solubilidad. El análisis global de los resultados de los péptidos de la serie de ácido aspártico (Asp-1, Asp-2, etc.) muestra que la substitución produce una disminución

en la solubilidad con respecto a la del péptido 1585 tomado como referencia (**Figura 2A**), y que los aminoácidos de la secuencia original en las posiciones 6, 9, 16 y 17 son críticos para este proceso. Sin embargo, no se pudo hallar correlación alguna entre la carga, el tamaño o la polaridad del aminoácido sustituido y la tendencia decreciente en la solubilidad.

Los péptidos análogos de la serie de lisina (Figura 2B) presentaron un comportamiento poco esperado, pues se suponía que la sustitución de un aminoácido hidrofóbico como Val (análogos Lys-2 y Lys-11) o Leu (análogos Lys-3, -5, -8, -15 y -19) por un aminoácido cargado positivamente como Lys, incrementaría de una manera apreciable su solubilidad. Este efecto solo se cumplió para la valina, pero no para la leucina.

Es interesante destacar que no siempre la sustitución de un aminoácido hidrofóbico como leucina o valina por

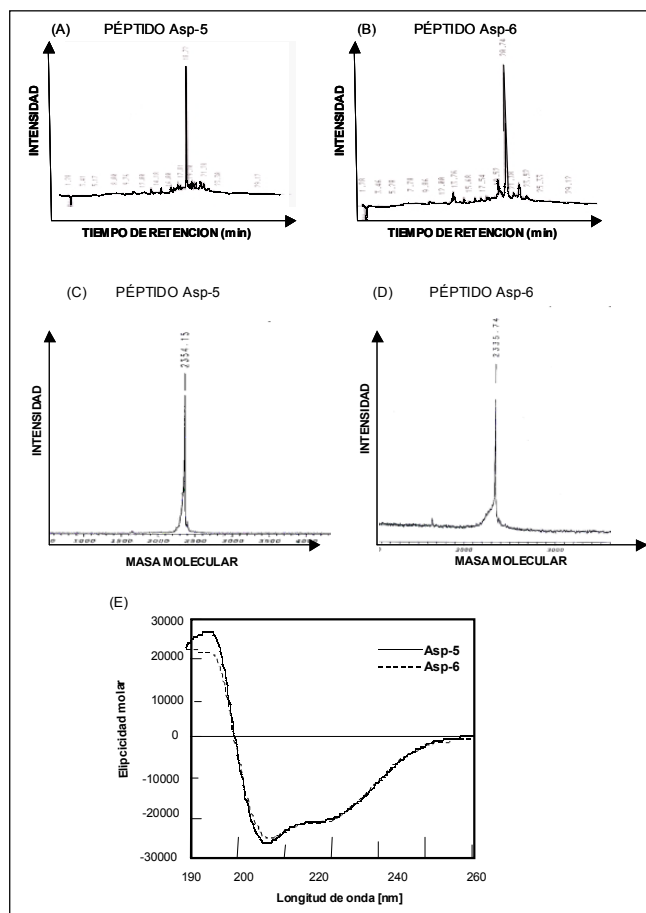


Figura 1. Caracterización de los péptidos análogos Asp-5 y Asp-6: RP-HPLC analítica de los análogos (1-A y 1-B), en una columna Lichrosorb RP-18 usando un gradiente de 0-70% ACN en 30 min; espectros de masas (1-C y 1-D) tomados en un espectrómetro Bruker Protein MALDI-TOF; espectros de dicroísmo circular (1-E), tomados en un espectropolarímetro JASCO J720.

uno hidrofílico como lo es la lisina, produce un incremento en la solubilidad del péptido, ya que en cada caso, es necesario tener en cuenta la masa molecular, la posición del sustituyente y las interacciones entre las cargas de grupos vecinos, donde pueden ocurrir atracciones o repulsiones que inducen efectos en la estructura y en las interacciones intermoleculares. En estas condiciones la falta de tendencia en la solubilidad está relacionada con la naturaleza del microambiente generado en cada sustitución que es característico y es específico y que provoca modificaciones en el comportamiento fisicoquímico del péptido frente al medio de disolución.

Es bien conocido el caso en el cual tres o cuatro moléculas con características estructurales helicoidales se agrupan por la interacción de residuos de leucina y valina, en la posiciones $i, i+3$. En nuestro caso particular, pareciera que las leucinas en las posiciones 3 y 5 estuvieran interactuando para formar y estabilizar grupos poliméricos, los cuales se romperían cuando substituyen dichas leucinas por residuos cargados tales como ácido aspártico y lisina. El comportamiento de los otros péptidos análogos, en donde se substituye valina y leucina en otras posiciones, se explicaría analizando el microambiente generado, tal como se enunció anteriormente.

Ensayo de adsorción. Para determinar el tiempo de equilibrio del proceso de adsorción del péptido 1585 de referencia (EVLYLKPLAGVYRSLKKQLE), se cuantificó la adsorción en función del tiempo (**Figura 3**); de los

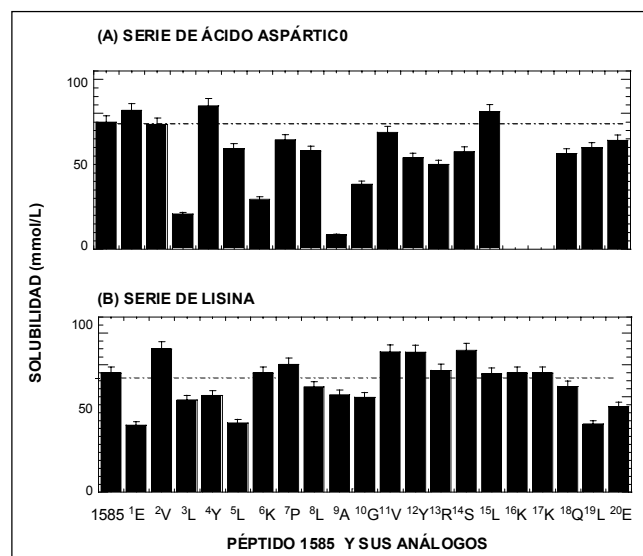


Figura 2. Ensayo de solubilidad de las dos series de análogos en 0.9% NaCl a $\text{pH } 7 \pm 0.1$ y 298 K. En la parte inferior (eje de abscisas) aparece el aminoácido que ha sido reemplazado por Lys (K) o Asp (D) y su posición en la secuencia de original, para cada uno de los péptidos análogos.

valores obtenidos se deduce que el proceso de adsorción fue rápido y alcanzó un valor máximo de concentración de 0.28 mmol/mg aluminio a los 30 min. Este tiempo fue tomado como estándar para los experimentos de adsorción del resto de los péptidos estudiados en las dos series.

Los resultados de la adsorción de los péptidos análogos de la serie de ácido aspártico, sobre hidróxido de aluminio, muestran que la sustitución de la lisina en la posición seis (análogo Asp-6) produce un incremento notable en el valor de su adsorción (**Figura 4A**); el mismo comportamiento, aunque en menor proporción, se observó cuando se sustituyó la arginina en la posición 13 (análogo Asp-13). No fue posible determinar la adsorción de los péptidos análogos donde se reemplazó la lisina en las posiciones 16 y 17 por ácido aspártico (análogos Asp-16 y -17) porque presentaron una solubilidad muy baja (**Figura 4A**); sin embargo, se presume que la adsorción de estos péptidos sobre hidróxido de aluminio también debe estar gobernada predominantemente por efectos electrostáticos.

La adsorción de los péptidos de la serie de análogos de lisina fue diseñada como control negativo y mostró concordancia con lo esperado, por la repulsión que debía existir entre el hidróxido de aluminio y los péptidos cargados ambos positivamente (**Figura 4B**).

Para realizar un análisis más detallado del proceso de adsorción, se escogieron los análogos Asp-6 y Asp-5 de la serie de ácido aspártico que presentan el máximo y el mínimo valor de adsorción, respectivamente. Se determinó adsorción en función de la concentración de la solución de péptido, como se ilustra en las isotermas de la

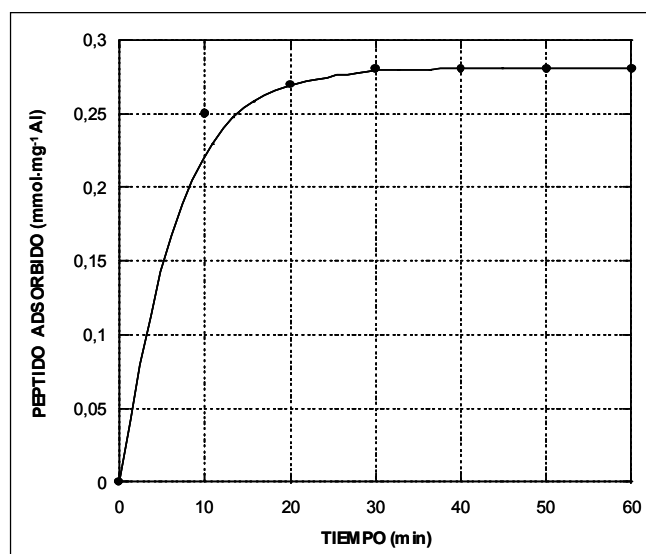


Figura 3. Gráfica del tiempo de equilibrio para la Adsorción del péptido 1585 de referencia sobre hidróxido de aluminio.

Figura 5; los resultados indican que la adsorción del péptido sobre hidróxido de aluminio es compleja y no se puede interpretar en todo el rango de concentraciones estudiadas con la isoterma de Langmuir (**Martin, 1983**). Es posible que el fenómeno de adsorción esté conformado por dos tipos independientes: el primero sobre el hidróxido de aluminio para conformar la monocapa y, a concentraciones mayores, la formación de una segunda capa sobre la monocapa adsorbida.

Conclusiones

Los valores aleatorios en los resultados para la solubilidad y la adsorción en las dos series de péptidos análogos estudiados sugieren que no hay una tendencia regular relacionada con las sustituciones de aminoácidos realizadas. Adicionalmente, se encontró que no hay correlación entre los datos encontrados de solubilidad y adsorción. El análisis estructural por dicroísmo circular mostró que no había diferencias significativas entre los péptidos análogos Asp-6 (de máxima adsorción) y Asp-5 (muy baja adsorción). Estos péptidos análogos no siguieron el patrón de adsorción asociado con la ecuación de Langmuir, en todo el rango de concentración estudiado, sugiriendo un mecanismo de adsorción complejo. Los resultados anteriores, el efecto extraordinario en la adsorción sobre hidróxido de aluminio al reemplazar la lisina en la posición seis por ácido aspártico y la disminución drástica en los valores de adsorción en la serie de análogos de lisina, indican que la adsorción de estos péptidos sobre hidróxido de aluminio esta gobernada predominantemente por efectos electrostáticos; sin embar-

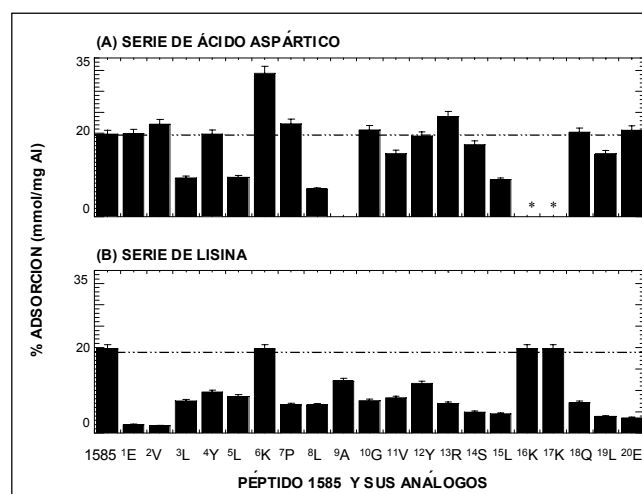


Figura 4. Adsorción sobre hidróxido de aluminio de las dos series de péptidos análogos en 0.9% NaCl a pH 7 ± 0.1 y 298 K.

*No Analizado

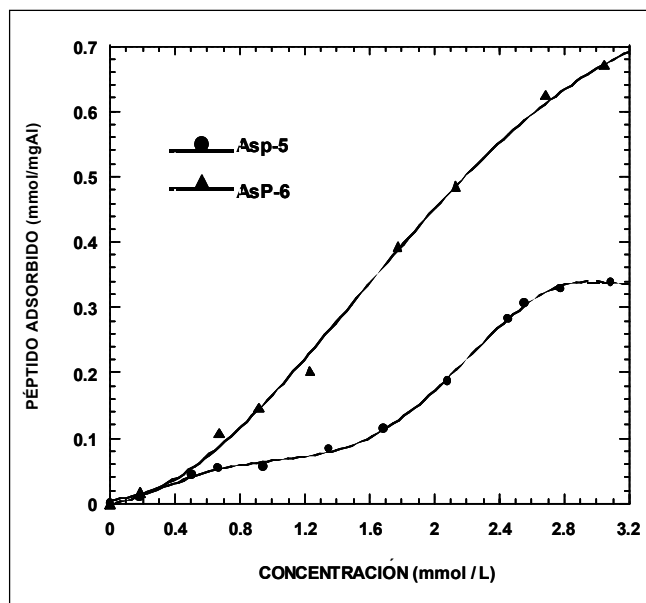


Figura 5. Isotherma de Adsorción de los péptidos Asp-5 y Asp-6 sobre hidróxido de aluminio en 0.9% NaCl a pH 7 ± 0.5 y 298 K.

go, deben existir otros factores que afectan el proceso, tal como lo demuestran los resultados opuestos encontrados para los análogos Asp-5 y Asp-6, que merecen estudios posteriores enfocados en las superficies puntuales de contacto, a través de la secuencia, en el complejo péptido-hidróxido de aluminio.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Oficina de la Presidencia de la República y al Ministerio de Protección Social por la financiación de este proyecto.

Bibliografía

- Al-Shakhshir, R. H., Regnier, F. E., White, J. L., & S. L. Hem. 1994. Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine* **12**: 472-474.
- Al-Shakhshir, R. H., Lee, A. L., White, J. L., & S. L. Hem. 1995. Interaction in model vaccines composed of mixtures of aluminium-containing adjuvants. *J. Colloid Interface Sci.* **169**: 197-199.
- Al-Shakhshir, R. H., Regnier, F. E., White, J. L., & S. L. Hem. 1995b. Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine* **13**: 41-44.
- Blackman, M. J. & A. A. Holder. 1992. Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein by a calcium-dependent membrane-bound serine protease shedding of MSP as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP-1. *Molec. And. Biochem. Parasitol.*, **49**: 29-34

- Brown, R. E., Jarvis, K. L. & K. J. Hyland, K. 1989. Protein measurement using Bicinchoninic acid: Elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.* **180**: 136-139
- Callahan, P. M., Shorter, A. L., & S. L. Hem. 1991. The importance of surface charge characteristics of aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* **12**: 472-474.
- Chang, M., White, J. L., Nail S. L. & S. L. Hem. 1997. Role of the electrostatic attractive force in the adsorption of proteins by aluminium hydroxide adjuvant. *PDA J. Pharm. Sci. & Tech.* **51(1)**: 25-29
- Espejo, B. F., Cubillos, M., Salazar, L. M., Guzmán, F., Urquiza, M., Ocampo, M., Silva, Y., Rodríguez, R., Lyoi, E. & M. E. Patarroyo. 2001. Structure, Immunogenicity, and Protectivity relationship for the 1585 malarial peptide and its substitution analogues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**: 4654-4657
- Hem, S. L. & J. L. White. 1984. Characterization of aluminium hydroxide for use as an adjuvant in parenteral vaccines. *J. Parenteral Sc. And Tech.* **38(1)**: 1-10
- Hem, S. L. & J. L. White. En: Powell M.F, Newman M.J., and Burdman J.R. editors. 1995. *Vaccine design-the subunit and adjuvant approach*. New York: Plenum Press, 249-75.
- Houghten, R. 1985. General method for the rapid solid-phase synthesis of large number of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**: 5131-5.
- Martin, A., Swarbrick, J. & A. Camarata. 1983. *A Physical Pharmacy*, 3rd edition, Lea & Febiger (Eds.), Philadelphia.
- Matheis, W., Zott, A. & M. Schwanig. 2002. The role of the adsorption process for production and control combined adsorbed bacines. *Vaccine* **20**: 67-73.
- Merrifield, R. B. 1963. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am.Chem. Soc.* **85**: 2149-2154
- Rinella, J. V,jr., White, J. L., & S. L. Hem. 1995. Effect of anions on model aluminium adjuvant containing vaccines. *J. Colloid Interface Sci.* **172**: 121-130.
- Seeber, S. J., White, J. L., & S. L. Hem. 1991a. Solubilization of aluminium-containing adjuvants by constituents of interstitial fluid. *J. Parenteral Sci. Tech.* **45**: 156-159
- Seeber, S. J., White, J. L., & S. L. Hem. 1991b. Predicting the adsorption of proteins by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* **9**: 201-203.
- Serna, C. J., White, J. L. & S. L. Hem. 1977. Anion-aluminium hydroxide gel interactions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **41**: 1009-1013.
- Serna, C. J., White, J. L., & S. L. Hem. 1978. Factors affecting homogeneous precipitation of aluminium hydroxide gel. *J. Pharm. Sci.* **67(8)**: 1179-1181.
- Shirodkar, S., Hutchinson, R. L., Perry, D. L., White, J. L., & S. L. Hem. 1990. Aluminum compounds used as adjuvants in vaccines, *Pharm. Res.* **2**: 1282-1288.
- Smith, P. K., Krohn, R., Hermanson, A., Mallia, K., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goetze, N., Olson, B., & D. Klenk. 1985. Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85
- Wiechelman, K., Braun, R. & J. Fitzpatrick. 1988. Investigation of the Bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **175**: 231-237.
- World Health Organization (W.H.O.). 1976. Immunological adjuvants. World Health Organization Technical Report Series No. 595. Geneva: WHO, pp.6-8.

Recibido el 25 de agosto de 2004

Aprobado para su publicación el 4 de abril de 2005