

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Doctorado en Ciencias  
Ciencias de la Vida**

---

**Péptidos quiméricos a partir de la unión de diferentes CDR3 de  
VNAR de *Heterodontus francisci* y una alfa conotoxina de  
*Californiconus californicus* con capacidad de unión a  
antígenos: diseño de anticuerpos no naturales (NoNaBodies)**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias

Presenta:

**Salvador Dueñas Espinoza**

Ensenada, Baja California, México  
2023

Tesis defendida por  
**Salvador Dueñas Espinoza**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro**  
Director de tesis

**Dra. Carolina Álvarez Delgado**

**Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez**

**Dr. Aldo Moreno Ulloa**

**Dr. Luis Gabriel Briebe De Castro**

**Dr. Jorge Fernando Paniagua Solís**



---

**Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la vida

---

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Salvador Dueñas Espinoza** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida.

**Péptidos quiméricos a partir de la unión de diferentes CDR3 de VNAR de *Heterodontus francisci* y una alfa conotoxina de *Californiconus californicus* con capacidad de unión a antígenos: diseño de anticuerpos no naturales (NoNaBodies)**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro  
**Director de tesis**

La búsqueda de diversas proteínas capaces de modular rutas metabólicas ha mejorado la detección y tratamiento de múltiples patologías asociadas al mal funcionamiento y sobreexpresión de diferentes metabolitos. Sin embargo, las proteínas de unión a antígeno tienen limitaciones de tamaño, penetrabilidad a tejidos densos y barreras de propiedad intelectual. Para superar las desventajas de las proteínas de unión a antígeno disponibles, la presente investigación tiene como objetivo proporcionar péptidos quiméricos de unión a antígeno mediante la unión de una región determinante de complementariedad 3 (CDR3, por sus siglas en inglés) de dominios variables de nuevo receptor de antígeno (VNAR, por sus siglas en inglés) con una alfa conotoxina. Se obtuvieron seis anticuerpos no naturales (NoNaBodies, por sus siglas en inglés) de los complejos de conotoxina cal14.1a con seis CDR3 de los VNAR de *Heterodontus francisci* y dos NoNaBodies de los VNAR de otras especies de tiburones. Los péptidos cal\_P98Y vs. VEGF<sub>165</sub>, cal\_T10 vs. TGF- $\beta$ , y cal\_CV043 vs. Antígeno carcinoembrionario (CEA) mostraron capacidad de reconocimiento *in silico* e *in vitro*. Mientras que los NoNaBodies cal\_P98Y y cal\_CV043 demostraron la capacidad de neutralizar los antígenos para los que fueron diseñados.

**Palabras clave:** NoNaBody, Péptido quimérico, Miniproteína, fusión de VNAR y conotoxina

Abstract of the thesis presented by **Salvador Dueñas Espinoza** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Science.

**Chimeric peptides from the union of different CDR3 of VNAR of *Heterodontus francisci* and an alpha conotoxin of *Californiconus californicus* with antigen-binding capacity: design of non-natural antibodies (NoNaBodies)**

Abstract approved by:

---

PhD. Alexei Fedorovich Licea Navarro  
**Thesis Director**

The search for various proteins capable of blocking metabolic pathways has improved the detection and treatment of multiple pathologies associated with the malfunction and overexpression of different metabolites. However, antigen binding proteins have limitations. To overcome the disadvantages of available antigen-binding proteins, the present investigation aims to provide chimeric antigen-binding peptides by conjugating a complementarity-determining region 3 (CDR3) of variable domains of new antigen receptors (VNARs) with a conotoxin. Six Non-natural antibody (NoNaBodies) were obtained from the complexes of conotoxin cal14.1a with six CDR3 from the VNARs of *Heterodontus francisci* and two NoNaBodies from the VNARs of other shark species. The peptides cal\_P98Y vs. VEGF<sub>165</sub>, cal\_T10 vs. TGF- $\beta$ , and cal\_CV043 vs. Carcinoembryonic antigen (CEA) showed *in silico* and *in vitro* recognition capacity. Likewise, cal\_P98Y and cal\_CV043 demonstrated the capacity to neutralize the antigens for which they were designed.

**Keywords: NoNaBody, Chimeric Peptide, Miniprotein, VNAR and conotoxin fusion**

## **Dedicatoria**

A mi familia.

## Agradecimientos

Al Centro Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca otorgada.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California por permitirme pertenecer a su programa de posgrado.

Al Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro, por su apoyo y guía a lo largo de todos estos años.

A los miembros de mi comité de tesis: Dr. Aldo Moreno Ulloa, a la Dra. Carolina Álvarez Delgado, al Dr. Carlos Brizuela Rodríguez, al Dr. Jorge Paniagua Solís y al Dr. Luis Gabriel Brieba De Castro, por todo su apoyo y sus valiosas aportaciones durante el desarrollo de este proyecto.

A mi esposa Priscila Meling, por todo el apoyo, cariño y comprensión durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Teresa Escalante, por su ayuda y guía en mi estancia en su laboratorio en el Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica.

A Adriana Mejía, por todo el apoyo y buena disposición en los asuntos administrativos que realicé durante mi paso por CICESE.

A los técnicos y amigos MC. Samanta Jiménez y Dr. Ricardo González por siempre estar ahí.

A mis buenos amigos el Dr. Jahaziel Gasperin y MC. Kee Whun Dan, por todo el apoyo en este trabajo de tesis, fueron una parte importante de mi paso por el doctorado.

A la Dra. Johana Bernáldez, por todo su apoyo y paciencia en mi trabajo de laboratorio en cultivo celular, muchas gracias por el entrenamiento.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xii
Lista de tablas.....	xx
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Justificación.....	3
1.2 Hipótesis.....	3
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
<b>Capítulo 2. Péptidos andamio.....</b>	<b>5</b>
2.1 Método.....	8
2.1.1 Estrategia in silico.....	8
2.1.1.1 Modelado por homología de cal14.1a.....	8
2.1.1.2 Dinámica Molecular.....	8
2.1.2 Estrategia in vitro.....	9
2.1.2.1 Expresión relativa de TNF $\alpha$ .....	9
2.2 Resultados.....	9
2.2.1 Estrategia in silico.....	9
2.2.1.1 Análisis estructural de cal14.1a.....	9
2.3 Resultados.....	11
2.3.1 Estrategia in vitro.....	11
2.3.1.1 Expresión relativa de TNF- $\alpha$ .....	11
<b>Capítulo 3. VEGF<sub>165</sub>.....</b>	<b>13</b>
3.1 Método.....	14
3.1.1 Estrategia in silico.....	14

3.1.1.1	Modelado por homología de cal_P98Y y cal_VSO-4.....	14
3.1.1.2	Modelado por homología del VNAR P98Y y VNAR VSO-4 .....	14
3.1.1.3	Dinámica Molecular .....	14
3.1.1.4	Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking) .....	15
3.1.2	Estrategia in vitro .....	16
3.1.2.1	Ensayo ELISA.....	16
3.1.2.2	Cultivo celular.....	16
3.1.2.3	Generación de esferoides de células endoteliales.....	16
3.1.2.4	Ensayo de angiogénesis in vitro .....	17
3.1.2.5	Análisis estadístico .....	17
3.2	Resultados .....	17
3.2.1	Estrategia in silico.....	17
3.2.1.1	Análisis estructural de la proteína VEGF <sub>165</sub> .....	17
3.2.1.2	Análisis estructural del VNAR P98Y .....	19
3.2.1.3	Análisis de interacción del complejo P98Y/VEGF <sub>165</sub> (control positivo) .....	21
3.2.1.4	Análisis del complejo cal14.1a/VEGF <sub>165</sub> (control negativo).....	22
3.2.1.5	Análisis de interacción del complejo cal14.1a/VEGF <sub>165</sub> .....	22
3.2.1.6	Análisis estructural de la proteína quimérica cal_P98Y .....	24
3.2.1.7	Análisis de interacción del complejo cal_P98Y/VEGF <sub>165</sub> .....	25
3.2.1.8	Análisis estructural del VNAR VSO-4.....	27
3.2.1.9	Análisis de interacción del complejo control positivo VSO-4/VEGF <sub>165</sub> .....	28
3.2.1.10	Análisis estructural de cal_VSO4.....	30
3.2.1.11	Análisis de interacción del complejo cal_VSO4/VEGF <sub>165</sub> .....	32
3.2.2	Estrategia in vitro .....	33
3.2.2.1	Ensayo ELISA.....	33
3.2.2.2	Ensayo de angiogénesis in vitro basado en esferoides tridimensionales de CE .....	34
<b>Capítulo 4.</b>	<b>TGF-<math>\beta</math> .....</b>	<b>36</b>
4.1	Método.....	36
4.1.1	Estrategia In silico.....	36
4.1.1.1	Modelado por homología del VNAR T10 y T21 .....	36
4.1.1.2	Modelado por homología de cal_T10 y cal_T21 .....	36
4.1.1.3	Dinámica Molecular .....	37
4.1.1.4	Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking) .....	37

4.1.2	Estrategia In vitro .....	38
4.1.2.1	Ensayo ELISA.....	38
4.2	Resultados del análisis In silico .....	38
4.2.1	Análisis estructural de TGF- $\beta$ .....	38
4.2.2	Análisis estructural del VNAR T10 .....	40
4.2.3	Análisis de interacción del complejo T10/ TGF- $\beta$ (control positivo) .....	42
4.2.4	Análisis de interacción del complejo cal14.1a/ TGF- $\beta$ (control negativo) .....	43
4.2.5	Análisis estructural de cal_T10.....	44
4.2.6	Análisis de interacción del complejo cal_T10/ TGF- $\beta$ .....	46
4.2.7	Análisis estructural del VNAR T21 .....	47
4.2.8	Análisis de interacción del complejo T21/ TGF- $\beta$ .....	49
4.2.9	Análisis estructural de cal_T21.....	50
4.2.10	Análisis de interacción del complejo cal_T21/ TGF- $\beta$ .....	51
4.3	Resultados del análisis In vitro .....	53
4.3.1	Ensayo ELISA.....	53
<b>Capítulo 5.</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math>.....</b>	<b>54</b>
5.1	Método.....	54
5.1.1	Estrategia In silico.....	54
5.1.1.1	Modelado por homología de cal_T16 .....	54
5.1.1.2	Modelado por homología del VNAR T16.....	54
5.1.1.3	Dinámica Molecular .....	55
5.1.1.4	Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking) .....	55
5.2	Resultados del análisis In silico .....	56
5.2.1	Análisis estructural de TNF- $\alpha$ .....	56
5.2.2	Análisis estructural del VNAR T16 .....	57
5.3	Análisis de interacción del complejo T16/TNF- $\alpha$ (control positivo).....	59
5.3.1	Análisis de la interacción del complejo cal14.1a/TNF- $\alpha$ (control negativo) .....	60
5.3.2	Análisis estructural de cal_T16.....	61
5.3.3	Análisis de la interacción del complejo cal_T16/TNF- $\alpha$ .....	62
<b>Capítulo 6.</b>	<b>PCSK-9.....</b>	<b>64</b>
6.1	Método.....	64
6.1.1	Estrategia In silico.....	64

6.1.1.1	Modelado por homología de cal_PK13 .....	64
6.1.1.2	Modelado por homología del VNAR PK13 .....	64
6.1.1.3	Dinámica Molecular .....	65
6.1.1.4	Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking) .....	65
6.2	Resultados del análisis In silico .....	66
6.2.1	Análisis estructural de PCSK-9.....	66
6.2.2	Análisis estructural del VNAR PK13.....	67
6.2.3	Análisis de interacción del complejo PK13/PCSK-9 (control positivo) .....	68
6.2.4	Análisis de la interacción del complejo cal14.1a/PCSK-9 (control negativo).....	69
6.2.5	Análisis estructural de cal_PK13 .....	71
6.2.6	Análisis de la interacción del complejo cal_PK13/PCSK-9.....	72
<b>Capítulo 7.</b>	<b>Antígeno Carcinoembrionario (CEA) .....</b>	<b>74</b>
7.1	Método.....	74
7.1.1	Estrategia in silico.....	74
7.1.1.1	Modelado por homología de cal_CV043.....	74
7.1.1.2	Modelado por homología del VNAR CV043 .....	74
7.1.1.3	Dinámica Molecular .....	75
7.1.1.4	Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking) .....	75
7.1.2	Estrategia in vitro .....	76
7.2	Resultados .....	77
7.2.1	Estrategia in silico.....	77
7.2.1.1	Análisis de la interacción del complejo CV043/CEA (control positivo) .....	77
7.2.1.2	Análisis de la interacción del complejo cal14.1a/CEA (control negativo) .....	78
7.2.1.3	Análisis de la interacción del complejo cal_CV043/CEA .....	78
7.2.2	Estrategia in vitro .....	79
<b>Capítulo 8.</b>	<b>SPIKE de SARS-CoV-2 .....</b>	<b>81</b>
8.1	Método.....	81
8.1.1	Estrategia in silico.....	81
8.1.1.1	Modelado por homología de cal_D240.....	81
8.1.1.2	Modelado por homología del VNAR D240 .....	81
8.1.1.3	Dinámica Molecular .....	82
8.1.1.4	Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking) .....	82

8.2 Resultados .....	83
8.2.1 Estrategia in silico.....	83
8.2.3 Análisis de la interacción del complejo D240/SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron .....	84
8.2.4 Análisis de la interacción del complejo cal14.1a/SARS-CoV-2 SPIKE Delta.....	85
8.2.5 Análisis estructural del NoNaBody cal_D240 .....	85
8.2.6 Análisis de la interacción del complejo cal_D240/SARS-CoV-2 SPIKE Delta .....	86
8.2.7 Análisis de la interacción del complejo cal_D240/SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron.....	87
<b>Capítulo 9. Proteína quimérica basada en el CDR3 de VNAR de otra especie de tiburón .....</b>	<b>88</b>
9.1 Método.....	88
9.1.1 Estrategia In silico.....	88
9.1.1.1 Modelado por homología de cal_AMA1 .....	88
9.1.1.2 Dinámica Molecular .....	89
9.1.1.3 Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking) .....	89
9.2 Resultados del análisis In silico .....	90
9.2.1 Análisis de la interacción del complejo VNAR/AMA1 (control positivo).....	90
9.2.2 Análisis de la interacción del complejo cal14.1a/AMA1 (control negativo) .....	90
9.2.3 Análisis estructural de cal_ama1.....	91
9.2.4 Análisis de la interacción del complejo cal_AMA1/AMA1 .....	92
9.3 Método.....	94
9.3.1 Estrategia In silico.....	94
9.3.1.1 Modelado por homología de cal_lis.....	94
9.3.1.2 Dinámica Molecular .....	94
9.3.1.3 Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking) .....	95
9.4 Resultados del análisis In silico .....	95
9.4.1 Análisis de la interacción del complejo VNAR/Lisozima (control positivo).....	96
9.4.2 Análisis de la interacción del complejo cal14.1a/Lisozima (control negativo) .....	96
9.4.3 Análisis estructural de cal_lis .....	97
9.4.4 Análisis de la interacción del complejo cal_lis/Lisozima .....	98
<b>Capítulo 10. Discusión.....</b>	<b>100</b>
<b>Capítulo 11. Conclusiones .....</b>	<b>105</b>
11.1 Perspectivas .....	106

**Literatura citada ..... 107**

**Anexos.....114**

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura de la $\alpha$ -conotoxina cal14.1a. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	10
2. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 3) de la $\alpha$ -conotoxina cal14.1a después de la dinámica molecular.....	11
3. Expresión relativa de TNF- $\alpha$ . LPS + IFN $\gamma$ aumenta la expresión relativa de TNF- $\alpha$ . La conotoxina andamio y el NoNaBody cal_P98Y se utilizaron como control negativo en células sin estímulos de LPS + IFN $\gamma$ . Las células estimuladas con LPS + IFN $\gamma$ + cal14.1a reducen la expresión de TNF- $\alpha$ . cal_P98Y + LPS + IFN $\gamma$ no reduce la expresión relativa de TNF $\alpha$ .....	12
4. Estructura del VEGF <sub>165</sub> refinado por dinámica molecular. Cadena A (verde), cadena B (cian).....	17
5. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VEGF <sub>165</sub> . En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	18
6. Gráfico de Ramachandran de la estructura del VEGF <sub>165</sub> después de la dinámica molecular.....	18
7. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VNAR P98Y. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	19
8. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del VNAR P98Y después de la dinámica molecular.....	20
9. Complejos de unión del VNAR P98Y con el VEGF <sub>165</sub> después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en magenta. El VEGF en cian (cadena A) y verde (cadena B).....	21
10. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo P98Y/VEGF <sub>165</sub> . A) Gráficas de la unión del VEGF <sub>165</sub> con el VNAR P98Y, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR. B) Orientación de unión del complejo VNAR P98Y/VEGF <sub>165</sub> .....	21
11. Complejos de unión de la conotoxina cal14.1a con el VEGF <sub>165</sub> después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. Cal14.1a en magenta. El VEGF <sub>165</sub> en cian (cadena A) y verde (cadena B).....	22
12. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/VEGF <sub>165</sub> . A) Gráficas de la unión del VEGF <sub>165</sub> con la $\alpha$ -conotoxina cal14.1a. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/VEGF <sub>165</sub> .....	23

13. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del NoNaBody cal_P98Y. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	23
14. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del NoNaBody cal_P98Y después de la dinámica molecular.....	24
15. Complejos de unión del NoNaBody cal_P98Y con el VEGF <sub>165</sub> después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El NoNaBody en magenta. El VEGF <sub>165</sub> en cian (cadena A) y verde (cadena B).....	25
16. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal_P98Y/VEGF <sub>165</sub> . A) Gráficas de la unión del VEGF <sub>165</sub> con la proteína cal_P98Y, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR. B) Orientación de unión del complejo cal_P98Y/VEGF <sub>165</sub> .....	25
17. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VNAR VS0-4. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	27
18. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 3) del VNAR VS0-4 después de la dinámica molecular.....	28
19. Complejos de unión del VNAR VS0-4 con el VEGF <sub>165</sub> después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en magenta. El VEGF en cian (cadena A) y verde (cadena B).....	28
20. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VS0-4/VEGF <sub>165</sub> . A) Gráficas de la unión del VEGF <sub>165</sub> con el VNAR VS0-4, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR. B) Orientación de unión del complejo VS0-4/VEGF <sub>165</sub> .....	29
21. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del péptido cal_VS04. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	30
22. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del NoNaBody cal_VS04 después de la dinámica molecular.....	31
23. Complejos de unión del péptido cal_VS04 con el VEGF <sub>165</sub> después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en magenta. El VEGF <sub>165</sub> en cian (cadena A) y verde (cadena B).....	32
24. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal_VS04/VEGF <sub>165</sub> . A) Gráficas de la unión del VEGF <sub>165</sub> con el péptido cal_VS04, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR parental. B) Orientación de unión del complejo cal_VS04/VEGF <sub>165</sub> .....	32
25. Ensayo ELISA sándwich de reconocimiento de VEGF <sub>165</sub> por el péptido quimérico cal_P98Y, el VNAR parental V13_P98Y y la proteína andamio cal14.1a.....	34

26. Ensayo de angiogénesis *in vitro* basado en esferoides tridimensionales de células endoteliales (CE) embebidas en gel de colágeno. Esferoides de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tratados con VEGF<sub>165</sub> y el VNAR P98Y y la proteína quimérica cal\_P98Y anti-VEGF<sub>165</sub>. a) Esferoide HUVEC sin tratamiento (medio basal de control (BM)). b) Esferoide estimulado con VEGF<sub>165</sub> (CE + VEGF<sub>165</sub>). c) Control positivo, esferoides estimulados con VEGF<sub>165</sub>, tratados con VNAR P98Y (CE + VEGF<sub>165</sub> + P98Y). d) Esferoides de células endoteliales estimuladas con VEGF<sub>165</sub> y tratadas con el péptido andamio cal14.1a (CE + VEGF<sub>165</sub> + cal14.1a). e) Esferoides de células endoteliales estimuladas con VEGF<sub>165</sub> y tratadas con cal\_P98Y (CE + VEGF<sub>165</sub> + cal\_P98Y). f) Gráfica de la longitud acumulada de brotes (CSL, por sus siglas en inglés) de brotes capilares medidos después de 24 horas de incubación. Los brotes de angiogénesis se inhibieron significativamente ( $p < 0.013$ ) cuando los esferoides se trataron con VNAR P98Y y la proteína quimérica cal\_P98Y..... 35
27. Estructura del TGF- $\beta$  refinado por dinámica molecular. Cadena A (verde), cadena B (cian)..... 39
28. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del TGF- $\beta$ . En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular..... 39
29. Gráfico de Ramachandran de la estructura de TGF- $\beta$  después de la dinámica molecular..... 40
30. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VNAR T10. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular..... 40
31. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del VNAR T10 después de la dinámica molecular..... 41
32. Complejos de unión del VNAR T10 con el TGF- $\beta$  después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en magenta. El TGF- $\beta$  en cian (cadena A) y verde (cadena B)..... 42
33. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR T10/ TGF- $\beta$ . A) Gráficas de la unión del TGF- $\beta$  con la proteína T10. B) Orientación de unión del complejo T10/ TGF- $\beta$ ..... 42
34. Complejos de unión de la conotoxina cal14.1a con el TGF- $\beta$ . después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. La  $\alpha$ -conotoxina en magenta. El TGF- $\beta$ . en cian (cadena A) y verde (cadena B)..... 43

35. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/TGF- $\beta$ . A) Gráficas de la unión del TGF- $\beta$ con la $\alpha$ -conotoxina cal14.1a. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/ TGF- $\beta$ .....	44
36. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura de la proteína cal_T10. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	44
37. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del NoNaBody cal_T10 después de la dinámica molecular.....	45
38. Complejos de unión del NoNaBody cal_T10 con el TGF- $\beta$ después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El péptido cal_T10 en magenta. El TGF- $\beta$ en cian (cadena A) y verde (cadena B).....	46
39. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal_T10/TGF- $\beta$ . A) Gráficas de la unión del TGF- $\beta$ con el péptido cal_T10, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR. B) Orientación de unión del complejo cal_T10/ TGF- $\beta$ .....	46
40. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VNAR T21. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	47
41. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del VNAR T21 después de la dinámica molecular.....	48
42. Complejos de unión del VNAR T21 con el TGF- $\beta$ después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en magenta. El TGF- $\beta$ en cian (cadena A) y verde (cadena B).....	49
43. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR T21/ TGF- $\beta$ . A) Gráficas de la unión del TGF- $\beta$ con la proteína T21. B) Orientación de unión del complejo T21/ TGF- $\beta$ .....	49
44. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del NoNaBody cal_T21. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	50
45. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del péptido cal_T21 después de la dinámica molecular.....	51
46. Complejos de unión del NoNaBody cal_T21 con el TGF- $\beta$ después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El NoNaBody en magenta. El TGF- $\beta$ en cian (cadena A) y verde (cadena B).....	52
47. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal_T21/TGF- $\beta$ . A) Gráficas de la unión del TGF- $\beta$ con el NoNaBody cal_T21, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR. B) Orientación de unión del complejo cal_T21/ TGF- $\beta$ .....	53

48. Ensayo ELISA sándwich de reconocimiento de TGF- $\beta$ por el péptido quimérica cal_T10, el VNAR parental T10 y la conotoxina andamio cal14.1a.....	53
49. Estructura del TNF- $\alpha$ refinado por dinámica molecular. Cadena A (verde), cadena B (cian), Cadena C (magenta).....	56
50. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo TNF- $\alpha$ /TNFR-2. A) Gráficas de la unión del TNFR-2 con la proteína TNF- $\alpha$ . B) Orientación de unión del complejo TNF- $\alpha$ /TNFR-2.....	57
51. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VNAR T16. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	57
52. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del VNAR T16 después de la dinámica molecular.....	58
53. Complejos de unión del VNAR T16 con el TNF- $\alpha$ después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en amarillo. El TNF- $\alpha$ , en cian (cadena A), en verde (cadena B) y en magenta (cadena C).....	59
54. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR T16/TNF- $\alpha$ . A) Gráficas de la unión del VNAR T16 con la proteína TNF- $\alpha$ . B) Orientación de unión del complejo T16/TNF- $\alpha$ .....	59
55. Complejos de unión de la proteína andamio cal14.1a con el TNF- $\alpha$ después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. Cal14.1a en amarillo. El TNF- $\alpha$ , en cian (cadena A), en verde (cadena B) y en magenta (cadena C).....	60
56. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/TNF- $\alpha$ . A) Gráficas de la unión de la proteína andamio cal14.1a con la proteína TNF- $\alpha$ . B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/TNF- $\alpha$ .....	60
57. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del péptido quimérica cal_T16. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	61
58. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del péptido quimérico cal_T16 después de la dinámica molecular.....	62
59. Complejos de unión de la proteína quimérica cal_T16 con el TNF- $\alpha$ después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. Cal_T16 en amarillo. El TNF- $\alpha$ , en cian (cadena A), en verde (cadena B) y en magenta (cadena C).....	63
60. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal_T16/TNF- $\alpha$ . A) Gráficas de la unión del péptido cal_T16 con la proteína TNF- $\alpha$ . B) Orientación de unión del complejo cal_T16/TNF- $\alpha$ .....	63

61. Estructura de PCSK-9 refinado por dinámica molecular.....	66
62. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo PCSK-9/LDLR. A) Gráficas de la unión de PCSK-9 con la proteína LDLR. B) Orientación de unión del complejo PCSK-9/LDLR.....	66
63. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VNAR PK13. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	68
64. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del VNAR PK13 después de la dinámica molecular.....	68
65. Complejos de unión del VNAR PK13 con el PCSK-9 después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en cian. El PCSK-9, en verde.....	69
66. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR PK13/PCSK-9. A) Gráficas de la unión del VNAR PK13 con la proteína PCSK-9. B) Orientación de unión del complejo PK13/PCSK-9.....	69
67. Complejos de unión del andamio cal14.1a con PCSK-9 después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. Cal14.1a en cian. El PCSK-9 en verde.....	70
68. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/PCSK-9. A) Gráficas de la unión de la proteína andamio cal14.1a con la proteína PCSK-9. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/PCSK-9.....	70
69. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del péptido quimérica cal_PK13. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	71
70. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del péptido quimérico cal_PK13 después de la dinámica molecular.....	72
71. Complejos de unión del péptido quimérico cal_PK13 con el PCSK-9 después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. Cal_PK13 en cian. PCSK-9 en verde.....	72
72. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal_PK13/PCSK-9. A) Gráficas de la unión de la proteína andamio cal_PK13 con la proteína PCSK-9. B) Orientación de unión del complejo cal_PK13/ PCSK-9.....	73
73. Estructura del dímero CEA refinado mediante dinámica molecular.....	77
74. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo CV043/CEA. A) Gráficas de la unión de la proteína CEA con el VNAR CV043, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR. B) Orientación de unión del complejo VNAR CV043/CEA.....	77

75.	Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/CEA. A) Gráficas de la unión de la proteína CEA con la $\alpha$ -conotoxina cal14.1a. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/CEA.....	78
76.	Complejos de unión del NoNaBody cal_CV043 con la proteína CEA posterior al análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El NoNaBody en magenta. CEA en cian (cadena A) y verde (cadena B).....	78
77.	Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal_CV043/CEA. A) Gráficas de la unión de la proteína CEA con el NoNaBody cal_CV043. B) Orientación de unión del complejo cal_CV043/CEA.....	79
78.	Ensayo ELISA de reconocimiento de CEA. cal14.1a (control negativo), VNAR CV043 (control positivo), NoNaBody cal_CV043.....	80
79.	Histograma representativo de anti-CEA en dos líneas celulares e índice MFI. Células de cáncer de colon HCT-116 (CEA+) y cáncer de mama MDA-231 (CEA-) se marcaron con anticuerpos anti-CEA (gráfico rojo), VNAR CV043 o el NoNaBody cal_CV043, se evaluó la intensidad de fluorescencia media (MFI). La línea punteada representa la media del control negativo (gráfico azul) solo células con anticuerpo secundario ( $\alpha$ HA-FITC o $\alpha$ Cal suero + $\alpha$ ratón IgG1-AF647).....	80
80.	Estructura refinada por dinámica molecular del SPIKE del virus SARS-CoV-2.....	83
81.	Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR D240/SARS-CoV-2 SPIKE Delta. A) Gráficas de la unión de la proteína SARS-CoV-2 SPIKE Delta con el VNAR D240. B) Orientación de unión del complejo D240/ SARS-CoV-2 SPIKE Delta.....	84
82.	Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR D240/SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron. A) Gráficas de la unión de la proteína SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron con el VNAR D240. B) Orientación de unión del complejo D240/ SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron.....	84
83.	Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/SARS-CoV-2 SPIKE Delta. A) Gráficas de la unión de la proteína SARS-CoV-2 SPIKE Delta con el péptido andamio cal14.1a. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/ SARS-CoV-2 SPIKE Delta.....	85
84.	Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada del péptido quimérico cal_D240 después de la dinámica molecular.....	86
85.	Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal_D240/SARS-CoV-2 SPIKE Delta. A) Gráficas de la unión de la proteína SARS-CoV-2 SPIKE Delta con el NoNaBody cal_D240 B) Orientación de unión del complejo cal_D240/ SARS-CoV-2 SPIKE Delta.....	86
86.	Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal_D240/SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron. A) Gráficas de la unión de la proteína SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron	

con el NoNaBody cal_D240 B) Orientación de unión del complejo cal_D240/ SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron.....	87
87. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR/AMA1. A) Gráficas de la unión del VNAR con la proteína AMA1. B) Orientación de unión del complejo VNAR/AMA1.....	90
88. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/AMA1. A) Gráficas de la unión del péptido andamio con la proteína AMA1. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/AMA1.....	90
89. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del péptido quimérico cal_AMA1. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	91
90. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 3) de la proteína quimérica cal_AMA1 después de la dinámica molecular.....	92
91. Complejos de unión del péptido quimérico cal_AMA1 con el AMA1 después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. cal_AMA1 en cian. AMA1 en verde.....	92
92. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal_AMA1/AMA1. A) Gráficas de la unión de la proteína andamio cal_AMA1 con la proteína AMA1. B) Orientación de unión del complejo cal_AMA1/AMA1.....	93
93. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR/Lisozima. A) Gráficas de la unión del VNAR con la proteína Lisozima. B) Orientación de unión del complejo VNAR/Lisozima.....	96
94. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/Lisozima. A) Gráficas de la unión de cal14.1a con la proteína Lisozima. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/Lisozima.....	96
95. Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del péptido quimérico cal_lis. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.....	97
96. Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del péptido quimérico cal_lis después de la dinámica molecular.....	98
97. Complejos de unión del péptido quimérico cal_lis con Lisozima después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. Cal_lis en cian. Lisozima en verde.....	98
98. Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal_lis/Lisozima. A) Gráficas de la unión de la proteína andamio cal_lis con la proteína Lisozima. B) Orientación de unión del complejo cal_lis/Lisozima.....	99

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. NoNaBodies diseñados utilizando diferentes andamios. El péptido seleccionado como mejor opción para ser utilizado como andamio, el VNAR parental utilizado y el NoNaBody seleccionado se resalta en negritas para ser descrito a detalle en este documento.....	5
2. Conformaciones de la proteína cal14.1a durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas se indica la conformación seleccionada con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.....	10
3. Conformaciones del VNAR P98Y durante la dinámica molecular. La conformación con mayor tiempo de existencia se resalta en negritas.....	20
4. Conformaciones del péptido cal_P98Y durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.....	24
5. Resumen de resultados de las proteínas contra VEGF <sub>165</sub> . En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR P98Y.....	27
6. Conformaciones del VNAR VS0-4 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.....	28
7. Conformaciones del NoNaBody cal_VS04 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia después del análisis de dinámica molecular.....	31
8. Resumen de resultados de las proteínas contra VEGF <sub>165</sub> . En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR VS0-4.....	33
9. Conformaciones del VNAR T10 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas se indica la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.....	41
10. Conformaciones del péptido cal_T10 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia.....	45
11. Resumen de resultados de las proteínas contra TGF- $\beta$ . En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR T10.....	47
12. Conformaciones del VNAR T21 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas se indica la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.....	48
13. Conformaciones del péptido cal_T21 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.....	51

14.	Resumen de resultados de las proteínas contra TGF- $\beta$ . En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR T21.....	52
15.	Conformaciones del VNAR T16 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas el modelo seleccionado con mayor tiempo de existencia después de la dinámica molecular.....	58
16.	Conformaciones del NoNaBody cal_T16 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia durante la dinámica molecular.....	62
17.	Conformaciones del VNAR PK13 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.....	67
18.	Conformaciones del péptido cal_PK13 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.....	71
19.	Resumen de resultados de las proteínas diseñadas contra PCSK-9. En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR PK13.....	73
20.	Conformaciones de la proteína cal_AMA1 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia durante la dinámica molecular.....	91
21.	Resumen de resultados de las proteínas contra AMA1. En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR anti-AMA1.....	93
22.	Conformaciones del NoNaBody cal_lis durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas el modelo con mayor tiempo de existencia durante la dinámica molecular.....	97
23.	Resumen de resultados de las proteínas contra Lisozima. En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR anti-Lisozima.....	99

## Capítulo 1. Introducción

---

El uso de proteínas de unión a antígenos para bloquear o modular vías metabólicas ha mejorado la detección y el tratamiento de diversas patologías asociadas con la sobreexpresión o el mal funcionamiento de diversos metabolitos como el VEGF<sub>165</sub>, TNF- $\alpha$ , CEA, TGF- $\beta$ , entre otros. En comparación con la mayoría de los fármacos comerciales, las proteínas de unión a antígeno tienen una mayor afinidad por los sitios de unión de los blancos moleculares, lo que garantiza una mayor especificidad en el tratamiento o en la detección. Sin embargo, el uso de proteínas de unión a antígeno no está exento de problemas, como los relacionados con su almacenamiento y transporte, dado que la mayoría de las proteínas disponibles son termolábiles (Kholodenko, Kalinovsky, Doronin, Ponomarev & Kholodenko, 2017). Otra limitación de las proteínas de unión a antígeno convencionales es su gran tamaño. En los organismos multicelulares, las proteínas de unión a antígeno a menudo no pueden penetrar las barreras biológicas y, por lo tanto, los efectos de su tratamiento pueden estar limitados a las capas superficiales de los tejidos en los sitios de su aplicación. Se han realizado varias modificaciones a las proteínas de unión a antígeno para reducir las desventajas o limitaciones relacionadas con su uso; sin embargo, la mayoría de estos cambios han tendido a reducir la fuerza de unión al antígeno (Kim, Park & Hong, 2005).

Se han desarrollado diferentes estrategias para generar proteínas capaces de neutralizar dianas moleculares de interés, como los dominios variables de los nuevos receptores de antígenos (VNAR, por sus siglas en inglés) de los anticuerpos de peces cartilaginosos (es decir, los nuevos receptores de antígenos de inmunoglobulinas; IgNAR). A diferencia de los anticuerpos convencionales, los IgNAR son homodímeros de cadena pesada que están unidos por enlaces disulfuro y carecen de cadenas ligeras. Cada cadena pesada contiene un dominio VNAR (cuyo peso molecular es de  $\sim 15$  kDa) y cinco dominios constantes (Saerens, Ghassabeh, & Muyldermans, 2008). Los VNAR se pueden expresar de manera eficiente en bacterias como proteínas activas, solubles y estructuradas. Además, su pequeño tamaño y naturaleza casi globular, y un CDR3 largo (15-30 aminoácidos) les permiten acceder a hendiduras y epítopos de difícil acceso que los fragmentos de anticuerpos no pueden alcanzar. Su alta y rápida permeabilidad también facilita el acceso a tejidos densos (Wu & Senter, 2005). Al igual que con los anticuerpos convencionales, la variabilidad de IgNAR se basa en la región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) del dominio VNAR, cuya longitud puede variar de 5 a 23 residuos de aminoácidos, aunque suelen estar presentes bucles largos de 15 a 30 aminoácidos que normalmente se estabilizan mediante enlaces disulfuro (Holliger & Hudson, 2005).

Los knottins son proteínas de 20 a 50 aminoácidos de longitud que a pesar de su pequeño tamaño, tienen un núcleo de láminas beta anti paralelas estabilizadas por enlaces disulfuro en lugar de un “núcleo hidrofóbico” (Ackerman, Currier, Bergen, & Cochran, 2014; Gracy & Chiche, 2010). Estos enlaces juegan un papel en la estructura y función de los péptidos, ya que, confieren la capacidad de formar estructuras tridimensionales limitadas y bien definidas. Estas estructuras bien definidas pueden aumentar la potencia, la estabilidad, la selectividad y la permeabilidad de las knottins al tiempo que reducen su susceptibilidad a la degradación por proteasas y les permiten bloquear péptidos en conformaciones activas. El mimetismo y la estabilización de estructuras secundarias deben tenerse en cuenta al diseñar inhibidores de interacciones proteína-proteína para objetivos terapéuticos (Northfield et al., 2014). A través del diseño racional y la ingeniería de proteínas, las mini proteínas constituyen andamios privilegiados para el desarrollo de fármacos (Ackerman et al., 2014; Daly & Craik, 2011), ya que comparten características tanto de proteínas (p. ej., plegamiento tridimensional) como de péptidos (p. ej., tamaño pequeño; (Kolmar, 2008; Moore, Leung, & Cochran, 2012).

En esta investigación se propone el uso de un péptido rico en enlaces disulfuro como andamio y diferentes CDR3 de VNAR para generar péptidos quiméricos que mantengan su afinidad por el sitio de unión al antígeno al igual que su VNAR parental, a las que llamamos anticuerpos no naturales (NoNaBodies, por sus siglas en inglés). En la actualidad no existen tecnologías o ideas patentadas similares a las que aquí se presentan. La patente número EP3277810 (Karatt, V.A., McCafferty, J., Surade, S., Luetkens, T., Masters, 2020) contiene información donde se utiliza una idea similar a la de este estudio. El dominio de estructura de diversidad del receptor en la patente EP3277810 es un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo que se fusionó con un dominio donante compuesto por un péptido rico en cisteínas, donde el anticuerpo actúa como acarreador del péptido entrante sin contribuir a la unión al objetivo. La fusión se produce en el CDR del dominio de la cadena ligera. Otros estudios han informado péptidos que no son anticuerpos de otras fuentes que se trasplantaron a marcos de anticuerpos, como la unión de integrina natural en la región VH CDR3 de un anticuerpo humano (Barbas, Laguino y Smith, 1993) y un péptido conocido por unirse al receptor de trombopoyetina (TPO) en varios CDR de un anticuerpo contra el toxoide tetánico (Frederickson et al., 2006).

La presente investigación tiene como objetivo proporcionar una proteína de andamio derivada de una conotoxina capaz de servir como marco para generar péptidos quiméricos de unión a antígeno. Así mismo, para proporcionar una proteína de andamiaje que, mediante la inserción de una secuencia CDR3 de un VNAR, conserve la afinidad por el antígeno específico del VNAR parental.

## 1.1 Justificación

Actualmente, los tratamientos para neutralizar diversos blancos moleculares, se basan en el uso de anticuerpos humanizados de gran tamaño con baja o nula penetración a tejidos. Por lo que el diseño racional de péptidos *in silico* a partir de la unión de un péptido andamio con un CDR3 de VNAR es una alternativa a la creación de diversas moléculas capaces de regular y neutralizar blancos de interés biomédico, ya que, al ser de péptidos de menor tamaño y mayor estabilidad, se espera que tengan mayor capacidad de penetración.

## 1.2 Hipótesis

Los NoNaBodies diseñados racionalmente *in silico* a partir de la unión de una  $\alpha$ -conotoxina con el CDR3 de diversos VNAR de *Heterodontus francisci*, neutralizarán sus blancos moleculares específicos, al igual que sus VNAR parentales.

## 1.3 Objetivos

### Objetivo general

Obtener NoNaBodies diseñados racionalmente para la neutralización de diversos blancos terapéuticos a partir de la unión de una  $\alpha$ -conotoxina con un CDR3 de VNAR.

### Objetivos específicos

- Obtener una proteína de andamio derivada de una conotoxina capaz de servir como marco para generar NoNaBodies de unión a antígeno
- Diseñar y modelar péptidos *in silico* específicos para la neutralización de diversos blancos moleculares a partir de la unión de una  $\alpha$ -conotoxina con varios CDR3 de VNAR.
- Evaluar la capacidad de unión *in silico* de los NoNaBodies diseñados a partir de la unión de una  $\alpha$ -conotoxina con un CDR3 de VNAR de *Heterodontus francisci* con diversos blancos moleculares.

- Evaluar la capacidad de unión *in silico* de los NoNaBodies diseñados a partir de la unión de una  $\alpha$ -conotoxina con un CDR3 de VNAR de otras especies de peces cartilagosos con sus blancos moleculares específicos.
- Evaluar la capacidad neutralizante *in vitro* de diversos blancos moleculares de los NoNaBodies específicos comparados con su VNAR parental.

## Capítulo 2. Péptidos andamio

El objetivo del capítulo 2 fue evaluar los diferentes péptidos utilizados en esta investigación como potencial andamio para la creación de diferentes NoNaBodies. Se evaluaron los péptidos LEAP-II, Guanilina, Endotelina, cal14.1a y FSTI-1. Para las pruebas contra el blanco molecular VEGF<sub>165</sub>, dichos péptidos fueron modificados al agregarles en su secuencia de aminoácidos los CDR3 de cuatro VNAR (VS0-4, VS1-20, V13 y P98Y). Para las pruebas contra TGF- $\beta$  se probaron los diferentes andamios modificados con dos CDR3 de los VNAR T10 y T21 obtenidos de biblioteca sintética. Los NoNaBodies probados contra TNF- $\alpha$  se crearon al unir los péptidos andamio con los CDR3 de VNAR obtenidos de biblioteca inmune Tn43, Tn16 y Tn65. Para las pruebas contra PCSK9, se utilizaron solo los andamios LEAP-II, Guanilina, Endotelina, cal14.1a modificados con el CDR3 de VNAR de PK13. En los análisis contra la proteína RBD del SPIKE del SARS-CoV-2 se utilizaron los andamios LEAP-II, Guanilina y cal14.1a diseñados al unirlos con los CDR3 de los VNAR SP24, SP34 y D240. Para los análisis contra CEA, solo se utilizaron los andamios LEAP-II y cal14.1a y el CDR3 del VNAR CV043. Para las proteínas lisozima y AMA1 solo se utilizó el andamio cal14.1a y los CDR3 de VNAR obtenidos del Protein Data Bank (A07 y 14I-1) (Tabla 1).

**Tabla 1.** NoNaBodies diseñados utilizando diferentes andamios. El péptido seleccionado como mejor opción para ser utilizado como andamio, el VNAR parental utilizado y el NoNaBody seleccionado se resalta en negritas, ya que se describe a detalle en este documento.

Blanco molecular	Péptido andamio	VNAR parental	NoNaBody
<b>VEGF<sub>165</sub></b>	LEAP-II	VS0-4	LEAP_VS04
		VS1-20	LEAP_VS120
		V13	LEAP_V13
		P98Y	LEAP_P98Y
	Guanilina	VS0-4	GUA_VS04
		VS1-20	GUA_VS120
		V13	GUA_V13
		P98Y	GUA_P98Y
	Endotelina	VS0-4	ENDO_VS04
		VS1-20	ENDO_VS120

	<b>Cal14.1a</b>	V13	ENDO_V13	
		P98Y	ENDO_P98Y	
		<b>VS0-4</b>	<b>Cal_VS04</b>	
		VS1-20	Cal_VS120	
		V13	Cal_V13	
		<b>P98Y</b>	<b>Cal_P98Y</b>	
	FSTI-1	VS0-4	FS_VS04	
		VS1-20	FS_VS120	
		V13	FS_V13	
		P98Y	FS_P98Y	
	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	LEAP-II	T10	LEAP_T10
			T21	LEAP_T21
Guanilina		T10	GUA_T10	
		T21	GUA_T21	
Endotelina		T10	ENDO_T10	
		T21	ENDO_T21	
<b>Cal14.1a</b>		<b>T10</b>	<b>Cal_T10</b>	
		<b>T21</b>	<b>Cal_T21</b>	
FSTI-1		T10	FS_T10	
		T21	FS_T21	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>		LEAP-II	Tn43	LEAP_Tn43
			Tn16	LEAP_Tn16
	Tn65		LEAP_Tn65	
	Guanilina	Tn43	GUA_Tn43	
		Tn16	GUA_Tn16	
		Tn65	GUA_Tn65	
	Endotelina	Tn43	ENDO_Tn43	

	<b>Cal14.1a</b>	Tn16	ENDO_Tn16
		Tn65	ENDO_Tn65
		Tn43	Cal_Tn43
		<b>Tn16</b>	<b>Cal_Tn16</b>
		Tn65	Cal_Tn65
<b>PCSK9</b>	LEAP-II	<b>PK13</b>	LEAP_PK13
	Guanilina		GUA_PK13
	Endotelina		ENDO_PK13
	<b>Cal14.1a</b>		<b>cal_PK13</b>
<b>SARS-CoV-2 SPIKE</b>	LEAP-II	SP34	LEAP_SP34
		SP24	LEAP_SP24
		D240	LEAP_D240
	Guanilina	SP34	GUA_SP34
		SP24	GUA_SP24
		D240	GUA_D240
	<b>Cal14.1a</b>	SP34	Cal_SP34
		SP24	Cal_SP24
		<b>D240</b>	<b>Cal_D240</b>
	<b>CEA</b>	LEAP-II	<b>CV043</b>
<b>Cal14.1a</b>		<b>Cal_CV043</b>	
<b>Lisozima</b>	<b>Cal14.1a</b>	<b>A07</b>	<b>Cal_Lis</b>
<b>AMA1</b>	<b>Cal14.1a</b>	<b>14I-1</b>	<b>Cal_AMA1</b>

A continuación, se presenta el proceso de modelado, análisis *in silico* y pruebas *in vitro* de la alfa conotoxina cal14.1a, ya que fue el péptido que presentó mejores características para su uso como andamio para la creación de NoNaBodies.

## 2.1 Método

### Estrategia *in silico*

#### 2.1.1.1 Modelado por homología de cal14.1a

Se realizó el modelado de la conotoxina cal14.1a. La estructura tridimensional fue construida con el software MODELLER v.9.19 mediante el protocolo de “Advanced Modeling for multiple templates”. Para dicho procedimiento fue necesario realizar un alineamiento en BLAST-P para identificar las estructuras andamios para el modelado por homología. Se basó en tres distintas proteínas andamio de diferentes conotoxinas con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 1FEO (Goldenberg, Koehn, Gilbert, & Wagner, 2001), 1OMG (Kohno et al., 1995), y 1MVI (Nielsen, Thomas, Lewis, Alewood, & Craik, 1996).

#### 2.1.1.2 Dinámica Molecular

La estructura tridimensional del péptido andamio cal14.1a se refinó mediante el procedimiento de “simulated annealing” con el software Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD) (Phillips et al., 2005), seguido del análisis y visualización con los softwares Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996) y PyMOL Molecular Graphics System v2.2.2 para Mac OS X. Los parámetros del campo de fuerza para la simulación se aplicaron utilizando la herramienta informática Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM34). Para el control de calidad de las estructuras modeladas, se realizó el análisis estructural con la herramienta en línea PROCHECK. Las simulaciones se realizaron en una caja de moléculas de agua TIP3P como solvente con condiciones de contorno periódicas, donde se supone un ensamble NPT (un número constante de partículas (N), condiciones isobáricas (P) e isotérmicas (T) constantes). La presión se ajustó a 1 atm y la temperatura a 310 K. Estas condiciones se unieron a pasos de recocido y relajación de forma iterativa. Después del recocido y enfriamiento, la conotoxina se sometió a un análisis de dinámica molecular a 310 K y 1 atm durante 50 ns. El análisis de las coordenadas de trayectoria atómica y las energías se escribieron en el disco cada 10 ps. Se seleccionó la conformación del péptido con el mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.

## **Estrategia *in vitro***

### **2.1.1.3 Expresión relativa de TNF $\alpha$**

Para evaluar si existía alteración en la expresión de genes pro-inflamatorios, se valoró el efecto de la actividad de cada toxina sintética en la expresión del gen TNF $\alpha$  empleando la línea celular THP-1. Un total de  $2 \times 10^5$  células fueron expuestas a 50 nM PMA (Sigma) por 24h a 37 C, 5% CO<sub>2</sub> para su diferenciación a macrófagos (M0) previo a la adición de cada tratamiento. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y nuevo medio sin PMA fue adicionado 24h antes de cada tratamiento. Para favorecer la polarización a macrófagos pro-inflamatorios (M1), las células fueron expuestas por 24h a 100 ng/mL de LPS y 100 IU rh-IFN $\gamma$ , el efecto de cada toxina fue evaluado en células M0 y M1 empleando una concentración final de 5  $\mu$ M de cada péptido recombinante a cada condición por 24h en duplicado.

Se extrajo el ARN total empleando el reactivo TRI (Sigma) de acuerdo a las especificaciones del fabricante y 0.5  $\mu$ g fueron retrotranscritos empleando el kit superscript III (Invitrogen). La expresión del gen TNF $\alpha$  fue evaluada para cada tratamiento empleando  $\beta$ -actina como gen de referencia.

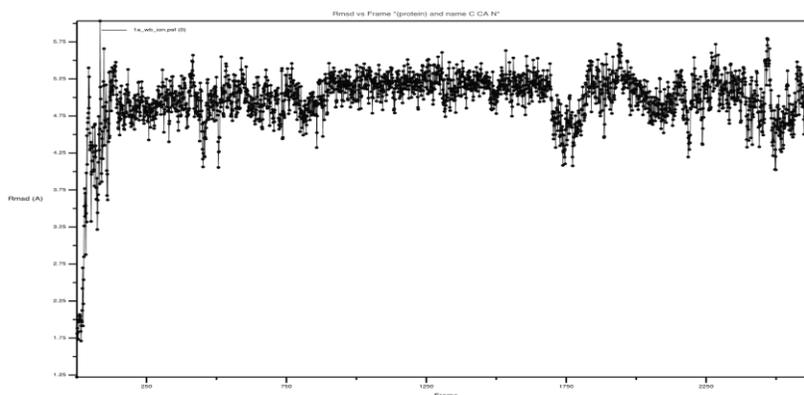
## **2.2 Resultados**

### **Estrategia *in silico***

#### **2.2.1.1 Análisis estructural de cal14.1a**

La  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a es una proteína de 17 aminoácidos, cuenta con 2 enlaces disulfuro entre la Cys3-Cys12 y Cys7-Cys17, los que le confieren una alta estabilidad estructural, por lo que la convierte en un andamio idóneo para el diseño racional de proteínas. La conotoxina cal14.1a no ha sido resuelta por NMR o cristalografía de rayos X, por lo que se tuvo que realizar el modelado por homología con el programa MODELLER. Posteriormente se refinó el modelo durante 50 ns utilizando el software NAMD. Respecto al análisis de la fluctuación global de la estructura durante la dinámica, se observaron valores de RMSD (Root-mean-square deviation) estables después de 2 ns de la simulación, donde cada una de las estructuras de la simulación no muestran una diferencia mayor a 1.5 Å (Figura 1).

En la Tabla 2 se muestran las diferentes conformaciones de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a a lo largo de la dinámica molecular. Se seleccionó la conformación número 3, ya que fue la estructura que apareció durante más tiempo en la simulación con 17.40 ns.



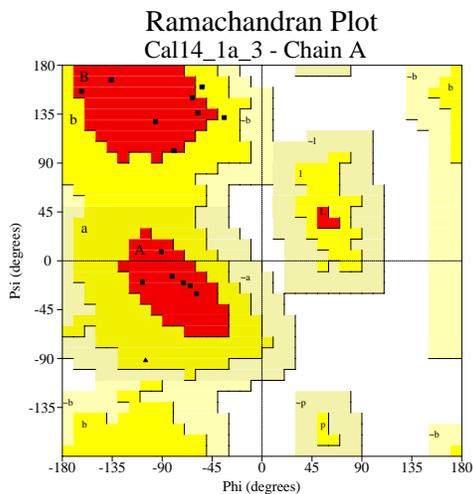
**Figura 1.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a. En el eje “X” se indican los Armstrong y en el eje “Y” el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

**Tabla 2.** Conformaciones de la proteína cal14.1a durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas se indica la conformación seleccionada con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.

Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1	315	6.30
2	667	13.34
3	<b>870</b>	<b>17.40</b>
4	538	10.76
5	110	2.20

Posteriormente al refinamiento del modelo de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a se procedió a analizar la calidad de la conformación 3 mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura

2). El modelo obtuvo 11 residuos en regiones altamente favorecidas (91.7 %), 1 residuo en regiones adicionales permitidas (8.3 %) y ningún residuo (0 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad del modelo fue buena para los análisis posteriores.



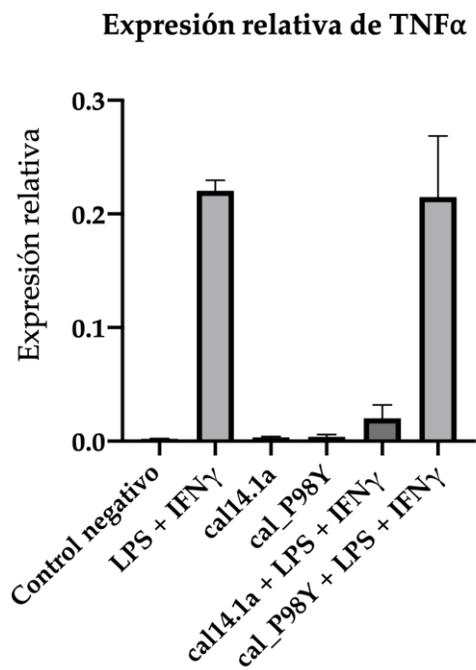
**Figura 2.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 3) de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a después de la dinámica molecular.

## 2.3 Resultados

### Estrategia *in vitro*

#### 2.3.1.1 Expresión relativa de TNF- $\alpha$

Se observa que ambos péptidos por sí solos no favorecen la expresión de TNF- $\alpha$  en células no expuestas a estímulos pro-inflamatorios (M0). Sin embargo, en presencia de estímulo pro-inflamatorio, el péptido cal14.1a disminuye significativamente la expresión TNF- $\alpha$  mientras que el NoNaBody cal\_P98Y no modifica la expresión inducida por LPS e IFN $\gamma$  (Figura 3).



**Figura 3.** Expresión relativa de TNF- $\alpha$ . LPS + IFN $\gamma$  aumenta la expresión relativa de TNF- $\alpha$ . La conotoxina andamio y el NoNaBody cal\_P98Y se utilizaron como control negativo en células sin estímulos de LPS + IFN $\gamma$ . Las células estimuladas con LPS + IFN $\gamma$  + cal14.1a reducen la expresión de TNF- $\alpha$ . cal\_P98Y + LPS + IFN $\gamma$  no reduce la expresión relativa de TNF $\alpha$ .

### Capítulo 3. VEGF<sub>165</sub>

---

El objetivo del capítulo 3 fue analizar la interacción de proteínas diseñadas a partir de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a y el CDR3 de los VNAR P98Y y VS0-4 con la isoforma 165 del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF<sub>165</sub>). Para lograr el análisis, se realizó el modelado por homología de las proteínas quiméricas con el programa MODELLER (Webb & Sali, 2016).

Posteriormente, se llevó a cabo el refinamiento mediante simulaciones de dinámica molecular con el software NAMD (Phillips et al., 2005). Para el blanco molecular, se utilizó la estructura cristalográfica modificada del VEGF<sub>121</sub> (Muller et al., 1997), al cual se le agregó el dominio de unión a heparina del VEGF<sub>165</sub> previamente publicado (Stauffer, Skelton, & Fairbrother, 2002).

Una vez obtenidas las estructuras, se procedió a realizar el análisis de interacción proteína-proteína (Docking), con el programa ClusPro (PIPER) (Desta, Porter, Xia, Kozakov, & Vajda, 2020; Kozakov et al., 2013, 2017; Vajda et al., 2017). En dicho procedimiento se evaluaron diferentes zonas de unión y orientación con la finalidad de encontrar la conformación estructural óptima.

Para lograr encontrar la mejor conformación estructural se llevó a cabo a través de dos etapas del docking. La primera etapa consistió en los patrones de contacto y la segunda etapa se basó en el análisis energético de las regiones de contacto de cada una de las proteínas en la plataforma ROSIE (Rossetta) (London, Raveh, Movshovitz-Attias, & Schueler-Furman, 2010; Lyskov et al., 2013; Sedan, Marcu, Lyskov, & Schueler-Furman, 2016b).

A modo de control positivo, se analizó la interacción del VNAR P98Y y el VNAR VS0-4 con la proteína VEGF<sub>165</sub>, la cual dio una energía de unión de referencia. Ya que, dichos VNAR se han evaluado *in silico*, *in vitro* e *in vivo* como inhibidor del VEGF<sub>165</sub> (Cabanillas-Bernal et al., 2019; Millán-gómez et al., 2018). Así mismo, a manera de control negativo, se realizó el análisis de la interacción de la proteína andamio cal14.1a con el VEGF<sub>165</sub>.

## 3.1 Método

### Estrategia *in silico*

#### 3.1.1.1 Modelado por homología de cal\_P98Y y cal\_VS0-4

Se realizó el modelado de las proteínas quiméricas cal\_P98Y y cal\_VS0-4, al unir el péptido andamio cal14.1a con el CDR3 de la VNAR P98Y y VS04 respectivamente. Las estructuras tridimensionales fueron construidas con el software MODELLER v.9.19 mediante el protocolo de “Advanced Modeling for multiple templates”. Para dicho procedimiento fue necesario realizar un alineamiento en BLAST-P para identificar las estructuras andamios para el modelado por homología. La construcción de cal\_P98Y y cal\_VS04 se basó en tres distintas proteínas andamio de diferentes conotoxinas con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 1FEO (Goldenberg, Koehn, Gilbert, & Wagner, 2001), 1OMG (Kohn et al., 1995), y 1MVI (Nielsen, Thomas, Lewis, Alewood, & Craik, 1996).

#### 3.1.1.2 Modelado por homología del VNAR P98Y y VNAR VS0-4

La estructura tridimensional del VNAR P98Y y VS0-4 se predijo mediante modelado basado en homología usando el software MODELLER v.9.18 (Webb & Sali, 2016), a través de la estrategia "Advanced Modeling". BLAST-P se utilizó para identificar las posibles estructuras andamio para el modelado. El VNAR P98Y y VS04 se modelaron con base en tres estructuras de proteínas diferentes de VNAR reportadas con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 4HGK (Kovalenko et al., 2013), 2I26 y 2I24 (Stanfield, Dooley, Verdino, Flajnik, & Wilson, 2007).

#### 3.1.1.3 Dinámica Molecular

Posterior al modelado por homología, la estructura tridimensional de las proteínas quiméricas y los VNAR parentales se refinaron mediante el procedimiento de “simulated annealing” con el software Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD) (Phillips et al., 2005), seguido del análisis y visualización con los softwares Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996) y PyMOL Molecular Graphics System v2.2.2 para Mac OS X. Los parámetros del campo de fuerza para la simulación se aplicaron

utilizando la herramienta informática Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM34). Para el control de calidad de las estructuras modeladas, se realizó el análisis estructural con la herramienta en línea PROCHECK. Las simulaciones se realizaron en una caja de moléculas de agua TIP3P como solvente con condiciones de contorno periódicas, donde se supone un ensamble NPT (un número constante de partículas (N), condiciones isobáricas (P) e isotérmicas (T) constantes).

La presión se ajustó a 1 atm y la temperatura a 310 K. Estas condiciones se unieron a pasos de recocido y relajación de forma iterativa. Después del recocido y enfriamiento, los NoNabodies y los VNAR parentales se sometieron a un análisis de dinámica molecular a 310 K y 1 atm durante 50 ns. El análisis de las coordenadas de trayectoria atómica y las energías se escribieron en el disco cada 10 ps. Se seleccionó la conformación de proteínas con el mayor tiempo de existencia de cada una de las proteínas durante la dinámica.

#### ***3.1.1.4 Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking)***

Para predecir el posible sitio de unión de cal\_P98Y y cal\_VS04 a VEGF<sub>165</sub> se aplicó un protocolo de acoplamiento proteína-proteína, utilizando la herramienta web ClusPro (PIPER) (Desta et al., 2020; Kozakov et al., 2013, 2017; Vajda et al., 2017). En dicho procedimiento se evaluaron diferentes zonas. El algoritmo de acoplamiento evalúa diferentes complejos putativos con complementariedades de superficie favorables. Los complejos obtenidos se filtraron, seleccionando aquellos con buena energía electrostática y libres de desolvatación para su posterior agrupamiento.

Para la visualización y selección de los mejores resultados se utilizó PyMOL Molecular Graphics System para Mac OS X. Se eligió el complejo con mejor afinidad y orientación de unión del VEGF<sub>165</sub>/cal\_P98Y y VEGF<sub>165</sub>/cal\_VS04. Para identificar las regiones predichas de interacción proteína-proteína (PPI), se utilizó la herramienta “Peptiderive” en el servidor ROSIE (Rossetta), con la configuración predeterminada por el desarrollador. Para el cálculo del acoplamiento, “Peptiderive” proporcionó un gráfico con los posibles residuos de interacciones proteína-proteína involucrados en la interacción, clasificados de acuerdo con la función de puntuación de Rosetta – Unidades de energía de Rosetta (REU, Rosetta Energy Units)(Sedan et al., 2016b; Veresov, 2016).

## **Estrategia *in vitro***

### **3.1.2.1 Ensayo ELISA**

Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de VEGF<sub>165</sub> (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS) en 9 pozos de la placa y se dejó incubar a 37 °C por 1 hora. Posteriormente se descartó el PBS. Se realizó el bloqueo con 200  $\mu\text{L}$  de PBS con BSA 3% durante toda la noche a 4 °C (Se agregaron 3 pozos como blanco para cada proteína). Se descartó el PBS con BSA 3% y se agregó el péptido quimérico (cal\_P98Y a 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS), el VNAR P98Y (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS) y la proteína andamio cal14.1a por triplicado en un volumen de 50  $\mu\text{L}$  por pozo. Se incubó a 37 °C por 1 hora. Se descartó el líquido y se lavó 3 veces con 200  $\mu\text{L}$  de PBS Tween 0.05%. Posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{L}$  del anticuerpo anti-cal<sub>14</sub> 1/100 (8  $\mu\text{L}$  en 7920  $\mu\text{L}$  de PBS Tween) a la quimera y a la proteína andamio. Se agregó PBS Tween 0.05% BSA 1% al VNAR. Se incubó a 37 °C por 1 hora. Se descartó el líquido y se lavó 3 veces con 200  $\mu\text{L}$  de PBS Tween. Posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-ratón 1:1000 en PBS Tween 0.05% BSA 1% para la quimera cal\_P98Y, la proteína andamio cal14.1a y anticuerpo anti HA con peroxidasa 1:1000 en PBS Tween BSA 1% el VNAR en cada uno de los pozos y se dejó incubar durante 1 hora a 37 °C. Se tiró el líquido y se lavó 5 veces con 200  $\mu\text{L}$  de PBS Tween 0.05% para posteriormente revelar la placa con 50  $\mu\text{L}$  de 1-Step Turbo TMB-ELISA por pozo, se dejó incubar durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de HCL 1N en cada pozo. Se realizó la lectura de la placa a 450 nm con el equipo Epoch de BioTek.

### **3.1.1.2 Cultivo celular**

Las células endoteliales (HUVEC) se cultivaron a 37 °C (5% CO<sub>2</sub>, 100% humedad), en placa de cultivo de 100 mm, con medio de crecimiento de células endoteliales (ECGM) suplementado con 10 % suero fetal de ternero (SCF) inactivado por calor.

### **3.1.1.3 Generación de esferoides de células endoteliales**

Una monocapa confluyente de células HUVEC se separó utilizando tripsina. Un número definido de células. (400 células aproximadamente) se suspendieron en medio ECGM con 0.25 % (p/v) carboximetilcelulosa y se cultivaron en placas de 96 pozos de fondo redondo no adherente. Bajo estas condiciones, todas las

células contribuyen a la formación de un solo esferoide por pozo, de tamaño y número de células definido. Los esferoides se cultivaron por al menos 24 h a 37 °C (5% CO<sub>2</sub>, 100% humedad) (Korff, 2004).

#### **3.1.1.4 Ensayo de angiogénesis *in vitro***

Se cuantificó la angiogénesis *in vitro* en gel de colágeno utilizando esferoides de células endoteliales. Se generaron esferoides y se embebieron en geles de colágeno. Se preparó un stock de colágeno y se mezcló con una cantidad igual de ECGM, que contenga 0.5% (p/v) de carboximetilcelulosa (para prevenir la sedimentación de los esferoides antes de la polimerización del gel de colágeno), 50 esferoides y los anticuerpos VNAR y/o tratamientos a evaluar. El gel que contenga los esferoides se transfiere rápidamente a una placa de 24 pozos para permitir la polimerización, después de esta, 0.1 ml de medio basal ECGM se pipeteó sobre la superficie del gel. Los geles se incubaron a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 100% humedad. Después de 24 h, la angiogénesis *in vitro* se cuantificó digitalmente midiendo la longitud de las ramificaciones que han crecido de cada esferoide, utilizando al menos 10 esferoides por grupo experimental (Korff, 2004).

#### **3.1.1.5 Análisis estadístico**

La diferencia en la longitud de las ramificaciones entre los diferentes grupos experimentales se analizó utilizando la prueba t para muestras independientes.

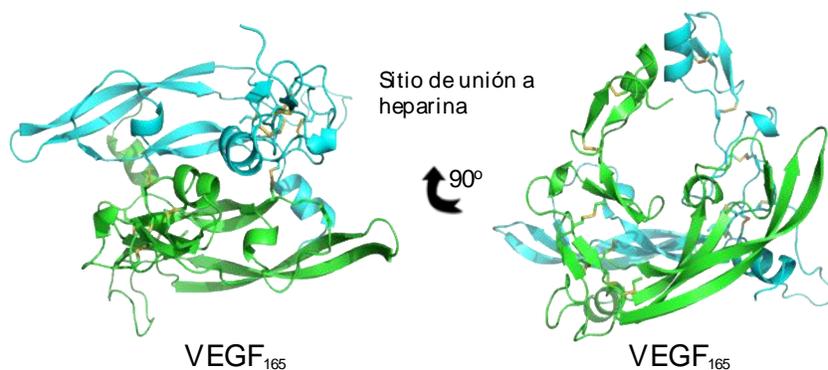
## **3.2 Resultados**

### **Estrategia *in silico***

#### **3.2.1.1 Análisis estructural de la proteína VEGF<sub>165</sub>**

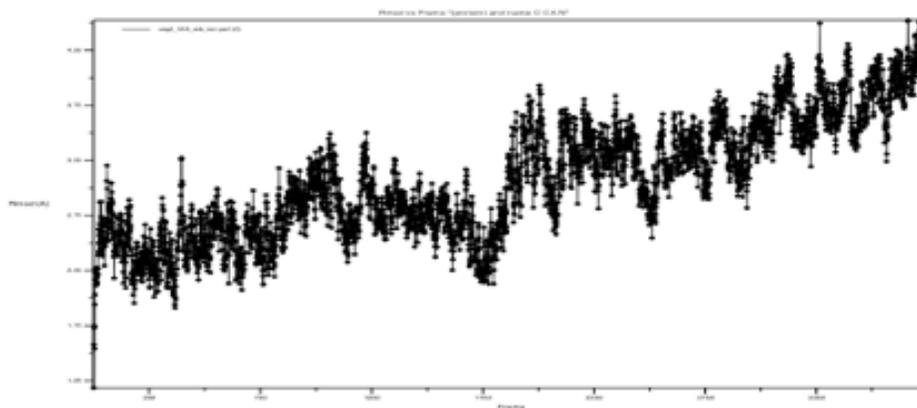
Para realizar el análisis estructural del VEGF<sub>165</sub>, fue necesario modelar por homología la isoforma 165 del VEGF, ya que no hay una estructura resuelta por NMR o difracción de rayos X. Se descargó la estructura del VEGF<sub>121</sub> resuelta por cristalografía de rayos X, con una resolución de 2.5Å, con PDB ID 1VPF (Muller et al., 1997) y la estructura del dominio de unión a heparina del VEGF<sub>165</sub> resuelta por NMR (Stauffer et al., 2002)

con PDB ID 1KMX del RCSB Protein Data Bank. Posteriormente, se realizó la unión de las dos estructuras y se refinó la estructura cristalográfica en el programa NAMD, la cual consistió en una simulación de 50 ns a temperatura y presión constante (Figura 4).



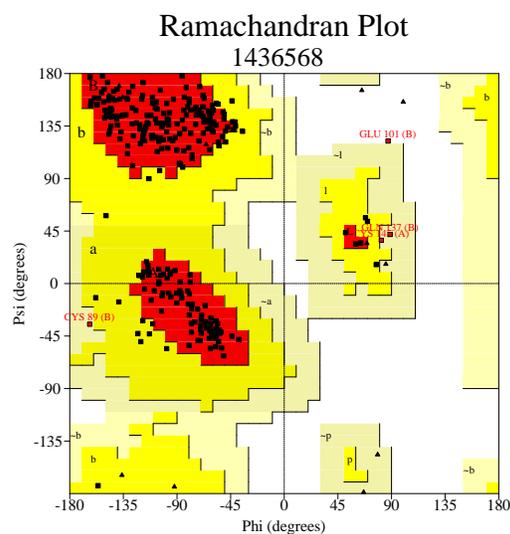
**Figura 4.** Estructura del VEGF<sub>165</sub> refinado por dinámica molecular. Cadena A (verde), cadena B (cian).

Respecto a la fluctuación global de la estructura del VEGF<sub>165</sub>, la Figura 5 muestra la estabilidad del sistema a lo largo de la dinámica donde obtuvo valores de RMSD (Root-mean-square deviation) de 2.45 Å de fluctuación. Cuanto menor es el valor de RMSD la estructura es más estable.



**Figura 5.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VEGF<sub>165</sub>. En el eje "X" se indican los picosegundos y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

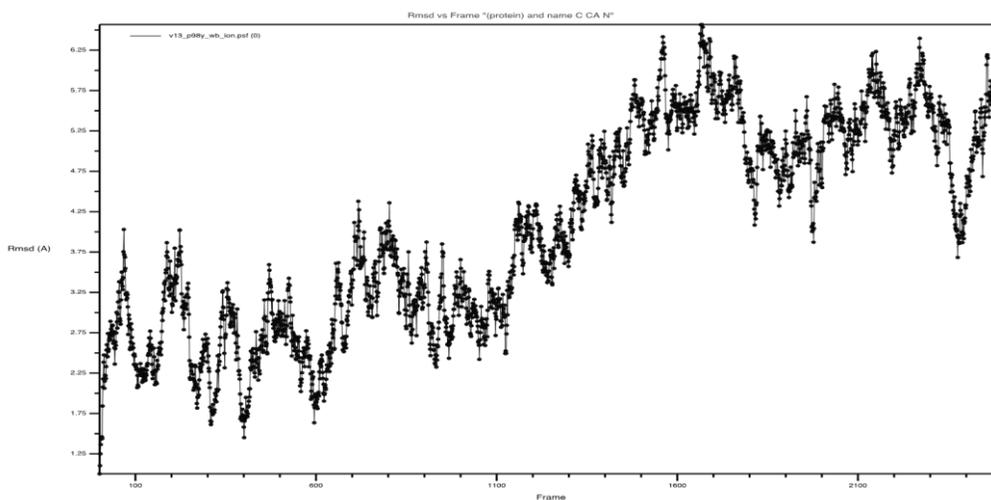
Posteriormente al refinamiento de la estructura cristalográfica del VEGF<sub>165</sub> se analizó la calidad de la estructura seleccionada de las diferentes conformaciones obtenidas en la dinámica mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura 6). La estructura presenta 245 residuos en regiones altamente favorecidas (92.1 %), 17 residuos en regiones adicionales permitidas (6.4 %) y solo un residuo (0.4 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad de la estructura se considera buena para los análisis posteriores.



**Figura 6.** Gráfico de Ramachandran de la estructura del VEGF<sub>165</sub> después de la dinámica molecular.

### 3.2.1.2 Análisis estructural del VNAR P98Y

El VNAR P98Y es una proteína de 123 aminoácidos, la cual no ha sido resuelta por resonancia magnética nuclear (NMR), ni por cristalografía de rayos X, por lo que se modeló por homología con el programa MODELLER, para posteriormente refinar el modelo durante 50 ns utilizando el software NAMD. En el análisis de fluctuación global de la estructura del VNAR P98Y (Figura 7), se observó una variación de los valores de RMSD que van de los 1.5 Å a los 6.5 Å. En la gráfica se identificó que la estructura se estabiliza en dos tiempos determinados, lo que sugiere que la estructura del VNAR P98Y puede tener dos conformaciones estables a lo largo de la dinámica. Esto se puede deber a la longitud del CDR3 de 26 aminoácidos.

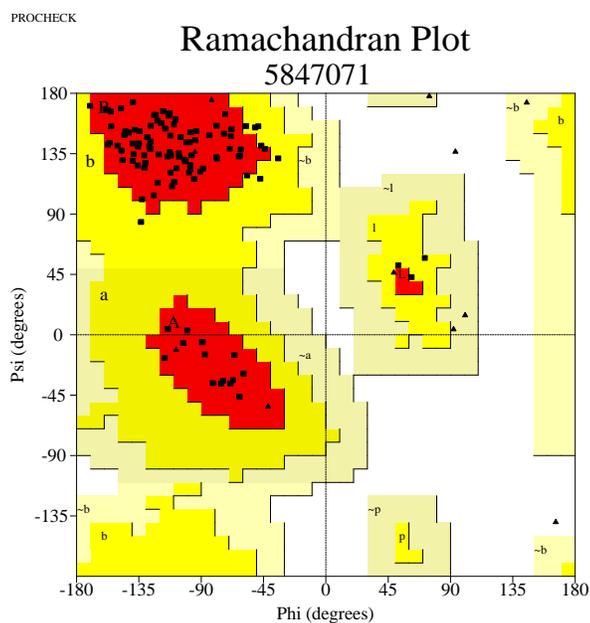


**Figura 7.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VNAR P98Y. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

En la Tabla 3 se muestran las diferentes conformaciones del VNAR P98Y a lo largo de la dinámica. Se seleccionó la conformación número 1, ya que fue la estructura que apareció durante más tiempo en la simulación con 23.36 ns.

**Tabla 3.** Conformaciones del VNAR P98Y durante la dinámica molecular. La conformación con mayor tiempo de existencia se resalta en negritas.

	Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1		<b>1168</b>	<b>23.36</b>
2		545	10.90
3		329	6.58
4		260	5.20
5		199	3.96

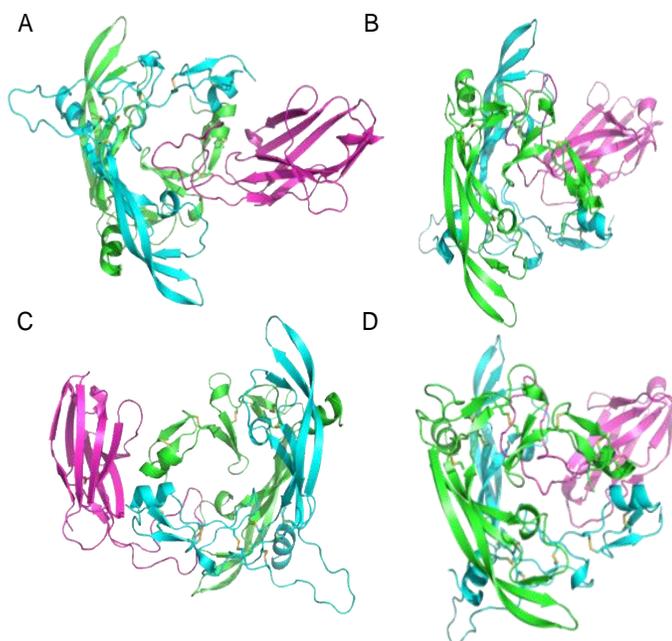


**Figura 8.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del VNAR P98Y después de la dinámica molecular.

Posteriormente al refinamiento del modelo del VNAR P98Y se analizó la calidad de la conformación 1 mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura 8). El modelo obtuvo 96 residuos en regiones altamente favorecidas (89.7 %), 11 residuos en regiones adicionales permitidas (10.3 %) y ningún residuo (0 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad del modelo fue buena para los análisis posteriores.

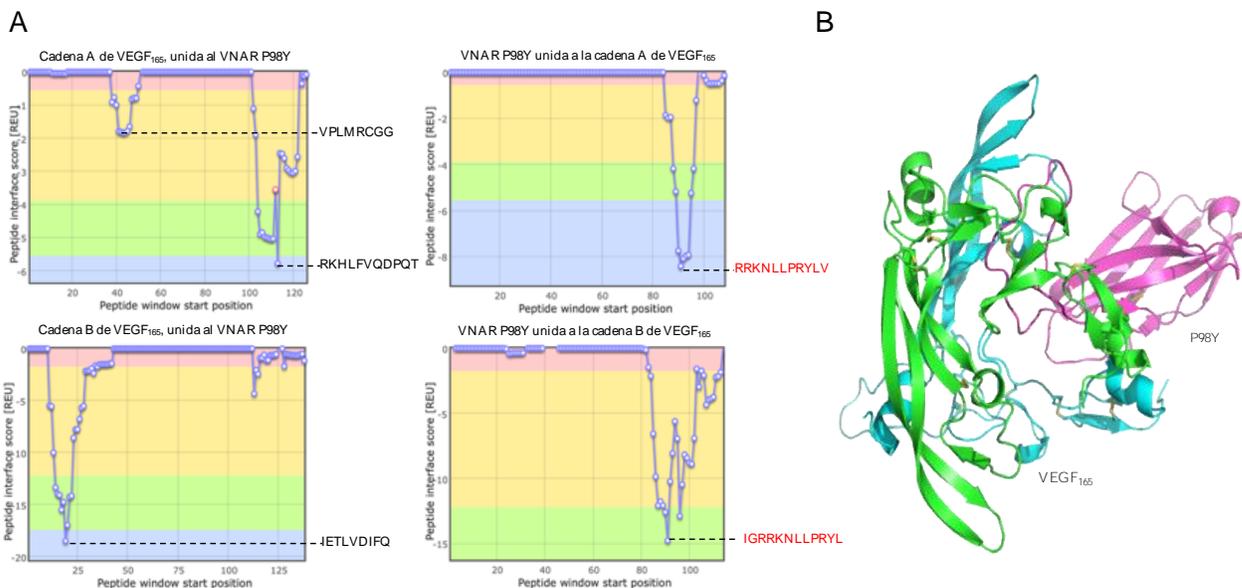
### 3.2.1.3 Análisis de interacción del complejo P98Y/VEGF<sub>165</sub> (control positivo)

Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión, se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión del VNAR con el VEGF<sub>165</sub>, en la plataforma ROSIE.



**Figura 9.** Complejos de unión del VNAR P98Y con el VEGF<sub>165</sub> después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en magenta. El VEGF en cian (cadena A) y verde (cadena B).

En la Figura 10A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas del VEGF<sub>165</sub> con el VNAR P98Y el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-45.98 REU** (Rossetta Energy Units, unidad arbitraria dada por el programa ROSIE que indica la afinidad entre moléculas, a menor puntaje, mayor afinidad). En la Figura 10B, se observa la orientación de unión del VNAR con respecto a su blanco.



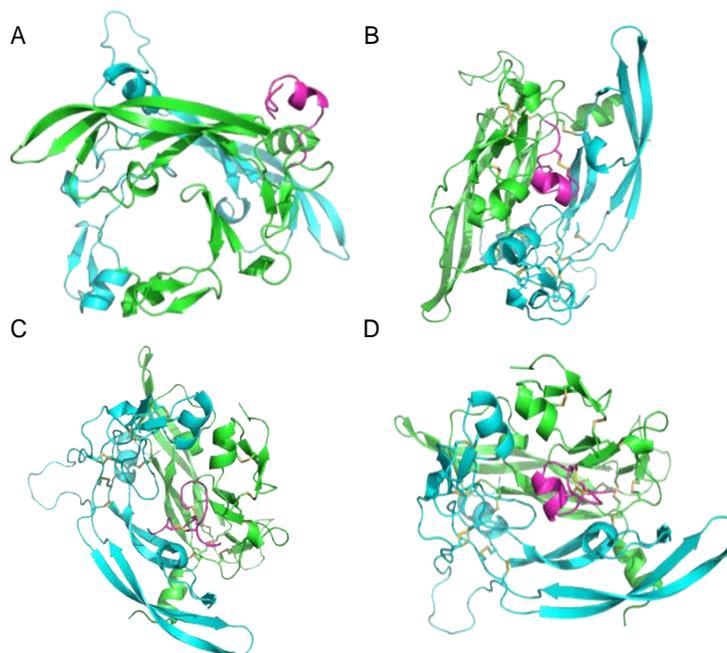
**Figura 10.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo P98Y/VEGF<sub>165</sub>. A) Gráficas de la unión del VEGF<sub>165</sub> con el VNAR P98Y, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR. B) Orientación de unión del complejo VNAR P98Y/VEGF<sub>165</sub>.

### 3.2.1.4 Análisis del complejo cal14.1a/VEGF<sub>165</sub> (control negativo)

Se utilizó la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a como control negativo, ya que esta proteína fue utilizada como andamio para el diseño racional de las diferentes proteínas a probar como inhibidoras del VEGF<sub>165</sub>.

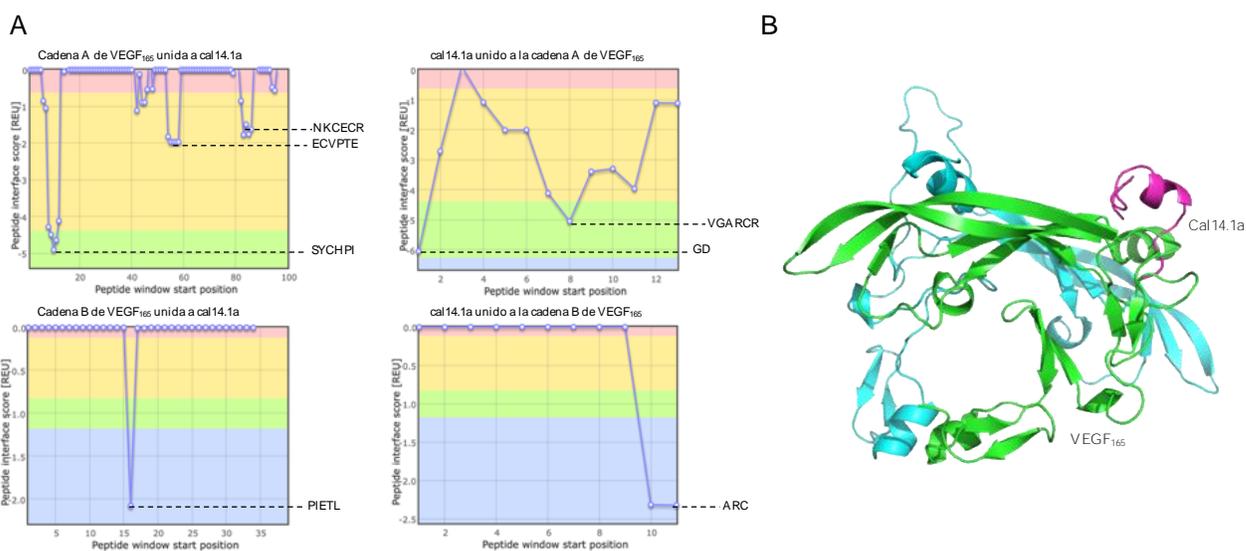
### 3.2.1.5 Análisis de interacción del complejo cal14.1a/VEGF<sub>165</sub>

Se realizó el Docking proteína-proteína de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco VEGF<sub>165</sub>. Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción obtenidos con el software ClusPro (PIPER) (Figura 11), con la finalidad de encontrar las posibles zonas de unión y la orientación óptima de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina con el VEGF<sub>165</sub>. La unión que presentó mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo D.



**Figura 11.** Complejos de unión de la conotoxina cal14.1a con el VEGF<sub>165</sub> después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. Cal14.1a en magenta. El VEGF<sub>165</sub> en cian (cadena A) y verde (cadena B).

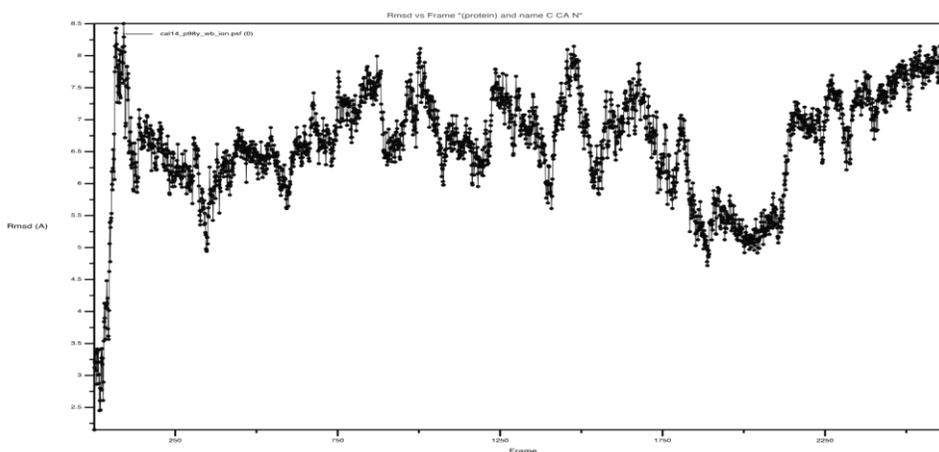
Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión, se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a con el VEGF<sub>165</sub>, en la plataforma ROSIE. En la Figura 12A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas del VEGF<sub>165</sub> con cal14.1a, el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-14.88 REU**. En la Figura 12B, se observa la orientación de unión de cal14.1a con respecto a su blanco.



**Figura 12.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/VEGF<sub>165</sub>. A) Graficas de la unión del VEGF<sub>165</sub> con la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/VEGF<sub>165</sub>.

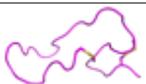
### 3.2.1.6 Análisis estructural de la proteína quimérica cal\_P98Y

Se modeló la unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a con el CDR3 del VNAR P98Y con el programa MODELLER y refinada con el programa NAMD durante 50 ns. Dicha proteína se denominó cal\_P98Y. Respecto a su análisis de fluctuación global, se puede observar en la Figura 13 que la mayor oscilación de valores de RMSD son de 2.5 Å (de 5.5 Å a 8 Å). La estructura es estable a lo largo de la simulación. Al realizar la selección de la conformación más estable, se pudo observar que la conformación 1 apareció 1304 veces con un tiempo de existencia de 26.08 ns (Tabla 4), lo que indica que más del 50% de las estructuras en la simulación mantienen buena estabilidad.

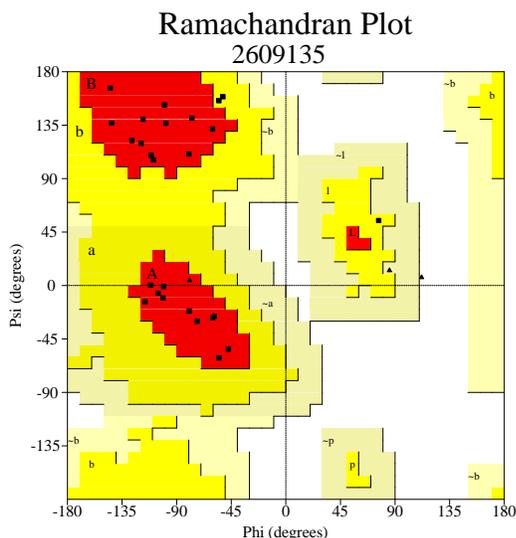


**Figura 13.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del NoNaBody cal\_P98Y. En el eje “X” se indican los Armstrong y en el eje “Y” el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

**Tabla 4.** Conformaciones del péptido cal\_P98Y durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.

Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1 	<b>1304</b>	<b>26.08</b>
2 	517	10.34
3 	199	3.98
4 	138	2.76
5 	87	1.74

Posterior al refinamiento del modelo de la proteína cal\_P98Y se procedió a analizar la calidad de la conformación 1 mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura 14). El modelo obtuvo 21 residuos en regiones altamente favorecidas (95.5 %), 1 residuo en regiones adicionales permitidas (4.5 %) y ningún residuo (0 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad del modelo fue buena para los análisis posteriores.



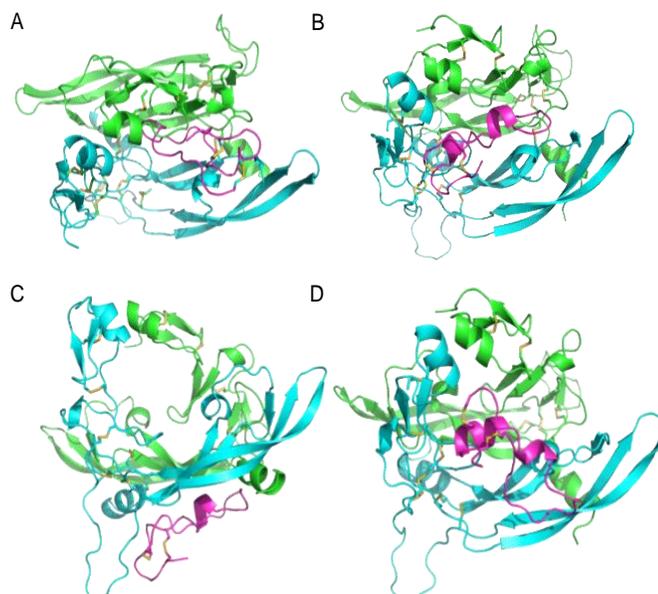
**Figura 14.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del NoNaBody cal\_P98Y después de la dinámica molecular.

### 3.2.1.7 Análisis de interacción del complejo cal\_P98Y/VEGF<sub>165</sub>

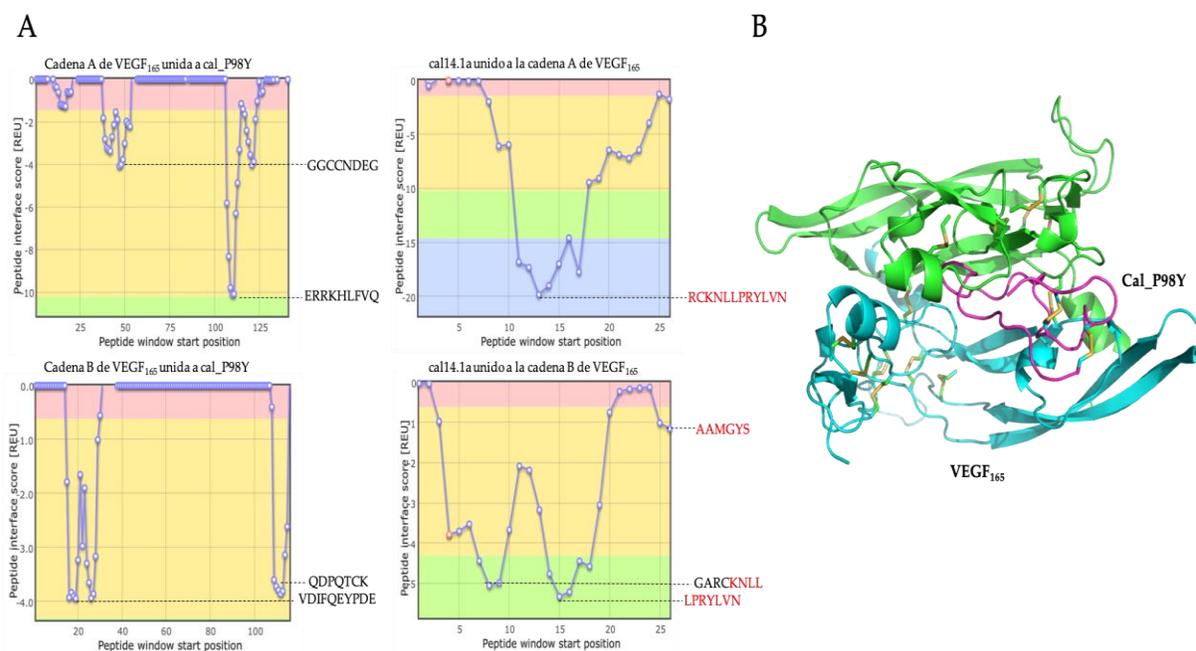
Se realizó el Docking proteína-proteína de cal\_P98Y como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco VEGF<sub>165</sub>. Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción obtenidos con el software ClusPro (Figura 15), con la finalidad de encontrar las posibles zonas de unión y la orientación óptima de la unión de cal\_P98Y con el VEGF<sub>165</sub>. La unión que presentó mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo B.

Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión del complejo cal\_P98Y/VEGF<sub>165</sub>, se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión en la plataforma ROSIE. En la Figura 16A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas del VEGF<sub>165</sub> con cal\_P98Y, el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-41.54 REU**. En la Figura 16B, se observa la orientación de unión de cal\_P98Y con respecto a su blanco. La energía de interacción de esta proteína fue muy similar a la del control positivo

VNAR P98Y (-45.98 REU), por lo que se recomienda la síntesis de la proteína cal\_P98Y para pruebas posteriores.



**Figura 15.** Complejos de unión del NoNaBody cal\_P98Y con el VEGF<sub>165</sub> después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El NoNaBody en magenta. El VEGF<sub>165</sub> en cian (cadena A) y verde (cadena B).



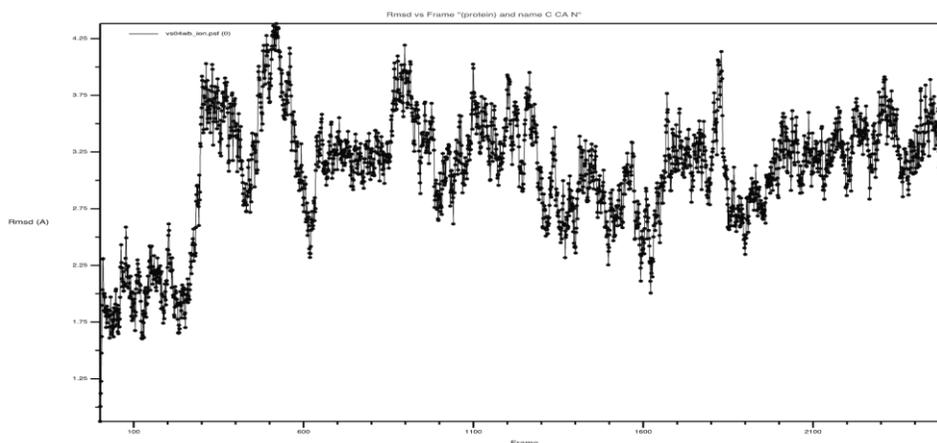
**Figura 16.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal\_P98Y/VEGF<sub>165</sub>. A) Gráficas de la unión del VEGF<sub>165</sub> con la proteína cal\_P98Y, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR. B) Orientación de unión del complejo cal\_P98Y/VEGF<sub>165</sub>.

**Tabla 5.** Resumen de resultados de las proteínas contra VEGF<sub>165</sub>. En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR P98Y.

Proteína	Sitio de interacción, con la cadena A del VEGF <sub>165</sub>	Sitio de interacción de la cadena A del VEGF <sub>165</sub>	Sitio de interacción, con la cadena B del VEGF <sub>165</sub>	Sitio de interacción de la cadena A del VEGF <sub>165</sub>	Score Total (REU)
+++	RRKNLLPRYL <sup>V</sup>	RKHLFVQDPQ	IGRRKNLLPRYL	IETLVDIFQ	<b>-45.98</b>
Cal_P98Y	RCKNLLPRYL <sup>VN</sup>	RRKHLFVQD	KNLLPRYL <sup>VN</sup>	VDIFQEYPD	<b>-41.54</b>
cal14.1a	VGARCR	SYCHPI	ARC	PIETL	<b>-14.88</b>

### 3.2.1.8 Análisis estructural del VNAR VS0-4

El VNAR VS0-4 es una proteína de 119 aminoácidos. Se realizó el modelado por homología con el programa MODELLER, para posteriormente refinar el modelo mediante dinámica molecular durante 50 ns utilizando el software NAMD. En la Figura 17 se muestra la fluctuación global del modelo del VNAR VS0-4 durante la dinámica, se observa una variación leve en los valores de RMSD de 1.75 Å a 4.25 Å.



**Figura 17.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VNAR VS0-4. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

El modelo se mantuvo estable desde los 6 ns hasta los 50 ns de la dinámica. A diferencia del VNAR P98Y, el modelo de VNAR VS0-4 mantiene una mayor estabilidad, esto se puede deber a la estructura secundaria que forma la secuencia de aminoácidos en el CDR3. En la Tabla 6 se muestran las diferentes conformaciones del VNAR VS0-4 a lo largo de la dinámica. Se seleccionó la conformación número 3, ya que fue la estructura que apareció durante más tiempo en la simulación con 26.96 ns.

**Tabla 6.** Conformaciones del VNAR VS0-4 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.

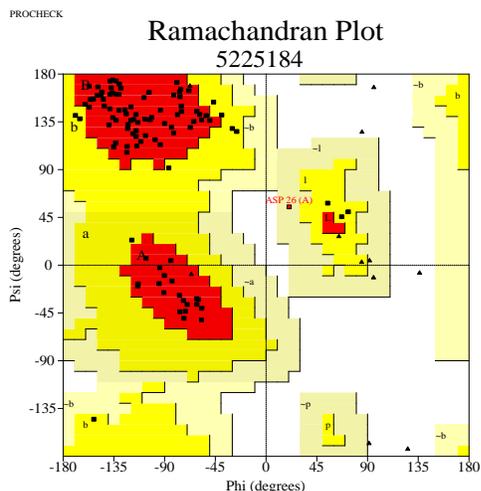
Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1 	52	1.04
2 	759	15.18
3 	<b>1348</b>	<b>26.96</b>
4 	290	5.8
5 	51	1.02

Posteriormente al refinamiento del modelo del VNAR VS0-4 se procedió a analizar la calidad de la conformación 3 mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura 18). El modelo obtuvo 92 residuos en regiones altamente favorecidas (89.3 %), 10 residuos en regiones adicionales permitidas (10.3 %) y ningún residuo (0 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad del modelo fue buena para los análisis posteriores.

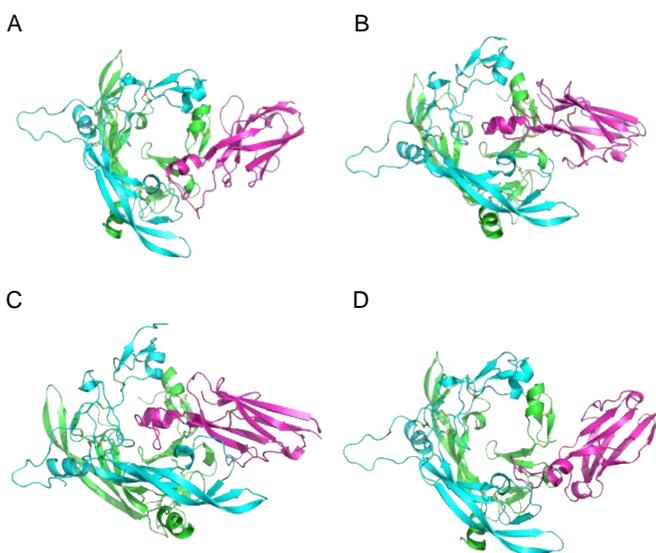
### 3.2.1.9 Análisis de interacción del complejo control positivo VS0-4/VEGF<sub>165</sub>

Se realizó el Docking proteína-proteína del VNAR VS0-4 como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco VEGF<sub>165</sub>. Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción resultados obtenidos con el software ClusPro (Figura 19), con la finalidad de encontrar las posibles zonas

de unión y la orientación óptima de la unión del VNAR con el VEGF<sub>165</sub>. La unión que presentó mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo C.

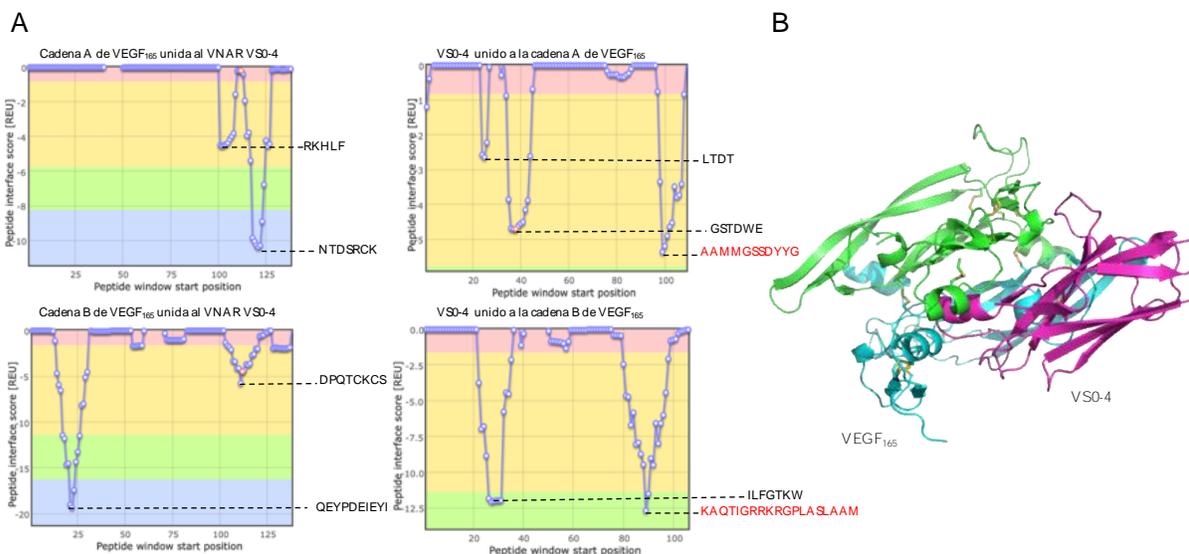


**Figura 18.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 3) del VNAR VS0-4 después de la dinámica molecular.



**Figura 19.** Complejos de unión del VNAR VS0-4 con el VEGF<sub>165</sub> después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en magenta. El VEGF en cian (cadena A) y verde (cadena B).

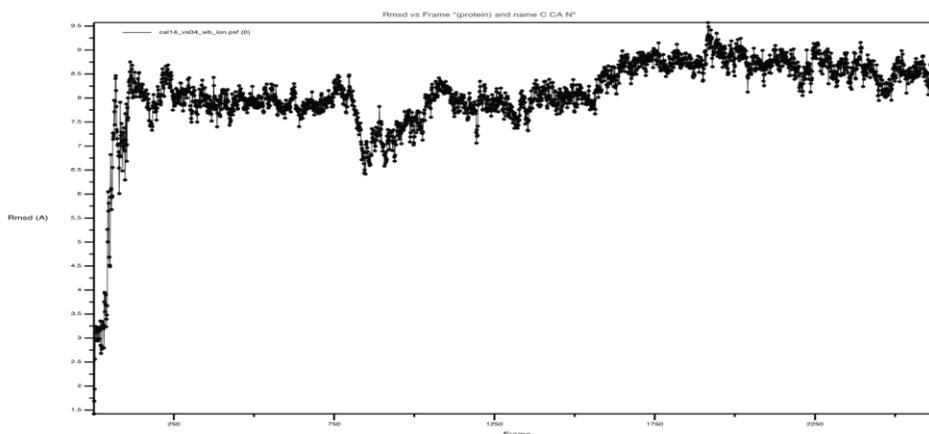
Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión, se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión del VNAR con el VEGF<sub>165</sub>, en la plataforma ROSIE. En la Figura 20A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas del VEGF<sub>165</sub> con el VNAR VS0-4 el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-49.00 REU**. En la Figura 20B, se observa la orientación de unión del VNAR con respecto a su blanco.



**Figura 19.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VS0-4/VEGF<sub>165</sub>. A) Gráficas de la unión del VEGF<sub>165</sub> con el VNAR VS0-4, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR. B) Orientación de unión del complejo VS0-4/VEGF<sub>165</sub>.

### 3.2.1.10 Análisis estructural de cal\_VS04

Se realizó el modelado del NoNaBody cal\_VS04, resultado de la unión de la conotoxina cal14.1a con el CDR3 del VNAR VS0-4 en el programa MODELLER y refinada mediante dinámica molecular durante 50 ns con el programa NAMD. En la Figura 21 se observa la fluctuación global de la estructura, donde los valores de RMSD muestran que la estructura se estabilizó por debajo de los 9.5 Å, en un rango de variación de los 6.5 Å a 9.5 Å. La estructura tiene una estabilidad media, ya que se presentan dos variaciones importantes de los valores de RMSD.

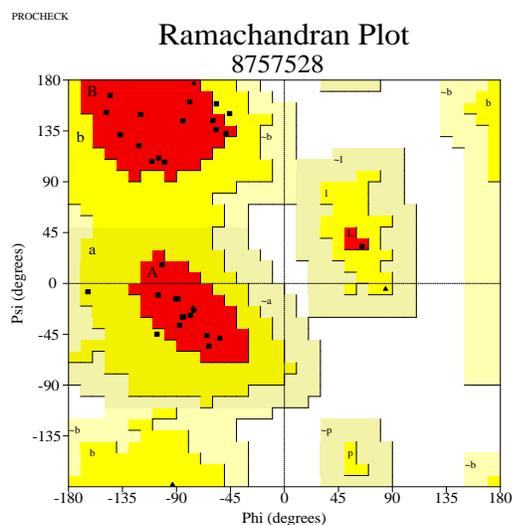


**Figura 21.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del péptido cal\_VS04. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

**Tabla 7.** Conformaciones del NoNaBody cal\_VS04 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia después del análisis de dinámica molecular.

Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1 	<b>1023</b>	<b>20.46</b>
2 	412	8.24
3 	303	6.06
4 	138	2.76
5 	111	2.22

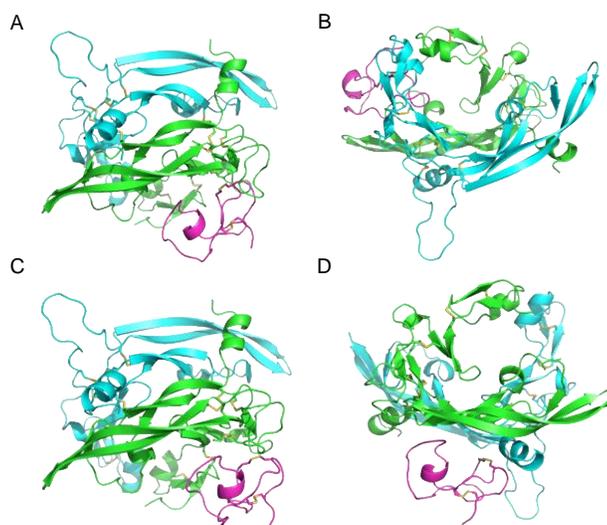
Posteriormente al refinamiento del modelo del NoNaBody cal\_VS04 se procedió a analizar la calidad de la conformación 1 mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura 22). El modelo obtuvo 23 residuos en regiones altamente favorecidas (88.5 %), 3 residuos en regiones adicionales permitidas (11.5 %) y ningún residuo (0 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad del modelo fue buena para los análisis de interacción proteína-proteína.



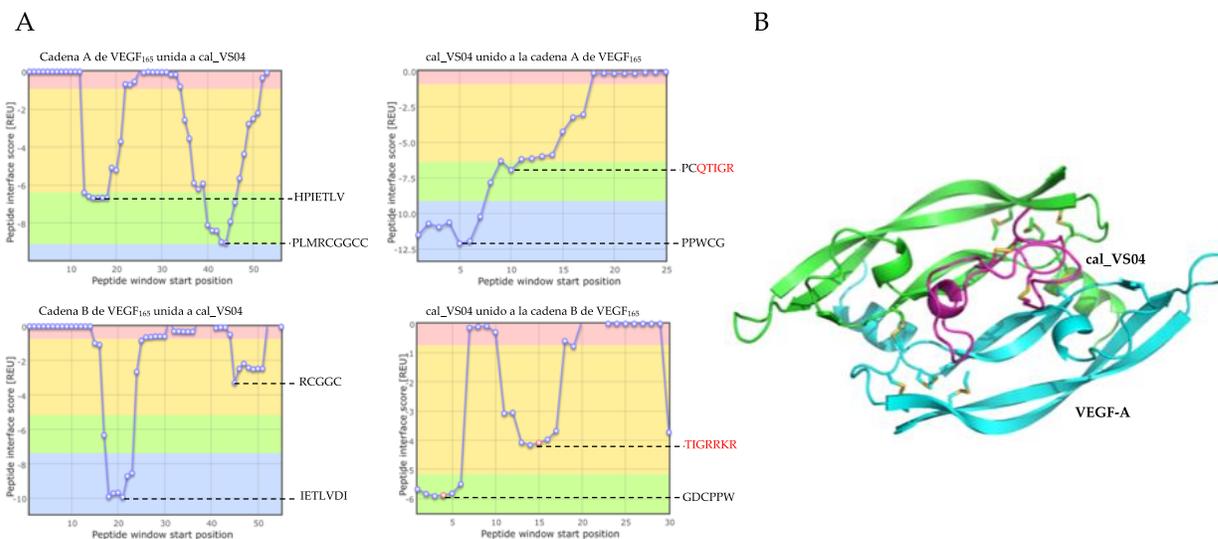
**Figura 22.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del NoNaBody cal\_VS04 después de la dinámica molecular.

### 3.2.1.11 Análisis de interacción del complejo cal\_VS04/VEGF<sub>165</sub>

Se realizó el Docking proteína-proteína de cal\_VS04 como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco VEGF<sub>165</sub>. Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción obtenidos con el software ClusPro (Figura 23), con la finalidad de encontrar las posibles zonas de unión y la orientación óptima de la unión de cal\_VS04 con el VEGF<sub>165</sub>. La unión que presento mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo D.



**Figura 23.** Complejos de unión del péptido cal\_VS04 con el VEGF<sub>165</sub> después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en magenta. El VEGF<sub>165</sub> en cian (cadena A) y verde (cadena B).



**Figura 24.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal\_VS04/VEGF<sub>165</sub>. A) Gráficas de la unión del VEGF<sub>165</sub> con el péptido cal\_VS04, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR parental. B) Orientación de unión del complejo cal\_VS04/VEGF<sub>165</sub>.

Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión del complejo cal\_VS04/VEGF<sub>165</sub>, se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión en la plataforma ROSIE. En la Figura 24A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas del VEGF<sub>165</sub> con cal\_VS04, el cual obtuvo un “score” total de interacción de **-47.07 REU**. En la Figura 24B, se observa la orientación de unión de cal\_VS04 con respecto a su blanco. La energía de interacción de esta proteína fue mayor a la del control positivo del VNAR VS0-4 (-29.97 REU), por lo que se recomienda la síntesis del NoNaBody cal\_VS04 para pruebas posteriores.

**Tabla 8.** Resumen de resultados de las proteínas contra VEGF<sub>165</sub>. En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR VS0-4.

Proteína	Sitio de interacción, con la cadena A del VEGF <sub>165</sub>	Sitio de interacción de la cadena A del VEGF <sub>165</sub>	Sitio de interacción, con la cadena B del VEGF <sub>165</sub>	Sitio de interacción de la cadena A del VEGF <sub>165</sub>	Score Total (REU)
VS0-4	AAMMGSSDY	NTDSRCK	KAQTIGRRKRG	QEYPDEIEY	<b>-49.00</b>
Cal_VS04	AAMMGSS	SCKNTDS	IGRRKRG	FQEYPD	<b>-47.07</b>
Cal14.1a	VGARCR	SYCHPI	ARC	PIETL	-14.88

### Estrategia *in vitro*

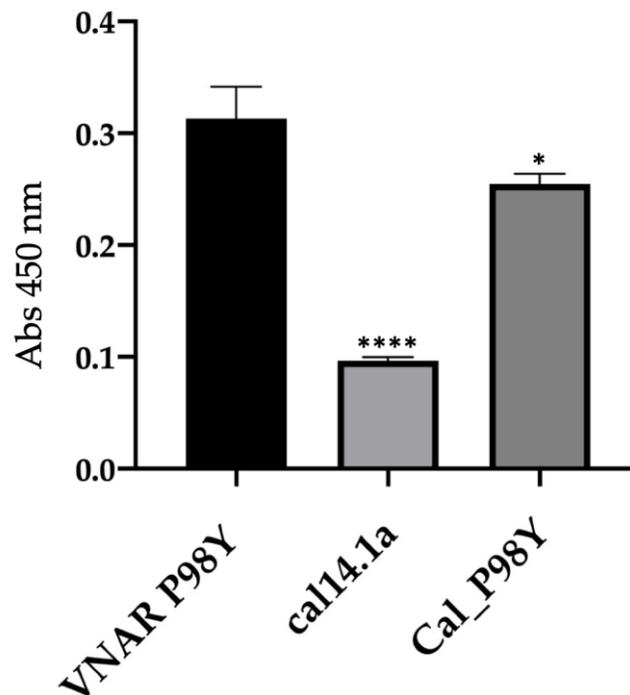
Después del análisis *in silico*, se realizó la síntesis química de los péptidos quiméricos con mejores resultados de interacción con el VEGF<sub>165</sub>. Ya que, dichos péptidos son candidatos potenciales para la neutralización del VEGF<sub>165</sub>.

Se mandó sintetizar el NoNaBody cal\_P98Y en la empresa Agentide. El proveedor certificó como controles de calidad que la pureza fue mayor al 98%, la correcta unión de los enlaces disulfuro y el peso molecular.

#### 3.2.1.12 Ensayo ELISA

En el ensayo ELISA de reconocimiento de VEGF<sub>165</sub> se identificó la capacidad de unión del NoNaBody cal\_P98Y al obtener una señal de absorbancia de 0.250 nm, mayor que la del control negativo (cal14.1a),

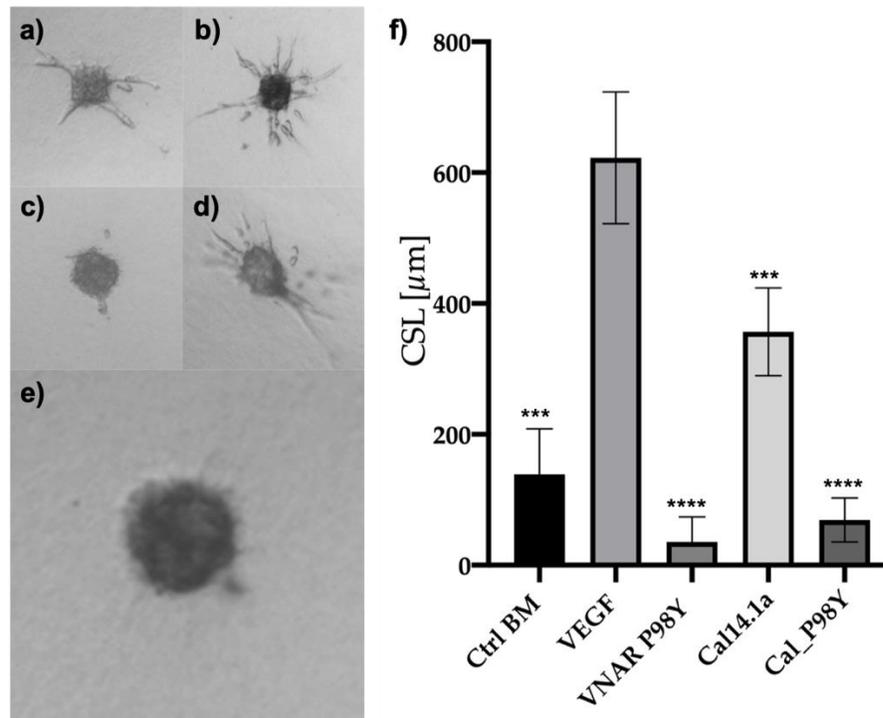
con una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.001$ ). Como control positivo se utilizó el VNAR parental P98Y (Figura 25).



**Figura 25.** Ensayo ELISA sándwich de reconocimiento de VEGF<sub>165</sub> por el péptido quimérico cal\_P98Y, el VNAR parental V13\_P98Y y la proteína andamio cal14.1a.

### 3.2.1.13 Ensayo de angiogénesis *in vitro* basado en esferoides tridimensionales de células endoteliales

La Figura 26 muestra los resultados del ensayo de angiogénesis *in vitro* del efecto antiangiogénico del NoNaBody cal\_P98Y evaluado en esferoides tridimensionales de células endoteliales (CE) por triplicado. Los esferoides se estimularon con VEGF<sub>165</sub> y se trataron con cal\_P98Y y el VNAR P98Y como control positivo. La longitud acumulada del brote (CSL, por sus siglas en inglés) se cuantificó después de 24 horas de tratamiento. El control sin estímulos de VEGF<sub>165</sub> (Figura 26A y 26F) tiene una CSL baja y una diferencia estadística con respecto a los esferoides de CE estimulados con VEGF<sub>165</sub> (5ng / mL) (Fig. 26B y 25F). Los esferoides de CE estimulados con VEGF<sub>165</sub> y tratados con cal\_P98Y y el VNAR P98Y (control positivo) obtuvieron una inhibición significativa ( $p=0.013$ ) de la formación de brotes en comparación con los esferoides de CE solo estimulados con VEGF<sub>165</sub> (Fig. 26B, 26D y 25F).



**Figura 26.** Ensayo de angiogénesis *in vitro* basado en esferoides tridimensionales de células endoteliales (CE) embebidas en gel de colágeno. Esferoides de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tratados con VEGF<sub>165</sub> y el VNAR P98Y y la proteína quimérica cal\_P98Y anti-VEGF<sub>165</sub>. a) Esferoide HUVEC sin tratamiento (medio basal de control (BM)). b) Esferoide estimulado con VEGF<sub>165</sub> (CE + VEGF<sub>165</sub>). c) Control positivo, esferoides estimulados con VEGF<sub>165</sub>, tratados con VNAR P98Y (CE + VEGF<sub>165</sub> + P98Y). d) Esferoides de células endoteliales estimuladas con VEGF<sub>165</sub> y tratadas con el péptido andamio cal14.1a (CE + VEGF<sub>165</sub> + cal14.1a). e) Esferoides de células endoteliales estimuladas con VEGF<sub>165</sub> y tratadas con cal\_P98Y (CE + VEGF<sub>165</sub> + cal\_P98Y). f) Gráfica de la longitud acumulada de brotes (CSL, por sus siglas en inglés) de brotes capilares medidos después de 24 horas de incubación. Los brotes de angiogénesis se inhibieron significativamente ( $p < 0.013$ ) cuando los esferoides se trataron con VNAR P98Y y la proteína quimérica cal\_P98Y.

## Capítulo 4. TGF- $\beta$

---

Con la finalidad de dar validez al diseño de proteínas utilizando el método de diseño racional de proteínas mediante la unión de una conotoxina y el CDR3 de diferentes VNAR, se procedió a realizar el análisis de interacción con otra proteína blanco. Para este apartado, se utilizó a la citocina TGF- $\beta$  como antígeno y los VNAR T10 y T21 como parentales para los NoNaBodies cal\_T10 y cal\_T21. El objetivo de este capítulo fue analizar la interacción de proteínas diseñadas a partir de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a y los CDR3 del VNAR T10 y T21. A modo de control positivo, se analizó la interacción del VNAR T10 Y T21 con la proteína TGF- $\beta$ , la cual dio una energía de unión de referencia. A manera de control negativo, se realizó el análisis de la interacción del péptido andamio cal14.1a con el TGF- $\beta$ .

### 4.1 Método

#### Estrategia *In silico*

##### 4.1.1.1 Modelado por homología del VNAR T10 y T21

Las estructuras tridimensionales de los VNAR T10 y T21 se predijeron mediante modelado basado en homología usando el software MODELLER v.9.19 (Webb & Sali, 2016), a través de la estrategia "Advanced Modeling". BLAST-P se utilizó para identificar las posibles estructuras andamio para el modelado. Los VNAR T10 y T21 se modelaron con base a tres estructuras de proteínas de VNAR reportadas con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 2I26 (Stanfield et al., 2007), 4HGK (Kovalenko et al., 2013) y 2Z8W (Henderson et al., 2007).

##### 4.1.1.2 Modelado por homología de cal\_T10 y cal\_T21

Se realizó el modelado de los péptidos quiméricos cal\_T10 y cal\_T21, al unir el péptido andamio cal14.1a con el CDR3 de los VNAR anti-TGF- $\beta$  T10 y T21. Las estructuras tridimensionales fueron construidas con el software MODELLER v.9.19 mediante el protocolo de "Advanced Modeling for multiple templates". Para dicho procedimiento fue necesario realizar un alineamiento en BLAST-P para identificar las estructuras molde para el modelado por homología. Para la construcción de cal\_T10 y cal\_T21 se basó en tres distintas

proteínas andamio de diferentes conotoxinas con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 1FEO (Goldenberg et al., 2001), 1TT3 (Adams, Smith, Schroeder, Yasuda, & Lewis, 2003), y 1DW4 (Atkinson, Kieffer, Dejaegere, Sirockin, & Lefèvre, 2000b).

#### *4.1.1.3 Dinámica Molecular*

Posterior al modelado por homología, las estructuras tridimensionales de los péptidos quiméricos y los VNAR parentales se refinaron mediante el procedimiento de “simulated annealing” con el software Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD)(Phillips et al., 2005), seguido del análisis y visualización con los softwares Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et al., 1996) y PyMOL Molecular Graphics System v2.2.2 para Mac OS X. Los parámetros del campo de fuerza para la simulación se aplicaron utilizando la herramienta informática Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM34). Para el control de calidad de las estructuras modeladas, se realizó el análisis estructural con la herramienta en línea PROCHECK. Las simulaciones se realizaron en una caja de moléculas de agua TIP3P como solvente con condiciones de contorno periódicas, donde se supone un ensamble NPT (un número constante de partículas (N), condiciones isobáricas (P) e isotérmicas (T) constantes). La presión se ajustó a 1 atm y la temperatura a 310 K. Estas condiciones se unieron a pasos de recocido y relajación de forma iterativa. Después del recocido y enfriamiento, los péptidos quiméricos y los VNAR parentales se sometieron a un análisis de dinámica molecular a 310 K y 1 atm durante 50 ns. El análisis de las coordenadas de trayectoria atómica y las energías se escribieron en el disco cada 10 ps. Se seleccionó la conformación de proteínas con el mayor tiempo de existencia.

#### *4.1.1.4 Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking)*

Para predecir el posible sitio de unión de cal\_T10 y cal\_T21 a TGF- $\beta$  se aplicó un protocolo de acoplamiento proteína-proteína, utilizando la herramienta web ClusPro (Comeau, Gatchell, Vajda, & Camacho, 2004a; Kozakov et al., 2017). El algoritmo de acoplamiento evalúa diferentes complejos putativos con complementariedades de superficie favorables. Los complejos obtenidos se filtraron, seleccionando aquellos con buena energía electrostática y libres de desolvatación para su posterior agrupamiento. Para la visualización y selección de los mejores resultados se utilizó PyMOL Molecular Graphics System para Mac OS X. Se eligió el complejo con mejor afinidad y orientación de unión del TGF- $\beta$ /cal\_T10 y TGF-

$\beta$ /cal\_T21. Para identificar las regiones predichas de interacción proteína-proteína (PPI), se utilizó la herramienta “Peptiderive” en el servidor ROSIE, con la configuración predeterminada por el desarrollador. Para el cálculo del acoplamiento Peptiderive proporcionó un gráfico con los posibles residuos de interacciones proteína-proteína involucrados en la interacción, clasificados de acuerdo con la función de puntuación de Rosetta – Unidades de energía de Rosetta (REU, Rosetta Energy Units) (Sedan et al., 2016b; Veresov, 2016).

## **Estrategia *In vitro***

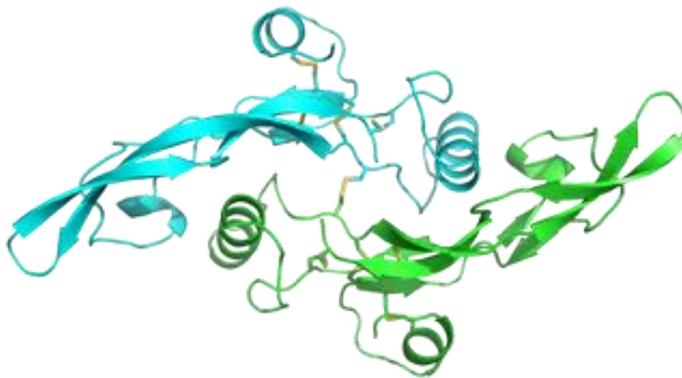
### **4.1.2.1 Ensayo ELISA**

En una placa de 96 pozos se inmovilizaron 250 ng de cal14.1a, cal\_T10 y el VNAR T10 en un volumen de 50  $\mu$ L por triplicado, se incubaron 12 h a 4 °C. Se descartó la solución y se bloquearon los pozos con 300  $\mu$ L de BSA 3% en TBS-Tween 0.05%, se incubaron 12 h a 4 °C. Se descartó la solución de bloqueo y se adicionaron 50  $\mu$ L de rhTGF- $\beta$ 1 a 5  $\mu$ g/mL (Peprotech), se incubaron 1.5 h a 37 °C. Se descartó la solución y se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.05%, se adicionaron 50  $\mu$ L de anticuerpo anti-TGF- $\beta$  1D11.16.8 a 8.4  $\mu$ g/mL (dil 1/1000, BioXcell), se incubaron 1 h a 37 °C. Se descartó la solución y se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.05%, se adicionaron 50  $\mu$ L de m-IgGk BP-HRP a una dilución 1/3000 (Santa Cruz Biotech.), se incubaron 1 h a 37 °C. Se descartó la solución y se realizaron 2 lavados con TBS-Tween 0.5% y 3 lavados con TBS-Tween 0.05%, se adicionaron 50  $\mu$ L de reactivo TBM, se incubaron 0.5 h a 37°C, se detuvo la reacción con 50  $\mu$ L de HCl 1 N y se leyó la absorbancia a 450nm. Como control negativo de reconocimiento se procedió de igual forma, pero no se adicionó TGF- $\beta$ .

## **4.2 Resultados del análisis *In silico***

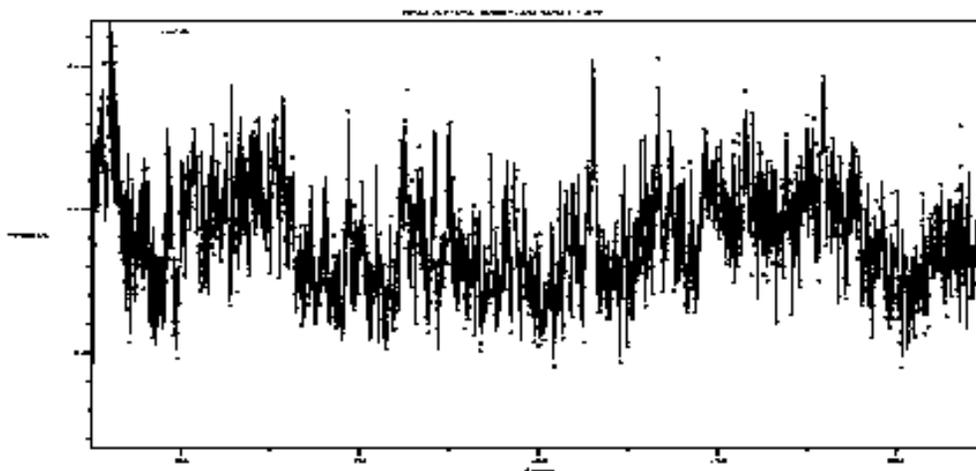
### **Análisis estructural de TGF- $\beta$**

Para la preparación de TGF- $\beta$ , se descargó la estructura resuelta por NMR, con PDB ID 1KLA (Hinck et al., 1996), del RCSB Protein Data Bank (Figura 27). Se realizó un refinamiento de la estructura descargada en el programa NAMD, la cual consistió en una simulación de 50 ns a temperatura y presión constante.



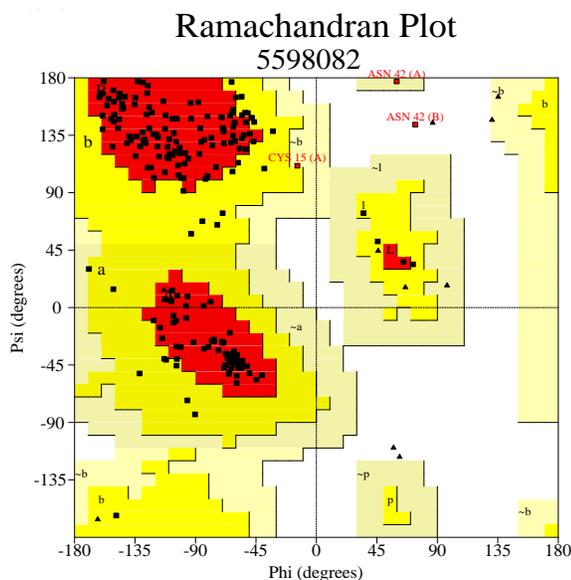
**Figura 27.** Estructura del TGF- $\beta$  refinado por dinámica molecular. Cadena A (verde), cadena B (cian).

Para refinar la estructura resuelta por NMR, se procedió a realizar una simulación de dinámica molecular de 50 ns con el programa NAMD. Posteriormente se realizó el análisis de fluctuación global de la estructura, la cual se muestra en la Figura 28, donde se observa la alta estabilidad de la estructura de las dos cadenas de TGF- $\beta$ , ya que la fluctuación de los valores de RMSD fue de 1 Å.



**Figura 28.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del TGF- $\beta$ . En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

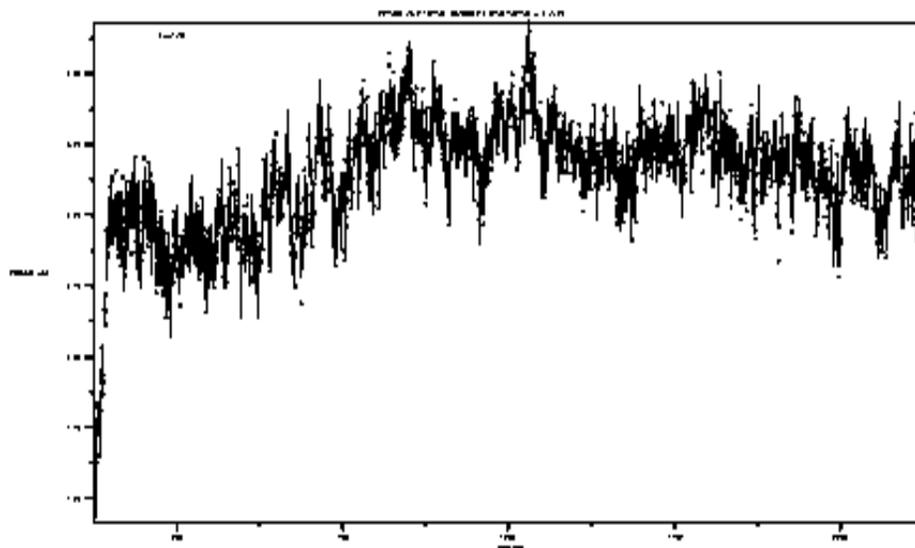
Posteriormente al refinamiento del modelo del TGF- $\beta$ , se procedió a analizar la calidad de la estructura mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura 29). El modelo obtuvo 166 residuos en regiones altamente favorecidas (86.5 %), 23 residuos en regiones adicionales permitidas (12 %) y ningún residuo (0 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad del modelo fue buena para los análisis posteriores.



**Figura 29.** Gráfico de Ramachandran de la estructura de TGF- $\beta$  después de la dinámica molecular.

### **Análisis estructural del VNAR T10**

El VNAR T10 es una proteína de 119 aminoácidos. Se procedió a realizar el modelado por homología con el programa MODELLER, para posteriormente refinar el modelo durante 50 ns utilizando el software NAMD. En el análisis de fluctuación global de la estructura del VNAR T10 (Figura 30), se pudo observar una variación de los valores de RMSD que van de los 2.5 Å a los 4.25 Å. La estructura del VNAR mantiene una alta estabilidad. En la Tabla 9 se muestran las diferentes conformaciones que aparecieron a lo largo de la simulación. De las cuales se eligió a la conformación 1 con 33.02 ns de tiempo de existencia.

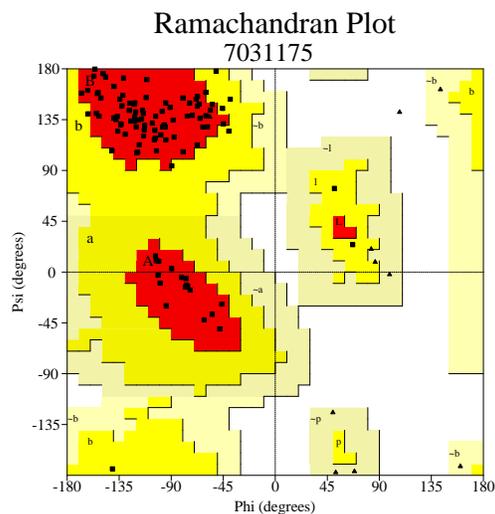


**Figura 30.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VNAR T10. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

**Tabla 9.** Conformaciones del VNAR T10 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas se indica la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.

	Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
0		1655	<b>33.02</b>
1		352	7.02
2		180	3.59
3		81	1.62
4		38	0.76

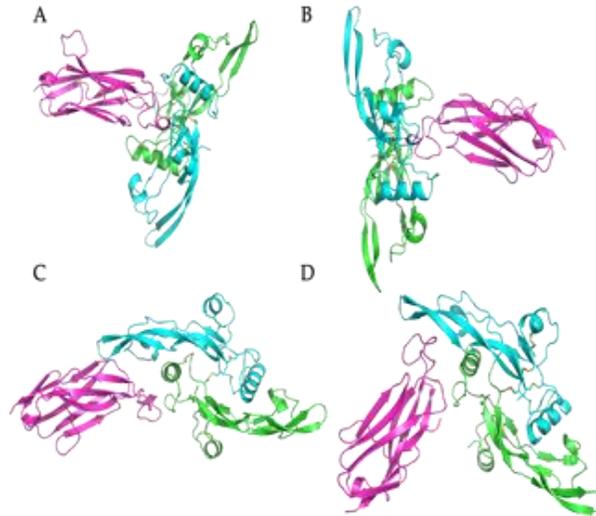
Posteriormente al refinamiento del modelo del VNAR T10 se procedió a analizar la calidad de la conformación 1 mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura 31). El modelo obtuvo 95 residuos en regiones altamente favorecidas (91.3 %), 9 residuos en regiones adicionales permitidas (8.7 %) y ningún residuo (0 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad del modelo fue buena para los análisis posteriores.



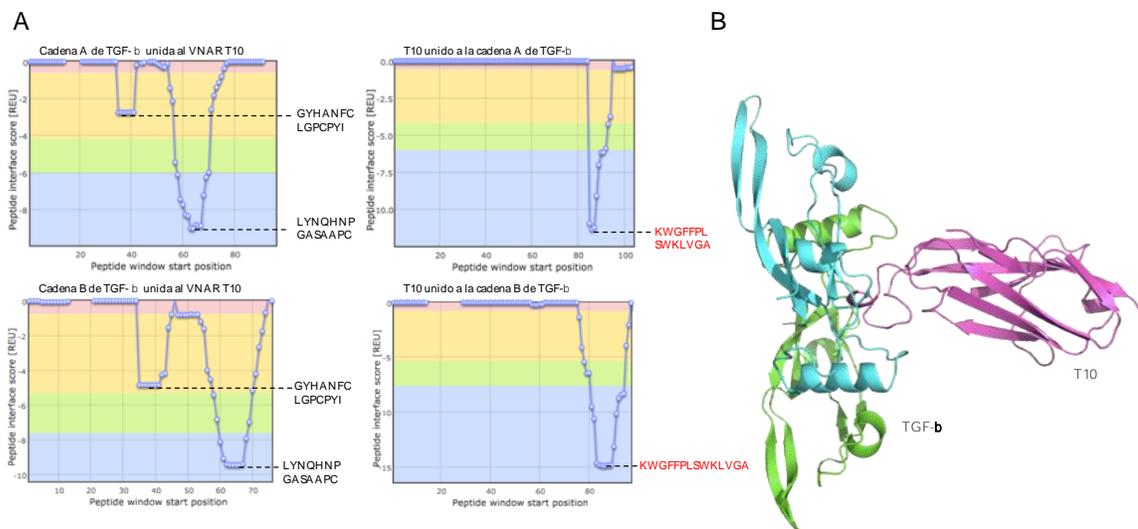
**Figura 31.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del VNAR T10 después de la dinámica molecular.

### Análisis de interacción del complejo T10/ TGF- $\beta$ (control positivo)

Se realizó el Docking proteína-proteína del VNAR T10 como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco TGF- $\beta$ . Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción obtenidos con el software ClusPro (Figura 32), con la finalidad de encontrar las posibles zonas de unión y la orientación óptima de la unión del VNAR con el TGF- $\beta$ . La unión que presentó mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo B.



**Figura 32.** Complejos de unión del VNAR T10 con el TGF- $\beta$  después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en magenta. El TGF- $\beta$  en cian (cadena A) y verde (cadena B).

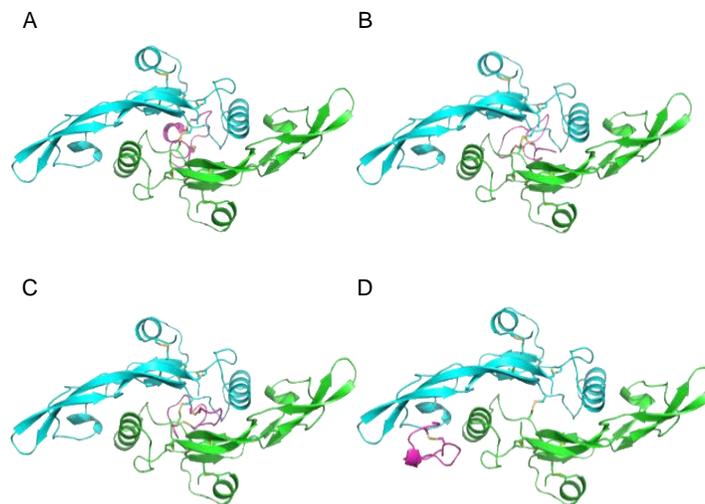


**Figura 33.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR T10/ TGF- $\beta$ . A) Gráficas de la unión del TGF- $\beta$  con la proteína T10. B) Orientación de unión del complejo T10/ TGF- $\beta$ .

Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión del complejo T10/ TGF- $\beta$ , se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión en la plataforma ROSIE. En la Figura 33A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas del TGF- $\beta$  con T10, el cual obtuvo una puntuación total de interacción de **-27.24 REU**. En la Figura 33B, se observa la orientación de unión de T10 con respecto a su blanco.

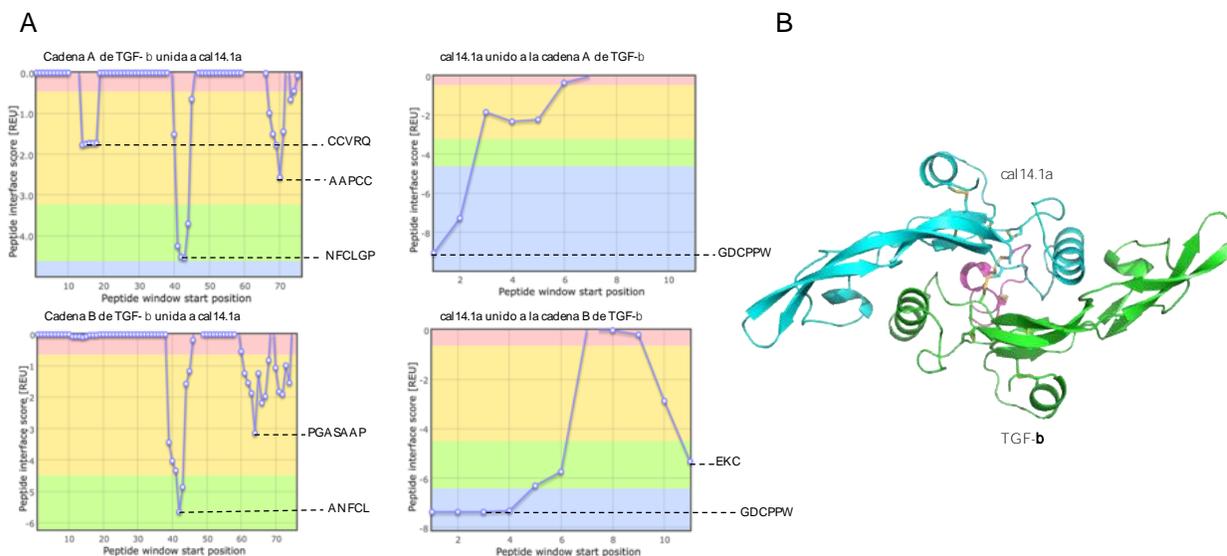
### **Análisis de interacción del complejo cal14.1a/ TGF- $\beta$ (control negativo)**

Se realizó el Docking proteína-proteína de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco TGF- $\beta$ . Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción obtenidos con el software ClusPro (PIPER) (Figura 34), con la finalidad de encontrar las posibles zonas de unión y la orientación óptima de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina con el TGF- $\beta$ . La unión que presentó mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo A.



**Figura 34.** Complejos de unión de la conotoxina cal14.1a con el TGF- $\beta$ . después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. La  $\alpha$ -conotoxina en magenta. El TGF- $\beta$ . en cian (cadena A) y verde (cadena B).

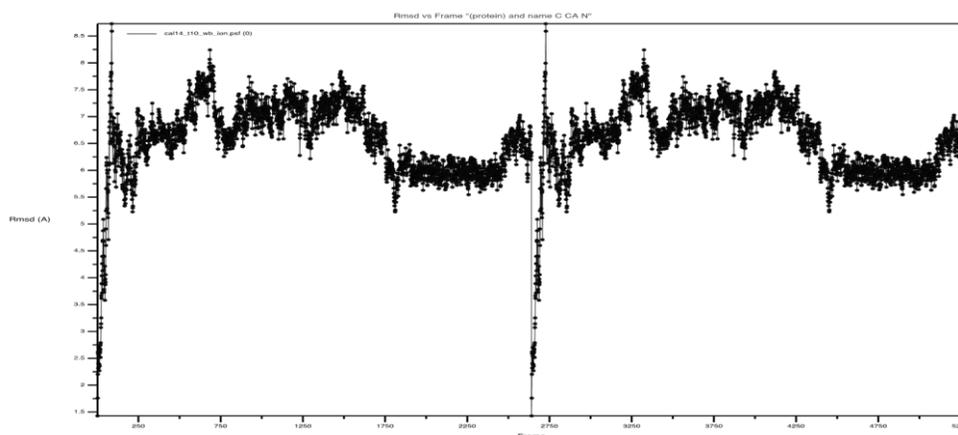
Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión, se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a con TGF- $\beta$ , en la plataforma ROSIE. En la Figura 35A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas del TGF- $\beta$  con cal14.1a, el cual obtuvo un “score” total de interacción de **-21.07 REU**. En la Figura 35B, se observa la orientación de unión de cal14.1a.



**Figura 35.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/TGF- $\beta$ . A) Gráficas de la unión del TGF- $\beta$  con la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/ TGF- $\beta$ .

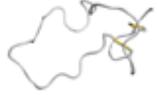
### Análisis estructural de cal\_T10

Se realizó el modelado del péptido cal\_T10 uniendo la conotoxina cal14.1a con el CDR3 del VNAR T10 con el programa MODELLER (Webb & Sali, 2016). Posteriormente se realizó el refinamiento por dinámica molecular de la estructura utilizando el programa NAMD (Phillips et al., 2005). Después de la simulación se realizó el análisis de la fluctuación global de la estructura. En la Figura 36 se puede observar que la proteína mantiene una estabilidad media. En la Tabla 10 se muestran las diferentes conformaciones del péptido cal\_T10 que aparecieron a lo largo de la simulación. Se eligió la conformación 1 como la estructura mas estable, ya que obtuvo un tiempo de existencia de 28.14 ns.

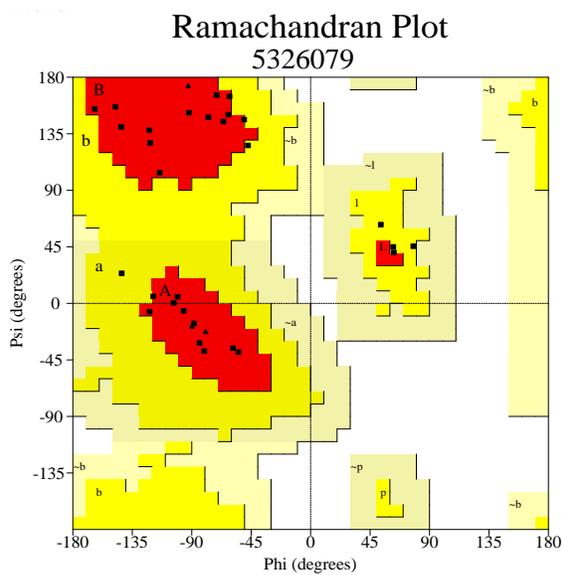


**Figura 36.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura de la proteína cal\_T10. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

**Tabla 10.** Conformaciones del péptido cal\_T10 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia.

	Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1		<b>1407</b>	<b>28.14</b>
2		465	9.30
3		338	6.76
4		113	2.26
5		90	1.80

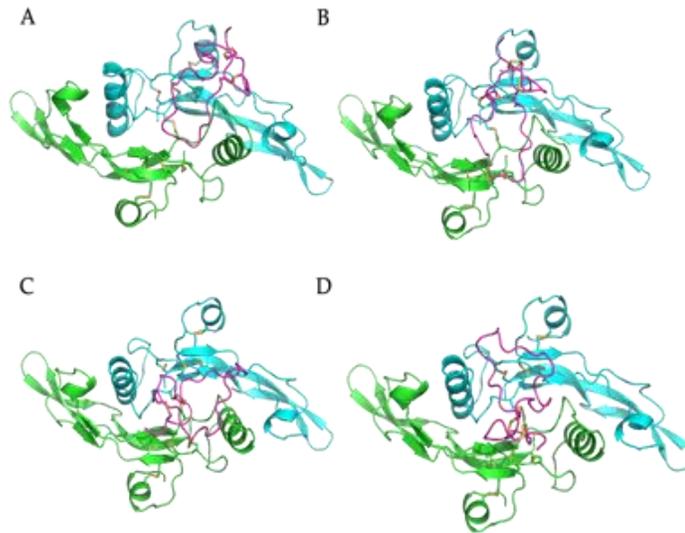
Posteriormente al refinamiento del modelo del péptido cal\_T10 se procedió a analizar la calidad de la conformación 1 mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura 37). El modelo obtuvo 20 residuos en regiones altamente favorecidas (80.0 %), 5 residuos en regiones adicionales permitidas (20.0 %) y ningún residuo (0 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad del modelo fue buena para los análisis de interacción proteína-proteína.



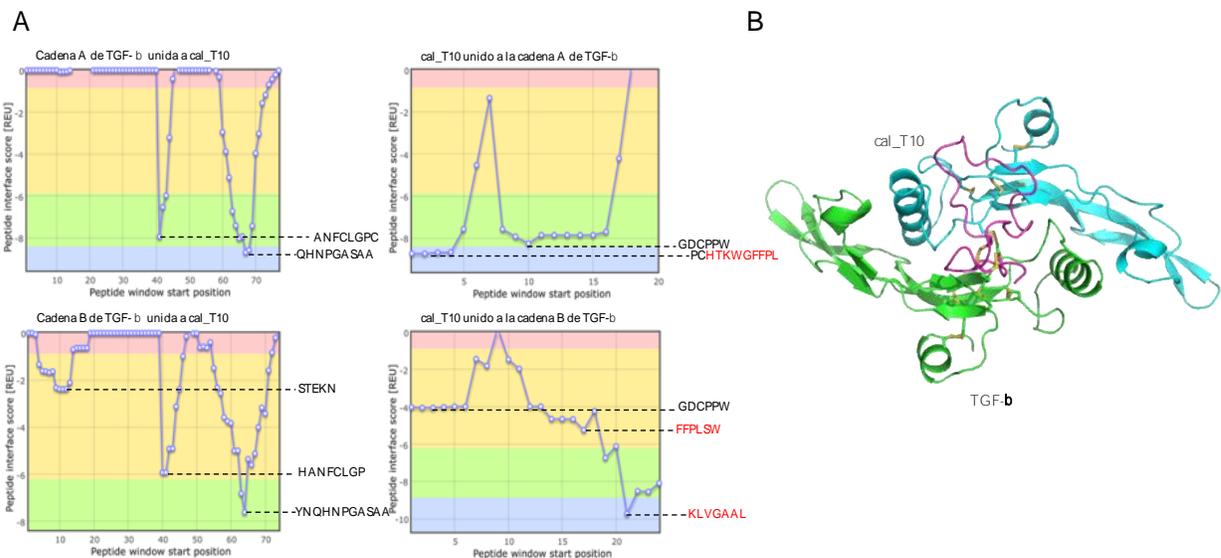
**Figura 37.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del NoNaBody cal\_T10 después de la dinámica molecular.

## Análisis de interacción del complejo cal\_T10/ TGF-β

Se realizó el Docking proteína-proteína del péptido cal\_T10 como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco TGF-β. Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción obtenidos con el software ClusPro (Figura 38), con la finalidad de encontrar las posibles zonas de unión y la orientación óptima de la unión de cal\_T10 con el TGF-β. La unión que presentó mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo D.



**Figura 38.** Complejos de unión del NoNaBody cal\_T10 con el TGF-β después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El péptido cal\_T10 en magenta. El TGF-β en cian (cadena A) y verde (cadena B).



**Figura 39.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal\_T10/TGF-β. A) Gráficas de la unión del TGF-β con el péptido cal\_T10, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR. B) Orientación de unión del complejo cal\_T10/ TGF-β.

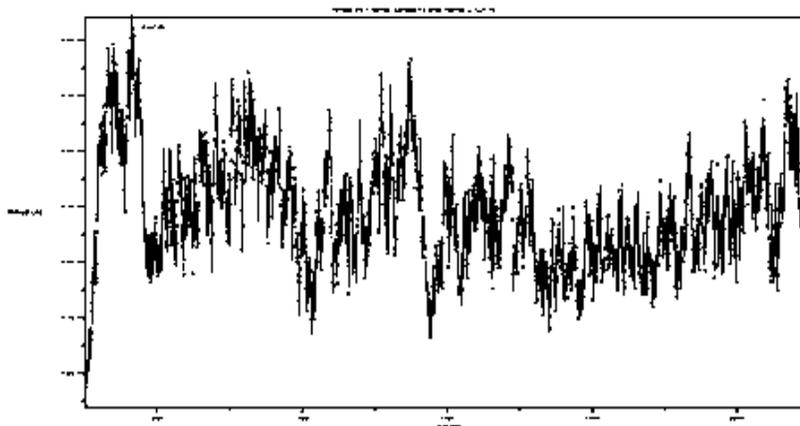
Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión del complejo cal\_T10/ TGF- $\beta$ , se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión en la plataforma ROSIE. En la Figura 39A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas del TGF- $\beta$  con T10, el cual obtuvo un “score” total de interacción de **-34.55 REU**. En la Figura 39B, se observa la orientación de unión de T10 con respecto a su blanco. El péptido cal\_T10 obtuvo una mayor energía de interacción que el complejo control VNAR T10/ TGF- $\beta$  (-27.24 REU). Se recomendó sintetizar este péptido para su posterior análisis en pruebas *in vitro*.

**Tabla 11.** Resumen de resultados de las proteínas contra TGF- $\beta$ . En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR T10.

Proteína	Sitio de interacción, con la cadena A del TGF- $\beta$	Sitio de interacción de la cadena A del TGF- $\beta$	Sitio de interacción, con la cadena B del TGF- $\beta$	Sitio de interacción de la cadena A del TGF- $\beta$	Score Total (REU)
T10	<b>KWGFFPLSWKLV</b>	NQHNP GASA	<b>KWGFFPLSWK</b>	LYNQHNPGASAAP	<b>-27.24</b>
Cal_T10	<b>HTKWGFFPL</b>	QHNP GASAA	<b>FFPLSWKLVGA</b>	YNQHNP GASAA	<b>-34.55</b>
Cal14.1a	GDCPPW	ANFCL	GDCPPW	NFCLGP	-21.07

### Análisis estructural del VNAR T21

El VNAR T21 es una proteína de 119 aminoácidos. Se procedió a realizar el modelado por homología con el programa MODELLER, para posteriormente refinar el modelo durante 50 ns utilizando el software NAMD. En el análisis de fluctuación global de la estructura del VNAR T21 (Figura 40), se puede observar una variación de los valores de RMSD que van de los 1.75 Å a los 4.25 Å. Esto indica que la estructura del VNAR mantiene una alta estabilidad.



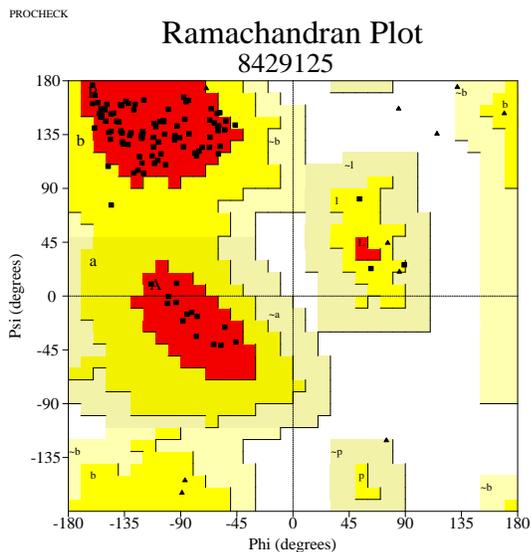
**Figura 40.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VNAR T21. En el eje “X” se indican los Armstrong y en el eje “Y” el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

En la Tabla 12 se muestran las diferentes conformaciones que aparecieron a lo largo de la simulación. Se eligió a la conformación 1 con un tiempo de existencia de 33.02 ns.

**Tabla 12.** Conformaciones del VNAR T21 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas se indica la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.

Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
0	<b>1655</b>	<b>33.02</b>
1	352	7.02
2	180	3.59
3	81	1.62
4	38	0.76

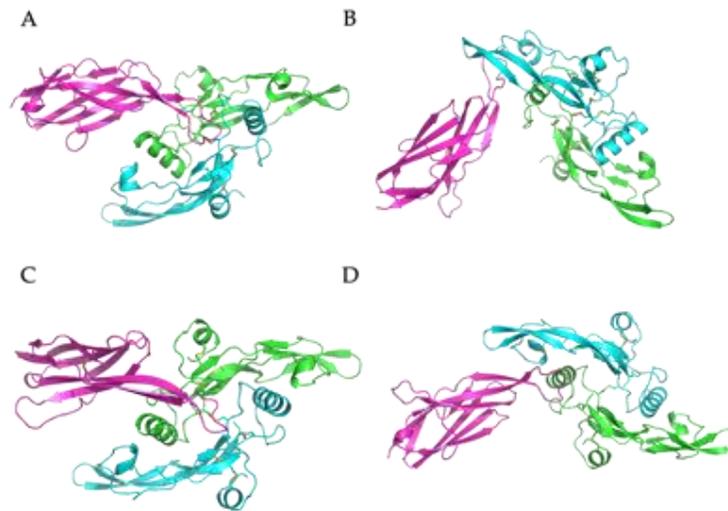
Después del refinamiento del modelo del VNAR T21 se procedió a analizar la calidad de la conformación 1 mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura 41). El modelo obtuvo 97 residuos en regiones altamente favorecidas (93.3 %), 7 residuos en regiones adicionales permitidas (6.7 %) y ningún residuo (0 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad del modelo fue buena para los análisis posteriores de docking.



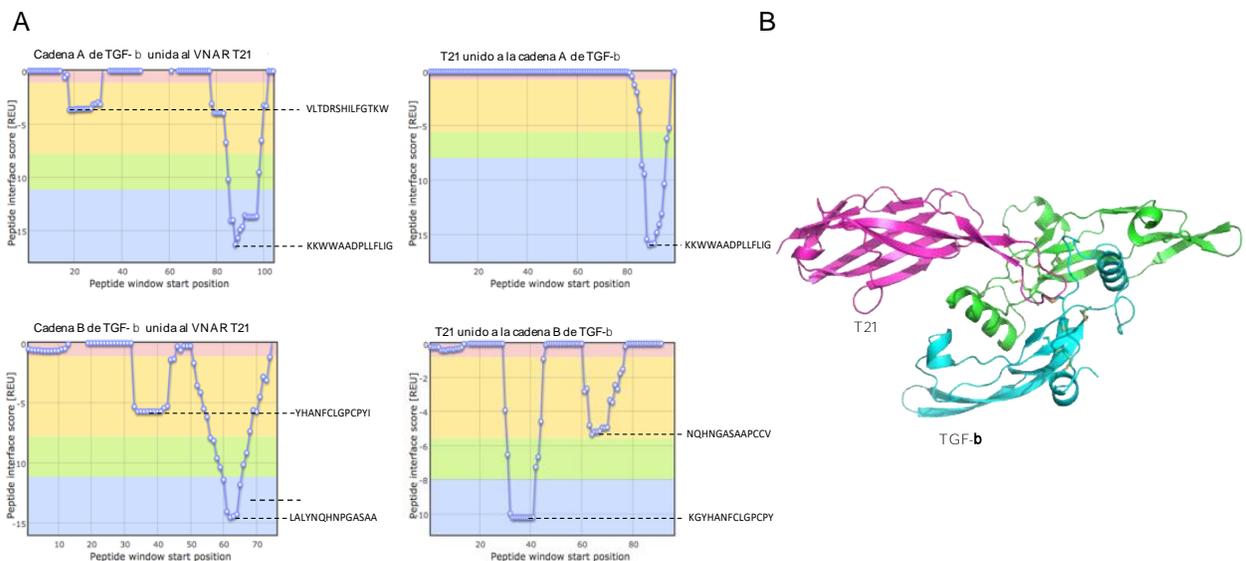
**Figura 41.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del VNAR T21 después de la dinámica molecular.

## Análisis de interacción del complejo T21/ TGF- $\beta$

Se realizó el Docking proteína-proteína del VNAR T21 como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco TGF- $\beta$ . Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción obtenidos con el software ClusPro (Figura 42), con la finalidad de encontrar las posibles zonas de unión y la orientación óptima de la unión del VNAR con el TGF- $\beta$ . La unión que presento mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo A.



**Figura 42.** Complejos de unión del VNAR T21 con el TGF- $\beta$  después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en magenta. El TGF- $\beta$  en cian (cadena A) y verde (cadena B).

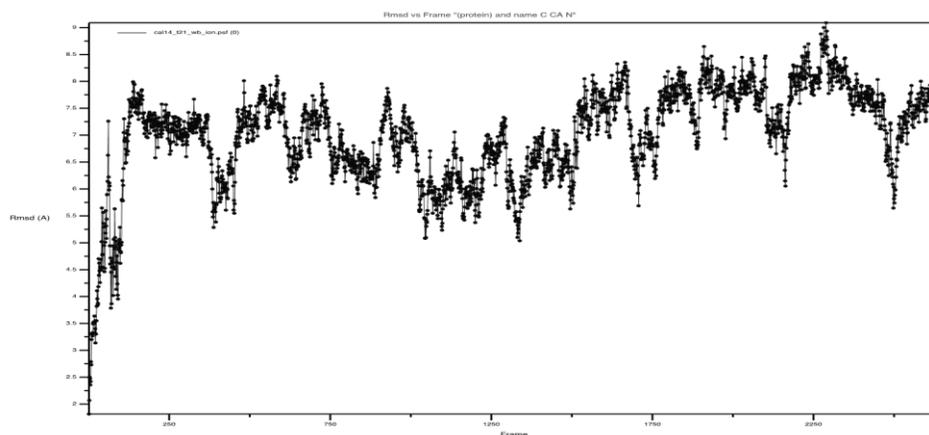


**Figura 43.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR T21/ TGF- $\beta$ .. A) Gráficas de la unión del TGF- $\beta$  con la proteína T21. B) Orientación de unión del complejo T21/ TGF- $\beta$ ..

Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión del complejo T21/ TGF- $\beta$ , se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión en la plataforma ROSIE. En la Figura 43A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas del TGF- $\beta$  con en VNAR T21, el cual obtuvo un “score” total de interacción de **-38.26 REU**. En la Figura 43B, se observa la orientación de unión de T21 con respecto a su blanco.

### Análisis estructural de cal\_T21

Se realizó el modelado del péptido cal\_T21 uniendo la conotoxina cal14.1a con el CDR3 del VNAR T21 con el programa MODELLER (Webb & Sali, 2016). Posteriormente se realizó el refinamiento por dinámica molecular de la estructura utilizando el programa NAMD (Phillips et al., 2005). Después de la simulación se realizó el análisis de la fluctuación global de la estructura. En la Figura 44 se puede observar que la proteína mantiene una estabilidad media al mantener valores de RMSD inestables.



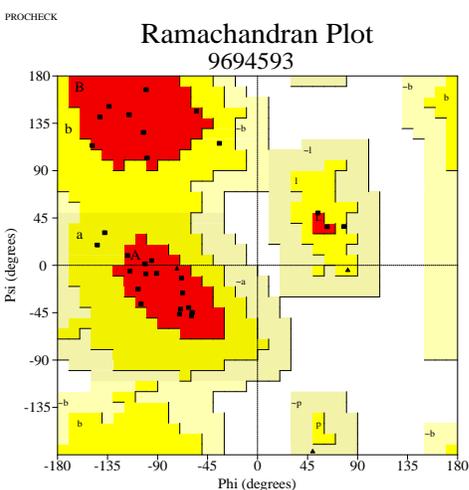
**Figura 44.** Valores de RMSD durante la simulación de 25 ns de la estructura del NoNaBody cal\_T21. En el eje “X” se indican los Armstrong y en el eje “Y” el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

En la Tabla 13 se muestran las diferentes conformaciones del péptido cal\_T21 que aparecieron a lo largo de la simulación. Se eligió la conformación 1 como la estructura más estable, ya que obtuvo un tiempo de existencia de 22.60 ns.

Posteriormente al refinamiento del modelo del NoNaBody cal\_T21 se procedió a analizar la calidad de la conformación 1 mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura 45). El modelo obtuvo 21 residuos en regiones altamente favorecidas (84.0 %), 4 residuos en regiones adicionales permitidas (16.0 %) y ningún residuo (0 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad del modelo fue buena para los análisis de interacción proteína-proteína.

**Tabla 13.** Conformaciones del péptido cal\_T21 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.

Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1 	<b>1130</b>	<b>22.60</b>
2 	566	11.32
3 	260	5.20
4 	166	3.32
5 	116	2.32

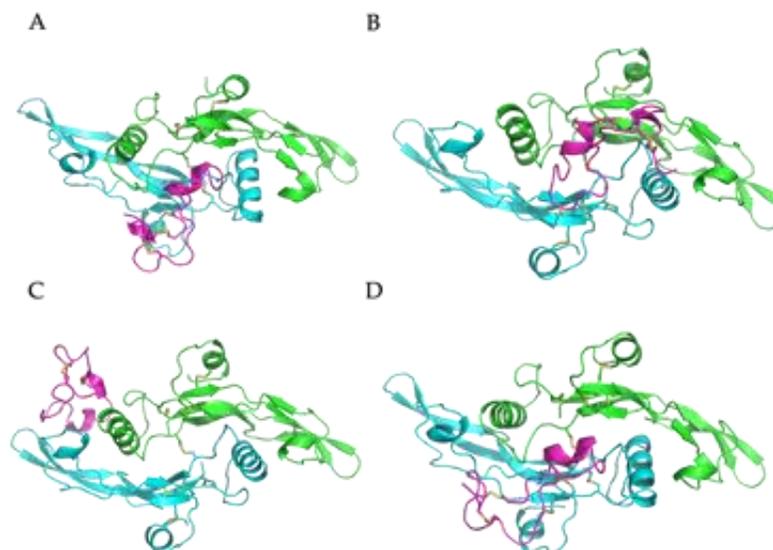


**Figura 45.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del péptido cal\_T21 después de la dinámica molecular.

### Análisis de interacción del complejo cal\_T21/ TGF- $\beta$

Se realizó el Docking proteína-proteína del péptido cal\_T21 como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco TGF- $\beta$ . Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción obtenidos con el software ClusPro (Figura 46), con la finalidad de encontrar las posibles zonas

de unión y la orientación óptima de la unión de cal\_T21 con el TGF- $\beta$ . La unión que presentó mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo D.

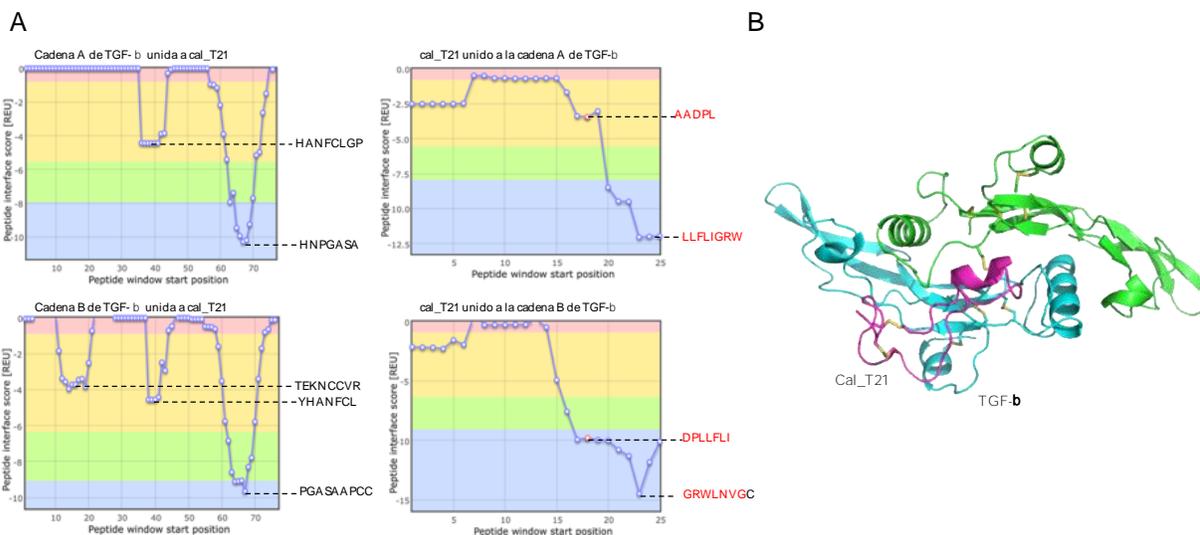


**Figura 46.** Complejos de unión del NoNaBody cal\_T21 con el TGF- $\beta$  después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El NoNaBody en magenta. El TGF- $\beta$  en cian (cadena A) y verde (cadena B).

Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión del complejo cal\_T21/TGF- $\beta$ , se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión en la plataforma ROSIE. En la Figura 47A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas del TGF- $\beta$  con T21, el cual obtuvo un “score” total de interacción de **-34.02 REU**. En la Figura 47B, se observa la orientación de unión de T21 con respecto a su blanco. La energía de interacción fue menor a la del complejo control VNAR T21/ TGF- $\beta$  (-38.26). Por lo que no se recomienda la síntesis del péptido cal\_T21.

**Tabla 14.** Resumen de resultados de las proteínas contra TGF- $\beta$ . En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR T21.

Proteína	Sitio de interacción, con la cadena A del TGF- $\beta$	Sitio de interacción de la cadena A del TGF- $\beta$	Sitio de interacción, con la cadena B del TGF- $\beta$	Sitio de interacción de la cadena A del TGF- $\beta$	Score Total (REU)
T21	<b>KKWWAADPLLF</b>	YNQHNP GAS	<b>KKWWQQDPL</b>	KGYHANFCLGP	<b>-28.26</b>
Cal_T21	<b>LLFLIGRW</b>	HNP GASAA	<b>GRWLNVG</b>	PGASAAPCC	<b>-34.02</b>
Cal14.1a	GDCPPW	ANFCL	GDCPPW	NFCLGP	<b>-21.07</b>

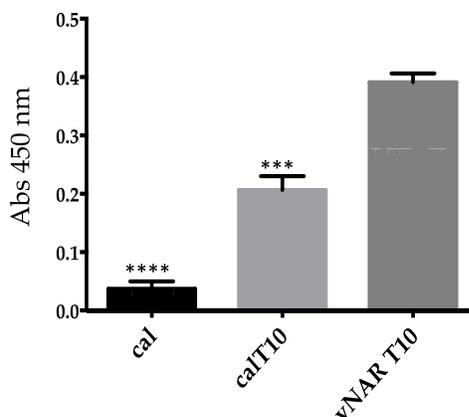


**Figura 47.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal\_T21/TGF- $\beta$ . A) Gráficas de la unión del TGF- $\beta$  con el NoNaBody cal\_T21, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR. B) Orientación de unión del complejo cal\_T21/ TGF- $\beta$ .

### 4.3 Resultados del análisis *In vitro*

#### Ensayo ELISA

En el ensayo ELISA de reconocimiento de TGF beta, se utilizó como control positivo al VNAR T10 anti TGF- $\beta$ , el cual obtuvo una señal de absorbancia de 0.390 nm. Como control negativo se utilizó al péptido andamio cal14.1a, el cual obtuvo una señal de absorbancia estadísticamente significativa más baja que el VNAR parental y que el NoNaBody a probar cal\_T10 que obtuvo un valor de absorbancia de 0.220 nm (Figura 48).



**Figura 48.** Ensayo ELISA sándwich de reconocimiento de TGF- $\beta$  por el péptido química cal\_T10, el VNAR parental T10 y la conotoxina andamio cal14.1a.

## Capítulo 5. TNF- $\alpha$

---

Se realizó el análisis con TNF- $\alpha$  como blanco molecular para dar otro ejemplo del diseño racional de proteínas utilizando el diseño de NoNaBodies mediante la unión de una conotoxina y el CDR3 de diferentes VNAR. Para este apartado, se utilizó a la citocina TNF- $\alpha$  como antígeno y al VNAR T16 como parental para el péptido quimérico cal\_T16. El objetivo de este capítulo fue analizar la interacción de proteínas diseñadas a partir de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a y el CDR3 del VNAR T16. A modo de control positivo, se analizó la interacción del VNAR T16 con la proteína TNF- $\alpha$ , la cual dio una energía de unión de referencia. A manera de control negativo, se realizó el análisis de la interacción del péptido andamio cal14.1a con el TNF- $\alpha$ .

### 5.1 Método

#### Estrategia *In silico*

##### 5.1.1.1 Modelado por homología de cal\_T16

Se realizó el modelado del NoNaBody cal\_T16, al unir el andamio cal14.1a con el CDR3 del VNAR T16. La estructura tridimensional fue construida con el software MODELLER v.9.19 mediante el protocolo de "Advanced Modeling for multiple templates". Para dicho procedimiento fue necesario realizar un alineamiento en BLAST-P para identificar las estructuras molde para el modelado por homología. La construcción de cal\_T16 se basó en tres diferentes conotoxinas con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 1FEO (Goldenberg et al., 2001), 1TT3 (Adams et al., 2003), y 1DW4 (Atkinson et al., 2000b).

##### 5.1.1.2 Modelado por homología del VNAR T16

La estructura tridimensional del VNAR T16 se predijo mediante modelado basado en homología usando el software MODELLER v.9.18 (Webb & Sali, 2016), a través de la estrategia "Advanced Modeling". BLAST-P se utilizó para identificar las posibles estructuras andamio para el modelado. T16 se modeló con base en tres estructuras de diferentes proteínas IgNAR con más del 50% de identidad. Los archivos PDB

de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 4HGK (Kovalenko et al., 2013), 1VER (V. a Streltsov et al., 2004) y 3MOQ (V. A. Streltsov, Varghese, Masters, & Nuttall, 2011).

### 5.1.1.3 *Dinámica Molecular*

Posterior al modelado por homología, la estructura tridimensional del péptido quimérico cal\_T16 y el VNAR T16 se refinaron mediante el procedimiento de “simulated annealing” con el software Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD) (Phillips et al., 2005), seguido del análisis y visualización con los softwares Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et al., 1996) y PyMOL Molecular Graphics System v2.2.2 para Mac OS X. Los parámetros del campo de fuerza para la simulación se aplicaron utilizando la herramienta informática Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM34). Para el control de calidad de las estructuras modeladas, se realizó el análisis estructural con la herramienta en línea PROCHECK. Las simulaciones se realizaron en una caja de moléculas de agua TIP3P como solvente con condiciones de contorno periódicas, donde se supone un ensamble NPT (un número constante de partículas (N), condiciones isobáricas (P) e isotérmicas (T) constantes). La presión se ajustó a 1 atm y la temperatura a 310 K. Estas condiciones se unieron a pasos de recocido y relajación de forma iterativa. Después del recocido y enfriamiento, cal\_T16 y T16 se sometieron a un análisis de dinámica molecular a 310 K y 1 atm durante 50 ns. El análisis de las coordenadas de trayectoria atómica y las energías se escribieron en el disco cada 10 ps. Se seleccionó la conformación de proteínas con el mayor tiempo de existencia.

### 5.1.1.4 *Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking)*

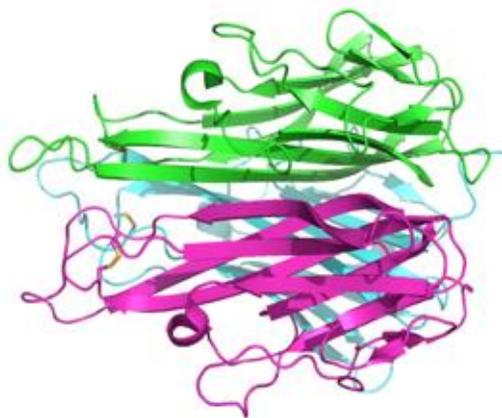
Para predecir el posible sitio de unión de cal\_T16 a TNF- $\alpha$  se aplicó un protocolo de acoplamiento proteína-proteína, utilizando la herramienta web ClusPro (Comeau, Gatchell, Vajda, & Camacho, 2004b; Kozakov et al., 2017). El algoritmo de acoplamiento evalúa diferentes complejos putativos con complementariedades de superficie favorables. Los complejos obtenidos se filtraron, seleccionando aquellos con buena energía electrostática y libres de desolvatación para su posterior agrupamiento. Para la visualización y selección de los mejores resultados se utilizó PyMOL Molecular Graphics System para Mac OS X. Se eligió el complejo con mejor afinidad y orientación de unión del TNF- $\alpha$ /cal\_T16. Para identificar las regiones predichas de interacción proteína-proteína (PPI), se utilizó la herramienta “Peptidederive” en el servidor ROSIE, con la configuración predeterminada por el desarrollador. Para el cálculo del acoplamiento, “Peptidederive”

proporcionó un gráfico con los posibles residuos de interacciones proteína-proteína involucrados en la interacción, clasificados de acuerdo con la función de puntuación de Rosetta – Unidades de energía de Rosetta (REU, Rosetta Energy Units) (Lyskov et al., 2013; Sedan et al., 2016b; Sedan, Marcu, Lyskov, & Schueler-Furman, 2016a).

## 5.2 Resultados del análisis *In silico*

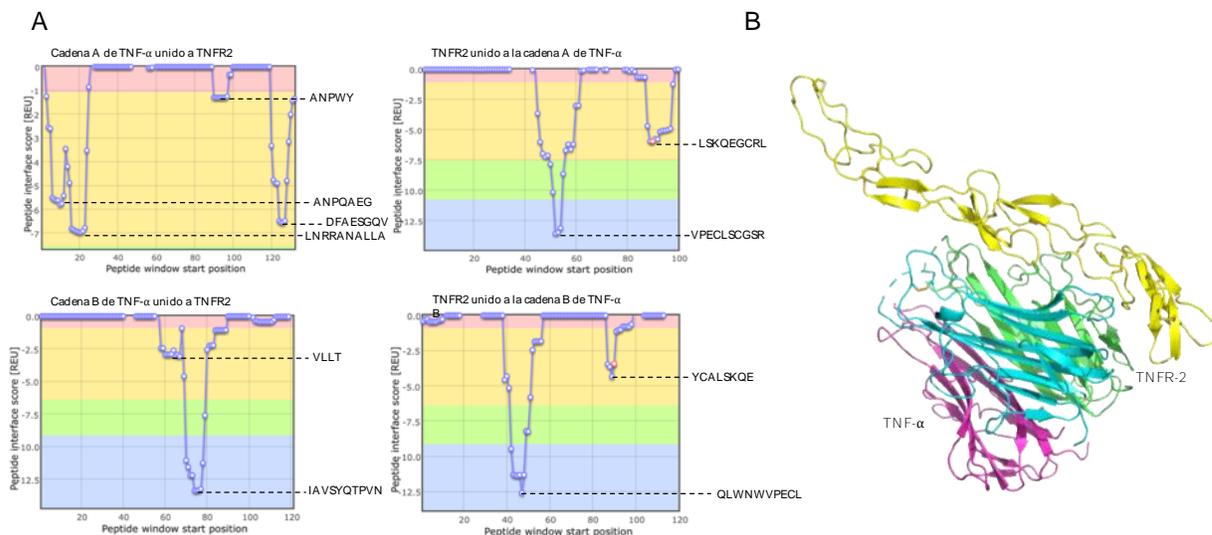
### Análisis estructural de TNF- $\alpha$

Se realizó la dinámica molecular durante 50 ns de la estructura del TNF- $\alpha$  resulta por Difracción de rayos X. Con la finalidad de refinar y ajustar la estructura a las mismas condiciones de las proteínas que se utilizaron para los análisis de interacción proteína-proteína (Figura 49).



**Figura 49.** Estructura del TNF- $\alpha$  refinado por dinámica molecular. Cadena A (verde), cadena B (cian), Cadena C (magenta).

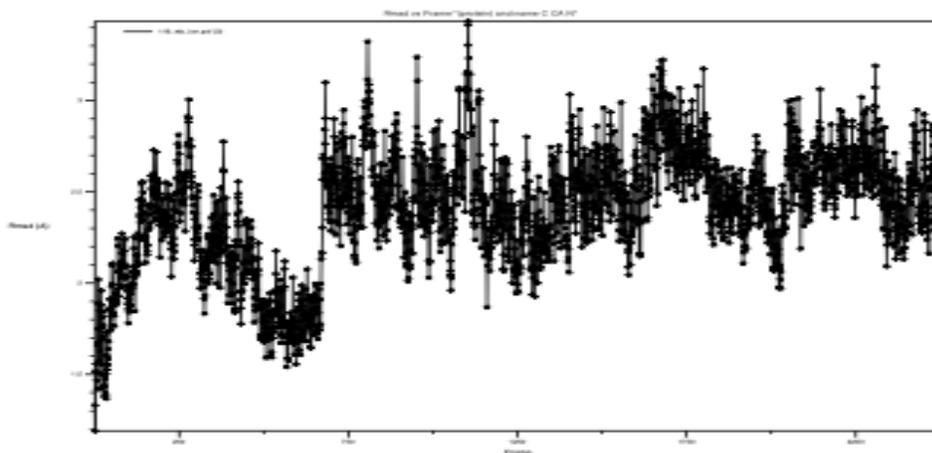
Se procedió a realizar el análisis de interacción proteína-proteína del complejo TNF- $\alpha$ /TNFR-2 (Receptor natural) con la finalidad de contar con un control positivo y un “score” de referencia. En la Figura 50 se muestran las regiones de unión del complejo y un “score” total de interacción de **-39.78 REU**. Se realizó el análisis solo con una cadena del TNFR-2, para poder comparar los resultados con el VNAR T16 y el péptido quimérico.



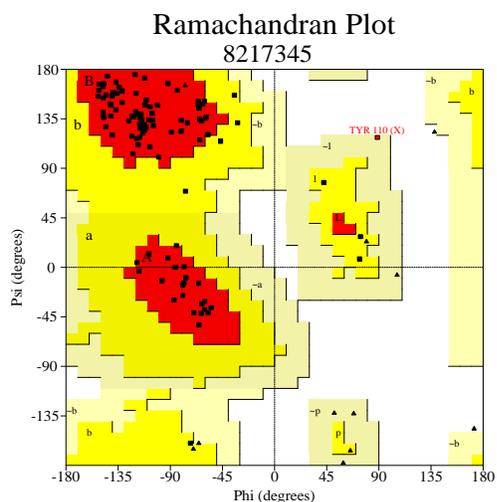
**Figura 50.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo TNF- $\alpha$ /TNFR-2. A) Gráficas de la unión del TNFR-2 con la proteína TNF- $\alpha$ . B) Orientación de unión del complejo TNF- $\alpha$ /TNFR-2.

### Análisis estructural del VNAR T16

Se realizó el modelado por homología del VNAR T16, dominio variable de un anticuerpo de tiburón capaz de neutralizar al TNF- $\alpha$ . Con el objetivo de utilizar este VNAR como control positivo al compararlo con el péptido quimérico cal\_T16. En la tabla 15 se muestran los diferentes modelos encontrados en el análisis de dinámica molecular. Se obtuvo un buen modelo para proceder a realizar los análisis de interacción proteína-proteína, ya que a lo largo de la dinámica obtuvo valores de RMSD estables a partir de los 14 ns (Figura 51).

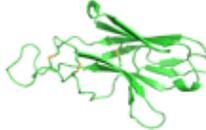
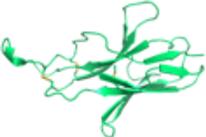


**Figura 51.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VNAR T16. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.



**Figura 52.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del VNAR T16 después de la dinámica molecular.

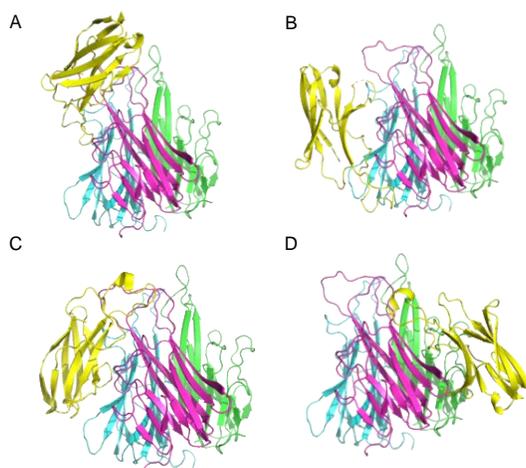
**Tabla 15.** Conformaciones del VNAR T16 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas el modelo seleccionado con mayor tiempo de existencia después de la dinámica molecular.

	Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1		<b>1116</b>	<b>22.32</b>
2		698	13.96
3		203	4.06
4		412	8.24
5		71	1.42

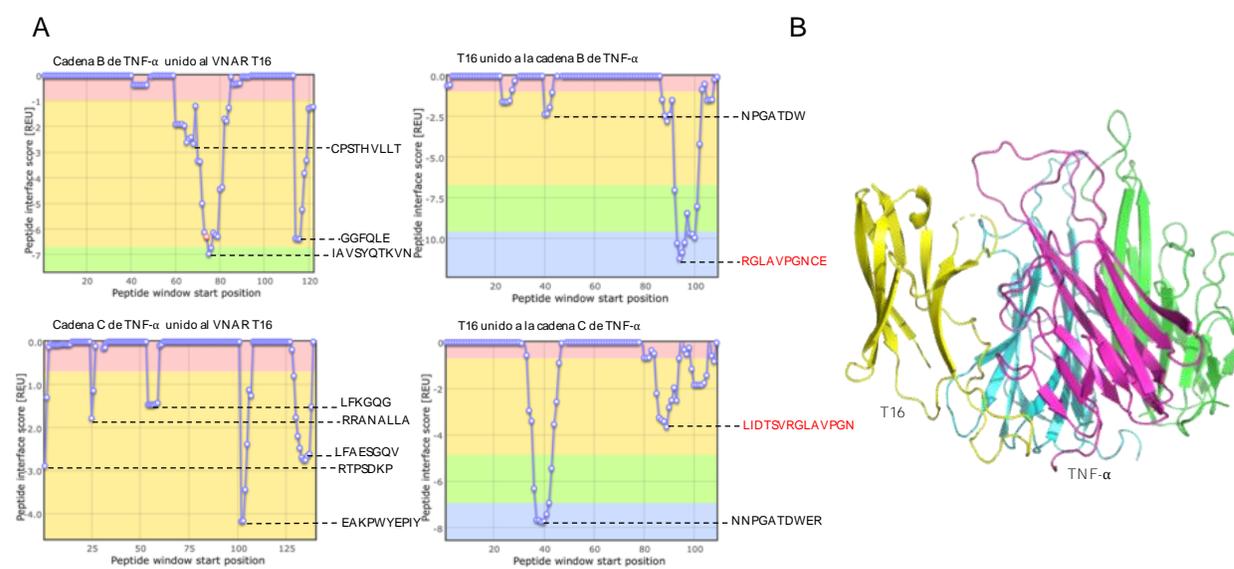
En los análisis posteriores obtuvo 92.3 % de los residuos en regiones altamente favorecidas en el gráfico de Ramachandran (Figura 52).

### 5.3 Análisis de interacción del complejo T16/TNF- $\alpha$ (control positivo)

En la Figura 53 se muestran las diferentes conformaciones de interacción del complejo VNAR T16/TNF- $\alpha$  después del análisis global de interacción proteína-proteína. Dicho complejo se realizó como control positivo. Se eligió al modelo de interacción B, ya que presentó la menor energía de unión. Se procedió a realizar el análisis de interacción proteína-proteína local del complejo control VNAR T16/TNF- $\alpha$ , en el cual se obtuvo un puntaje total de **-33.01 REU**. En la Figura 54 se muestran las gráficas con las regiones de unión del complejo.



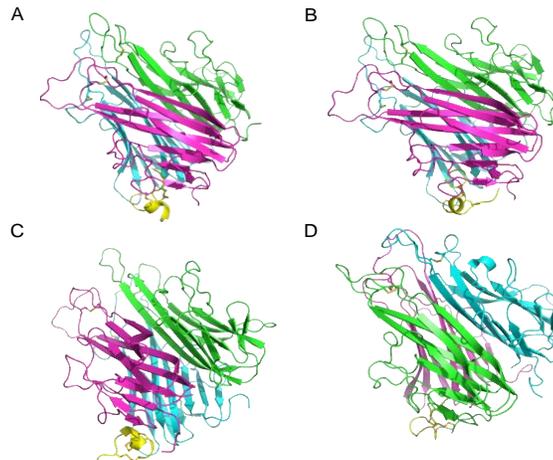
**Figura 53.** Complejos de unión del VNAR T16 con el TNF- $\alpha$  después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en amarillo. El TNF- $\alpha$ , en cian (cadena A), en verde (cadena B) y en magenta (cadena C)



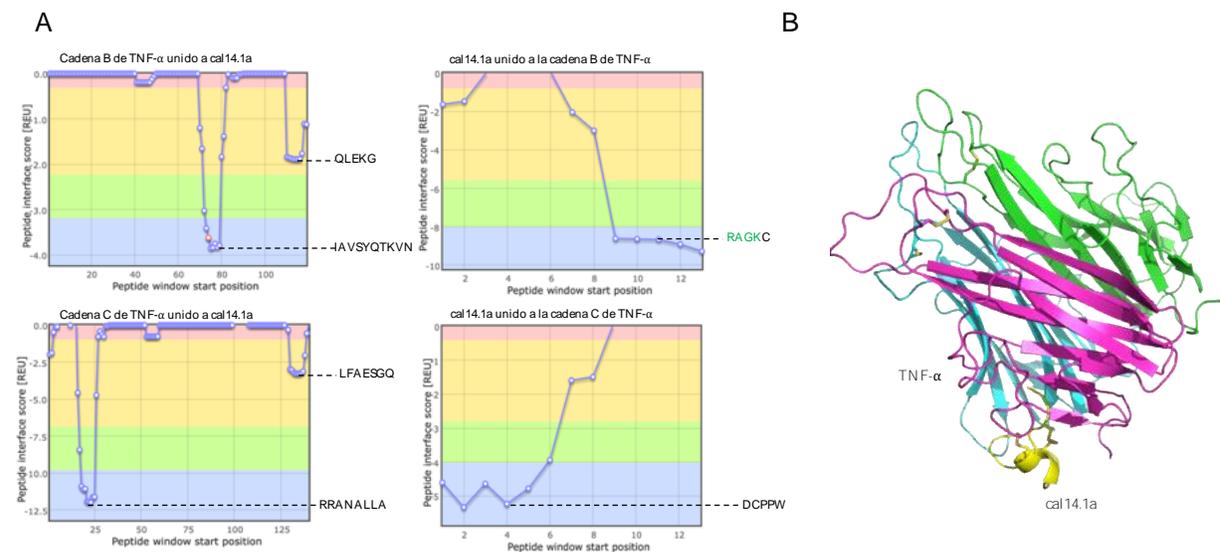
**Figura 54.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR T16/TNF- $\alpha$ . A) Gráficas de la unión del VNAR T16 con la proteína TNF- $\alpha$ . B) Orientación de unión del complejo T16/TNF- $\alpha$ .

## Análisis de la interacción del complejo cal14.1a/TNF- $\alpha$ (control negativo)

Se realizó el Global Docking proteína-proteína de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco TNF- $\alpha$ . Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción obtenidos con el software ClusPro (Figura 55), con la finalidad de encontrar las posibles zonas de unión y la orientación óptima de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina con el TNF- $\alpha$ .



**Figura 55.** Complejos de unión de la proteína andamio cal14.1a con el TNF- $\alpha$  después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. Cal14.1a en amarillo. El TNF- $\alpha$ , en cian (cadena A), en verde (cadena B) y en magenta (cadena C)



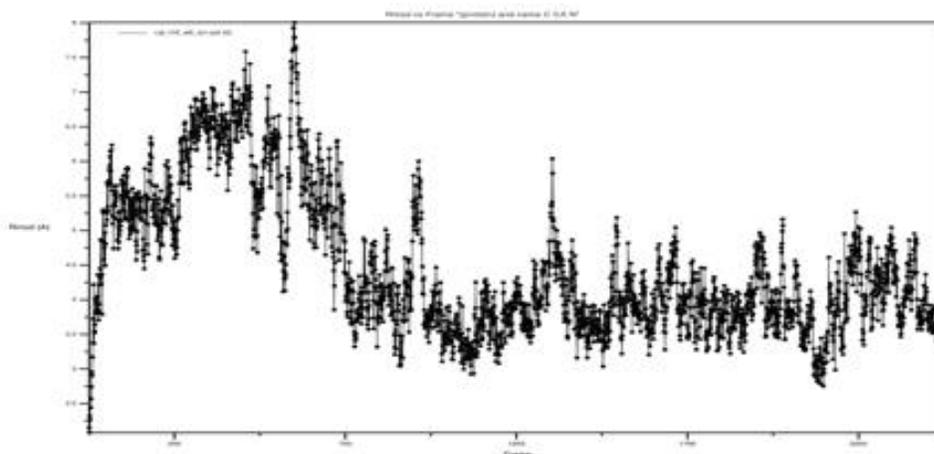
**Figura 56.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/TNF- $\alpha$ . A) Gráficas de la unión de la proteína andamio cal14.1a con la proteína TNF- $\alpha$ . B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/TNF- $\alpha$ .

La unión que presentó mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo A. Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión, se llevó a cabo la identificación de

las regiones de unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a con TNF- $\alpha$ , en la plataforma ROSIE. En la Figura 56A, se observan las regiones de interacción que tiene las tres cadenas del TNF- $\alpha$  con cal14.1a, el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-24.04 REU**. En la Figura 56B, se observa la orientación de unión de cal14.1a.

### Análisis estructural de cal\_T16

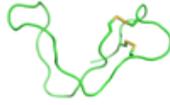
Se realizó el modelado de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a con el CDR3 del VNAR T16 con el programa MODELLER y refinada con el programa NAMD durante 50 ns. Dicha proteína se denominó cal\_T16. Respecto a su análisis de fluctuación global, se puede observar en la Figura 57 que la estructura se estabiliza a los 10 ns a lo largo de la simulación. Al realizar la selección de la conformación más estable, se pudo observar que la conformación 3 apareció 1320 veces con un tiempo de existencia de 26.4 ns (Tabla 16), lo que indica que más del 50% de las estructuras en la simulación mantienen buena estabilidad.

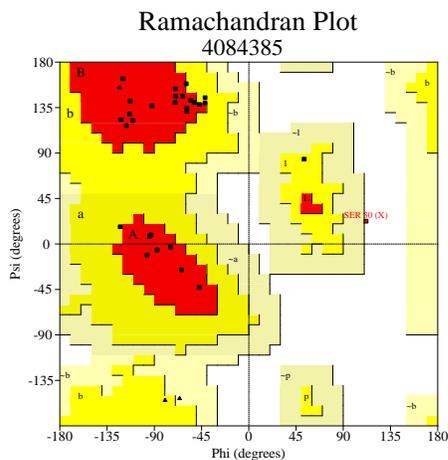


**Figura 57.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del péptido quimérica cal\_T16. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

Posterior al refinamiento del modelo del péptido cal\_T16 se procedió a analizar la calidad de la conformación 3 mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura 58). El modelo obtuvo 21 residuos en regiones altamente favorecidas (80.8 %), 4 residuos en regiones adicionales permitidas (15.4 %) y ningún residuo (0 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad del modelo fue buena para los análisis posteriores.

**Tabla 16.** Conformaciones del NoNaBody cal\_T16 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia durante la dinámica molecular.

	Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1		536	10.72
2		244	4.88
3		<b>1320</b>	<b>26.4</b>
4		112	2.24
5		288	5.76

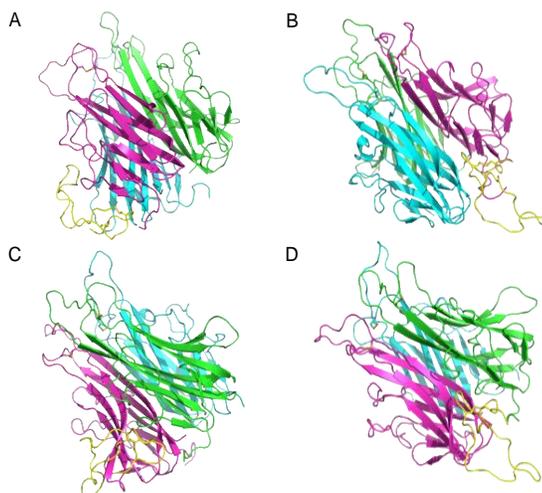


**Figura 58.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del péptido quimérico cal\_T16 después de la dinámica molecular.

### Análisis de la interacción del complejo cal\_T16/TNF- $\alpha$

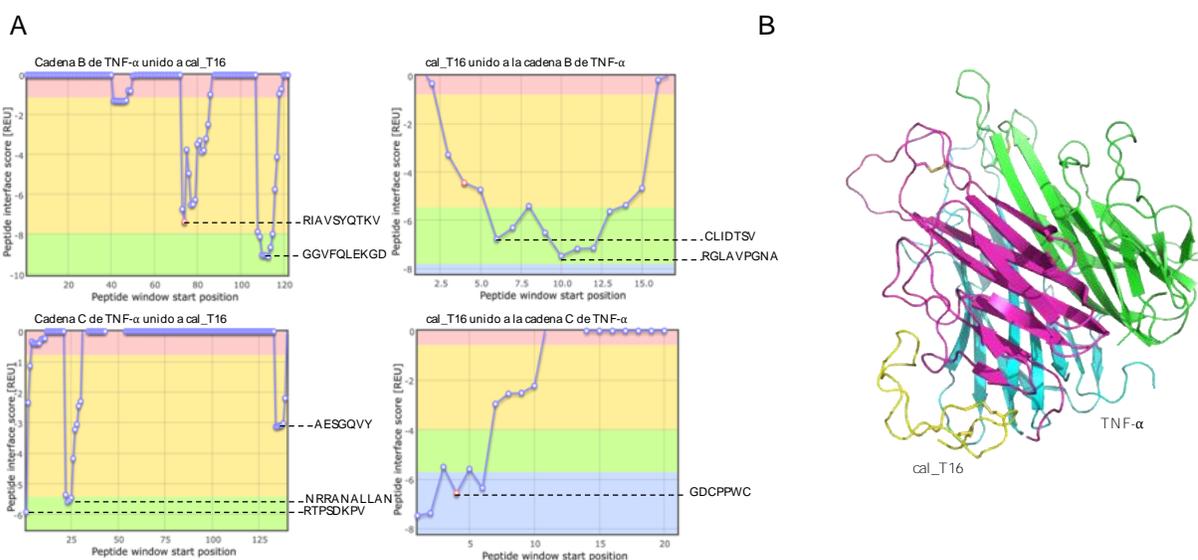
Se realizó el Global Docking proteína-proteína del péptido cal\_T16 como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco TNF- $\alpha$ . Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción obtenidos con el software ClusPro (Figura 59), con la finalidad de encontrar las posibles

zonas de unión y la orientación óptima de la unión de cal\_T16 con el TNF- $\alpha$ . La unión que presentó mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo A.



**Figura 59.** Complejos de unión de la proteína quimérica cal\_T16 con el TNF- $\alpha$  después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. Cal\_T16 en amarillo. El TNF- $\alpha$ , en cian (cadena A), en verde (cadena B) y en magenta (cadena C).

Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión del complejo cal\_T16/TNF- $\alpha$  se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión en la plataforma ROSIE. En la Figura 60A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas del TNF- $\alpha$  con cal\_T16, el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-27.05 REU**. En la Figura 60B, se observa la orientación de unión de cal\_T16 con respecto a su blanco.



**Figura 60.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal\_T16/TNF- $\alpha$ . A) Gráficas de la unión del péptido cal\_T16 con la proteína TNF- $\alpha$ . B) Orientación de unión del complejo cal\_T16/TNF- $\alpha$ .

## Capítulo 6. PCSK-9

---

Se realizó el análisis de interacción *in silico* de un NoNaBody con el PCSK-9 como blanco molecular para dar otro ejemplo del diseño racional de péptidos quiméricos mediante la unión de una conotoxina y el CDR3 de diferentes VNAR. Para este apartado, se utilizó la proteína PCSK-9 como antígeno y al VNAR PK13 como parental para el péptido quimérico cal\_PK13. El objetivo de este capítulo fue analizar la interacción de proteínas diseñadas a partir de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a y el CDR3 del VNAR PK13. A modo de control positivo, se analizó la interacción del VNAR PK13 con la proteína PCSK9, la cual dio una energía de unión de referencia. A manera de control negativo, se realizó el análisis de la interacción del andamio cal14.1a con PCSK-9.

### 6.1 Método

#### Estrategia *In silico*

##### 6.1.1.1 Modelado por homología de cal\_PK13

Se realizó el modelado del péptido quimérico cal\_PK13, al unir el péptido andamio cal14.1a con el CDR3 de la VNAR PK13. La estructura tridimensional fue construida con el software MODELLER v.9.19 mediante el protocolo de "Advanced Modeling for multiple templates". Para dicho procedimiento fue necesario realizar un alineamiento en BLAST-P para identificar las estructuras molde para el modelado por homología. La construcción de cal\_PK13 se basó en tres distintas proteínas andamio de diferentes conotoxinas con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 1FEO (Goldenberg et al., 2001), 1TT3 (Adams et al., 2003), y 1DW4 (Atkinson et al., 2000b).

##### 6.1.1.2 Modelado por homología del VNAR PK13

La estructura tridimensional del VNAR PK13 se predijo mediante modelado basado en homología usando el software MODELLER v.9.19 (Webb & Sali, 2016), a través de la estrategia "Advanced Modeling". BLAST-P se utilizó para identificar las posibles estructuras andamio para el modelado. PK13 se modeló con base

en tres estructuras de diferentes proteínas IgNAR con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 4HGK (Kovalenko et al., 2013), 1VER (Streltsov et al., 2004) y 3MOQ (Streltsov et al., 2011).

#### *6.1.1.3 Dinámica Molecular*

Posterior al modelado por homología, la estructura tridimensional del NoNaBody cal\_PK13 y el VNAR PK13 se refinaron mediante el procedimiento de “simulated annealing” con el software Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD) (Phillips et al., 2005), seguido del análisis y visualización con los softwares Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et al., 1996) y PyMOL Molecular Graphics System v2.2.2 para Mac OS X. Los parámetros del campo de fuerza para la simulación se aplicaron utilizando la herramienta informática Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM34). Para el control de calidad de las estructuras modeladas, se realizó el análisis estructural con la herramienta en línea PROCHECK. Las simulaciones se realizaron en una caja de moléculas de agua TIP3P como solvente con condiciones de contorno periódicas, donde se supone un ensamble NPT (un número constante de partículas (N), condiciones isobáricas (P) e isotérmicas (T) constantes). La presión se ajustó a 1 atm y la temperatura a 310 K. Estas condiciones se unieron a pasos de recocido y relajación de forma iterativa. Después del recocido y enfriamiento, cal\_PK13 y PK13 se sometieron a un análisis de dinámica molecular a 310 K y 1 atm durante 50 ns. El análisis de las coordenadas de trayectoria atómica y las energías se escribieron en el disco cada 10 ps. Se seleccionó la conformación de proteínas más estable con el mayor tiempo de existencia.

#### *6.1.1.4 Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking)*

Para predecir el posible sitio de unión de cal\_PK13 a PCSK-9 se aplicó un protocolo de acoplamiento proteína-proteína, utilizando la herramienta web ClusPro (Comeau et al., 2004b; Kozakov et al., 2017). El algoritmo de acoplamiento evalúa diferentes complejos putativos con complementariedades de superficie favorables. Los complejos obtenidos se filtraron, seleccionando aquellos con buena energía electrostática y libres de desolvatación para su posterior agrupamiento. Para la visualización y selección de los mejores resultados se utilizó PyMOL Molecular Graphics System para Mac OS X. Se eligió el complejo con mejor afinidad y orientación de unión del PCSK-9/cal\_PK13. Para identificar las regiones predichas de interacción proteína-proteína (PPI), se utilizó la herramienta “Peptidederive” en el servidor ROSIE, con la configuración

predeterminada por el desarrollador. Para el cálculo del acoplamiento, “Peptidederive” proporcionó un gráfico con los posibles residuos de interacciones proteína-proteína involucrados en la interacción, clasificados de acuerdo con la función de puntuación de Rosetta – Unidades de energía de Rosetta (REU, Rosetta Energy Units) (Lyskov et al., 2013; Sedan et al., 2016b, 2016a).

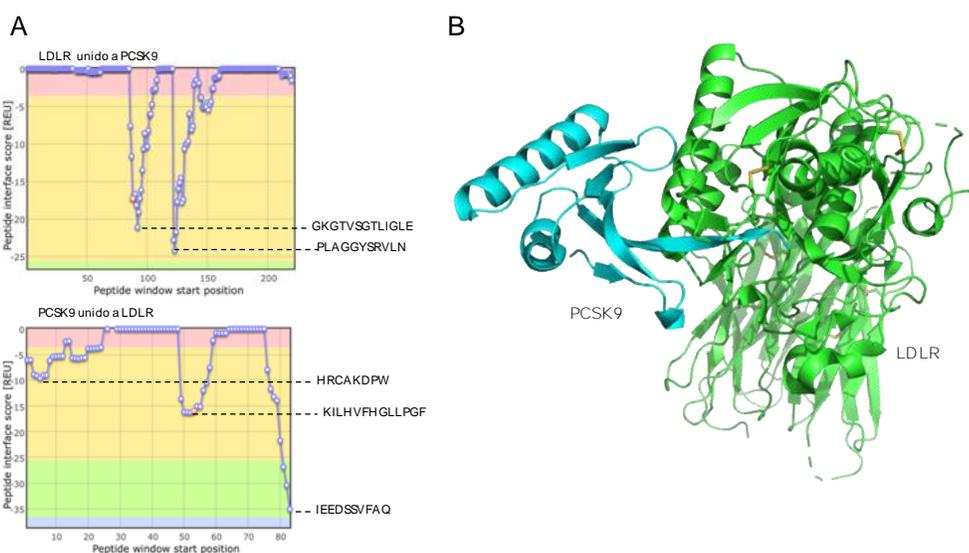
## 6.2 Resultados del análisis *In silico*

### Análisis estructural de PCSK-9

Se realizó la dinámica molecular durante 50 ns de la estructura del PCSK-9 resuelta por Difracción de rayos X (PDB ID 2P4E (Cunningham et al., 2007)). Con la finalidad de refinar y ajustar la estructura a las mismas condiciones de las proteínas que se utilizaron para los análisis de interacción proteína-proteína (Figura 61).



**Figura 61.** Estructura de PCSK-9 refinado por dinámica molecular.



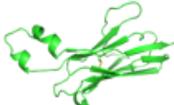
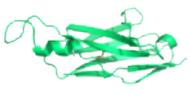
**Figura 62.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo PCSK-9/LDLR. A) Gráficas de la unión de PCSK-9 con la proteína LDLR. B) Orientación de unión del complejo PCSK-9/LDLR.

Se procedió a realizar el análisis de interacción proteína-proteína del complejo PCSK-9/LDLR (Receptor natural) con la finalidad de contar con un control positivo y un puntaje de referencia. En la Figura 62 se muestran las regiones de unión del complejo y un puntaje total de interacción de **-73.37 REU**.

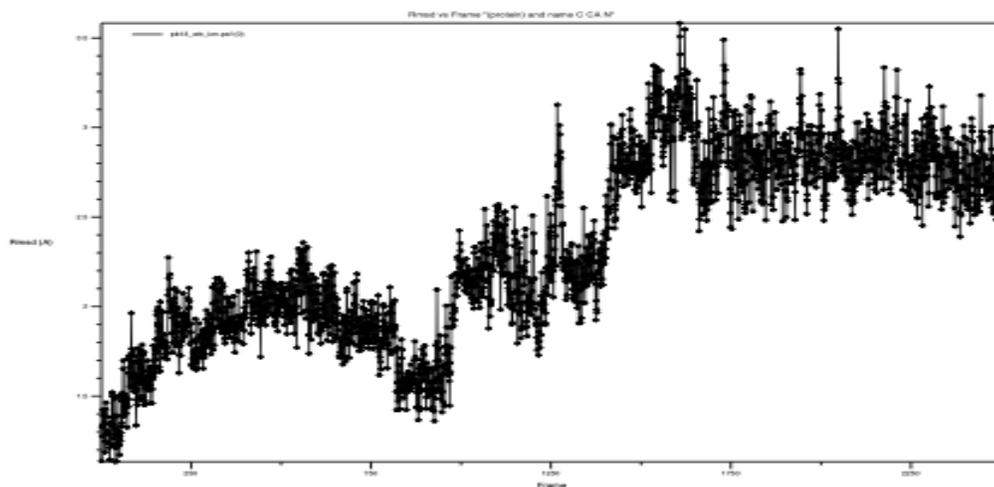
### Análisis estructural del VNAR PK13

Se realizó el modelado por homología del VNAR PK13, dominio variable de un anticuerpo de tiburón capaz de neutralizar al PCSK-9 *in vitro*. Con el objetivo de utilizar este VNAR como control positivo al compararlo con el péptido quimérico cal\_PK13.

**Tabla 17.** Conformaciones del VNAR PK13 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.

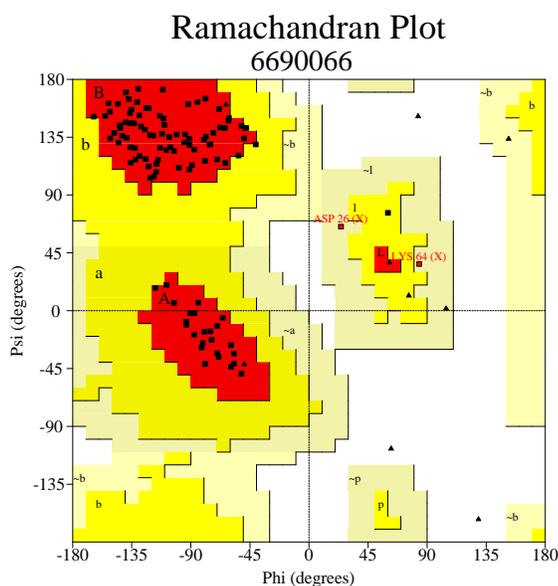
	Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1		<b>1389</b>	<b>27.78</b>
2		541	10.82
3		112	2.24
4		199	3.98
5		259	5.18

En la Tabla 17 se muestran los diferentes modelos encontrados en el análisis de dinámica molecular. Se obtuvo un buen modelo para proceder a realizar los análisis de interacción proteína-proteína, ya que a lo largo de la dinámica obtuvo valores de RMSD estables a partir de los 25 ns (Figura 63).



**Figura 63.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del VNAR PK13. En el eje “X” se indican los Armstrong y en el eje “Y” el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

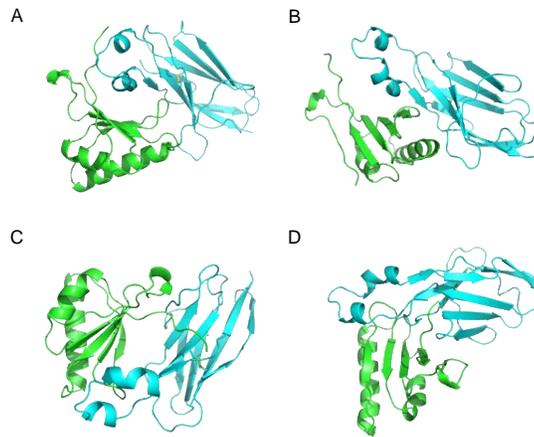
En los análisis posteriores obtuvo un 96.2 % de los residuos en regiones altamente favorecidas en el gráfico de Ramachandran (Figura 64).



**Figura 64.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del VNAR PK13 después de la dinámica molecular.

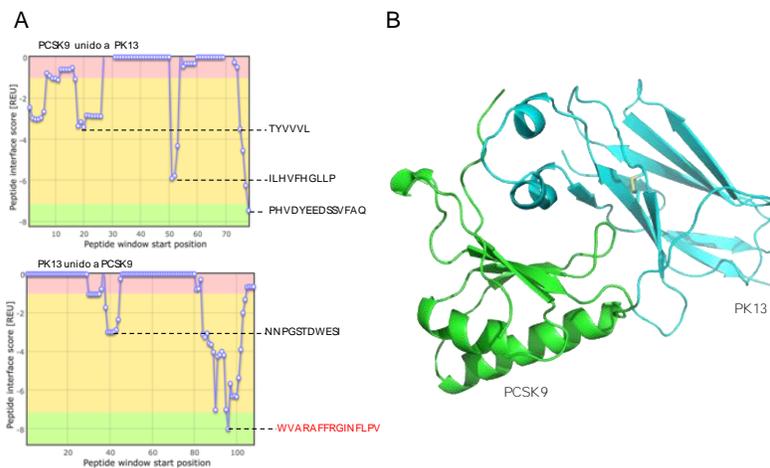
### **Análisis de interacción del complejo PK13/PCSK-9 (control positivo)**

En la Figura 65 se muestran las diferentes conformaciones de interacción del complejo VNAR PK13/PCSK-9 después del análisis global de interacción proteína-proteína. Dicho complejo se realizó como control positivo. Se eligió al modelo de interacción A, ya que presentó la menor energía de unión.



**Figura 65.** Complejos de unión del VNAR PK13 con el PCSK-9 después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El VNAR en cian. El PCSK-9, en verde.

Se analizó la interacción local proteína-proteína del complejo control positivo VNAR PK13/PCSK-9, en el cual se obtuvo un puntaje total de **-20.49 REU**. En la Figura 66 se muestran las gráficas con las regiones de unión del complejo.

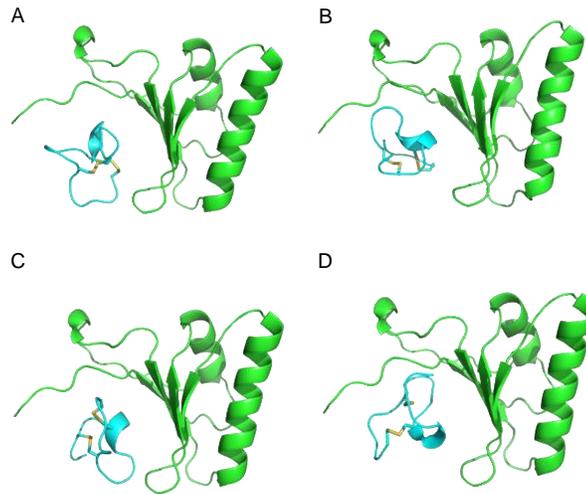


**Figura 66.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR PK13/PCSK-9. A) Gráficas de la unión del VNAR PK13 con la proteína PCSK-9. B) Orientación de unión del complejo PK13/PCSK-9

### **Análisis de la interacción del complejo cal14.1a/PCSK-9 (control negativo)**

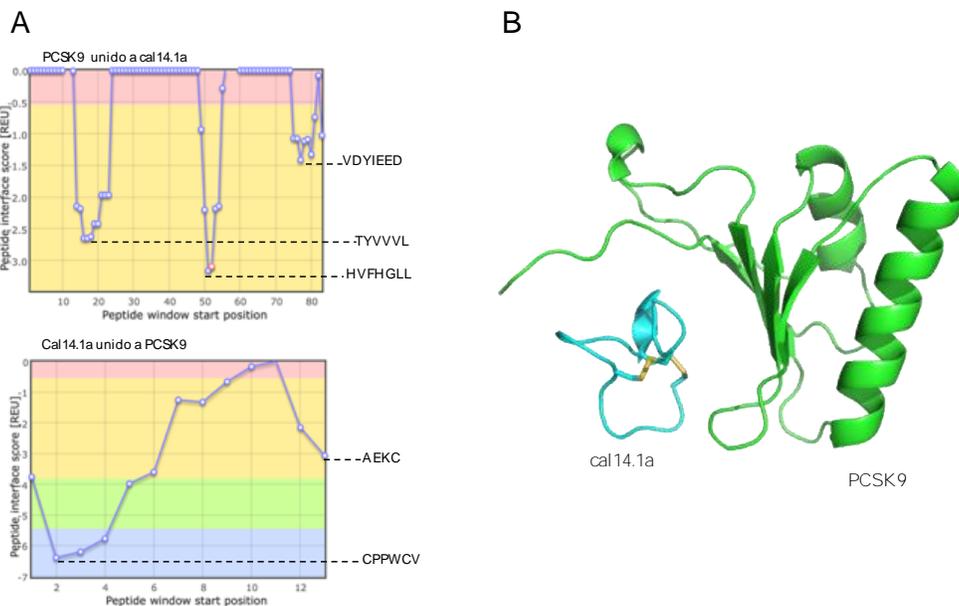
Se realizó el Global Docking proteína-proteína de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco PCSK-9. Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción obtenidos con el software ClusPro (Figura 67), con la finalidad de encontrar las

posibles zonas de unión y la orientación óptima de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina con PCSK-9. La unión que presentó mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo A.



**Figura 67.** Complejos de unión del andamio cal14.1a con PCSK-9 después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. Cal14.1a en cian. El PCSK-9 en verde.

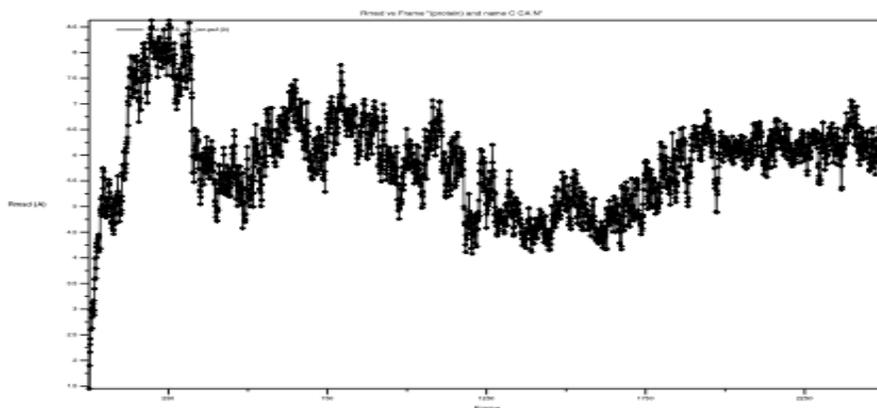
Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión, se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a con PCSK-9, en la plataforma ROSIE. En la Figura 68A, se observan las regiones de interacción que tiene las tres cadenas del TNF- $\alpha$  con cal14.1a, el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-10.90 REU**. En la Figura 68B, se observa la orientación de unión de cal14.1a.



**Figura 68.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/PCSK-9. A) Gráficas de la unión de la proteína andamio cal14.1a con la proteína PCSK-9. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/PCSK-9.

## Análisis estructural de cal\_PK13

Se realizó el modelado de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a con el CDR3 del VNAR PK13 con el programa MODELLER y refinada con el programa NAMD durante 50 ns. Dicho péptido se denominó cal\_PK13. Respecto a su análisis de fluctuación global, se puede observar en la Figura 69 que la estructura se estabiliza a los 5 ns a lo largo de la simulación.

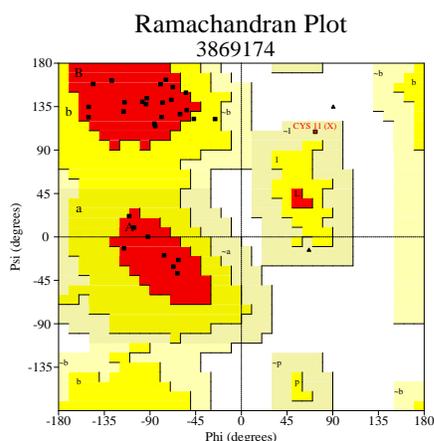


**Figura 69.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del péptido quimérica cal\_PK13. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

**Tabla 18.** Conformaciones del péptido cal\_PK13 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia en la dinámica molecular.

Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1 	<b>1213</b>	<b>24.26</b>
2 	233	4.66
3 	665	13.3
4 	236	4.72
5 	153	3.06

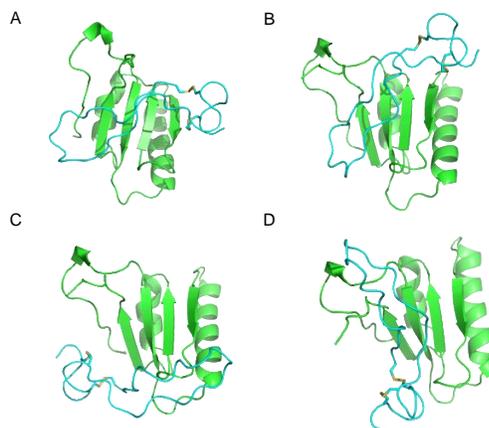
Posterior al refinamiento del modelo del péptido cal\_PK13 se procedió a analizar la calidad de la conformación 3 mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura 70). El modelo obtuvo 24 residuos en regiones altamente favorecidas (85.7 %), 3 residuos en regiones adicionales permitidas (10.7 %) y ningún residuo (0 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad del modelo fue buena para los análisis posteriores.



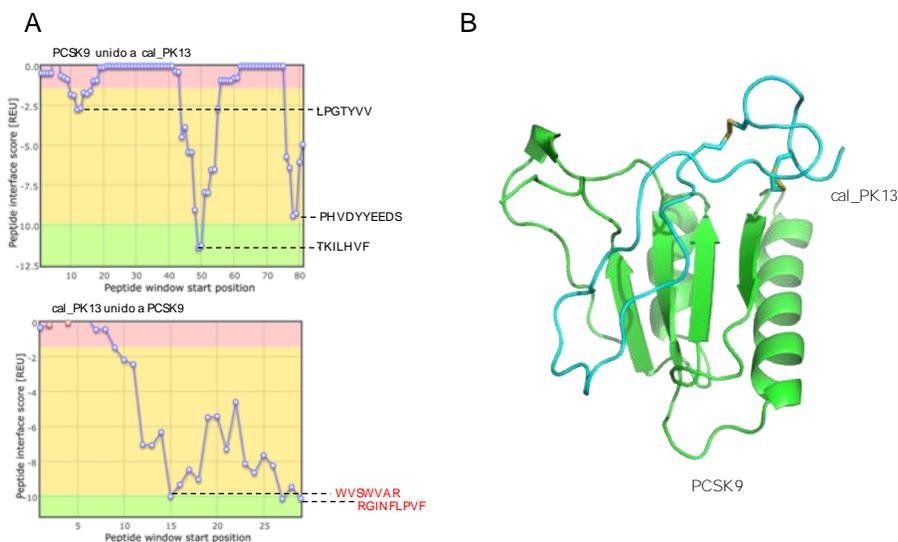
**Figura 70.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del péptido quimérico cal\_PK13 después de la dinámica molecular.

### Análisis de la interacción del complejo cal\_PK13/PCSK-9

Se realizó el Global Docking proteína-proteína del péptido cal\_PK13 como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco PCSK-9. Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción obtenidos con el software ClusPro (Figura 71), con la finalidad de encontrar las posibles zonas de unión y la orientación óptima de la unión de cal\_PK13 con PCSK-9. La unión que presentó mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo A.



**Figura 71.** Complejos de unión del péptido quimérico cal\_PK13 con el PCSK-9 después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. Cal\_PK13 en cian. PCSK-9 en verde.



**Figura 72.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal\_PK13/PCSK-9. A) Gráficas de la unión de la proteína andamio cal\_PK13 con la proteína PCSK-9. B) Orientación de unión del complejo cal\_PK13/ PCSK-9.

Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión del complejo cal\_PK13/PCSK-9 se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión en la plataforma ROSIE. En la Figura 72A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas del PCSK-9 con cal\_PK13, el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-28.20 REU**. En la Figura 72B, se observa la orientación de unión de cal\_PK13 con respecto a su blanco.

**Tabla 19.** Resumen de resultados de las proteínas diseñadas contra PCSK-9. En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR PK13.

Proteína	Sitio de interacción, con el PCSK-9	Sitio de interacción del PCSK-9	Score Total (REU)
PK13	WVARAFFRGINFLPV	PHVDYEEEDSSVFAQ	<b>-20.49</b>
Cal_PK13	WVSWVARAF	TKILHVF	<b>-28.20</b>
Cal14.1a	CPPWCV	HVFHGLL	<b>-10.90</b>

## Capítulo 7. Antígeno Carcinoembrionario (CEA)

---

Se llevó a cabo el análisis de interacción *in silico e in vitro* del NoNaBody cal\_CV043 derivado de la unión de la alfa conotoxina cal14.1a con el CDR3 del VNAR CV043 anti CEA para proporcionar otro ejemplo del diseño racional de péptidos quiméricos mediante el método propuesto en esta investigación. El objetivo de este capítulo fue analizar la interacción de proteínas diseñadas a partir de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a y el CDR3 del VNAR CV043. A modo de control positivo, se analizó la interacción del VNAR CV043 con la proteína CEA, la cual dio una energía de unión de referencia. A manera de control negativo, se realizó el análisis de la interacción del andamio cal14.1a con CEA.

### 7.1 Método

#### Estrategia *in silico*

##### 7.1.1.1 Modelado por homología de cal\_CV043

Se realizó el modelado del NoNaBody cal\_CV043, al unir el péptido andamio cal14.1a con el CDR3 de la VNAR CV043. La estructura tridimensional fue construida con el software MODELLER v.9.19 (Webb & Sali, 2016) mediante el protocolo de "Advanced Modeling for multiple templates". Se realizó un alineamiento en BLAST-P para identificar las estructuras molde para el modelado por homología. Para la construcción de cal\_CV043 se utilizaron tres distintas proteínas andamio de diferentes conotoxinas con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 1FEO (Goldenberg et al., 2001), 1TT3 (Adams et al., 2003), y 1DW4 (Atkinson et al., 2000b).

##### 7.1.1.2 Modelado por homología del VNAR CV043

La estructura tridimensional del VNAR CV043 se predijo mediante modelado basado en homología usando el software MODELLER v.9.19 (Webb & Sali, 2016), a través de la estrategia "Advanced Modeling". BLAST-P se utilizó para identificar las posibles estructuras andamio para el modelado. El VNAR CV043 se modeló con base en tres estructuras de diferentes VNAR con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los

andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 4HGK (Kovalenko et al., 2013), 1VER (V. a Streltsov et al., 2004) y 3MOQ (Streltsov et al., 2011).

### 7.1.1.3 *Dinámica Molecular*

La estructura tridimensional del NoNaBody cal\_VC043 y el VNAR CV043 se refinaron mediante el procedimiento de “simulated annealing” con el software Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD) (Phillips et al., 2005), seguido del análisis y visualización con los softwares Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et al., 1996) y PyMOL Molecular Graphics System v2.2.2 para Mac OS X. Los parámetros del campo de fuerza para la simulación se aplicaron utilizando la herramienta informática Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM34). Para el control de calidad de las estructuras modeladas, se realizó el análisis estructural con la herramienta en línea PROCHECK. Las simulaciones se realizaron en una caja de moléculas de agua TIP3P como solvente con condiciones de contorno periódicas, donde se supone un ensamble NPT (un número constante de partículas (N), condiciones isobáricas (P) e isotérmicas (T) constantes).

La presión se ajustó a 1 atm y la temperatura a 310 K. Estas condiciones se unieron a pasos de recocido y relajación de forma iterativa. Después del recocido y enfriamiento, cal\_CV043 y VNAR CV043 se sometieron a un análisis de dinámica molecular a 310 K y 1 atm durante 50 ns. El análisis de las coordenadas de trayectoria atómica y las energías se escribieron en el disco cada 10 ps. Se seleccionó la conformación de proteínas más estable termodinámicamente con el mayor tiempo de existencia.

### 7.1.1.4 *Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking)*

Para predecir el posible sitio de unión de cal\_CV043 a CEA se aplicó un protocolo de acoplamiento proteína-proteína, utilizando la herramienta web ClusPro (Comeau et al., 2004b; Kozakov et al., 2017). El algoritmo de acoplamiento evalúa diferentes complejos putativos con complementariedades de superficie favorables. Los complejos obtenidos se filtraron, seleccionando aquellos con buena energía electrostática y libres de desolvatación para su posterior agrupamiento. Para la visualización y selección de los mejores resultados se utilizó PyMOL Molecular Graphics System para Mac OS X.

Se eligió el complejo con mejor afinidad y orientación de unión del CEA/cal\_CV043. Para identificar las regiones predichas de interacción proteína-proteína (PPI), se utilizó la herramienta “Peptiderive” en el servidor ROSIE, con la configuración predeterminada por el desarrollador. Para el cálculo del acoplamiento, “Peptiderive” proporcionó un gráfico con los posibles residuos de interacciones proteína-proteína involucrados en la interacción, clasificados de acuerdo con la función de puntuación de Rosetta – Unidades de energía de Rosetta (REU, Rosetta Energy Units)(Lyskov et al., 2013; Sedan et al., 2016b, 2016a).

### **Estrategia *in vitro***

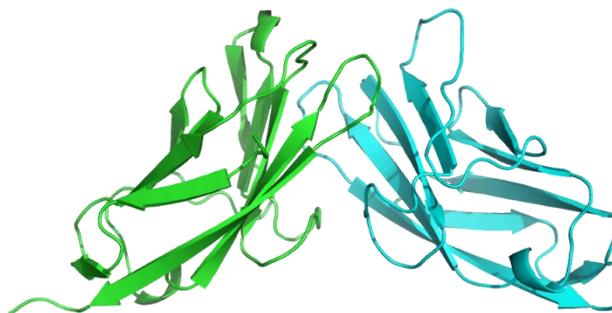
La línea celular de carcinoma de colon humano HCT-116 que expresa CEA (CCL-247, ATCC), se cultivó en medio 5A de McCoy (Corning) suplementado con SFB al 10 % (Corning) y antibiótico antimicótico al 1 % (Sigma-Aldrich) en un medio humidificado. Se incubó a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. La línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (HTB-26, ATCC) se cultivó en medio DMEM con alto contenido de glucosa (Corning) suplementado e incubado en las mismas condiciones que las células HCT-116, y se usó como control de la expresión negativa de CEA.

Las células de cáncer de colon y de mama se separaron de la placa de cultivo incubando 10 minutos en hielo, posteriormente se raspó suavemente la monocapa usando el émbolo de una jeringa de insulina. La suspensión celular se recuperó de la placa y se centrifugó a 180 x g durante 5 minutos a 4 °C. Se eliminó el Sobrenadante y se re-suspendió el botón celular en 1 ml de PBS enfriado con hielo. El número de células y la viabilidad se determinaron utilizando azul de tripano y la concentración de células se ajustó a 5x10<sup>6</sup> células/mL. para cada tratamiento. Se centrifugaron 100 µL de células y se re-suspendieron en tampón FACS (PBS, BSA al 1 %, EDTA 2 mM y Na<sub>3</sub>N al 0,2 %) y se incubaron durante 10 min a 4 °C.

Posteriormente, a las suspensiones celulares se añadieron los diferentes tratamientos, de la siguiente manera, 1) Células sin teñir; 2) Células + anticuerpo secundario  $\alpha$ HA-FITC; 3) Células + VNAR CV0-43 (5 µg) +  $\alpha$ HA-FITC; 4) Células + cal\_043 (5 µg) + suero anti-cal14.1a + IgG1-AF647 de ratón; 5) Células + suero anti-cal14.1a +  $\alpha$ ratón IgG1-AF647. El anticuerpo primario (CV043 o cal\_043) se incubó 1 h a 4 °C seguido de un lavado con PBS. Los anticuerpos posteriores se incubaron uno por uno durante 15 min a 4 °C seguido de un lavado con PBS. Las células teñidas se analizaron por citometría de flujo (Attune-applied Biosystems) adquiriendo 50.000 eventos totales. El análisis citométrico se realizó con el software Flowjo ver.10.4.

## 7.2 Resultados

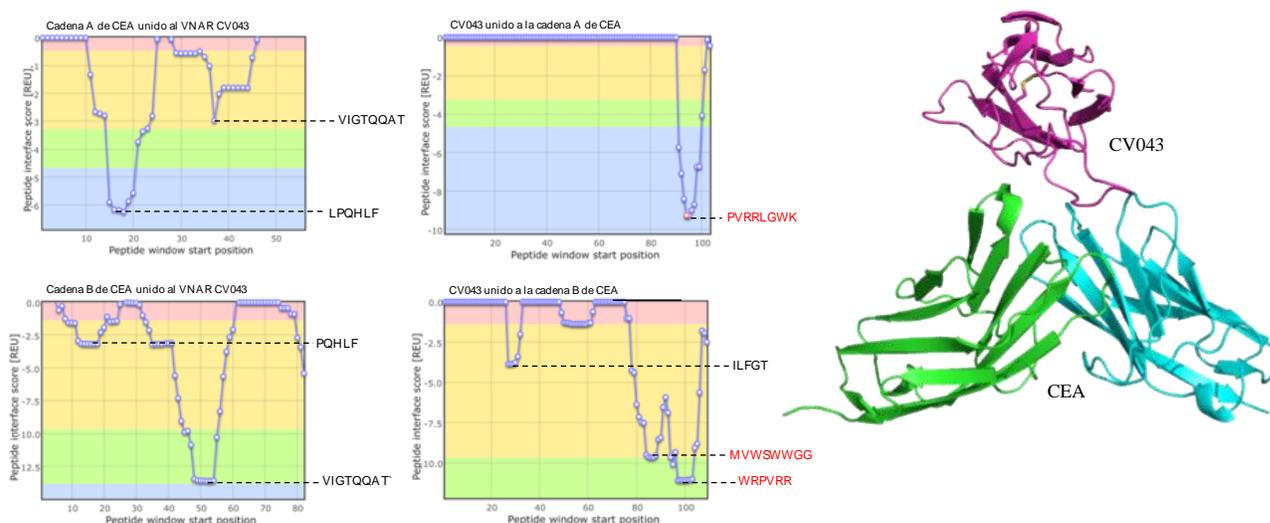
### 7.2.1 Estrategia *in silico*



**Figura 73.** Estructura del dímero CEA refinado mediante dinámica molecular.

#### 7.2.1.1 Análisis de la interacción del complejo CV043/CEA (control positivo)

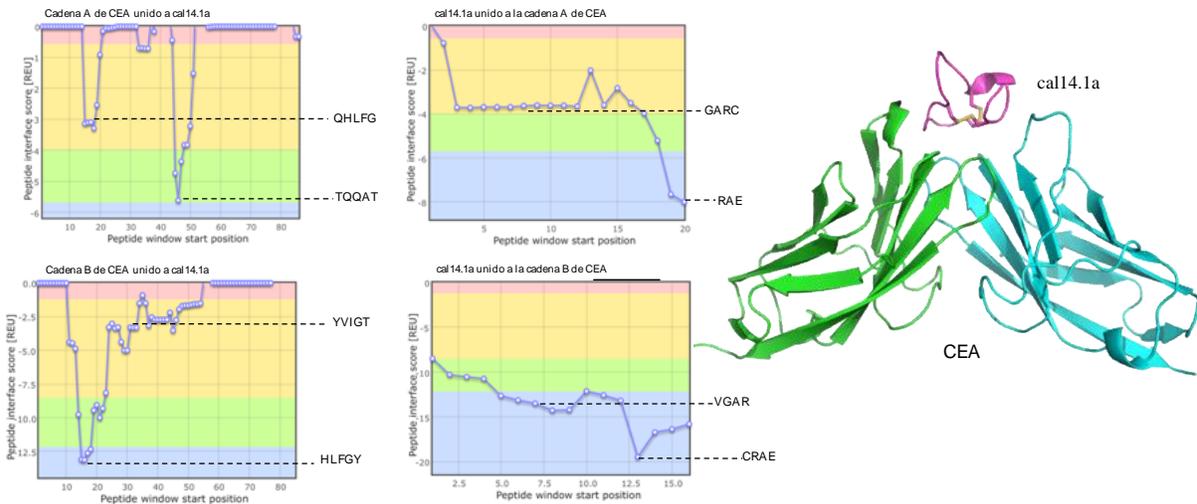
Se llevó a cabo el análisis de Docking del VNAR CV043 como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco CEA. Para lograr este objetivo se analizó el modelo con las mejores características de unión, se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión del VNAR con la proteína CEA, en la plataforma ROSIE. En la Figura 74A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas de CEA con el VNAR CV043 el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-18.76 REU**. En la Figura 74B, se observa la orientación de unión del VNAR con respecto a su blanco.



**Figura 74.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo CV043/CEA. A) Gráficas de la unión de la proteína CEA con el VNAR CV043, en rojo se resaltan los aminoácidos que forman parte del CDR3 del VNAR. B) Orientación de unión del complejo VNAR CV043/CEA.

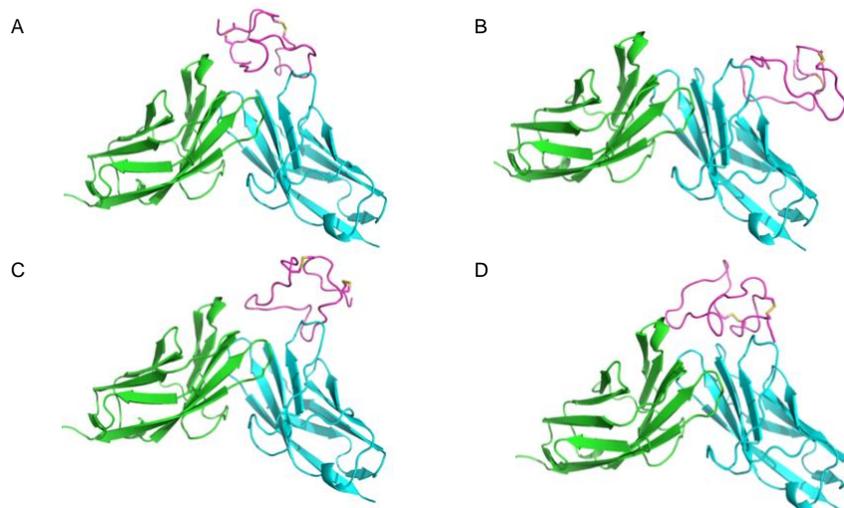
### 7.2.1.2 Análisis de la interacción del complejo cal14.1a/CEA (control negativo)

Posteriormente, se realizó la identificación de las regiones de unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a con la proteína CEA, en la plataforma ROSIE. En la Figura 75A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas de CEA con cal14.1a, el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-8.53 REU**. En la Figura 75B, se observa la orientación de unión de cal14.1a unida al antígeno CEA.



**Figura 75.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/CEA. A) Gráficas de la unión de la proteína CEA con la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/CEA.

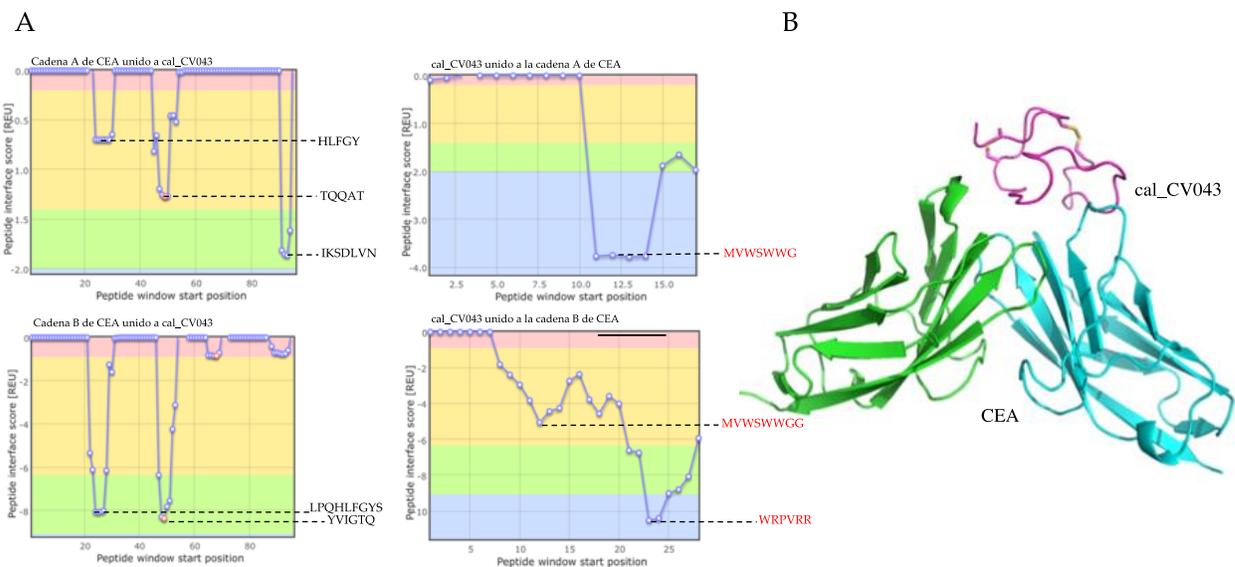
### 7.2.1.3 Análisis de la interacción del complejo cal\_CV043/CEA



**Figura 76.** Complejos de unión del NoNaBody cal\_CV043 con la proteína CEA posterior al análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. El NoNaBody en magenta. CEA en cian (cadena A) y verde (cadena B).

Se realizó el Docking proteína-proteína del péptido cal\_CV043 como ligando para identificar la interacción con la molécula blanco CEA. Para lograr este objetivo se analizaron cuatro posibles modelos de interacción resultados obtenidos con el software ClusPro (Figura 76), con la finalidad de encontrar las posibles zonas de unión y la orientación óptima de la unión de cal\_CV043 con la proteína CEA. La unión que presentó mejores resultados tanto de orientación como de energía de unión fue el modelo A.

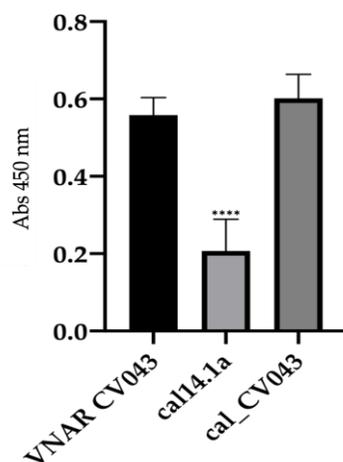
Una vez obtenido el modelo con las mejores características de unión del complejo cal\_CV043/CEA, se realizó la identificación de las regiones de unión en la plataforma ROSIE. En la Figura 77A, se observan las regiones de interacción que tienen las dos cadenas de CEA con el NoNaBody cal\_CV043, el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-22.16 REU**. En la Figura 77B, se observa la orientación de unión del NoNaBody con respecto a su blanco. La energía de interacción fue mayor a la del complejo control VNAR CV043/ CEA ( -18.76 REU).



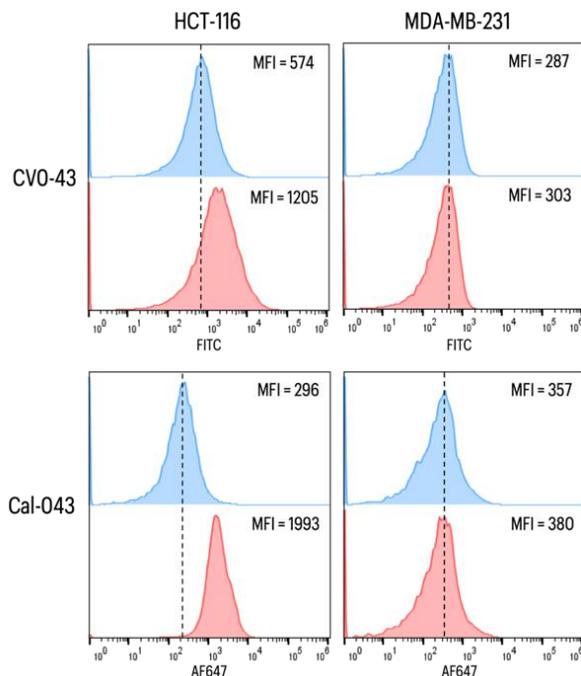
**Figura 77.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal\_CV043/CEA. A) Gráficas de la unión de la proteína CEA con el NoNaBody cal\_CV043. B) Orientación de unión del complejo cal\_CV043/CEA.

### Estrategia *in vitro*

Se realizó el ensayo ELISA para identificar el reconocimiento del NoNaBody cal\_CV043 con la proteína CEA. El VNAR CV043 se utilizó como control positivo, mostró una señal de absorbancia de 0.550, mientras que el control negativo cal14.1a obtuvo una señal de reconocimiento de 0.200. El NoNaBody cal\_CV043 obtuvo una señal de absorbancia mayor que su VNAR parental y una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.001$ ) con respecto al control negativo (Figura 78).



**Figure 78.** Ensayo ELISA de reconocimiento de CEA. cal14.1a (control negativo), VNAR CV043 (control positivo), NoNaBody cal\_CV043.



**Figure 79.** Histograma representativo de anti-CEA en dos líneas celulares e índice MFI. Células de cáncer de colon HCT-116 (CEA+) y cáncer de mama MDA-231 (CEA-) se marcaron con anticuerpos anti-CEA (gráfico rojo), VNAR CV043 o el NoNaBody cal\_CV043, se evaluó la intensidad de fluorescencia media (MFI). La línea punteada representa la media del control negativo (gráfico azul) solo células con anticuerpo secundario ( $\alpha$ HA-FITC o  $\alpha$ Cal suero +  $\alpha$ ratón IgG1-AF647).

Al evaluar el VNAR CV043 anti-CEA y el péptido quimérico cal\_CV043 en la línea celular HCT-116 que expresa CEA, se observó un aumento en la intensidad media de fluorescencia (MFI) (Figura 79, izquierda). Por el contrario, las células cancerosas MDA-MB-231 que no expresan CEA no mostraron cambios en la intensidad de fluorescencia media (Figura 79, derecha).

## Capítulo 8. SPIKE de SARS-CoV-2

---

En este capítulo se muestra el análisis de interacción *in silico* del NoNaBody cal\_D240 diseñado a partir de la unión de la alfa conotoxina cal14.1a con el CDR3 del VNAR D240 anti RBD del SPIKE del SARS-CoV-2. A modo de control positivo, se analizó la interacción del VNAR D240 con la proteína RBD del SPIKE del SARS-CoV-2 de la variante Delta y Ómicron, la cual dio una energía de unión de referencia. Así mismo, a manera de control negativo, se realizó el análisis de la interacción del péptido andamio cal14.1a con ambas proteínas SPIKE.

### 8.1 Método

#### Estrategia *in silico*

##### 8.1.1.1 Modelado por homología de cal\_D240

Se realizó el modelado del NoNaBody cal\_D240, al unir el péptido andamio cal14.1a con el CDR3 de la VNAR D240. La estructura tridimensional fue construida con el software MODELLER v.9.21 (Webb & Sali, 2016) mediante el protocolo de “Advanced Modeling for multiple templates”. Se realizó un alineamiento en BLAST-P para identificar las estructuras andamios para el modelado por homología. Para la construcción de cal\_D240 se utilizaron tres distintas conotoxinas con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 1FEO (Goldenberg et al., 2001), 1TT3 (Adams et al., 2003), y 1DW4 (Atkinson, Kieffer, Dejaegere, Sirockin, & Lefèvre, 2000a).

##### 8.1.1.2 Modelado por homología del VNAR D240

La estructura tridimensional del VNAR D240 se predijo mediante modelado basado en homología usando el software MODELLER v.9.21 (Webb & Sali, 2016), a través de la estrategia "Advanced Modeling". BLAST-P se utilizó para identificar las posibles estructuras andamio para el modelado. El VNAR D240 se modeló con base en tres estructuras de diferentes VNAR con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 4HGK (Kovalenko et al., 2013), 1VER (V. a Streltsov et al., 2004) y 3MOQ (V. A. Streltsov et al., 2011).

### 8.1.1.3 *Dinámica Molecular*

La estructura tridimensional del NoNaBody cal\_D240 y el VNAR D240 se refinaron mediante el procedimiento de “simulated annealing” con el software Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD) (Phillips et al., 2005), seguido del análisis y visualización con los softwares Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et al., 1996) y PyMOL Molecular Graphics System v2.2.2 para Mac OS X. Los parámetros del campo de fuerza para la simulación se aplicaron utilizando la herramienta informática Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics (CHARMM36). Para el control de calidad de las estructuras modeladas, se realizó el análisis estructural con la herramienta en línea PROCHECK. Las simulaciones se realizaron en una caja de moléculas de agua TIP3P como solvente con condiciones de contorno periódicas, donde se supone un ensamble NPT (un número constante de partículas (N), condiciones isobáricas (P) e isotérmicas (T) constantes). La presión se ajustó a 1 atm y la temperatura a 310 K. Estas condiciones se unieron a pasos de recocido y relajación de forma iterativa. Después del recocido y enfriamiento, cal\_D240 y VNAR D240 se sometieron a un análisis de dinámica molecular a 310 K y 1 atm durante 50 ns. El análisis de las coordenadas de trayectoria atómica y las energías se escribieron en el disco cada 10 ps. Se seleccionó la conformación de proteínas más estable termodinámicamente con el mayor tiempo de existencia.

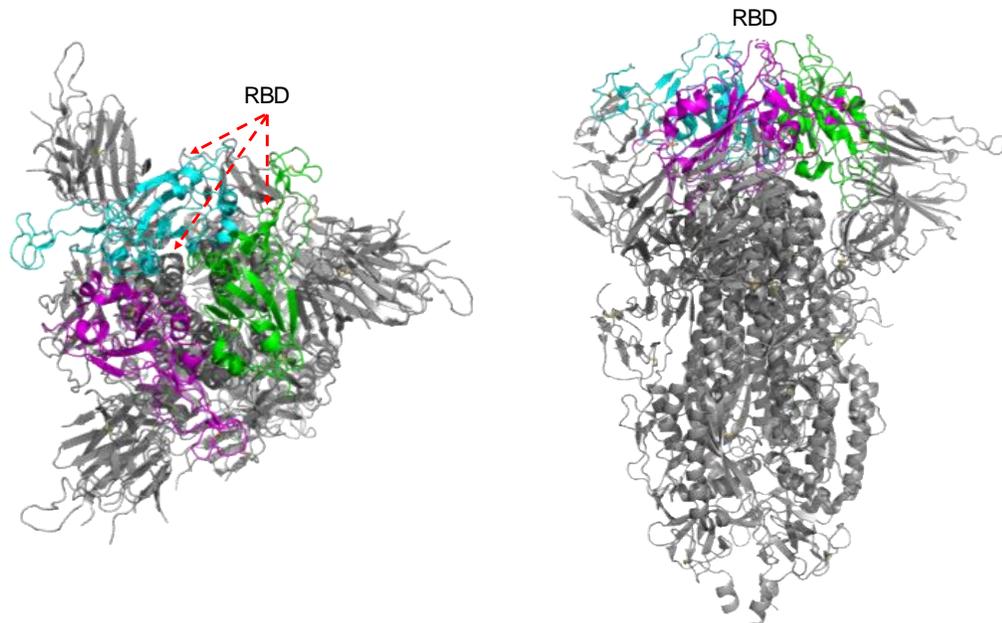
### 8.1.1.4 *Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking)*

Para predecir el posible sitio de unión de cal\_D240 al RBD de SPIKE del SARS-CoV-2 de las variantes Delta y Ómicron se aplicó un protocolo de acoplamiento proteína-proteína, utilizando la herramienta web ClusPro (Comeau et al., 2004b; Kozakov et al., 2017). El algoritmo de acoplamiento evalúa diferentes complejos putativos con complementariedades de superficie favorables. Los complejos obtenidos se filtraron, seleccionando aquellos con buena energía electrostática y libres de desolvatación para su posterior agrupamiento. Para la visualización y selección de los mejores resultados se utilizó PyMOL Molecular Graphics System para Mac OS X. Se eligió el complejo con mejor afinidad y orientación de unión del SARS-CoV-2 SPIKE (Delta y Ómicron) /cal\_D240. Para identificar las regiones predichas de interacción proteína-proteína (PPI), se utilizó la herramienta “Peptiderive” en el servidor ROSIE, con la configuración predeterminada por el desarrollador. Para el cálculo del acoplamiento, “Peptiderive” proporcionó un gráfico con los posibles residuos de interacciones proteína-proteína involucrados en la interacción, clasificados de acuerdo con la función de puntuación de Rosetta – Unidades de energía de Rosetta (REU, Rosetta Energy Units) (Lyskov et al., 2013; Sedan et al., 2016b, 2016a).

## 8.2 Resultados

### Estrategia *in silico*

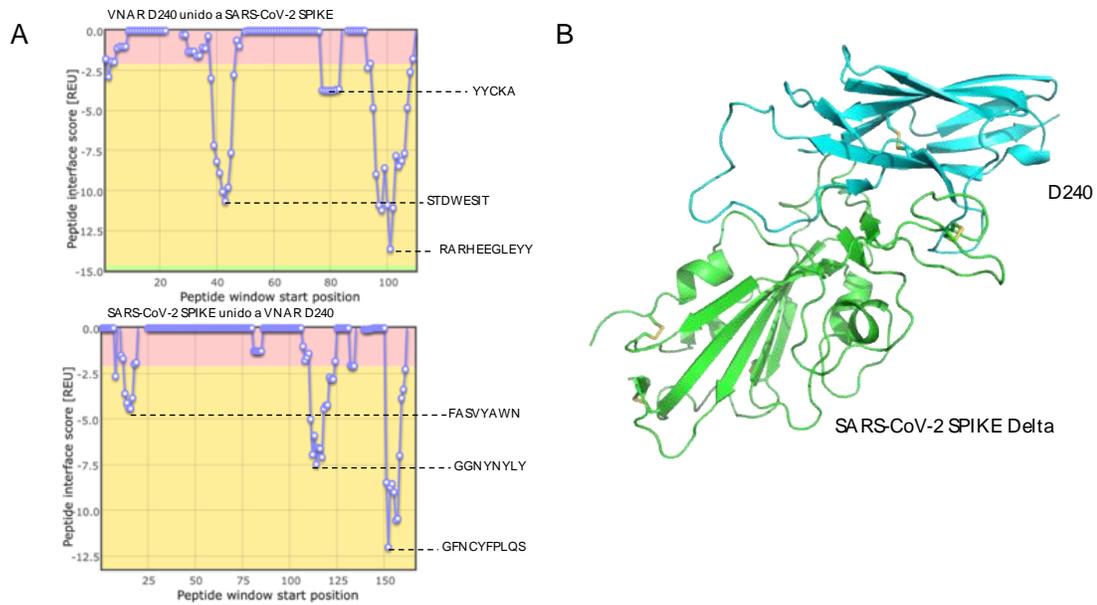
La estructura completa del SPIKE del SARS-CoV-2 se obtuvo del RCSB Protein Data Bank con PDB ID 7CAB, posteriormente se utilizó solo el RBD (cian, magenta y verde) extraído del archivo PDB de la estructura descargada como blanco para las pruebas de docking en esta investigación (Figura 80).



**Figura 80.** Estructura refinada por dinámica molecular del SPIKE del virus SARS-CoV-2.

### **Análisis de la interacción del complejo D240/SARS-CoV-2 SPIKE Delta (control positivo)**

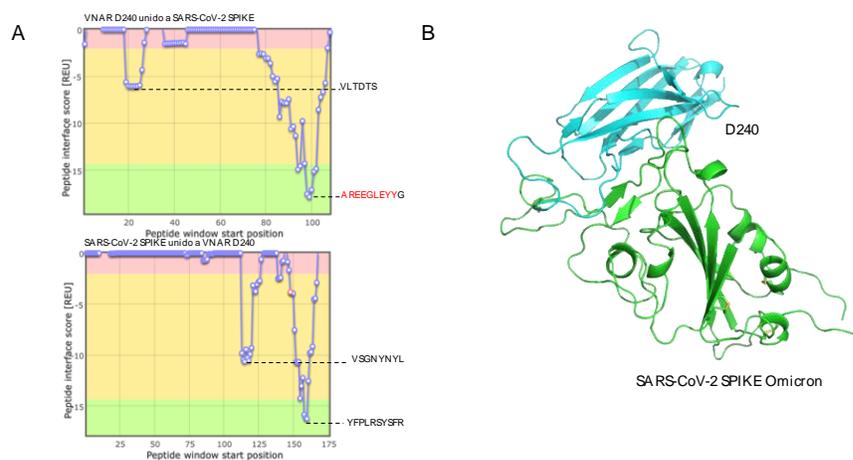
Se realizó el análisis de interacción proteína-proteína del complejo control VNAR D240/SARS-CoV-2 SPIKE Delta, en el cual se obtuvo un puntaje total de **-41.97 REU**. En la Figura 81 se muestran las gráficas con las regiones de unión del complejo.



**Figura 81.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR D240/SARS-CoV-2 SPIKE Delta. A) Gráficas de la unión de la proteína SARS-CoV-2 SPIKE Delta con el VNAR D240. B) Orientación de unión del complejo D240/SARS-CoV-2 SPIKE Delta.

### Análisis de la interacción del complejo D240/SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron (control positivo)

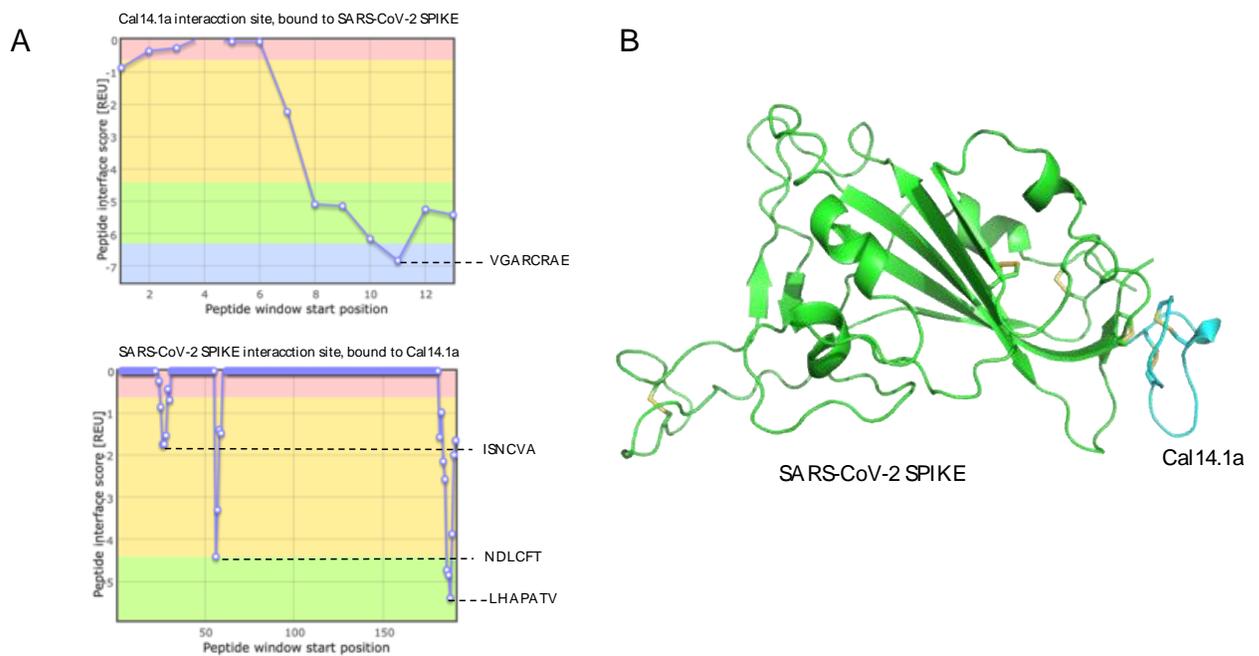
Se realizó el análisis de docking del complejo control VNAR D240/SARS-CoV-2 SPIKE ómicron, en el cual se obtuvo un puntaje total de interacción de **-41.06 REU**. En la Figura 82 se muestran las gráficas con las regiones de unión del complejo y la orientación de la unión de las proteínas.



**Figura 82.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR D240/SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron. A) Gráficas de la unión de la proteína SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron con el VNAR D240. B) Orientación de unión del complejo D240/SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron.

## Análisis de la interacción del complejo cal14.1a/SARS-CoV-2 SPIKE Delta (control negativo)

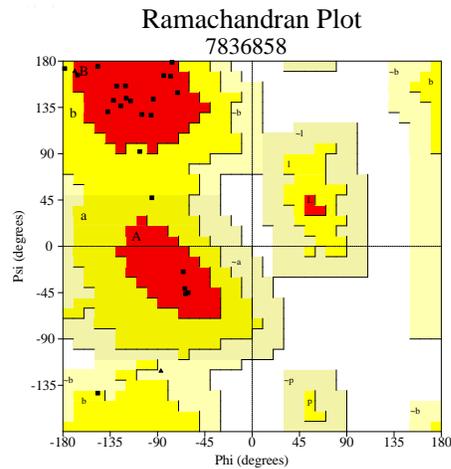
Se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a contra SARS-CoV-2 SPIKE, en la plataforma ROSIE. En la Figura 83A, se observan las regiones de interacción que tiene las dos cadenas del RBD de SARS-CoV-2 SPIKE con cal14.1a, el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-12.60 REU**. En la Figura 83B, se observa la orientación de unión de cal14.1a con el RBD de SARS-CoV-2 SPIKE.



**Figura 83.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/SARS-CoV-2 SPIKE Delta. A) Gráficas de la unión de la proteína SARS-CoV-2 SPIKE Delta con el péptido andamio cal14.1a. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/ SARS-CoV-2 SPIKE Delta.

## Análisis estructural del NoNaBody cal\_D240

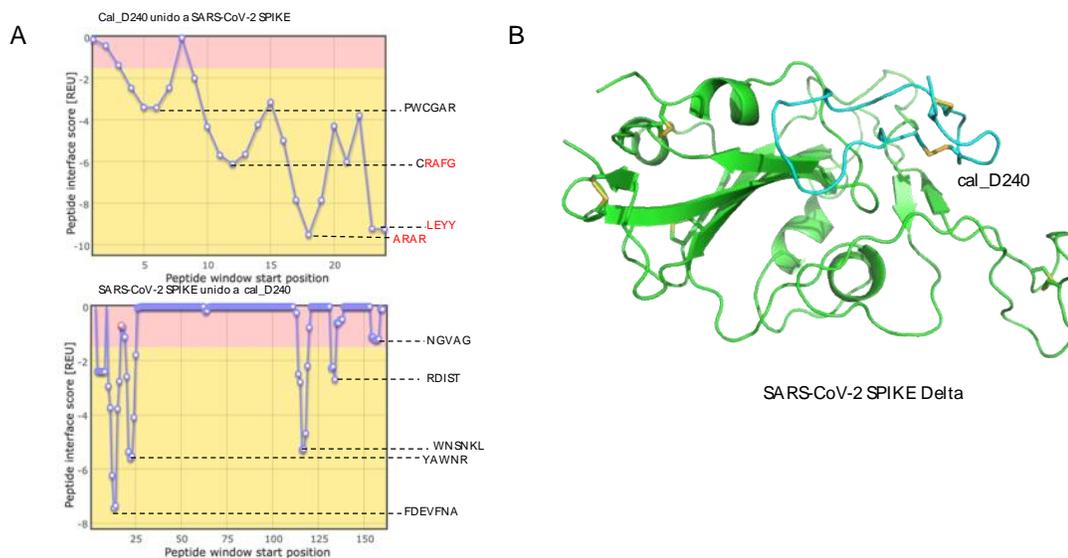
Posteriormente al refinamiento del modelo del NoNaBody cal\_D240 se llevó a cabo el análisis del modelo mediante una gráfica de Ramachandran utilizando la plataforma PROCHECK (Figura 84). El modelo obtuvo 18 residuos en regiones altamente favorecidas (81.8 %), 4 residuos en regiones adicionales permitidas (18.2 %) y ningún residuo (0 %) en regiones no permitidas. Por lo que la calidad del modelo fue buena para los análisis posteriores.



**Figura 84.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada del péptido quimérico cal\_D240 después de la dinámica molecular.

### Análisis de la interacción del complejo cal\_D240/SARS-CoV-2 SPIKE Delta

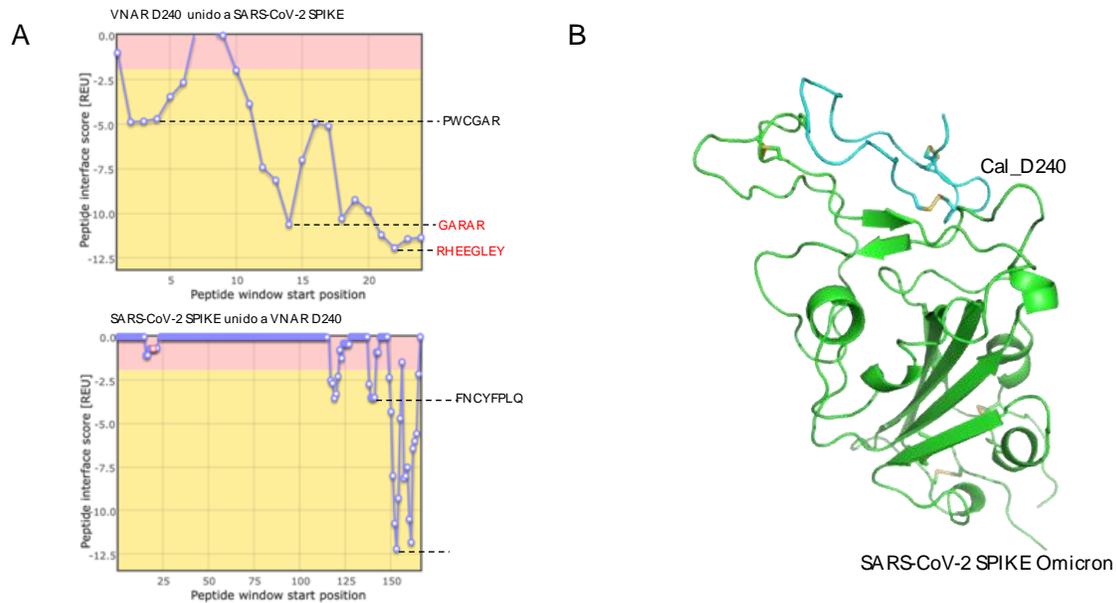
Se llevó a cabo la identificación de las regiones de unión del NoNaBody cal\_D240 contra el SPIKE del SARS-CoV-2 de la variante delta, en la plataforma ROSIE. En la Figura 85A, se observan las regiones de interacción que tiene la región del RBD con cal\_D240 el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-30.29 REU**. En la Figura 85B, se observa la orientación de unión del NoNaBody con respecto a blanco.



**Figura 85.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal\_D240/SARS-CoV-2 SPIKE Delta. A) Gráficas de la unión de la proteína SARS-CoV-2 SPIKE Delta con el NoNaBody cal\_D240 B) Orientación de unión del complejo cal\_D240/ SARS-CoV-2 SPIKE Delta.

## Análisis de la interacción del complejo cal\_D240/SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron

Se realizó la identificación de las regiones de unión del NoNaBody cal\_D240 contra el SPIKE del SARS-CoV-2 de la variante ómicron. En la Figura 86A, se observan las regiones de interacción que tiene la región del RBD con cal\_D240 el cual obtuvo un puntaje total de interacción de **-38.46 REU**. En la Figura 86B, se observa la orientación de unión de cal\_D240 con respecto al RBD del SPIKE del SARS-CoV-2 de la variante ómicron.



**Figura 86.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal\_D240/SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron. A) Gráficas de la unión de la proteína SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron con el NoNaBody cal\_D240 B) Orientación de unión del complejo cal\_D240/ SARS-CoV-2 SPIKE Ómicron.

## Capítulo 9. Proteína quimérica basada en el CDR3 de VNAR de otra especie de tiburón

---

### *O. maculatus*

Se realizó el análisis de interacción *in silico* del complejo VNAR/AMA1 (PDB ID 2Z8W (Henderson et al., 2007)) para dar otro ejemplo del sistema de diseño racional de proteínas mediante la unión de una conotoxina y el CDR3 de diferentes VNAR (*O. maculatus*). Para este apartado, se utilizó AMA1 como antígeno y al VNAR anti-AMA1 como parental para el péptido quimérico cal\_AMA1. El objetivo de este capítulo fue analizar la interacción de proteínas diseñadas a partir de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a y el CDR3 del VNAR anti-AMA1. A modo de control positivo, se analizó la interacción del VNAR con la proteína AMA1, la cual dio una energía de unión de referencia.

### 9.1 Método

#### Estrategia *In silico*

##### 9.1.1.1 Modelado por homología de cal\_AMA1

Se realizó el modelado del péptido quimérico cal\_AMA1, al unir la proteína andamio cal14.1a con el CDR3 de la VNAR anti-AMA1. La estructura tridimensional fue construida con el software MODELLER v.9.19 (Webb & Sali, 2016) mediante el protocolo de “Advanced Modeling for multiple templates”. Para dicho procedimiento fue necesario realizar un alineamiento en BLAST-P para identificar las estructuras andamios para el modelado por homología. Para la construcción de cal\_AMA1 se basó en tres distintas proteínas andamio de diferentes conotoxinas con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 1FEO (Goldenberg et al., 2001), 1TT3 (Adams et al., 2003), y 1DW4 (Atkinson et al., 2000b).

### 9.1.1.2 *Dinámica Molecular*

Posterior al modelado por homología, la estructura tridimensional de la proteína quimérica cal\_AMA1 se refinó mediante el procedimiento de “simulated annealing” con el software Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD) (Phillips et al., 2005), seguido del análisis y visualización con los softwares Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et al., 1996) y PyMOL Molecular Graphics System v2.2.2 para Mac OS X. Los parámetros del campo de fuerza para la simulación se aplicaron utilizando la herramienta informática Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM34). Para el control de calidad de las estructuras modeladas, se realizó el análisis estructural con la herramienta en línea PROCHECK. Las simulaciones se realizaron en una caja de moléculas de agua TIP3P como solvente con condiciones de contorno periódicas, donde se supone un ensamble NPT (un número constante de partículas (N), condiciones isobáricas (P) e isotérmicas (T) constantes). La presión se ajustó a 1 atm y la temperatura a 310 K. Estas condiciones se unieron a pasos de recocido y relajación de forma iterativa. Después del recocido y enfriamiento, cal\_AMA1 se sometió a un análisis de dinámica molecular a 310 K y 1 atm durante 50 ns. El análisis de las coordenadas de trayectoria atómica y las energías se escribieron en el disco cada 10 ps. Se seleccionó la conformación de proteínas más estable termodinámicamente con el mayor tiempo de existencia.

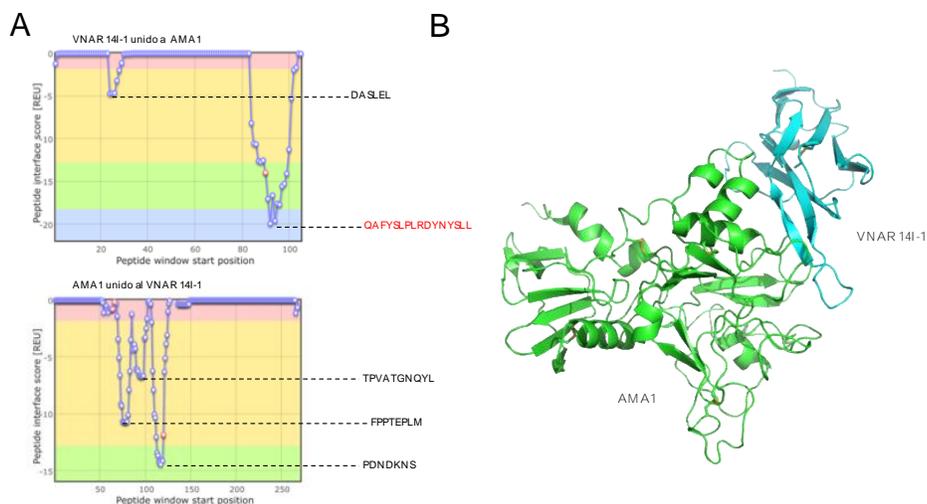
### 9.1.1.3 *Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking)*

Para predecir el posible sitio de unión de cal\_AMA1 a AMA1 se aplicó un protocolo de acoplamiento proteína-proteína, utilizando la herramienta web ClusPro (Comeau et al., 2004b; Kozakov et al., 2017). El algoritmo de acoplamiento evalúa diferentes complejos putativos con complementariedades de superficie favorables. Los complejos obtenidos se filtraron, seleccionando aquellos con buena energía electrostática y libres de desolvatación para su posterior agrupamiento. Para la visualización y selección de los mejores resultados se utilizó PyMOL Molecular Graphics System para Mac OS X. Se eligió el complejo con mejor afinidad y orientación de unión del AMA1/cal\_AMA1. Para identificar las regiones predichas de interacción proteína-proteína (PPI), se utilizó la herramienta “Peptiderive” en el servidor ROSIE, con la configuración predeterminada por el desarrollador. Para el cálculo del acoplamiento, “Peptiderive” proporcionó un gráfico con los posibles residuos de interacciones proteína-proteína involucrados en la interacción, clasificados de acuerdo con la función de puntuación de Rosetta – Unidades de energía de Rosetta (REU, Rosetta Energy Units) (Lyskov et al., 2013; Sedan et al., 2016b, 2016a).

## 9.2 Resultados del análisis *In silico*

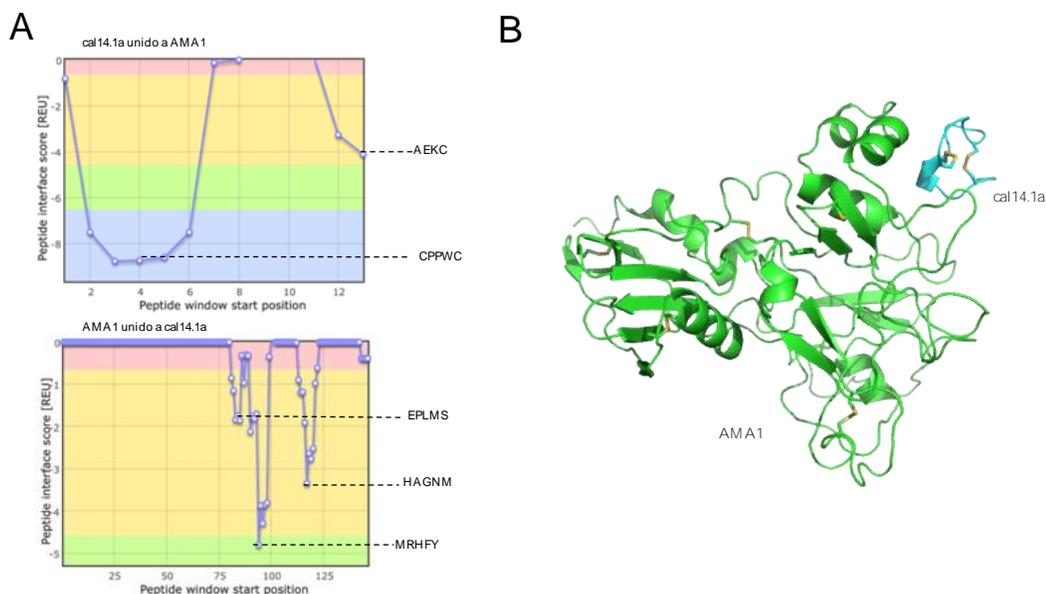
Se procedió a realizar el análisis de interacción proteína-proteína del complejo VNAR/AMA1 con la finalidad de contar con un control positivo y un puntaje de referencia. En la Figura 87 se muestran las regiones de unión del complejo y un puntaje total de interacción de **-36.53 REU**.

### Análisis de la interacción del complejo VNAR/AMA1 (control positivo)



**Figura 87.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR/AMA1. A) Gráficas de la unión del VNAR con la proteína AMA1. B) Orientación de unión del complejo VNAR/AMA1.

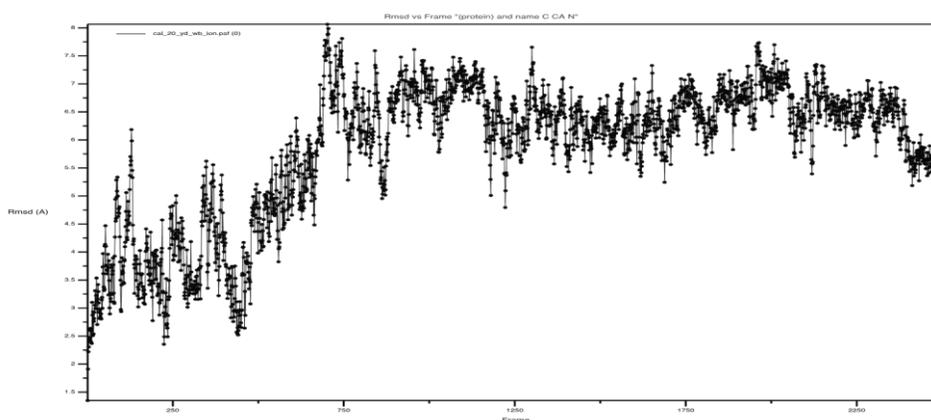
### Análisis de la interacción del complejo cal14.1a/AMA1 (control negativo)



**Figura 88.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/AMA1. A) Gráficas de la unión del péptido andamio con la proteína AMA1. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/AMA1.

## Análisis estructural de cal\_ama1

Se realizó el modelado de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a con el CDR3 del VNAR anti-AMA1 con el programa MODELLER y refinada con el programa NAMD durante 50 ns. Dicho péptido se denominó cal\_AMA1. Respecto a su análisis de fluctuación global, se puede observar en la Figura 89 que la estructura se estabiliza a los 15 ns a lo largo de la simulación.

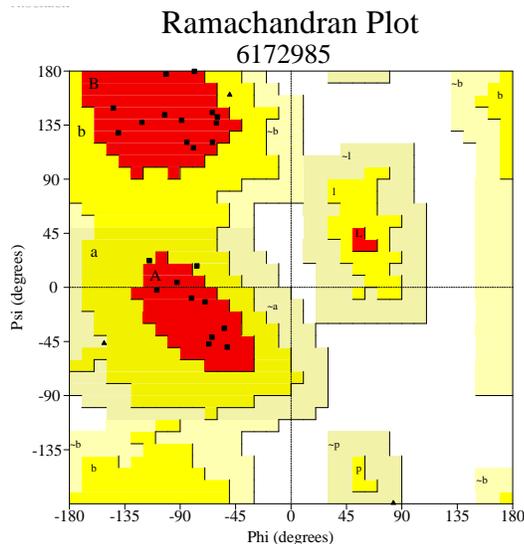


**Figura 89.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del péptido quimérico cal\_AMA1. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

**Tabla 20.** Conformaciones de la proteína cal\_AMA1 durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas la conformación con mayor tiempo de existencia durante la dinámica molecular.

	Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1		499	9.98
2		254	5.08
3		<b>1538</b>	<b>30.76</b>
4		101	2.02
5		108	2.16

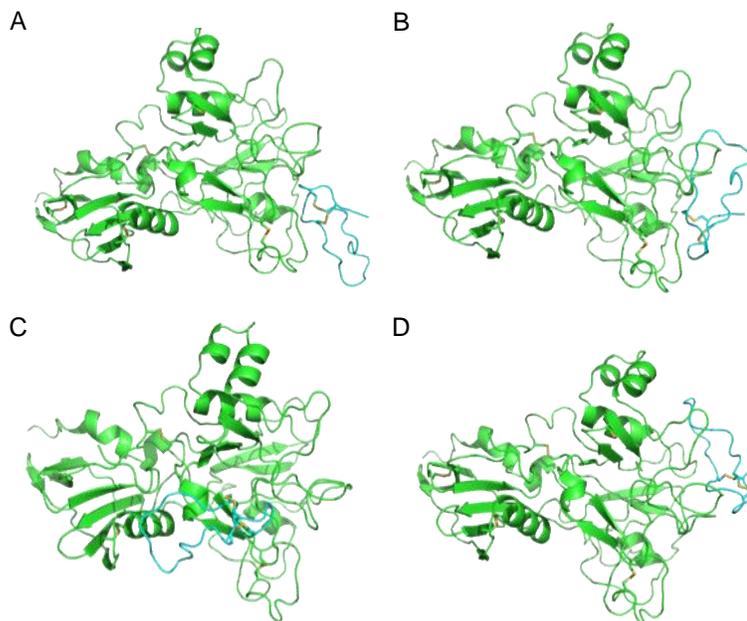
En los análisis posteriores obtuvo un 94.7 % de los residuos en regiones altamente favorecidas en el gráfico de Ramachandran (Figura 90).



**Figura 90.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 3) de la proteína química cal\_AMA1 después de la dinámica molecular.

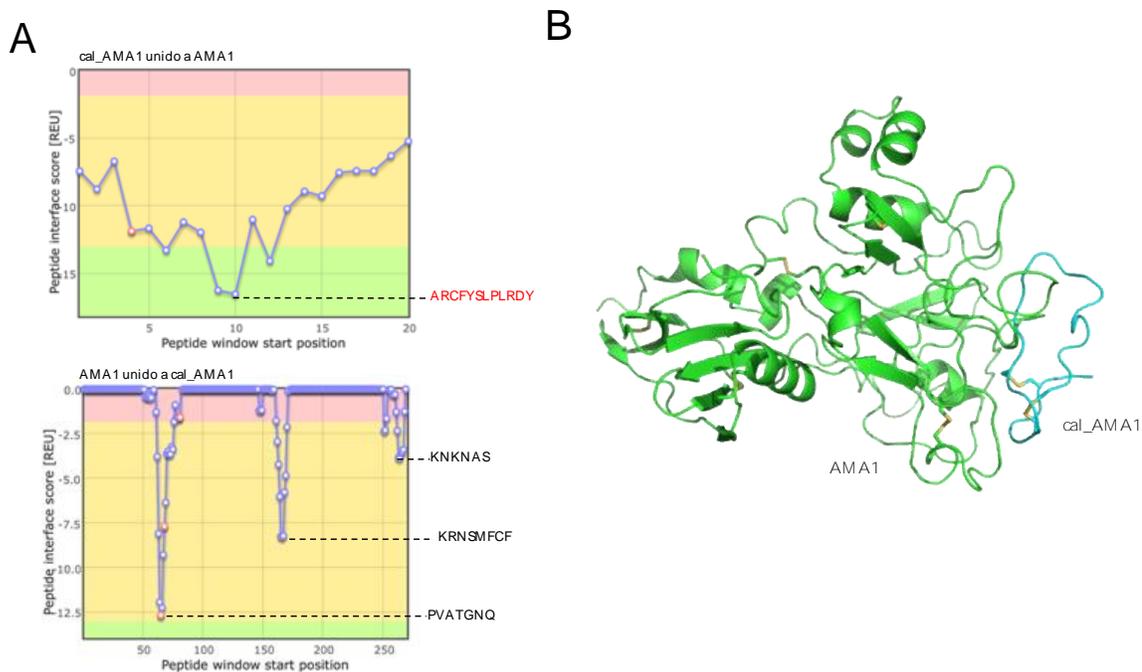
### Análisis de la interacción del complejo cal\_AMA1/AMA1

En la Figura 91 se muestran las diferentes conformaciones de interacción del complejo cal\_AMA1/AMA1 después del análisis global de interacción proteína-proteína. Se eligió al modelo de interacción B, ya que presentó la menor energía de unión.



**Figura 91.** Complejos de unión del péptido químico cal\_AMA1 con el AMA1 después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. cal\_AMA1 en cian. AMA1 en verde.

Se procedió a realizar el análisis de interacción local proteína-proteína del complejo cal\_AMA1/AMA1, en el cual se obtuvo un puntaje total de **-37.18 REU**. En la Figura 92 se muestran las gráficas con las regiones de unión del complejo.



**Figura 92.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal\_AMA1/AMA1. A) Gráficas de la unión de la proteína andamio cal\_AMA1 con la proteína AMA1. B) Orientación de unión del complejo cal\_AMA1/AMA1.

**Tabla 21.** Resumen de resultados de las proteínas contra AMA1. En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR anti-AMA1.

Proteína	Sitio de interacción, con AMA1	Sitio de interacción del AMA1	Score Total (REU)
VNAR	QAFYSLPLRDYNYS	TPVATGNQYL	<b>-36.53</b>
Cal14.1a	CPPWC	MRHFY	<b>-13.08</b>
Cal_ama1	ARCFYSLPLRDY	PVATGNQY	<b>-37.18</b>

### ***G. cirratum* (Tiburón nodriza)**

Se realizó el análisis de interacción *in silico* del complejo VNAR/Lisozima (PDB ID 2I26 (Stanfield, Dooley, Flajnik, & Wilson, 2004; Stanfield et al., 2007)) para dar otro ejemplo del sistema de diseño racional de proteínas mediante la unión de una conotoxina (cal14.1a) y el CDR3 de un VNAR de *G. cirratum*. Para este

apartado, se utilizó la lisozima como antígeno y al VNAR anti-Lisozima como parental para el péptido quimérico cal\_lis. El objetivo de este capítulo fue analizar la interacción de proteínas diseñadas a partir de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a y el CDR3 del VNAR anti-lisozima. A modo de control positivo, se analizó la interacción del VNAR con la proteína Lisozima, la cual dio una energía de unión de referencia.

## 9.3 Método

### Estrategia *In silico*

#### 9.3.1.1 Modelado por homología de cal\_lis

Se realizó el modelado del péptido quimérico cal\_lis, al unir el péptido andamio cal14.1a con el CDR3 de la VNAR anti-lisozima. La estructura tridimensional fue construida con el software MODELLER v.9.20 (Webb & Sali, 2016) mediante el protocolo de “Advanced Modeling for multiple templates”. Para dicho procedimiento fue necesario realizar un alineamiento en BLAST-P para identificar las estructuras andamios para el modelado por homología. cal\_lis se basó en tres distintas proteínas andamio de diferentes conotoxinas con más del 50% de identidad. Los archivos PDB de los andamios se descargaron del Protein Data Bank (PDB), con PDB ID 1FEO (Goldenberg et al., 2001), 1TT3 (Adams et al., 2003), y 1DW4 (Atkinson et al., 2000b).

#### 9.3.1.2 Dinámica Molecular

Posterior al modelado por homología, la estructura tridimensional de la proteína quimérica cal\_lis se refinó mediante el procedimiento de “simulated annealing” con el software Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD) (Phillips et al., 2005), seguido del análisis y visualización con los softwares Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et al., 1996) y PyMOL Molecular Graphics System v2.2.2 para Mac OS X. Los parámetros del campo de fuerza para la simulación se aplicaron utilizando la herramienta informática Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics (CHARMM36). Para el control de calidad de las estructuras modeladas, se realizó el análisis estructural con la herramienta en línea PROCHECK. Las simulaciones se realizaron en una caja de moléculas de agua TIP3P como solvente con condiciones de contorno periódicas, donde se supone un ensamble NPT (un número constante de partículas (N),

condiciones isobáricas (P) e isotérmicas (T) constantes). La presión se ajustó a 1 atm y la temperatura a 310 K. Estas condiciones se unieron a pasos de recocido y relajación de forma iterativa. Después del recocido y enfriamiento, cal\_lis se sometió a un análisis de dinámica molecular a 310 K y 1 atm durante 50 ns. El análisis de las coordenadas de trayectoria atómica y las energías se escribieron en el disco cada 10 ps. Se seleccionó la conformación de proteínas más estable termodinámicamente con el mayor tiempo de existencia.

### 9.3.1.3 *Análisis de Interacción proteína-proteína (Docking)*

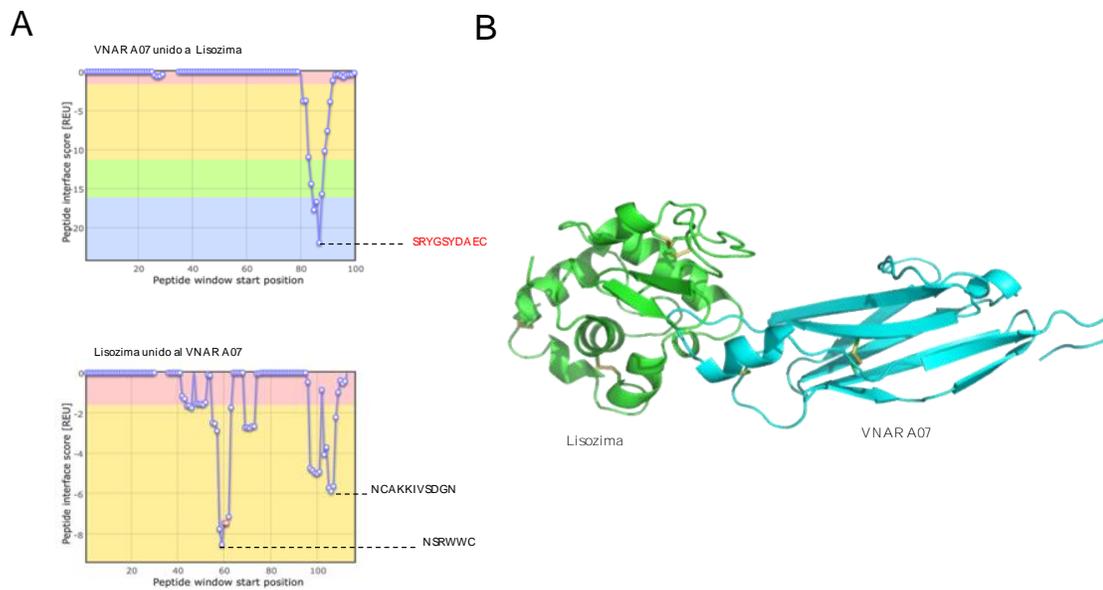
Para predecir el posible sitio de unión de cal\_lis a lisozima se aplicó un protocolo de acoplamiento proteína-proteína, utilizando la herramienta web ClusPro (Comeau et al., 2004b; Kozakov et al., 2017). El algoritmo de acoplamiento evalúa diferentes complejos putativos con complementariedades de superficie favorables. Los complejos obtenidos se filtraron, seleccionando aquellos con buena energía electrostática y libres de desolvatación para su posterior agrupamiento. Para la visualización y selección de los mejores resultados se utilizó PyMOL Molecular Graphics System para Mac OS X. Se eligió el complejo con mejor afinidad y orientación de unión del Lisozima/cal\_lis.

Para identificar las regiones predichas de interacción proteína-proteína (PPI), se utilizó la herramienta “Peptiderive” en el servidor ROSIE, con la configuración predeterminada por el desarrollador. Para el cálculo del acoplamiento, “Peptiderive” proporcionó un gráfico con los posibles residuos de interacciones proteína-proteína involucrados en la interacción, clasificados de acuerdo con la función de puntuación de Rosetta – Unidades de energía de Rosetta (REU, Rosetta Energy Units) (Lyskov et al., 2013; Sedan et al., 2016b, 2016a).

## 9.4 **Resultados del análisis *In silico***

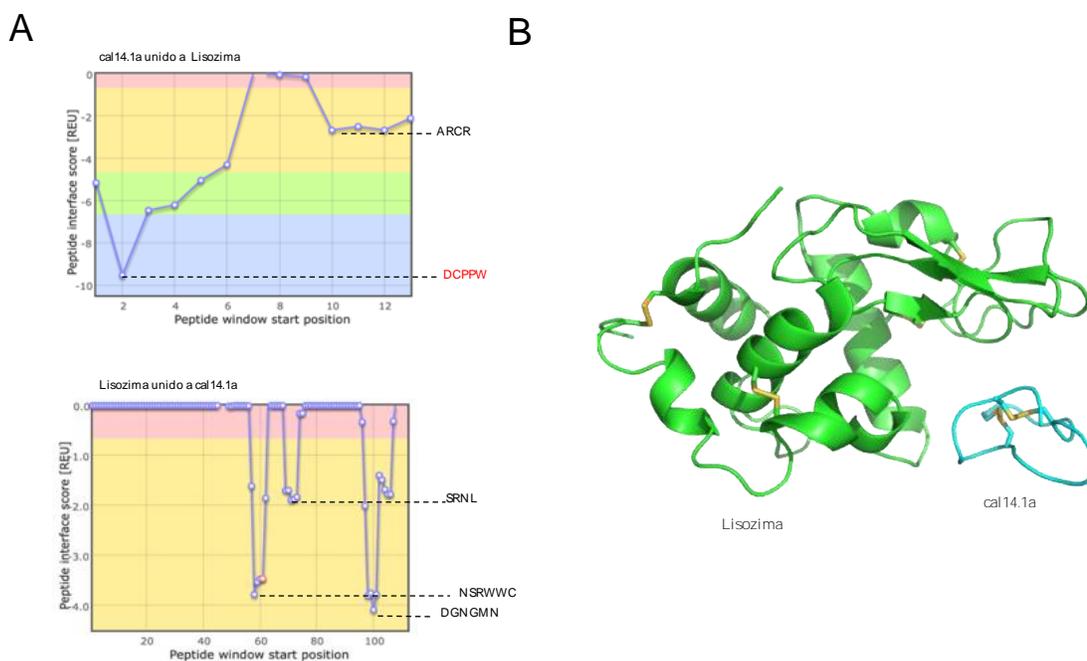
Se procedió a realizar el análisis de interacción proteína-proteína del complejo VNAR/Lisozima con la finalidad de contar con un control positivo y un puntaje de referencia. En la Figura 93 se muestran las regiones de unión del complejo y un puntaje total de interacción de **-32.29 REU**.

## Análisis de la interacción del complejo VNAR/Lisozima (control positivo)



**Figura 93.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo VNAR/Lisozima. A) Gráficas de la unión del VNAR con la proteína Lisozima. B) Orientación de unión del complejo VNAR/Lisozima.

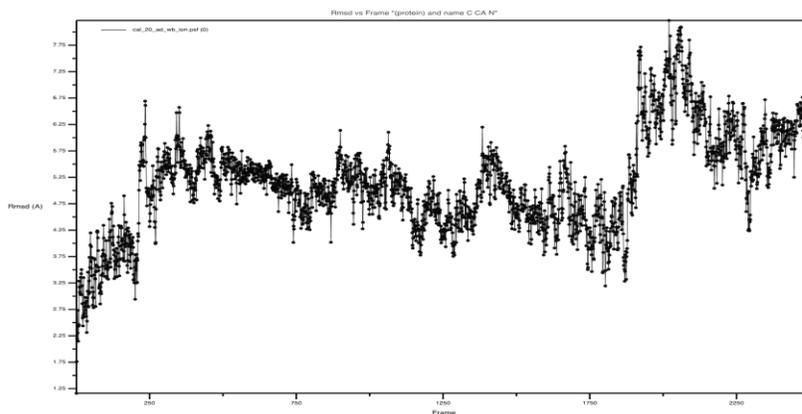
## Análisis de la interacción del complejo cal14.1a/Lisozima (control negativo)



**Figura 94.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal14.1a/Lisozima. A) Gráficas de la unión de cal14.1a con la proteína Lisozima. B) Orientación de unión del complejo cal14.1a/Lisozima.

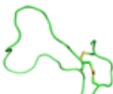
## Análisis estructural de cal\_lis

Se realizó el modelado de la unión de la  $\alpha$ -conotoxina cal14.1a con el CDR3 del VNAR anti-Lisozima con el programa MODELLER y refinada con el programa NAMD durante 50 ns. Dicho péptido se denominó cal\_lis. Respecto a su análisis de fluctuación global, se puede observar en la Figura 95 que la estructura se estabiliza a los 5 ns a lo largo de la simulación.

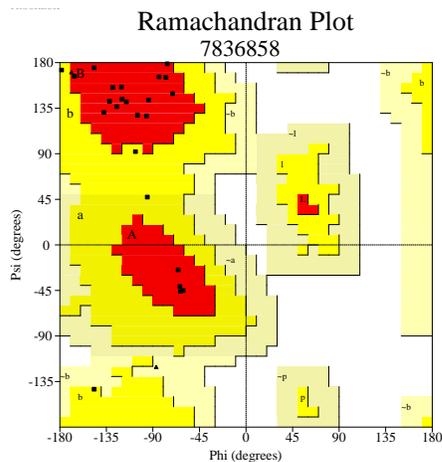


**Figura 95.** Valores de RMSD durante la simulación de 50 ns de la estructura del péptido quimérico cal\_lis. En el eje "X" se indican los Armstrong y en el eje "Y" el número de estructura a lo largo de la dinámica molecular.

**Tabla 22.** Conformaciones del NoNaBody cal\_lis durante la dinámica molecular. Resaltado en negritas el modelo con mayor tiempo de existencia durante la dinámica molecular.

	Conformación	Número de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1		<b>1488</b>	<b>29.76</b>
2		569	11.38
3		102	2.04
4		289	5.78
5		52	1.04

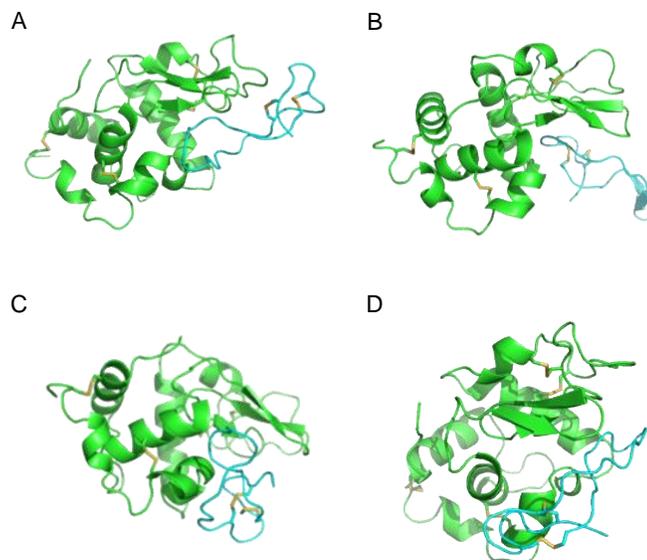
En los análisis posteriores obtuvo un 81.8 % de los residuos en regiones altamente favorecidas en el gráfico de Ramachandran (Figura 96).



**Figura 96.** Gráfico de Ramachandran de la estructura seleccionada (conformación 1) del péptido quimérico cal\_lis después de la dinámica molecular.

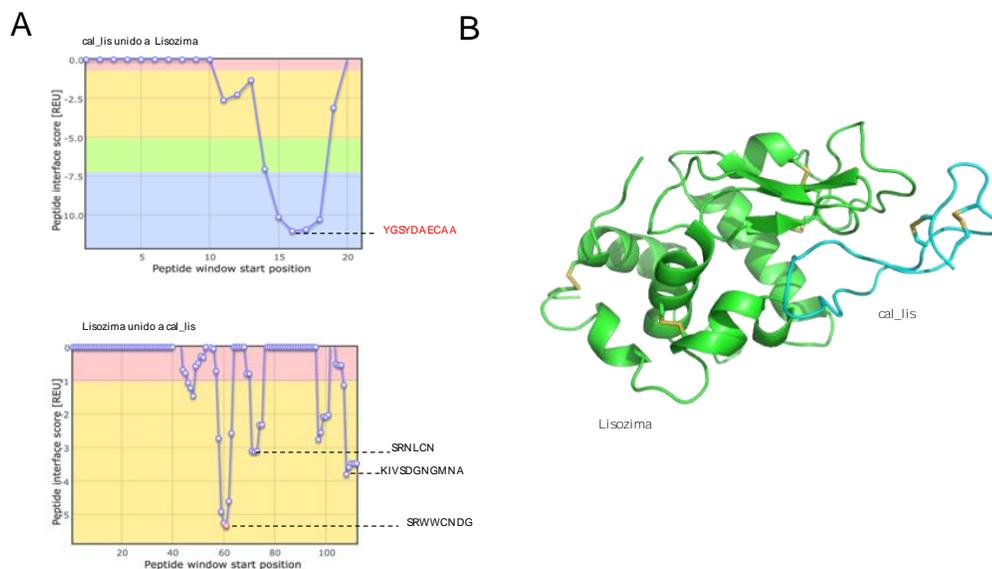
### Análisis de la interacción del complejo cal\_lis/Lisozima

En la Figura 97 se muestran las diferentes conformaciones de interacción del complejo cal\_lis/Lisozima después del análisis global de interacción proteína-proteína. Se eligió al modelo de interacción A, ya que presentó la menor energía de unión.



**Figura 97.** Complejos de unión del péptido quimérico cal\_lis con Lisozima después del análisis de interacción proteína-proteína con el software ClusPro. Cal\_lis en cian. Lisozima en verde.

Se procedió a realizar el análisis de interacción local proteína-proteína del complejo cal\_lis/Lisozima, en el cual se obtuvo un puntaje total de **-29.78 REU**. En la Figura 98 se muestran las gráficas con las regiones de unión del complejo.



**Figura 98.** Regiones de interacción proteína-proteína del complejo cal\_lis/Lisozima. A) Gráficas de la unión de la proteína andamio cal\_lis con la proteína Lisozima. B) Orientación de unión del complejo cal\_lis/Lisozima.

**Tabla 23.** Resumen de resultados de las proteínas contra Lisozima. En rojo se indica la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VNAR anti-Lisozima.

Proteína	Sitio de interacción, con Lisozima	Sitio de interacción del Lisozima	Score Total (REU)
VNAR	<b>SRYGSYDAECAA</b>	NSRWWC	<b>-32.29</b>
Cal14.1a	DCPPW	DGNGMN	<b>-13.10</b>
Cal_lis	<b>YGSYDAECAA</b>	SRWWCNDG	<b>-29.78</b>

## Capítulo 10. Discusión

---

La búsqueda de proteínas y péptidos para tratar enfermedades degenerativas e infecciosas ha resultado en la búsqueda de diversas estrategias para controlar el funcionamiento y la sobreexpresión de proteínas de interés biomédico. Las proteínas de unión a antígeno como moléculas bloqueadoras de diversos metabolitos han mejorado el tratamiento de múltiples patologías asociadas con la sobreexpresión de dichos blancos moleculares (Diversos tipos de cáncer, retinopatía diabética, entre otras) o enfermedades infecciosas (Covid19, Malaria, etc.). El uso de anticuerpos ha sido uno de los métodos más utilizados por la industria farmacéutica ya que tienen una afinidad muy alta por el sitio de unión con el antígeno diana. Sin embargo, el uso de proteínas de unión a antígeno no está exento de problemas, ya que la mayoría son termolábiles, lo que dificulta su almacenamiento y manipulación (Kholodenko, et al., 2017). Otra limitación es el gran tamaño de las proteínas de unión a antígeno convencionales, por lo que difícilmente pueden atravesar las barreras biológicas de los organismos multicelulares, por lo que su efecto se limita a las capas superficiales del tejido donde se aplican. Por este motivo, se han diseñado diversas estrategias de modificación en proteínas de unión a antígeno para mejorar su velocidad de penetración o estabilidad térmica. Sin embargo, la mayoría de las modificaciones tienden a reducir la fuerza de unión de la proteína al sitio de unión al antígeno (Kim, Park & Hong, 2005). Debido a las desventajas descritas anteriormente, existe la necesidad de proporcionar proteínas de unión a antígeno de tamaño reducido, termoestables y capaces de penetrar en tejidos complejos.

Una de estas alternativas son los dominios VNAR, moléculas con características únicas que les permiten unirse a antígenos específicos (Cheong, Leow, Abdul Majeed, & Leow, 2020; Juma et al., 2021). Algunas de estas características particulares son su tamaño pequeño, estabilidad química y térmica, y largos CDR3 que permiten un mejor acceso a los objetivos biológicos, lo que las convierte en moléculas atractivas para usos terapéuticos y de diagnóstico (Juarez et al., 2011; Juma et al., 2021; Zielonka et al., 2015). Se han reportado varios VNAR contra diferentes dianas moleculares, como VEGF<sub>165</sub> (Camacho-Villegas et al., 2018), TNF- $\alpha$  (Camacho-Villegas, Mata-Gonzalez, Paniagua-Solis, Sanchez, & Licea, 2012), malaria (Leow et al., 2018) y SARS-CoV-2 (Gauhar et al., 2021). Se han empleado diferentes métodos para obtener estos VNAR, incluidas bibliotecas inmunes (Camacho-Villegas, 2012), bibliotecas semisintéticas (Könning et al., 2017) y bibliotecas sintéticas (Cabanillas-Bernal et al., 2019). A pesar de todas estas ventajas, los VNAR tienen limitaciones notables. Estas limitaciones incluyen la humanización de estas moléculas para su uso como fármacos en humanos, los tamaños de las moléculas cuando se utilizan como fármacos que requieren una mayor penetración en los tejidos y las barreras de propiedad intelectual para su uso en

tratamientos contra el cáncer. Por lo tanto, en este estudio se diseñaron y evaluaron pequeños NoNaBodies generados a través de la unión de VNAR CDR3 con péptidos ricos en enlaces disulfuro (cuatro veces más pequeños que el VNAR) con una capacidad de interacción similar al VNAR parental.

Las “knottin” son moléculas emergentes con potenciales aplicaciones terapéuticas y diagnósticas (Kolmar, 2008; Moore et al., 2013). Son péptidos pequeños de 30 a 50 aminoácidos, con un núcleo de láminas beta anti-paralelas estabilizadas por tres enlaces disulfuro (Ackerman et al., 2014). La alfa conotoxina cal14.1a es un péptido rico en enlaces disulfuro, sin embargo, no entra en la categoría de un knottin. La alfa conotoxina cal14.1a es un péptido con 17 aminoácidos y dos enlaces disulfuro entre Cys3-Cys12 y Cys7-Cys17 que confieren alta estabilidad estructural (Oroz-Parra, Álvarez-Delgado, Cervantes-Luevano, Dueñas-Espinoza, & Licea-Navarro, 2020). Cal14.1a no se encontró por RMN o cristalografía de rayos X, por lo que se realizó un modelo por homología, y se obtuvo la estructura para cal14.1a, esta estructura se comparó con las obtenidas a partir de los resultados del modelado de las conotoxinas cal14.1a y cal14.1b reportados por Oroz et al., 2020. En ambos estudios, los péptidos modelados mostraron resultados similares a los de conotoxinas resueltas por RMN. En análisis *in silico* e *in vitro*, se ha demostrado que el péptido cal14.1a pierde su actividad como conotoxina frente a su diana natural cuando se modifica con las diferentes CDR3 de VNAR previamente descritas. Se realizó una prueba de expresión relativa de TNF- $\alpha$  para evaluar si la actividad del andamio cal14.1a cambiaba si se modificaba su secuencia de aminoácidos. Encontramos que la conotoxina cal14.1a redujo la expresión de TNF- $\alpha$ , mientras que el péptido quimérico cal\_P98Y no lo hizo (Figura 3). Este resultado indica que el péptido cal14.1a es un andamio idóneo para el diseño racional de proteínas. Al intercambiar la región de aminoácidos nativos por la CDR3 de un VNAR, cal14.1a pierde su actividad como conotoxina (Oroz-Parra et al., 2016).

Se usaron diversos CDR3 de VNAR de *Heterodontus francisci* reportados anteriormente contra VEGF<sub>165</sub>, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PCSK-9 y SARS-COV2 SPIKE, incluido un CDR3 de *O. maculatus* VNAR y un CDR3 de *G. cirratum* VNAR. Se demostró que la fusión del péptido rico en enlaces disulfuro unido a un VNAR CDR3 funciona con cualquier VNAR independientemente de la especie de tiburón.

La estrategia utilizada en este estudio se basa en pruebas *in silico* utilizadas para modelar NoNaBodies por homología y dinámica molecular para posteriormente evaluar las interacciones proteína-proteína. En este estudio se realizaron 10 ejemplos de NoNaBodies: cal\_P98Y y cal\_VS04 contra VEGF<sub>165</sub>, cal\_T10 y cal\_T21 contra TGF- $\beta$ , cal\_CV043 contra CEA, cal\_Tn16 contra TNF- $\alpha$ , cal\_PK13 contra PCSK-9, cal\_D240 contra SARS-COV2 SPIKE, cal\_Lis contra lisozima (*G. cirratum*) y cal\_AMA1 contra AMA1 (*O. maculatus*).

El péptido cal\_P98Y produjo resultados pos-dinámica, lo que sugiere que se podrían realizar análisis de acoplamiento posteriores contra VEGF<sub>165</sub>. En el análisis de acoplamiento, el péptido quimérico mostró una puntuación de interacción de -41,54 REU, mientras que su VNAR original (VNAR P98Y) tenía una puntuación de -45,98 REU. El VNAR ya se ha *probado in silico, in vitro e in vivo* frente a VEGF (Millán-Gómez et al., 2018), lo que lo convierte en un buen ejemplo de referencia para este sistema de creación de NoNaBodies. Por otro lado, la región de interacción del VNAR P98Y parental contra VEGF<sub>165</sub> está específicamente dentro de CDR3 como en el péptido cal\_P98Y. Este NoNaBody está relacionado y se une en la misma región de VEGF<sub>165</sub>, como el VNAR P98Y parental. Para comparar si esta puntuación de interacción tiene validez *in silico*, se acopló VEGF<sub>165</sub> contra la conotoxina de andamiaje cal14.1a. Se obtuvo una puntuación total de -14,88 REU. Al comparar este resultado con el de NoNaBody cal\_P98Y, se puede observar que es mucho más alto que el del péptido de andamio, lo que confirma que el NoNaBody cal\_P98Y tiene una afinidad de unión por VEGF<sub>165</sub>.

Después del análisis de acoplamiento, se sintetizó el NoNaBody cal\_P98Y. Una vez sintetizado el péptido, se realizó un ELISA de reconocimiento frente a VEGF<sub>165</sub> (Figura 25) en el que el VNAR P98Y parental tenía una absorbancia de referencia. Por el contrario, el NoNaBody cal\_P98Y tenía un valor de absorbancia significativamente diferente al de VNAR P98Y. El péptido de andamio cal14.1a fue significativamente diferente desde el punto de vista estadístico del VNAR P98Y y NoNabody cal\_P98Y, lo que sugiere que el péptido quimérico podría tener la capacidad de unirse a VEGF<sub>165</sub>. Por lo tanto, se realizó un análisis de los esferoides 3D de las células HUVEC para evaluar la actividad neutralizante de NoNabody cal\_P98Y en comparación con la del VNAR P98Y original. Se encontró que el NoNaBody cal\_P98Y neutraliza VEGF<sub>165</sub> casi al mismo nivel que su VNAR parental (Figura 26), lo que indica que el NoNaBody diseñado racionalmente contra VEGF<sub>165</sub> es una opción de fármaco viable, así como los VNAR P98Y. El péptido andamio cal14.1a se probó como control negativo para demostrar que no tenía actividad neutralizante. Se encontró que la capacidad neutralizante del andamio contra VEGF<sub>165</sub> no fue significativa contra las proteínas cal\_P98Y y VNAR P98Y.

El NoNaBody cal\_T10 contra TGF- $\beta$  diseñado racionalmente constituye otro ejemplo de un NoNaBody capaz de reconocer con éxito una citocina para la que fue diseñado. El NoNaBody cal\_T10 y el T10 VNAR parental se modelaron siguiendo el mismo protocolo que en el ejemplo anterior. Los análisis de acoplamiento indicaron que NoNaBody podría tener la misma capacidad de unión que su VNAR parental, ya que NoNaBody cal\_T10 mostró una puntuación total de -34,55 REU, mientras que VNAR T10 tiene una puntuación total de -27,24 REU. El control negativo del modelo de interacción entre cal14.1a contra TGF- $\beta$  recibió una puntuación baja (-12,83 REU) en comparación con el control positivo y el NoNaBody. Después

del análisis *in silico*, se sintetizó químicamente el NoNaBody cal\_T10 y se realizó un ELISA de reconocimiento (Figura 48). Comparamos las capacidades de unión del VNAR T10 parental como control positivo, el andamio cal14.1a como control negativo y el NoNaBody cal\_T10. Los resultados mostraron que NoNaBody cal\_T10 podía unirse con TGF- $\beta$ , y el control negativo cal14.1a no mostró una unión clara. Este resultado respalda los resultados obtenidos *in silico*, que indican que este NoNaBody diseñado racionalmente se une exitosamente a TGF- $\beta$ .

El NoNaBody diseñado contra CEA es otro ejemplo exitoso de diseño racional de proteínas utilizando cal14.1a como andamio. El VNAR CV043 y el NoNaBody cal\_CV043 anti-CEA se modelaron mediante modelado por homología. Después de la dinámica molecular, los modelos con parámetros estructurales de calidad continúan con el análisis de acoplamiento. El VNAR CV043 frente a CEA obtuvo una puntuación de interacción total de -18,76 REU, mientras que NoNaBody cal\_CV043 muestra -22,16 REU. Este resultado sugiere que NoNaBody cal\_CV043 tiene una mayor capacidad de unión que su VNAR original (CV043). Por esto, se sintetizó el NoNaBody para realizar las pruebas *in vitro* necesarias para posteriormente validar los resultados *in silico*. En el ensayo ELISA, identificamos que el NoNaBody y el VNAR parental reconocen el antígeno CEA. Para confirmar la capacidad de unión de NoNaBody cal\_CV043 a CEA, se realizó un ensayo de citometría para evaluar la presencia de CEA en una línea celular HCT-116. Como control negativo se utilizó la línea celular MDA-MB-231, que no expresa el antígeno CEA. Los resultados mostraron que el NoNaBody cal\_CV043 se une al CEA expresado en la membrana de la línea celular de cáncer de colon HCT-116. Por otro lado, en el control negativo, la línea celular MDA-MB-231 no mostró señal en el ensayo de citometría de flujo. Estos resultados sugieren que NoNaBody cal\_CV043 tiene un uso potencial como marcador en el diagnóstico de cáncer en los que interviene el CEA (Grunnet & Sorensen, 2012; Moertel et al., 1993).

Para validar el protocolo para el diseño racional *in silico* de NoNaBodies basado en una alfa conotoxina y una CDR3 de VNAR de *H. francisci*, se realizaron varios ejemplos de NoNaBodies específicos para otras dianas moleculares, como TNF- $\alpha$ , PCSK-9 y SARS-CoV2 SPIKE. Los diferentes NoNaBodies mostraron resultados prometedores en la neutralización de los objetivos moleculares específicos para los que fueron diseñados en comparación con el rendimiento de los VNAR parentales. Se construyeron dos NoNaBodies basados en VNAR reportados anteriormente en la literatura para demostrar que el sistema de diseño racional de NoNaBodies basado en la unión de una conotoxina con un VNAR CDR3 de tiburón también funciona con otros VNAR de diferentes especies de tiburones. El primer VNAR fue un anti-AMA1 de *O. maculatus* (Henderson et al., 2007) y el segundo VNAR fue un anti-lisozima de *G. cirratum* (Burgess et al., 2016).

El NoNaBody cal\_AMA1 dio como resultado una puntuación de interacción más alta que su VNAR original, y el péptido andamio cal14.1a dio como resultado una puntuación total más baja que NoNaBody. Por lo tanto, los resultados sugieren que el péptido cal\_AMA1 puede ser un posible inhibidor de la proteína AMA1 como su VNAR parental. El mismo escenario fue evidente en el ejemplo de NoNaBody basado en el VNAR anti-lisozima. Estos resultados muestran que el sistema de unión de un VNAR CDR3 con una alfa conotoxina funciona con cualquier VNAR independientemente de la especie de tiburón, lo que abre la posibilidad de crear anticuerpos no naturales de 1/40 del tamaño de una IgG que sean capaces de reconocer y neutralizar como los anticuerpos regulares. Estas nuevas proteínas se pueden utilizar como fármacos cuando los anticuerpos normales no pueden penetrar en los tejidos, como en el tratamiento de la retinopatía diabética para neutralizar el VEGF<sub>165</sub>.

La construcción y operación *in silico* e *in vitro* de los NoNaBodies expuesta anteriormente, muestran que estas moléculas generadas tienen una fuerza de unión de entre 85 y 150%, a la fuerza de unión de referencia del VNAR parental. La construcción descrita anteriormente permite que los NoNaBodies mantengan la capacidad de unirse al mismo epítipo del anticuerpo original sin perder eficacia. Además, debido al menor tamaño del NoNaBody obtenido, comparado con el VNAR parental, tiene una mayor capacidad de penetración tisular. Asimismo, debido a su conformación, los NoNaBodies presentan una mejor la estabilidad térmica.

## Capítulo 11. Conclusiones

---

El péptido cal14.1a es un andamio ideal para su uso en el diseño racional de proteínas con capacidad de unión a antígenos, ya que al ser modificado con un CDR3 de VNAR pierde su función original de  $\alpha$ -conotoxina.

El NoNaBody cal\_P98Y es un inhibidor del VEGF<sub>165</sub>, ya que tiene capacidad de neutralizar dicha citocina en ensayos *in silico* e *in vitro*, lo que convierte al NoNaBody cal\_P98Y en un potencial fármaco de importancia biomédica.

El NoNaBody cal\_T10 presenta resultados positivos de unión a TGF- $\beta$  tanto *in silico* como *in vitro*. cal\_T10 no neutraliza al TGF- $\beta$ , ya que el NoNaBody y su VNAR parental T10 se unen a una región de la citocina distinta a la zona de unión al receptor. Sin embargo, el método de diseño del NoNaBody mostró ser un éxito, ya que cal\_T10 reconoce a TGF- $\beta$ , al igual que el VNAR parental anti-TGF- $\beta$ .

El NoNaBody cal\_CV043 diseñado para reconocer al antígeno carcinoembrionario, mostró capacidad de unión *in silico* e *in vitro*, lo que convierte a cal\_CV043 en un potencial marcador en el diagnóstico de enfermedades relacionadas a la expresión de CEA. Adicionalmente, el NoNaBody cal\_CV043 presenta mejor actividad de reconocimiento que el VNAR parental.

Los NoNaBodies diseñados y probados *in silico* contra otros blancos moleculares como TNF- $\alpha$  y PCSK9, mostraron un mejor puntaje de unión respecto al control negativo (proteína andamio), lo que demuestra que al agregar un CDR3 de VNAR a la conotoxina cal14.1a pueden generarse moléculas con capacidad de unión a diferentes blancos terapéuticos y de diagnóstico.

El NoNaBody cal\_D240 se une al RBD del SARS CoV-2 SPIKE, de la variante delta y ómicron en los análisis *in silico*. Se muestra una unión menor a la del VNAR parental D240, debido a la importancia del rol de unión del CDR1 de dicho VNAR, sin embargo, el NoNaBody podría ser un potencial inhibidor de SPIKE en ambas variantes.

Los NoNaBodies diseñados *in silico* a partir de CDR3 de VNAR de otras especies de tiburón, muestran un potencial neutralizante al igual que sus VNAR parentales, lo que demuestra que el método de unión de una conotoxina con un CDR3 de VNAR, funciona sin importar la especie de tiburón.

## 11.1 Perspectivas

Llevar a cabo pruebas *in vitro* de los NoNaBodies que mostraron un potencial de unión a su blanco molecular al igual que su VNAR parental en las pruebas *in silico*.

Realizar el rediseño de aquellos NoNabodies que son posibles candidatos a la neutralización de los blancos moleculares para los que fueron diseñados, pero que por las características de la secuencia de aminoácidos del CDR3 del VNAR son péptidos hidrofóbicos.

Realizar el rediseño de los NoNaBodies anti-RBD del SARS-CoV-2, para mejorar la afinidad total del péptido quimérico con el blanco molecular, mediante la adición de aminoácidos presentes en el CDR1 del VNAR parental, con el objetivo de crear péptidos quiméricos con la misma capacidad de unión que su VNAR parental al utilizar método de creación de NoNaBodies.

Llevar a cabo el modelado de los NoNaBodies mediante nuevas estrategias de modelado de programas como AphaFold2, Rossetta Fold, ESMFold, I-Tasser, etc. para comparar metodologías y estrategias de modelado que ayuden a mejorar y actualizar el método de creación de NoNaBodies.

Realizar una constante actualización de métodos y estrategias *in silico* en la aplicación de análisis de dinámica molecular, visualización, análisis estructurales y análisis de interacción proteína-proteína, en pro de mejorar la calidad de los modelos utilizados en la creación de NoNaBodies.

## Literatura citada

---

- Ackerman, S. E., Currier, N. V, Bergen, J. M., & Cochran, J. R. (2014). Cystine-knot peptides: emerging tools for cancer imaging and therapy. *Expert Review of Proteomics*, 11(5), 561–572. <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.932251>
- Adams, D. J., Smith, A. B., Schroeder, C. I., Yasuda, T., & Lewis, R. J. (2003).  $\omega$ -conotoxin CVID inhibits a pharmacologically distinct voltage-sensitive calcium channel associated with transmitter release from preganglionic nerve terminals. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 4057–4062. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209969200>
- Atkinson, R. A., Kieffer, B., Dejaegere, A., Sirockin, F., & Lefèvre, J. F. (2000a). Structural and dynamic characterization of  $\omega$ -conotoxin MVIIA: The binding loop exhibits slow conformational exchange. *Biochemistry*, 39(14), 3908–3919. <https://doi.org/10.1021/bi992651h>
- Atkinson, R. A., Kieffer, B., Dejaegere, A., Sirockin, F., & Lefèvre, J. F. (2000b). Structural and dynamic characterization of  $\omega$ -conotoxin MVIIA: The binding loop exhibits slow conformational exchange. *Biochemistry*, 39(14), 3908–3919. <https://doi.org/10.1021/bi992651h>
- Burgess, S. G., Oleksy, A., Cavazza, T., Richards, M. W., Vernos, I., Matthews, D., & Bayliss, R. (2016). Allosteric inhibition of Aurora-A kinase by a synthetic vNAR domain. *Open Biology*, 6(7). <https://doi.org/10.1098/rsob.160089>
- Cabanillas-Bernal, O., Dueñas, S., Ayala-Avila, M., Rucavado, A., Escalante, T., & Licea-Navarro, A. F. (2019). Synthetic libraries of shark vNAR domains with different cysteine numbers within the CDR3. *PLoS ONE*, 14(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213394>
- Camacho-Villegas, T. A., Mata-González, M. T., García-Ubbelohd, W., Núñez-García, L., Elosua, C., Paniagua-Solis, J. F., & Licea-Navarro, A. F. (2018). Intraocular penetration of a vNAR: In vivo and in vitro VEGF165 neutralization. *Marine Drugs*, 16(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/md16040113>
- Camacho-Villegas, T., Mata-Gonzalez, T., Paniagua-Solis, J., Sanchez, E., & Licea, A. (2012). Human TNF cytokine neutralization with a vNAR from *Heterodontus francisci* shark: a potential therapeutic use. *MAbs*, 5(1), 80–85. <https://doi.org/10.4161/mabs.22593>
- Canavese, M., Ngo, D. T. M., Maddern, G. J., Hardingham, J. E., Price, T. J., & Hauben, E. (2017). Biology and therapeutic implications of VEGF-A splice isoforms and single-nucleotide polymorphisms in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 140(10), 2183–2191. <https://doi.org/10.1002/ijc.30567>
- Chatenoud, L., Chernajovsky, Y., Epstein, A. L., Eshhar, Z., Goldblatt, F., Grewal, I. S., ... Zhu, Q. (2008). *Therapeutic Antibodies*. (Y. Chernajovsky & A. Nissim, Eds.). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Cheong, W. S., Leow, C. Y., Abdul Majeed, A. B., & Leow, C. H. (2020). Diagnostic and therapeutic potential of shark variable new antigen receptor (VNAR) single domain antibody. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.039>
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., & Camacho, C. J. (2004a). ClusPro: A fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*, 32(WEB SERVER ISS.), 96–99. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh354>

- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., & Camacho, C. J. (2004b). ClusPro: An automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, *20*(1), 45–50. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg371>
- Cunningham, D., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Griffor, M. C., Hawkins, J. L., Subashi, T. A., ... Qiu, X. (2007). Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nature Structural and Molecular Biology*, *14*(5), 413–419. <https://doi.org/10.1038/nsmb1235>
- Daly, N. L., & Craik, D. J. (2011). Bioactive cystine knot proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, *15*(3), 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.02.008>
- Destà, I. T., Porter, K. A., Xia, B., Kozakov, D., & Vajda, S. (2020). Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure*, *28*(9), 1071–1081.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.06.006>
- Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, *9*(6), 669–676. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>
- Ferrara, Napoleone, Houck, K., Jakeman, L., Winer, J., & Leung, D. (1991). The Vascular Endothelial Growth Factor Family of  $\gamma$  peptides. *Journal of Cellular Biochemistry*, *218*, 211–218.
- Ferrara, Napoleone, & Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, *438*(7070), 967–974. <https://doi.org/10.1038/nature04483>
- Gauhar, A., Privezentzev, C. V., Demydchuk, M., Gerlza, T., Rieger, J., Kungl, A. J., ... Stocki, P. (2021). Single domain shark VNAR antibodies neutralize SARS-CoV-2 infection in vitro. *FASEB Journal*, *35*(11), 1–13. <https://doi.org/10.1096/fj.202100986RR>
- Goldenberg, D. P., Koehn, R. E., Gilbert, D. E., & Wagner, G. (2001). Solution structure and backbone dynamics of an omega-conotoxin precursor. *Protein Science*, *10*(3), 538–550. <https://doi.org/10.1110/ps.30701>
- Gracy, J., & Chiche, L. (2010). Optimizing structural modeling for a specific protein scaffold: knottins or inhibitor cystine knots. *BMC Bioinformatics*, *11*(1), 535. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-535>
- Grunnet, M., & Sorensen, J. B. (2012). Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer*, *76*(2), 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.11.012>
- Henderson, K. A., Streltsov, V. A., Coley, A. M., Dolezal, O., Hudson, P. J., Batchelor, A. H., ... Nuttall, S. D. (2007). Structure of an IgNAR-AMA1 complex: targeting a conserved hydrophobic cleft broadens malarial strain recognition. *Structure (London, England: 1993)*, *15*(11), 1452–1466. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.09.011>
- Hinck, A. P., Archer, S. J., Qian, S. W., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Weatherbee, J. A., ... Torchia, D. A. (1996). Transforming growth factor  $\beta$ 1: Three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor  $\beta$ 2. *Biochemistry*, *35*(26), 8517–8534. <https://doi.org/10.1021/bi9604946>
- Holliger, P., & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, *23*(9), 1126–1136. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>

- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). \uppercase{VMD}: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph. Model.*, *14*(October 1995), 27-28,33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Juarez, K., Dubberke, G., Lugo, P., Koch-Nolte, F., Buck, F., Haag, F., & Licea, A. (2011). Monoclonal antibodies for the identification and purification of vNAR domains and IgNAR immunoglobulins from the horn shark *Heterodontus francisci*. *Hybridoma* (2005), *30*(4), 323–329. <https://doi.org/10.1089/hyb.2011.0010>
- Juma, S. N., Gong, X., Hu, S., Lv, Z., Shao, J., Liu, L., & Chen, G. (2021). Shark new antigen receptor (IgNAR): Structure, characteristics and potential biomedical applications. *Cells*, *10*(5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/cells10051140>
- Kholodenko, R.V., Kalinovsky, D.V., Doronin, I.I., Ponomarev, E.D., & Kholodenko, I.V. (2017) Antibody Fragments as Potential Biopharmaceuticals for Cancer Therapy: Seccess and Limitations. *Current Medicinal Chemistry*, *26*, 396-426.
- Kim, S.J., Park, Y., & Hong, H.J. (2005) Antibody Engineering for the Development of Therapeutic Antibodies. *Molecules and Cells*. *20*(1), 17-29.
- Kohno, T., Kim, J., Kobayashi, K., Kodera, Y., Maeda, T., & Sato, K. (1995). Three-Dimensional Structure in Solution of the Calcium Channel Blocker. *Biochemistry*, *34*(32), 10256–10265.
- Kolmar, H. (2008). Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cystine-knot miniproteins. *The FEBS Journal*, *275*(11), 2684–2690. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06440.x>
- Könning, D., Rhiel, L., Empting, M., Grzeschik, J., Sellmann, C., Schröter, C., ... Kolmar, H. (2017). Semi-synthetic vNAR libraries screened against therapeutic antibodies primarily deliver anti-idiotypic binders. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10513-9>
- Korff, T. (2004). Three-Dimensional in Vitro Angiogenesis Assays. In H. Augustin (Ed.), *Methods in Endothelial Cell Biology* (pp. 115–124). Freiburg: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-18725-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-18725-4_10)
- Kovalenko, O. V., Olland, A., Piché-Nicholas, N., Godbole, A., King, D., Svenson, K., ... Tchistiakova, L. (2013). Atypical antigen recognition mode of a shark Immunoglobulin New Antigen Receptor (IgNAR) variable domain characterized by humanization and structural analysis. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(24), 17408–17419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.435289>
- Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., & Vajda, S. (2013). How good is automated protein docking? *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *81*(12), 2159–2166. <https://doi.org/10.1002/prot.24403>
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padjhony, D., Yueh, C., ... Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature Protocols*, *12*(2), 255–278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- Leow, C. H., Fischer, K., Leow, C. Y., Braet, K., Cheng, Q., & McCarthy, J. (2018). Isolation and characterization of malaria PfHRP2 specific VNAR antibody fragments from immunized shark phage display library. *Malaria Journal*, *17*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2531-y>

- London, N., Raveh, B., Movshovitz-Attias, D., & Schueler-Furman, O. (2010). Can self-inhibitory peptides be derived from the interfaces of globular protein-protein interactions? *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 78(15), 3140–3149. <https://doi.org/10.1002/prot.22785>
- Lyskov, S., Chou, F.-C., Conchúir, S. Ó., Der, B. S., Drew, K., Kuroda, D., ... Das, R. (2013). Serverification of molecular modeling applications: the Rosetta Online Server that Includes Everyone (ROSIE). *PLoS One*, 8(5), e63906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063906>
- Markovic-Mueller, S., Stutfeld, E., Asthana, M., Weinert, T., Bliven, S., Goldie, K. N., ... Ballmer-Hofer, K. (2017). Structure of the Full-length VEGFR-1 Extracellular Domain in Complex with VEGF-A. *Structure*, 25(2), 341–352. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.12.012>
- Millán-gómez, D., Dueñas, S., Muñoz, P. L. A., Camacho-, T., Elosua, C., Cabanillas-bernal, O., ... Sánchez-, N. (2018). In silico-designed mutations increase variable new-antigen receptor single-domain antibodies for VEGF 165 neutralization. *Oncotarget*, 9(46), 28016–28029.
- Moertel, C. G., Fleming, T. R., Macdonald, J. S., Haller, D. G., Laurie, J. A., & Tangen, C. (1993). An Evaluation of the Carcinoembryonic Antigen (CEA) Test for Monitoring Patients With Resected Colon Cancer. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 270(8), 943–947. <https://doi.org/10.1001/jama.1993.03510080047030>
- Moore, S. J., Hayden Gephart, M. G., Bergen, J. M., Su, Y. S., Rayburn, H., Scott, M. P., & Cochran, J. R. (2013). Engineered knottin peptide enables noninvasive optical imaging of intracranial medulloblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(36), 14598–14603. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311333110>
- Moore, S. J., Leung, C. L., & Cochran, J. R. (2012). Knottins: disulfide-bonded therapeutic and diagnostic peptides. *Drug Discovery Today. Technologies*, 9(1), e1–e70. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2011.07.003>
- Muller, Y. A., Li, B., Christinger, H. W., Wells, J. a, Cunningham, B. C., & de Vos, a M. (1997). Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), 7192–7197.
- Nagy, J. A., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (2007). VEGF-A and the Induction of Pathological Angiogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2(1), 251–275. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.2.010506.134925>
- Nielsen, K. J., Thomas, L., Lewis, R. J., Alewood, P. F., & Craik, D. J. (1996). A consensus structure for  $\omega$ -conotoxins with different selectivities for voltage-sensitive calcium channel subtypes: Comparison of MVIIA, SVIB and SNX-202. *Journal of Molecular Biology*, 263(2), 297–310. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0576>
- Northfield, S. E., Wang, C. K., Schroeder, C. I., Durek, T., Kan, M.-W., Swedberg, J. E., & Craik, D. J. (2014). Disulfide-rich macrocyclic peptides as templates in drug design. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 77, 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.011>

- Oroz-Parra, I., Álvarez-Delgado, C., Cervantes-Luevano, K., Dueñas-Espinoza, S., & Licea-Navarro, A. F. (2020). Proapoptotic index evaluation of two synthetic peptides derived from the coneshell *californiconus californicus* in lung cancer cell line h1299. *Marine Drugs*, *18*(1), 8–19. <https://doi.org/10.3390/md18010010>
- Oroz-Parra, I., Navarro, M., Cervantes-Luevano, K. E., Álvarez-Delgado, C., Salvesen, G., Sanchez-Campos, L. N., & Licea-Navarro, A. F. (2016). Apoptosis activation in human lung cancer cell lines by a novel synthetic peptide derived from *Conus californicus* venom. *Toxins*, *8*(2). <https://doi.org/10.3390/toxins8020038>
- Pauthner, M., Yeung, J., Ullman, C., Bakker, J., Wurch, T., Reichert, J. M., ... Joost, P. M. (2016). Antibody engineering & therapeutics , the annual meeting of the antibody society December 7 – 10 ,. *MAbs*, *8*(3), 617–652. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1153211>
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., ... Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, *26*(16), 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
- Saerens, D., Ghassabeh, G. H., & Muyldermans, S. (2008). Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, *8*(5), 600–608. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.07.006>
- Sedan, Y., Marcu, O., Lyskov, S., & Schueler-Furman, O. (2016a). Peptiderive server: derive peptide inhibitors from protein-protein interactions. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W536–W541. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw385>
- Sedan, Y., Marcu, O., Lyskov, S., & Schueler-Furman, O. (2016b). Peptiderive server: derive peptide inhibitors from protein–protein interactions. *Nucleic Acids Research*, *1*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw385>
- Simons, M., Gordon, E., & Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*, 611–625. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.87>
- Stanfield, R. L., Dooley, H., Flajnik, M. F., & Wilson, I. a. (2004). Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5691), 1770–1773. <https://doi.org/10.1126/science.1101148>
- Stanfield, R. L., Dooley, H., Verdino, P., Flajnik, M. F., & Wilson, I. a. (2007). Maturation of shark single-domain (IgNAR) antibodies: evidence for induced-fit binding. *Journal of Molecular Biology*, *367*(2), 358–372. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.045>
- Stauffer, M. E., Skelton, N. J., & Fairbrother, W. J. (2002). Refinement of the solution structure of the heparin-binding domain of vascular endothelial growth factor using residual dipolar couplings. *Journal of Biomolecular NMR*, *23*(1), 57–61. <https://doi.org/10.1023/A:1015346504499>
- Streltsov, V. A., Varghese, J. N., Masters, C. L., & Nuttall, S. D. (2011). Crystal structure of the amyloid- $\beta$  p3 fragment provides a model for oligomer formation in Alzheimer’s disease. *Journal of Neuroscience*, *31*(4), 1419–1426. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4259-10.2011>

- Streltsov, V. a, Varghese, J. N., Carmichael, J. a, Irving, R. a, Hudson, P. J., & Nuttall, S. D. (2004). Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12444–12449. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403509101>
- Vajda, S., Yueh, C., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., ... Kozakov, D. (2017). New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 85(3), 435–444. <https://doi.org/10.1002/prot.25219>
- Veresov, V. G. (2016). Predicting Protein-Protein Binding Affinity by In silico Docking. *JSM Chem*, 4(1), 1–13. Retrieved from <https://www.jsccimedcentral.com/Chemistry/chemistry-4-1019.pdf>
- Webb, B., & Sali, A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. In *Current Protocols in Bioinformatics* (Vol. Unit 5.6, p. Supplements 47). Wiley Online Library. <https://doi.org/10.1002/0471250953>
- Wu, A. M., & Senter, P. D. (2005). Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1137–1146. <https://doi.org/10.1038/nbt1141>
- Zielonka, S., Empting, M., Grzeschik, J., Könning, D., Barelle, C. J., & Kolmar, H. (2015). Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. *MAbs*, 7(1), 15–25. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989032>

## ANEXOS

### Modelado por homología de MODELLER

#### Script1

```

rom modeller import *
log.verbose()
env = environ()
env.io.atom_files_directory = './../atom_files/'
aln = alignment(env)
for (code, chain) in (('tseq1', 'A'), ('tseq2', 'A'), ('tseq3', 'A'), ('tseq4', 'A')):
    mdl = model(env, file=code, model_segment=('FIRST:'+chain, 'LAST:'+chain))
    aln.append_model(mdl, atom_files=code, align_codes=code+chain)
for (weights, write_fit, whole) in (((1., 0., 0., 0., 1., 0.), False, True),
    ((1., 0.5, 1., 1., 1., 0.), False, True),
    ((1., 1., 1., 1., 1., 0.), True, False)):
    aln.salign(rms_cutoff=3.5, normalize_pp_scores=False,
        rr_file='${LIB}/as1.sim.mat', overhang=30,
        gap_penalties_1d=(-450, -50),
        gap_penalties_3d=(0, 3), gap_gap_score=0, gap_residue_score=0,
        dendrogram_file='fm00495.tree',
        alignment_type='tree', # If 'progresive', the tree is not
        # computed and all structures will be
        # aligned sequentially to the first
        feature_weights=weights, # For a multiple sequence alignment only
        # the first feature needs to be non-zero
        improve_alignment=True, fit=True, write_fit=write_fit,
        write_whole_pdb=whole, output='ALIGNMENT QUALITY')
aln.write(file='fm00495.pap', alignment_format='PAP')
aln.write(file='fm00495.ali', alignment_format='PIR')
aln.salign(rms_cutoff=1.0, normalize_pp_scores=False,
    rr_file='${LIB}/as1.sim.mat', overhang=30,
    gap_penalties_1d=(-450, -50), gap_penalties_3d=(0, 3),
    gap_gap_score=0, gap_residue_score=0, dendrogram_file='1is3A.tree',
    alignment_type='progressive', feature_weights=[0]*6,
    improve_alignment=False, fit=False, write_fit=True,
    write_whole_pdb=False, output='QUALITY')

```

#### Script2

```

from modeller import *
log.verbose()
env = environ()
env.libs.topology.read(file='${LIB}/top_heav.lib')
# Read aligned structure(s):
aln = alignment(env)

```

```
aln.append(file='fm00495.ali', align_codes='all')
aln_block = len(aln)
# Read aligned sequence(s):
aln.append(file='qseq1.ali', align_codes='qseq1')
# Structure sensitive variable gap penalty sequence-sequence alignment:
aln.salign(output='', max_gap_length=20,
           gap_function=True, # to use structure-dependent gap penalty
           alignment_type='PAIRWISE', align_block=aln_block,
           feature_weights=(1., 0., 0., 0., 0., 0.), overhang=0,
           gap_penalties_1d=(-450, 0),
           gap_penalties_2d=(0.35, 1.2, 0.9, 1.2, 0.6, 8.6, 1.2, 0., 0.),
           similarity_flag=True)
aln.write(file='qseq1-mult.ali', alignment_format='PIR')
aln.write(file='qseq1-mult.pap', alignment_format='PAP')
```

### Script3

```
from modeller import *
from modeller.automodel import *
env = environ()
a = automodel(env, alnfile='qseq1-mult.ali',
             knowns=('tseq1A', 'tseq2A', 'tseq3A', 'tseq4A'), sequence='qseq1')
a.starting_model = 1
a.ending_model = 5
a.make()
```

## Dinámica molecular con NAMD

```
# Minimization and Equilibration of
# Ubiquitin in a Water Box
```

```
#####
## ADJUSTABLE PARAMETERS          ##
#####
```

```
structure    cal_p98y_wb_ion.psf
coordinates  cal_p98y_wb_ion.pdb
```

```
set temperature 310
set outputname MD
```

```
firsttimestep 0
```

```
#####
## SIMULATION PARAMETERS          ##
#####
```

```
# Input
paraTypeCharmm      on
parameters          par_all36_prot.prm
parameters          par_all36m_prot.prm
parameters          toppar_water_ions_namd.str
temperature         $temperature
```

```
# Force-Field Parameters
exclude            scaled1-4
1-4scaling        1.0
cutoff            12.0
switching         on
switchdist       10.0
pairlistdist     14.0
```

```
# Integrator Parameters
timestep          2.0 ;# 2fs/step
rigidBonds       all ;# needed for 2fs steps
nonbondedFreq    1
fullElectFrequency 2
stepspercycle    10
```

```
# Constant Temperature Control
langevin         on ;# do langevin dynamics
```

```

langevinDamping 1 ;# damping coefficient (gamma) of 1/ps
langevinTemp $temperature
langevinHydrogen off ;# don't couple langevin bath to hydrogens

# Periodic Boundary Conditions
cellBasisVector1 48.571001052856445 0 0
cellBasisVector2 0 65.83600044250488 0
cellBasisVector3 0 0 50.57200050354004
cellOrigin -8.893335342407227 23.556005477905273 -5.519240379333496

wrapWater on
wrapAll on

# PME (for full-system periodic electrostatics)
PME yes
PMEGridSpacing 1.0

#manual grid definition
#PMEGridSizeX 45
#PMEGridSizeY 45
#PMEGridSizeZ 48

# Constant Pressure Control (variable volume)
if {0} {
useGroupPressure yes ;# needed for rigidBonds
useFlexibleCell no
useConstantArea no

langevinPiston on
langevinPistonTarget 1.01325 ;# in bar -> 1 atm
langevinPistonPeriod 100.0
langevinPistonDecay 50.0
langevinPistonTemp $temperature
}

# Output
outputName $outputname

restartfreq 10000 ;# 500steps = every 1ps
dcdfreq 10000
xstFreq 10000
outputEnergies 10000
outputPressure 10000

#####
## EXTRA PARAMETERS ##

```

```
#####
```

```
#####
```

```
## EXECUTION SCRIPT
```

```
##
```

```
#####
```

```
# Minimization
```

```
minimize      5000
```

```
reinitvels    $temperature
```

```
run 50000
```

```
#run 50000000 ;#100ns
```

```
#run 25000000 ;#50ns
```

```
run 12500000 ;#25ns
```

```
#run 5000000 ;#10ns
```

```
#run 2500000 ;#5ns
```

```
#run 500000 ;#1ns
```

```
#run 50000 ;#100ps
```

```
#run 5000 ;#10ps
```