



Trabajo fin de grado

Facultad de Enología

Grado en Biotecnología

Evaluación biotecnológica de péptidos cíclicos heteroquirales como inhibidores de la interacción PD1/PD-L1

Autor: Xavier Roig Soriano

Tutor profesional: Salvador Guardiola Bagán

Tutora académica: María Teresa Blay Olivé

Índice

1. Agradecimientos.....	3
2. Resumen.....	4
3. Introducción.....	5
3.1 PD-1 y sus interacciones.....	5
3.2 PD-1: Papel en el cáncer.....	6
3.3 Tratamientos contra el cáncer actuando sobre PD-1.....	8
3.4 Diseño de péptidos para la interacción con PD-1.....	11
3.5 Mecanismos para la evaluación de la interacción péptidos/PD-1.....	13
3.5.1 Termoforesis a Microescala (MST).....	14
3.5.2 Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC).....	15
3.5.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	15
4. Objetivos.....	16
5. Metodología.....	17
5.1 Expresión de hPD1 en <i>E. coli</i>	17
5.1.1 Transformación de células.....	17
5.1.2 Preparación de cultivos.....	17
5.2 Purificación de hPD-1.....	18
5.2.1 Electroforesis en gel SDS-PAGE.....	20
5.2.2 Separación per cromatografía de exclusión molecular.....	20
5.2.3 Detección por espectroscopia de masas (LC-MS).....	21
5.3 Termoforesis a Microescala (MST).....	22
5.4 Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC).....	23
5.5 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	24
6. Resultados.....	26
6.1 Expresión y purificación de hPD1 en <i>E. coli</i>	26

6.2 Termoforesis a Microescala (MST).....	29
6.3 Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC).....	33
6.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	35
7. Discusión.....	38
7.1 Expresión y purificación de hPD1 en <i>E. coli</i>	38
7.2 Termoforesis a Microescala (MST).....	39
7.3 Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC).....	41
7.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	42
8. Conclusiones.....	44
9. Autoevaluación.....	45
10. Bibliografía.....	46
11. Anexo I: Ficha de seguimiento del tutor.....	49

1. Agradecimientos

Este trabajo se basa en los resultados de las prácticas externas llevadas a cabo en el laboratorio "*Design, Synthesis and Structure of Peptides and Proteins*" del Institut de Reserca Biomèdica (IRB), bajo la supervisión del profesor Ernest Giralt. Por este motivo primero quiero agradecer la oportunidad de haber podido realizar estas prácticas, el tiempo invertido en mi formación y la ayuda del grupo de investigación dedicado a este proyecto que he disfrutado tanto realizando. Agradecer también al doctor Salvador Guardiola por tanta ayuda, comprensión, aprendizaje y confianza en mi trabajo, así como también al resto del grupo por hacerme sentir uno más desde el principio y ofrecerse siempre para ayudarme en todo lo posible. También agradecer el apoyo de la doctora Mayte Blay como mi tutora académica. Y de otro modo, pero no por ello menos importante, agradecer el apoyo de mi familia porque sin ellos no hubiese sido posible.

Evaluación biotecnológica de péptidos cíclicos heteroquirales como inhibidores de la interacción PD1/PD-L1

2. Resumen

La proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) es un receptor que se encuentra en la membrana citoplasmática de las células del sistema inmune (SI). Las células interactúan con PD-1 mediante su ligando natural, PD-L1. Con esta interacción el sistema inmune reconoce las células sanas e inhibe su actuación contra ella, si no se produce esta interacción, desencadenará la respuesta para eliminarla. En algunos tipos de cáncer, se ha detectado el incremento de la expresión de PD-L1 simulando a una célula sana, como mecanismo de adaptación del cáncer para escapar de la respuesta inmune. Este trabajo se centra en evaluar péptidos que puedan bloquear dicha interacción. De esta forma, se evitaría que las células cancerígenas sean percibidas como células sanas y, por tanto, el sistema inmune pueda atacar la proliferación tumoral. Los péptidos anti-PD-1 han sido evaluados por tres técnicas biofísicas diferentes: Termoforesis a Microescala (MST), Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Entre todos los péptidos testados, destacaron PD-i3, PD-i5 y PD-i6, que presentaron valores de afinidad del orden del ligando natural y, por tanto, pueden competir por inhibir la interacción endógena. También se comprobó por RMN la zona de interacción con dichos péptidos sobre la superficie de PD-1. Por tanto, estos péptidos son candidatos prometedores para conseguir interferir en la interacción PD-1/PD-L1 y, con esto, lograr que el sistema inmune pueda atacar al cáncer.

3. Introducción

3.1 PD-1 y sus interacciones

La proteína de muerte celular programada 1 o PD-1 es un receptor expresado por las células T, células B y monocitos, es decir, la familia de células CD28. PD-1 es una glicoproteína monomérica situada en la superficie celular, con estructura similar a las inmunoglobulinas, y su función consiste en modular la respuesta inmune [1]. Esta acción la lleva a cabo después de su interacción con la proteínas PD-L1 (CD274 o B7-H1) o PD-L2 (CD273 o B7-DC), sus dos principales ligandos naturales. PD-L1 se expresa constitutivamente tanto en células hematopoyéticas como no hematopoyéticas, mientras que la de PD-L2 se expresa principalmente en células dendríticas, macrófagos y mastocitos. Por lo que respecta a su expresión, la de PD-L2 es más generalizada, a pesar de esto, como veremos posteriormente, PD-L1 es la más estudiada y más usada terapéuticamente [2].

A través de ensayos de afinidad se evaluaron las interacciones de ambos ligandos con PD-1 usando resonancia de plasmón superficial. Se observó que la afinidad de PD-L1 por PD-1 fue unas 3-4 veces inferior a la de PD-L2, esto es debido a que la tasa de disociación es tres veces inferior para la unión con PD-L2 respecto a la producida con PD-L1. Aun así, los valores de las afinidades en las interacciones de ambos ligandos con PD-1 estuvieron por debajo de los valores esperados. A través de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) se pudo determinar que la unión PD-1/PD-L1 se favorece desde el punto de vista entrópico, mientras que la que se realiza con PD-L2 tiene una gran componente de entalpia. Esto permitió demostrar que esta interacción puede estar constituida por interacciones débiles, a pesar de regir importantes funciones [3].

Como el resto de la familia a la que pertenece este receptor, CD28/CTLA-4, se vio que PD-1 interacciona de manera ortogonal a través de sus hojas GFCCXCX con otros dominios como se puede observar en la figura 1. En su caso en concreto, estas hojas son flexibles y se caracterizan por carecer de la hebra C'''[4]. A través de diferentes ensayos con RMN se observó que mediante la unión de PD-1 con diferentes ligandos se producían alteraciones en el centro de su estructura, estos ensayos permitieron conocer que esta unión se centraba en la hojas GFCC'. También se pudo observar que sus dos ligandos ocupan de manera diferente los mismos sitios de unión en PD-1 y por ser las estructuras de cada uno de estos ligandos de PD-1 diferentes. Aun teniendo esta información aportada por sus estructuras cristalizadas, no se comprende de una forma lo suficientemente clara la interacción de PD1 con sus ligandos [3].

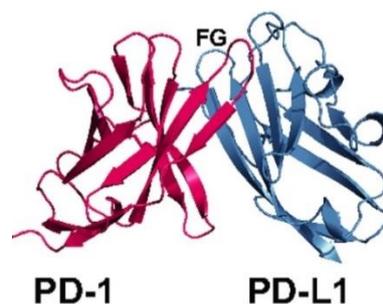


Figura 1. Interficie de interacción de PD-1 con PD-L1 donde se puede observar la importancia de las hojas GFCC' [4].

La función principal de la interacción de PD1 con sus ligandos es contribuir a la homeostasis del sistema inmune (SI). Cuando se produce la interacción entre PD-1 y alguno de sus dos ligandos, se produce una inhibición de la respuesta inmune, tanto de su papel efector, es decir, citotoxicidad y liberación de citoquinas, como de su supervivencia y proliferación. Esta inhibición del sistema inmune a través de PD-1/PD-L1 es una de las bases de la tolerancia central y periférica a las células sanas del organismo [5]. Debido a la importancia de este sistema de control, los linfocitos pasan por varios procesos de selección para asegurar la sensibilidad a PD-L1 y que esta no sea excesiva. De este modo, PD-L1 se expresa en la corteza y médula tímica (timocitos) y participa tanto en la selección positiva como negativa. Esto también se realiza mediante las células dendríticas, que presentan PD-L1 y PD-L2, con lo que producen una disminución de la fase inicial de activación y expansión de las células T autorreactivas. Además, la vía PD-1 también interviene en la limitación de las funciones de reactivación, expansión y papel efector de las células T [6].

El grado en que se produce la inhibición del sistema inmune a través de PD-1 depende también de la fuerza de estimulación de los receptores de célula T (TCR), con más efectos inhibitorios a bajos niveles de interacción de los TCR. Al disminuir la interacción con el TCR, se evita la expresión del factor de supervivencia Bcl-XL y los factores de transcripción GATA-3, EOMES y T-BET. Por otra parte, tras la activación de PD-1, se produce un reclutamiento de proteínas tirosina-fosfatasa que contienen el dominio SH2 (SHP-1 y SHP-2), que mediante la cola proteica de PD-1 inhibe los eventos de señalización del TCR como la activación de PI3K/Akt. Esto aumenta el poder inhibitorio de la interacción PD1/PD-L1 [7].

Por tanto, si se produce esta inhibición, la célula del sistema inmune que contiene los receptores PD-1 reconocerá a la célula como propia y evitará eliminarla a través de componentes citotóxicos o liberando citoquinas para que monocitos la destruyan. Es por esto, que este receptor es uno de los medios por los que el sistema inmune reconoce y se defiende de células externas y evita la autoinmunidad que se provocaría al no reconocer las células corporales como propias.

3.2 PD-1: Papel en el cáncer

El cáncer es una de las enfermedades que mayor mortalidad y morbilidad ha producido en el siglo XX y su incidencia continua aumentando a lo largo del siglo XXI. La situación es tan alarmante que una de cada cuatro personas tiene, o padecerá cáncer a lo largo de su vida según las últimas estimaciones, llegando a padecerlo más de 32 millones de personas en todo el mundo [8]. La definición más extendida de tumor es la de crecimiento tisular excesivo que se encuentra fuera de las leyes que rigen la división celular del resto del cuerpo. Durante el desarrollo de esta enfermedad se produce una división celular extremadamente rápida y, de esta manera, las células cancerosas continúan creciendo a menos que se actué mediante los siguientes métodos:

- Actuación de las defensas del sistema inmune del propio cuerpo.
- Eliminación quirúrgica de la masa cancerosa.
- Tratamientos contra el cáncer como quimioterapia o radioterapia.

- Otro tipo de medicamentos específicos, como la terapia hormonal o inmunoterapia [9].

En los tumores las células cancerígenas se dividen a una velocidad de división que no permite que se lleguen a expresar todas las proteínas celulares de forma correcta en sus primeros estadios. Esto permite que el sistema inmune detecte las células como extrañas ya que el PD-L1 no se encuentra constituido correctamente. Debido a la expresión defectuosa de PD-L1, el receptor PD-1 no interaccionará correctamente con él, lo que producirá la muerte de la célula tumoral. Como se representa en la figura 2, a medida que el tumor avanza se va adaptando y recupera la expresión correcta de estos receptores, además de producir mecanismos de inmunosupresión adicionales. En algunos casos, y con el paso del tiempo, incluso llega a realizar una sobreexpresión de dichos ligandos.

Por tanto, cuando una células tumoral produce la expresión correcta de este ligando PD-L1, consigue una ventaja reproductiva frente las demás. Esto le permitirá evitar que las células T actúen para eliminarla y se continuará con la proliferación del tumor escapando de la vigilancia inmune. De este modo, otra función de la interacción entre PD1 y sus ligandos, en este caso negativa, es la producción de la apoptosis de las células T antitumorales. Con esta se contribuye a la diferenciación de células T CD4+, aumentando la resistencia de células tumorales al ataque de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) [5].

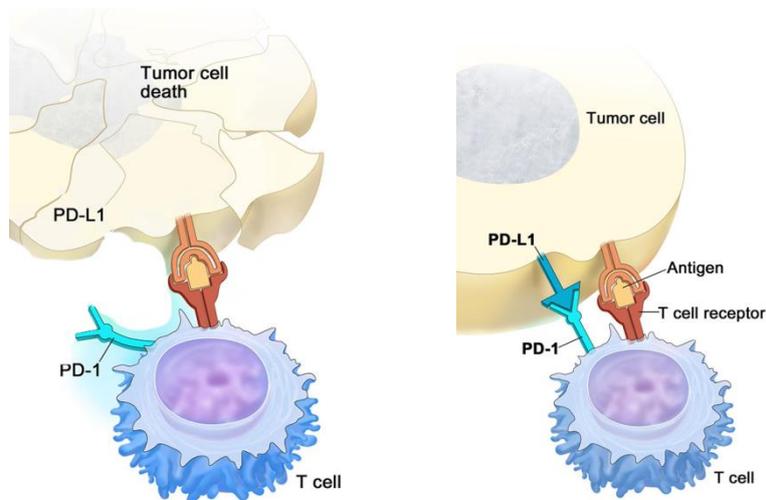


Figura 2. Interacción entre una célula tumoral y linfocito T antes y después de la adaptación de la célula tumoral y correcta expresión de PD-L1 [10].

En los últimos años se ha visto que PD-1 es uno de los más potentes moduladores del sistema inmune. Esto se demostró en ratones a los cuales se les silenció el gen *PDL1*, estos desarrollaron problemas autoinmunes graves [11]. Posteriormente, este poder de inhibición se propuso como un punto de partida para conseguir un efecto terapéutico contra el cáncer. Esta visión parte de la idea de que si se consigue bloquear la unión entre el receptor y su ligando en las células tumorales, no se dará la cascada de señales inhibitorias. Con esto, también se impedirá que escapen del ataque mediado por las células inmunitarias, produciendo la muerte de las células tumorales y, en el mejor de los casos, la cura de la enfermedad.

3.3 Tratamientos contra el cáncer actuando sobre PD-1

Los bloqueadores de los puntos de control inmunitario (ICBs) se consideraron una gran revolución en el tratamiento del cáncer y han conllevado a un aumento en la investigación dirigida a la inmunoterapia tumoral.

Uno de los puntos donde se vio que era posible intervenir en este control inmunitario fue PD-L1, viéndolo como un objetivo ideal por su expresión extremadamente baja en tejidos normales comparado con PD-L2 y su expresión inducible en el sitio del tumor. Como ya hemos dicho, las células cancerígenas pueden comenzar rápidamente con la síntesis de PD-L1, comprometiendo a las células Th1 productoras de interferón γ (IFN- γ) o los linfocitos T citotóxicos (CTL). Por tanto, se consideró PD-L1 como un objetivo para atacar estas células del tumor "adaptativo" que puede regularse mediante los ICB. Uno de los puntos más importantes durante el diseño de los ICB contra PD-L1 es el mantenimiento de la autotolerancia debido a que PD-L1 es una proteína autóloga [11].

A través de determinados estudios [12] se vio que la eficacia del tratamiento de estos ICBs depende también de la actividad del sistema inmune de cada individuo, y requiere la actuación de las células T antitumorales CD8+ en el mismo tumor. Sin embargo, una gran cantidad de los cánceres, alrededor del 70%, no están infiltrados de manera considerable por las células T CD8+. Por tanto, otro método para contribuir a frenar este cáncer pueden ser las vacunas contra el cáncer, induciendo respuestas de células T CD8+. Por lo tanto, los ICBs combinados con las vacunas contra el cáncer son una opción razonable para mejorar los resultados clínicos [13].

Una de las estrategias más usadas para atacar los ICBs es la inmunoterapia, cuya vertiente principal es el uso de los anticuerpos monoclonales. Estos, sin ninguna modificación, cuentan con la capacidad de actuar contra los tumores de la misma forma que lo hacen en el cuerpo humano de manera natural. Los anticuerpos producen su efecto al unirse al antígeno objetivo, aunque por si solos tienen poca actividad. Existen excepciones, como pueden ser aquellos contra HER2, EGFR y CD20, los cuales sí que tienen una gran actividad contra tumores que expresan alguno de estos antígenos. Pero, aunque la actividad antitumoral de los anticuerpos monoclonales que genera el propio cuerpo sea generalmente baja con respecto al ataque contra el cáncer, representan una buena arma debido a que su especificidad por el antígeno objetivo los convierte en agentes terapéuticos muy útiles [14].

Los anticuerpos siempre han marcado la diferencia a la hora de elegir un método para llevar a cabo una interacción, esto es debido a su capacidad de unirse de manera muy específica y eficiente a un determinado epítipo. Se han desarrollado estrategias inhibitorias con el anticuerpo sólo y también conjugado con diferentes moléculas efectoras que logran la muerte celular después de la unión e internalización de los anticuerpos. Dichas moléculas efectoras incluyen agentes citotóxicos, toxinas de proteínas bacterianas o vegetales (inmunotoxinas) y agentes radiofarmacéuticos [15].

En el campo de la investigación de los ICB, el uso de estos anticuerpos contra la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) o su ligando (PD-L1), han demostrado una buena eficacia contra un amplio espectro de tumores malignos, como el cáncer de pulmón, carcinoma de células renales, melanoma avanzado y enfermedad de Hodgkin [16]. Sin embargo, los

resultados clínicos mostraron que la mayoría de los pacientes, entre el 70% y el 80%, son resistentes o solo responden transitoriamente a los anticuerpos contra PD1/PDL1.

A partir de esta visión se han producido grandes avances en este campo como el estudio que permitió la creación de Ipilimumab, un anticuerpo (anti-CTLA4) contra melanomas metastásicos. El Ipilimumab tenía como objetivo el Antígeno 4 del Linfocito T Citotóxicos (CTLA4), que es otro punto de control del sistema inmune. La estimulación de dicho receptor produce también una inhibición del sistema inmune, análogamente a PD-1. Este estudio fue de los primeros en los que se usó una terapia de anticuerpos monoclonales (mAb) para paliar el cáncer y que obtuvo resultados muy prometedores. En este estudio, los resultados positivos fueron bajos, alrededor del 11% pero aquellos que respondieron tuvieron unos efectos clínicos duraderos [17]. Después de este punto de partida, se empezaron a hacer ensayos en diferentes puntos de control del sistema inmune, de ahí la gran importancia de un mayor estudio sobre la interacción PD-1/PD-L1. Posteriormente, mediante la colaboración de la empresa Bristol Myers Squibb en combinación con Nivolumab (mAb anti-PD-1) e Ipilimumab produjeron la primera aproximación para el tratamiento del melanoma metastásico a través de una combinación de inmunoterapia que obtuvo unas tasas de respuesta altas [18]. La mayoría de las aproximaciones actuales para inhibir estas interacciones tienen una visión inmunológica, es decir, se realizan a través de anticuerpos contra aquello que se quiere inhibir.

A su vez también se publicaron varias estructuras de anticuerpos dirigidos al punto de control PD-1/PD-L1. Un ejemplo de la misma es el pembrolizumab de la farmacéutica Merck, que es un anticuerpo IgG4 dirigido a PD-1 capaz de actuar como su ligando [1]. No obstante, la estructura de este anticuerpo no proporcionó información sobre el mecanismo del reconocimiento con su ligando, pero su estructura complejada con PD-1 proporcionó la visión más reciente de un anticuerpo terapéutico contra este receptor. La interacción involucra principalmente dos sitios dentro de PD-1: el bucle C0D (sitio I) y las cadenas C, C0 y F (sitio II). Como se puede observar en la figura 3, la superficie de unión a PD-1 de PD-L1 se superpone con la superficie II del sitio de unión al antígeno de pembrolizumab, lo que justifica la competencia del anticuerpo y PD-L1 por el sitio de unión en PD-1.

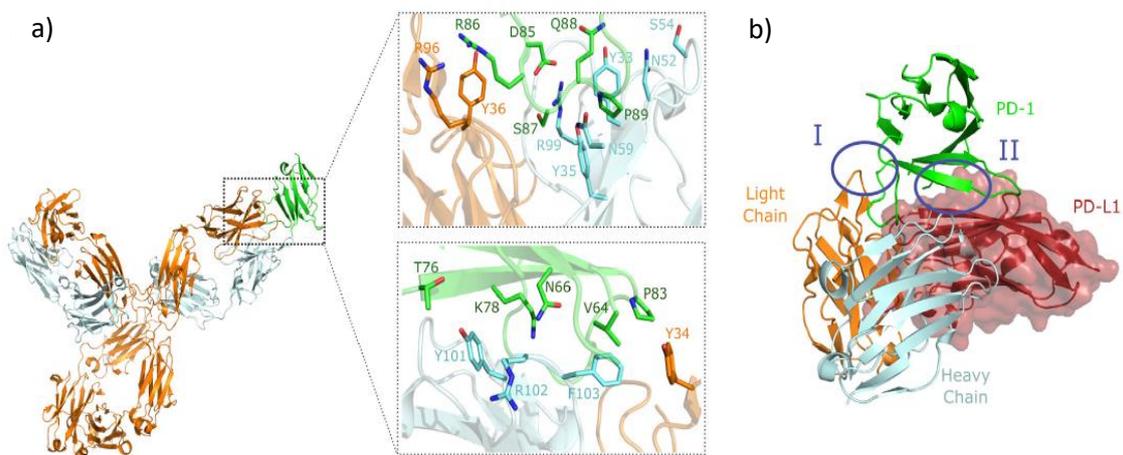


Figura 3. a) Superposición de la estructura de pembrolizumab (naranja, azul) y Fab de pembrolizumab (no se muestra) en complejo con PD-1 humano (verde). b) Superposición de PD-1/PD-L1 (verde y rojo, respectivamente) y los complejos PD-1/pembrolizumab Fab (naranja y verde claro, respectivamente)[1].

Este anticuerpo, por tanto, es capaz de reconocer las cadenas GFCC' de PD-1 ubicados en el centro de las superficies de interacción con PD-L1, lo que permite explicar el procedimiento por el cual se produce la interrupción de la interacción PD-1/PD-L1.

Este ha sido uno de los principales métodos de inmunoterapia contra el cáncer, pero también se observaron resultados prometedores con otras estrategias basadas en la terapia celular. En este campo de investigación, destacan la transferencia de linfocitos T o la extracción de los propios linfocitos T del paciente, modificación de estos y posterior introducción en el cuerpo del paciente, lo que se conoce como CAR-T. Se ha observado que estos mecanismos combinados mejoran la tasa de respuesta contra el cáncer, es más, aquellas inmunoterapias múltiples que usan 3 o más agente producen una mayor tasa de respuestas a la enfermedad, por sinergia de las mismas [19]. Aunque se han conseguido grandes avances en el tratamiento anticancerígeno mediante mecanismos inmunitarios gracias a los anticuerpos, es necesaria mucha más investigación acerca de fármacos o métodos innovadores y eficaces.

La eficacia de los anticuerpos para la terapia contra el cáncer ha sido demostrada en gran cantidad de estudios [1,18-19]. Al mismo tiempo, al estudiar posibles mejoras que se podrían realizar para mejorar la eficiencia de acción de estas técnicas, se vio que el tamaño era uno de los puntos clave en este desarrollo. Esto es debido a que el tamaño de estas moléculas (mAb) dificultaba la penetración a determinadas zonas corporales (como la barrera hematoencefálica) o incluso la introducción de los mismos al interior del tumor, limitando su efecto beneficioso en masas tumorales grandes [2]. Otro de los inconvenientes que tiene el trabajo con anticuerpos como tratamiento, es que existe una dificultad de reproducibilidad a la hora de producirlos. Esto se conoce como diferencias lote a lote, y nos impide asegurar que en un mismo lote existe una uniformidad total entre los anticuerpos y, por tanto, una actuación contra el tumor idéntica. También el coste de producción de los anticuerpos es mayor que el de otras moléculas pequeñas. A través de la realización de estudios estructurales, se observó que el área de unión de PD-1 es extensa, lo que permitía la oportunidad de que péptidos u otros inhibidores constituidos por moléculas de pequeño tamaño pudieran imitar la interacción anticuerpo/PD-1. Sin embargo, la utilización de moléculas de pequeño tamaño para inhibir esta interacción es una de las visiones menos estudiadas

Los péptidos, al igual que los anticuerpos, constituyen uno de los mecanismos biotecnológicos más eficientes y usados en la modulación de interacciones proteína-proteína. Tienen grandes superficies de contacto y, aunque son químicamente diversos, son susceptibles a síntesis química, lo que nos puede llevar a generarlos con un coste menor y conseguir una mayor homogeneidad y reproducibilidad que los con los mAb. Los péptidos también presentan ventajas a la hora de la distribución ya que preservan mejor sus propiedades. Una de sus desventajas es que los péptidos de origen natural tienen una degradación rápida in vivo, se ha visto que esto puede ser paliado a través de la utilización de péptidos cíclicos, ya que de esta manera, se aumenta su rigidez estructural, estabilidad biológica y farmacocinética [20].

El estudio de péptidos cíclicos para el bloqueo de puntos de control del SI ha sufrido un pobre desarrollo debido a la dificultad para determinar la estructura compleja de las moléculas que interviene en esta interacción. Recientemente se han ido completando estas estructuras para el caso del complejo PD-1/PD-L1 humano, lo que ha llevado a un aumento sustancial en estas investigaciones. Actualmente el estudio de moléculas de bajo tamaño que puedan inhibir esta interacción a través de la unión a PD-1 es uno de los puntos clave de la investigación inmunitaria

contra el cáncer, ya que de esta manera se evitaría la inhibición de la células inmunitarias por parte de las células tumorales [1].

El método más utilizado para la realización de estos péptidos se basa principalmente en la conocida como teoría de los puntos críticos. Esta técnica necesita una biblioteca de fragmentos peptídicos que se usan como punto de partida, a los que se añaden residuos clave que interaccionarán con la proteína, denominados de anclaje. A partir de la aplicación de estos recursos se podrán diseñar ligandos que se unan a casi cualquier interacción proteína-proteína (IPP). Con esta técnica se comenzó el diseño de péptidos dirigidos a PD-1, lo que sirvió de punto de partida para una mayor optimización de la unión a este receptor. Con esta idea se han obtenido varios péptidos y pequeños compuestos orgánicos dirigidos a PD-1. Sin embargo, hay pocos moduladores de bajo peso molecular dirigidos a PD-1 que tengan un informe prometedor [2].

3.4 Diseño de péptidos para la interacción con PD-1

A partir del conocimiento que ya existía en la materia de la creación de nuevos péptidos para la inhibición de la interacción PD-1/PD-L1, el grupo *Design, Synthesis and Structure of Peptides and Proteins* del IRB a la cabeza del profesor Ernest Giralt y el doctor Salvador Guardiola continuaron en la investigación y desarrollo de nuevos péptidos. Su principal objetivo fue encontrar un péptido que tuvieran una afinidad considerable por PD-1, con el fin de evitar esta interacción y contribuir a la investigación contra el cáncer.

Para la realización de péptidos contra PD-1 se utilizaron herramientas de modelado proteico, las cuales han sufrido grandes avances en los últimos años. El diseño de estos péptidos cíclicos se centra en la predicción de las estructuras lineales naturales formadas exclusivamente por aminoácidos levógiros (L). Sin embargo, estos métodos son poco eficaces para el diseño de péptidos que cuentan con una mayor complejidad estructural [21]. También es necesario tener en cuenta que muchos de los péptidos cíclicos destinados a actuar como inhibidores se diseñan a partir de estructuras secundarias bien definidas. Un ejemplo de ello son los dedos de zinc, que presentan determinados motivos proteicos cuya interacción es conocida [22].

El problema es que la mayor parte de estas IPP contienen epitopos no lineales, en los que sería necesaria una mayor flexibilidad estructural en sus complejos para su diseño. Por este motivo, la creación de péptidos cíclicos *de novo* fue un reto altamente exigente, ya que se tuvieron que tener en cuenta dos factores que no se pueden pasar por alto y que se han de realizar de forma simultánea. Primero, es necesaria una visión de la geometría de la parte principal del péptido así como de su parte efectora, que cuente con una energía mínima y que permita la estabilidad del péptido generado [23]. Del mismo modo, es necesario diseñar las cadenas laterales para incrementar la complementariedad química y estructural con la proteína diana

Uno de los mecanismos que se ha venido usando en gran cantidad de ensayos para el diseño de proteínas funcionales se basa en el programa de modelización *Rosetta* [24]. Para el diseño de los péptidos evaluados en este proyecto se usó este modelo, generando péptidos macrocíclicos dirigidos a PD-1 que eviten la unión de PD-L1 o PD-L2.

Como ya se ha comentado anteriormente, la unión producida entre el receptor PD-1 y sus ligandos, PD-L1 y PD-L2, se lleva a cabo mediante la superficie plana de una gran hoja β , de 1.970 \AA^2 . También se conoce que a través de esta interacción del receptor con su ligando se reorganiza la región flexible de la lámina β , denominada GFCC' de PD-1. A consecuencia del movimiento producido por la unión, se abre una bolsa hidrofóbica transitoria que hace que la cadena lateral aromática de Y123 se asiente y haga posible las interacciones necesarias con residuos adyacentes [1]. El Y123 se encuentra muy conservado en todas las secuencias conocidas de PD-L1 y PD-L2, lo que ha hecho que sea considerado por medio de varios estudios y algoritmos de predicción como uno de los puntos de interacción principal [25]. Basándose en esto se estableció Y123 como un punto de unión a partir del cual construir el péptido cíclico.

Para llevar a cabo la construcción, primero, a partir de Y123 como residuo principal se produjo una cadena cíclica de poli-glicinas, ya que se ha visto que esta adición es adecuada para la construcción de péptidos heteroquirales. Estos residuos son los únicos que se pueden ver a ambos lados del diagrama de Ramachandran, lo que nos indica que son regiones energéticamente permitidas [26].

Posteriormente se le realizó un muestreo genKIC, que permitió calcular una gran cantidad de conformaciones de columna vertebral las cuales son posibles mecánicamente en presencia de la proteína objetivo [27]. A partir de las estructuras resultantes, se eliminaron aquellas que no podrían dar una buena interacción. De este modo, aquellas estructuras que contaban con una alta energía se descartaron, debido a que si esta es mayor que 0 podrían producir interacciones estéricas con la PD-1. A su vez, aquellas que en su esqueleto principal contaban con pocos puentes de hidrogeno tampoco se tuvieron en cuenta, ya que estos contribuyen a su estabilidad.

Seguidamente se realizó el ensayo Monte Carlo, que permitió introducir, minimizar y seleccionar las cadenas laterales que tengan menor energía para todos aquellos residuos diferentes de Y123. Uno de los fallos que puede tener este sistema, es que la glicina y la alanina pueden salir muchas veces favorecidos y verse muy repetido en la secuencia al ser muy flexibles. Por tanto, esto se evitó a través de una penalización, para así obtener más variedad química. Del mismo modo se propició la presencia de prolinas para obtener más flexibilidad en la estructura final.

Posteriormente, los péptidos obtenidos se clasificaron basándose en su afinidad y plegamiento, para así seleccionar los que presenten una mayor probabilidad de interactuar con PD-1. Las variables analizadas fueron: la energía libre de unión, el área accesible al disolvente enterrada en la interfaz, la complementariedad de forma y el número total de enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares. Los 20 mejores clasificados para estos criterios se inspeccionaron visualmente y se analizaron mediante cálculos que permitían conocer su organización estructural. De entre estos 20, fueron pocos los que seguían presentando una baja energía, lo que hizo que solo 2 candidatos cumplieran con los requisitos para seguir con las adelante, PD-i1 y PD-i2.

Durante el proceso de diseño de péptidos, se observó que no se podía obtener la posición exacta del residuo Y123, clave en la interacción con PD-1, pero sí que se consiguió en posiciones más usuales de este rotámero. Usando el residuo Y123 en las posiciones posibles y aplicando el protocolo anterior, se obtuvieron los péptidos heteroquirales PD-i3 y PD-i4. Finalmente, la tercera aproximación que se llevó a cabo fue a través de la superficie de PD-1,

la cual cuenta con una gran flexibilidad si no se encuentra unida al ligando, por tanto, se investigó esta PD-1 humana no unida [1]. Se usó un algoritmo FTMap27, que permite encontrar sitios de unión en la proteína objetivo, y se halló que seguía siendo el bucle GFCC'' el que tenía una mayor relevancia en términos de sus interacciones [28]. Se pensó que esta superficie grande puede albergar uniones con determinadas cadenas laterales aromáticas grandes de residuos como la del triptófano. A consecuencia, se usó el triptófano como base y a partir de este se introdujeron péptidos cíclicos que interaccionen con PD-1, de esta manera se diseñaron PD-i5 y PD-i6. Este procedimiento se puede ver ejemplificado paso a paso en la figura 4.

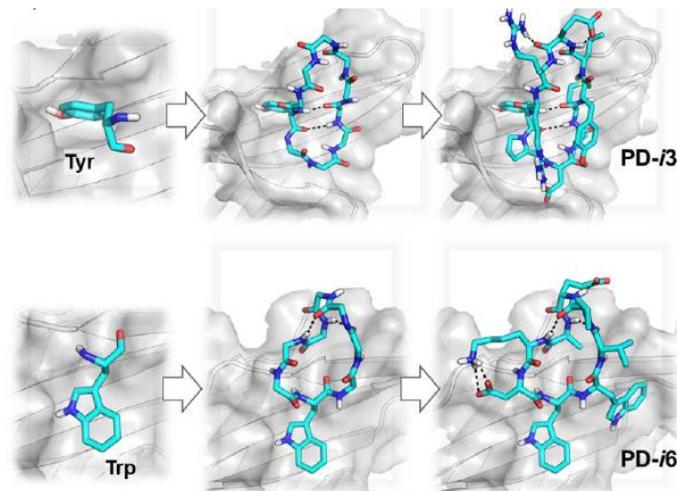


Figura 4. Diseño de peptídicos macrocíclicos dirigidos a PD-1. A) Protocolo de diseño esquemático para PD-i3 (arriba) y PD-i6 (abajo). (Artículo aun no publicado).

Una vez se completó el diseño de los péptidos y se consiguieron estos 6 candidatos, se pasó a la síntesis de los mismos. Para ello se alargaron las cadenas proteicas a través de una resina de poliestireno modificado con enlace Wang, en lo que se llama anclaje del ácido carboxílico de cadena lateral Asp [29]. A través de esta resina se pudo realizar la ciclación, la desprotección y la escisión del péptido de forma simultánea.

De esta manera, el grupo *Design, Synthesis and Structure of Peptides and Proteins* del IRB diseñó y sintetizó los 6 péptidos candidatos a ser el inhibidor de la interacción PD-1/PD-L1. Posteriormente fue el momento de empezar los ensayos para evaluar y analizar la capacidad de cada uno de estos de unirse a PD-1.

3.5 Mecanismos para la evaluación de la interacción péptidos/PD-1

Para llevar a cabo la evaluación de la interacción PD-1/PD-L1 se deben usar un conjunto de técnicas biofísicas que permitan establecer de una manera clara y reproducible la existencia de interacción, así como su constante de disociación (K_D). Esta constante es el valor más usado para establecer la propensión o afinidad de unión de un ligando por una proteína en concreto, es decir, su facilidad para unirse a él [30]. Existen una gran cantidad de métodos y técnicas para evaluar la interacción entre dos proteínas. A partir de las posibilidades y recursos más

eficaces y viables, los métodos elegidos para comprobar las afinidades mediante el estudio de la K_D y estudiar en profundidad esta interacción fueron: Termoforesis a Microescala (MST), Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

3.5.1 Termoforesis a Microescala (MST)

La MST es una técnica novedosa para el análisis biofísico de las interacciones entre biomoléculas que trata de determinar la afinidad entre estas. Este método consiste en medir la variación de movimiento relativo de las moléculas dentro de un gradiente de temperatura creado por un láser. La fuerza de la interacción entre una muestra marcada con fluorescencia y un ligando, se mide mediante la detección de cambios en la intensidad de fluorescencia dentro del capilar donde se produce el ensayo. Estos cambios en la fluorescencia se dan mientras se aplica un gradiente microscópico de temperatura mediante un láser, fenómeno conocido como termoforesis. A través de este procedimiento, se puede diferenciar cambios en la conformación, carga o masa de la proteína marcada, antes y después de interaccionar [31]. Finalmente, gracias a la representación del cambio de termoforesis frente a la concentración, se puede conocer si existe o no afinidad y la K_D de esta unión. Para calcularla se lleva a cabo un análisis de la migración de la señal fluorescente, que se conoce como *T-Jump*, y se muestra en la figura 5b. Este permite calcular la K_D a través de la aplicación la fórmula 1 [32].

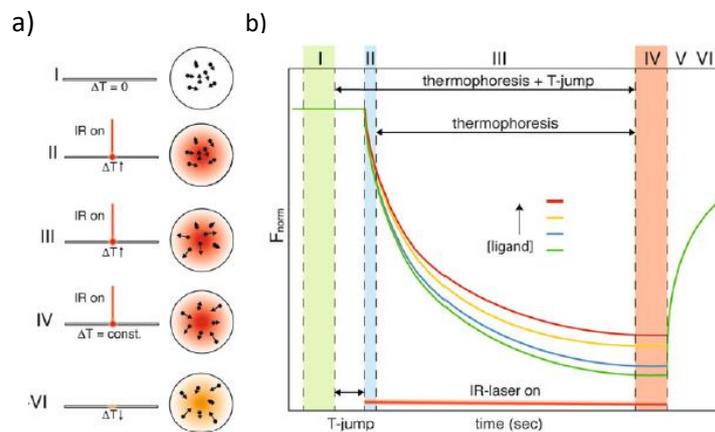


Figura 5. a) Descripción esquemática de la migración de las partículas tras la aplicación del gradiente térmico producido por un láser y b) ejemplo del espectro resultante [33].

$$FB = \frac{[AB]}{[B]} = \frac{[A] + [B] + K_D - \sqrt{([A] + [B] + K_D)^2 - 4[AB]}}{2[B]} \quad (1)$$

A través de este método, se establecieron las primeras descripciones de la medida de afinidad del complejo formado por PD-1 y su ligando PD-L1 en el escenario tumoral. Este método nos permite, a partir de un protocolo sencillo y usando una pequeña cantidad de muestra, disponer de un gran abanico de aplicaciones potenciales con las que investigar las interacciones proteicas y obtener resultados sensibles [32].

Aplicado a nuestro caso, a través de la termoforesis a microescala, se pretende validar la interacción entre los péptidos y la proteína PD-1, ya que esta nos permite realizar una

representación fiel de las condiciones fisiológicas en las que se produciría dicha unión. Además, esta técnica permitirá obtener la K_D de forma precisa y reproducible.

3.5.2 Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

La ITC es una técnica biofísica que se utiliza para la medida de la formación de complejos moleculares. Esta está siendo ampliamente utilizada para cuantificar la afinidad de unión en el desarrollo de fármacos durante el proceso de optimización y validación de candidatos. Se basa en que toda interacción entre dos moléculas genera o absorbe calor al formarse o romperse los enlaces de dichas moléculas, dependiendo de la naturaleza termodinámica de la interacción. Este cambio de calor se mide en la calorimetría de valoración isotérmica (ITC) mediante la valoración de un ligando de interacción, presente en una jeringa, con la otra molécula de interacción, presente en una celda de reacción [34]. A partir de los pulsos de calor brutos generados al producirse la interacción se derivan isotermas de unión, que proporcionan información completa de la afinidad, estequiometría y termodinámica de las interacciones moleculares mediante la aplicación de determinadas ecuaciones [35].

La ITC indica medidas muy precisas de las interacciones moleculares, además este tiene la ventaja de que no es necesario el marcaje de las moléculas que intervienen para realizar la medida termodinámica. El método ITC se puede aplicar a una gran cantidad de sistemas y ha sido muy usado especialmente el campo farmacéutico o alimentario [34]. De este modo mediante la curva la transferencia de calor se conocerá si hay o no interacción y su K_D con una mayor sensibilidad y precisión que la MST. Esto permitirá garantizar y confirmar los resultados obtenidos mediante la técnica precedente.

3.5.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

En la creación de nuevos fármacos es indispensable el conocimiento de la estructura de la proteína a testar, de la molécula que se va a obtener después de la interacción e incluso de las interacciones que se producen entre ambas.

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de proteínas (RMN de proteínas) es un campo de la biología estructural que permite obtener información sobre la estructura de las proteínas. Esta, también aporta información acerca del complejo diana-ligando, dinámica de las proteínas y su interacción con otras biomoléculas. Este método permite el trabajo bajo condiciones fisiológicas y la obtención de una visión rápida y específica de la estructura deseada [37]. La RMN es una herramienta usada en las diferentes etapas de la investigación de fármacos pero, en este caso, se usará para el estudio de la estructura de unión. Las aplicaciones más importantes para su uso en química orgánica son la espectrometría RMN de protones, la de carbono-13 o la de nitrógeno-15, que será la usada en nuestro caso.

Esta técnica nos permite observar cuáles son los aminoácidos más importantes en las interacciones entre dos proteínas y cuál es el cambio de posición de estos después de esta interacción. Al mismo tiempo, permite conocer mejor el sitio de interacción de los péptidos a estudiar.

4. Objetivos

El trabajo se centra en evaluar si se produce una interacción entre los péptidos diseñados y PD-1 y si ésta puede llegar a inhibir la interacción de PD-1 con su ligando natural PD-L1.

Este objetivo principal se subdivide en objetivos secundarios necesarios para avanzar en la investigación:

- Primero, la expresión de la proteína recombinante PD-1 en *E. coli* y purificación de la forma correctamente plegada.
- Segundo, la evaluación de los péptidos diseñados (PD-i1-PD-i6) mediante Termoforesis a Microescala (MST) y Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) con el fin de determinación de su constante de disociación (K_D).
- Y, por último, la utilización de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de campo alto para conocer la región de interacción de los péptidos en PD-1.

5. Metodología

5.1 Expresión de hPD1 en *E. coli*

5.1.1 Transformación de células

Para obtener la fracción extracelular de la proteína de muerte celular programada humana (PD-1), se llevó a cabo la transformación de células *E. coli* BL21 (DE3) mediante un vector de expresión, pET-24. Este vector se encuentra descrito en el artículo *Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1* [38]. El grupo que lo realizó nos cedió una copia del plásmido que nos permitió la expresión de dicho receptor. Este vector contiene la secuencia necesaria para expresar PD-1 bajo el promotor *lacI*. Para transformar las bacterias, éstas se descongelaron en hielo durante 10 minutos y se inocularon 50 uL del plásmido a una concentración de entre 1 pM-100 nM. La transformación se realizó mediante choque térmico, pasando de hielo a agua a 42°C durante 20 segundos y rápidamente volviendo al hielo. Una vez enfriado, se añadieron 400 µL de medio Luria-Bertani (LB) (Thermo Fisher Scientific, EEUU) a temperatura ambiente. Este medio es nutricionalmente rico y es utilizado principalmente para el crecimiento de bacterias que contiene lisado de levaduras, glucosa y proteínas. Finalmente se incubó en agitación a 37°C y 250 rpm para promover el crecimiento. Para la conservación del stock, se congeló una alícuota a -80°C con 30% glicerol para sus posteriores usos.

5.1.2 Preparación de cultivos

Una vez se obtuvieron las células transformadas, se preparó la expresión [38], proceso que se empezó con los precultivos. En la expresión se generaron dos isotopos de la misma proteína. Una fracción de proteína se expresó marcada isotópicamente con ¹⁵N y otra sin este marcaje. Esto es debido a que mientras un lote de proteína PD-1 se usó para el ensayo de afinidad MST e ITC, la proteína marcada con ¹⁵N se usó para la RMN. Este segundo lote necesitó ser expresado a partir de un medio mínimo, que contenía todos los nutrientes necesarios para que las bacterias puedan crecer y la única fuente de N para la expresión de la proteína fue el ¹⁵N. Este isótopo permitió que los aminoácidos de la proteína estuviesen marcados y pudieran ser localizados para así conocer sus ubicaciones específicas y, por tanto, la región de interacción de los ligandos en la proteína.

Todos los instrumentos, medios y buffers requeridos fueron autoclavados (a 121°C) para evitar posibles contaminaciones o presencia de microorganismos externos. Los componentes termolábiles de aquellos buffers o medios a utilizar se añadieron a posteriori de la esterilización a través de filtros de 0.22 µm de diámetro, que nos permitieron su esterilización (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

Se preparó el medio mínimo para la proteína marcada con ^{15}N y el medio LB para la producción de la proteína nativa. Para la preparación del LB se mezcló LB en polvo y agua desionizada (miliQ) para obtener una concentración de 20 g/L. Por otra parte, la composición del medio mínimo fue de 7.52 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L NaCl, 2 g/L de glucosa, 300 $\mu\text{g/L}$ de tiamina, glutamina, 0.5 g/L NH_4Cl (Sigma-Aldrich, Alemania. A no ser que se diga lo contrario todos los compuestos usados se compraron de esta empresa), diluido en un litro de agua miliQ. En este paso también se preparó una dilución 50 mg/ml de kanamicina, antibiótico mediante el cual se realizará la selección positiva de las bacterias transformadas debido a su resistencia adquirida, y una solución de IPTG 1 M, inductor de la expresión de la proteína al activar el promotor *LacI*.

Se realizaron dos precultivos con 100 mL del medio de crecimiento respectivo, al cual se añadió 100 μL de la disolución stock de kanamicina. Se inocularon 10 μL de bacterias previamente transformadas a cada medio y se dejaron creciendo a 37°C en agitación durante 16h. Una vez estos crecieron, se añadieron 10 mL del medio de precultivos a un litro de los medios de cultivo correspondiente y 1 mL de la disolución de kanamicina. Los cultivos se hicieron crecer a 37°C en agitación hasta que estos alcanzaron una densidad óptica de aproximadamente 0.8 de absorbancia (ABS) a 600 nm, medido en un espectrofotómetro de UV/VIS (Thermo Fisher Scientific, EEUU). En este punto se dejó media hora más incubando a 30°C para alcanzar definitivamente la densidad óptima requerida y se añadió 1 mL de IPTG 1M volviéndose a incubar durante 5 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se centrifugaron los medios y el pellet donde se encontraban las células y se resuspendió en 20 mL de una dilución de tampón fosfato salino (PBS), PCI (inhibidor de proteasas) y DNAsa (Thermo Fisher Scientific, EEUU), para prepararlo para la purificación.

5.2 Purificación de hPD-1

Para llevar a cabo la purificación, primero las bacterias se lisaron con un disruptor celular por presión (CF2 Series Cabinet, PBI, EEUU) que permite romper las paredes celulares sin dañar la proteína al producir un cambio de presión llegando a alrededor de 25 KPsi, suficiente para romper cuerpos de inclusión. Mediante este procedimiento se obtuvo un homogeneizado de células donde se encontraba la proteína. Cabe destacar, que en todo momento se debe mantener separados el medio mínimo y el LB porque si se mezclan ya no se podrán separar la proteína marcada isotópicamente de la no marcada. Se escogió este método de lisis debido a que se puede llevar a cabo a 4°C, mientras que otros como la sonicación pueden calentar la muestra haciendo que se degrade la proteína.

Una vez lisadas las células se realizó una centrifugación de 25 kG a 4°C (manteniendo esta temperatura en todos los procesos posteriores) y se resuspendió pellet. Durante las centrifugaciones realizadas en la purificación de los cuerpos de inclusión de la bacteria, como PD-1 es insoluble si no está en su forma activa, siempre se encontrará en el pellet. Esta resuspensión se realizó con un tampón de lavado (tabla 1) a temperatura ambiente para terminar de retirar las posibles impurezas presentes. Este proceso de centrifugación se repitió una vez más con el mismo tampón y una última vez sin Tritón X, para retirar los restos de detergente. Para resuspender el pellet de una manera más rápida y eficaz se usó el Ultraturax

(IKA, China), un homogeneizador mecánico que cuenta con dos rotores que contribuyen a la disolución del pellet.

Tabla 1. Concentraciones de los componentes de los tampones utilizados en la purificación.

Tampón de limpiado:

50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 46 mM β EtSH, 9 mM de detergente Tritón X. (pH 8)

Tampón de desnaturalización:

50 mM Tris, 6 M GnHCl, 200 mM NaCl, 11 mM β EtSH. (pH8)

Tampón de plegamiento:

100 mM Tris, 500 mM Arginina, 2 mM EDTA, 6 mM Cistamina, 6 mM Cisteamina. (pH8)

Tampón de diálisis:

10 mM Tris, 21 mM NaCl, 2 mM Azida Sódica, (1ª etapa 1 M GnHCl). (pH8)

Una vez ya se extrajo y se limpió la proteína, se llevó a cabo el proceso para conseguir el correcto plegamiento de la proteína. Para ello, se desnaturalizó la proteína mediante el tampón concentrado de hidrocloreuro de guanidina (GnHCl) (tabla 1) y la centrifugación de la muestra. Esto se mantuvo en agitación vigorosa e incluso calentándolo a 30°C para contribuir a la desnaturalización y solubilización de las proteínas. Una vez desnaturalizada, la proteína se encontrará solubilizada en el sobrenadante.

Para obtener el plegamiento nativo de la proteína se usó un tampón de Tris en presencia de arginina, cistamina y cisteamina (tabla 1). Estos contribuyen a que se produzca un buen plegamiento debido que el par redox cistamina/cisteamina contribuye a la correcta formación de los puentes de sulfuro de la proteína. En este procedimiento se centrifugó la muestra para eliminar los restos celulares y se añadió el sobrenadante al tampón de plegamiento. Durante este proceso es importante la adición lenta de la muestra sobre el tampón gota a gota y en agitación suave, debido a que de esta manera es como se obtiene un plegamiento correcto, para ello se usó un decantador en una cámara fría, a 4°C.

Finalmente se realizó una diálisis, lo que permitió el cambio progresivo de la composición de sales de la disolución de proteína y la eliminación del agente desnaturalizante. Para ello se preparó un tampón con una concentración baja de sales (tabla 1), excepto en la 1ª etapa en la cual se añadió GnHCl para minimizar el choque osmótico. Se usó una membrana de 3-5 kDa (Sigma-Aldrich, Alemania) debido a que la proteína de interés es de 13.25kDa (figura 6) [39]. En el exterior del vaso de precipitados se introdujo el buffer de diálisis más concentrado y se mantuvo la agitación hasta que llegó al equilibrio, aproximadamente 24h después. Una vez alcanzado, se

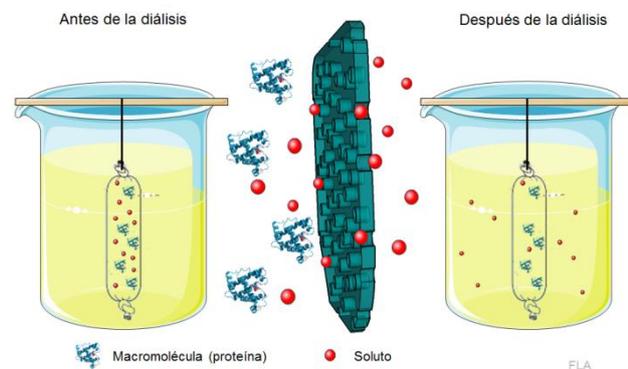


Figura 6. Representación del proceso de diálisis [51].

realizó un segundo paso de diálisis con tampón fresco durante 24h a 4°C. El precipitado se eliminó por centrifugación y la fracción soluble se analizó por electroforesis de SDS-PAGE. Como resultado las posibles proteínas diferentes de hPD-1 se eliminaron y dentro de las bolsas únicamente quedó ésta o aquellas con un peso molecular similar.

5.2.1 Electroforesis en gel SDS-PAGE

Antes de realizar la diálisis se guardó una alícuota para realizar un ensayo de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), lo cual permite separar mezclas complejas de proteínas, verificar la presencia de una proteína o purificar proteínas entre muchos otros usos.

Se preparó un gel del 15% de acrilamida, mezclando 4.4 mL de agua mili Q, 2.5 mL de acrilamida 60%, 3 mL de Tris 1.5 M, 0.1 mL de persulfato de amonio y de SDS ambos al 10% y 10 µL de TEMED. Posteriormente, se preparó la solución concentradora al 1% constituida por 3 mL de agua mili Q, 500 µL mL de acrilamida 60%, 1.25 mL de Tris 1.5 M, 50 µL de persulfato de amonio y de SDS ambos al 10% y 5 µL de TEMED. Estas soluciones se introdujeron en un molde para formar el gel. Una vez solidificado el gel se llevó a cabo el montaje del equipo de electroforesis, se colocó el gel en el medio del recipiente y se rellenaron los diferentes cubículos con el tampón constituido por Tris-HCl 25 mM y glicina 200 mM, para el mantenimiento del pH estable en 7.

Se cargaron 10 µL de cada una de las muestras y 10 µL de tampón de carga, excepto el marcador molecular que solo se usaron 3 µL. El tampón de carga se realizó a través de SDS 10%, beta-mercapto-ethanol 10 mM, Glicerol 20%, 0.2 M Tris-HCl, y azul de bromophenol 0.05% (pH 6.8). Una vez cargado se activó el equipo haciendo pasar 80 V hasta el frente y 120 V para hacer correr el gel hasta que se llegue a la separación correcta.

Finalmente se reanalizó una tinción con Coomassie Blue (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Se dejó tiñendo y una vez se completó la tinción se fue limpiando el exceso de tinción a través de una solución descolorante del gel, después se repitió el proceso con agua hasta que se observaron correctamente las bandas.

5.2.2 Separación por cromatografía de exclusión molecular

Con el fin de separar la muestra de posibles restos de proteína mal plegada, otras proteínas o impurezas y contenerla en un volumen inferior, se usó una columna de dextrano reticulado (Sephadex 75, Sigma-Aldrich, Alemania), como la observada en la figura 7. La muestra se aplicó a la columna, siendo esta la fase móvil, y se bombeó a través de la misma. De este modo, se separaron las fracciones del resultado de la diálisis y se determinó en cuál de estas fracciones se encontraba la proteína mediante su detección espectrofotométrica y la aparición de picos de absorbancia a 254 nm, longitud de onda que nos permite observar las proteínas.



Figura 7. Cromatógrafo de exclusión molecular [40].

Las fracciones en las que se observaron estos picos de absorbancia se juntaron y se centrifugaron para acabar de eliminar los restos de proteína mal plegada, ya que aquella que se encuentre en la forma nativa será soluble.

Posteriormente para concentrar las proteínas se centrifugó la solución, pasando la muestra a través de un filtro con poros de 3 kDa (Merck Millipore, Thermo Fisher Scientific, EEUU). En estos se introdujeron aquellas fracciones obtenidas en la cromatografía que presentaban picos de absorbancia pertenecientes a proteína. De esta forma, se filtró todo el volumen de las fracciones de interés. El material no retenido por el filtro se descartó, obteniendo una solución final 4 mL con la proteína de interés.

5.2.3 Detección por espectroscopia de masas (LC-MS)

Para conocer y confirmar la presencia de la proteína PD-1 en la muestra obtenida a través de la separación por cromatografía, se usó la espectroscopia de masas utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC).

Este proceso se realizó después de la cromatografía de exclusión molecular para así evitar los efectos perjudiciales de las impurezas en el dispositivo. Para llevarlo a cabo se cogieron 10 μ L de la muestra de 4 mL, concentrada en el paso anterior, y se introdujo en un recipiente especializado de 40 μ L. Se realizó el mismo procedimiento con muestra de PD-1 pura. Los dos recipientes se colocaron en el espectrómetro de masas (Thermo Fisher Scientific, EEUU) para su análisis.

Posteriormente se comparó el espectro de picos de m/z (masa/carga) de la muestra con el obtenido de la muestra pura. También se cotejó el peso molecular teórico de la proteína obtenido mediante la herramienta Protparam de *ExPASy* [41] con el que se obtuvo a partir del espectro de masas aplicando la herramienta ESprot [42].

5.3 Termoforesis a Microescala (MST)

Posteriormente para comenzar con el análisis de la afinidad de las interacciones entre moléculas se realizó la técnica MST. Para llevarla a cabo fue necesario un cambio de medio debido a que el tampón con Tris en el que se encontraba la proteína podría realizar interferencias en este ensayo. Para ello, a través de una columna filtrado estándar, PD MiniTrap G-25 (Thermo Fisher Scientific, EEUU), se cambió este tampón por le PBS + 0.05% de detergente Tween. Para ello, únicamente hizo falta introducir la muestra en la columna y una vez salió el tampón Tris se hizo pasar PBS para que la proteína eludiera. Esto se realizó exclusivamente para la proteína a usar en el ensayo MST, es decir, aquella que no tiene un marcaje con ¹⁵N. Una vez recogida la proteína mediante un espectrómetro de gota (NanoDrop 2000, Nanodrop, EEUU) se obtuvo la concentración final de proteína y pureza a través de la medida de su absorbancia a 280 nm, mediante la fórmula 2.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{ABS } 280}{\epsilon \cdot \text{Longitud (l)}} \quad (2)$$

Para llevar a cabo este ensayo MST es necesario una proteína que se pueda detectar por fluorescencia, como la proteína PD-1 no es fluorescente se tomó la proteína purificada y se marcó con el fluoróforo Alexa Fluor 647 NHS Ester (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Este fluoróforo se une a las lisinas de los grupos amina de la proteína y tiene un rango de absorción/emisión, 594-633 nm, dentro de lo permitido por el aparato de termoforesis [45]. Para llevar a cabo la conjugación se aplicó un ratio de 3:1, mezclando la proteína y el fluoróforo a una concentración de 10 mg/mL. Posteriormente se realizó una purificación mediante una columna de separación PD MiniTrap G-25 para eliminar los restos de fluoróforo no unidos a proteína que podrían dar señal igualmente en la MST. Seguidamente se realizó un análisis mediante LC-MS para corroborar si realmente se había realizado una correcta adición. Una vez se produjo la unión se midió la concentración de PD-1/Alexa flúor mediante el NanoDrop 2000, debido a que para la MST no son necesarias altas concentraciones y pueden afectar a la eficacia de la medida. Para ello, se aplicó la fórmula 3 en la cual también se mide la ABS a 650 nm para evitar cuantificar erróneamente todo aquello que no sea proteína.

$$C = \frac{\text{ABS } 280 - (\text{ABS } 650 \cdot F \cdot \text{Corrección})}{\epsilon \cdot l} \quad (3)$$

Para comenzar con el ensayo de MST, primero es necesario establecer las condiciones idóneas para este, ya que pueden variar en función de la proteína a utilizar y la interacción, por lo que se realizó un pre-test. Para ello, primero se estableció la concentración de proteína fluorescente, que idealmente debería encontrarse entre 10-100 nM. Para conseguir estar en este rango de concentración se hicieron diluciones de la muestra (1:2 en PBS) y se testaron estos valores intermedios. Al mismo tiempo, se testó el tipo de tampón para ver si el usado era apropiado y los tres tipos de capilares disponibles para hacer el ensayo, los cuales difieren en su comportamiento cinético. Durante el ensayo, el tipo e intensidad del láser también se evaluaron para conseguir una señal óptima.

Una vez establecidas las condiciones, se hizo una comprobación de unión. Esta se realizó mediante un anticuerpo anti-PD-1 (Abcam, EEUU) con su ligando, PD-1, ya que si el ensayo establece una interacción, se confirmará el buen funcionamiento de la técnica y del dispositivo. Para ello el anticuerpo se diluyó a 1 μM con el tampón PBS + 0.05% de Tween, mientras que para la muestra se estableció una concentración de 20 nM. Para esta comprobación, se preparó un eppendorf en el cual se pusieron 25 μL de proteína y 25 μL de tampón PBS y en otro 25 μL de proteína más 25 μL del anticuerpo anteriormente preparado. Cada una de las dos muestras se introdujo por capilaridad en un capilar *standard* (Nanotemper, Alemania) y se insertó en el dispositivo necesario para su análisis, Monolith NT.115 (Nanotemper, Alemania).

Finalmente, una vez validado el ensayo con el control positivo (anticuerpo monoclonal), se ensayaron los péptidos obtenidos por nuestro grupo de investigación. Estos péptidos fueron sintetizados y liofilizados después de su purificación para su conservación. Por ello, para realizar el ensayo fue necesaria su resuspensión en tampón PBS para conseguir la concentración deseada, 10 mM.

Partiendo de este se realizó un banco de diluciones cogiendo la mitad del volumen, 5 μL , y añadiendo otros 5 μL de tampón PBS, de esta manera conseguiremos diluciones seriadas 1:2 hasta un total de 16 muestras. Por otra parte, se añadieron a cada tubo 5 μL de la proteína marcada a 20 nM, por tanto, la concentración de péptido y de proteína fluorescente se disminuyeron a la mitad de la inicial, 5 mM y 10 nM respectivamente. Mediante este procedimiento se obtuvieron diluciones seriadas del péptido objetivo con una concentración fija de PD-1. Posteriormente se mezclaron las muestras, por capilaridad se insertó la mezcla en los capilares y finalmente se introdujo en el portacapilares del Monolith NT.115 observado en la figura 8.



Figura 8. Equipo y mecanismo de carga de la muestra al Monolith NT.115 [52].

Este procedimiento, se llevó a cabo para los 6 péptidos que se realizaron computacionalmente en el trabajo precedente. También se evaluó la afinidad del mAb anti-PD-1 para conocer su K_D , aunque en este caso su concentración más alta fue de 500 μM debido a la mayor eficiencia de interacción de este, que lo hace fácil de detectar. Para acabar, se obtuvo computacionalmente la variación de movimiento relativo dentro del gradiente de temperatura creado por el láser, para su posterior análisis y detección de la K_D de cada unión.

5.4 Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

El ensayo ITC solo se realizó con los tres péptidos de los que mejor K_D se obtuvo en el ensayo de MST. Debido a la sensibilidad de esta técnica, todos los tampones fueron filtrados a partir de filtros de 0.22 μm y toda muestra a utilizar se desgasificaron mediante una bomba de vacío (LabTech, EEUU). El dispositivo cuenta con dos celdas, una donde se evaluará la interacción y otra de referencia a partir de la que el dispositivo compara las variaciones de temperatura y minimiza interferencias.

Para esta evaluación, a partir del stock de proteína PD-1 no marcado con el fluoróforo obtenido a partir de la purificación, se realizó una muestra a una concentración de 0.03 mM. En cuanto a los péptidos a evaluar, se usó una concentración de 2 mM y, para alcanzar dichas concentraciones, se usó un tampón a base de NaCl, Tris y azida sódica diseñado para disminuir el ruido de fondo, este es el mismo buffer que se usó en la celda de referencia. Por tanto, en la celda de evaluación se introdujo la proteína mientras que los diferentes péptidos o el tampón necesario para el blanco se colocaron en una aguja, esta permite adicionar lentamente su contenido para ver la variación de temperatura a medida que interaccionan. Una vez cargado el péptido, la aguja se introdujo en el la máquina de ITC (TA Instruments, EEUU). De este modo se obtendrá una curva del intercambio de calor, que permitirá conocer si hay o no interacción y su K_D .

5.5 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Para concluir el estudio de interacción se llevó a cabo el ensayo de RMN. En los pasos de purificación de la proteína marcada con ^{15}N , además de usarse la cromatografía de exclusión molecular, se añadió un paso adicional de cromatografía de intercambio iónico. Para ello se usó una columna catiónica (Thermo Fisher Scientific, EEUU), que contiene en su interior cargas negativas, y se hizo pasar una solución de nuestra proteína marcada en un tampón de pH 6.5. Esto permitió que la proteína, que tiene un punto isoeléctrico de 8.3, se mantenga cargada negativamente y al hacerla pasar por la columna se atrajo con las moléculas positivas del interior de la columna. Posteriormente se pasó una solución de igual pH pero con 1 M de NaCl, lo que produjo un cambio en la fuerza iónica que provocó la elución de la proteína en diferentes fracciones. Con la ayuda del LC-MS se determinó aquellas que contenían la proteína y se concentró la proteína en una única fracción por el procedimiento de los filtros de centrifuga (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

Para el ensayo RMN también es necesario diluir la proteína en un nuevo tampón, debido a que el tris tiene muchos protones y esto provocaría interferencias en la señal. Se usó una disolución de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 como sales tampón, NaCl y azida sódica. Con este, se realizó un cambio de medio mediante el PD MiniTrap G-25 de manera que ya estuviese optimizado para el ensayo. Se usó la proteína marcada con ^{15}N ya que esta nos permitió visualizar los aminoácidos en el espectro debido a la radiación del isótopo marcado. Una vez realizada la preparación, primero se introdujo en el instrumento de RMN (Varian, EEUU) una muestra de la PD-1 marcada con N^{15} sin complejar a modo de blanco, para observar sus picos en estado puro. Para ello, se cogieron 500 μL de una solución de concentración 0.1 mM y se insertó en el dispositivo de RMN. Posteriormente, se realizó el mismo ensayo de RMN para la proteína conjugada con los tres péptidos que mostraron mayor afinidad del ensayo de MST para observar qué aminoácidos de la proteína sufren más cambios debido a la interacción.



Figura 9. Ejemplo de dispositivo necesario para realizar la resonancia magnética nuclear de proteínas [53].

Por último, se compararon los picos obtenidos mediante el software Topspin (Bruker, Reino Unido). Mediante este se solaparon los espectros y se evaluaron las diferencias significativas existentes entre ellos. Para ello, se realizó una comparación de la intensidad relativa de los picos de los espectros obtenidos mediante los péptidos conjugados con PD-1, con las intensidades de los mismos picos en el espectro de PD-1 sin conjugar, esto se realizó mediante Excel. Se evaluó si estos aumentaron o disminuyeron de intensidad, desaparecieron o si aparecieron nuevos debido a la interacción entre proteína y péptido. Esta comparación se realizó con cada uno de los espectros de las interacciones de los tres péptidos. Para la interpretación de los espectros RMN, se usó como base la muestra pura sin interaccionar, habiendo añadido todos los picos que no se podían distinguir mediante la comparación con el espectro de PD-1 de estudio anteriores de RMN [3]. A partir de esta comparación también se relacionó cada uno de los picos del espectro obtenido con los aminoácidos de la proteína.

Aquellos picos que presentaron una variación respecto a la referencia se anotaron y se estableció la relación entre el desplazamiento químico (ppm) y la intensidad. Además se calculó el valor del Chemical Shift Perturbation (CSP), descrito por la fórmula 4, el cual es útil para medir el desplazamiento relativo de los picos que representan a cada aminoácido, donde H es la altura del pico y N la posición relativa.

$$\text{CSP} = \sqrt{\Delta H^2 + \left(\frac{\Delta N}{5}\right)^2} \quad (4)$$

Los aminoácidos que sufrieron variaciones se representaron en la estructura 3D de la proteína utilizando el software PyMOL (Schrödinger, Alemania). Este nos permitió visualizar en que zonas de las proteínas se veían estas variaciones y en qué lugar de la interacción se encontraban. Para ello, se cargó la proteína en dicho programa y se hicieron visibles los aminoácidos que variaron de intensidad, aparecieron o desaparecieron.

6. Resultados

6.1 Expresión y purificación de hPD-1 en *E. coli*

Tanto la transformación de las bacterias como la preparación de los cultivos se llevaron a cabo con éxito y sin ningún contratiempo. La evaluación de estos procesos se realizó en la fase de purificación. Una vez llevada a cabo la expresión de hPD-1 se analizó el resultado de forma cualitativa y cuantitativa. Para ello, se realizó el ensayo SDS-PAGE de diferentes fracciones obtenidas durante la purificación.

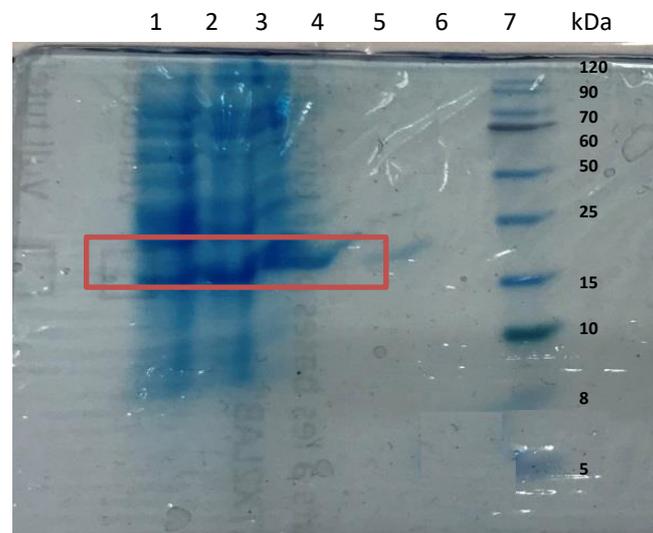


Figura 10. Gel de electroforesis resultado de la SDS-PAGE.

En la figura 10, se muestra el resultado del proceso de la SDS-PAGE. En este se ven las bandas resultado de las muestras de: purificado del medio LB (columna 1) y del medio mínimo (columna 2), tampón de diálisis de la proteína dializada del LB (columna 3), la proteína purificada pura (columna 4), líquido filtrado de centrifugas del medio LB (columna 5) y del medio mínimo (columna 6) y el marcador de peso molecular (columna 7). Al comparar las bandas presentes en la columna de proteína pura (4) con las demás, vemos que tanto en la columna 1 como en la 2 se puede observar la misma banda, lo que indicaría que la proteína está presente. En la columna 3 también se observa una banda cercana a esa altura, a diferencia de las columnas 5 y 6 que no presentan ninguna banda. Debido a que los resultados no fueron muy claros por una mala producción del gel de electroforesis, se llevó a cabo otra técnica más precisa para la confirmación.

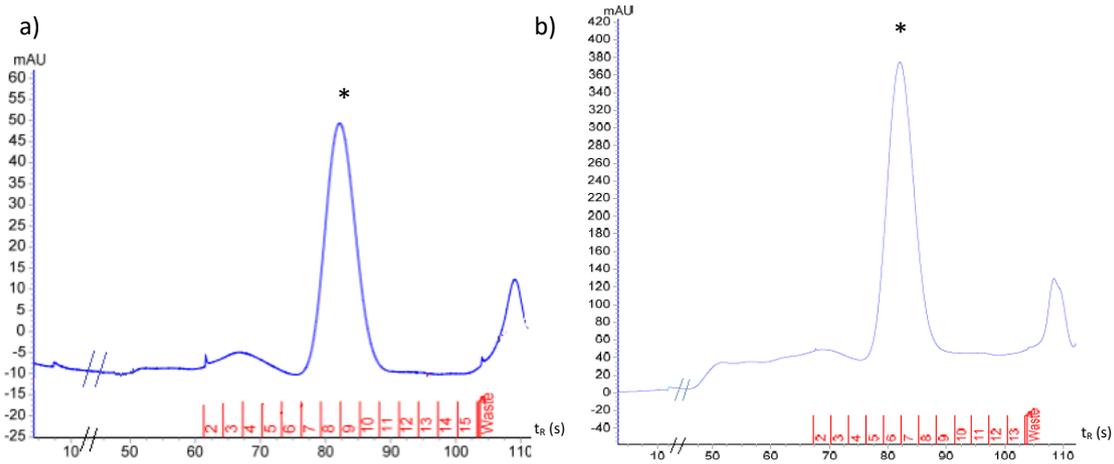


Figura 11. Cromatograma de purificación por cromatografía de exclusión molecular (280nm) de las muestras obtenidas a partir del medio LB (a) y del medio mínimo (b).

Mediante la cromatografía de exclusión molecular se pudo obtener una muestra más pura y concentrada de la proteína PD-1. En la figura 11, se muestran los cromatogramas producidos durante las eluciones de las muestras de la columna medidos a 280 nm. Las fracciones donde se observaron los picos proteicos (*) fueron las escogidas para continuar los ensayos, siendo de la 7 a la 11 en el medio LB y de la 5 a la 9 en el medio mínimo.

Para corroborar que la proteína obtenida fuese PD-1 también se usó el LC-MS. Este análisis se realizó exclusivamente de las fracciones anteriormente descritas, sus resultados se muestran en la figura 12a. Se analizó, una muestra de proteína producida a través del medio LB (1), una del medio mínimo (2) y una de proteína PD-1 pura (c). Mediante este ensayo se obtuvo de cada muestra un cromatograma UV (medido a 220 nm) y un cromatograma y un espectro de masas.

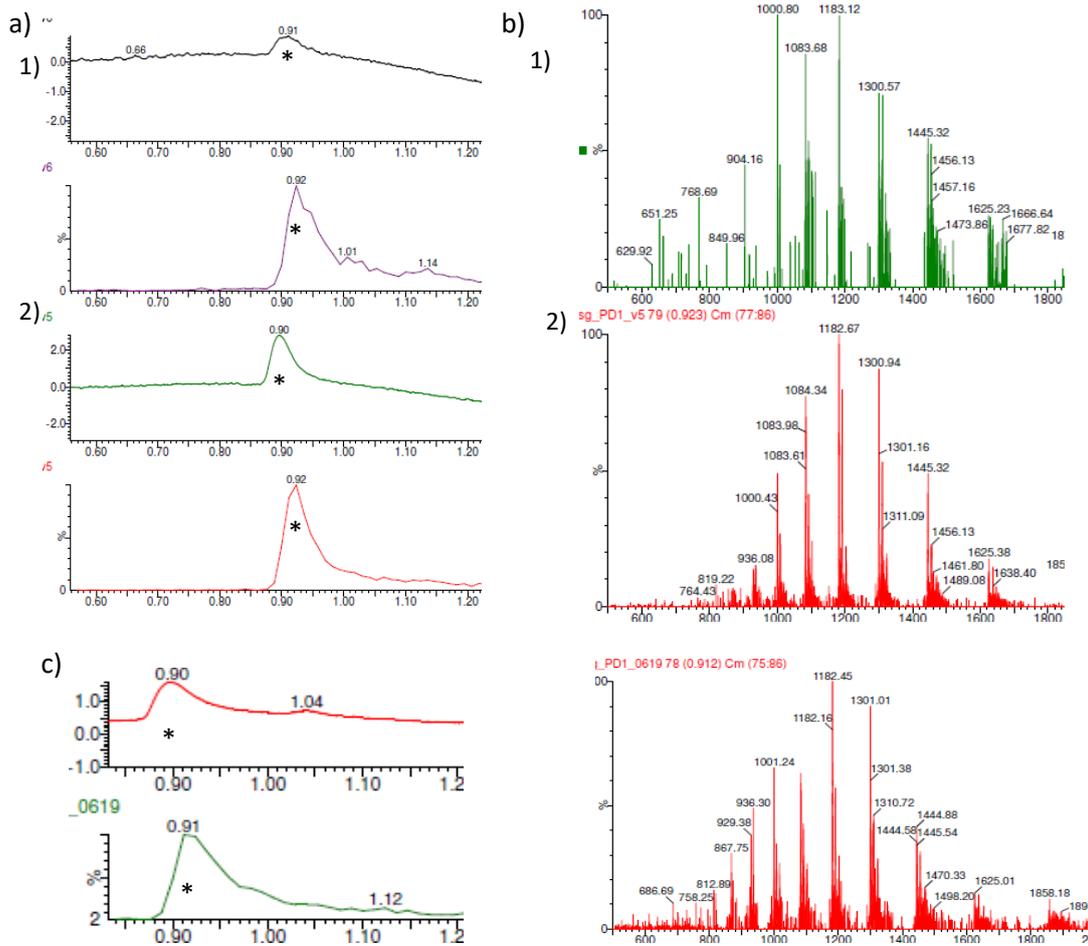


Figura 12. a) Cromatograma de UV (fila 1) y de masas (fila 2) obtenida del medio LB (1) y del medio mínimo (2). b) Espectro de masas de la proteína obtenida del medio LB (1) y del medio mínimo (2). c) Cromatogramas de UV (fila 1) y de masas (fila 2) y espectro de la proteína PD-1 pura.

Los picos obtenidos de las muestras se compararon con los obtenidos en el espectro de la proteína PD-1 pura para corroborar si se trata de la misma. En la figura 12a y 12c se muestra que en los cromatogramas UV (situados siempre en la parte superior de las figuras) de ambas muestras existe un pico que sobresale a la altura alrededor de 0.9 minutos, mientras que en cromatograma de masas destaca un pico alrededor de 0.92 minutos. Ambos picos se encuentran en posiciones muy similares en los cromatogramas obtenidos de la proteína PD-1 pura. Observando la figura 12b y 12c se puede ver la similitud existente entre la disposición de los picos del espectro de masas de las dos muestras analizadas. Se usó la herramienta ESiprot [42] para realizar la deconvolución del espectro, conocer la masa molecular de la proteína encontrada y, posteriormente, compararla con la teórica de PD-1. Mediante la deconvolución se obtuvo una masa molecular de alrededor de 13 kDa para ambas muestras obtenidas, dando el resultado presentado en la figura 13.

m/z	charge	MW [Da]	Error [Da]
936.08	14+	13091.016520119	80.31496859684
1000.43	13+	12992.493911539	-18.20763998306
1084.34	12+	12999.991302959	-10.710248562962
1182.67	11+	12998.288694379	-12.412857142859
1300.94	10+	12999.326085799	-11.37546572276
1445.32	9+	12998.813477219	-11.888074302662
1625.38	8+	12994.980868639	-15.72068288256

Deconvoluted MW [Da]: 13010.701551522
Standard deviation [Da]: 35.51682273356

Figura 13. Deconvolución del espectro de masas de la muestra.

Por lo que respecta a la cuantificación de PD-1, se usó el Nanodrop. Por ello, se midió la absorbancia a 280 nm de las dos muestras, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. En el caso de la proteína realizada a partir de medio mínimo, es decir la proteína marcada, la absorbancia fue de 0.034, mientras que para la proteína del medio LB fue de 0.108. Con estos resultados y aplicando la fórmula 3, descrita en la metodología, se obtuvo unas concentraciones de 39.5 μM y 104 μM respectivamente.

Tabla 2. Resumen de las absorbancias y concentraciones de PD-1 de los dos medios.

	ABS (280nm)	[PD-1] (μM)
Medio mínimo	0.034	39.5
Medio LB	0.108	104

6.2 Termoforesis a Microescala (MST)

Uno de los primeros pasos para llevar a cabo esta técnica, fue la unión del fluoróforo Alexa Fluor 647 NHS Ester a PD-1 para poder detectar su migración en el gradiente de temperatura aplicado por la máquina. Una vez hechos reaccionar, para conocer si realmente se había completado el proceso, se evaluó la presencia del complejo a 90 y 215 minutos. Para ello, se realizó una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), los resultados del ensayo se muestran en la figura 14. Para conocer la proporción de complejo formado se compararon los cromatogramas de PD-1 con los tomados en las muestras.

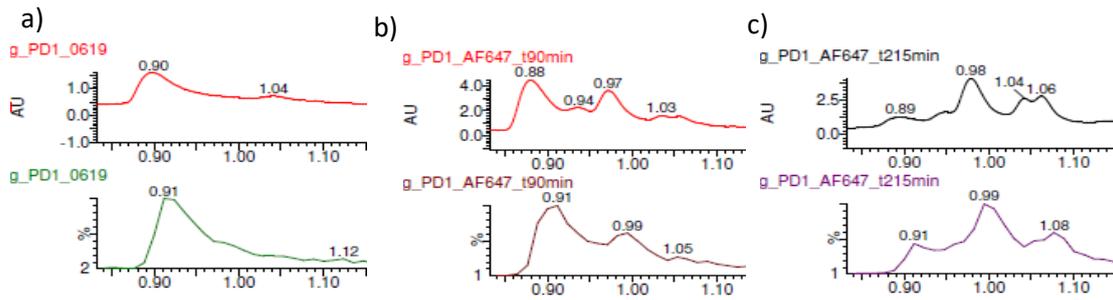


Figura 14. Cromatograma UV (fila 1) y de masas (fila 2) de la proteína PD-1 pura (a) y de la muestra a 90 (b) y a 120 minutos de reacción(c).

Como se observa en la figura 14 los picos pertenecientes a la proteína PD-1 pura se encuentran a 0.90 y 0.91 min en los cromatogramas de UV y de masas respectivamente (a). Estos picos se ven reducidos a los 90 min y son casi inexistentes a los 215 min. Por otra parte, aparecen unos nuevos picos a 0.97 y a 1.03 min en el cromatograma de UV y otros dos a 0.99 y 1.05 min en los cromatogramas de masas a los 90 minutos. Estos 4 últimos picos se ven aumentados a los 215 minutos.

Una vez ya se retiraron los restos de fluoróforo de la muestra mediante la PD-minitrap G25, se volvió a calcular la concentración de proteína unida a fluoróforo final con la que se contó para realizar el ensayo. Para medir esta concentración, se utilizó el Nanodrop, con el que se midieron las absorbancias de las muestras a 280 y 650 nm. Las absorbancias obtenidas para 280 y 650 nm fueron de 0.018 y 0.3 respectivamente. Mediante la aplicación de la fórmula 4, descrita en la metodología, se obtuvo una concentración de 81.2 μM .

Posteriormente se empezó con el ensayo de MST. Para llevarlo a cabo se comenzó con el pretest, con el que se evaluaron las condiciones óptimas para el ensayo y la validez del mismo. Además este nos permitió evaluar la precisión de la medida de afinidad mediante una comprobación del valor de la K_D de la unión de PD-1 con el mAb contra este receptor.

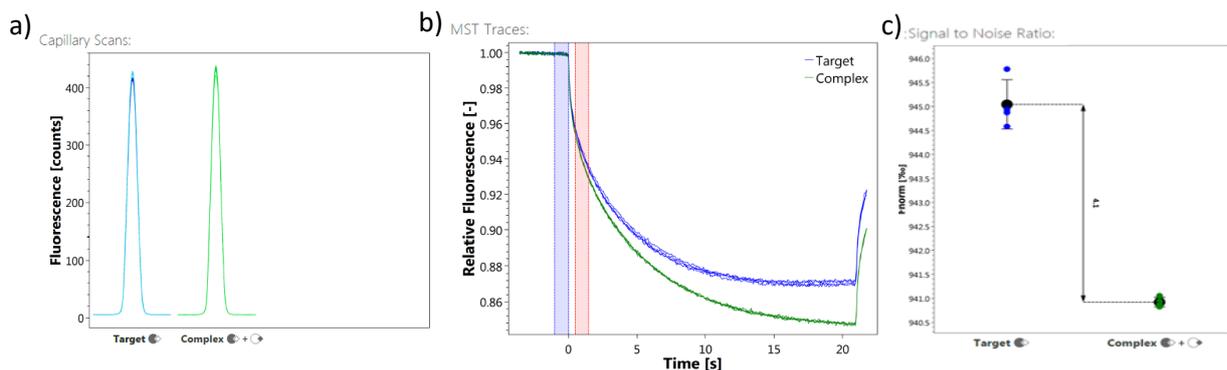


Figura 15. Resultado del pretest de las condiciones del ensayo MST para una muestra de 10nm de proteína fluorescente en PBS + 0.05% Tween testada contra mAb, en capilar normal. Escáner de capilares (a), análisis de los trazos de la termoforesis (b) y la ratio de señal (c).

En los resultados obtenidos en el escáner de capilares (figura 15a) se puede observar que la muestra testada se encuentra sobre los 450 puntos de fluorescencia. La figura 15b nos permite ver que los trazos de MST son limpios y que existe una diferencia entre los trazos de la proteína sin complejo y la complejada. Finalmente en la figura 15c destaca la variación de la

migración de la proteína en el gradiente de temperatura entre la proteína con y sin complejo (T-jump).

Una vez realizado el pretest y obtenidas las condiciones óptimas para el ensayo MST, se realizaron las evaluaciones de la afinidad de los 6 péptidos a evaluar (PD-i1-6) además del anticuerpo (mAb-antiPD1) y del propio ligando natural de la proteína, PDL-1.

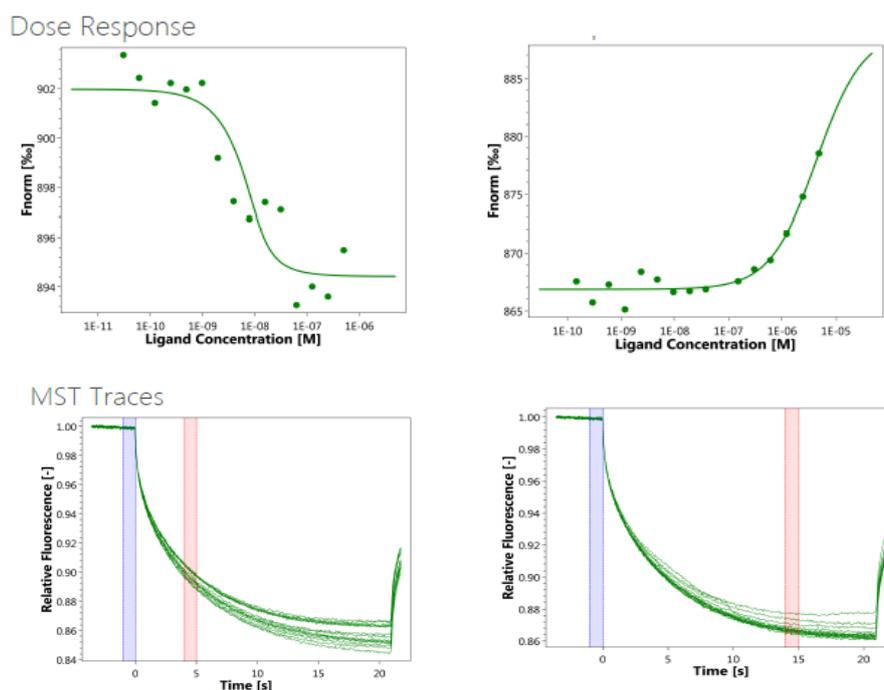


Figura 16. Gráficas de migración y termoforesis de mAb y PD-L1 respectivamente.

En los resultados obtenidos a partir de la unión de PD-1 con mAb y PD-L1, representados en la figura 16, podemos observar una curva sigmoidea en la representación del cambio de señal respecto a concentración (*Dose Response*) y unos trazos de MST limpios en el análisis de los trazos de la termoforesis. Se puede observar también que la curva sigmoidea presentada por el complejo PD-1/mAb es inversa a la del complejo PD-1/PD-L1. En cuanto a los péptidos PD-i1-PD-i6, presentados en la figura 17, se observan unas curvas sigmoideas bien ajustadas, excepto en el PD-i1. En el análisis de trazos de Termoforesis, todos los péptidos presentaron unos trazos limpios, a excepción de PD-i4 que presentó un trazo con líneas alteradas a altas concentraciones de complejo.

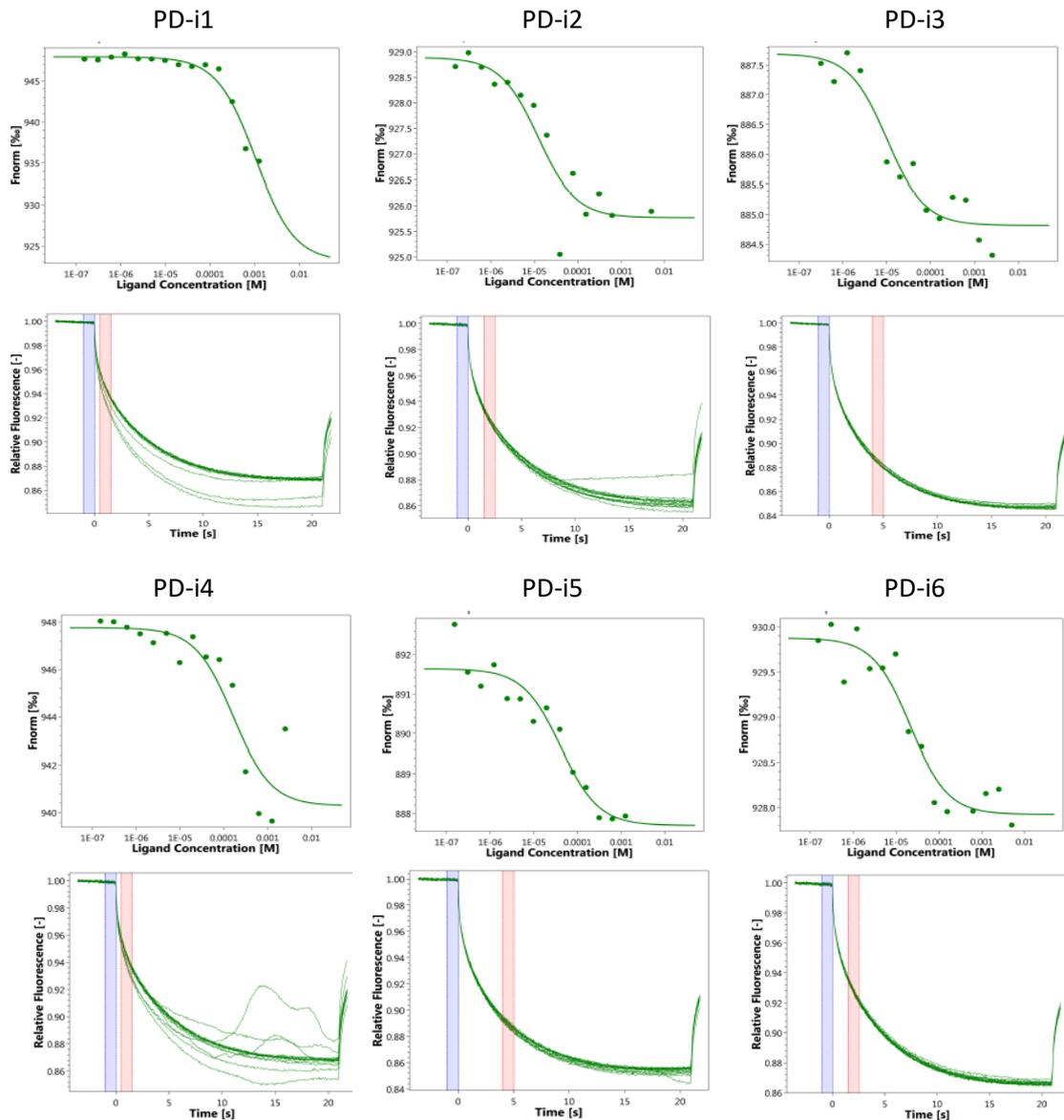


Figura 17. Graficas de migración y termoforesis de PD-i1-6.

Mediante estos ensayos se pudo obtener los valores de la K_D de cada uno de los péptidos, así como mAb y PD-L1, mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen de los valores obtenidos a partir del ensayo de MST.

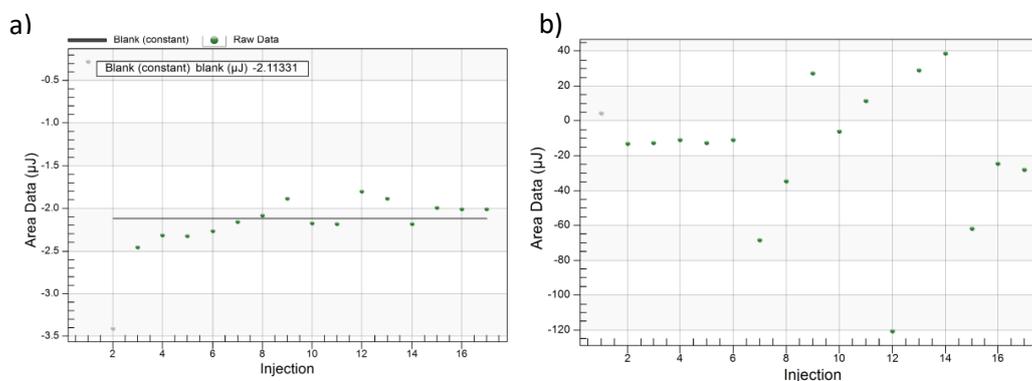
Nombre	Constante de disociación (K_D)(M)	Desviación Estándar de la K_D	Ruido de fondo
mAb	1.27E-09	$\pm 1.97E-09$	5.38
PD-L1	3.19E-06	$\pm 4.63E-06$	7.00
PD-i1	3.76E-04	$\pm 2.17 E-04$	8.06
PD-i2	3.70E-05	$\pm 4.93E-05$	1.82

PD-i3	2.95E-05	$\pm 3.93E-05$	2.44
PD-i4	1.90 E-04	$\pm 2.52E-04$	2.99
PD-i5	1.02E-05	$\pm 8.16E-06$	5.04
PD-i6	1.89E-05	$\pm 1.34E-05$	4.61

A partir de estos resultados, se escogieron los tres péptidos que menor K_D presentaron para seguir con los estudios de afinidad, estos fueron el PD-i3, PD-i5 y el PD-i6.

6.3 Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

A través de estos tres péptidos se llevó a cabo el ensayo ITC. Este método, al medir la variación de calor producida por la interacción y ser muy sensible, nos permitió tener otra visión de si se produce o no interacción y de su K_D . De este modo, se complementaron los resultados obtenidos mediante la termoforesis. Para su realización, primero se analizó un blanco y posteriormente los péptidos PD-i3, PD-i5 y PD-i6.



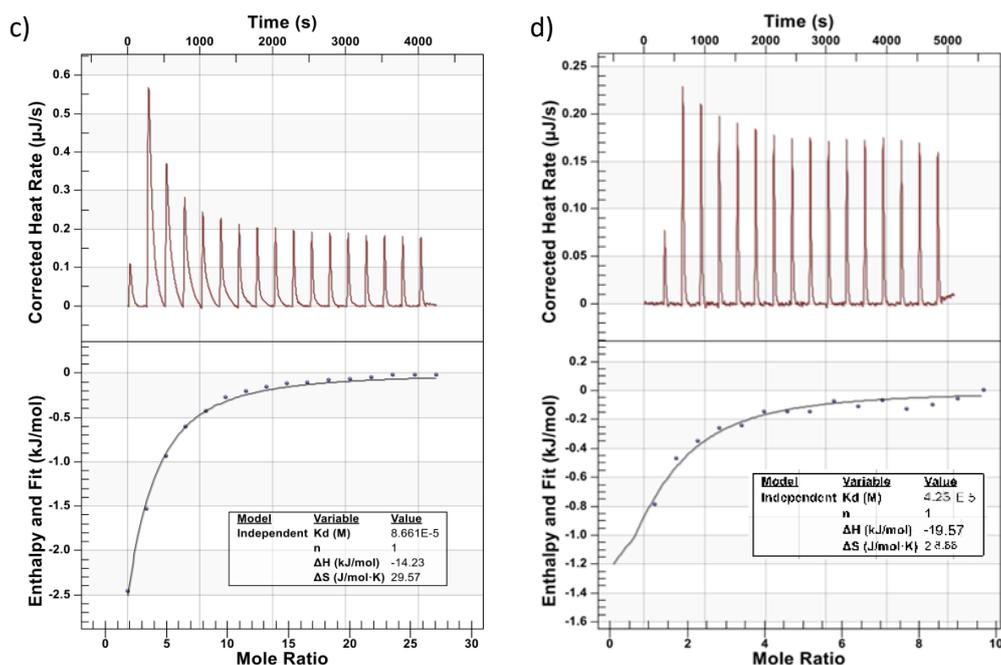


Figura 18. Representación de la variación de calor por adición de muestra: blanco (a), PD-i5 (b), PD-i3 (c) y PD-i6 (d).

Como se muestra en las figura 18, a través del péptido PD-i5 no pudo obtener una curva de calorimetría, ya que el resultado obtenido fue más similar al ensayo del blanco que al de un péptido. Por lo que respecta a PD-i3 y PD-i6, sí que presentaron una variación en la entalpia a medida que se aumentó la concentración de muestra, representado mediante sus curvas calorimétricas.

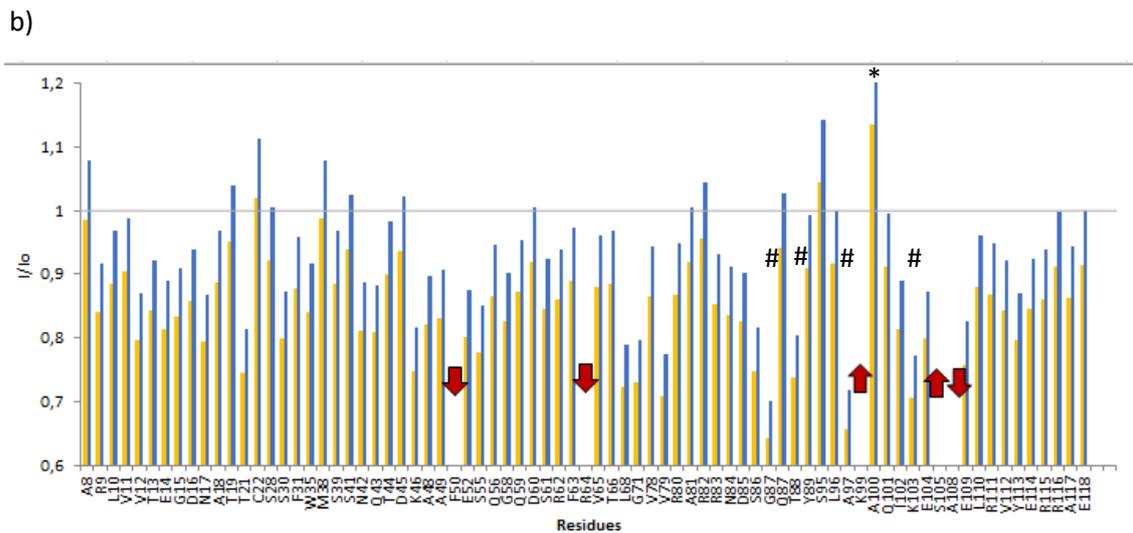
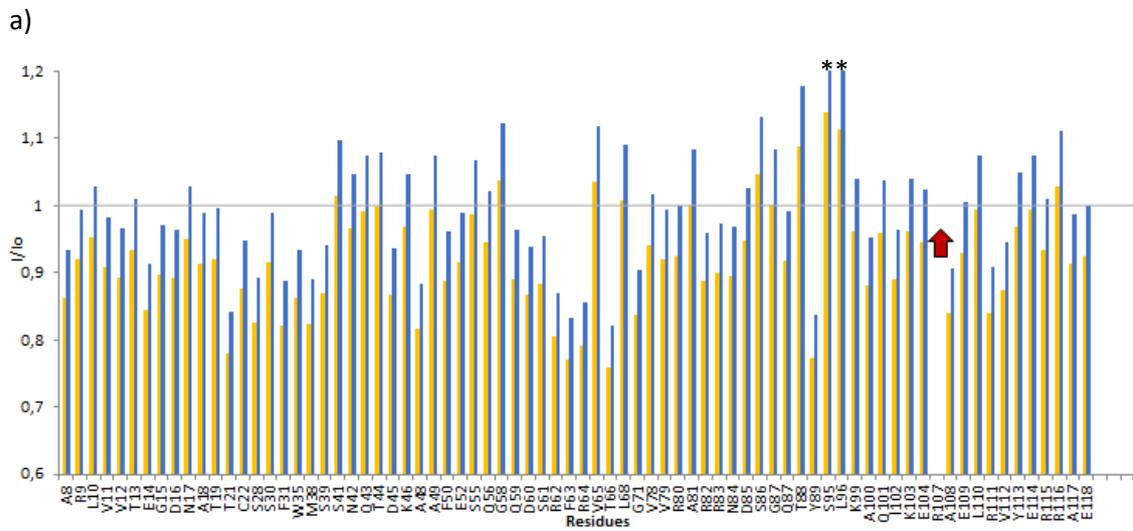
Mediante los datos obtenidos a partir de estos resultados se llevó a cabo la determinación de la K_D de cada uno de los tres péptidos y se compararon los resultados obtenidos con los de la MST, tabla 4.

Tabla 4. Comparación entre los valores de K_D obtenidas mediante MST y ITC.

Nombre	Constante de disociación (K_D)	
	MST (M)	ITC (M)
PD-i3	2.95E-05	8.67E-5
PD-i5	1.02E-05	-
PD-i6	1.88E-05	4.25E-5

6.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Una vez comprobada la afinidad de estos péptidos por la PD-1 se llevó a cabo la evaluación de las diferencias entre las uniones de cada uno de los péptidos. Es decir, en qué zonas interaccionan con la proteína PD-1 y cuáles son los cambios conformacionales que se dan durante esta interacción. Se evaluaron únicamente los tres péptidos que mejor resultado dieron en el ensayo MST, es decir, PD-i3, PD-i5 y PD-i6. A través de los espectros obtenidos de estos péptidos conjugados con PD-1 se realizaron gráficas comparativas de la intensidad de sus picos con respecto a PD-1 no conjugada, figura 19.



c)

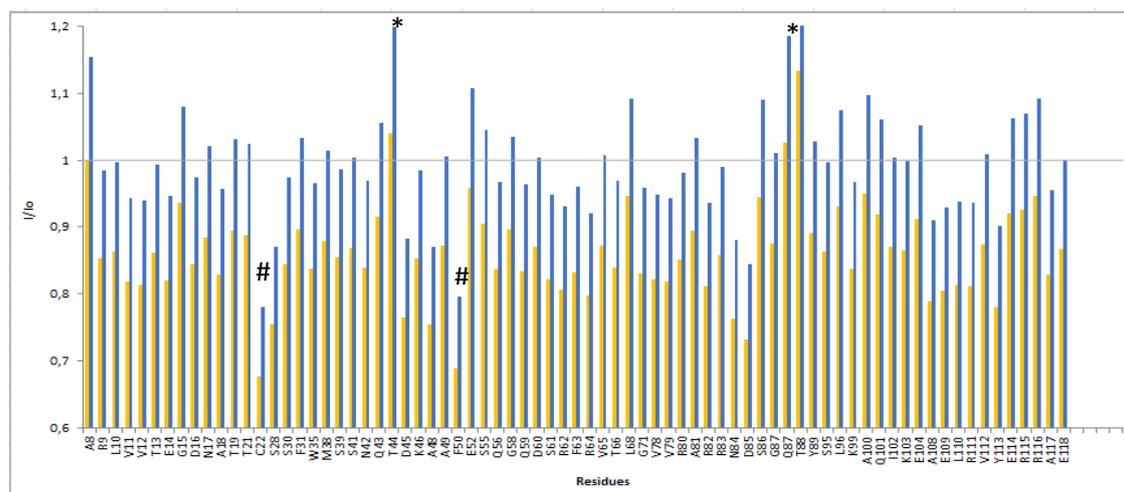


Figura 19. Gráficas de comparación de intensidad de los picos de PD-i3 (a), PD-i5 (b) y PD-i6 (c).

Mediante estas gráficas, figura 19, se puede observar los picos del espectro que aumentaron (*) o disminuyeron (#) de intensidad significativamente, desaparecieron (↓) o si aparecieron nuevos debido a la interacción entre proteína y péptido (↑). Las intensidades se presentan normalizadas respecto al mismo pico sin ligando (azul) y respecto al pico más alto del espectro de PD-1 sin ligando (amarillo).

Mediante las comparaciones establecidas en la figura 19, se pudo determinar cuáles son los cambios que se producen en los diferentes residuos debido a la interacciones del receptor PD-1 con cada uno de los péptidos, los resultados obtenidos se expresan en la tabla 5.

Tabla 5. Cambios producidos en los residuos como consecuencia de la interacción entre PD-1 y PD-i3, 5 y 6.

	Aumento de la intensidad del pico	Disminución de la intensidad del pico	Aparición de un nuevo pico	Desaparición de un pico
PD-1 +PD-i3	L96 y S95		R107	
PD-1 + PD-i5	A100	A97, G87, K103 y T88	S105 y K99	F50, R64 y A108
PD-1 + PD-i6	T44 y Q88	C22 y F50		

Posteriormente se usó el software PyMol para visualizar en qué zonas de las proteínas se veían estas variaciones y en qué lugar de la interacción se encontraban. Los residuos anteriormente nombrados se presentan en la figura 20 de la siguiente forma: los aumentos de la intensidad de pico en amarillo, la disminución en naranja, un nuevo pico en verde y una desaparición en color salmón.

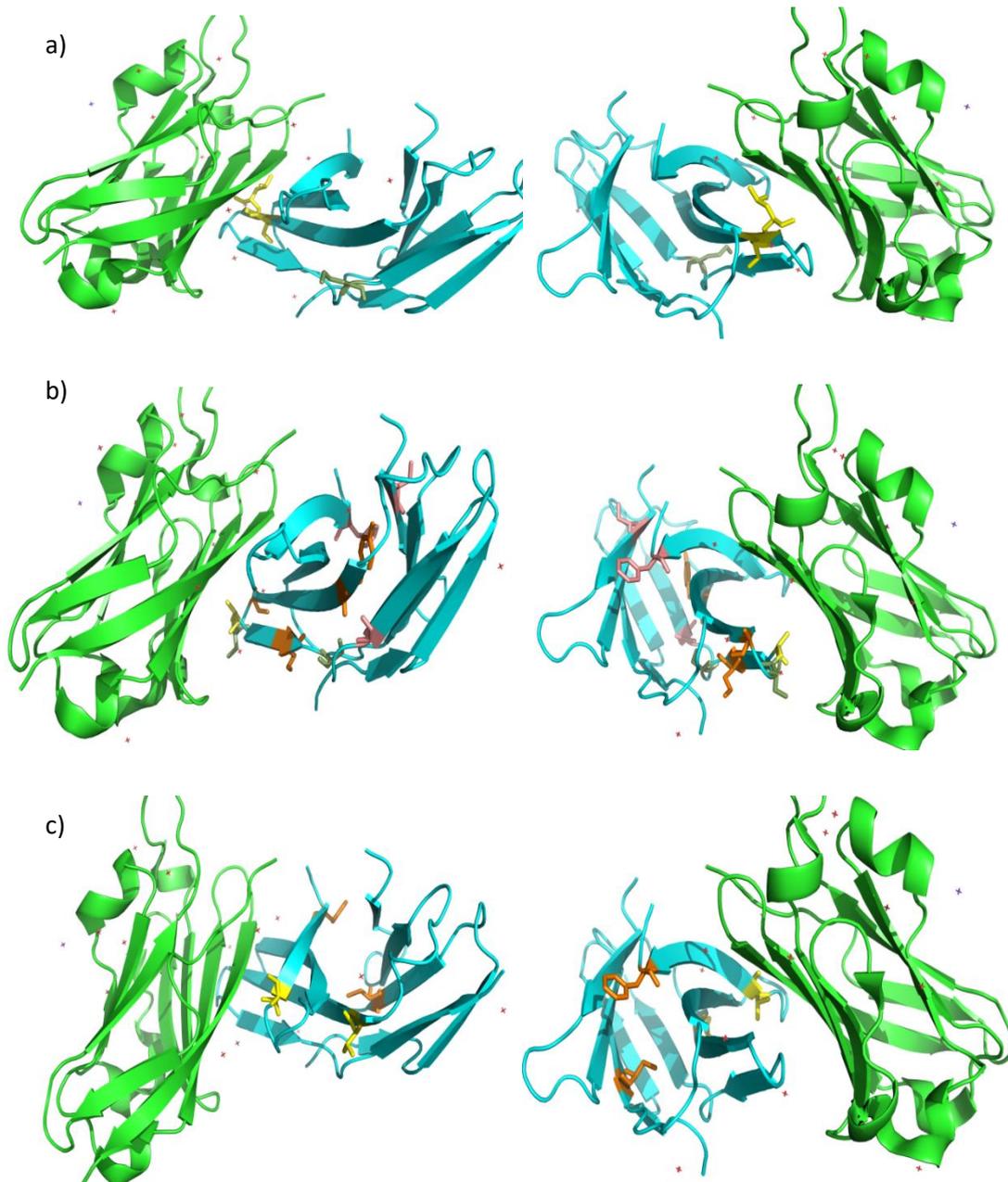


Figura 20. Representación de los residuos más afectados por la Interacción entre PD-1 (azul) con PD-i3 (a), PD-i5 (b) y PD-i6 (c).

De este modo, en la figura 20 se muestran los lugares de los aminoácidos que presentan una variación producida por la interacción entre la proteína PD-1 y los respectivos péptidos. Por tanto, nos permite observar su posición relativa respecto a la zona de interacción entre PD-1 y PD-L1.

7. Discusión

7.1 Expresión y purificación de hPD-1 en *E. coli*

La proteína PD-1, como ya hemos anticipado, se trata de una proteína extremadamente compleja, es por esto que tras su expresión recombinante presenta un plegamiento defectuoso o se encuentra sin plegar, siendo en esta forma insoluble. Por tanto, se tiene que llevar a cabo una exhaustiva purificación de la misma para conseguir que la proteína expresada tenga la estructura del receptor nativo y, por tanto, que los ensayos sean significativos [3]. Por este motivo, después de la expresión se llevaron a cabo los procesos de desnaturalización de la proteína expresada y plegamiento de la misma, para de esta forma conseguir su estructura nativa.

Para determinar el éxito de los procesos de expresión y purificación de la fracción extracelular de la proteína PD-1, se usaron diferentes ensayos. El primero fue la SDS-PAGE realizada justo después de la purificación. Mediante el resultado de esta, se puede distinguir que la columna de la proteína pura presenta una banda alrededor de 13 kDa, masa molecular de la PD-1 [39], lo que nos hace pensar que dicha banda corresponde a la proteína objetivo, figura 10. Tanto en la columna con la muestra extraída del medio LB como en la del medio mínimo destaca esta misma banda, lo que nos indica que la expresión de la proteína se llevó a cabo con éxito. También se puede ver esta banda en la columna de restos del tampón de diálisis, pero este hecho es debido a que la proteína corrió hacia la derecha por un defecto en el gel de electroforesis o un mal *running* del gel. Este gel defectuoso hizo que los carriles se juntaran haciendo que la proteína pasase a un carril donde no debía estar. De igual manera, como los resultados no fueron claros, se llevó a cabo otra técnica más precisa para la confirmación.

Posteriormente, se siguió con la purificación de las muestras mediante la cromatografía de exclusión molecular, la cual nos permitió eliminar las impurezas de la muestra con la proteína objetivo. Con esta técnica también se pudo conocer aspectos de la pureza y tamaño de PD-1, debido a que el tiempo de retención en una misma columna siempre debe ser el mismo para una misma proteína [46]. Al conocer la masa molecular de nuestra proteína se escogió este método por ser muy eficiente en este tipo de purificaciones.

Mediante el cromatograma de elución obtenido a través de esta técnica, se pudo observar un pico proteico elevado medido a 280 nm, esta absorbancia es importante ya que es aquella a la que emiten las proteínas, figura 11. Por tanto, este pico destacado en ambas muestras se espera que fuese producido por la proteína PD-1. Los tiempos de retención para esta proteína fueron similares en ambas muestras aplicadas al cromatógrafo, lo que nos confirmó que ambos picos están producidos por la misma proteína.

Una vez determinada la presencia de una proteína que posiblemente era PD-1 fue necesaria su confirmación. Con este fin, se realizó una detección por espectroscopia de masas (LC-MS) y una posterior comparación de los espectros resultante con espectros anteriores de la proteína PD-1 (figura 11). Este método nos permitió obtener información para determinar la estructura, el peso molecular, la identidad o la cantidad de átomos o moléculas [39]. El LC-MS suele verse

acoplado a un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) como primer paso de separación, y junto con este, conforma una de las técnicas más usadas para la identificación de péptidos y proteínas debido a su sensibilidad y facilidad de automatización [47].

Mediante la comparación de los espectros de la proteína pura y los de las dos muestras, se vio que los picos existentes coincidían con los de la proteína PD-1 pura. Esto se observó tanto en el lugar de aparición de los picos principales de los espectros de diodo (0.90 min) y masas (0.91 min) como la disposición de picos en el espectro de masas, figura 12. Por tanto, se pudo confirmar que la proteína en las muestras era PD-1. Para corroborarlo, se realizó la deconvolución de los picos obtenidos del espectro de masas, figura 13, que nos indicó que la masa molecular de la proteína que se encontraba en las dos muestras era de 13 kDa, lo que confirmo que esta proteína era PD-1.

Para concluir con el análisis de los resultados obtenidos de la expresión y purificación, se calculó la concentración de la proteína obtenida a través del Nanodrop. Se concluyó que la concentración conseguida fue de 104 μM y 39 μM de proteína sin marcar y marcada con ^{15}N respectivamente. Por tanto, se pudo determinar que la expresión de esta proteína fue muy eficiente [38]. Esto permitió realizar los siguientes experimentos e incluso hubo para los ensayos posteriores que se pudieran hacer.

De esta manera se pudo establecer mediante la espectroscopia de masas la presencia de esta proteína, con una conformación similar o igual a la nativa. Y, mediante el Nanodrop, que la concentración obtenida fue satisfactoria. Esto nos permite corroborar y validar que mediante la metodología utilizada para la expresión y la purificación de la proteína hPD-1 se obtienen una concentración elevada de este receptor en su conformación nativa.

7.2 Termoforesis a Microescala (MST)

El ensayo MST se llevó a cabo con el objetivo de determinar si realmente alguno de los péptidos diseñados era capaz de unirse al receptor y, por tanto, evitar la unión de los receptores que evita la respuesta inmune.

Para realizarla, primero se llevó a cabo la unión de PD-1 con Alexa Fluor 647[®] para su posterior detección. El marcaje mediante este fluoróforo se comprobó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se evaluó la reacción tanto a 90 como a 215 minutos. Se pudo ver cómo, a medida que pasaba el tiempo, bajaba el pico característico de PD-1 a 0.9 min del cromatograma UV y aumentaban un pico sobre 0.99 y 1.05 min, figura 14. Esto es debido a que la adición de una molécula de Alexa Fluor aumenta la masa de la proteína, con lo que se formara este pico a 0.99 min. Por otra parte, si son dos las moléculas de fluoróforo que se han unido a las aminas de la proteína dará el pico a 1.05 min. En este espectro se puede ver también que la reacción de unión de Alexa Fluor con PD-1 a los 90 minutos no se ha completado, pero que casi ha concluido a los 215 minutos.

Posteriormente, mediante Nanodrop, se midió la concentración de la proteína marcada que tendremos, que resultó de 81 μM . Esta es una concentración muy alta para el ensayo MST, por

lo tanto, mediante este protocolo se consiguió una gran cantidad de proteína, que entonces sí se pudo usar en la termoforesis.

Antes de iniciar el experimento, se llevó a cabo el pretest, figura 15. Mediante este se determinó que la proteína marcada con Alexa Fluor era un buen método para esta técnica ya que producía una fluorescencia alta. Tras la dilución de la proteína a 10 mM, se obtuvieron 450 unidades de fluorescencia, como se observa en el escáner de capilares, y de esta manera se ubicó entre los valores de 200-1000, óptimos para esta técnica [48]. Se determinó también que el láser idóneo para irradiar este fluoróforo era el rojo, y que la intensidad del 70% daba las unidades de fluorescencia requeridas. Estas dos últimas comprobaciones son unos procedimientos que hace el Monolith NT.115 automáticamente. Se estableció que los capilares *standard* eran los correctos para el ensayo debido a que no se observaron perturbaciones en el análisis de los trazos de MST. Estas perturbaciones suelen ser causadas por la agregación producida por la proteína al tener problemas para separarse de las paredes. Precisamente por no presentar esta agregación, se pudo concluir que el tampón PBS + 0.05% Tween también fue el idóneo para el ensayo y que no producía interferencias en las medidas. Este se testó por ser el más usado en ensayos MST [45]. Finalmente, mediante el gráfico de ratio de señal, se estableció que sí que se producía una diferencia significativa en la migración de la proteína con y sin el anticuerpo anti-PD-1 en el gradiente de temperatura. Esto nos sirvió como control positivo para validar el método debido a que detectó la interacción entre dos componentes que presentan afinidad. También nos permitió garantizar que la proteína es apta para ser usada en este método ya que detecto la migración, por tanto, el marcaje fue correcto y la proteína presenta el plegamiento correcto.

Una vez validada la técnica se realizó la MST para el anticuerpo anti-mAb, el ligando natural de PD-1 (PD-L1) y los 6 péptidos diseñados por el grupo "*Design, Synthesis and Structure of Peptides and Proteins*" para interactuar con PD-1 (PD-i1- PD-i6). El resultado de la MST se muestra con una gráfica de migración respecto a la concentración y los datos en crudo de evolución de la fluorescencia respecto al tiempo, figuras 16 y 17. Mediante la primera se puede observar la curva sigmoidea típica de este ensayo, que nos permitió conocer sus K_D , mientras que con la segunda se vio la fiabilidad en el ensayo, es decir, si existieron anomalías en la medida, como por ejemplo la agregación proteica o el ruido de fondo [32].

Respecto al resultado de la afinidad del anticuerpo anti-PD-1 (tabla 3), como era de esperar presento una gran afinidad, $K_D = 1.3 \text{ nM} \pm 2.0 \text{ nM}$. De igual manera se obtuvo una buena afinidad, aunque menor que para el mAb, en el ligando natural PD-L1 ($K_D = 3.2 \text{ } \mu\text{M} \pm 4.6 \text{ } \mu\text{M}$) sin presentar una curva tan perfecta debido a un fallo en el último capilar, en el que se produjo agregación. Este es un hecho común a concentraciones elevadas [45], aun así se contó con suficientes puntos como para trazar la curva y obtener su K_D con un ruido de fondo no muy elevado. En este caso la curva sigmoidea se obtuvo al revés que en la del anticuerpo, esto es debido a que en función del tipo de interacción entre las moléculas se realizará una migración u otra, pero esto no afecta al cálculo de la K_D [49].

En cuanto a los péptidos de PD-i1 a PD-i6 únicamente PD-i1 presento una curva sigmoidea no muy bien ajustada debido a la falta de más puntos a concentración alta, que permitirían poder establecer la variación de migración correctamente, figura 17. El análisis de trazos nos confirmó que no hubo perturbaciones en las medidas a excepción de PD-i4, el cual presentó agregación a altas concentraciones y, en consecuencia, su ruido de fondo fue mayor.

De entre los valores de K_D de los péptidos testados, destacaron los obtenidos por PD-i3, PD-i5 y PD-i6 ($29.5 \mu\text{M} \pm 39.3 \mu\text{M}$, $10.2 \mu\text{M} \pm 8.2 \mu\text{M}$ y $18.9 \mu\text{M} \pm 13.4 \mu\text{M}$ respectivamente). Estos péptidos resaltan respecto a los demás debido a que son los que obtuvieron unas K_D más bajas. Por tanto, son aquellos que producirán una unión con el ligando a menor concentración [30], es decir, se necesitará una menor cantidad de ellos para evitar la interacción entre PD-1 y PD-L1. Por este motivo, estos tres péptidos fueron los que se establecieron como aquellos a testar en los siguientes ensayos de ITC y RMN.

Los valores obtenidos para las K_D de estos tres péptidos fueron muy positivos, pero presentaron una desviación estándar de igual rango. Este hecho se da, debido a que al ser valores tan pequeños existe gran variación. Por otra parte, aun asumiendo esta baja confianza, los valores destacan como prometedores al tener una afinidad de solo un factor de 10 menor que el ligando natural. Respecto al anticuerpo anti-PD-1, sí que se observó una diferencia mayor, ya que este tiene una afinidad por PD-1 1000 veces superior al de los péptidos testados. Pero en este caso hay que considerar las posibles ventajas de usar péptidos en lugar de anticuerpos nombradas en la introducción. Entre estas ventajas destacan la posibilidad de los péptidos de entrar en la masa tumoral, por tener un menor tamaño, o el menor precio de fabricación, al poder industrializarse su producción [20]. Como conclusión de este ensayo, se podría asumir que los péptidos destacados tendrían una afinidad suficiente como para interponerse entre la interacción de PD-1 y PD-L1 al contar con unos valores de K_D en un rango cercano al valor del ligando natural de PD-1.

Mediante estos resultados también se puede destacar que los dos péptidos obtenidos mediante el último mecanismo de diseño de péptidos estuvieron entre los que mejor K_D obtuvieron. Este método, como se explicaba en la introducción, se basó en la interacción de residuos de cadena lateral grandes con la lámina GFCC' de PD-1 [28]. Por tanto, se pudo establecer este protocolo como prometedor y ventajoso respecto a los otros métodos de diseño de péptidos, al menos en el caso de péptidos diseñados para interaccionar con PD-1.

7.3 Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

La calorimetría de titulación isotérmica, nos informa de la presencia de unión entre las moléculas mediante el estudio de la transferencia de calor que se produce durante la formación de los enlaces de la interacción de dos moléculas [34]. Con la ITC se pretendió confirmar los datos obtenidos mediante el ensayo MST. En este ensayo solo se testaron los tres péptidos que mayor K_D tuvieron en la MST debido a que esta técnica requiere de concentraciones elevadas de ligando y proteína y presenta una mayor complejidad llevarla a cabo por su sensibilidad. A causa de esta sensibilidad, incluso una pequeña perturbación mediante un mal procedimiento o manejo puede llevar a un resultado alterado. Esto se pudo observar en que incluso los blanco realizados al comienzo de la ITC presentaron variación de medida a medida, que pudo ser debida incluso a diferencias ínfimas en la concentración del tampón añadida por etapa. Por este motivo, se llevaron a cabo todas las medidas oportunas para evitar esta variabilidad (explicado en material y métodos) y aun así los resultados no fueron perfectos.

Como se muestra en la figura 18, únicamente se pudo obtener resultados significativos de los péptidos PD-i3 y PD-i6. En el caso del PD-i5 no se obtuvo un resultado valido, de esta manera no se pudo obtener una K_D de este péptido mediante esta técnica. Este resultado puede ser

debido a que los cambios de calor no fueron suficientemente grandes como para ser representados por este método. Por otra parte, también se ha visto que en esta técnica los resultados pueden ser enmascarados por el disolvente [50].

Por lo que respecta a resultados que sí que son significativos, se puede apreciar cómo en los péptidos PD-i3 y PD-i6 sí que se pudieron obtener curvas calorimétricas a partir de sus resultados. Esto nos permite establecer que se está produciendo interacciones entre los péptido y la proteína PD-1 [49]. Se puede observar también como en cada adición del péptido aumenta el calor intercambiado debido a esta interacción y la formación de enlaces. Mediante esta curva se pudo determinar que la K_D es de 86.7 μM para PD-i3 y 42.5 μM para PD-i6.

Una vez realizados ambos ensayos se pudieron comparar los resultados obtenidos de las K_D mediante los dos métodos. Respecto al péptido PD-i3 se obtuvo una K_D mayor en el ensayo ITC respecto al de la MST, 60 μM de diferencia, estando los dos valores en el mismo rango (μM). Esto nos indica que los dos métodos dan valores muy similares, por tanto, se consideró validado este valor de K_D . De igual modo ocurrió en el péptido PD-i6, en el que la diferencia entre ambos valores fue incluso más baja, 30 μM , por tanto la validación también se extendió a este. El péptido PD-i5, es el que mejor K_D obtuvo basándonos únicamente en los resultados obtenidos mediante la MST. En cambio, para este péptido no se pudo obtener el resultado mediante el ensayo ITC, de modo que sería necesario otro método para acabar de realizar la confirmación de este valor de K_D como válido. De igual manera los péptidos PD-i3 y PD-i6 en el ensayo MST presentaron K_D no muy superiores a PD-i5, alrededor de 15 μM , por lo que estos también serían buenos candidatos para continuar con la investigación para evitar la inmunosupresión producida por la interacción PD-1/PDL-1.

7.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

A través de esta técnica se pretendió conocer cómo se producía la interacción de la proteína y el péptido. Además también nos permitió buscar aquellos cambios en la conformación del lugar de unión de PD-1 que relacione las K_D de cada uno de los péptidos destacados PD-i3, PD-i5 y PD-i6 con el receptor PD-1. Esto se llevó a cabo mediante la comparación de los resultados de los espectros de RMN obtenidos de la interacción de cada uno de los péptidos con PD-1 y el de esta proteína pura no complejada [3]. De este modo, los aminoácidos cuyos picos en el espectro varíen su intensidad, aparezcan o desaparezcan serán aquellos que se verán afectados por la interacción del péptido con PD-1 y, por tanto, serán candidatos tener un papel principal en esta unión. La aparición o desaparición de estos picos es causada por el aumento o disminuido de la intensidad de un pico que, con este cambio de intensidad, superó o descendió sobre el valor límite para que el pico sea tenido en cuenta [37].

De este modo, como se observa en la figura 19, en la interacción de PD-1 con PD-i3 se produce la aparición de un nuevo pico en el espectro y el aumento de la intensidad del pico de otros dos (tabla 5). Como se ve en la figura 20, dónde se muestra la posición en la proteína PD-1 de estos cambios, el aminoácido que ha aparecido se encuentra lejos de la zona de interacción con el péptido. La aparición de este puede ser debida a una reorganización de la estructura proteica a causa de la propia interacción. Contrariamente, los dos aminoácidos que han aumentado de intensidad (L96 y S95) sí que se encuentran muy cerca una de la otra y justo en

la zona de interacción. Por tanto, estos dos aminoácidos pueden ser responsables de la interacción con el péptido en cuestión.

Por lo que respecta a la interacción entre PD-1 y el péptido PD-i5, se pudieron ver 2 aumentos de intensidad, 4 disminuciones de la misma, dos apariciones de picos y 3 desapariciones (tabla 5). La gran cantidad de cambios conformacionales presentes en esta interacción destacó entre los péptidos testados por ser el que mayor variación producía en la estructura de PD-1 sin complejar. Viendo su interacción de una manera estructural, las desapariciones se ubican en posiciones bastante alejadas del lugar de interacción, por tanto, no son claves o son derivadas del cambio estructural de los demás aminoácidos. De igual manera, esto también se ve en la mayoría de las disminuciones de intensidad y la aparición del pico del aminoácido S105. Aquellos que se ubican en la zona de interacción representan la disminución de la intensidad del pico de A97 y K103, la aparición del nuevo pico en K99 y el aumento de intensidad de A100. Esos son los candidatos más probables para ser residuos clave en la interacción PD-1/PD-i5.

Finalmente, la interacción entre el péptido PD-i6 y PD-1 produjo un aumento de la intensidad de dos picos y la disminución de otros dos (tabla 5). En este caso, el aumento de la intensidad del aminoácido T44 es el único candidato clave en la interacción por su localización en la estructura. Esto se supuso debido a que los demás residuos se direccionan hacia las zonas interiores de la proteína, por tanto, no pueden ser los principales en la interacción de PD-1/PD-i6.

Las diferencias entre los cambios en los espectros de PD-1 producidas al interactuar con los péptidos testados son debidas a que estos fueron diseñados de diferentes maneras como se explica en la introducción y, por tanto, esta interacción no es exactamente igual. Por eso a pesar de que todos están dirigidos a PD-1 presentan estas variaciones en función del mecanismo usado para su diseño y como este afecta a la interacción.

En resumen, aquellos residuos que podrían tener una relevancia especial en sus interacciones con PD-i3, PD-i5 y PD-i6 son: L96 y S95; A97, K103, K99 y A100 y T44 respectivamente. Estos resultados también muestran que la interacción de PD-1 con PD-i5 hace que se produzcan una mayor cantidad de variaciones en la conformación de PD-1. Esto se podría correlacionar con el ensayo MST, en el que se ha observado como este es el péptido que menor K_D y, por tanto, mayor afinidad presentó en el ensayo MST. Estos resultados podrían dar a entender una dependencia de estos cambios de conformación con una mayor afinidad entre los ligandos.

8. Conclusiones

La expresión de la fracción extracelular de la proteína de muerte celular programada, PD-1, mediante el vector diseñado para *E. coli* ha conseguido una concentración de proteína suficiente para la realización de los ensayos a realizar, e incluso para posteriores. También se puede concluir que la proteína PD-1 obtenida fue de alta pureza, como se demostró en los resultados obtenidos a partir de la misma. Esto indica que el proceso de purificación y plegamiento de la proteína fue eficaz y, por tanto, se puede validar su uso para futuras aplicaciones.

La Termoforesis a Microescala (MST) y Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) realizados para evaluar la interacción de los péptidos PD-i1- PD-i6 con PD-1 y determinar su constante de disociación fue muy satisfactoria. La MST se validó como un método sencillo, que necesita poca cantidad de muestra y muy sensible para la determinación de interacciones con esta proteína. Por lo que respecta a los resultados obtenidos, se obtuvieron afinidades de un rango únicamente 10 veces inferior al ligando natural, en el caso de los péptidos que presentaron mayor afinidad, PD-i3, PD-i5 y PD-i6. Estos resultados se pudieron ratificar con el ensayo ITC, método que al presentar una gran sensibilidad cuenta con mayor fiabilidad. La ITC no se pudo realizar para todos los péptidos probados, con lo que se necesitaría un nuevo ensayo con los restantes. Mediante ambos métodos se obtuvieron valores muy similares para sus K_D , en valores del rango de 30 μ M validando este valor y ambos métodos.

Gracias a la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de campo alto se pudo estudiar cuales eran aquellos aminoácidos que se presentan como clave para cada una de las interacciones con los péptidos con más afinidad por PD-1. Se pudo conocer también las regiones en las que se produce la interacción, para tener un mayor conocimiento de estas zonas. De entre estos péptidos destacó por producir una mayor cantidad de variaciones en la estructura de PD-1 la interacción con PD-i5. Se pudo establecer también que la interacción de estos péptidos con PD-1 producía en esta proteína cambios estructurales en su zona de interacción, los cuales eran diferentes en función del péptido usado.

A partir de este estudio se consiguió aumentar el conocimiento sobre la interacción entre el péptido diseñado por el grupo "*Design, Synthesis and Structure of Peptides and Proteins*" y el receptor PD-1, así como la obtención de sus afinidades por diferentes métodos biofísicos. Gracias a este conocimiento se podrá continuar con el estudio para determinar si uno de estos péptidos tiene suficiente afinidad por el receptor como para llegar a ser usado como bloqueador del receptor y, por tanto, poder contribuir al tratamiento del cáncer. De no ser así, y determinarse que esta interacción no es suficientemente fuerte, se podría diseñar nuevos péptidos que reúnan las características estructurales ventajosas de los tres principales candidatos y así conseguir avances en este campo.

9. Autoevaluación

Respecto al trabajo práctico realizado estoy satisfecho debido a que he podido realizar casi todo los procedimientos por mí mismo una vez me habían ayudado y supervisado para que lo realizara correctamente. Por lo tanto, he tenido responsabilidad en estos experimentos, ya que una vez veían que era capaz de hacerlo correctamente era yo el que tenía que ocuparme de llevarlo a cabo, siempre pendientes de mis dudas y posibles necesidades. Además, estos procedimientos los he realizado en múltiples ocasiones lo que me ha ayudado a ir perfeccionándolos. Por otra parte, al no haber realizado anteriormente muchas de las técnicas (RMN, ITC, SEC, LC-MS o MST) que he llevado a cabo, he podido ver cómo funciona el mundo del diseño de fármacos actual más de cerca.

Durante estas prácticas he podido trabajar con software en la correlación de la estructura de proteínas, que es uno de los aspectos que más difícil me resulta, por el hecho de haberlo realizado en menos ocasiones durante mi formación. También he podido continuar mi formación en el mundo de los cultivos celulares tanto en la de expresión de la proteína PD-1 en *E. coli* y como en la transformación de esta bacteria. Pero sobre todo, al estar en un grupo de investigación formado casi al completo por químicos, me he podido enriquecer de la visión y conocimiento sobre química de mis compañeros viendo su forma de trabajar y cómo o en qué investigaban. Esto ha sido posible ya que en este grupo prima el trabajo en equipo, la colaboración y el compañerismo que son cosas de las que siempre se puede aprender y es de agradecer en un mundo tan competitivo como es el de la ciencia.

Finalmente, desde el punto de vista teórico, el IRB me ha permitido ir a una gran cantidad de charlas de miembros del instituto de investigación, los cuales mostraban tanto sus investigaciones como el estado del arte de este. En estos seminarios también vinieron a exponer sus avances grandes figuras en la ciencia como son Judith Campisi o bien Gautam Dey, de los que pude aprender cómo se trabaja para hacer publicaciones en revistas de gran impacto. Todos estos seminarios además de hacerme conocer más en profundidad diferentes campos de la ciencia, me mostró nuevas posibilidad de encaminar mi carrera. Ya que trataban desde la investigación pura hasta la aplicación artística de la ciencia.

10. Bibliografía

- [1] K. M. Zak, P. Grudnik, K. Magiera, A. Dömling, G. Dubin, and T. A. Holak, "Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2," *Structure*, vol. 25, no. 8, pp. 1163–1174, 2017.
- [2] Q. Li *et al.*, "Discovery of peptide inhibitors targeting human programmed death 1 (PD-1) receptor," *Oncotarget*, vol. 7, no. 40, pp. 64967–64976, 2016.
- [3] X. Cheng *et al.*, "Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 17, pp. 11771–11785, 2013.
- [4] D. Y. Lin *et al.*, "The PD-1 / PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors," vol. 105, no. 8, pp. 3011–3016, 2008.
- [5] L. Zitvogel and G. Kroemer, "Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy," *Oncoimmunology*, vol. 1, no. 8, pp. 1223–1225, 2012.
- [6] H. C. Probst, K. McCoy, T. Okazaki, T. Honjo, and M. Van Den Broek, "Resting dendritic cells induce peripheral CD8 + T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4," vol. 6, no. 3, pp. 280–286, 2005.
- [7] L. Wang, K. Pino-lagos, V. C. De Vries, I. Guleria, M. H. Sayegh, and R. J. Noelle, "Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3 γ . CD4 γ . regulatory T cells," vol. 105, no. 27, pp. 9331–9336, 2008.
- [8] A. Jemal, P. Vineis, F. Bray, L. Torre, and D. Forman, *El Atlas del Cáncer, 2^o Edición*. 2014.
- [9] P. S. Roy and B. J. Saikia, "Cancer and cure: A critical analysis," *Indian J. Cancer*, vol. 53, no. 3, pp. 441–442, 2016.
- [10] "Atezolizumab for Bladder Cancer - National Cancer Institute." [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2016/fda-atezolizumab-bladder>. [Accessed: 19-May-2020].
- [11] H. Tian *et al.*, "PDL1-targeted vaccine exhibits potent antitumor activity by simultaneously blocking PD1/PDL1 pathway and activating PDL1-specific immune responses," *Cancer Lett.*, vol. 476, no. February, pp. 170–182, 2020.
- [12] C. Y. Ock *et al.*, "Pan-Cancer Immunogenomic Perspective on the Tumor Microenvironment Based on PD-L1 and CD8 T-Cell Infiltration," *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 9, pp. 2261–2270, 2016.
- [13] X. Zhang *et al.*, "Breast cancer neoantigens can induce CD8+ T-cell responses and antitumor immunity," *Cancer Immunol. Res.*, vol. 5, no. 7, pp. 516–523, 2017.
- [14] E. L. Sievers and P. D. Senter, "Antibody-Drug Conjugates in Cancer Therapy," *Annu. Rev. Med.*, vol. 64, no. 1, pp. 15–29, 2013.
- [15] S. M. Gheibi Hayat and A. H. Sahebkar, "Antibody drug conjugates for cancer therapy," *J. Babol Univ. Med. Sci.*, vol. 19, no. 7, pp. 20–27, 2017.
- [16] S. M. Ansell *et al.*, "PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 4, pp. 311–319, 2015.
- [17] J. A. Sosman *et al.*, "new england journal," pp. 711–723, 2010.
- [18] M. A. Postow *et al.*, "Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 21, pp. 2006–2017, 2015.

- [19] F. Zhang *et al.*, "Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade," *Cell Discov.*, vol. 3, pp. 1–12, 2017.
- [20] S. Guardiola *et al.*, "Toward a Novel Drug To Target the EGF–EGFR Interaction: Design of Metabolically Stable Bicyclic Peptides," *ChemBioChem*, vol. 19, no. 1, pp. 76–84, 2018.
- [21] S. Singh *et al.*, "PEPstrMOD: Structure prediction of peptides containing natural, non-natural and modified residues," *Biol. Direct*, vol. 10, no. 1, pp. 1–19, 2015.
- [22] T. Arai *et al.*, "Rational design and identification of a non-peptidic aggregation inhibitor of amyloid- β based on a pharmacophore motif obtained from cyclo[-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-]," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 53, no. 31, pp. 8236–8239, 2014.
- [23] P. Hosseinzadeh *et al.*, "Comprehensive computational design of ordered peptide macrocycles," *Science (80-.)*, vol. 358, no. 6369, pp. 1461–1466, 2017.
- [24] D. Baker, "What has de novo protein design taught us about protein folding and biophysics?," *Protein Sci.*, vol. 28, no. 4, pp. 678–683, 2019.
- [25] D. Shi, S. Zhou, X. Liu, C. Zhao, H. Liu, and X. Yao, "Understanding the structural and energetic basis of PD-1 and monoclonal antibodies bound to PD-L1: A molecular modeling perspective," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1862, no. 3, pp. 576–588, 2018.
- [26] R. Momen *et al.*, "Exploration of the forbidden regions of the Ramachandran plot (ϕ - ψ) with QTAIM," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 19, no. 38, pp. 26423–26434, 2017.
- [27] G. Bhardwaj *et al.*, "Accurate de novo design of hyperstable constrained peptides," *Nature*, vol. 538, no. 7625, pp. 329–335, 2016.
- [28] D. Kozakov *et al.*, "The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins," *Nat. Protoc.*, vol. 10, no. 5, pp. 733–755, 2015.
- [29] "Wang Resin (4-Hydroxybenzyl Alcohol (PHB) on Polystyrene):" [Online]. Available: <http://www.rapp-polymer.com/index.php?id=710>. [Accessed: 22-May-2020].
- [30] "KD value: a quantitative measurement of antibody affinity | Abcam." [Online]. Available: <https://www.abcam.com/primary-antibodies/kd-value-a-quantitative-measurement-of-antibody-affinity>. [Accessed: 22-May-2020].
- [31] R. Magnez, B. Thiroux, S. Taront, Z. Segoula, B. Quesnel, and X. Thuru, "PD-1/PD-L1 binding studies using microscale thermophoresis," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–8, 2017.
- [32] T. H. Scheuermann, S. B. Padrick, K. H. Gardner, and C. A. Brautigam, "On the acquisition and analysis of microscale thermophoresis data," *Anal. Biochem.*, vol. 496, pp. 79–93, 2016.
- [33] S. Lin, L. Qin, G. J. L. Wuite, and R. T. Dame, "Bacterial Chromatin: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology," vol. 1837, pp. 177–197, 2018.
- [34] R. Ghai, R. J. Falconer, and B. M. Collins, "Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research-survey of the literature from 2010," *J. Mol. Recognit.*, vol. 25, no. 1, pp. 32–52, 2012.
- [35] W. B. Turnbull and A. H. Daranas, "On the Value of c : Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry?," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 48, pp. 14859–14866, 2003.
- [36] F. Torres and J. Orts, "Nuclear magnetic resonance structure-based drug design," *Future Med. Chem.*, vol. 10, no. 20, pp. 2373–2376, 2018.
- [37] A. Sekhar and L. E. Kay, "An NMR View of Protein Dynamics in Health and Disease," *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 48, no. 1, pp. 297–319, 2019.
- [38] K. M. Zak *et al.*, "Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1," *Structure*, vol. 23, no. 12, pp. 2341–2348, 2015.

- [39] "PDB 2m2d structure summary < Protein Data Bank in Europe (PDBe) < EMBL-EBI." [Online]. Available: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2m2d>. [Accessed: 22-May-2020].
- [40] "Laboratorio de Biología Molecular." [Online]. Available: <https://www.tecnalia.com/es/servicios-tecnologicos/laboratorios/laboratorio-biologia-molecular/laboratorio-biologia-molecular.htm>. [Accessed: 25-May-2020].
- [41] "ExpASy - ProtParam tool." [Online]. Available: <https://web.expasy.org/protparam/>. [Accessed: 22-May-2020].
- [42] R. Winkler, "ESIprot: A universal tool for charge state determination and molecular weight calculation of proteins from electrospray ionization mass spectrometry data," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 24, no. 3, pp. 285–294, Feb. 2010.
- [43] "PD Minitrap™ G-25 GE Healthcare, 28-9180-07 | Sigma-Aldrich." [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/ge28918007?lang=es®ion=ES>. [Accessed: 22-May-2020].
- [44] "Alexa Fluor 647 dye | Thermo Fisher Scientific - ES." [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/alexa-fluor-647.html>. [Accessed: 22-May-2020].
- [45] et al Teeple E, Collins J, Shrestha S, Dennerlein J, "乳鼠心肌提取 HHS Public Access," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 1, pp. 139–148, 2018.
- [46] E. S. P. Bouvier and S. M. Koza, "Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 63, pp. 85–94, 2014.
- [47] J. Cheng and T. J. Deming, "synthesis of polypeptides by ROP of NCAs," *Pept. Mater.*, vol. 310, pp. 1–26, 2011.
- [48] P. Bradbury, "User Manual for the," *System*, vol. 3, no. 501, pp. 1–16, 2011.
- [49] G. Winkelaar, C. Trieber, J. Kumar, and M. Overduin, "Measuring interactions of globular and filamentous proteins by nuclear magnetic resonance spectroscopy (Nmr) and microscale thermophoresis (mst)," *J. Vis. Exp.*, vol. 2018, no. 141, pp. 1–14, 2018.
- [50] "Is it possible that the heat of dilution can mask change in the heat content of protein - ligand interactions in ITC experiment?" [Online]. Available: https://www.researchgate.net/post/Is_it_possible_that_the_heat_of_dilution_can_mask_change_in_the_heat_content_of_protein-ligand_interactions_in_ITC_experiment. [Accessed: 22-May-2020].
- [51] H. Lebram and I. (Irene S. M. E. Lebram, *Opgedoken : de veelbewogen eerste helft van de twintigste eeuw als décor voor de levensgeschiedenis van een joodse Berlijner, die twee jaar in Alkmaar zat ondergedoken*. Louise uitgeverij, 2011.
- [52] "MST Systems for Binding Affinity & Protein Interactions." [Online]. Available: <https://nanotempertech.com/monolith/>. [Accessed: 26-May-2020].
- [53] "Resonancia Magnética Nuclear - Facultad de Química." [Online]. Available: <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/resonancia-magnetica-nuclear/>. [Accessed: 26-May-2020].

11. Anexo I: Ficha de seguimiento del tutor

Nombre y Apellidos del Alumno/a: Xavier Roig Soriano

Nombre y Apellidos del Tutor/a: Dr. Salvador Guardiola

Fecha de la entrevista con el alumno: 01/04/2020 - 06/04/2020 - 14/04/2020 - 05/04/2020 - 10/05/2020 y 22/05/2020.

Recomendaciones durante el seguimiento:

-Establecimiento de un guion para hacer la introducción y el desarrollo del TFG.

-Revisión de la introducción: reducir el tamaño de algunos puntos desarrollados y añadir más referencias.

Revisión de la metodología: falta de referencias y algunos aspectos del diseño de procedimiento llevado a cabo.

-Revisión de los resultados y discusiones: falta de algunos posibles resultados no añadidos por mí, modificación de la forma de presentar un resultado y propuesta para una discusión no añadida.

-Revisión de conclusiones: algunos cambios en defectos de forma en las conclusiones.

Observaciones: En este documento están reflejadas las reuniones y revisiones llevadas a cabo pero, además, el Doctor Salvador Guardiola me ha resuelto cualquier duda que se me ha presentado por vía e-mail o video-llamada.

Observaciones Última revisión:

Algunos puntos de los resultados se debían explicar más o mejor. Se pueden añadir más resultados realizados en el periodo de prácticas para facilitar la comprensión del proceso seguido. Algunos errores en la forma de las últimas partes añadidas que se solucionaron fácilmente. Y sugerencias de la expresión correcta a la hora de expresar determinados conceptos en publicaciones científicas.

Firma del Tutor / a Firma del Alumno / a



Tarragona a 24 de Mayo de 2020
