



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Expresión en *Escherichia coli* de quimeras recombinantes
de chagasina con tres o más epítopos de TSA-1”**

T E S I S

Que presenta

MARCO IBRIM RODRÍGUEZ SÁNCHEZ

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis: **Dr. Jaime Ortega López**

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Proteínas (laboratorio 23) del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), bajo la dirección del **Dr. Jaime Ortega López**, con la asesoría de la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui**, de la **Dra. María Viridiana Olin Sandoval** y de la **Dra. María del Carmen Montes Horcasitas**. Para la realización de este proyecto de investigación se contó con el apoyo financiero de la fundación Carlos Slim: Chagas Vaccine Initiative (WO3-WO4) y la colaboración con la Universidad de Tulane (TUL-HSC-561355-23/24) y del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT, A1-S-34224), así como de la beca otorgada en el periodo comprendido de septiembre 2022 a agosto 2024 (830969).

Agradecimientos

Agradezco al **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional** por las facilidades y el financiamiento otorgado para obtención de grado y asistencia a congreso. Al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería por el asesoramiento, acceso a sus instalaciones y facilidades otorgadas.

Agradezco al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías** por el financiamiento (A1-S-34224) y la beca otorgada (830969).

Agradezco al **Dr. Jaime Ortega López** por todo su apoyo, asesoría, mentoría y confianza durante el desarrollo de mi proyecto, gracias además por sus enseñanzas, por compartir su experticia académica y su amor a la ciencia. Agradezco a mis asesores, la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui**, la **Dra. Viridiana Olin Sandoval** y la **Dra. Ma. Del Carmen Montes Horcasitas** por sus comentarios y consejos que constantemente enriquecieron y mejoraron la calidad del presente trabajo.

Gracias a la **M. en C. Claudia Ivonne Flores Pucheta** y al **IBT. Octavio Montes Flores** por su apoyo y enseñanzas en técnicas y temas del presente proyecto, a **Ma Eugenia Zúñiga Trejo** por su asistencia técnica en el laboratorio, y a la **Q.F.B Leticia Ávila González** por el apoyo en la generación de anticuerpos en el laboratorio 11 del DIPM.

A mis compañeros de laboratorio **Paola, Esdras, Alejandro, Leo, Vero, Brenda y Montse** por su ayuda, compañía y amistad, y especialmente a **Pao**, por su apoyo, cariño y compañía incondicional.

Agradezco y dedico este logro a mi mamá **María de Jesús Sánchez Mohedano** por todo su apoyo, y por ser ejemplo de esfuerzo y sacrificio. Gracias a mi hermano **Héctor Rodríguez Sánchez**, porque no hay persona que crea más en mí, que él. Y a mis tíos Fernando y Blanca y mis primas Amanda y Karla por recibirme y cuidar de mí en mis primeros meses de licenciatura y maestría en Ciudad de México, estaré siempre agradecido.

Índice general

Agradecimientos	3
Índice general	4
Índice de Tablas	5
Índice de Figuras	6
Abreviaturas	8
Resumen	9
Abstract	10
Antecedentes	11
Justificación	22
Hipótesis	23
Objetivos	23
Materiales y métodos	24
Resultados y Discusión	34
Conclusión	64
Perspectivas	65
Referencias	66
Apéndices	74

Índice de Tablas

Tabla 1. Ventajas y desventajas de <i>E. coli</i> como sistema de expresión.	21
Tabla 2. Antígenos vacunales no glicosilados expresados en <i>E. coli</i>	21
Tabla 3. Servidores para la predicción de solubilidad de proteínas.	21
Tabla 4. Normalización de datos de solubilidad (CamSol y Aggrescan3D)...	28
Tabla 5. Mutación asistida para incrementar solubilidad de la chagasina. ...	34
Tabla 6. Predicción de la solubilidad de las mutantes de chagasina.....	35
Tabla 7. Análisis cualitativo mediante ImageLab	39
Tabla 8. Temperatura de fusión (T_m) de las mutantes de chagasina.....	40
Tabla 9. Predicción de la solubilidad de las proteínas quiméricas con tres epítomos de TSA-1.....	47
Tabla 10. Predicción de la solubilidad de las proteínas quiméricas con cuatro epítomos de TSA-1.....	48
Tabla 11. Quimeras de 3 epítomos seleccionadas.....	49
Tabla 12. Quimeras de 4 epítomos seleccionadas.....	49
Tabla 14. Propiedades de las quimeras seleccionadas.....	52
Tabla 16. Predicción de solubilidad de quimeras de tres epítomos.....	78
Tabla 17. Predicción de solubilidad de quimeras de cuatro epítomos.	81
Tabla 18. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para colonyPCR	89

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de Vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
Figura 2. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas.....	14
Figura 3. Mecanismo de evasión del sistema inmune mediado por transialidasas.	17
Figura 4. Extremo amino-terminal de TSA-1.....	17
Figura 5. Chagasina de <i>T. cruzi</i>	19
Figura 6. Inhibidora de cisteín-proteasas de <i>Trypanosoma brucei</i>	26
Figura 6. Mutación a la chagasina	35
Figura 7. Comparación de hidrofobicidad en superficie	36
Figura 8. Análisis de clonas	37
Figura 9. Expresión de las mutantes, análisis SDS-PAGE	38
Figura 10. Análisis por densitometría	39
Figura 11. Estabilidad térmica de las mutantes de chagasina.....	41
Figura 12. Quimera Q8 (Q4E_8 V18K-F58K).....	42
Figura 13. Quimeras con mayor score de solubilidad	45
Figura 14. Efecto en la solubilidad <i>in silico</i>	50
Figura 15. Estructura 3D de las quimeras seleccionadas.	51
Figura 17. Confirmación de construcción y selección de transformantes por colonyPCR.....	53
Figura 18. Expresión de las quimeras fusionadas a MBP	54
Figura 19. Expresión de las quimeras de 4 epítomos sin tag de solubilización (pCri8a), análisis por SDS-PAGE.....	55
Figura 20. Inmunodetección α -His en la expresión de quimeras.....	56
Figura 21. Cambio en la estructura 3D.....	58

Figura 22. Comparativa en la posición de los epítomos.	60
Figura 23. Expresión de Q109 en biorreactor, análisis por SDS-PAGE.	61
Figura 24. Purificación Q109-MBP.....	62
Figura 25. Inmunodetección en la expresión de quimeras.....	63
Figura 26. Vector pCri1a.....	76
Figura 27. Vector pCri8a.....	77
Figura 28. Cromatogramas de Mutantes de chagasina por IMAC.	86
Figura 30. Amplicones generados por colonyPCR.....	89

Abreviaturas

aa	Aminoácido
BCA	Método del ácido biciconínico
BSM	Medio Salino Basal
DO	Densidad Óptica
IEX	Cromatografía por intercambio iónico
IMAC	Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
MBP	Proteína de Unión a Maltosa
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
ORF	Marco Abierto de Lectura
PBS	Solución salina amortiguadora con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto Isoeléctrico
pLDDT	Prueba de diferencia de distancia local prevista
rpm	Revoluciones por minuto
SEC	Cromatografía por exclusión de tamaño
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
TBE	Tris Borato EDTA
TSA-1	Antígeno de superficie de Tripomastigote

Resumen

La enfermedad de Chagas es una enfermedad zoonótica, parasitaria, sistémica y crónica causada por *Trypanosoma cruzi* con una incidencia anual de 30.000 casos nuevos y alrededor de 12.000 muertes, afectando principalmente a regiones marginadas de América Latina. Debido a la baja eficacia de la terapia farmacológica disponible se han propuesto vacunas basadas en antígenos recombinantes como un nuevo tratamiento complementario. Un antígeno prometedor es el Antígeno de Superficie Trypomastigote-1 (TSA-1), una proteína de *T. cruzi* involucrada en el proceso infeccioso que ha demostrado reducir la parasitemia después de su inmunización en modelos animales. Sin embargo, la producción recombinante de TSA-1 en *E. coli* es en cuerpos de inclusión, requiriendo un paso de replegamiento adicional.

Estudios previos han demostrado que TSA-1 tiene cinco epítomos conservados entre las Unidades Discretas de Tipificación (DTU's) de *T. cruzi* que pueden inducir una respuesta inmunológica de los linfocitos T citotóxicos. Además, se ha propuesto el uso de un andamiaje molecular soluble como un enfoque novedoso para lograr la expresión soluble de dos epítomos TSA-1. Este proyecto tiene como objetivo expresar proteínas quiméricas que contienen tres y cuatro epítomos TSA-1 en los bucles L2, L4 y L6 de la chagasina, un inhibidor endógeno de cisteín-proteasas de *T. cruzi*.

El diseño implicó la mutación de aminoácidos expuestos hidrofóbicos en la superficie de la chagasina, seguida de una predicción *in silico* de la solubilidad y la propensión a la agregación de 180 posibles quimeras empleando su estructura 3D predicha. Las dos quimeras más prometedoras de tres y cuatro epítomos se seleccionaron, clonaron y expresaron en *Escherichia coli*, algunas de ellas se fusionaron a la etiqueta de solubilidad: Proteína de Unión a Maltosa (MBP). Las proteínas recombinantes se reconocieron mediante inmunoensayos y se eligió una quimera para su escalamiento en biorreactor de 2L, seguido de su purificación por métodos cromatográficos.

Abstract

Chagas disease is a zoonotic, parasitic, systemic, and chronic disease caused by *Trypanosoma cruzi* with an annual incidence of 30,000 new cases and around 12,000 deaths, affecting mainly marginated regions in Latin-America. Due to the low efficacy of the available drug-based therapy, vaccines based on recombinant antigens have been proposed as a novel complementary treatment. One promising antigen is Trypomastigote Surface Antigen-1 (TSA-1), a protein of *T. cruzi* involved in the infective process that has been demonstrated to reduce parasitemia after its immunization in animal models. However, the recombinant production of TSA-1 in *E. coli* is as inclusion bodies, requiring an extra refolding step.

Previous studies have shown that TSA-1 has five conserved epitopes among the *T. cruzi* Discrete Typification Units (DTU's) that can induce an immunological response of cytotoxic T-lymphocytes. Also, the use of a soluble molecular scaffold has been proposed as a novel approach to achieve the soluble expression of two TSA-1 epitopes. This project aims to express chimeric proteins containing three and four TSA-1 epitopes in the loops L2, L4, and L6 of the chagasina, an endogenous inhibitor of cysteine-protease of *T. cruzi*.

The design involved the mutation of hydrophobic exposed amino acids on the chagasin surface, followed by *in silico* prediction of solubility and aggregation propensity of 180 possible chimeras employing their predicted 3D structure. The two most promising chimeras of three and four epitopes were selected, cloned, and expressed in *Escherichia coli*, some of them were fused to the solubility tag: Maltose Binding Protein (MBP). recombinant proteins were recognized by immunoassays and one chimera was chosen for scale-up in a 2L bioreactor followed by purification.

.

Antecedentes

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis americana es una enfermedad zoonótica, parasitaria, sistémica y crónica causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad es endémica de 21 países de Latinoamérica, con una incidencia anual promedio de 30,000 nuevos casos y cerca de 12,000 muertes. Las estadísticas indican incidencias principalmente en países en vías de desarrollo, por lo que en el 2015 la organización mundial de la salud (OMS) y la organización panamericana de la salud (OPS) la han denominado enfermedad tropical desatendida.

El agente etiológico de la enfermedad es un protista flagelado con dimensiones variables de entre 2 a 30 μm dependiendo del estadio morfológico y etapa de su ciclo de vida, comparte características moleculares con procariotas y eucariotas, exhibe amplia variación antigénica además de reproducción tanto sexual como asexual (Berry *et al.*, 2019; Jansen *et al.*, 2020).

Este parásito es transmitido principalmente por vía vectorial a través de insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae*, conocidos comúnmente como chinche besucona; la enfermedad, dada la infección, puede causar trastornos irreversibles en el sistema nervioso, digestivo y alteraciones cardíacas (Rassi *et al.*, 2017).

A inicios del siglo XX dentro de la investigación relacionada a la malaria, el médico Carlos J. Ribeiro da Chagas observó particularidades clínicas en comunidades rurales de Brasil, así como una distintiva invasión de insectos hematófagos a viviendas humanas. Al realizar autopsias a casos crónicos, análisis hematológicos y examinar el intestino de los insectos descubrió al mismo parásito en diferentes etapas de transmisión, de esta manera y a través de experimentación logró reproducir procesos de infección en pequeños animales. Fue entonces entre 1908 y 1911, que describió y reportó detalladamente el ciclo de vida de *T. cruzi* y la sintomatología presente en el huésped (Chagas, 1909; Lewinsohn, 1979).

Las principales complicaciones clínicas observadas por Carlos Chagas fueron alteraciones cardíacas y del sistema nervioso. Actualmente se estima que el 50% de los casos son asintomáticos, mientras que la sintomatología común en la fase aguda consiste en dolor de cabeza, muscular y abdominal, fiebre y dificultad para respirar. Por otro lado, en la fase crónica los parásitos se localizan en músculo cardíaco y digestivo, lo que aumenta la posibilidad de sufrir trastornos cardíacos, nerviosos y hasta muerte súbita (INSP, 2021).

La infección por *T. cruzi* es enzoótica en diversos animales, tanto vertebrados como invertebrados. Entre estos, los insectos hematófagos de la familia *Triatominae* son los principales transmisores del parásito, de amplia variedad de especies, estos insectos logran formar colonias de hasta 1000 individuos y, debido a su notable capacidad de adaptación a distintos ecotopos, el control de su población se ha convertido en el método principal en los esfuerzos para reducir la propagación de la enfermedad (Guarneri y Lorenzo, 2021).

La complejidad del ciclo de vida se atribuye a diversos mecanismos de diferenciación celular que ejecuta dependiendo del huésped que habite (Figura 1). El insecto succiona sangre de la piel del vertebrado incrustando su probóscide, acción que dura alrededor de 20 minutos durante la noche. Simultáneamente, excreta cerca al sitio de la picadura liberando dentro de las heces la forma infecciosa del parásito (tripomastigote metacíclico), para finalmente por acción mecánica entrar en contacto con la herida o mucosas y penetrar en diferentes tejidos del mamífero.

Después de la invasión al huésped, el tripomastigote metacíclico ingresa a la célula a través de una vacuola parasitófora (PV), de la cual puede escapar, transformarse en amastigote y multiplicarse en el citosol, posteriormente realiza división binaria y se diferencia de nuevo a tripomastigote móvil, liberándose mediante lisis a la célula huésped e infectando consecuentemente células aledañas, puede además migrar a

diferentes tejidos o ser ingeridas nuevamente por algún insecto vector cerrando así el ciclo (Moretti *et al.*, 2019).

Además de la clásica ruta de infección por el vector vía cutánea, se han reportado nuevos mecanismos, como la transmisión vía transfusión sanguínea, transmisión congénita, transmisión oral e incluso accidentes de laboratorio. La frecuencia y probabilidad del mecanismo de transmisión dependen de la zona geográfica, condiciones ambientales y del sistema sanitario (Pérez *et al.*, 2009; De Noya *et al.*, 2015).

Esta enfermedad zoonótica es considerada en México un problema de salud pública. Dos terceras partes del territorio poseen condiciones para la transmisión vectorial, con un estimado de 1.1 millones de personas infectadas hasta el 2018 y 8 géneros y 31 especies de triatoma descritos, y debido al movimiento poblacional hay presencia de pacientes chagásicos en Estados Unidos, Canadá y Europa (Figura 2), convirtiéndose en un problema de salud global, (Rojo *et al.*, 2018; Abras *et al.*, 2022).

Tratamiento

Durante los últimos 50 años el único tratamiento ante la infección ha sido basado en fármacos, con una limitada disponibilidad de dos compuestos nitro-heterocíclicos (benznidazol y nifurtimox). Ambos presentan su mayor efectividad cuando son administrados durante las primeras semanas tras la infección, sin embargo, no son considerados adecuados debido a su hepatotoxicidad, alta tasa de ineffectividad (10-30%), desarrollo de resistencia por *T. cruzi*, e indeseados efectos secundarios en hasta el 90% de los pacientes (Beltrán *et al.*, 2022).

Así mismo, dentro de los esfuerzos por mitigar, controlar y eliminar la enfermedad de Chagas, desde la primera mitad del siglo pasado se ha estudiado experimentalmente la protección por inmunización, empleando múltiples tipos de inmunógenos, desde parásitos muertos/atenuados hasta proteínas recombinantes (Dumonteil *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2015).

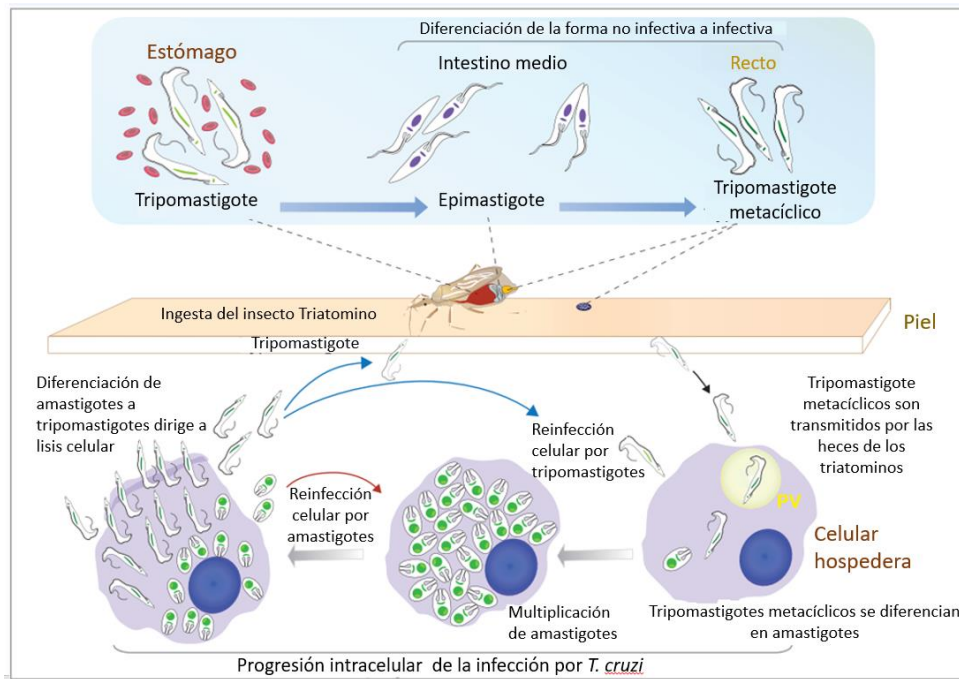


Figura 1. Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi* (Modificado de Morreti *et al.*, 2019).

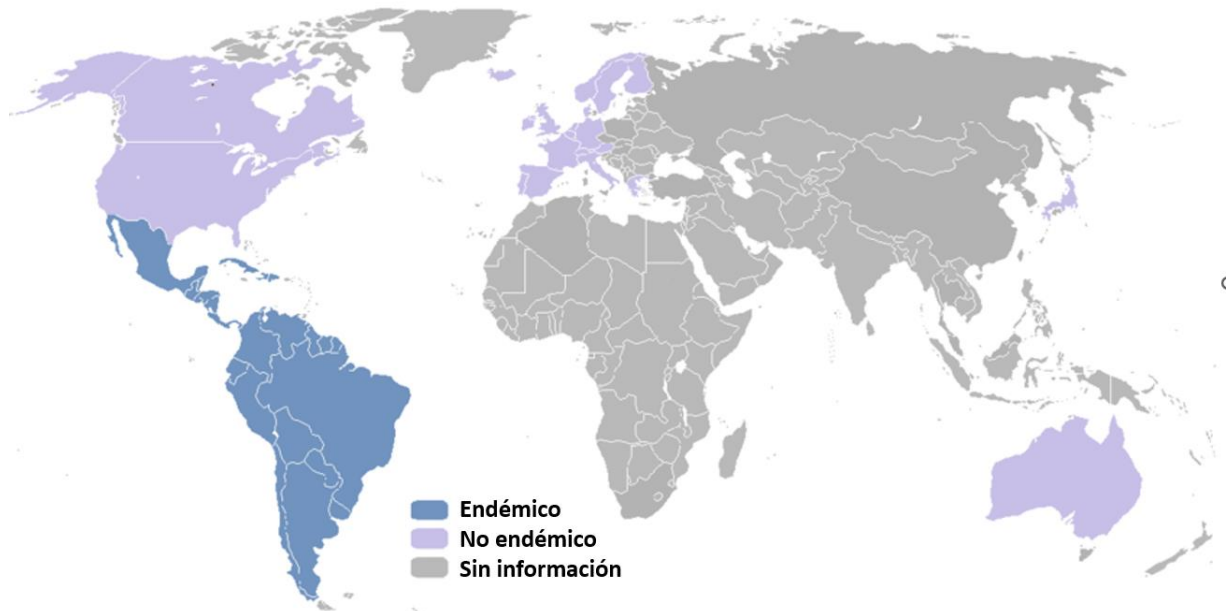


Figura 2. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas (Modificado de Sangenito *et al.*, 2020).

Experimentos en animales de laboratorio (ratones y perros) (Sánchez *et al.*, 2007; Quijano *et al.*, 2013) y recientemente en macacos (Dumonteil *et al.*, 2020; Dumonteil *et al.*, 2023) han demostrado que los antígenos proteicos Tc24 y TSA-1 inducen una respuesta inmune protectora, reduciendo la parasitemia. Ambos antígenos se producen de manera recombinante con buenos rendimientos en *E. coli*, sin embargo, TSA-1 solo se expresa en cuerpos de inclusión, por lo que para su empleo en ensayos como candidato a antígeno vacunal se estableció una etapa de replegamiento cromatográfico, no obstante, estos procedimientos representan un reto para el escalamiento en la bioproducción de este antígeno vacunal (Villanueva *et al.*, 2018; De la cruz *et al.*, 2019).

Trypomastigote Surface Antigen-1 (TSA-1)

Es una proteína periférica de membrana de 85 kDa anclada mediante unión covalente a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI anchor), pertenece a la familia de las transialidasas y aunque carece de actividad, está involucrada en mecanismos de evasión al sistema inmune del hospedero (Figura 3).

Específicamente la porción amino-terminal de TSA-1 de 65 kDa (Figura 4) es la que ha demostrado a través de inmunización y formulación de adyuvantes brindar protección inmune, reducción de la parasitemia, efectividad y control en la infección en modelos murinos, (De la cruz *et al.*, 2019). Sin embargo, el gen codificante para esta proteína presenta variabilidad dentro de linajes de *T. cruzi* en Latinoamérica, es así como Knight y colaboradores han localizado 5 epítomos peptídicos dentro del extremo amino-terminal, de entre 9 y 10 aminoácidos (Figura 4), que han indicado ser altamente antigénicos y conservados dentro de 6 linajes de importancia clínica de Latinoamérica (2014).

Por lo tanto, con el objetivo de evitar etapas de replegamiento de la molécula completa, una alternativa presentada es producir estos epítomos conservados de TSA-1 fusionados a una segunda proteína con características favorables como expresión de forma soluble y en altos rendimientos en *E. coli*, considerando que la procedencia sea igualmente de *T. cruzi*, esto con el fin de evitar redireccionamiento en la respuesta inmune.

Además de altos niveles de expresión, uno de los principales requerimientos de producción de proteínas recombinantes es evitar la formación de cuerpos de inclusión, pues la solubilidad es un requerimiento farmacéutico, demostrado que los antígenos en forma soluble presentan distintas propiedades inmunológicas en comparación a los antígenos en agregación, como la activación de distintas vías, diferentes respuestas de señalización, tiempos de procesamiento y cambios en la eficiencia, en consecuencia, el correcto plegamiento y la solubilidad es un objetivo de amplia relevancia en el diseño de vacunas (Snapper, 2018).

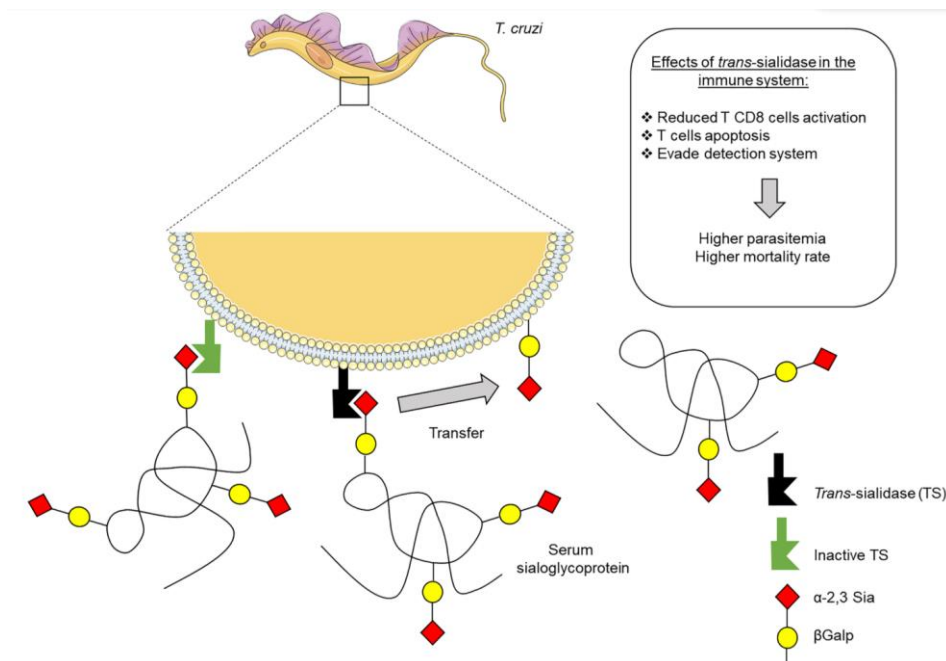


Figura 3. Mecanismo de evasión del sistema inmune mediado por transialidasas. La incorporación de ácido siálico del huésped a la superficie del parasito evita su detección por el sistema inmune, permitiendo su supervivencia (Modificado de da Costa *et al.*, 2021).

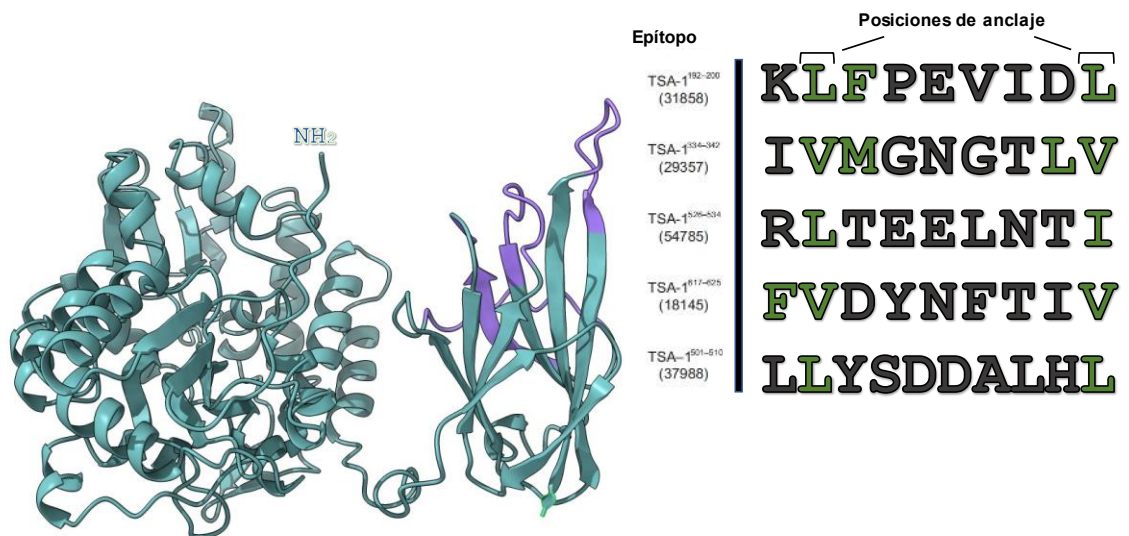


Figura 4. Extremo amino-terminal de TSA-1 (65 kDa), marcando de color morado los sitios donde se encuentran los 5 epítomos y su respectiva secuencia aminoacídica. Los aminoácidos de color verde forman parte de las regiones favorables y las posiciones de anclaje corresponden al sitio de unión al MHC (Modificado de Knight *et al.*, 2014).

Chagasina como andamio molecular

La chagasina es una proteína endógena inhibidora de cisteín-proteasas de *T. cruzi* que modula la diferenciación celular y la invasión a células de mamífero (Santos *et al.*, 2005), se localiza junto a la cruzipaína y carboxipeptidasas en los reservosomas (estructuras similares a lisosomas) principalmente durante el estadio de epimastigote, sin embargo, también es expresada en el resto de los estadios morfológicos del ciclo de vida (Santos *et al.*, 2014).

Estructuralmente está compuesta por 110 aminoácidos, ocho laminas beta y una pequeña alfa hélice 3_{10} (Figura 5). Los giros son menos convergentes que las láminas beta o el alpha hélice, de tal forma que estos giros estructurales se presentan expuestos, interaccionando con el medio, lo que proporciona accesibilidad al sitio activo inhibidor de proteasas, localizado en el giro L2 (Salmon *et al.*, 2006).

Esta proteína ha sido previamente propuesta y empleada como andamio molecular para la expresión de epítomos de TSA-1. En estos estudios lograron obtener proteínas quiméricas al insertar 2 o 3 epítomos en los giros L4 y L6, con diferentes niveles de expresión tanto en rendimiento como en solubilidad (Rodríguez Gavaldón, 2021; Cárdenas *et al.*, 2024), Sin embargo, se desconoce si es posible insertar epítomos en el giro L2 de la chagasina, por lo que en este trabajo se propone generar quimeras de la chagasina mediante la inserción de hasta 4 epítomos de TSA-1 en los giros L2, L4 y L6, analizarlas por métodos bioinformáticos, seleccionar las cuatro con mejor score de solubilidad libres o fusionadas a promotores de solubilidad como la MBP (Sun *et al.*, 2011).

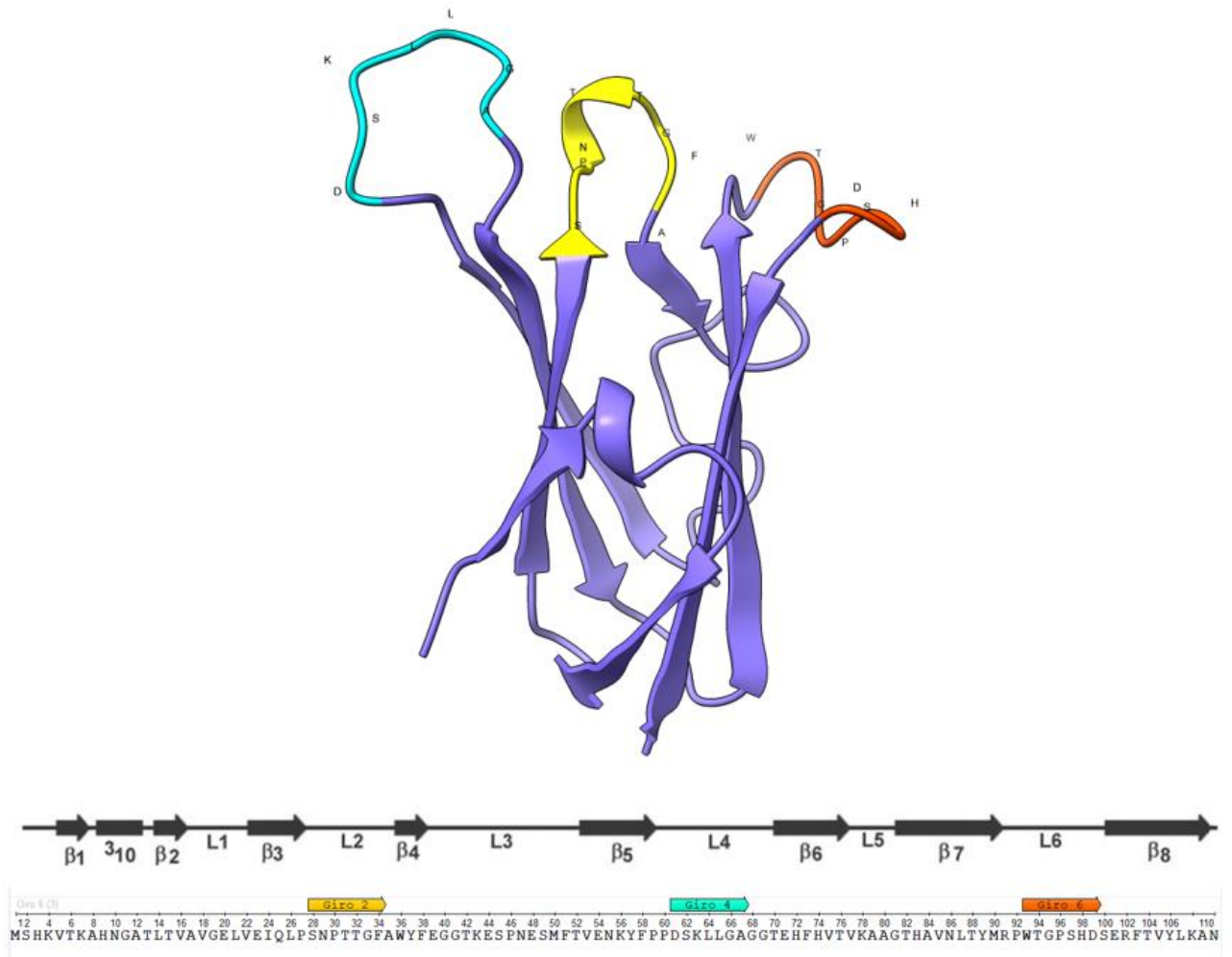


Figura 5. Chagasina de *T. cruzi*, Estructura terciaria, secundaria y primaria, giro L2 (amarillo), giro L4 (cian) y giro L6 (naranja). Elaborada en UCSF ChimeraX.

Estrategias en la expresión soluble de proteínas heterólogas

La rapidez, facilidad y economía son características del empleo de *Escherichia coli* como plataforma de expresión de proteínas heterólogas, sin embargo, este organismo modelo presenta desventajas con los modelos eucariontes en la expresión soluble de proteínas complejas (Tabla 1) (Reena *et al.*, 2016).

Es así como por su versatilidad se han expresado antígenos vacunales proteínicos en este organismo procarionta (Tabla 2), obteniendo resultados prometedores en la producción de candidatos inmunizantes provenientes de virus, bacterias y protozoarios. Estrategias adicionales se han propuesto en los esfuerzos de expresar proteínas solubles en *E. coli*, como los parámetros de fermentación, co-expresión de chaperones, mutaciones dirigidas, selección de promotores y fusión a tags de solubilidad.

Esta última ha mostrado prometedores resultados por lo que se han diseñado sistemas de expresión que brindan asistencia en procesos de transporte, secreción y purificación a través de la fusión de tags tanto en el extremo amino como carboxilo (Goulas *et al.*, 2014). Entre estos tags, se encuentran las proteínas de fusión MBP (proteína de unión a maltosa) y SUMO (pequeño modificador semejante a ubiquitina), los cuales han sido reportados como elementos que incrementan la expresión soluble de la proteína (Kuo *et al.*, 2014; Guerrero *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2022). Además, es posible remover estos tags mediante sitios específicos a proteasas, proceso necesario en caso de inmunización, ya que se evitan interacciones inmunogénicas inespecíficas.

Asimismo, el sistema pCri ya se ha empleado en la expresión de antígenos vacunales no glicosilados en *E. coli*; Nuñez y colaboradores expresaron regiones del RBD de la proteína Spike del SARS Cov-2, empleando el vector pCri11a con el objetivo de incrementar la expresión en forma soluble (2021).

Por otra parte, como parte del diseño *in silico* de proteínas quiméricas con enfoque en expresión soluble, es posible aplicar algoritmos para, a partir de la composición

aminoacídica, estructura, posición e interacción de átomos, predecir e inferir la susceptibilidad de agregación y solubilidad. Es posible acceder y hacer uso de estos algoritmos mediante servidores en línea, algunos de estos se muestran en la tabla 3.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de *E. coli* como sistema de expresión.

Ventajas	Desventajas
Tiempo corto de duplicación	No realiza procesamiento de intrones
Capacidad de operar fermentación en continuo	Código genético diferente al estándar
Bajo costo	Carencia de MPT
Fácil manejo	Posible plegamiento incorrecto de proteínas
Gran variedad de vectores con diferentes tags	Incapaz de sintetizar puentes disulfuro
Múltiples cepas optimizadas y especializadas	Acumulación de endotoxinas

Tabla 2. Antígenos vacunales no glicosilados expresados en *E. coli*

Candidato a vacuna para:	Proteína heteróloga (Antígeno)	Agente infeccioso:	Referencia
Tripanosomiasis americana	Tc-24	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Villanueva <i>et al.</i> , 2023
Disentería amebiana	Multiepítipo	<i>Entamoeba histolytica</i>	Chatterjee <i>et al.</i> , 2023
Filariasis linfática	Multiepítipo de tiorredoxina	<i>Wuchereria bancrofti</i>	Gorai <i>et al.</i> , 2022
Leishmaniasis visceral	Multiepítipo	<i>Leishmania donovani</i>	Yadav <i>et al.</i> , 2020
Toxoplasmosis	Multiepítipo de la proteína MRS	<i>Toxoplasma gondii</i>	Dodangeh <i>et al.</i> , 2021

Tabla 3. Servidores para la predicción de solubilidad de proteínas.

Servidor	Basado en:	Rango de score:		Referencia
		Insoluble	Soluble	
SoDOPE	Secuencia de aa.	0	1	Bhandari <i>et al.</i> , 2020
Protein-Sol	Secuencia de aa.	0	1	Hebdich <i>et al.</i> , 2017
SOLart	Estructura 3D	0	130	Hou <i>et al.</i> , 2020
Aggrescan3D	Estructura 3D	>0	<0	Kuriata <i>et al.</i> , 2019
CamSol	Estructura 3D	<1	>1	Sormanni <i>et al.</i> , 2015

Justificación

Los datos epidemiológicos de la tripanosomiasis americana estiman de 8 a 11 millones de casos, cifra que aumenta cada año. Además, la detección de pacientes en regiones no endémicas ha catalogado a la enfermedad como problema de salud global, por lo que evitar la propagación y aumentar la eficiencia en el tratamiento son objetivos actuales del sistema sanitario, acciones que se complican al ser clasificada como enfermedad tropical desatendida (OMS, 2015; CDC, 2016).

El tratamiento farmacológico para las etapas crónicas presenta limitaciones significativas, como baja efectividad e indeseados efectos secundarios, por lo que actualmente, ante ninguna vacuna aprobada, la inmunización se presenta como una estrategia prometedora, así, el desarrollar y/o presentar nuevos antígenos permitiría aumentar la probabilidad y tasa de recuperación, además de disminuir los niveles de mortalidad.

Dentro de los candidatos, los antígenos proteicos se deben identificar por ser, solubles, seguros e inmunogénicos, por lo que diseñar y expresar una molécula quimérica multiepítopo aseguraría la exposición de epítomos y minimizaría la propensión a agregación, consiguiendo una adecuada defensa inmunitaria.

Se propone emplear la chagasina como andamio molecular y sustituir los giros estructurales por epítomos conservados de TSA-1 con el propósito de expresar en conjunto la mayoría de estos, encontrar la configuración más soluble, y evitar expresiones en cuerpos de inclusión.

En términos de productividad, el poder expresar estos antígenos solubles no glicosilados en *E. coli*, y evitar etapas adicionales de replegamiento permitirá establecer un sistema atractivo de biomanufactura, dadas sus ventajas en costos, manipulación y rapidez.

Hipótesis

- La aplicación de estrategias como el diseño *in silico*, la fusión a tags y las mutaciones dirigidas, individualmente o combinadas, facilitarán la expresión en forma soluble de quimeras de chagasina con 3 o 4 epítomos de TSA-1 en *E. coli*.

Objetivos

Objetivo general

- Producir quimeras solubles de chagasina con tres o más epítomos de TSA-1 mediante su diseño *in silico* y expresión fusionada a MBP en *E. coli*.

Objetivos específicos

- Diseñar, subclonar y expresar mutantes de Chagasina para incrementar solubilidad y estabilidad, con la finalidad de aplicarlas en las quimeras.
- Realizar análisis bioinformático para la predicción de solubilidad en la fusión de 3 o más epítomos de TSA-1 en los giros L2, L4 y L6 de la chagasina para seleccionar dos quimeras con cuatro y dos quimeras con tres epítomos de TSA-1.
- Subclonar y expresar en *E. coli* la secuencia ORF de las quimeras seleccionadas en el sistema pCri que emplean tags de fusión.
- Purificar las quimeras seleccionadas por métodos cromatográficos.

Materiales y métodos

Estrategia experimental



Modificaciones a la chagasina para incrementar su solubilidad

A través del servidor web de Aggrescan3D se realizó un análisis de mutación asistida a residuos de la chagasina. La estructura empleada corresponde al código PDB: 2HTW y se aplicó la función de la herramienta denominada: mejora de solubilidad. A su vez, se indicó la exclusión en el análisis de los aminoácidos que constituyen a los giros L2, L4 y L6.

El análisis proporciona los 10 residuos susceptibles a causar agregación, indicando además los aminoácidos sustituyentes recomendados, el efecto energético y el cambio de score de solubilidad de cada posible mutación.

De los sitios con mayor significancia en el cambio de score de solubilidad se predijo la estructura 3D (AlphaFold2) de mutaciones sencillas y dobles, para posteriormente predecir su propensión a agregación y su solubilidad con la herramienta del servidor Aggrescan3D y su solubilidad con CamSol.

Diseño *in silico* de quimeras

Sustitución de epítomos en giros L2, L4 y L6

En la formación de quimeras de 4 epítomos, se sustituyó el giro L4 por dos epítomos, ya que el homólogo inhibidor de cisteín-proteasas procedente de *Trypanosoma brucei* (UNIPROT: Q57YP6) tiene alta semejanza estructural a la chagasina y posee un giro L4 compuesto por 20 aminoácidos (Figura 6).

Los elementos empleados para la formación de las quimeras son las siguientes secuencias de aminoácidos:

Chagasina (número de acceso UniProtKB: Q966X9):

```
MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLP SNPTTGFAWYFEGGTKESPNESMFTVEN  
KYFPPDSKLLGAGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLT YMRPWTG PSHDGSERFTVYLKA  
N
```

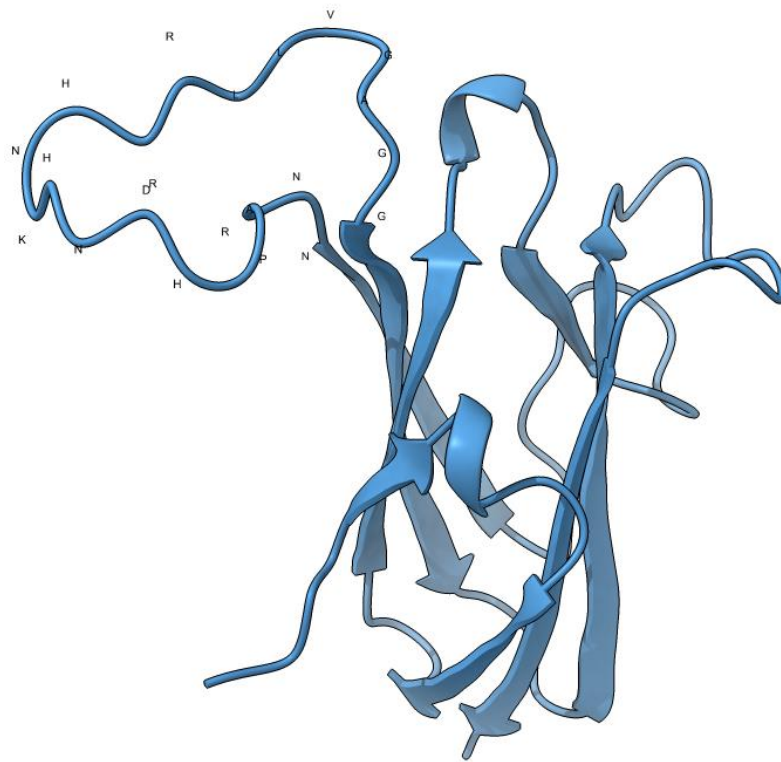
Epítomos de TSA-1:

```
E 1 = K L F P E V I D L  
E 2 = I V M G N G T L V  
E 3 = R L T E E L N T I  
E 4 = F V D Y N F T I V  
E 5 = L L Y S D D A L H L
```

Linker: GSGS (Empleado en la formación de quimeras con dos epítomos en el giro L4).

La formación de las quimeras de 3 epítomos involucró los sitios posibles: giro L2, L4 y L6, mientras que las quimeras de 4 epítomos los sitios: giro L2, L6 y dos en L4, con 5 secuencias sustituyentes para ambos. Se realizaron las permutaciones correspondientes generando así todas las posibles secuencias quiméricas.

Se programó un código empleando Python 3.0, y mediante paquetes de iteración en bucle y las secuencias como entradas de texto, se formaron las secuencias de las 120 quimeras de 4 epítomos y las 60 quimeras de 3 epítomos en formato FASTA (código en apéndice A).



	$\beta 1$ 3_{10} $\beta 2$ $\beta 3$ (L2) $\beta 4$ L3 $\beta 5$	
T. cruzi Dm28cMSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPSPNPTTGF ^o AWYFEGGTK. ^o SPNESMFTVENKYF	58
T. cruzi CLBrenerMSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPSPNPTTGF ^o AWFFEGGTK. ^o SPNESMFTVENKYF	58
T. brucei	...MSHNLFT ^o EED ^o DN ^o NKT ^o IR ^o VI ^o GETFT ^o IEL ^o KS ^o NPTTGY ^o TWLRSLAG. ^o TELS ^o DCTFA ^o QSKFN	59
	$L 4$ $\beta 6$ $\beta 7$ L6 $\beta 8$	
T. cruzi Dm28c	PPDSK.....LLGAGGTEHFHVTVKAA ^o GTHAV ^o NLT ^o YMRPWTG ^o PSH ^o SERF ^o TVYLKAN	110
T. cruzi CLBrener	PPDSK.....LLGAGGTEHFHVTVKVAG ^o THAV ^o NLT ^o YMRPWAG ^o PSH ^o SERF ^o IVYLKAN	110
T. brucei	NRAPHDNHKNHRRL ^o LVGAGG ^o MVLE ^o VKAL ^o KPG ^o KHT ^o SLAY ^o GRPWVGF ^o NAAKRY ^o NI ^o HVEAT	120

■ All Match Residues ■ Conserved Residues ■ Similar Residues

Figura 6. Inhibidora de cisteín-proteasas de *Trypanosoma brucei* Estructura tridimensional marcando los 20 aminoácidos que conforman el giro L4, y el alineamiento con la chagasina de *T. cruzi*. Estructura elaborada por AlphaFold2 y acondicionada en UCSF ChimeraX. Alineamiento tomado de Figueriedo *et al.*, 2007.

Obtención de estructura 3D por AlphaFold2

Para la obtención de la predicción de solubilidad en algunos servidores y emplear sus respectivos algoritmos es necesaria la estructura 3D en formato PDB, por lo que se realizó la predicción de éstas, a todas las 180 secuencias aminoacídicas de las quimeras, se accedió a AlphaFold2 desde UCSF ChimeraX versión 1.5 2022, y a través de la máquina virtual de Google Colab, y del software Colafold, el cual usa y combina MMseqs2 con AlphaFold2 (Mirdita *et al.*, 2022).

Predicción de solubilidad de quimeras por servidores

Se realizó la predicción de solubilidad empleando la secuencia aminoacídica de las 180 quimeras mediante los servidores:

- SoDOPE (Soluble Domain for Protein Expression) v2020 update.
- Protein-Sol - Warwicker and Curtis Groups v2018.

El algoritmo de Protein-Sol, se ejecutó localmente en la terminal en Ubuntu versión 22.04.1 LTS

La determinación de score de solubilidad mediante estructura 3D de las 180 quimeras se realizó en los servidores:

- SOLart (Soluble Domain for Protein Expression) v1.0 2017.
- Aggrescan3D (A3D) v2.0 2021.
- CamSol v2.3 2023 Function: Structurally Corrected Chemistry of Health - software.

Tratamiento de datos de score de solubilidad

Se normalizaron los datos obtenidos de CamSol y Aggrescan3D de solubilidad de las 180 quimeras considerando al score de la chagasina en ambos servidores con un valor de 1.0.

Tabla 4. Normalización de datos de solubilidad (CamSol y Aggrescan3D)

	Predicción de solubilidad de la chagasina	Fórmula de normalización
CamSol- Structured Corrected	0.5433	$SN = 1 - \frac{0.5433 - SQ}{0.5433}$
Aggrescan3D 2.0	-92.4088	$SN = 1 - \frac{-92.4088 - SQ}{-92.4088}$

SN: Solubilidad normalizada, SQ: Solubilidad de la quimera

Se consideró a la chagasina con un valor normalizado de 2.0, compuesto por 1.0 de Aggrescan3D más 1.0 de CamSol, y a su vez se usaron los valores normalizados para dar una magnitud unificada de solubilidad a las quimeras y ordenarlas de manera descendente.

Selección de quimeras y síntesis de genes

Se seleccionaron dos quimeras de 3 epítomos y dos de 4 epítomos, las cuales fueron optimizadas al código genético de *E. coli* y, debido a la estructura de los vectores pCri1a y pCri8a, se adicionó un codón de paro en el extremo carboxilo para únicamente conservar el tag de histidinas en el extremo amino. Además, se adicionaron los sitios de restricción (NcoI y XhoI) a los extremos de las secuencias para la subsecuente subclonación. Para la selección, se aplicaron criterios de mayor solubilidad, aplicación de mutaciones, confiabilidad en el modelado 3D y condiciones de posición. Finalmente, los genes se mandaron sintetizar a Syn Biotechnologies (<http://synbio-tech.com/>).

Metodología experimental

Subclonación de mutantes de chagasina y quimeras

Las secuencias se recibieron clonadas en el vector pUC57, por lo que se subclonó por restricción cada gen para obtener el sistema de expresión pCri8a-mutante y pCri-quimera.

Se realizó doble digestión de 10ug del vector destino (pCri8a o pCri1a) y de la construcción pUC-mutante o pUC-quimera según corresponda, las enzimas empleadas fueron NcoI y XhoI (New England Biolabs), ya que flanquean al inserto de interés y a la GFP del vector destino (Figura 26 y 27, apéndice B). Posteriormente se

realizó electroforesis en gel de agarosa y el vector linealizado y los insertos se purificaron mediante el kit QIAGEN Extraction gel.

Se realizó la reacción de ligación usando la enzima ligasa T4 (New England Biolabs), empleando relaciones molares vector-inserto de 1:3 y 1:7 mediante previa cuantificación a 260nm en el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000, utilizando las siguientes condiciones: 16h a 16°C, 2h a 25°C e inactivación 10min a 65°C. Posteriormente, se transformaron células químicamente competentes DH5 α por choque térmico y se realizó la selección de clonas por colonyPCR (T100 Thermal Cycler BioRad), protocolo mostrado en apéndice F.

Expresión en matraz de mutantes (pCri8a) y quimeras (pCri8a y pCri1a)

De las clonas positivas DH5 α se realizó la extracción del DNA plasmídico por lisis alcalina mediante kit QIAGEN spin Miniprep y células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) y soluBL21 se transformaron por choque térmico con la construcción purificada. Posteriormente, se inoculó con una colonia de células transformadas en medio 2TY y al alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.6 a $\lambda=600\text{nm}$, se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de IPTG a las siguientes condiciones de fermentación: Mutantes de chagasina: 0.5mM IPTG, 18h a 20°C y 200rpm; Quimeras: 0.2mM IPTG, 18h a 18°C y 200rpm.

Previo y al final del periodo de inducción se determinó la densidad óptica, y se muestreó el volumen equivalente a 1 unidad de absorbancia (UA) a 600nm, fracciones correspondientes a la no inducida e inducida respectivamente. Del cultivo restante al final de la inducción se tomó nuevamente el volumen equivalente a 1UA, del cual se obtuvieron tanto la fracción soluble como la insoluble. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm, 4°C durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se recuperó la biomasa.

La biomasa se lisó mediante la adición de 45 μL de Bug-Buster (Merck) a la pastilla celular, se resuspendió e incubó en agitación durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm, 4°C durante 30 minutos. Transcurrido este

tiempo, se colectó el sobrenadante (fracción soluble) y la pastilla (fracción insoluble). Todas las fracciones fueron adicionadas con buffer de Laemli 4x (Tris-HCl 250mM, pH 6.8, glicerol 40%, SDS 8%, beta-mercaptoetanol 8% y azul de bromofenol al 0.02%) y fueron analizadas por electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

En el análisis de grado de expresión de mutantes por densitometría, se recuperaron muestras adicionales y una vez recuperada la biomasa se resuspendió en buffer PBS 1x, glicerol 5% y pH 7.4, para realizar la lisis por sonicación: 30% de potencia por 10 ciclos de 30 segundos. Las fracciones solubles fueron cuantificadas por el método del ácido biciconínico (BCA) y se realizó SDS-PAGE estandarizando la cantidad de proteína por fracción, finalmente se ejecutó análisis cualitativo de expresión por ImageLab de Bio-Rad.

En las mutantes de chagasina se realizó una segunda inducción a las condiciones previas descritas en un volumen de fermentación de 500mL para su posterior purificación.

Expresión de quimera Q109 en reactor semicontinuo de 2.5L

Se cultivó un inóculo de 50mL de medio LB a partir de una colonia durante 16 horas a 37°C y 200rpm en agitación orbital, el reactor Applikon de 3L controlado por Celligen BioFlo 310 Bioreactor se esterilizó *in situ* con un 2.25L de medio Basal Salt Media (K₂HPO₄ 5g/L, KH₂PO₄ 3.5g/L, (NH₄)₂HPO₄ 3.5g/L, glicerol 20g/L, extracto de levadura 5g/L) para posteriormente adicionarlo con 1mL/L de solución de Sales Traza para Bacteria (NaCl 5g/L, ZnSO₄ 1g/L, MnCl₂-4H₂O 4g/L, FeCl₃-6H₂O 4.75g/L, CuSO₄-5H₂O 0.4g/L, H₃BO₃ 0.575g/L, Na₂MoO₄-2H₂O 0.5g/L, CaCl₂ 2g/L, H₂SO₄ 0.75N) esterilizada previamente por filtración.

Se inóculó el medio del reactor con la cantidad requerida para alcanzar una DO inicial de 0.05 y se controlaron los siguientes parámetros: pH (hidróxido de amonio al 28%), oxígeno disuelto (velocidad de agitación y flujo de aire), temperatura (serpentín) y espuma (antiespumante no basado en silicio, SIGMA). Durante la primera etapa de

crecimiento en lote se mantuvo la fermentación a 30°C por 10 horas monitoreando el oxígeno disuelto para estimar el consumo del glicerol (fuente de carbono principal), posterior a esto se inició la etapa de alimentación-inducción mediante la adición del medio HCDF1 (glicerol 50%, MgCl₂ 20mM) y del IPTG hasta alcanzar una concentración de 0.25mM, la etapa tuvo una duración de 20h a 20°C. Finalmente la biomasa se cosechó en alícuotas de 20 gramos para su posterior purificación.

Lisis celular

La biomasa se recuperó por centrifugación y se lavó con PBS 1X pH 7.4, para posteriormente resuspender en buffer de lisis: (TrisHCl 50mM, pH 9.3, NaCl 0.5M, imidazol 50mM, glicerol 5%, beta-mercaptoetanol 1mM y cocteles de proteasas). Como primer paso se incubó con lisozima 0.5mg/mL a 37°C por 30min, posteriormente se realizó lisis mecánica (sonicación) con 10 ciclos de 30 segundos a 30% potencia, e incubación con DNAasa a 1ug/mL por 30min a 30°C, para finalmente obtener la fracción soluble por centrifugación a 13000 rpm durante 30 min.

Purificación de mutantes de chagasina

La purificación se realizó por cromatografía de afinidad IMAC-Ni en el sistema ÄKTA pure (Cytiva), empleando columnas pre-empacadas de Níquel-Sefarosa His Trap FF de 5mL, los buffers empleados para equilibrio, lavado (buffer A) y elución (buffer B) poseen la misma composición del buffer de lisis, modificando únicamente la concentración de imidazol (Buffer A a 50mM y Buffer B a 500mM). La cromatografía constó de las siguientes fases: equilibrio, muestra (fracción soluble), lavados con Buffer A, lavado con buffer B al 7%, gradiente de imidazol (7-100%) y elución final (100%B). Las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE de acuerdo con las señales de fluorescencia a 280nm.

Purificación de quimera Q109

El primer paso de purificación por IMAC se realizó con el mismo protocolo y sistema empleado en la purificación de mutantes de chagasina, con la adición de un paso extra de lavado previo a la elución, el cual consiste en Buffer A adicionado con TritónX-114 al 0.1%, para la eliminación endotoxinas. Posterior al análisis SDS-PAGE y con el

objetivo de eliminar contaminantes y concentrar la proteína se realizó un segundo paso de purificación por IMAC, donde se conservaron las fases a excepción de la reducción en volumen de columna del gradiente. Como paso final se realizó en el mismo sistema la purificación por exclusión de tamaño (SEC), empleando columnas pre-empacadas HiLoad 26/600 Superdex 200pg de 320mL, empleando fases de equilibrio, paso de muestra (6mL) y eluciones de 1.5 volúmenes de columna (480mL). La proteína fue concentrada y cambiada de buffer a PBS 1x por ultrafiltración en membrana de 3 kDa (Pellicon-Cassette with Ultracel). La determinación de endotoxinas se realizó mediante el sistema portable de nexgen-PTS Endosafe.

Purificación de quimera Q109-MBP

Se realizó la lisis celular de acuerdo con el protocolo previamente descrito, tomando únicamente al final de la centrifugación a la fracción insoluble, la cuál fue acondicionada por soluciones de lavado y de solubilización, mediante pasos alternados de homogenización (8000rpm), incubación (4°C, 15 min) y centrifugación (16000g, 4°C, 15min). El procedimiento constó de 6 pasos de lavado: WB I (TrisHCl 50mM, pH 8.0, NaCl 0.5M, EDTA 1mM, DTT 1mM), WB II (TrisHCl 50mM, pH 8.0, NaCl 0.5M, EDTA 100mM, DTT 1mM, Urea 2M), WB III (TrisHCl 50mM, pH 8.0, NaCl 0.5M, EDTA 100mM, Gnd-HCl 2M), WB IV (TrisHCl 50mM, pH 8.0, NaCl 20mM, EDTA 10mM, beta-mercaptoetanol 2M, sarkosyl 0.1%), WB V (TrisHCl 50mM, pH 8.0, NaCl 20mM, DTT 1mM), y WB VI (TrisHCl 50mM, pH 8.0) y un paso de solubilización (TrisHCl 50mM, pH 8.5, NaCl 250mM, beta-mercaptoetanol 0.5mM, urea 8M).

Se purificó con el mismo protocolo y sistema empleado en la purificación de mutantes de chagasina por IMAC, con la adición de urea 8M a todos los buffers de purificación y las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE de acuerdo con las señales de fluorescencia a 280nm.

Estabilidad térmica

La estabilidad de las proteínas recombinantes purificadas se determinó por termofluorometría (Huynh, K. y Partch, C. 2015). Primero se realizó el cambio de buffer a 75µL de las fracciones purificadas mediante filtración en gel por las columnas

(microBioSpin6 Biorad), obteniendo así a las mutantes a pH 9.3, 8.5, 7.5, 6.0 y 4.5, mediante la elución con buffer TrisHCl, BisTris ó acetatos dependiendo el pH.

Las reacciones se llevaron a 25 μ L, a concentración final de SyproOrange 10X y 15 μ M de proteína, condiciones las cuales fueron optimizadas, además, se empleó el filtro de fluorescencia HEX y un gradiente de temperatura de 25-90°C para la determinación de las curvas de desnaturalización en termociclador qPCR.

Inmunodetección por Western-blot

Se realizó la inmunodetección de determinadas fracciones de expresión de las proteínas quiméricas mediante Western-blot con revelado colorimétrico indirecto. Primeramente, las fracciones se sometieron a electroforesis de poliacrilamida desnaturalizante para después transferir el perfil proteico del gel a una membrana de nitrocelulosa, empleando transferencia en húmedo y buffer de transferencia en frío, corroborando con tinción de rojo Ponceu, y lavados a la membrana con amortiguador PBS 1x.

Consecutivamente el bloqueo de la membrana se realizó con una solución de leche baja en grasa 5% y Tween 0.1% diluidas en PBS1x, incubando 18h a 4°C, seguidamente se realizó la incubación del anticuerpo primario a su título correspondiente (α -chagasina, α -histidinas, α -TSA1, ó α -Q109) por 18h a 4°C. Finalmente la incubación con el anticuerpo secundario según sea el animal de origen del anticuerpo primario (α -mouse, α -rabbit o α -goat) por 2.5h a 25°C. Al final de cada paso de tinción, bloqueo o incubación se realizaron 5 lavados de 10min a la membrana con solución de PBS1x a temperatura ambiente. El revelado por colorimetría se efectuó mediante la reacción de una solución de TBS1x y H₂O₂ y una solución de metanol y peroxidasa de rábano picante.

Resultados y Discusión

Mutación a la chagasina

El análisis bioinformático de mutación asistida por Agresscan3D proporciona los residuos de aminoácidos más propensos a mutar y los mejores candidatos sustituyentes para incrementar la solubilidad (Tabla 5). Tomando en cuenta estos resultados se seleccionaron las siguientes mutaciones: V18R, V18K, F58R, F58K, y sus combinaciones de estas: V18K- F58K, V18R-F58K, V18K- F58R, V18R- F58R.

Tabla 5. Mutación asistida para incrementar solubilidad de la chagasina.

Aa propenso a causar agregación	Aa recomendado a sustituir	Efecto energético (kcal/mol)	Diferencia en score
Val 18	Arg	-0.3147	-0.0980
	Lys	-0.3777	-0.0883
Phe 58	Arg	0.6055	-0.0807
	Lys	0.6352	-0.0824
Phe 34	Lys	0.4403	-0.0624
Leu 21	Lys	0.6734	-0.0555
Met 1	Arg	-0.1962	-0.0559
	Lys	-0.1584	-0.0505

Como se observa, los residuos más propensos a disminuir la solubilidad y causar agregación tras el análisis son la fenilalanina (Phe) 58 y la valina (Val) 18 (Figura 6), indicando como mejores aminoácidos sustituyentes a la arginina (Arg) y la lisina (Lys) que presentan carga positiva en su cadena lateral, aumentando así la interacción con el solvente, además, se ha reportado que la sustitución de residuos hidrofóbicos expuestos en la superficie por residuos cargados positivamente puede mejorar significativamente la solubilidad de la proteína a pH fisiológico (Mosavi y Peng, 2003). De esta forma se evaluó *in silico* el efecto en solubilidad de las mutaciones solas y combinadas (Tabla 6), seleccionando a las cuatro combinaciones de mutaciones dobles debido al significativo aumento de solubilidad predicha.

Tabla 6. Predicción de la solubilidad de las mutantes de chagasina

Mutación	Aggrescan3D	CamSol	Normalizado
WT	-92.4088	0.5433	2.000
V18R	-103.32	0.7555	2.478
V18K	-102.25	0.7498	2.457
F58R	-100.50	0.6699	2.291
F58K	-101.42	0.6599	2.283
V18R-F58R	-112.25	0.8820	2.838
V18R-F58K	-112.34	0.8720	2.820
V18K-F58R	-111.39	0.8764	2.818
V18K-F58K	-111.29	0.8663	2.799

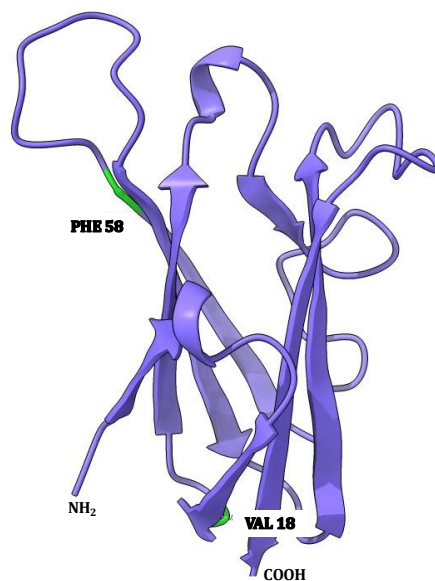


Figura 6. Mutación a la chagasina. Chagasina con sitios susceptibles a sustituir, en verde Val18 y Phe58. Estructura elaborada en UCSF ChimeraX.

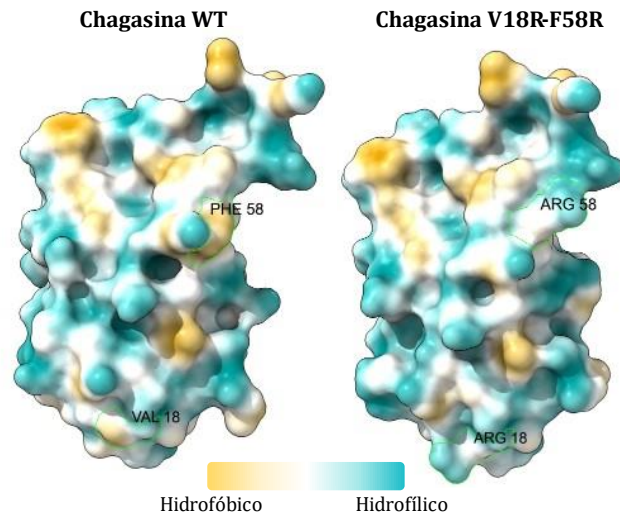


Figura 7. Comparación de hidrofobicidad en superficie, a la izquierda la Chagasina WT y a la derecha la Chagasina V18R-F58R, la escala mostrada indica en azul las regiones hidrofílicas, en blanco las regiones neutras y en amarillo regiones hidrofóbicas. Estructuras elaboradas en UCSF ChimeraX.

Subclonación, expresión y termo-estabilidad de mutantes

Como confirmación de la subclonación, se evaluó la generación del amplicón del tamaño aproximado de 593pb (Figura 30, apéndice F) al realizar colonyPCR a las colonias DH5 α , transformantes con el producto de la ligación (Figura 8).

Con el objetivo de evaluar experimentalmente el impacto de las mutaciones a la molécula de andamiaje se realizó la expresión en *E. coli* BL21 de las cuatro mutantes dobles de chagasina, conservando la estrategia y condiciones de fermentación-inducción. En todos los ensayos de expresión, la proteína se expresó en forma soluble y con similar intensidad visualizada en SDS-PAGE (Figura 9B y 9C). El análisis densitométrico de las fracciones solubles (Figura 10), mostró que todas las mutantes, con excepción de ChagV18K-F58R, se expresaron de manera soluble similar con hasta un 12% más soluble que la chagasina. Sugiriendo que estas modificaciones pudieran mejorar la solubilidad de las quimeras de chagasina conteniendo tres o cuatro epítomos de TSA-1.

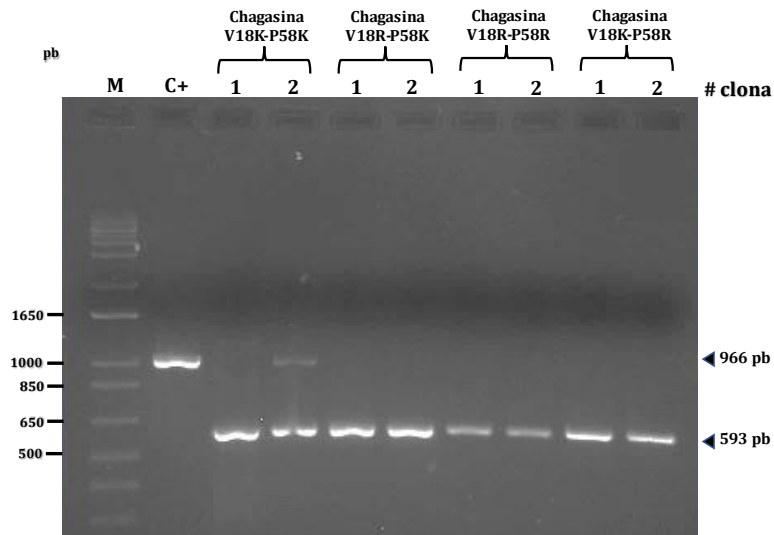


Figura 8. Análisis de clonas. Electroforesis en gel de agarosa: Amplicones positivos tras colonyPCR, dos clonas analizadas por mutante. (M: marcador de tamaño, C+: pCri8-GFP) Gel de agarosa al 1.2%, buffer: TBE 0.5x

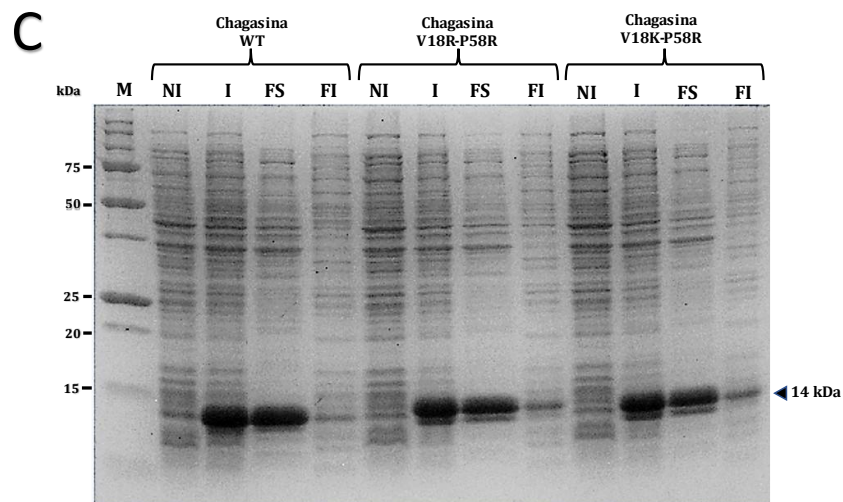
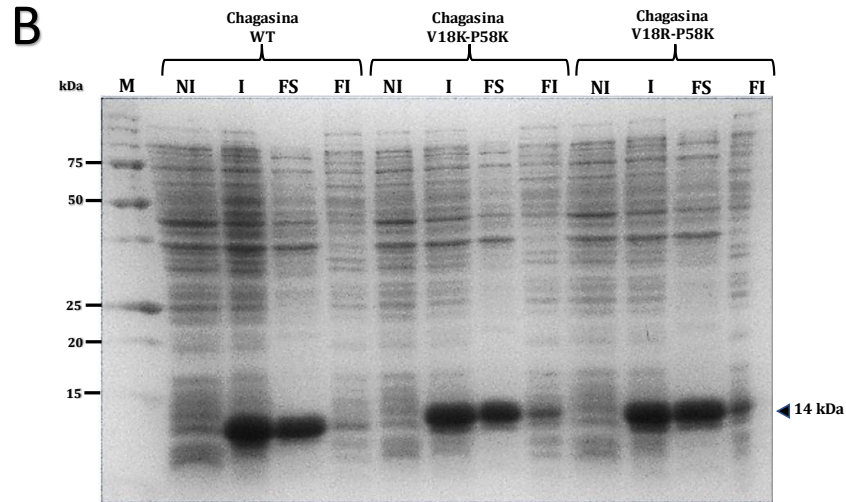


Figura 9. Expresión de las mutantes, análisis SDS-PAGE. (A). ORF del pCri8a-mutante, (B) mutantes V18K-F58K y V18R-F58K, (C) mutantes V18R-F58R y V18K-F58R. Las fracciones se indican como NI: no inducida, I: inducida, FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble, M: marcador de peso molecular. Gel de acrilamida al 15%

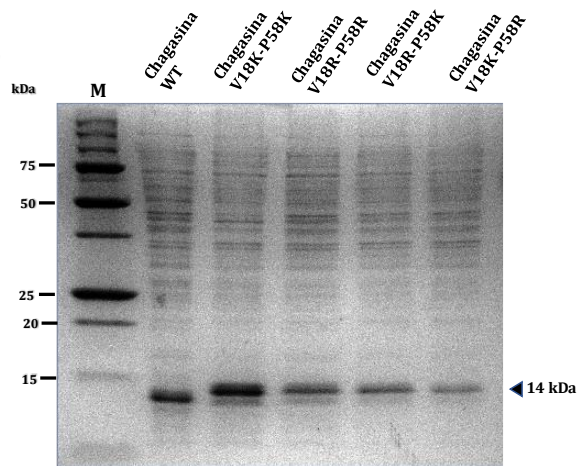


Figura 10. Análisis por densitometría. Análisis SDS-PAGE de la fracción soluble estandarizada a 4µg de proteína del extracto, gel empleado para el análisis de densitometría, M: marcador de peso molecular. Gel de acrilamida al 15%.

Tabla 7. Análisis cualitativo mediante ImageLab

Mutante	Abreviatura	%Intensidad	µg Proteína
			µg Proteína Total Soluble
V18K-F58K	KK	111.8	0.074
V18R-F58R	RR	107.2	0.072
V18R-F58K	RK	104.5	0.069
Wild-Type	WT	100.0	0.066
V18K-F58R	KR	74.4	0.050

Los cromatogramas de la purificación de las mutantes presentan ligeras variaciones en el perfil de elución (Figura 28, apéndice D) debido a la diferente exposición del tag de 6 histidinas dadas las mutaciones y su cercanía del aminoácido 18 al extremo amino terminal (Figura 6).

En cuanto al análisis de termo-estabilidad, el presentar mayor grado de aminoácidos hidrofílicos en la superficie (para mejorar la interacción con el solvente) no garantiza mayor estabilidad estructural frente a un incremento en la energía térmica, las mutantes presentaron un decremento en su termo-estabilidad de entre 2 y 7°C respecto a la variante silvestre, se observa además un mayor decremento (Figura 11) al realizar el ensayo a un pH cercano al punto isoeléctrico (pI: 6.5-7.5) y una desnaturalización total al exponer las proteínas isotérmicamente a pH 4.5. Sin embargo, la termo-estabilidad no es un requerimiento farmacéutico para la generación de antígenos vacunales.

Tabla 8. Temperatura de fusión (Tm) de las mutantes de chagasina

Mutante	pH 9.3	pH 8.5	pH 7.5	pH 6.0	pH 4.5
WT	68.9	66.75	63.9	61.06	67.09
KK	63.5	58.95	57.04	52.02	52.29
RK	63.3	58.84	58.58	53.33	64.06
KR	63.8	59.16	58.1	56.30	56.99

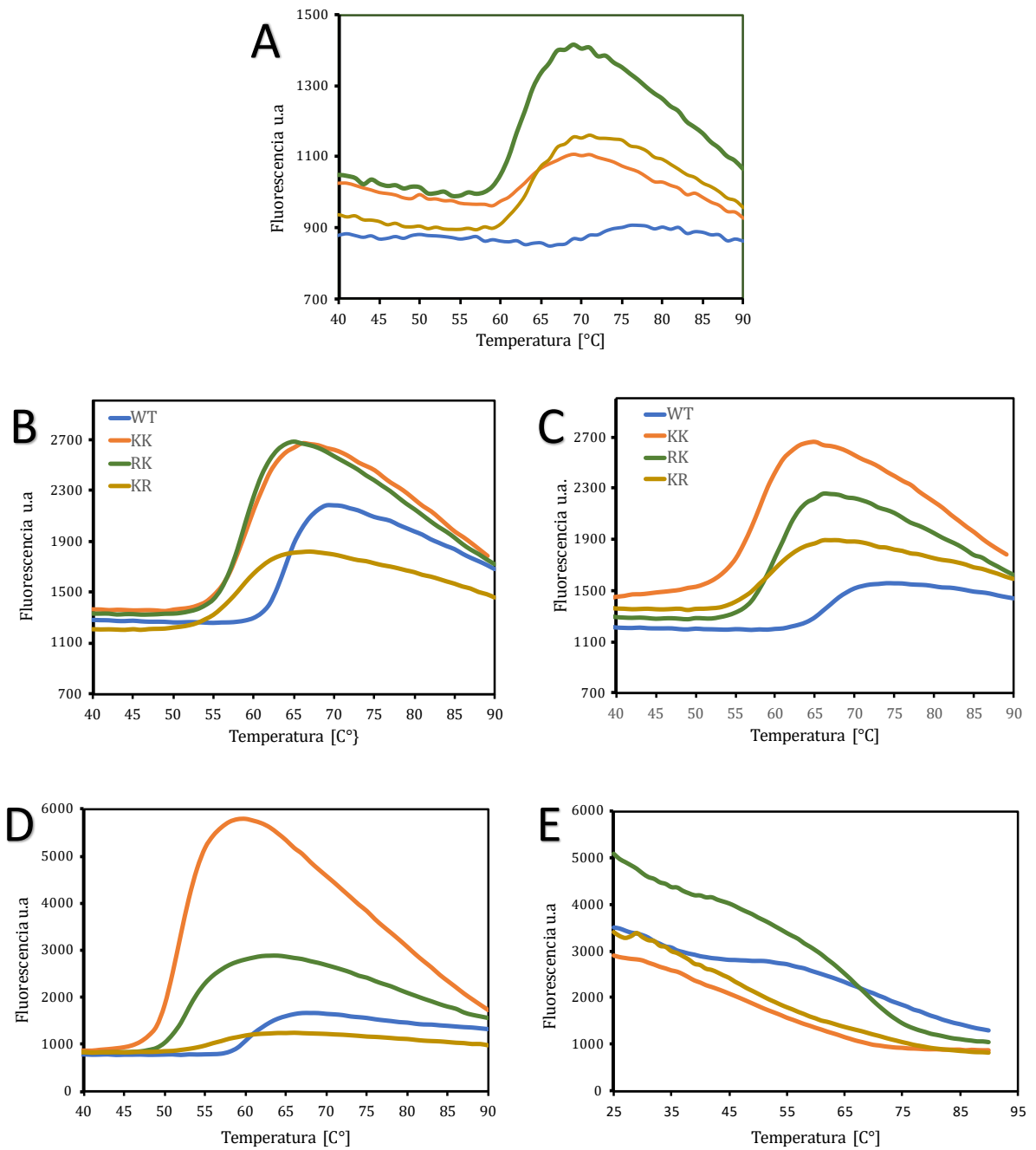


Figura 11. Estabilidad térmica de las mutantes de chagasina. Ensayo Thermal shift a multiples pH: (A) pH 9.3, (B) pH 8.5, (C) pH 7.5, (D) pH 6.0, (E) pH 4.5

Diseño *in silico* de quimeras y predicción de su solubilidad

La exposición y cantidad de aminoácidos que conforman los giros/epítomos son propiedades que fundamentan la sustitución y formación de quimeras, con entre 7 a 9 aminoácidos en los epítomos y giros no se espera un cambio conformacional estructural global, significativo u forzado, sin embargo, las propiedades, el orden de los aminoácidos y las interacciones de estos pueden influir en la formación de estructuras secundarias o cambios en los motivos característicos de inhibidores de cisteín-proteasas de *Trypanosoma*, fenómeno observado en la predicción estructural de algunas quimeras (Figura 12).



Figura 12. Quimera Q8 (Q4E_8 V18K-F58K), quimera más soluble formada por 4 epítomos con distorsión en los motivos estructurales y baja confiabilidad en el modelado (pLDDT: 35.2). Estructura elaborada por AlphaFold2 y acondicionada en UCSF ChimeraX.

En la formación de quimeras de cuatro epítomos la sustitución de dos péptidos en un giro estructural requiere generar una separación mediante un linker, el empleo de Gly-Ser-Gly-Ser (GSGS) se fundamenta en las propiedades fisicoquímicas de la glicina, como ausencia de carga (no modifica el pI), tamaño pequeño, flexibilidad, mejora de solubilidad y resistencia a proteólisis, además, los linker de glicina en combinación con serina son preferidos en la formación de vacunas multiepítomo (Negahdaripour *et al.*, 2018).

La combinación de flexibilidad y solubilidad hace que los linkers GSGS sean ideales para conectar diferentes dominios proteicos y permitir su libre actuar sin interferir con su función. Específicamente este linker se encuentra en la base de datos del Centro de Bioinformática de la Universidad de Vrije–Amsterdam, y ha sido empleado en la unión de proteínas antigénicas (Bird *et al.*, 1988; George y Heringa, 2002).

De las 180 quimeras y sus predicciones de solubilidad (Tablas 16 y 17, apéndice C) es evidente la disminución en el score de solubilidad al sustituir el Epítipo 4 en cualquiera de los giros, tanto en quimeras de 3 y 4 epítipos. Los resultados en los 5 servidores indican no solo baja solubilidad (CamSol), sino también una alta propensión a agregación (Aggrescan3D). Se observa en las 10 quimeras más solubles (Figura 13) que ninguna alberga en su estructura a este epítipo. La secuencia aminoacídica puede explicar parcialmente este fenómeno, ya que, de los 9 aminoácidos que lo componen, 5 son no polares (1 isoleucina, 2 fenilalaninas y 2 valinas), aminoácidos pertenecientes al top 5 de mayor hidrofobicidad en escala Kyte & Doolittle (Jiang *et al.*, 2006), y los primeros 3 en la escala de hidrofobicidad de energía libre de transferencia en transporte de membranas biológicas (Tauquir *et al.*, 2016).

En las quimeras formadas por 3 epítipos se observa una tendencia a los scores más altos de solubilidad al sustituir en cualquier combinación a los epítipos E1, E3 y E5 de manera indiferente a su posición, mostrando ser los menos hidrofóbicos, seguidos de las quimeras con las combinaciones de epítipos {E1, E2 y E3}; {E2, E3, E5} y {E1, E2, E5}. Esto puede deberse a que el epítipo E2 a diferencia de E5, E3 y E1 posee únicamente un aminoácido cargado dentro de sus 3 aminoácidos polares.

En las quimeras formadas por 4 epítipos no es posible observar tal distinción de composición-solubilidad, ya que al excluir al E4 por su hidrofobicidad todos los restantes epítipos (E1, E2, E3 y E5) están presentes en todas las quimeras, influyendo únicamente en este caso la posición e interacción entre los epítipos.

Se consideró únicamente para la selección de las quimeras a los servidores CamSol y Aggrescan3D 2.0, debido a que los servidores Protein-sol y SODOPE con predicción

a base de la secuencia de aminoácidos emplean únicamente para la estimación final parámetros basados en composición aminoacídica y propiedades fisicoquímicas. Por otro lado, SOLart presenta únicamente potenciales estadísticos: de distancia (describen interacciones terciarias), potenciales de ángulo de torsión (describen interacciones locales) y potenciales de accesibilidad del solvente. Esto sumado a la ausencia de actualizaciones desde su primera versión y la no correspondencia a los datos generados por los demás servidores hace que se descarte y no se considere para la selección (Hou *et al.*, 2020).

Los dos servidores seleccionados contemplan mayor número de variables para la predicción, como lo es la posición e interacción entre átomos, detección de sitios hidrófobos susceptibles a formación de agregados, descartando aquellos no expuestos, estabilidad (energía libre de Gibbs), flexibilidad estructural y análisis dinámicos (Kuriata *et al.*, 2019), además, estos servidores reciben actualizaciones constantemente.

La predicción por Aggrescan3D y CamSol recibió el mismo nivel de relevancia, proponiendo una normalización de datos donde un valor de 2.0 representa los scores generados a la estructura de la chagasina en ambos servidores, resultado de la suma de 1.0 de Aggrescan3D (score -92.4088) y 1.0 de CamSol (score 0.5433), así, al obtener por ejemplo para una quimera un valor normalizado de 0.8 en Aggrescan3D se interpreta como un 80% de la solubilidad de la chagasina.

De las secuencias de las quimeras y los scores de solubilidad obtenidos para las quimeras de 3 y 4 epítomos (apéndice, Tabla 15 y 16), se consideró únicamente a las que figuran con más alto score de solubilidad normalizado (Figura 13) para evaluar posteriores criterios de selección.

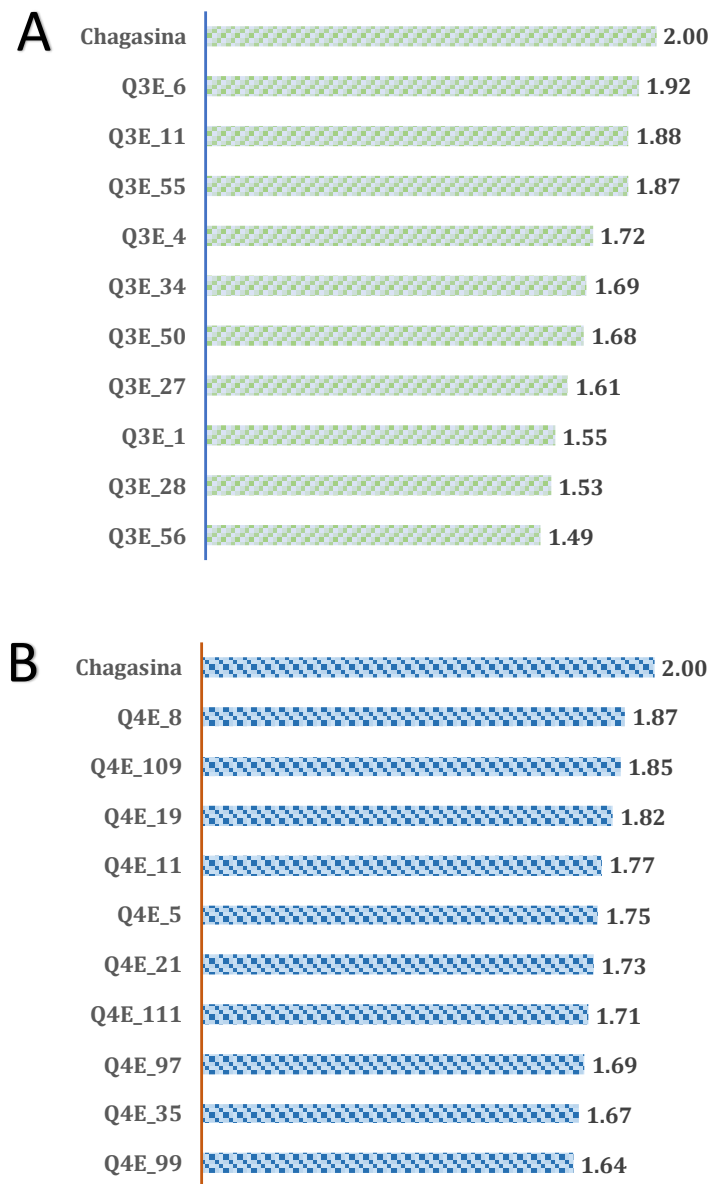


Figura 13. Quimeras con mayor score de solubilidad. (A) Quimeras de 3 epítomos. **(B)** Quimeras de 4 epítomos, como referencia la chagasina con score de 2.00.

Criterios de selección de quimeras

Cárdenas-Guerra y colaboradores analizaron *in silico* y expresaron quimeras de chagasina con dos epítomos de TSA-1, adquiriendo considerables niveles de expresión soluble en *E. coli*, donde notablemente el Epítomo 5 se encuentra en sustitución al giro L4 en las quimeras más solubles y con mayor nivel de expresión (2024). Con base a este antecedente directo se estableció la condición de posición del E5 en L4 como criterio en la selección de las quimeras a expresar.

En la predicción y generación de modelos 3D por AlphaFold2 se adquieren medidas de confianza necesarias para ser consideradas predicciones validas. Así, AlphaFold2 proporciona el parámetro llamado pLDDT (prueba de diferencia de distancia local predicha) en una escala de 0 a 100, el cual estima que tan bien es aceptada la predicción, con valores aceptables mayores a 70, y de alta precisión mayores a 90 (Tunyasuvunakool *et al.*, 2021). Por lo tanto, el efecto en el cambio estructural al realizar las sustituciones y mutaciones el parámetro de pLDDT en el modelado 3D por AlphaFold2 es un criterio adicional para la selección de las quimeras a expresar.

De los resultados experimentales en la expresión de mutantes se analizó la aplicación de estas a las quimeras más solubles procurando la mayor conservación de los valores de confianza estructurales (pLDDT). Finalmente se seleccionó la quimera de 3 y 4 epítomos con mayor score de solubilidad normalizado, un nivel de confianza estructural: pLDDT>70 en AlphaFold2 y las dobles mutaciones que conserven el nivel de confianza y que aumente la solubilidad (Tablas 11 y 12), además, una quimera que cumpla la condición del E5 en L4, para cada tipo de quimera (Tablas 9 y 10), seleccionando así 2 quimeras de 3 y 2 de 4 epítomos. Las cuatro quimeras seleccionadas se muestran en la Figura 15.

Tabla 9. Predicción de la solubilidad de las proteínas quiméricas con tres epítopos de TSA-1

Quimera	Mutación	Agresscan3D	CamSol	Normalización	pLDDT
Q3E_6	-	-75.6700	0.6119	1.923	73.6
	V18R-F58R	-94.9600	0.9170	2.717	30.2
	V18K-F58K	-111.660	0.9030	2.870	35.4
	V18K-F58R	-93.0400	0.9120	2.686	81.0
	V18R-F58K	-110.590	0.9085	2.869	36.8
Q3E_11	-	-78.8800	0.5694	1.879	83.1
	V18R-F58R	-105.880	0.9174	2.834	33.5
	V18K-F58K	-89.4666	0.9070	2.637	51.0
	V18K-F58R	-93.0640	0.9119	2.685	50.9
	V18R-F58K	-102.941	0.9125	2.793	30.8
Q3E_55	-	-90.9877	0.4978	1.875	82.2
	V18R-F58R	-98.2753	0.8034	2.542	78.3
	V18K-F58K	-101.342	0.7889	2.549	77.8
	V18K-F58R	-94.5391	0.7989	2.493	80.4
	V18R-F58K	-102.686	0.7944	2.573	81.5
Q3E_34	-	-70.2200	0.5181	1.693	82.5
	V18R-F58R	-89.0594	0.8661	2.558	78.1
	V18K-F58K	-91.1531	0.8557	2.561	81.9
	V18K-F58R	-89.6425	0.8606	2.554	78.6
	V18R-FK58	-85.7115	0.8612	2.512	79.9

Tabla 10. Predicción de la solubilidad de las proteínas quiméricas con cuatro epítopos de TSA-1

Quimera	Mutación	Agresscan3D	CamSol	Normalización	pLDDT
Q4E_8	-	-77.7309	0.5688	1.870	64.4
	V18R-F58R	-101.743	0.8582	2.681	33.4
	V18R-F58K	-102.550	0.8498	2.674	31.0
	V18K-F58R	-89.3782	0.8530	2.537	32.2
	V18K-F58K	-95.0398	0.8446	2.583	35.2
Q4E_109	-	-97.4620	0.4442	1.850	70.1
	V18R-F58R	-105.355	0.7336	2.490	75.4
	V18R-F58K	-90.4916	0.7251	2.314	60.4
	V18K-F58R	-110.591	0.7284	2.537	75.1
	V18K-F58K	-91.7385	0.7199	2.318	78.6
Q4E_19	-	-78.2568	0.5367	1.818	78.1
	V18R-F58R	-84.3279	0.8663	2.507	72.4
	V18R-F58K	-72.4448	0.8617	2.370	71.9
	V18K-F58R	-75.7219	0.8611	2.404	74.4
	V18K-F58K	-82.2270	0.8565	2.466	68.9
Q4E_53	-	-58.9068	0.5311	1.601	75.6
	V18R-F58R	-117.186	0.8219	2.781	27.6
	V18R-F58K	-98.0212	0.8142	2.559	47.4
	V18K-F58R	-91.9196	0.8167	2.498	55.3
	V18K-F58K	-128.232	0.8090	2.877	54.6

Quimeras seleccionadas a sintetizar y expresar:

Tabla 117. Quimeras de 3 epítomos seleccionadas

Quimera	Epítomos			Secuencia de aminoácidos
	L2	L4	L6	
Q3E_6_ V18K-F58R	E1	E3	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAKGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGTKE SPNESMFTVEN KYRPPRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLT YMRPLLYSDDALHLSERFTVYL KAN
Q3E_34_ V18R-F58K	E3	E5	E1	MSHKVTKAHNGATLTVARGELVEIQLPRLTEELNTI AWYFEGGTKE SPNESMFTVEN KYKPLLYSDDALHLLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLT YMRPKLFPEVIDLSERFTVYL KAN

Tabla 128. Quimeras de 4 epítomos seleccionadas

Quimera	Epítomos				Secuencia de aminoácidos
	L2	L4-1	L4-2	L6	
Q4E_19_ V18R-F58R	E1	E5	E2	E3	MSHKVTKAHNGATLTVARGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGTKE SPNESM FTVENKYRPLLYSDDALHLGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVN LT YMRPRLTEELNTI SERFTVYLKAN
Q4E_109_ V18K-F58K	E5	E3	E1	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAKGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGTKE SPNES MFTVENKYKPPRLTEELNTIGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVN LT YMRPIVMGNGTLV SERFTVYLKAN

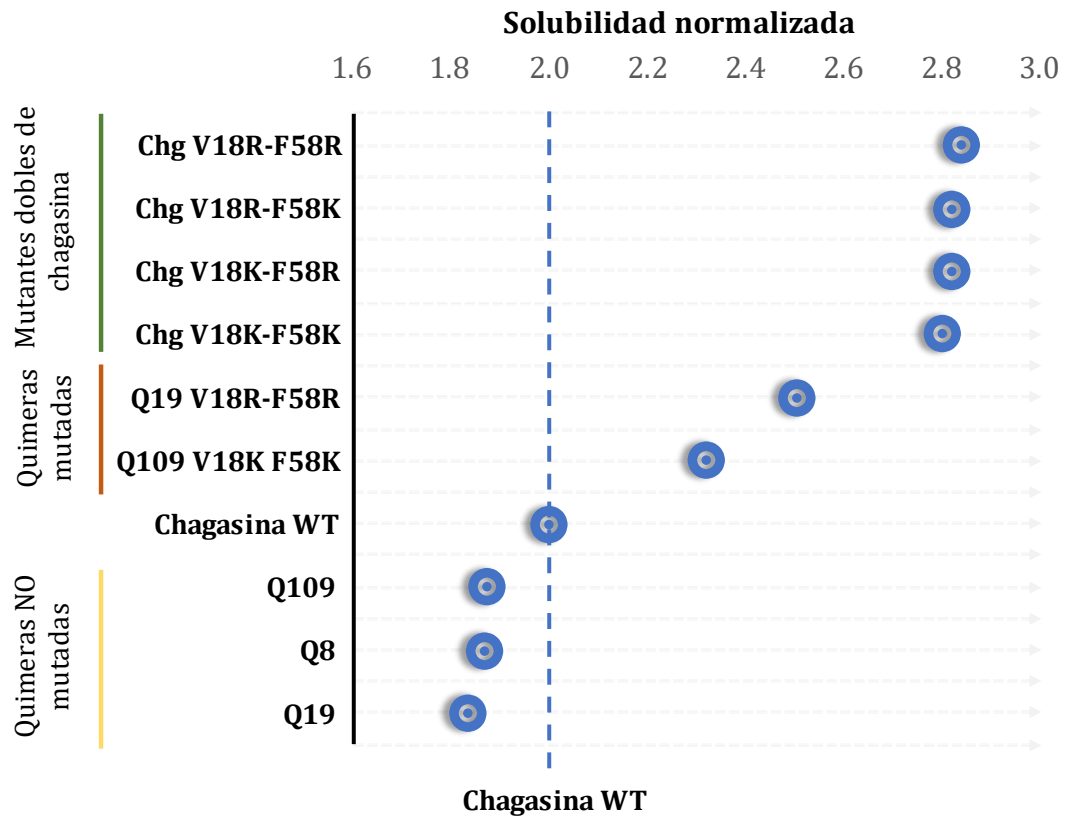


Figura 14. Efecto en la solubilidad *in silico* antes y después de mutar la molécula de andamiaje, comparado con la chagasina silvestre (WT).

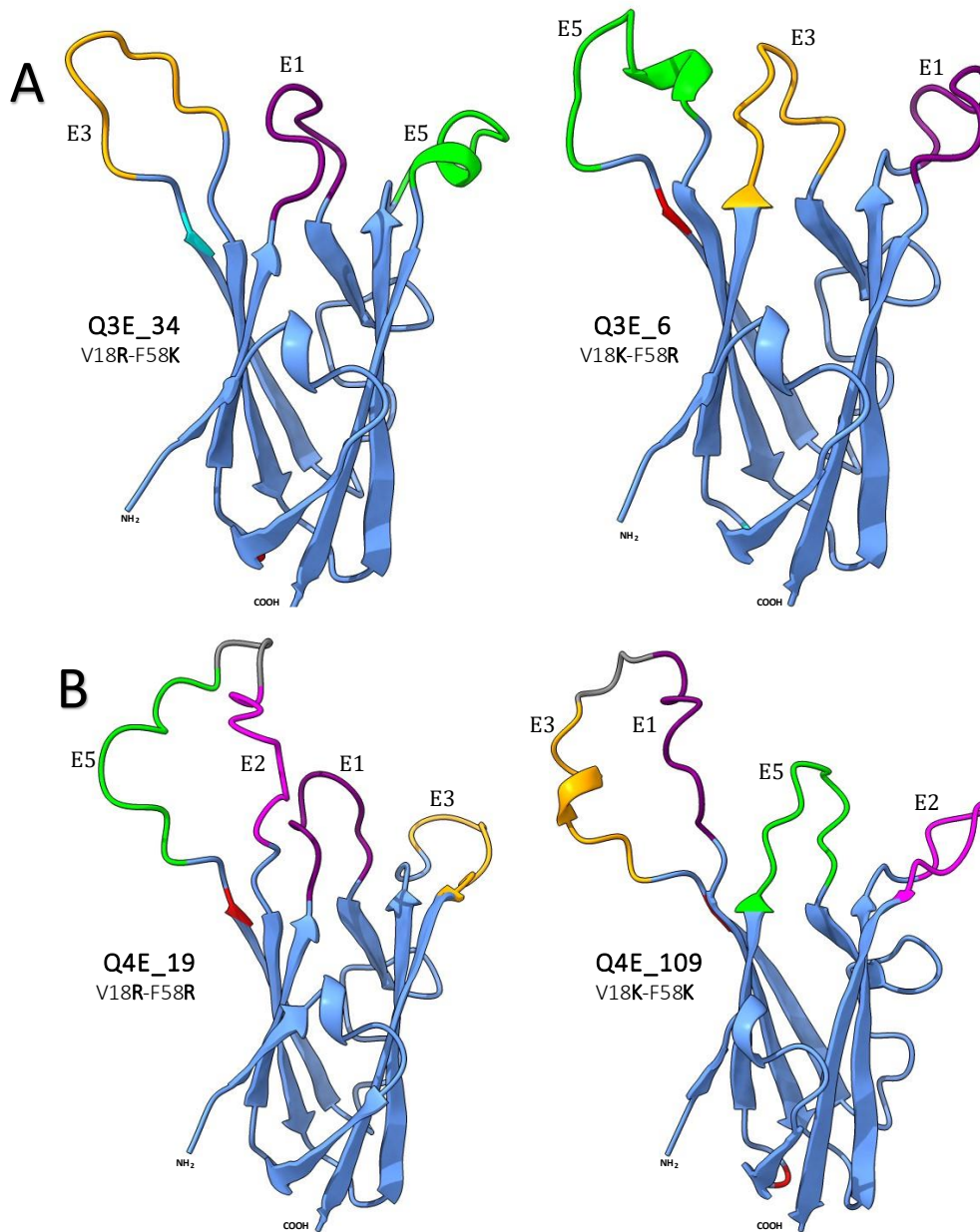


Figura 15. Estructura 3D de las quimeras seleccionadas. (A) Estructuras 3D de las quimeras con 3 epítomos. Izquierda Q3E_34 V18R – F58K. Derecha Q3E_6 V18K – F58R. (B) Estructuras 3D de las quimeras con 4 epítomos. Izquierda Q4E_19 V18R – F58R. Derecha Q4E_109 V18K – F58R. En color Verde: epítomo 5; Amarillo: epítomo 3; Púrpura: epítomo 1; Magenta: epítomo 2; Rojo: mutación V18K y F58K; Cian: mutación V18R y F58R; Gris: linker GSGS. Estructuras elaboradas por AlphaFold2 y acondicionadas en UCSF ChimeraX.

Subclonación y expresión e inmunodetección de quimeras

Para la presentación gráfica de los resultados experimentales pertenecientes a la clonación y expresión de quimeras seleccionadas se abrevió el nombre como lo indica la siguiente tabla, dando como referencia que cuando se mencione alguna, se da por entendido cuántos epítomos y qué mutaciones posee:

Tabla 149. Propiedades de las quimeras seleccionadas.

Quimera	Núm. de epítomos	Abreviatura	pI	Peso molecular (kDa)
Q3E_6 VK18-FR58	3	Q6	6.29	13.174
Q3E_34 VR18-FK58	3	Q34	6.29	13.174
Q4E_19 VR18-FR58	4	Q19	6.29	14.370
Q4E_109 VK18-FK58	4	Q109	6.29	14.319

En el análisis de clonas de DH5 α se evaluó la presencia del amplicón del tamaño esperado tras el ensayo colonyPCR, la longitud depende del vector destino, el amplicón visualizado en el gel de agarosa confirma la presencia del constructo deseado (Figura 30, apéndice F), mientras que en la expresión de las proteínas el peso molecular esperado es correspondiente al tag al que esté fusionado (Figura 16). En la Figura 18 se observan las fracciones correspondientes a la expresión de las quimeras de 3 (Q6 y Q34) y 4 (Q19 y Q109) epítomos respectivamente, todas fusionadas a MBP y en la Figura 19 las quimeras de 4 epítomos (Q19 y Q109) sin tag de solubilización

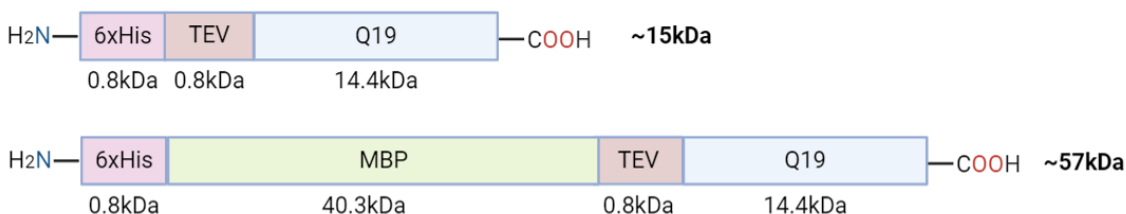


Figura 16. Peso molecular teórico de las quimeras expresadas

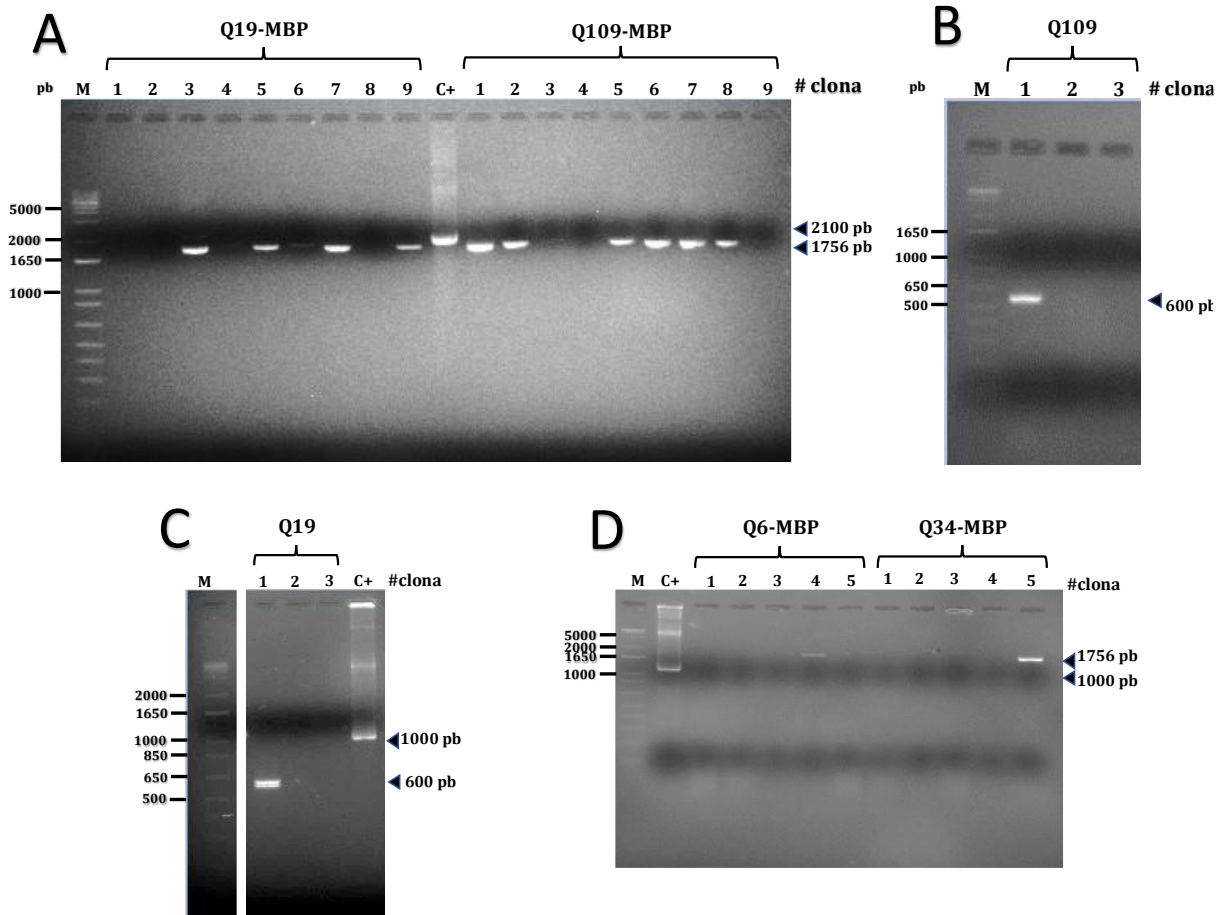


Figura 17. Confirmación de construcción y selección de transformantes por colonyPCR. (A) Clonas analizadas para las quimeras de 4 epítomos fusionadas a MBP, C+: pCri1a-GFP, agarosa: 1.2% (B) y (C) Clonas analizadas para las quimeras de 4 epítomos, C+: pCri8a-GFP, agarosa 1.5%. (D) Clonas analizadas para las quimeras de 3 epítomos fusionadas a MBP, C+: pCri8a-GFP, agarosa 2%. Electroforesis en gel de agarosa: (M marcador, C+: control positivo), Buffer: TBE 0.5x.

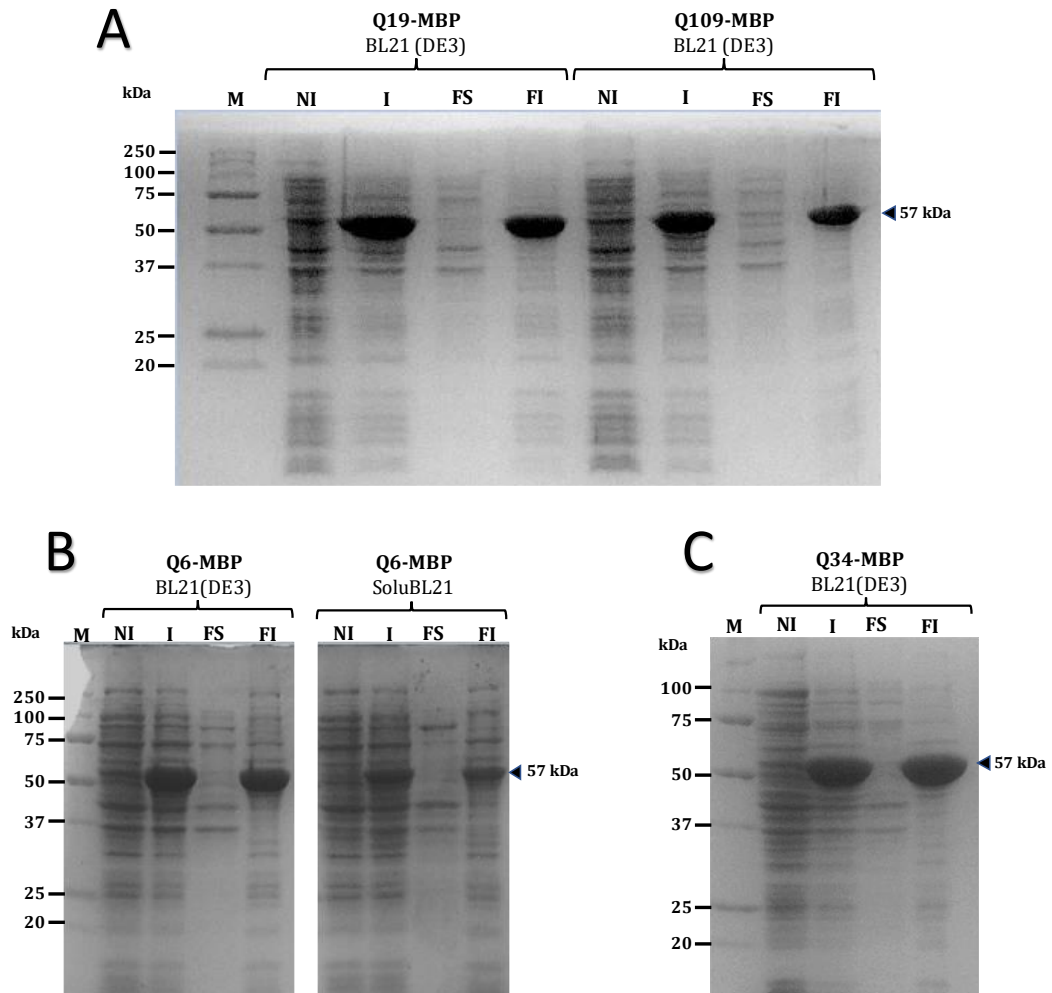


Figura 18. Expresión de las quimeras fusionadas a MBP, análisis SDS-PAGE. (A) Perfil de expresión de Q19-MBP y Q109-MBP en la cepa BL21, acrilamida 15%. (B) Perfil de expresión de Q6-MBP expresada en la cepa BL21 (izquierda) y soluBL21 (derecha), acrilamida 12%. (C) Perfil de expresión de Q34-MBP expresada en la cepa BL21, acrilamida 12%. Las fracciones se indican como NI: no inducida, I: inducida, FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble, M: marcador de peso molecular. Gel de acrilamida al 15%

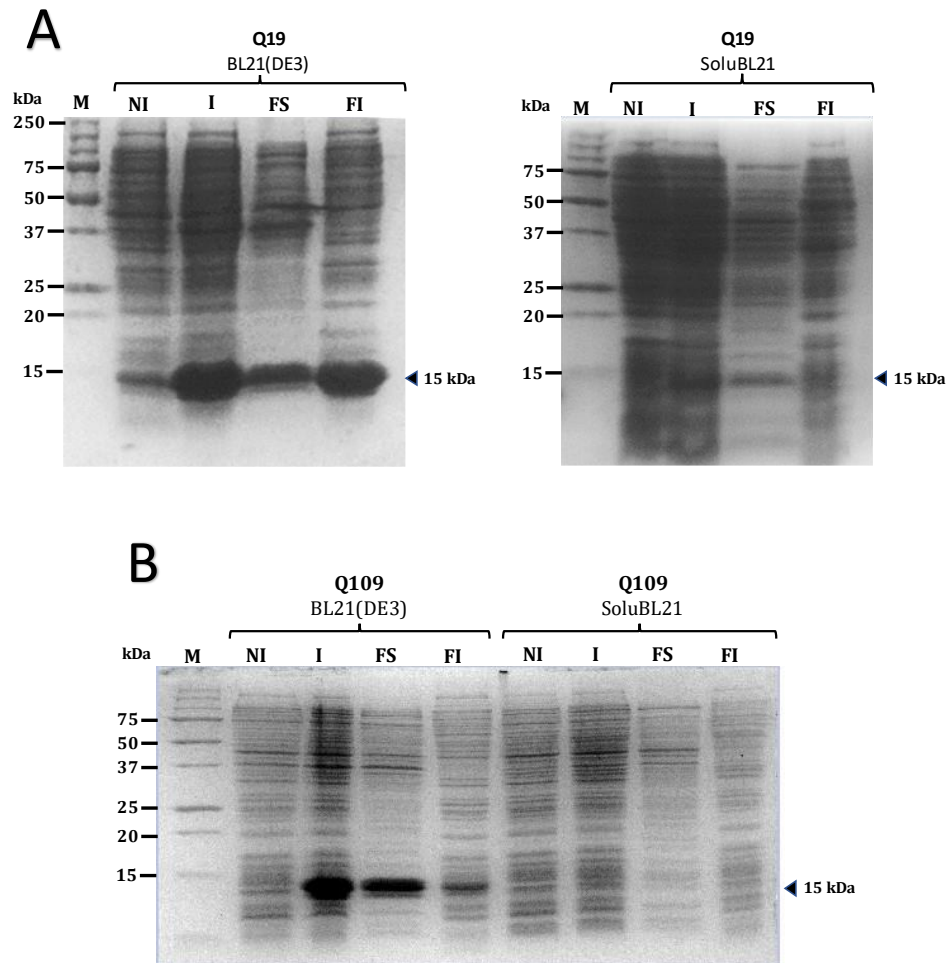


Figura 19. Expresión de las quimeras de 4 epítomos sin tag de solubilización (pCri8a), análisis por SDS-PAGE. (A) Perfil de expresión de Q19 expresada en la cepa BL21 (izquierda) y soluBL21 (derecha), acrilamida 15%. **(B)** Perfil de expresión de Q109 expresada en la cepa BL21 (izquierda) y soluBL21 (derecha), acrilamida 15%. Las fracciones se indican como NI: no inducida, I: inducida, FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble, M: marcador de peso molecular. Gel de acrilamida al 15%.

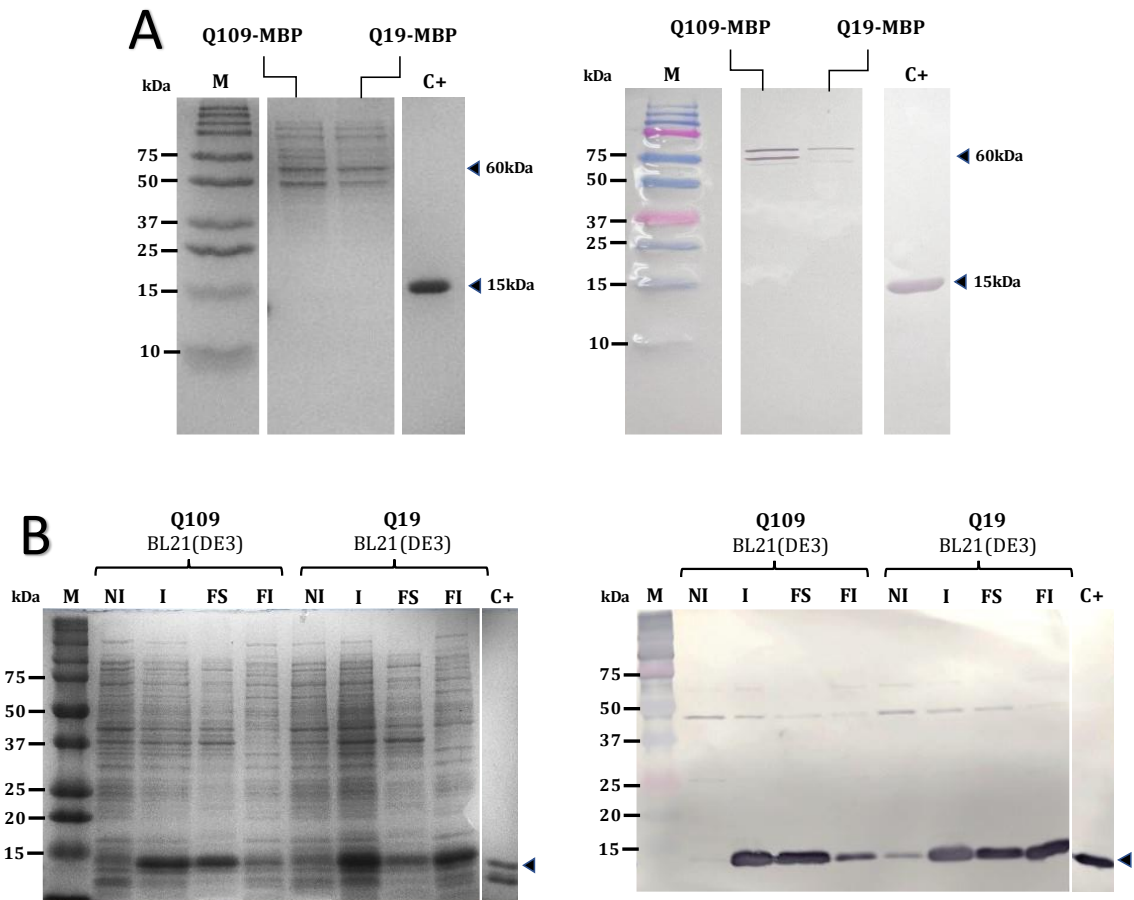


Figura 20. Inmunodetección α -His en la expresión de quimeras. (A) SDS-PAGE (izquierda) y membrana revelada α -Histidinas (derecha) de la fracción soluble de las quimeras Q19-MBP y Q109-MBP, C+: chagasina KK. (B) SDS-PAGE (izquierda) y membrana revelada α -Histidinas (derecha) de todas las fracciones de expresión de las quimeras Q19 y Q109, C+: chagasina WT. M: marcador de peso molecular.

Al expresar las quimeras de cuatro epítomos, Q19 y Q109 fusionadas a MBP se observó la expresión cercana a su totalidad en la fracción insoluble (Figura 18A), al no ser perceptible proteína en la fracción soluble de ambas quimeras se ratificó mediante el inmunoensayo Western blot (Figura 20A), donde se identificó mediante una banda tenue escasa presencia de proteína soluble comparada con la proteína total inducida, de manera similar, la proteína se encuentra en su totalidad de forma soluble tras la expresión de las quimeras de tres epítomos Q6 y Q34 fusionadas a MBP (Figura 18B y 18C).

No ha sido reportado caso alguno donde se genere expresión insoluble tras fusionar MBP a una proteína pasajera (PP), sin embargo, se ha demostrado que el mejor sitio para realizar la fusión es en el extremo amino de la proteína, donde también se han identificado altos niveles de interacción del tag ya sea con la PP parcialmente plegada o con otras moléculas de MBP, formando multímeros (Raran-Kurussi *et al.*, 2015; Momin *et al.*, 2019).

Posibles interacciones entre MBP-PP se analizaron mediante la predicción de estructura por AlphaFold2 al producto de la fusión, mostrando una evidente deformación estructural a comparación de los modelos de las proteínas sin fusionar, esto es observado tras generar los gráficos de Ramachandran (Figura 21), donde múltiples aminoácidos se encuentran en regiones energéticamente desfavorables.

Experimentalmente el grado de agregación se determinó mediante el lavado y solubilizado de cuerpos de inclusión, donde la Q109-MBP se solubilizó hasta llegar a una concentración 8M de urea (Figura 24A), lo que indica una alta asistencia química para romper fuerzas de unión, modificar fuerzas hidrofóbicas, y por lo tanto solubilizar a la proteína altamente hidrofóbica (Luche *et al.*, 2003).

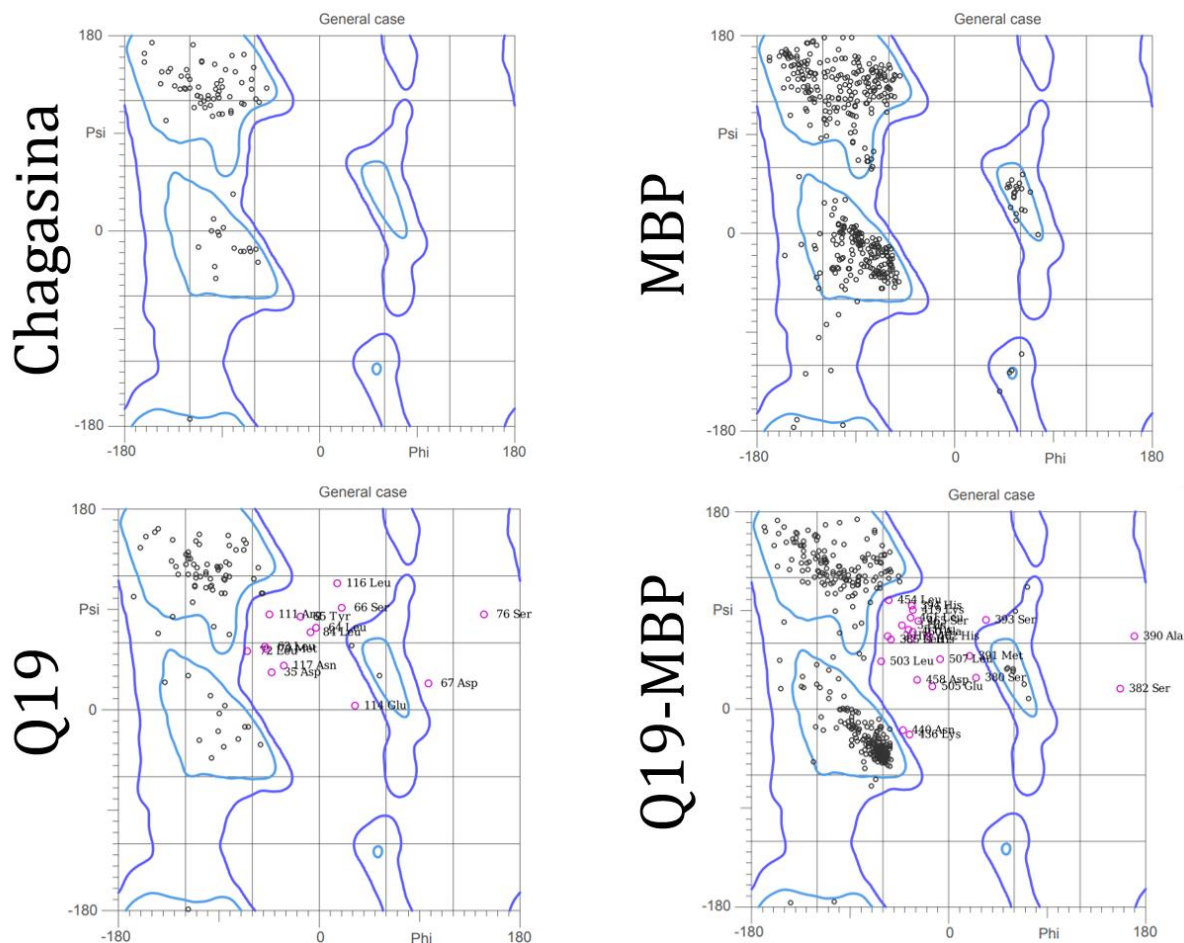


Figura 21. Cambio en la estructura 3D. Diagrama de Ramachandran de los modelos 3D de proteínas cristalizadas: Chagasina y Maltose Binding Protein (MBP), y modelos 3D de predicción por AlphaFold2: Quimera 19 y Q19-MBP. Elaborado en MolProvity server 4.5.2 (William *et al.*, 2018).

Cárdenas y colaboradores demostraron en la expresión de quimeras de dos epítomos que la presencia del E5 en el giro L4 promueve una alta solubilidad (2024), sin embargo, el giro L2 nunca se consideró como sitio a sustituir durante el diseño, en este proyecto la quimera Q19 y Q109 cuentan con el E5 en sustitución al L4 y L2 respectivamente con alta similitud en la predicción de solubilidad de estas dos quimeras (Figura 13); Experimentalmente, ambas se expresan parcialmente solubles, no obstante, la quimera Q109 presentó proporcionalmente mayor expresión de proteína soluble respecto a la proteína total (Figura 20B), lo cual sugiere que el grado de expresión soluble no está solo en función de la posición, sino también en cual es sintetizado primeramente por el ribosoma activo dada a su cercanía al extremo amino-terminal, lo cual concuerda con el fundamento de ubicación de dominios de fusión en dicho extremo para favorecer la expresión soluble, como el MBP.

Además, se ha demostrado por métodos computacionales que durante el proceso de traducción la cadena nascente interacciona con los compartimientos del túnel ribosomal, pudiendo inducir la formación de estructuras secundarias definidas o causar posibles atrapamientos del polipéptido, fenómenos que dependen de la longitud del ORF y de las características fisicoquímicas de los aminoácidos más próximos al amino-terminal de la proteína (Yu *et al.*, 2022; Yasuda *et al.*, 2024), lo que pudiera explicar el efecto de la posición del epítopo E5 en L2 y L4 en solubilidad y grado de expresión observado en la Figura 22.

Este antecedente sustenta la selección de quimeras y aunque se generó expresión soluble, el sustituir en esta ocasión dos epítomos en el giro L4 y sustituir el giro L2 genera interacciones adicionales. Expresar 8 quimeras con solo dos sitios reduce el número de variables y permite determinar la relación posicional E5-L4, por lo que en la generación de quimeras que alberguen 4 epítomos son necesarios más análisis de expresión de nuevas quimeras para generar hipótesis o conclusiones respecto a esta relación posición-solubilidad.

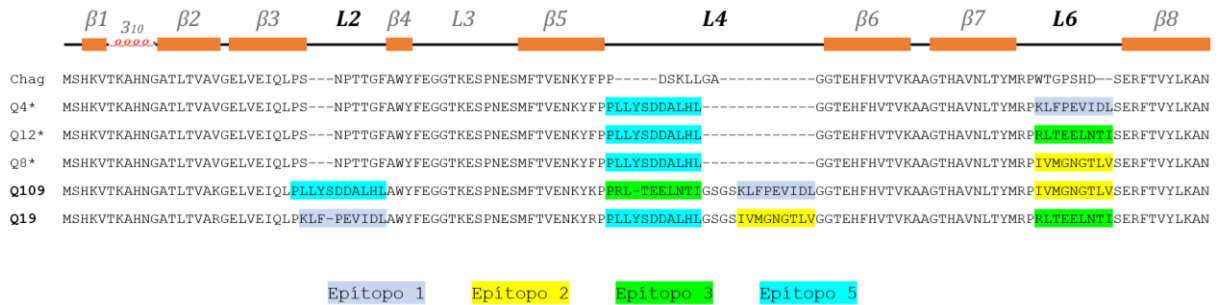
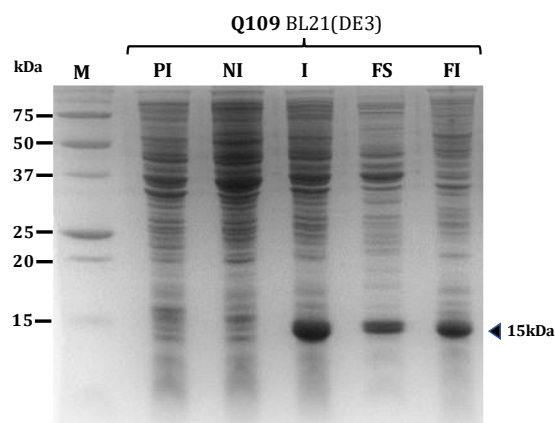


Figura 22. Comparativa en la posición de los epítopos. Comparativa con las dos quimeras de cuatro epítopos expresadas parcialmente solubles y la posición de los epítopos, Q4*, Q8* y Q12* expresadas por Cárdenas-Guerra. *et al.*, 2024.

Escalamiento de Q109 a biorreactor de 2.5L

Se realizó la inmunodetección con anticuerpos antihistidinas para confirmar la presencia e integridad de la proteína (Figura 20B) y emplear el tag como primer paso de purificación. La purificación de la quimera Q4E_109 V18K-V18K (Q109) tiene como objetivo la generación de anticuerpos para la detección de TSA-1 en inmunoensayos y para próximos análisis preclínicos.

En el escalamiento de la fermentación se alcanzó una productividad de 2g/L de la quimera Q109 en biorreactor de 2.5L, por otro lado, se debe seleccionar algún parámetro de escalamiento para igualar o aumentar la proporción de proteína soluble respecto a la proteína total, ya que visualmente se observa una disminución en el análisis SDS-PAGE (Figura 23), este mismo fenómeno aconteció a Cárdenas y colaboradores, donde al escalar la fermentación de la Q4 la proporción de proteína soluble disminuyó (2024).



Biomasa X [g/L]	$Y \frac{P}{x}$ [mg/g]	Proteína total P [g/L]
80	30.14	2.41 ± 0.11

Figura 23. Expresión de Q109 en biorreactor, análisis por SDS-PAGE. Acrilamida 15%. Las fracciones se indican como PI: pre-inóculo, NI: no inducida, I: inducida, FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble, M: marcador de peso molecular. Gel de acrilamida al 15%.

Generación de anticuerpos e inmunodetección

Ambas quimeras fueron detectadas por el inmunoensayo Western blot con anticuerpos α -chagasina (Figura 25A), lo cual se debe a la estructura y composición conservada del andamio molecular; Sin embargo, no hubo detección al emplear anticuerpos α -TSA1 (Figura 25B), asimismo, posterior a la purificación de la quimera Q109, y la generación y titulación de anticuerpos, se realizó el ensayo de inmunodetección de la TSA-1 con anticuerpos α -Q109, generando resultados igualmente negativos (Figura 25C), esto puede ser explicado debido a que se ha reportado que TSA-1 y los epítomos únicamente inducen inmunidad de tipo celular (Knight *et al.*, 2014; Pech-Canul, Á. *et al.*, 2017), donde estos antígenos son únicamente presentados y reconocidos mediante la interacción entre el receptor de células T (TCR) y el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), así, la generación *in vivo* de anticuerpos contra estos péptidos específicos no es estimulada.

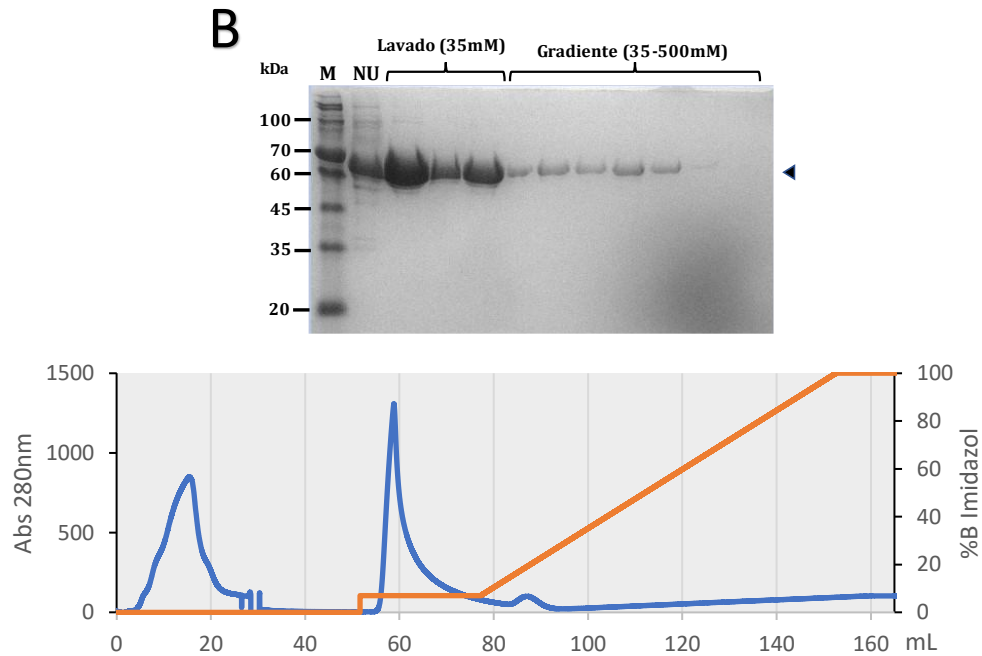
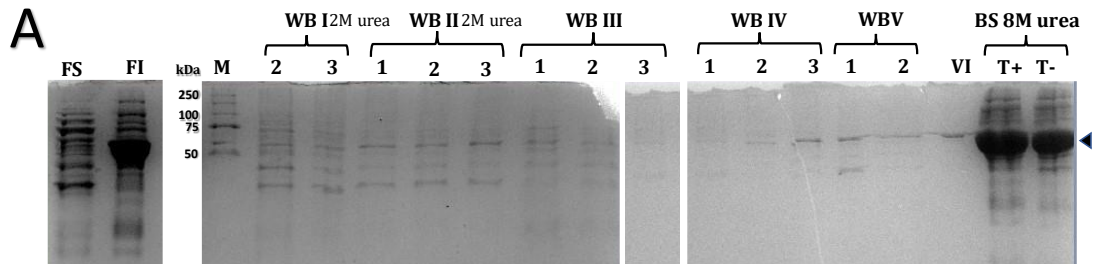


Figura 24. Purificación Q109-MBP (A) Lavado y solubilización de cuerpos de inclusión de Q109-MBP y **(B)** Perfil cromatográfico de elución por IMAC, análisis de fracciones SDS-PAGE, acrilamida 12%. M: marcador de peso molecular, NU: fracción no unida. T+: TritónX-114, T-: Sin TritónX-114, WB: Buffer de lavado, FS: Fracción soluble, FI: Fracción insoluble. Línea azul: Absorbancia a 280nm, línea naranja: porcentaje de compuesto de elución.

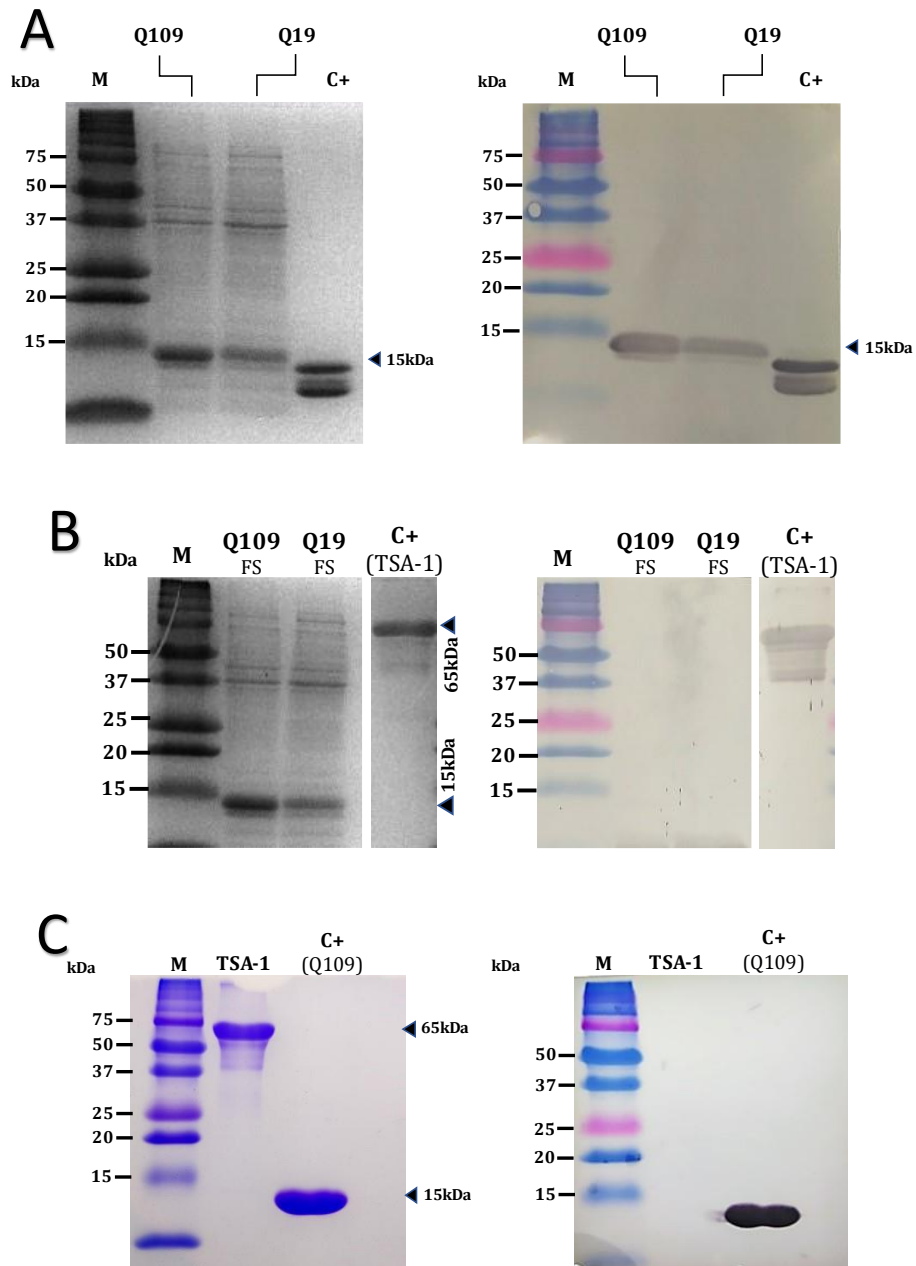


Figura 25. Inmunodetección en la expresión de quimeras. (A) SDS-PAGE y membrana revelada α -chagasina (fracciones solubles de las quimeras Q19 y Q109), C+: chagasina WT. (B) SDS-PAGE y membrana revelada α -TSA1 de la fracción soluble de las quimeras Q19 y Q109, C+: TSA-1 amino-terminal. (C) SDS-PAGE y membrana revelada α -Q109 de amino-terminal de TSA-1 replegada, C+: Q109. M: marcador de peso molecular.

Conclusión

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que la chagasina es un andamio molecular adecuado para la expresión de quimeras de chagasina conteniendo hasta cuatro epítomos de TSA-1, con altos rendimientos (~2g/L) y mayormente soluble en la plataforma de *E. coli*. Adicionalmente, se demostró que la predicción *in silico* de la solubilidad de las quimeras de la chagasina basada en modelos de su estructura 3D usando los servidores Aggregasan3D y CamSol, aunado a los criterios de selección fueron consistentes con los resultados experimentales. Inesperadamente, la fusión de las quimeras con MBP no favoreció su expresión en forma soluble.

Perspectivas

- Analizar por métodos adicionales la estabilidad de las mutantes de chagasina y las quimeras mutadas y no mutadas para evaluar si hay cambios significativos.
- Realizar cinéticas de inhibición de cisteín-proteasas a las quimeras purificadas y comparar los parámetros con la chagasina.
- Realizar las pruebas preclínicas correspondientes con las quimeras para evaluar la respuesta inmune en modelos animales y comparar con la chagasina y TSA-1.

Referencias

- Abras, A., Ballart, C., Fernández A., Pinazo M., Gascón, J., Muñoz C. y Gallego, M. (2022). Worldwide Control and Management of Chagas Disease in a New Era of Globalization: a Close Look at Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection
- Aguilar, J., Portillo, R., Mendoza, G., García, S., López, F., Bulnes D. (2010) An Influenza A/H1N1/2009 Hemagglutinin Vaccine Produced in *Escherichia coli*. PLoS ONE 5(7): e11694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011694>
- Beltrán, I., Alcolea V., Font, M. y Pérez S. (2022). Examination of multiple *Trypanosoma cruzi* targets in a new drug discovery approach for Chagas disease, Bioorganic & Medicinal Chemistry, Volume 58, 116577, ISSN 0968-0896, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116577>.
- Berry, A., Salazar, R., Castillo, R., Borrini, K., Chipana, C. y Vargas, M. (2019). Sexual reproduction in a natural *Trypanosoma cruzi* population. PLOS Neglected Tropical Diseases, 13(5), e0007392. doi:10.1371/journal.pntd.0007392
- Bhandari, B., Gardner, P., Lim, C. (2020) Solubility-Weighted Index: Fast and Accurate Prediction of Protein Solubility. Bioinformatics. DOI:10.1093/bioinformatics/btaa578.
- Bird, R., Hardman, D., Jacobson, W., Johnson, S., Kaufman, B., Lee, S., Lee, T., Pope, S., Riordan, G. y Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. Science (New York, N.Y.), 242(4877), 423–426. <https://doi.org/10.1126/science.3140379>
- Cárdenas, R., Montes, O., Nava, E., Reséndiz, G., Flores, C., Rodríguez, Y., Arroyo, R., Bottazzi, M., Hotez, P. and Ortega, J. (2024). Chagasin from *Trypanosoma cruzi* as a molecular scaffold to express epitopes of TSA-1 as soluble recombinant chimeras, Protein Expression and Purification, V 218, 106458, ISSN 1046-5928, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106458>.
- Centro para el control y prevención de enfermedades. [CDC]. (2016). Epidemiología y factores de riesgo: Enfermedad de Chagas. Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do

homem. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 1(2), 159–218. doi:10.1590/s0074-02761909000200008

Chatterjee, D., Al Rimon, R., Faruq, U. y Riazul, M. (2023). A multi-epitope based vaccine against the surface proteins expressed in cyst and trophozoite stages of parasite *Entamoeba histolytica*, Journal of Immunological Methods, Volume 517, 2023, 113475, ISSN 0022-1759, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2023.113475>.

da Costa, K., Marques da Fonseca, L., Dos Reis, J. S., Santos, M., Previato, J. O., Mendonça-Previato, L., y Freire-de-Lima, L. (2021). *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase as a Potential Vaccine Target Against Chagas Disease. Frontiers in cellular and infection microbiology, 11, 768450. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.768450>

De la Cruz, J., Villanueva, L., Dzul, V., Ramírez, J., Martínez, P., Rosado, M., Ortega, J., Flores, I., Gillespie, P., Zhan, B., Bottazzi, E., Hotez, J. y Dumonteil, E. (2019). Production of recombinant TSA-1 and evaluation of its potential for the immuno-therapeutic control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Human vaccines & immunotherapeutics, 15(1), 210–219. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1520581>

De Noya, B., González, O. y Robertson, L. J. (2015). *Trypanosoma cruzi* as a Foodborne Pathogen. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition. doi:10.1007/978-3-319-23410-6

Dodangeh, S., Fasihi-Ramandi, M., Daryani, A., Valadan, R., Asgarian-Omran, H., Hosseininejad, Z. y Sarvi, S. (2021). Protective efficacy by a novel multi-epitope vaccine, including MIC3, ROP8, and SAG1, against acute *Toxoplasma gondii* infection in BALB/c mice. Microbial Pathogenesis, 153, 104764. doi:10.1016/j.micpath.2021.104764

Dumonteil, E., Bottazzi, E., Zhan, B., Heffernan, J., Jones, K., Valenzuela, G., Kamhawi, S., Ortega, J., Ponce, S., Bruce, L., Bacon, K., Fleicher, B., Betacourt, M., Tapia, R. y Hotez, J. (2012). Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. Expert Review of Vaccines, 11(9), 1043–1055. doi:10.1586/erv.12.85

Dumonteil, E., Herrera, C. y Marx, P. (2023). Safety and preservation of cardiac function following therapeutic vaccination against *Trypanosoma cruzi* in rhesus macaques, Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 56(2), 400-407, <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2022.09.003>.

- Dumonteil, E., Herrera, C., Tu, W., Goff, K., Fahlberg, M., Haupt, E., Kaur, A., Marx, P., Ortega, J., Hotez, P. y Bottazzi, M. E. (2020). Safety and immunogenicity of a recombinant vaccine against *Trypanosoma cruzi* in Rhesus macaques. *Vaccine*. doi:10.1016/j.vaccine.2020.05.010
- Figueiredo da Silva, A. A., de Carvalho Vieira, L., Krieger, M. A., Goldenberg, S., Zanchin, N. I., & Guimarães, B. G. (2007). Crystal structure of chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of structural biology*, 157(2), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.07.017>
- George R. y Heringa J. (2002) An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein Engineering* 15, 871-879.
- Gorai, S., Chandra, N., Sarthi, P., Kumar, S., Kumar, M. y Mukherjee, S. (2022). Designing efficient multi-epitope peptide-based vaccine by targeting the antioxidant thioredoxin of bancroftian filarial parasite, *Infection, Genetics and Evolution*, 98, 105237, ISSN 1567-1348, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105237>.
- Goulas, T., Cuppari, A., Garcia, R., Snipas, S., Glockshuber, R., Arolas, J. y Gomis, F. (2014). The pCri System: A Vector Collection for Recombinant Protein Expression and Purification. *PLoS ONE*, 9(11), e112643. doi:10.1371/journal.pone.0112643
- Guarneri, A. y Lorenzo, M. (2021). *Triatominae* - The Biology of Chagas Disease Vectors. *Entomology in Focus*. doi:10.1007/978-3-030-64548-9
- Guerrero, F., Ciragan, A. y Iwai, H. (2015). Tandem SUMO fusion vectors for improving soluble protein expression and purification. *Protein Expression and Purification*, 116, 42–49. doi:10.1016/j.pep.2015.08.019
- Han, X., Ning, W., Ma, X., Wang, X., y Zhou, K. (2020). Improving protein solubility and activity by introducing small peptide tags designed with machine learning models. *Metabolic Engineering Communications*, 11, e00138. doi:10.1016/j.mec.2020.e00138
- Hebditch, M., Carballo M., Charonis, S., Curtis, R. y Warwicker, J. (2017). Protein-Sol: A web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics*
- Hou, Q., Kwasigroch, J., Rooman, M. y Pucci, F. (2020). SOLart: a structure-based method to predict protein solubility, *Bioinformatics* 36, 1445-1452.

- Huynh, K., y Partch, C. L. (2015). Analysis of Protein Stability and Ligand Interactions by Thermal Shift Assay. *Current Protocols in Protein Science*, 28.9.1–28.9.14. doi:10.1002/0471140864.ps2809s
- Instituto Nacional de Salud Pública [INSP] (2021). La enfermedad de Chagas. Gobierno de México <https://www.insp.mx/avisos/la-enfermedad-de-chagas>
- Jansen, A., Xavier, S. y Roque, A. (2020). Landmarks of the Knowledge and *Trypanosoma cruzi* Biology in the Wild Environment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. doi:10.3389/fcimb.2020.00010
- Jiang, R., Yang, H., Sun, F. y Chen, T. (2006). Searching for interpretable rules for disease mutations: A simulated annealing bump hunting strategy. *BMC bioinformatics*. 7. 417. 10.1186/1471-2105-7-417.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S., Ballard, A., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, M., Bodenstein, S., Silver, S., Vinyals, O., W. Senior, A., Kavukcuoglu, K., Kohli, P. y Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596 (7873), 583–589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
- Knight, M., Zingales, B., Bottazzi, M., Hotez, P. y Zhan, B. (2014). Limited antigenic variation in the *Trypanosoma cruzi* candidate vaccine antigen TSA-1. *Parasite immunology*, 36(12), 708–712. <https://doi.org/10.1111/pim.12130>
- Kuo, D., Nie, M., y Courey, A. (2014). SUMO as a solubility tag and in vivo cleavage of SUMO fusion proteins with Ulp1. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1177, 71–80. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1034-2_6
- Kuriata. A. Iglesias, V., Pujols, J., Kurcinski, M., Kmiecik, S. y Ventura, S. (2019). Aggrescan3D (A3D) 2.0: prediction and engineering of protein solubility. *Nucleic acids research*, 47(W1), W300–W307. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz321>
- Lewinsohn, R. (1979). Carlos Chagas (1879–1934): The discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American Trypanosomiasis (footnotes to the history of Chagas's disease). *Transactions of*

the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 73(5), 513–523. doi:10.1016/0035-9203(79)90042-7

Luche S et al. (2003). Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 3, 249–253.

Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* 19, 679–682 <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>

Momin, A., Hameed, S., y Arold, T. (2019). Passenger sequences can promote interlaced dimers in a common variant of the maltose-binding protein. *Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-56718-y

Moretti, N., Mortara, R., y Schenkman, S. (2019). *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology*. doi:10.1016/j.pt.2019.10.002

Mosavi, L. y Peng, Z. (2003). Structure-based substitutions for increased solubility of a designed protein. *Protein Engineering Design and Selection*, 16(10), 739–745. doi:10.1093/protein/gzg098

Negahdaripour, M., Nezafat, N., Eslami, M., Ghoshoon, M. B., Shoolian, E., Najafipour, S., Morowvat, M. H., Dehshahri, A., Erfani, N., y Ghasemi, Y. (2018). Structural vaccinology considerations for *in silico* designing of a multi-epitope vaccine. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 58, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.008>

Núñez, L., Marcelino, G., Calderón, B., Pérez, M., Acosta, K. González, H., Vargas, B., Olivares, A., Ruiz, R. y Roa, D. (2021). Recombinant Antigens Based on Non-Glycosylated Regions from RBD SARS-CoV-2 as Potential Vaccine Candidates against COVID-19. *Vaccines*, 9, 928. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080928>

Organización de las Naciones Unidas [ONU]. (2015). Resolución Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, Edición electrónica, consultado de: <http://www.un.org/es/comun/docs/?symbol=A/RES/70/1>

- Organización Mundial de la Salud [OMS] (2015). Enfermedad de Chagas (American trypanosomiasis) <http://www.paho.org/en/topics/chagas-disease> (Consultado 28 de marzo 2023).
- Pech-Canul, Á. de la C., Monteón, V., y Solís-Oviedo, R.-L. (2017). A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology Research*, 2017, 1–13. doi:10.1155/2017/3751403
- Pérez, M., Goncalves, L. y Alarcón, M. (2009). Transmisión congénita por *Trypanosoma cruzi*: Aspectos de la respuesta inmune fetal. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 49(2), 175-180.
- Quijano, A., Castro, A., Vázquez, C., Bolio, E., Ortega, J. y Dumonteil, E. (2013). Preventive and therapeutic DNA vaccination partially protect dogs against an infectious challenge with *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*, 31(18), 2246–2252. doi:10.1016/j.vaccine.2013.03.005
- Raran-Kurussi, S., Keefe, K., y Waugh, D. (2015). Positional effects of fusion partners on the yield and solubility of MBP fusion proteins. *Protein Expression and Purification*, 110, 159–164. doi:10.1016/j.pep.2015.03.004
- Rassi, A., Marin, A. y Rassi, A. (2017). Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(3), 224–235. doi:10.1590/0074-02760160334
- Reena, G., Munivenkatappa, B., Muniveerappa, V. y Balamurugan, V. (2016). An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 4(7): 346-356.
- Rodríguez, O., Monteón, V., Carrillo, C., Ríos, M., Martínez, M., Carabarin, A., y Arce, M. (2015). Experimental Vaccines against Chagas Disease: A Journey through History. *Journal of Immunology Research*, 1–8. doi:10.1155/2015/489758
- Rojo, J., Ruiz, C., Salazar, P. y González, J. (2018). Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta medica de México*, 154(5), 605–612. //doi.org/10.24875/GMM.18004515

- Salmon, D., do Aido, R., Diehl, A., Leidert, M., Schmetzer, O., de A. Lima, A. y Pires, J. (2006). Solution Structure and Backbone Dynamics of the *Trypanosoma cruzi* Cysteine Protease Inhibitor Chagasin. *Journal of Molecular Biology*, 357(5), 1511–1521. doi:10.1016/j.jmb.2006.01.064
- Sánchez, G., Mezquita, G., Escobedo, J., Ramirez, J., Arjona, A., Ouaiissi, A., Rodrigues, M. y Dumonteil, E. (2007). Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice, *FEMS Immunol Med Microbiol* 50, 333-341.
- Sangenito, L., Branquinha, M. y Santos, A. (2020). Funding for Chagas Disease: A 10-Year (2009–2018) Survey. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 5(2), 88. doi:10.3390/tropicalmed5020088
- Santos, A., Branquinha, M., d'Avila, C., Kneipp, L. y Sodr e, C. (2014). Proteins and Proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma*. 10.1007/978-94-007-7305-9.
- Santos, C., Sant'anna, C., Terres, A., Cunha, L., Scharfstein, J. y Lima, P. (2005). Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. *Journal of cell science*, 118(Pt 5), 901–915. <https://doi.org/10.1242/jcs.01677>
- Snapper, C. (2018). Distinct Immunologic Properties of Soluble Versus Particulate Antigens. *Frontiers in immunology*, 9, 598. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00598>
- Sormanni, F. A. Aprile y M. Vendruscolo. (2015). The CamSol method of rational design of protein mutants with enhanced solubility. *J. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.jmb.2014.09.026.
- Sun, P., Tropea, E. y Waugh, S. (2011). Enhancing the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli* by using hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 705, 259–274. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-967-3_16
- Tauqir, N. (2016). Absorption and Transportation of Amino acids in animals: A review. *Journal of Environmental & Agricultural Sciences*. 9: 96-109.
- Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z. *et al.* (2021). Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature* 596, 590–596 <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1>

- UCSF (2021). ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE. *Protein Sci.*;30(1):70-82.
- Villanueva, L., Cruz, J. Aguilar, A., Herrera, L., Rodriguez, M., Rosado, M., Ramirez, M., Ortega, J., Jones, K., Hotez, P., Bottazzi, E y Dumonteil, E. (2018). *Trypanosoma cruzi* vaccine candidate antigens Tc24 and TSA-1 recall memory immune response associated with HLA-A and -B supertypes in Chagasic chronic patients from Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(1), e0006240. doi:10.1371/journal.pntd.0006240
- Williams, C. J., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Prisant, M. G., Videau, L. L., Deis, L. N., Verma, V., Keedy, D. A., Hintze, B. J., Chen, V. B., Jain, S., Lewis, S. M., Arendall, W. B., 3rd, Snoeyink, J., Adams, P. D., Lovell, S. C., Richardson, J. S., y Richardson, D. C. (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 27(1), 293–315. <https://doi.org/10.1002/pro.3330>
- Yadav, S., Prakash, J., Shukla, H., Das, K., Tripathi, T. y Dubey, V. (2020). Design a multi-epitope subunit vaccine for immune protection against *Leishmania* parasite. *Pathogens and Global Health*, 1–11. doi:10.1080/20477724.2020.1842976
- Yasuda, T., Rikuri Morita, Yasuteru Shigeta, y Ryuhei Harada (2024). Ribosome Tunnel Environment Drives the Formation of α -Helix during Cotranslational Folding. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 64 (16), 6610-6622. DOI: 10.1021/acs.jcim.4c00901
- Yu, S., Srebnik, S. y Dao Duc, K (2022). Geometric differences in the ribosome exit tunnel impact the escape of small nascent proteins. *Biophysical Journal*. Elsevier.122-1 doi: 10.1016/j.bpj.2022.11.2945
- Zhang, J., Lv, X. y Xu, R. (2015). Soluble expression, rapid purification, and characterization of human interleukin-24 (IL-24) using a MBP-SUMO dual fusion system in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 6705–6713. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6441-4>
- Zhou, Z., Zhao, H., Zhang, L., Xie, Q., Liu, Q., Tong, M., Yu, X. y Xiong, S. (2022). Soluble expression of bioactive recombinant porcine-human chimeric uricase mutant employing MBP-SUMO fusion system, *Protein Expression and Purification*, 189, 105978, ISSN 1046-5928, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105978>.

Apéndices

Apéndice A. Códigos de Python 3.0

1.- Código de Python empleado para la formación de las quimeras de 3 epítodos (sustitución de secuencias entre epítodos y chagasin).

```
import itertools
import os

#Epitopos
E1='KLFPEVIDL'
E2='IVMGNGTLV'
E3='RLTEELNTI'
E4='FVDYNFTIV'
E5='LLYSDDALHL'

#Loops
L2='SNPTTGF'
L4='DSKLLGA'
L6='WTGPSHD'

chagasin='MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPSNPTTGFAWYFEG
GKESPNESMFTVENKYFPPDSKLLGAGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVM
RPWTGPSHDSERFTVYLKAN'
#print(chagasin)

#Permutación
perm=[E1,E2,E3,E4,E5]
v=list(itertools.permutations(perm, 3))
#print(v)

#Crear archivo fasta
file = open("/Users/MARCO/Desktop/Quimeras3ep.fa",
"w")

#Combinaciones
for n in range(60):
    w=v[n]

    x=(w[0])
    y=(w[1])
    z=(w[2])
    new_chagasin = chagasin.replace(L2, x)
    new_chagasin = new_chagasin.replace(L4, y)
    new_chagasin = new_chagasin.replace(L6, z)
    print(new_chagasin)
    #Convertir variable a str
    cn=str(n+1)
    #Combinación
    x=x.replace(E1, "E1")
    x=x.replace(E2, "E2")
    x=x.replace(E3, "E3")
    x=x.replace(E4, "E4")
    x=x.replace(E5, "E5")

    y=y.replace(E1, "E1")
    y=y.replace(E2, "E2")
    y=y.replace(E3, "E3")
    y=y.replace(E4, "E4")
    y=y.replace(E5, "E5")

    z=z.replace(E1, "E1")
    z=z.replace(E2, "E2")
    z=z.replace(E3, "E3")
    z=z.replace(E4, "E4")
    z=z.replace(E5, "E5")

    #Adicionar identificador
    file.write(">Quimera " + cn + " " + x + "-" +
y + "-" + z + "\n" + new_chagasin + os.linesep)
file.close()
```

2.- Código de Python empleado para la formación de las quimeras de 4 epítodos (sustitución de secuencias entre epítodos, linker y chagasin).

```
import itertools
import os

#Epitopos
E1='KLFPEVIDL'
E2='IVMGNGTLV'
E3='RLTEELNTI'
E4='FVDYNFTIV'
E5='LLYSDDALHL'

#Loops
L2='SNPTTGF'
L4_1='DSKL'
L4_2='LGA'
L6='WTGPSHD'

chagasin='MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPSNPTTGFAWYFEG
GKESPNESMFTVENKYFPPDSKLGSGSLGAGGTEHFHVTVKAAGTHAVN
LTYMRPWTGPSHDSERFTVYLKAN'
#print(chagasin)

#Permutación
perm=[E1,E2,E3,E4,E5]
v=list(itertools.permutations(perm, 4))
print(v)

#Crear archivo fasta
file = open("/Users/MARCO/Desktop/Quimeras4Ep.fa",
"w")

#Combinaciones
for n in range(120):
    w=v[n]
    x=(w[0])
    y=(w[1])
    z=(w[2])
    a=(w[3])
    new_chagasin = chagasin.replace(L2, x)
    new_chagasin = new_chagasin.replace(L4_1, y)
    new_chagasin = new_chagasin.replace(L4_2, z)
    new_chagasin = new_chagasin.replace(L6, a)
    #print(new_chagasin)
    #Convertir variable a str
    cn=str(n+1)
```

```
#Combinación
x=x.replace(E1, "E1")
x=x.replace(E2, "E2")
x=x.replace(E3, "E3")
x=x.replace(E4, "E4")
x=x.replace(E5, "E5")

y=y.replace(E1, "E1")
y=y.replace(E2, "E2")
y=y.replace(E3, "E3")
y=y.replace(E4, "E4")
y=y.replace(E5, "E5")

z=z.replace(E1, "E1")
z=z.replace(E2, "E2")
z=z.replace(E3, "E3")
z=z.replace(E4, "E4")
z=z.replace(E5, "E5")

a=a.replace(E1, "E1")
a=a.replace(E2, "E2")
a=a.replace(E3, "E3")
a=a.replace(E4, "E4")
a=a.replace(E5, "E5")

#Adicionar identificador
file.write(">Quimera " + cn + " " + x + "-" +
y + "/" + z + "-" + a + "\n" + new_chagasin +
os.linesep)

file.close()
```

Apéndice B. Vectores empleados del sistema pCri

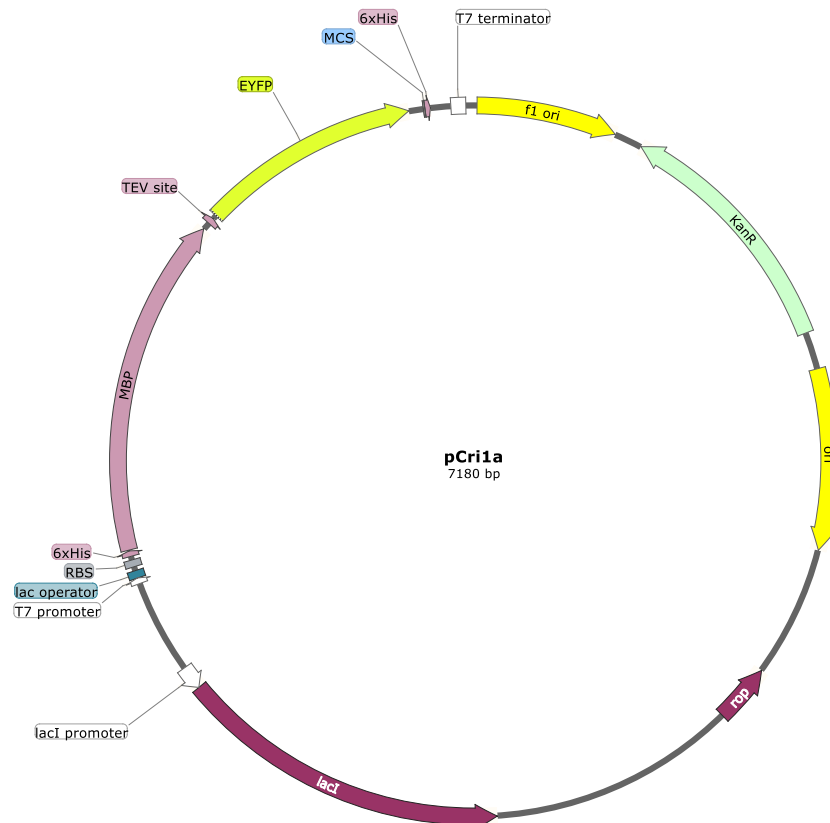


Figura 26. Vector pCri1a. Diseñado para fusión de proteínas a MBP y 6xHis.



Figura 27. Vector pCri8a. Diseñado para la fusión de proteínas a 6xHis.

Apéndice C. Secuencias y predicciones de solubilidad de quimeras

Tabla 16. Predicción de solubilidad de quimeras de tres epítomos.

Quimera	Epítomos			Secuencia de aminoácidos	Score de predicción de solubilidad				
	L2	L4	L6		SoDOPE	Protein-Sol	SOLart	Aggrescan	CamSol
Chagasina	L2	L4	L6	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPSNPTTGFAWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPDSKLLGAGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPWTGPHSDSERFTVYLVKAN	0.8017	0.604	83.2	-92.4088	0.5433
Q3E_1	E1	E2	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.7471	0.557	85.6	-63.57	0.4791
Q3E_2	E1	E2	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6433	0.549	85.6	-44.84	-0.1843
Q3E_3	E1	E2	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6794	0.523	88.9	-55.96	0.3878
Q3E_4	E1	E3	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.7471	0.557	86.4	-71.64	0.5243
Q3E_5	E1	E3	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.7205	0.579	86.0	-70.76	0.0408
Q3E_6	E1	E3	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.7512	0.567	86.8	-75.67	0.6119
Q3E_7	E1	E4	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6433	0.549	85.8	-28.29	-0.2259
Q3E_8	E1	E4	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.7205	0.579	86.1	-48.21	-0.0460
Q3E_9	E1	E4	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6492	0.574	87.9	-46.76	-0.1350
Q3E_10	E1	E5	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPPLYSDDALHGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6794	0.523	86.9	-57.15	0.3903
Q3E_11	E1	E5	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPPLYSDDALHGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.7512	0.567	85.5	-78.88	0.5694
Q3E_12	E1	E5	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPPLYSDDALHGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6492	0.574	86.0	-36.21	-0.0911
Q3E_13	E2	E1	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNGTLVWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.7471	0.557	86.0	-69.75	0.2685
Q3E_14	E2	E1	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNGTLVWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6433	0.549	86.2	-47.87	-0.3949
Q3E_15	E2	E1	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNGTLVWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6794	0.523	86.9	-62.86	0.1781
Q3E_16	E2	E3	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNGTLVWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDLSERFTVYLVKAN	0.7471	0.557	82.9	-83.9654	0.2781
Q3E_17	E2	E3	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNGTLVWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6837	0.557	83.0	-54.94	-0.3369
Q3E_18	E2	E3	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNGTLVWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.7172	0.544	85.5	-81.0076	0.2359
Q3E_19	E2	E4	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNGTLVWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDLSERFTVYLVKAN	0.6433	0.549	86.5	-56.21	-0.4721
Q3E_20	E2	E4	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNGTLVWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6837	0.557	83.7	-52.46	-0.4236
Q3E_21	E2	E4	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNGTLVWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6085	0.565	85.1	-43.64	-0.5110
Q3E_22	E2	E5	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNGTLVWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPPLYSDDALHGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDLSERFTVYLVKAN	0.6794	0.523	85.9	-62.08	0.1452
Q3E_23	E2	E5	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNGTLVWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPPLYSDDALHGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.7172	0.544	86.4	-75.0754	0.1934
Q3E_24	E2	E5	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNGTLVWYFEGGKTESPNESMFTVENKYFPPPLYSDDALHGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6085	0.565	84.3	-37.42	-0.4671

Tabla 16. Predicción de solubilidad de quimeras de tres epítomos (continuación).

Quimera	Epítomos			Secuencia de aminoácidos	Score de predicción de solubilidad				
	L2	L4	L6		SoDOPE	Protein-Sol	SOLart	Aggrescan	CamSol
Q3E_25	E3	E1	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPIVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.7471	0.557	84.7	-54.84	0.4632
Q3E_26	E3	E1	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPFVDYNFTIVSRFTVYLVKAN	0.7205	0.579	84.9	-64.97	-0.0202
Q3E_27	E3	E1	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.7512	0.567	86.8	-56.55	0.5510
Q3E_28	E3	E2	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPKLFPEVIDLSERFTVYLVKAN	0.7471	0.557	87.5	-70.93	0.4276
Q3E_29	E3	E2	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPFVDYNFTIVSRFTVYLVKAN	0.6837	0.557	83.0	-43.62	-0.1873
Q3E_30	E3	E2	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.7172	0.544	83.7	-58.19	-0.3847
Q3E_31	E3	E4	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPKLFPEVIDLSERFTVYLVKAN	0.7205	0.579	86.4	-52.88	-0.0974
Q3E_32	E3	E4	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPIVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6837	0.557	83.6	-34.82	-0.2289
Q3E_33	E3	E4	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.689	0.585	86.4	-55.07	-0.1380
Q3E_34	E3	E5	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.7512	0.567	86.4	-70.22	0.5181
Q3E_35	E3	E5	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.7172	0.544	83.0	-55.89	0.3872
Q3E_36	E3	E5	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.689	0.585	82.9	-66.13	-0.0941
Q3E_37	E4	E1	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPIVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6433	0.549	85.4	-38.19	-0.4761
Q3E_38	E4	E1	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.7205	0.579	85.9	-58.19	-0.2962
Q3E_39	E4	E1	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6492	0.574	89.0	-58.3	-0.3814
Q3E_40	E4	E2	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPKLFPEVIDLSERFTVYLVKAN	0.6433	0.549	84.2	-43.9	-0.5117
Q3E_41	E4	E2	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6837	0.557	83.3	-54.83	-0.4632
Q3E_42	E4	E2	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6085	0.565	85.1	-36.69	-0.5504
Q3E_43	E4	E3	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPKLFPEVIDLSERFTVYLVKAN	0.7205	0.579	84.3	-71.08	-0.2866
Q3E_44	E4	E3	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPIVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6837	0.557	81.9	-69.45	-0.4181
Q3E_45	E4	E3	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTVMRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.689	0.585	85.5	-67.97	-0.3264
Q3E_46	E4	E5	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6492	0.574	86.3	-55.91	-0.4171
Q3E_47	E4	E5	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6085	0.565	86.3	-43.35	-0.5479
Q3E_48	E4	E5	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.689	0.585	84.1	-55.61	-0.3688

Tabla 16. Predicción de solubilidad de quimeras de tres epítomos (continuación).

Quimera	Epítomos			Secuencia de aminoácidos	Score de predicción de solubilidad				
	L2	L4	L6		SoDOPE	Protein-Sol	SOLart	Aggrescan	CamSol
Q3E_49	E5	E1	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQPLPLYSDDALHLAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPIVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6794	0.523	87.4	-56.70	0.3092
Q3E_50	E5	E1	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQPLPLYSDDALHLAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.7512	0.567	87.5	-74.13	0.4883
Q3E_51	E5	E1	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQPLPLYSDDALHLAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPFVDYNFTIVSRFTVYLVKAN	0.6492	0.574	87.5	-54.22	-0.1722
Q3E_52	E5	E2	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQPLPLYSDDALHLAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPKLFPEVIDLSERFTVYLVKAN	0.6794	0.523	88.2	-53.41	0.2738
Q3E_53	E5	E2	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQPLPLYSDDALHLAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.7172	0.544	85.9	-63.77	0.3220
Q3E_54	E5	E2	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQPLPLYSDDALHLAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPFVDYNFTIVSRFTVYLVKAN	0.6085	0.565	84.2	-41.07	-0.3385
Q3E_55	E5	E3	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQPLPLYSDDALHLAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPKLFPEVIDLSERFTVYLVKAN	0.7512	0.567	82.8	-90.99	0.4978
Q3E_56	E5	E3	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQPLPLYSDDALHLAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPIVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.7172	0.544	83.3	-77.17	0.3670
Q3E_57	E5	E3	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQPLPLYSDDALHLAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPFVDYNFTIVSRFTVYLVKAN	0.689	0.585	84.9	-64.53	-0.1144
Q3E_58	E5	E4	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQPLPLYSDDALHLAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPKLFPEVIDLSERFTVYLVKAN	0.6492	0.574	87.9	-43.51	-0.2490
Q3E_59	E5	E4	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQPLPLYSDDALHLAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPIVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6085	0.565	81.4	-28.23	-0.3799
Q3E_60	E5	E4	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQPLPLYSDDALHLAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.689	0.585	84.2	-49.32	-0.2008

Tabla 17. Predicción de solubilidad de quimeras de cuatro epítomos.

Quimera	Epítomos			Secuencia de aminoácidos	Score de predicción de solubilidad					
	L2	L4	L6		SoDOPE	Protein-Sol	SOLart	Aggrescan	CamSol	
Chagasina	L2	L4	L6	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPSNPTTGFAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPDSKLLGAGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPWTGPHSDSERFTVYLVKAN	0.8017	0.604	83.2	-92.4088	0.5433	
Q4E_1	E1	E2	E3	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPFVDYNTIVSERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	84.6	-68.2711	-0.0378
Q4E_2	E1	E2	E3	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	85.2	-65.4961	0.5028
Q4E_3	E1	E2	E4	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVSGSFVDYNTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	84.5	-38.4500	-0.0943
Q4E_4	E1	E2	E4	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVSGSFVDYNTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.5943	0.574	87.0	-46.4386	-0.1788
Q4E_5	E1	E2	E5	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVSGSLLYSDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	84.2	-71.7400	0.5394
Q4E_6	E1	E2	E5	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVSGSLLYSDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPFVDYNTIVSERFTVYLVKAN	0.5943	0.574	84.2	-39.1207	-0.0860
Q4E_7	E1	E3	E2	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPFVDYNTIVSERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	85.1	-58.1869	0.0284
Q4E_8	E1	E3	E2	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	87.9	-77.7309	0.5688
Q4E_9	E1	E3	E4	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSFVDYNTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6632	0.571	85.9	-46.8014	-0.0396
Q4E_10	E1	E3	E4	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSFVDYNTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	86.4	-56.7463	0.0451
Q4E_11	E1	E3	E5	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSLLYSDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6947	0.531	84.4	-64.7694	0.5883
Q4E_12	E1	E3	E5	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSLLYSDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPFVDYNTIVSERFTVYLVKAN	0.6683	0.531	87.8	-76.8770	0.1324
Q4E_13	E1	E4	E2	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNTIVGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	85.3	-46.8797	-0.0800
Q4E_14	E1	E4	E2	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNTIVGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.5943	0.574	84.7	-34.1399	-0.1645
Q4E_15	E1	E4	E3	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNTIVGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6632	0.571	82.9	-39.6214	-0.0828
Q4E_16	E1	E4	E3	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNTIVGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	86.6	-82.6115	0.0022
Q4E_17	E1	E4	E5	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNTIVGSGSLLYSDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.5943	0.574	86.1	-41.3483	-0.1395
Q4E_18	E1	E4	E5	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNTIVGSGSLLYSDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	86.7	-58.0989	0.3000
Q4E_19	E1	E5	E2	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPLLYSDALHLGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	84.3	-78.2568	0.5367
Q4E_20	E1	E5	E2	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPLLYSDALHLGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPFVDYNTIVSERFTVYLVKAN	0.5943	0.574	86.1	-41.9018	-0.0886
Q4E_21	E1	E5	E3	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPLLYSDALHLGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6947	0.531	86.0	-77.2955	0.4971
Q4E_22	E1	E5	E3	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPLLYSDALHLGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPFVDYNTIVSERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	87.6	-83.6856	0.0413
Q4E_23	E1	E5	E4	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPLLYSDALHLGSGSFVDYNTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.5943	0.574	87.7	-40.8537	-0.1497
Q4E_24	E1	E5	E4	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPKLFPEVIDLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPLLYSDALHLGSGSFVDYNTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTYMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	87.5	-62.1811	0.0198

Tabla 17. Predicción de solubilidad de quimeras de cuatro epítomos (continuación).

Quimera	Epítomos			Secuencia de aminoácidos	Score de predicción de solubilidad					
	L2	L4	L6		SoDOPE	Protein-Sol	SOLart	Aggrescan	CamSol	
Q4E_25	E2	E1	E3	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	82.3	-56.9406	-0.2419
Q4E_26	E2	E1	E3	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	85.4	-80.5033	0.2995
Q4E_27	E2	E1	E4	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	85.7	-64.4914	-0.2696
Q4E_28	E2	E1	E4	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.5943	0.574	84.4	-52.5448	-0.3534
Q4E_29	E2	E1	E5	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	86.0	-71.8839	0.3476
Q4E_30	E2	E1	E5	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.5943	0.574	83.5	-40.2908	-0.2777
Q4E_31	E2	E3	E1	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	85.4	-80.0613	-0.2213
Q4E_32	E2	E3	E1	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	82.9	-83.5715	0.3201
Q4E_33	E2	E3	E4	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.6632	0.571	85.4	-53.0364	-0.2727
Q4E_34	E2	E3	E4	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	84.9	-49.3377	-0.3562
Q4E_35	E2	E3	E5	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.6947	0.531	85.0	-95.5416	0.3561
Q4E_36	E2	E3	E5	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	81.8	-71.6112	-0.2235
Q4E_37	E2	E4	E1	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	86.4	-58.4770	-0.3009
Q4E_38	E2	E4	E1	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.5943	0.574	82.8	-48.1515	-0.3846
Q4E_39	E2	E4	E3	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.6632	0.571	85.2	-75.6981	-0.3158
Q4E_40	E2	E4	E3	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	86.5	-61.6032	-0.3537
Q4E_41	E2	E4	E5	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGSGSLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.5943	0.574	87.4	-47.1097	-0.3710
Q4E_42	E2	E4	E5	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNFTIVGSGSLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	86.7	-50.4887	-0.3259
Q4E_43	E2	E5	E1	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPLYSDDALHLGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	86.8	-65.0569	0.2799
Q4E_44	E2	E5	E1	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPLYSDDALHLGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.5943	0.574	85.9	-54.5033	-0.3455
Q4E_45	E2	E5	E3	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPLYSDDALHLGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.6947	0.531	87.1	-75.0057	0.2650
Q4E_46	E2	E5	E3	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPLYSDDALHLGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	85.7	-63.4398	-0.3146
Q4E_47	E2	E5	E4	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPLYSDDALHLGSGSFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.5943	0.574	84.8	-51.3006	-0.3818
Q4E_48	E2	E5	E4	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPIVMGNTLVAVYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPLYSDDALHLGSGSFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	86.2	-66.1627	-0.3361

Tabla 17. Predicción de solubilidad de quimeras de cuatro epítomos (continuación).

Quimera	Epítomos				Secuencia de aminoácidos	Score de predicción de solubilidad				
	L2	L4	L6			SoDOPE	Protein-Sol	SOLart	Aggrescan	CamSol
Q4E_49	E3	E1	E2	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSIVMGNTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	84.4	-48.40	-0.0230
Q4E_50	E3	E1	E2	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSIVMGNTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	85.2	-54.9307	0.4882
Q4E_51	E3	E1	E4	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNTLVSERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	84.6	-45.470	-0.0853
Q4E_52	E3	E1	E4	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	85.5	-49.90	-0.0003
Q4E_53	E3	E1	E5	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNTLVSERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	85.1	-58.9068	0.5311
Q4E_54	E3	E1	E5	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	86.6	-60.670	0.0753
Q4E_55	E3	E2	E1	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPVIMGNTLVGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	83.5	-48.64	-0.0717
Q4E_56	E3	E2	E1	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPVIMGNTLVGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	83.8	-55.4917	0.4691
Q4E_57	E3	E2	E4	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPVIMGNTLVGSGSFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDL SERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	84.1	-31.790	-0.1431
Q4E_58	E3	E2	E4	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPVIMGNTLVGSGSFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	83.7	-40.7835	-0.1817
Q4E_59	E3	E2	E5	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPVIMGNTLVGSGSLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDL SERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	84.8	-37.8387	0.4908
Q4E_60	E3	E2	E5	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPVIMGNTLVGSGSLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	84.2	-51.0025	-0.0888
Q4E_61	E3	E4	E1	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPVDYNFTIVGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNTLVSERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	85.6	-49.1318	-0.1166
Q4E_62	E3	E4	E1	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPVDYNFTIVGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	87.8	-37.7850	-0.0314
Q4E_63	E3	E4	E2	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPVDYNFTIVGSGSIVMGNTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDL SERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	83.8	-57.2459	-0.1278
Q4E_64	E3	E4	E2	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPVDYNFTIVGSGSIVMGNTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	84.6	-40.1624	-0.1674
Q4E_65	E3	E4	E5	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPVDYNFTIVGSGSLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDL SERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	86.3	-66.0700	-0.0185
Q4E_66	E3	E4	E5	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPVDYNFTIVGSGSLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNTLVSERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	84.3	-59.4992	-0.1424
Q4E_67	E3	E5	E1	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPLYSDDALHLGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNTLVSERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	85.3	-59.8649	0.4634
Q4E_68	E3	E5	E1	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPLYSDDALHLGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	86.5	-40.9568	0.0076
Q4E_69	E3	E5	E2	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPLYSDDALHLGSGSIVMGNTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDL SERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	86.3	-56.1563	0.5176
Q4E_70	E3	E5	E2	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPLYSDDALHLGSGSIVMGNTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPFVDYNFTIVSERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	82.4	-44	-0.0915
Q4E_71	E3	E5	E4	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPLYSDDALHLGSGSFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLKLFPEVIDL SERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	85.7	-56.1563	-0.0287
Q4E_72	E3	E5	E4	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPRLTEELNTIAWYFEGGTKE SPNESMFTVENKYFPPLYSDDALHLGSGSFVDYNFTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNTLVSERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	84.1	-44	-0.1526

Tabla 17. Predicción de solubilidad de quimeras de cuatro epítomos (continuación).

Quimera	Epítomos			Secuencia de aminoácidos	Score de predicción de solubilidad					
	L2	L4	L6		SoDOPE	Protein-Sol	SOLart	Aggrescan	CamSol	
Q4E_73	E4	E1	E2	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	86.2	-52.0805	-0.2842
Q4E_74	E4	E1	E2	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSEFTVYLVKAN	0.5943	0.574	85.6	-44.4203	-0.3679
Q4E_75	E4	E1	E3	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNGTLVSEFTVYLVKAN	0.6632	0.571	84.1	-56.4077	-0.3188
Q4E_76	E4	E1	E3	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSEFTVYLVKAN	0.6683	0.571	85.5	-60.2544	-0.2328
Q4E_77	E4	E1	E5	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSLLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNGTLVSEFTVYLVKAN	0.5943	0.574	85.3	-20.3367	-0.3543
Q4E_78	E4	E1	E5	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSLLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	87.3	-57.6967	-0.1847
Q4E_79	E4	E2	E1	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVSGSKLPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6632	0.571	82.7	-54.4330	-0.3329
Q4E_80	E4	E2	E1	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVSGSKLPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSEFTVYLVKAN	0.5943	0.574	85.2	-42.0983	-0.4164
Q4E_81	E4	E2	E3	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.6632	0.571	81.8	-55.5272	-0.3478
Q4E_82	E4	E2	E3	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSEFTVYLVKAN	0.6326	0.587	83.9	-54.6000	-0.3856
Q4E_83	E4	E2	E5	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVSGSLLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.5943	0.574	84.9	-54.0898	-0.3947
Q4E_84	E4	E2	E5	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPIVMGNGTLVSGSLLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	84.7	-54.2528	-0.3490
Q4E_85	E4	E3	E1	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSKLPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNGTLVSEFTVYLVKAN	0.6632	0.571	85.6	-63.2630	-0.2982
Q4E_86	E4	E3	E1	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSKLPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSEFTVYLVKAN	0.6683	0.571	86.7	-70.2607	-0.2123
Q4E_87	E4	E3	E2	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.6632	0.571	83.6	-64.5014	-0.2815
Q4E_88	E4	E3	E2	E5	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLLYSDDALHLSEFTVYLVKAN	0.6326	0.587	85.3	-50.6716	-0.3196
Q4E_89	E4	E3	E5	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSLLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.6683	0.571	86.0	-77.3987	-0.1762
Q4E_90	E4	E3	E5	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSLLYSDDALHLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNGTLVSEFTVYLVKAN	0.6326	0.587	83.9	-69.9522	-0.3001
Q4E_91	E4	E5	E1	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPLLYSDDALHLGSGSKLPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNGTLVSEFTVYLVKAN	0.5943	0.574	84.8	-39.8019	-0.4221
Q4E_92	E4	E5	E1	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPLLYSDDALHLGSGSKLPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	86.3	-58.8214	-0.2525
Q4E_93	E4	E5	E2	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPLLYSDDALHLGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.5943	0.574	86.1	-41.6940	-0.3973
Q4E_94	E4	E5	E2	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPLLYSDDALHLGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	83.0	-45.9603	-0.3517
Q4E_95	E4	E5	E3	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPLLYSDDALHLGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPLPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.6683	0.571	86.8	-64.2262	-0.2674
Q4E_96	E4	E5	E3	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPFVDYNFTIVAWYFEGGTKESPNESMFTVENKYFPPLLYSDDALHLGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMYRPIVMGNGTLVSEFTVYLVKAN	0.6326	0.587	85.5	-57.1043	-0.3913

Tabla 17. Predicción de solubilidad de quimeras de cuatro epítomos (continuación).

Quimera	Epítomos			Secuencia de aminoácidos	Score de predicción de solubilidad					
	L2	L4	L6		SoDOPE	Protein-Sol	SOLart	Aggrescan	CamSol	
Q4E_97	E5	E1	E2	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	84.3	-80.1384	0.4582
Q4E_98	E5	E1	E2	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPFVDYNTIVSERFTVYLVKAN	0.5943	0.574	86.2	-54.2222	-0.1672
Q4E_99	E5	E1	E3	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRP IVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6947	0.531	84.5	-81.5368	0.4236
Q4E_100	E5	E1	E3	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPFVDYNTIVSERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	87.9	-69.3072	-0.0322
Q4E_101	E5	E1	E4	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSFVDYNTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRP IVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.5552	0.574	82.2	-45.5412	-0.2293
Q4E_102	E5	E1	E4	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPKLFPEVIDLGSGSFVDYNTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	85.6	-63.4069	-0.0597
Q4E_103	E5	E2	E1	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPP IVMGNGTLVSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6947	0.531	82.2	-45.5412	0.4097
Q4E_104	E5	E2	E1	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPP IVMGNGTLVSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPFVDYNTIVSERFTVYLVKAN	0.5943	0.574	82.5	-37.8448	-0.2157
Q4E_105	E5	E2	E3	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPP IVMGNGTLVSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPKLFPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.6947	0.531	84.3	-69.9661	0.3948
Q4E_106	E5	E2	E3	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPP IVMGNGTLVSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPFVDYNTIVSERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	82.8	-55.3265	-0.1849
Q4E_107	E5	E2	E4	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPP IVMGNGTLVSGSFVDYNTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPKLFPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.5943	0.574	85.3	-39.1827	-0.2869
Q4E_108	E5	E2	E4	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPP IVMGNGTLVSGSFVDYNTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	85.0	-53.2138	-0.2412
Q4E_109	E5	E3	E1	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRP IVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6947	0.531	87.6	-97.4620	0.4442
Q4E_110	E5	E3	E1	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPFVDYNTIVSERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	87.9	-71.5171	-0.0116
Q4E_111	E5	E3	E2	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPKLFPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.6947	0.531	82.7	-81.2409	0.4609
Q4E_112	E5	E3	E2	E4	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPFVDYNTIVSERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	84.9	-65.2890	-0.1189
Q4E_113	E5	E3	E4	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSFVDYNTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPKLFPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.6683	0.571	83.6	-73.6139	-0.0628
Q4E_114	E5	E3	E4	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPRLTEELNTIGSGSFVDYNTIVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRP IVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6326	0.587	84.3	-46.6514	-0.1867
Q4E_115	E5	E4	E1	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNTIVSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRP IVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.5923	0.574	86.3	-32.2725	-0.2605
Q4E_116	E5	E4	E1	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNTIVSGSKLFPEVIDLGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6683	0.571	88.2	-41.0706	-0.0909
Q4E_117	E5	E4	E2	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNTIVSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPKLFPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.5943	0.574	85.0	-35.0355	-0.2726
Q4E_118	E5	E4	E2	E3	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNTIVSGSIVMGNGTLVGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPRLTEELNTISERFTVYLVKAN	0.6326	0.587	86.0	-45.1895	-0.2269
Q4E_119	E5	E4	E3	E1	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNTIVSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRPKLFPEVIDLSEFTVYLVKAN	0.6683	0.571	85.4	-79.0654	-0.1058
Q4E_120	E5	E4	E3	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAVGELVEIQLPLLYSDDALHLAWYFEGGKESPNESMFTVENKYFPPFVDYNTIVSGSRLTEELNTIGGTEHFHVTVKAAGTHAVNLTMRP IVMGNGTLVSRFTVYLVKAN	0.6326	0.587	84.0	-46.1391	-0.2297

Apéndice D. Perfiles cromatográficos

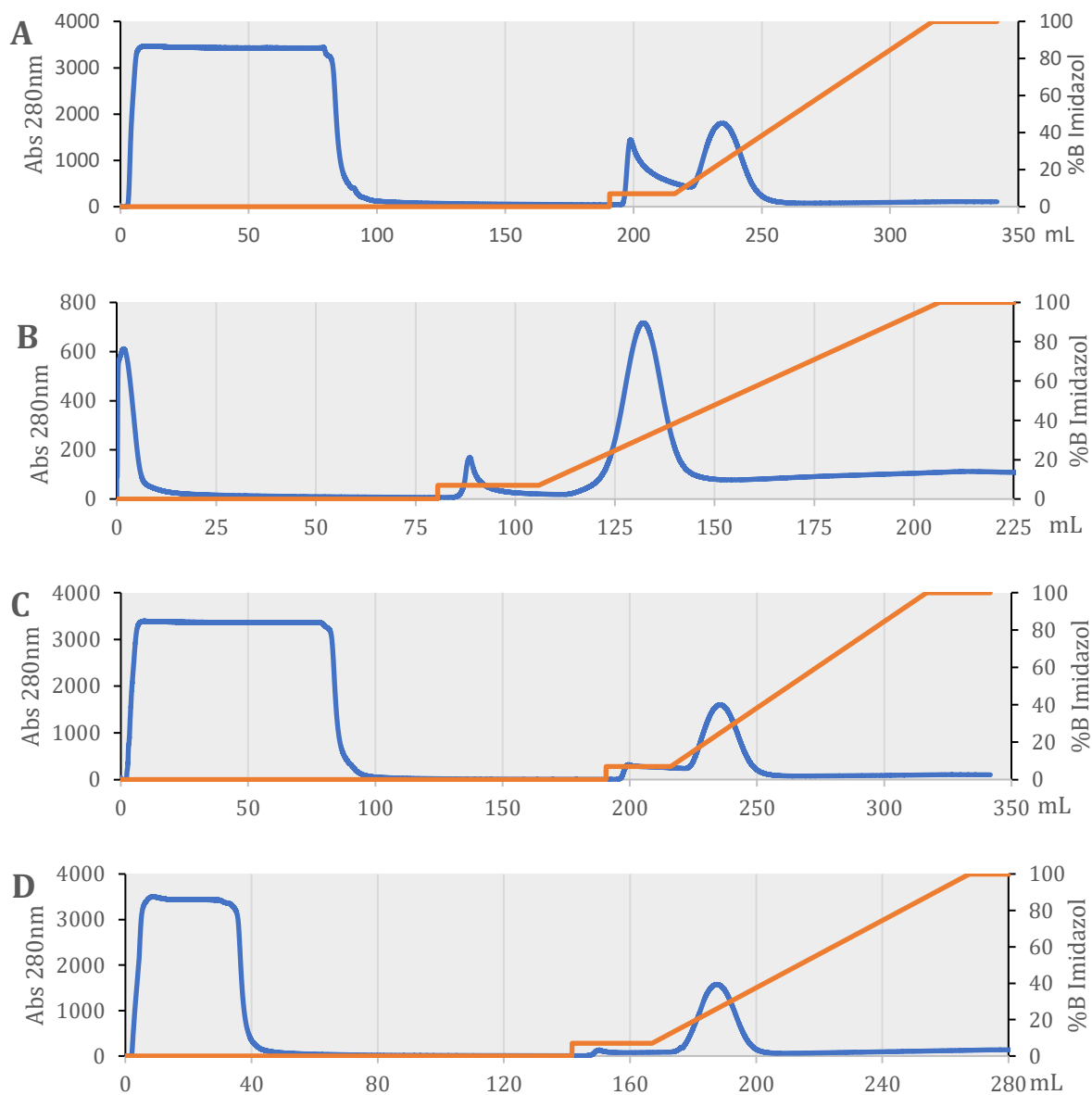


Figura 28. Cromatogramas de Mutantes de chagasina por IMAC. (A) Chagasina V18K – F58K, **(B)** Chagasina V18R – F58R, **(C)** Chagasina V18R – F58K, **(D)** Chagasina V18K – F58R. Línea azul: Absorbancia a 280nm, línea naranja: porcentaje de buffer de elución.

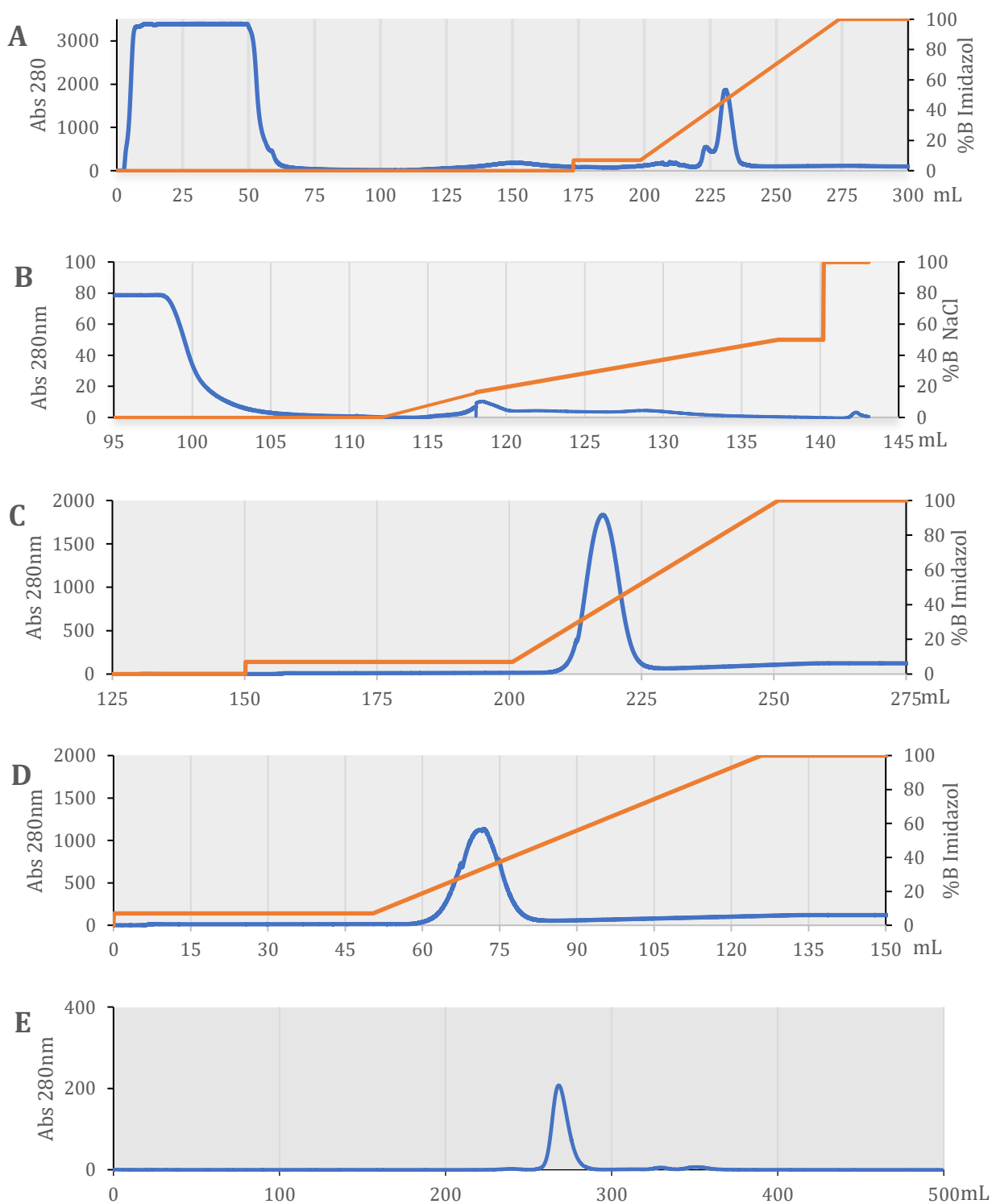


Figura 29. Cromatogramas de Quimera Q109 (A) Fracción soluble por IMAC, (B) Prueba por IEX, (D) y (C) Segundo paso por IMAC, (E) Separación de agregados por SEC. Línea azul: Abs a 280nm, línea naranja: porcentaje de buffer de elución.

Apéndice E. Medios de cultivo y amortiguadores

Medio Luria Bertani (LB)

10g/L de peptona, 5g/L de extracto de levadura y 10g/L de NaCl, ajustar el pH a 7.2 con NaOH 5N y esterilizar por calor húmedo, 121°C, 15 minutos, 15 libras de presión.

2TY

16g/L de peptona, 10g/L de extracto de levadura y 5g/L de NaCl, ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5N y esterilizar por calor húmedo, 121°C, 15 minutos, 15 libras de presión.

TBE 5X

54g/L TrisHCl, 27.5 g ácido bórico, 20 mL 0.5M EDTA (pH 8.0)

Buffer de transferencia

Tris-HCl 25mM, glicina 0.2M y metanol 20% a pH 8.3, esterilizar por filtración a 0.22 µm y resguardar en frasco ambar.

PBS 10x

NaCl 1.27M, KCl 27mM, Na_2HPO_4 , 100mM, KH_2HPO_4 18 mM, ajustar el pH a 7.4 y esterilizar por calor húmedo.

Buffer A

50Mm Tris-HCl pH 9.3, 0.5M NaCl, 5 mM de Imidazol, Glicerol 5%, 1 mM de beta mercaptoetanol y un coctel de inhibidores de proteasas.

Buffer B

50Mm Tris-HCl pH 9.3, 0.5M NaCl, 500 mM de Imidazol, Glicerol 5%, 1 mM de beta mercaptoetanol y un coctel de inhibidores de proteasas.

Apéndice F. colonyPCR

Protocolo: 1 ciclo de 94°C por 2 minutos, 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por un minuto y 72°C por 2 minutos. Finalmente 1 ciclo de 72°C durante 7 minutos.

Tabla 18. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para colonyPCR

Oligonucleótido	Secuencia	Longitud (pb)	Tm(°C)
Promotor T7 5' (Forward)	5'TAATACGACTCACTATAGGGG 3'	21	51
Terminador T7 3' (Reverse)	5'CCAAGGGGTTATGCTAGTTA 3'	20	53

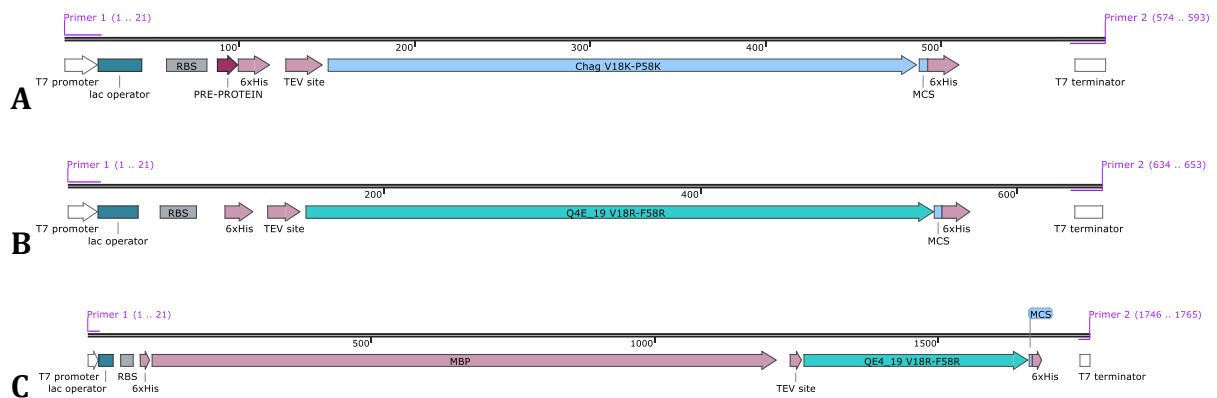


Figura 30. Amplicones generados por colonyPCR. (A) ChagasinaKK-pCri8a, 593pb, (B) Q19-pCri8a, 653pb, (C) Q19-pCri1a, 1765pb. Diseñados *in silico* en SnapGene.

Apéndice G. Curva tipo de ensayo BCA

