



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**Expresión de  $\alpha$ -neurotoxinas de cadena larga consenso para la generación  
de anticuerpos contra el veneno de elápidos**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. en Bt. Víctor Carpanta Capistran**

**TUTOR**

**Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete**

**Instituto de Biotecnología, UNAM.**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dra. Rosana Sánchez López**

**Instituto de Biotecnología, UNAM.**

**Dr. José Arcadio Farías Rico**

**Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.**

**Cuernavaca, Morelos. Enero 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*La verdad triunfa por sí misma, la mentira necesita siempre complicidad.*

(Epicteto)

La presente tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete, en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt-UNAM).

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo, especialmente a mis padres, Albina Capistrán Celis y Pedro Carpanta Díaz, por su incondicional apoyo, por haber creído siempre en mí y por su constante amor y respaldo.

## RESUMEN

Las neurotoxinas de cadena larga (LNTXs) están presentes en los venenos de élapidos de importancia médica alrededor del mundo. Son una familia muy interesante debido a dos peculiaridades que son su baja proporción dentro del veneno, ya que representan alrededor del 1 al 5% de la fracción proteica, y la variación intraespecífica entre las especies. Estas características causan complicaciones en la producción de antídotos contra mordeduras de élapidos, generando bajos porcentajes de anticuerpos contra el veneno de élapidos, lo cual provoca que la mayoría de los antivenenos convencionales sean poco efectivos para neutralizar estas toxinas.

El mejoramiento de los antivenenos se estudia continuamente, utilizando diferentes estrategias como la optimización de anticuerpos para que sean más efectivos. Una alternativa es el uso de proteínas recombinantes consenso que se asemejan a las proteínas tóxicas de los venenos son una alternativa para generar antivenenos más adecuados y de amplio espectro. Esta estrategia ha demostrado ser efectiva para generar anticuerpos eficaces, siendo pionera en su tecnología. Dado el potencial de esta metodología, nos propusimos sintetizar una neurotoxina recombinante de cadena larga consenso para optimizar la capacidad neutralizante de los antivenenos disponibles en el mercado. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron buenos niveles de reconocimiento de los anticuerpos generados hacia LNTXs y contra venenos de élapidos de importancia médica. La LcNNTX, expresada en cuerpos de inclusión se plegó en al menos cinco isoformas estructurales, ninguna de las cuales exhibió actividad neurotóxica. Sin embargo, a partir de estas isoformas se lograron producir anticuerpos. Entre ellas, la isoforma estructural 2 fue la única que demostró una capacidad parcial de neutralización frente al veneno de los élapidos *A. lubricus* y *D. polilepis*.

Se exploró si la modificación de la secuencia de aminoácidos en la neurotoxina consenso de cadena larga, junto con la eliminación de un puente disulfuro, podría mejorar la capacidad neutralizante de los anticuerpos. Para ello, se crearon dos tipos de variantes: en la primera, los aminoácidos básicos K23, R33, R36 y K49, esenciales para el reconocimiento toxina-canal, fueron reemplazados por Glu. Con esta modificación, se buscó determinar si estos residuos son reconocidos y neutralizados por los anticuerpos que se dirigen a las  $\alpha$ -LNTX recombinantes, y evaluar la posible disminución en toxicidad. Los resultados con los anticuerpos de la variante 1 fueron significativos: los anticuerpos mostraron un bajo reconocimiento de venenos y neurotoxinas en general, sin capacidad neutralizante frente a LNTXs. Aunque se obtuvo una proteína soluble al cambiar la polaridad, no se logró mantener la capacidad de neutralización sobre los venenos. En la segunda variante, se eliminó una sección de un puente disulfuro, que es clave en la toxicidad de las LNTXs al permitir su unión a canales de acetilcolina musculares y neuronales. Al eliminar esta zona, se generó una toxina quimérica con cuatro puentes disulfuro y 61 aminoácidos, conservando su identidad con las neurotoxinas de cadena larga. Los anticuerpos generados contra esta variante reconocieron neurotoxinas de cadena larga y venenos, aunque con menor eficacia que la variante con cinco puentes disulfuro. Este resultado sugiere que el segmento eliminado es

crucial para el reconocimiento y neutralización de LNTXs recombinantes, posiblemente debido a su influencia en el plegamiento estructural.

Los resultados de este trabajo son interesantes, ya que revelan las consideraciones clave al modificar la secuencia de neurotoxinas de cadena larga recombinante y cómo esto impacta directamente la efectividad de los anticuerpos producidos. Aunque el sistema de expresión en *E. coli* presenta limitaciones en el plegamiento de proteínas ricas en puentes disulfuro, hemos logrado generar anticuerpos prometedores que contribuyen a resolver el problema de neutralización de neurotoxinas de cadena larga en elápidos de importancia médica.

## ABSTRACT

Long-chain neurotoxins (LNTXs) are present in the venoms of medically significant elapids worldwide. They are an intriguing family due to two characteristics: their low proportion in the venom, representing around 1-5% of the protein fraction, and the intraspecific variation among species. These features complicate the production of antidotes against elapid bites, resulting in low antibody levels against elapid venom and rendering most conventional antivenoms less effective at neutralizing these toxins.

Antivenom improvement is continuously studied using various strategies, such as optimizing antibodies to enhance their effectiveness. One alternative is the use of consensus recombinant proteins resembling toxic venom proteins to generate broader-spectrum and more effective antivenoms. This strategy has proven effective for generating potent antibodies and represents a pioneering technological approach. Given the potential of this methodology, we aimed to synthesize a consensus recombinant long-chain neurotoxin to optimize the neutralizing capacity of commercially available antivenoms. The results showed good recognition levels of antibodies generated against LNTXs and medically important elapid venoms. The LcNTX, expressed in inclusion bodies, folded into at least five structural isoforms, none of which exhibited neurotoxic activity; however, antibodies were successfully produced from these isoforms. Among these, structural isoform 2 was the only one that demonstrated partial neutralizing capacity against *A. lubricus* and *D. polylepis* venom.

We further explored whether modifying the amino acid sequence of the consensus long-chain neurotoxin, along with removing a disulfide bridge, would enhance the neutralizing ability of the antibodies. Two variants were created: in the first, the basic amino acids K23, R33, R36, and K49, essential for toxin-channel recognition, were replaced by Glu. This modification aimed to determine if these residues are recognized and neutralized by antibodies targeting recombinant  $\alpha$ -LNTXs, and to assess a potential reduction in toxicity. The results with variant 1 antibody were significant, as the antibodies showed low recognition of venoms and neurotoxins in general, with no neutralizing effect on LNTXs. Although a soluble protein was obtained by altering polarity, the neutralization capacity of the venoms was not retained. In the second variant, a segment of a disulfide bridge was removed, which is crucial for LNTX toxicity by enabling binding to both muscular and neuronal acetylcholine receptors. Removing this segment yielded a chimeric toxin with four disulfide bridges and 61 amino acids, preserving its identity with long-chain neurotoxins. Antibodies generated against this variant recognized long-chain neurotoxins and venoms, albeit with less efficacy than the five-disulfide bridge variant. This result suggests that the removed segment is critical for recombinant LNTX recognition and neutralization, likely due to its impact on structural folding.

The findings of this study are noteworthy, as they reveal key considerations when modifying recombinant long-chain neurotoxin sequences and how these modifications directly impact the effectiveness of the generated antibodies. Although the *E. coli* expression system has limitations in folding disulfide-rich proteins, we successfully generated promising antibodies that contribute to addressing the challenge of neutralizing long-chain neurotoxins in medically relevant elapids.

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el producto de un esfuerzo constante, respaldado por el apoyo económico, intelectual y técnico de numerosas personas e instituciones

Agradezco a la UNAM y al Instituto de Biotecnología (IBT), especialmente a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), por el apoyo recibido a través del proyecto IT200724, así como por otorgarme la beca de manutención para el doctorado durante el periodo agosto-diciembre. También agradezco el financiamiento proporcionado por el proyecto CONACYT-PRONII titulado "Venenos y antivenenos" (No. 303045). Asimismo, quiero expresar mi gratitud al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONACYT) por la beca de doctorado otorgada (CVU: 738206).

Agradezco al Dr. Gerardo Corzo Burguete por su asesoría y tutoría durante el desarrollo de este proyecto de doctorado, así como por la confianza brindada a lo largo de todo el proceso. Le agradezco también por aceptarme en su grupo de investigación y por darme la oportunidad de aprender y trabajar con las maravillosas proteínas.

Agradezco a la Dra. Rosana Sánchez López por su invaluable tutoría, así como por su destacada labor como guía crítica en el planteamiento y desarrollo tanto del trabajo experimental como del escrito de la presente tesis. Su constante entusiasmo y disposición para brindar apoyo en todo momento han sido esenciales para el éxito de este proyecto. De igual manera, agradezco al Dr. José Arcadio Farías Rico por su asesoría académica, y el profundo interés demostrado en el desarrollo del proyecto de doctorado.

Expreso mi agradecimiento al comité evaluador y al jurado del examen de doctorado, compuesto por la Dra. María Alejandra Bravo de la Parra, la Dra. Liliana Pardo López, la Dra. Adela Rodríguez Romero, el Dr. José Federico del Río Portilla y el Dr. Gerardo Pável Espino Solís. Aprecio profundamente su dedicación por enriquecer el trabajo escrito, así como sus críticas constructivas y el valioso apoyo académico recibido.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Iván Arenas Sosa por su invaluable asesoría técnica y por su incansable dedicación para que pudiera dominar con precisión las técnicas del laboratorio. Su constante apoyo y disposición para ayudarme a superar los obstáculos y contratiempos de este proyecto fueron fundamentales para mi aprendizaje y desarrollo. Le estoy inmensamente agradecido por su compromiso a lo largo de todo este proceso.

Agradezco el apoyo técnico otorgado por la Dra. Herlinda Catalina Clement Carretero, Dra. Hilda Vázquez López, Dr. Edgar Neri Castro, Dr. Fernando Zamudio Zuñiga, M en C Alejandro Olvera Rodríguez y al Biol. Felipe Olvera Rodriguez. Igualmente a la M.V.Z M. Elena Elizabeth Mata Moreno de la Unidad de Bioterio; al M.A. Mario Trejo y Oswaldo López. Por último, reconozco y agradezco la enorme ayuda y soporte tecnico proporcionado por Maria del Carmen Martínez Segura y Ricardo Mondragón Cortes; y al Lic. J. Antonio Bolaños de la secretaria académica del IBT.

Finalmente, quiero expresar mi profundo agradecimiento a todos los miembros del grupo de trabajo Corzo-Alagón. Tuve la suerte de interactuar con ambos grupos, quienes siempre estuvieron dispuestos a brindarme su apoyo y ofrecerme valiosos consejos técnicos que no solo enriquecieron el desarrollo del proyecto, sino también mi formación académica.

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Serpientes venenosas y su peligrosidad .....	1
1.2 Familia Elapidae .....	1
1.3 Veneno de elápidos .....	1
1.4 Proteínas de tres dedos (3 FTXs) en venenos de elápidos .....	2
1.4.1 Bloqueadores de canales de calcio .....	2
1.4.2 Citotoxinas/Cardiotoxinas .....	2
1.4.3 Inhibidores de acetilcolinesterasas .....	3
1.4.4 Bloqueadores de receptores $\beta$ adrenérgicos .....	4
1.4.5 Toxinas muscarínicas .....	5
1.5 Neurotoxinas .....	6
1.5.1 $\beta$ -neurotoxinas .....	6
1.5.2 $\alpha$ -neurotoxinas .....	6
1.5.1 Neurotoxinas de cadena corta ( $\alpha$ -SNTX) .....	7
1.5.1 Neurotoxinas de cadena larga ( $\alpha$ -LNTX) .....	7
1.6 Interacción de las $\alpha$ -LNTX con el canal de acetilcolina (nAChR) .....	10
1.7 Uso de consensos proteicos en toxinas .....	12
1.8 Antivenenos contra el veneno de elápidos peligrosos .....	13
1.9 Anticuerpos contra neurotoxinas y el reconocimiento de $\alpha$ -LNTX .....	14
2. JUSTIFICACIÓN .....	15
3. HIPÓTESIS .....	16
4. OBJETIVO GENERAL .....	16
4.1 Objetivos particulares .....	16
5. METODOLOGÍA .....	17
5.1 Selección de LNTXs .....	17
5.2 Alineamiento múltiple de secuencia de $\alpha$ -LNTX .....	17
5.3 Construcción de las secuencias codificantes de las $\alpha$ -LcNTX, V1 y V2 .....	18
5.4 Expresión de proteínas $\alpha$ -LcNTX, V1 y V2 .....	20
5.5 Estructura secundaria $\alpha$ -LcNTX, V1 y V2 por difracción circular .....	21
5.6 Inmunización con $\alpha$ -LcNTX, $\alpha$ -LcNTX V1 y $\alpha$ -LcNTX V2 en conejos .....	21
5.7 Monitoreo y reconocimiento de neurotoxinas de cadena larga consenso y sus variantes por técnica de ELISA .....	22

6. RESULTADOS .....	23
6.1 $\alpha$ -LcNTX .....	23
6.2 Expresión de $\alpha$ -LcNTX en <i>E. coli</i> Origami, SHuffle, M15, BL21 y Artic en medio de cultivo LB .....	24
6.3 Modificaciones en el cultivo de <i>E. coli</i> ML15 pQE-30/LcNTX para optimizar la producción $\alpha$ -LcNTX en forma soluble citoplasmática en medio mMLB .....	25
6.4 $\alpha$ -LcNTX .....	27
6.5 Dicroísmo circular de las isoformas $\alpha$ -LcNTX .....	29
6.6 Reconocimiento de los anticuerpos a $\alpha$ -LNTXs, 3FTXs y a venenos de elápidos por medio de técnica de ELISA .....	31
6.7 Ensayo de neutralización de venenos de elápidos de importancia médica y a bungarotoxina utilizando los anticuerpos anti-LcNTX. ....	33
7. $\alpha$ -LcNTX V1 .....	34
7.1 Expresión de $\alpha$ -LcNTX V1 en <i>E. coli</i> Origami .....	35
7.2 Dicroísmo circular de $\alpha$ -LcNTX V1 .....	39
8 $\alpha$ -LcNTX V2 (CDAFC) .....	44
8.1 Expresión de $\alpha$ -LcNTX V2 en <i>E. coli</i> Origami .....	45
8.2 Producción de la $\alpha$ -LcNTX V2 oxidada contenida en los cuerpos de inclusión.....	46
8.3 Dicroísmo circular de las isoformas $\alpha$ -LcNTX V2 (1, 2).....	47
9. DISCUSIÓN .....	51
9.1 $\alpha$ -LcNTX.....	51
9.2 $\alpha$ -LcNTX V1 .....	55
9.3 $\alpha$ -LcNTX V2 .....	57
10. CONCLUSIONES .....	60
11. PERSPECTIVAS .....	61
10. BIBLIOGRAFÍA .....	62
10. ANEXOS .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura tridimensional de la toxina FS2 (PDB: 1tfs) y su unión el canal dependiente de calcio del elápidio *Dendroaspis polylepis*. En color azul se muestra la toxina FS2 y en color naranja el canal de calcio dependiente de voltaje..... 2
- Figura 2. Estructura tridimensional de la cardiotoxina I (PDB: 1cre) del elápidio *Naja naja atra*. En color rojo se muestran los 4 puentes disulfuro. Los números 1,2,3 señalan las asas proteicas..... 3
- Figura 3. Estructura tridimensional de la Fasciculina 2 (PDB: 1fsc) del elápidio *Dendroaspis angusticeps*. En color rojo se muestran los 4 puentes disulfuro. Los números 1,2,3 señalan las asas proteicas. .... 4
- Figura 4. Estructura tridimensional de  $\beta$ -cardiotoxin CTX27 (PDB: 2vlw) del elápidio *Ophiophagus hannah*. En color rojo se muestran los 4 puentes disulfuro. Los números 1,2,3 señalan las asas proteicas..... 4
- Figura 5. Estructura tridimensional de la MT1 (PDB: 4do8) del elápidio *Dendroaspis angusticeps*. En color rojo se muestran los 4 puentes disulfuro. Los números 1,2,3 señalan las asas proteicas. .... 5
- Figura 6. Estructura tridimensional de la cobrotoxin (PDB: 1coe) del elápidio *Naja atra*. En color rojo se muestran los 4 puentes disulfuro. Los números 1,2,3 señalan las asas proteicas ..... 7
- Figura 7. Superposición de estructura tridimensional de 4  $\alpha$ -LNTX altamente tóxicas. A)  $\alpha$ -bungarotoxin (PDB: 1haj) del elápidio *Bungarus multicinctus* (negro). B)  $\alpha$ -elapitoxin (PDB: 4lft) del elápidio *Dendroaspis polylepis* (verde), C)  $\alpha$ -cobratoxin (PDB: 1ctx) del elápidio *Naja siamensis* (rosa). D) Neurotoxina 1 (PDB: 1W6B) del elápidio *Naja oxidiana* (amarillo). En color rojo se muestran los 5 puentes disulfuro, en azul se muestran los residuos de lisina (L) y en naranja argininas (R). Los números 1,2,3 señalan las asas proteicas de las toxinas. .... 8
- Figura 8. Cantidad de  $\alpha$ -LNTX en un miligramo de veneno de elápidos de importancia médica en el mundo. Datos tomados y modificados de Malih *et al.*, 2014; Yap *et al.*, 2014; Shan *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2015; Petras *et al.*, 2015; Sintiprungrat *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2016; Oh *et al.*, 2017; Skejic *et al.*, 2018; Hia *et al.*, 2020. .... 9
- Figura 9. A) Se muestra el canal de acetilcolina muscular *Torpedo* con sus 3 dominios (PDB: 7QL6) 1) intra, 2) inter y 3) extra membranar. B) Dominio transmembranar de canal de acetilcolina. C) Dominio extra membranar en donde se ubican las subunidades ( $\alpha$ : rosa,  $\beta$ : amarillo,  $\gamma$ : azul,  $\alpha$ : morado y  $\delta$ : rojo) y el sitio de unión a antagonistas ubicados entre ( $\alpha$  y  $\gamma$ ) y ( $\alpha$  y  $\beta$ ). .... 11
- Figura 10. Interacción el dominio transmembranar del canal de acetilcolina neuronal con la bungarotoxina (*Bungarus multicinctus*). Formando el complejo canal-toxina altamente estable del tipo irreversible (PDB: 6UWZ). .... 11

Figura 12. Aminoácidos altamente conservados en el alineamiento múltiple de secuencia de la $\alpha$ -LNTXs (1-66).....	18
Figura 13. Producto de PCR del ensamblaje de los 6 oligonucleótidos para dar origen al gen $\alpha$ -LcNTX. M) Marcado de peso molecular, Carril 1: Producto de PCR del ensamblaje de $\alpha$ -LcNTX.....	23
Figura 14. PCR de colonia de 14 clonas de <i>E. coli</i> XL1B que contienen la construcción pQE-30/LcNTX. M) Marcado de peso molecular, Carril 1-14: Producto de PCR 14 clonas <i>E. coli</i> XL1B tamaño esperado de 391 pb, Carril 15: Vector vacío 234 pb.	24
Figura 15. SDS-PAGE (15% SDS-tricina) derivado de los cuerpos de inclusión de las cepas de <i>E. coli</i> Carril 1: Origami, Carril 2: SHuffle, Carril 3: M15, BL-21 y Carril 5: Artic expresadas mediante el plásmido pQE30-LcNTX.....	25
Figura 16. Western blot IgG rabbit anti-His de la proteína contenida en los cuerpos de inclusión solubilizados de la bacteria <i>E. coli</i> , carril 1: SHuffle, carril 2: Origami, carril 3: BL-21 con la construcción pQE30-LcNTX.....	25
Figura 17. A) SDS-PAGE (15% SDS-tricina) derivado del análisis de 15 $\mu$ L la fracción soluble de las fermentaciones de la cepa <i>E. coli</i> M15. Carril 1: 16 °C, 18 h con 0.25 mM de IPTG, carril 2: 16 °C, 18 h con 0.5 mM de IPTG, carril 3: 16 °C, 18 h con 1 mM de IPTG, carril 4: 30°C, 6 h con 0.25 mM de IPTG, carril 5: 30°C, 6 h con 0.5 mM de IPTG, carril 6: 30°C, 6 h con 1 mM de IPTG en medio mMLB. B) Western blot IgG Rabbit anti-His derivado del análisis de 30 $\mu$ L de la fracción soluble las cepas <i>E. coli</i> M15. Carril 1: 16 °C, 18 h con 0.25 mM de IPTG, carril 2: 16 °C, 18 h con 0.5 mM de IPTG, carril 3: 16 °C, 18 h con 1 mM de IPTG, carril 4: 30°C, 6 h con 0.25 mM de IPTG, carril 5: 30°C, 6 h con 0.5 mM de IPTG, carril 6: 30°C, 6 h con 1 mM de IPTG en medio mMLB.....	26
Figura 18. SDS-PAGE (15% SDS-tricina) derivado del análisis de 10 $\mu$ L la fracción insoluble de las fermentaciones de <i>E. coli</i> M15. Carril 1: 16 °C, 18 h con 0.25 mM de IPTG, carril 2: 16 °C, 18 h con 0.5 mM de IPTG, carril 3: 16 °C, 18 h con 1 mM de IPTG, carril 4: 30°C, 6 h con 0.25 mM de IPTG, carril 5: 30°C, 6 h con 0.5 mM de IPTG, carril 6: 30°C, 6 h con 1 mM de IPTG en medio mMLB.....	27
Figura 19. Cromatograma de la purificación del producto de la elución de la purificación por columna de afinidad Ni-agarosa de la $\alpha$ -LcNTX por medio de columna C18..	28
Figura 20. Espectros de dicroísmo circular de las isoformas de la $\alpha$ -LcNTx. ....	29
Figura 21. Títulos de los anticuerpos obtenidos por medio de la técnica de ELISA del reconocimiento de las isoformas proteicas de la $\alpha$ -LcNTX. Títulos obtenidos para la isoforma 2, 5 e isoformas 1, 2, 3, 4 y 5.....	30
Figura 22. Representación gráfica del reconocimiento de los anticuerpos anti-LcNTX isoforma 2, anti-LcNTX isoforma 5 y anti-LcNTX isoformas 1, 2, 3, 4 y 5 a venenos de elápidos de importancia médica. ....	32

Figura 23. Representación gráfica del reconocimiento de los anticuerpos anti-LcNTX isoforma 2, anti-LcNTX isoforma 5 y anti-LcNTX isoformas 1, 2, 3, 4 y 5 a venenos de elápidos de importancia médica. ....	32
Figura 24. Representación gráfica del reconocimiento de los anticuerpos anti-LcNTX isoforma 2, anti-LcNTX isoforma 5 y anti-LcNTX isoformas 1, 2, 3, 4 y 5 a venenos de elápidos de importancia médica. ....	33
Figura 25. Producto de PCR del ensamblaje de los 4 oligonucleótidos para dar origen al gen $\alpha$ -LcNTX V1. M) Marcado de peso molecular, Carril 1: Producto de PCR del ensamblaje de $\alpha$ -LcNTX V1. ....	34
Figura 26. PCR de colonia de 5 clonas de <i>E. coli</i> XL1B que contienen la construcción pQE-30/LcNTX V1. M) Marcado de peso molecular, Carril 1-3: Producto de PCR 5 clonas <i>E. coli</i> XL1B tamaño esperado de 391 pb. ....	35
Figura 27. SDS-PAGE (15 % SDS-tricina), posterior a la purificación por columna de níquel-agarosa de la toxina $\alpha$ -LcNTX V1, 1-15: tubos de 2 mL con proteína recolectada, se cargó al gel 100 $\mu$ L de la solución de cada tubo. ....	36
Figura 28. A) SDS-PAGE (15% SDS-tricina) derivado de la fracción soluble de Origami que expresa la $\alpha$ -LcNTX V1. Carril 1: 1 $\mu$ L, carril 2: 2 $\mu$ L, carril 3: 2.5 $\mu$ L y carril 4: 5 $\mu$ L. B) Western blot IgG rabbit anti-His derivado del análisis de la fracción soluble de <i>E. coli</i> Origami. Carril 1: 2 $\mu$ L, carril 2: 3 $\mu$ L y carril 3: 5 $\mu$ L. ....	36
Figura 29. Cromatograma de la fracción soluble citoplasmática de la toxina $\alpha$ -LcNTX V1 expresada en <i>E. coli</i> Origami de la proteína reducida y oxidada. ....	38
Figura 30. SDS-PAGE (15% SDS-glicina) derivado de las fracciones cromatográficas de la purificación de la fracción soluble de la toxina $\alpha$ -LcNTX V1 expresada en <i>E. coli</i> Origami. Carril 1: Control proteína $\alpha$ -LcNTX V1 reducida, carril 2: min 19. ....	38
Figura 31. Espectros de dicroísmo circular de la proteína $\alpha$ -LcNTx V1. ....	39
Figura 32. Títulos de los anticuerpos obtenidos por medio de la técnica de ELISA del reconocimiento de la proteína $\alpha$ -LcNTX V1. ....	40
Figura 33. Representación gráfica del reconocimiento del anticuerpo anti-LcNTX V1 frente a venenos de elápidos de importancia médica. ....	41
Figura 34. Visualización del reconocimiento del anti-LcNTX V1 a $\alpha$ -LNTX's de elápidos de importancia médica. ....	42
Figura 35. Representación gráfica del reconocimiento del anticuerpo anti-LcNTX V1 a toxinas de tres dedos (3FTX) de elápidos de importancia médica. ....	42
Figura 36. Producto de PCR del ensamblaje de los 4 oligonucleótidos para dar origen al gen $\alpha$ -LcNTX V2. M) Marcado de peso molecular, Carril 1: Producto de PCR del ensamblaje de $\alpha$ -LcNTX V2. ....	44

Figura 37. Resultado de la amplificación de las clonas obtenidas con la con la construcción $\alpha$ -LcNTX V2.....	45
Figura 38. SDS-PAGE (15 % SDS-tricina), posterior a la purificación por columna de níquel-agarosa de la toxina $\alpha$ -LcNTX V2, 1-15: tubos de 2 mL con proteína eluída, se cargó al gel 100 $\mu$ L de la solución de cada tubo. ....	45
Figura 39. Cromatograma de toxina $\alpha$ -LcNTX V2 resultado de la purificación de la columna C18 de las eluciones recolectadas de la purificación por afinidad níquel-agarosa de la proteína reducida y oxidada.....	46
Figura 40. Espectros de dicroísmo circular de las isoformas de la $\alpha$ -LcNTx V2.....	47
Figura 42. Títulos de los anticuerpos obtenidos por medio de la técnica de ELISA del reconocimiento de la proteína $\alpha$ -LcNTX V2. ....	48
Figura 43. Representación gráfica del reconocimiento del anticuerpo anti-LcNTX V2 a venenos de elápidos de relevancia médica. ....	49
Figura 44. Representación gráfica del reconocimiento del anticuerpo anti-LcNTX V2 a $\alpha$ -LNTX's de elápidos de importancia médica .....	49
Figura 45. Representación gráfica del reconocimiento del anticuerpo anti-LcNTX V2 a toxinas de tres dedos (3FTX's) de elápidos de relevancia médica. ....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de $\alpha$ -neurotoxinas de venenos de serpientes. ....	6
Tabla 2. Cambios de aminoácidos sobre la secuencia de la cobratoxina y su efecto en la disminución de la afinidad del canal de acetilcolina subtipo muscular <i>Torpedo</i> y neuronal $\alpha$ -7. ....	12
Tabla 3. LNTXs seleccionadas de elápidos de importancia médica en el mundo. ....	17
Tabla 4. Secuencia de aminoácidos de las variantes de $\alpha$ -LcNTXs .....	18
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la síntesis de la toxina $\alpha$ -LcNTX.....	18
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la síntesis de la toxina $\alpha$ -LcNTX V1 .....	19
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la síntesis de la toxina $\alpha$ -LcNTX V2 .....	19
Tabla 8. Proporción de oligonucleótidos utilizados para la síntesis de <i>novo</i> de LcNTXs ..	19
Tabla 10. Esquema de inmunización utilizado con las isoformas seleccionadas de toxina $\alpha$ -LcNTX. ....	21
Tabla 9. Resultado de análisis de espectrometría de masa de las fracciones cromatográficas de la purificación de la toxina $\alpha$ -LcNTX por columna C18 preparativa. ....	28
Tabla 11. Resultados obtenidos del ensayo de neutralización de la bungarotoxina y venenos de <i>A. lubricus</i> y <i>D. polylepis</i> utilizando los anticuerpos anti-LcNTX isoforma 2. ...	33
Tabla 12. Ensayos de neutralización de los venenos de <i>A. lubricus</i> y <i>D. polylepis</i> utilizando una mezcla de anticuerpos anti-isoforma 2 de LcNTx y anticuerpos anti-ScNTx. .	34
Tabla 13. Porcentajes de estructura secundaria de la bungarotoxina y de la toxina $\alpha$ -LcNTX .....	39
Tabla 14. Resultados obtenidos del ensayo de neutralización de bungarotoxina utilizando los anticuerpos anti-LcNTX V1.....	43
Tabla 15. Porcentajes de estructura secundaria de la bungarotoxina y las isoformas de $\alpha$ -LcNTX .....	47
Tabla 17. Resultados obtenidos del ensayo de neutralización de la bungarotoxina utilizando los anticuerpos anti-LcNTX V2.....	50
Tabla 18. Condiciones de plegamiento para proteínas de cadena larga ( $\alpha$ -LNTX) de elápidos producidas en <i>E. coli</i> . ....	53

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Serpientes venenosas y su peligrosidad

Las mordeduras de serpiente son un problema de salud pública de gran magnitud a nivel mundial. Cada año se reportan hasta 5.4 millones de ataques por estos reptiles, los cuales pueden causar múltiples padecimientos graves en las personas mordidas. Entre estos padecimientos se encuentran trastornos hemorrágicos, insuficiencia renal, destrucción local de los tejidos, parálisis grave de músculos respiratorios y cardíacos, lo que puede resultar en discapacidad o amputación de las extremidades afectadas. Sin embargo, el mayor riesgo radica en que, en casos graves, la víctima puede fallecer. De hecho, se estima que en todo el mundo se producen hasta 137,880 muertes al año debido a las mordeduras de serpiente (OMS, 2018).

A pesar de la evidente gravedad que representa sufrir un ataque de serpiente, este problema es a menudo descuidado en países donde habitan serpientes altamente peligrosas. Lamentablemente, el hábitat de estos reptiles suele coincidir con naciones de escasos recursos económicos, donde las víctimas reciben poco o ningún tratamiento médico (Scheske *et al.*, 2015). Las dos familias de serpientes más peligrosas, responsables de la mayoría de los accidentes ofídicos y muertes en todo el mundo, son la familia Viperidae y la familia Elapidae.

## 1.2 Familia Elapidae

La familia Elapidae se distribuye a lo largo del mundo, principalmente en regiones tropicales y subtropicales, dentro de ella se han considerado géneros de importancia médica como lo son: *Micrurus*, *Dendroaspis*, *Oxyuranus*, *Notechis*, *Naja* y *Ophiophagus* comúnmente conocidas como coralillos, mambas, serpientes de la muerte, taipanes y cobras. Son serpientes altamente peligrosas debido a la toxicidad de su veneno (Scheske *et al.*, 2015).

## 1.3 Veneno de elápidos

El veneno de los elápidos es un fluido altamente complejo con diversas funciones bioactivas (Chang, 1979). Su estudio se centra en caracterizar sus componentes para identificar la abundancia y peligrosidad de cada uno de ellos, y también en el análisis de sus elementos tóxicos para encontrar una manera de inhibir los efectos letales de estos y así prevenir los efectos adversos del envenenamiento (Kini *et al.*, 2010).

Al existir un número elevado de componentes en el veneno, se ha optado por clasificarlos principalmente en super familias proteicas, las cuales toman en cuenta la estructura, la secuencia de aminoácidos y su actividad biológica. Cabe mencionar que, aunque dos proteínas tengan una alta identidad de secuencia y estructura, bien pueden diferir en su actividad biológica (Kini *et al.*, 2010). Esto se atribuye a cambios específicos de aminoácidos en posiciones estratégicas, lo cual resulta en esta diversidad de funciones.

Dicha característica de variación en la actividad biológica está bien representada en la superfamilia de las proteínas denominadas de “tres dedos” (3 FTXs) altamente presentes en los venenos de elápidos (Nirthanan *et al.*, 2017).

## 1.4 Proteínas de tres dedos (3 FTXs) en venenos de elápidos

### 1.4.1 Bloqueadores de canales de calcio

La toxina más representativa de esta familia es la toxina FS2, encontrada en el veneno de mamba negra (*Dendroaspis polylepis*), la cual tiene una alta afinidad a canales de calcio voltaje dependientes (L-type calcium channel), bloqueándolos de manera irreversible. Al cerrarlos interfieren con la contracción del musculo liso, afectando funciones cardiacas. Debido a su importancia se han realizado varios estudios de esta toxina interaccionando con el canal de calcio (de Weille *et al.*, 1991). Además, se obtuvo su estructura cristalográfica, la cual permitió determinar que la región involucrada en la interacción con dicho canal está ubicada en el asa 3, ver figura 1 (Albrand *et al.*, 1995).

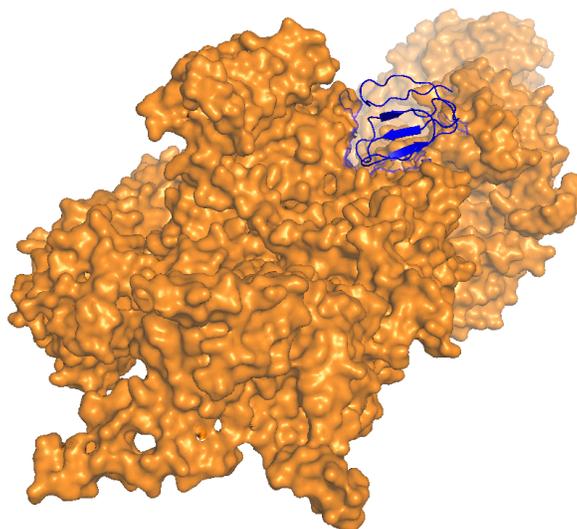


Figura 1. Estructura tridimensional de la toxina FS2 (PDB: 1tfs) y su unión al canal dependiente de calcio del elápidio *Dendroaspis polylepis*. En color azul se muestra la toxina FS2 y en color naranja el canal de calcio dependiente de voltaje

### 1.4.2 Citotoxinas/Cardiotoxinas

Son proteínas de alrededor de 60 aminoácidos que ocasionan daños en diferentes estirpes celulares, principalmente a células musculares y eritrocitos. Estas toxinas se han encontrado especialmente en venenos de serpientes del género *Naja*, su modo de acción y su blanco celular no han sido descritos completamente, aunque la hipótesis de que se unen a la membrana celular ocasionando ruptura se encuentra fuertemente apoyada.

Aunque determinado que solo los aminoácidos del asa 1 son los que interfieren en la unión toxina-canal, sin embargo, se tiene en cuenta la participación en menor grado de aminoácidos ácidos, básicos e hidrofóbicos distribuidos en lugares estratégicos alrededor de las 3 asas que forman a la cardiotoxina, la estructura tridimensional se muestra en la figura 2 (Kini *et al.*, 1989; Bhaskaran *et al.*, 1994).

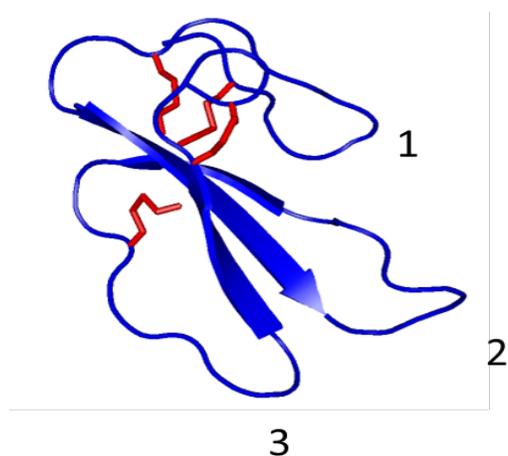


Figura 2. Estructura tridimensional de la cardiotoxina I (PDB: 1cre) del elápidio *Naja naja atra*. En color rojo se muestran los 4 puentes disulfuro. Los números 1,2,3 señalan las asas proteicas.

### 1.4.3 Inhibidores de acetilcolinesterasas

En este grupo se engloban toxinas cuya principal acción es la inhibición de las enzimas acetilcolinesterasas. Aunque la inhibición es generada en diferentes grados los efectos producto de la baja actividad enzimática se reflejan en la acumulación del neurotransmisor en la cavidad presináptica, lo que da a su vez trae como consecuencia la manifestación de pequeñas contracciones involuntarias visibles bajo la piel, sin embargo, no generan movimiento completo en alguna extremidad. El término médico de estos movimientos es fasciculaciones, por lo que se les denomina comúnmente como “fasiculinas” (Eastman *et al.*, 1995), como ejemplo se muestra en la figura 3 la estructura tridimensional de la fasiculina 2.

Este tipo de proteínas se han encontrado a la fecha solo en el veneno de serpientes africanas del género *Dendroaspis*. En cuanto a su secuencia constan de 60 aminoácidos y su estructura cristalográfica se ha resuelto, con ayuda de esto se ha determinado que los residuos importantes en la interacción toxina-enzima están ubicados en el asa 1 y 2 (Le Du *et al.*, 1996).

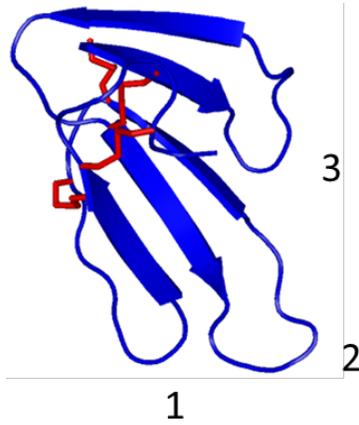


Figura 3. Estructura tridimensional de la Fasciculina 2 (PDB: 1fsc) del elápidio *Dendroaspis angusticeps*. En color rojo se muestran los 4 puentes disulfuro. Los números 1,2,3 señalan las asas proteicas.

#### 1.4.4 Bloqueadores de receptores $\beta$ adrenérgicos

Proteínas primeramente consideradas como citotoxinas debido a la similitud de secuencia aminoacídica, la cual está alrededor del 50%. Fueron encontradas en el veneno de la cobra rey (*Ophiophagus hannah*), en subsecuentes pruebas se probó la nula presencia de actividad hemolítica y anticoagulante (característica principal de las citotoxinas/cardiotoxinas motivo que obligó a separarlas de este grupo) (Rajagopalan *et al.*, 2007). Estas proteínas presentan alta afinidad por los canales adrenérgicos B1 y B2, en ensayos *in vivo* producen la disminución de la frecuencia cardíaca, lo cual demuestra el bloqueo de los canales tipo B. Un ejemplo de este grupo de la toxina  $\beta$ -cardiotoxin CTX27. Solo se han encontrado en el veneno de la cobra rey, presentan 63 aminoácidos en su secuencia (Fruchart *et al.*, 2008) en la Figura 4 se muestra la estructura tridimensional de  $\beta$ -cardiotoxina.

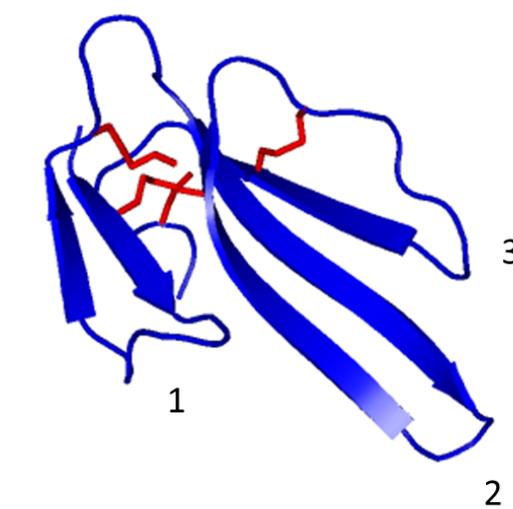


Figura 4. Estructura tridimensional de  $\beta$ -cardiotoxin CTX27 (PDB: 2v1w) del elápidio *Ophiophagus hannah*. En color rojo se muestran los 4 puentes disulfuro. Los números 1,2,3 señalan las asas proteicas.

### 1.4.5 Toxinas muscarínicas

Son las toxinas más caracterizadas pertenecientes a la superfamilia de tres dedos. Ellas poseen en su secuencia de 65 a 66 aminoácidos, tienen afinidad a canales de acetilcolina muscarínicos. En término de secuencia, tienen similitud con las toxinas adrenérgicas. Dentro de este grupo, las más caracterizadas provienen de venenos de mambas (*Dendroaspis*) (Karlsson *et al.*, 2000). Tienen alta afinidad por los canales de acetilcolina muscarínicos bloqueándolos y por lo tanto son clínicamente importantes. Estos canales muscarínicos están involucrados en procesos importantes tales como la visión, el aprendizaje, vasodilatación, sincronización del ritmo cardiaco, comunicación del sistema nervioso central, excitación de glándulas endocrinas y exocrinas, solo por nombrar a las más importantes.

Este tipo de proteínas son inhibidores alostéricos del canal de acetilcolina muscarínico. Son muy eficientes ya que logran tener actividades incluso a concentraciones nano y micro molares, y presentan alta selectividad en los subtipos de canales muscarínicos (M1-M5) (Karlsson *et al.*, 2000). Ha manera de ejemplo, la toxina MT1 mostrada en la figura 5, causa el bloqueo del canal subtipo M4, mientras que provoca la apertura del poro del subtipo M1. Se han reportado los aminoácidos determinantes en la interacción y bloqueo del receptor, siendo el Trp10 en el asa 1 y la Arg52 en la tercera asa, junto con la Tyr36 de la segunda asa que generan la interacción con el receptor (Sanchez *et al.*, 2009).

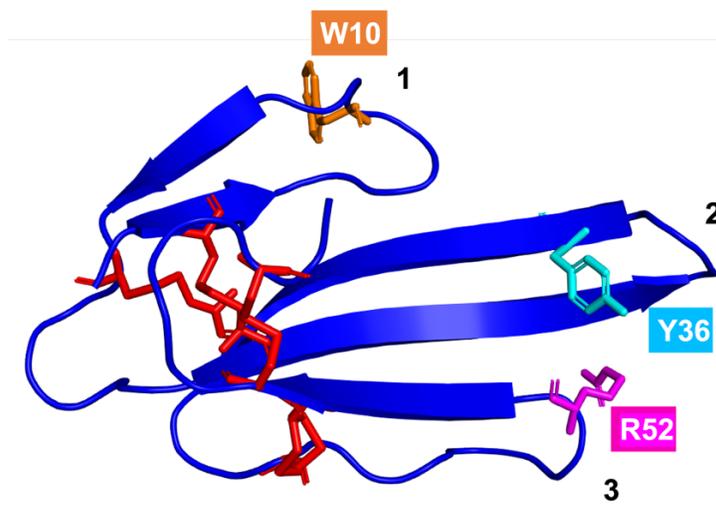


Figura 5. Estructura tridimensional de la MT1 (PDB: 4do8) del elárido *Dendroaspis angusticeps*. En color rojo se muestran los 4 puentes disulfuro. Los números 1,2,3 señalan las aspas proteicas.

## 1.5 Neurotoxinas

### 1.5.1 $\beta$ -neurotoxinas

Son enzimas pertenecientes a la familia de las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) tienen un peso molecular que ronda los 15 kDa. La actividad enzimática de las PLA<sub>2</sub>s requiere como cofactor al ion Ca<sup>2+</sup>. Su clasificación se ha basado tanto a su estructura y secuencia aminoacídica conforme a esto se formaron 4 clases (I, II, III y IV), dentro de la clase I se encuentran posicionadas las  $\beta$ -neurotoxinas de elápidos, el modo de acción radica en interferir en la liberación y recaptación de vesículas de acetilcolina con ello se imposibilita la contracción muscular por lo que se les categorizó como de acción pre-sináptica (Montecucco *et al.*, 2000).

### 1.5.2 $\alpha$ -neurotoxinas

Son las toxinas más letales pertenecientes a la superfamilia de proteínas de tres dedos. Su característica principal es la alta afinidad y especificidad a subtipos de canales de acetilcolina muscarínicos musculares y neuronales. En cuanto a su composición presentan de 60 a 75 aminoácidos desde su núcleo hidrofóbico estabilizado por 4 o 5 puentes disulfuro del cual emergen 5 hojas beta antiparalelas (Barber *et al.* 2013).

La clasificación actual está basada principalmente en la extensión aminoacídica, conforme a esto se agruparon en 4 tipos  $\alpha$ -neurotoxinas de cadena corta (SNTX),  $\alpha$ -neurotoxinas de cadena larga (LNTX),  $\alpha$ -neurotoxinas de cadena larga atípicas (ALNTXs) y  $\alpha$ -neurotoxinas de cadena larga no convencionales (NcLNTXs) las características de dichas toxinas se muestran en la tabla 1 (Nirthanan *et al.*, 2017).

Tabla 1. Clasificación de  $\alpha$ -neurotoxinas de venenos de serpientes.

Tipos	Blancos moleculares	Fuentes	Ejemplos
$\alpha$ -neurotoxinas de cadena corta ( $\alpha$ -SNTX)	Alta afinidad por nAChR muscular o <i>Torpedo</i> (Kd = 10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-11</sup> M)	Elapidae e Hydrophidae	$\alpha$ -erabutoxina ( <i>Laticauda semifasciata</i> ) $\alpha$ -toxina ( <i>Naja nigricolis</i> )
$\alpha$ -neurotoxinas de cadena larga ( $\alpha$ -LNTX)	Alta afinidad por nAChR muscular o <i>Torpedo</i> (Kd = 10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-11</sup> M) y nAChR neuronal (Kd = 10 <sup>-8</sup> - 10 <sup>-9</sup> M)	Elapidae	bungarotoxina ( <i>Bungarus multicinctus</i> )
$\alpha$ -neurotoxinas de cadena larga atípicas ( $\alpha$ -ALNTXs)	Alta afinidad por nAChR de <i>Torpedo</i> (Kd = 10 <sup>-11</sup> M)	Hydrophidae	Toxina Lc-a, Lc-b ( <i>Laticauda colubrina</i> )
$\alpha$ -neurotoxinas de cadena larga no convencionales ( $\alpha$ -NcLNTXs)	Baja afinidad por nAChR muscular o <i>Torpedo</i> (Kd = 10 nM)	Elapidae	Candoxina ( <i>Bungarus candidus</i> ) WTX ( <i>Naja kaouthia</i> ) Wntx-5 ( <i>Naja sputatrix</i> )

En los blancos moleculares, se muestra la interacción con receptores nicotínicos de acetilcolina y ejemplos. Como información adicional se muestra la constante de disociación de las toxinas (Kd). *Torpedo*: Receptor nicotínico de acetilcolina específico de pez marino *Torpedo*.

### 1.5.1 Neurotoxinas de cadena corta ( $\alpha$ -SNTX)

Su secuencia peptídica es de alrededor de 60 y 62 aminoácidos, dentro de la cual se encuentran 8 cisteínas, mismas que forman 4 puentes disulfuro, en cuanto a su peso molecular ronda entre 6 y 7 kDa. Como característica principal son capaces de interrumpir la comunicación entre nervios y músculos al interferir en la unión de la acetilcolina con su receptor (nAChRs muscular *Torpedo*), la interacción es estable, aunque se puede revertir. Como ejemplo de este grupo de toxinas se muestra la ilustración de la cobrotoxina figura 6, toxina altamente tóxica que exhibe una LD<sub>50</sub>: 0.09 mg/kg en inyección intravenosa en ratones (Meng *et al.*, 2002).

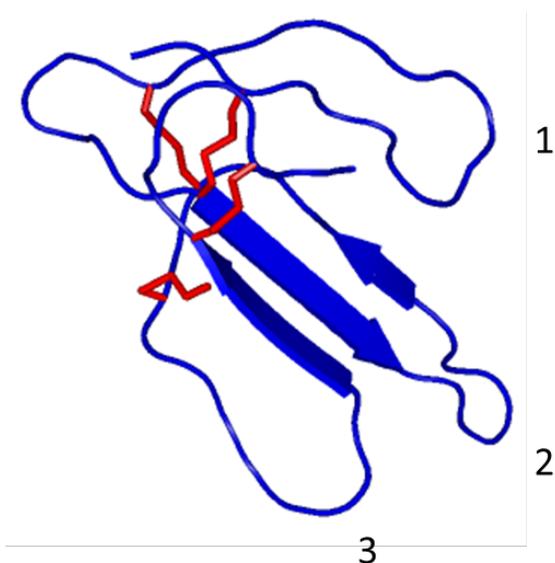


Figura 6. Estructura tridimensional de la cobrotoxina (PDB: 1coe) del elápidio *Naja atra*. En color rojo se muestran los 4 puentes disulfuro. Los números 1,2,3 señalan las asas proteicas

### 1.5.1 Neurotoxinas de cadena larga ( $\alpha$ -LNTX)

Estas proteínas están conformadas por 66 a 75 aminoácidos, y su peso molecular varía desde 7 a 9 kDa. La estructura tridimensional presenta 3 asas que contienen 10 cisteínas las cuales forman 5 puentes disulfuro; además, 4 de los 5 puentes disulfuro se encuentran en posiciones iguales o próximas a las de las neurotoxinas de cadena corta (Chang, 1999; Tsetlin *et al.*, 2009). La diferencia radica en la adición y posición del quinto puente disulfuro, mismo que se posiciona en la segunda asa de las toxinas. Son altamente afines a canales de acetilcolina del tipo neural y muscular formando una interacción altamente estable con un bloqueo de tipo irreversible. Debido a esta cualidad han sido utilizadas en la investigación y en la industria farmacéutica para localizar o caracterizar canales de acetilcolina (Nirthanan *et al.*, 2017). En la figura 7, se muestra la estructura espacial de LNTX altamente tóxicas de elápidos de importancia médica en el mundo.

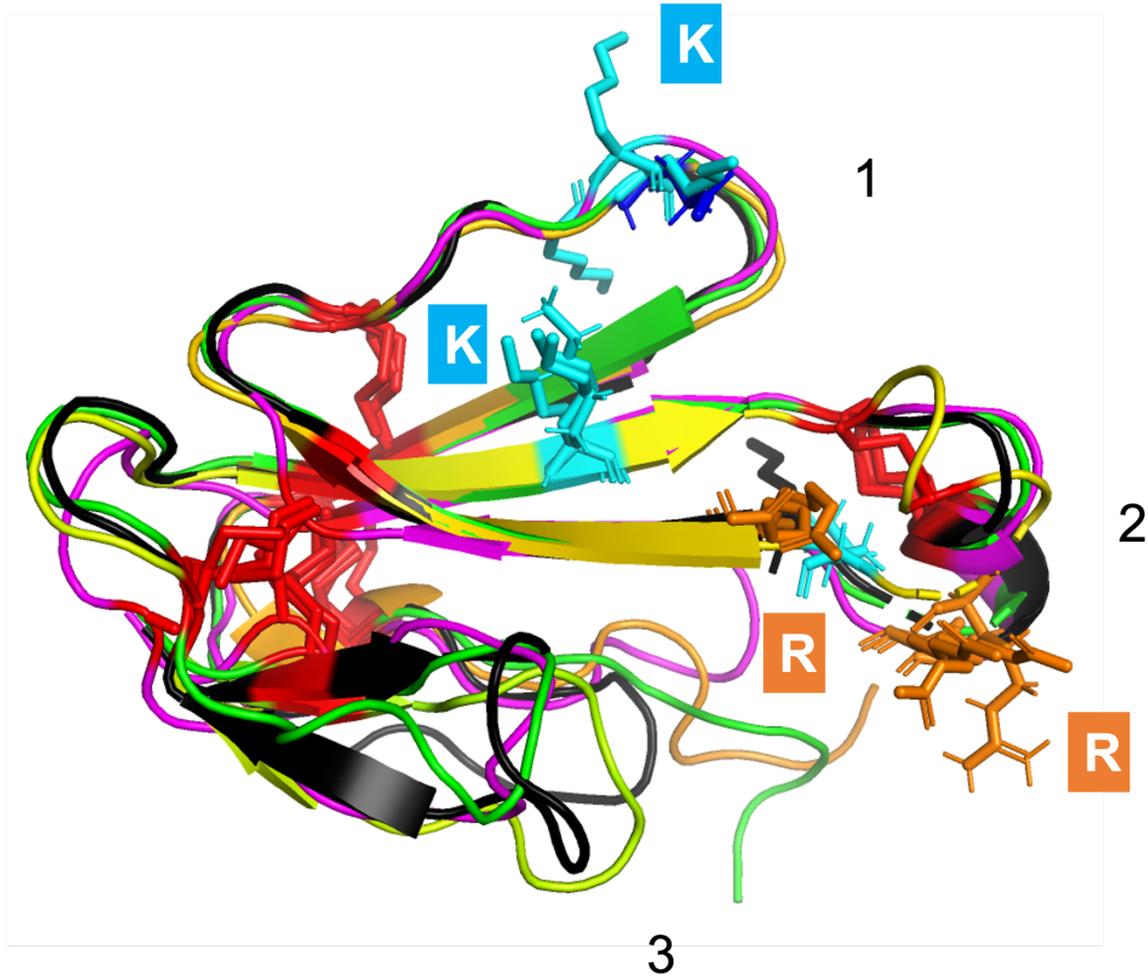


Figura 7. Superposición de estructura tridimensional de 4  $\alpha$ -LNTX altamente tóxicas. A)  $\alpha$ -bungarotoxin (PDB: 1haj) del elápidio *Bungarus multicinctus* (negro). B)  $\alpha$ -elapitoxin (PDB: 4lft) del elápidio *Dendroaspis polylepis* (verde), C)  $\alpha$ -cobratoxin (PDB: 1ctx) del elápidio *Naja siamensis* (rosa). D) Neurotoxina 1 (PDB: 1W6B) del elápidio *Naja oxidiana* (amarillo). En color rojo se muestran los 5 puentes disulfuro, en azul se muestran los residuos de lisina (L) y en naranja argininas (R). Los números 1,2,3 señalan las asas proteicas de las toxinas.

Las  $\alpha$ -LNTX son altamente tóxicas, sin embargo, en la mayoría de los venenos están en baja proporción con respecto al veneno total, como puede observarse en la figura 8. Aunque se encuentran en baja proporción juegan un papel crucial en el envenenamiento por mordedura de elápidio por ser altamente afines al canal de acetilcolina muscular y neuronal (Grant *et al.*, 1985; Barber *et al.*, 2013). Son tan potentes que llegan a actuar a concentraciones de LD<sub>50</sub>:1.6  $\mu$ g/kg Alpha-N3 de *Bungarus candidus* (Kim *et al.*, 1981).

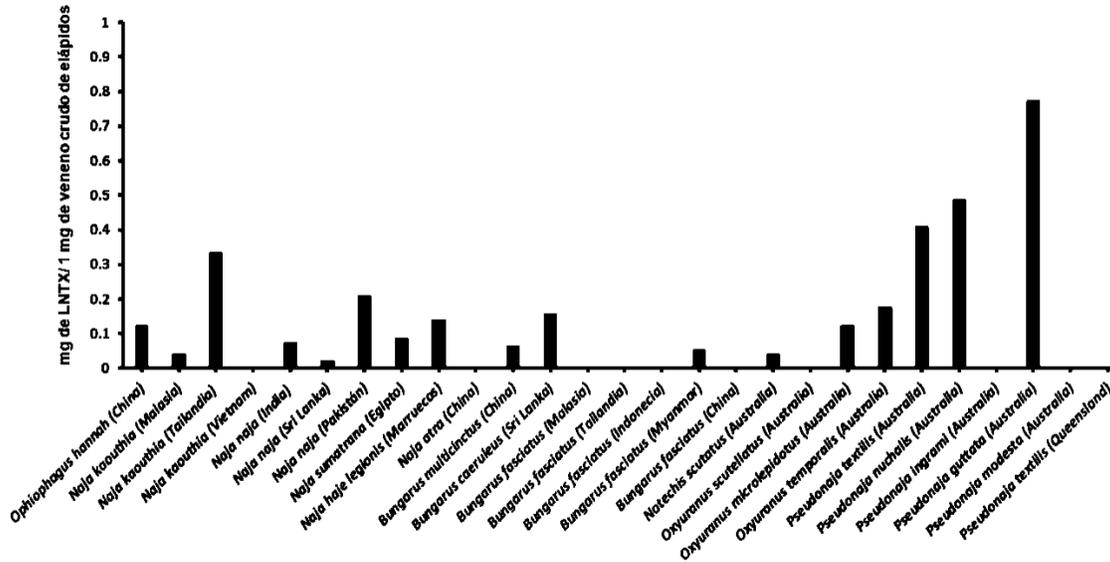


Figura 8. Cantidad de  $\alpha$ -LNTX en un miligramo de veneno de elápidos de importancia médica en el mundo. Datos tomados y modificados de Malih *et al.*, 2014; Yap *et al.*, 2014; Shan *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2015; Petras *et al.*, 2015; Sintiprungrat *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2016; Oh *et al.*, 2017; Skejic *et al.*, 2018; Hia *et al.*, 2020.

Así mismo, presentan variaciones en la cantidad de  $\alpha$ -LNTX con respecto al área geográfica que habitan los elápidos de la misma especie, como se puede observar en la figura 8. Como por ejemplo el veneno de la *Naja kaouthia* (Cobra monocelada) que proviene de elápidos de Malasia. Estos tienen 0.04 mg de  $\alpha$ -LNTX/mg de veneno crudo, mientras que las que habitan en Tailandia poseen alrededor de 10 veces más, registrando 0.3 mg de  $\alpha$ -LNTX/mg de veneno crudo. En ambos casos se reporta la presencia de  $\alpha$ -LNTX, a diferencia de la que reside en Vietnam que no contiene  $\alpha$ -LNTX (Tan *et al.*, 2015).

Otro ejemplo, es el veneno de *Bungarus fasciatus* (krait rayado), que habitan en Malasia, Tailandia, Indonesia y China no contienen  $\alpha$ -LNTX, a diferencia de las que habita en Myanmar que presentan 0.05 mg de  $\alpha$ -LNTX/mg de veneno crudo (Hia *et al.*, 2020). Esta variabilidad representa un problema en la producción de antivenenos, al ser toxinas altamente activas en el veneno por su alta afinidad al canal de acetilcolina teniendo una unión altamente estable. La variación en esta clase de toxinas es un problema en la producción de antídotos contra la mordedura de elápidos, ya que la ausencia de un componente provoca que no se produzcan anticuerpos contra esa proteína, lo que provoca que no sea neutralizada y sus efectos neurotóxicos prevalezcan aun con la administración de un antídoto, ocasionando parálisis prolongada insuficiencia respiratoria y cardiaca o muerte en los pacientes.

## 1.6 Interacción de las $\alpha$ -LNTX con el canal de acetilcolina (nAChR)

El estudio de la interacción de las  $\alpha$ -LNTX con los canales de acetilcolina del tipo muscular y neural requiere tener en contexto la estructura y función de este. Los canales de acetilcolina del tipo neural y muscular están constituidos por 3 dominios intra, inter y extramembranal como se muestra en la figura 9 sección A), aunque solo la región extramembranal participa en la interacción con las  $\alpha$ -LNTX. Están constituidos por pentámeros proteicos, su nomenclatura está basada en letras griegas  $(\alpha)_2\beta\gamma\delta$ , su peso molecular oscila los 290 kDa. Ya que son altamente importantes en la comunicación entre neuronas y músculos se han caracterizado su secuencia aminoacídica y estructura cristalográfica. Se encuentran ubicados y altamente distribuidos en la membrana de las neuronas postsinápticas de la placa neuromuscular en donde juegan un papel crucial en el lenguaje neuromuscular (Unwin, 2005).

El receptor de acetilcolina de tipo muscular fue caracterizado por primera vez en la raya eléctrica *Torpedo* y está compuesto por las subunidades  $\alpha$ -1,  $\beta$ -1,  $\gamma$  o  $\epsilon$ , y  $\delta$ , organizadas en la fórmula  $(\alpha)_2\beta\gamma\delta$ . Existen dos versiones de este receptor: la embrionaria, con la configuración  $(\alpha)_2\beta\epsilon\delta$ , y la versión en adultos,  $(\alpha)_2\beta\gamma\delta$  (Unwin, 2005). En contraste, el receptor neuronal de acetilcolina se distingue por contener subunidades del subtipo  $\alpha$ , desde  $\alpha$ -2 hasta  $\alpha$ -10  $((\alpha 1-10)_2)$  y subunidades del tipo  $\beta$  ( $\beta$ -2,  $\beta$ -3 o  $\beta$ -4), formando diferentes configuraciones como  $(\alpha 1-10)_2(\beta 2-4)\gamma\delta$ . La estructura tridimensional del canal de acetilcolina muscular en *Torpedo* se presenta en la Figura 9, secciones B y C (Zouridakis *et al.*, 2014).

Se han elucidado las subunidades responsables de la interacción toxina canal. Por parte del canal de acetilcolina se encuentran los 2 sitios de reconocimiento para agonistas y antagonistas situados en las subunidades ( $\alpha$  y  $\gamma$ ) y ( $\alpha$  y  $\beta$ ) del dominio transmembranal del canal como se observa en la figura 10. Los estudios de difracción de rayos X y simulaciones computacionales coinciden en que la unión se da en el asa C transmembranal, específicamente de la subunidad  $\alpha$  participan los residuos Y93, Y149, G153, H186 y la N200. Por parte de la en la subunidad  $\gamma$  o  $\beta$  los aminoácidos involucrados son K34, T55, L119, W149, Q59, F172, N174, E173, E176. Estos aminoácidos están altamente conservados en todos los canales de acetilcolina neural y muscular (Samson *et al.*, 2008; Nirthanan *et al.*, 2014). Al unirse las  $\alpha$ -LNTX cambian la conformación del canal cerrándolo y con ello interrumpen la transmisión del impulso nervioso (Silva *et al.*, 2020). Dicha interacción se ha descrito en gran medida con la ayuda de la bungarotoxina y cobratoxina que son las dos  $\alpha$ -LNTX mejor caracterizadas (Samson *et al.*, 2008).

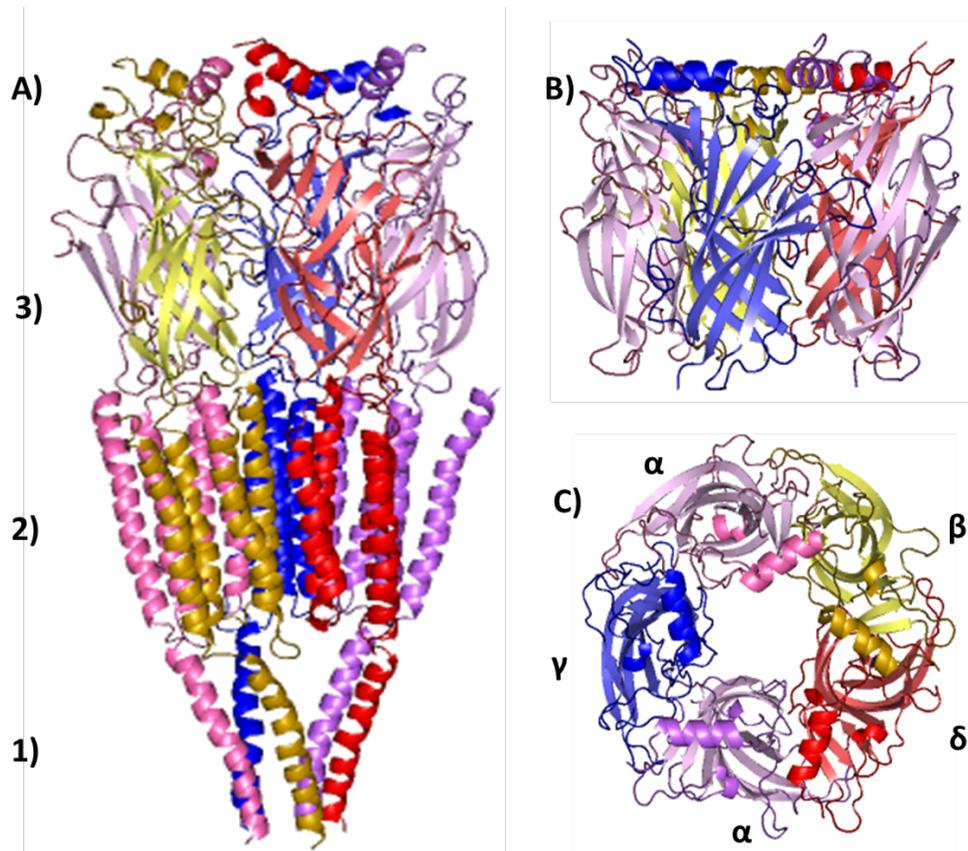


Figura 9. A) Se muestra el canal de acetilcolina muscular *Torpedo* con sus 3 dominios (PDB: 7QL6) 1) intra, 2) inter y 3) extra membranal. B) Dominio transmembranal de canal de acetilcolina. C) Dominio extra membranal en donde se ubican las subunidades ( $\alpha$ : rosa,  $\beta$ : amarillo,  $\gamma$ : azul,  $\alpha$ : morado y  $\delta$ : rojo) y el sitio de unión a antagonistas ubicados entre ( $\alpha$  y  $\gamma$ ) y ( $\alpha$  y  $\beta$ ).

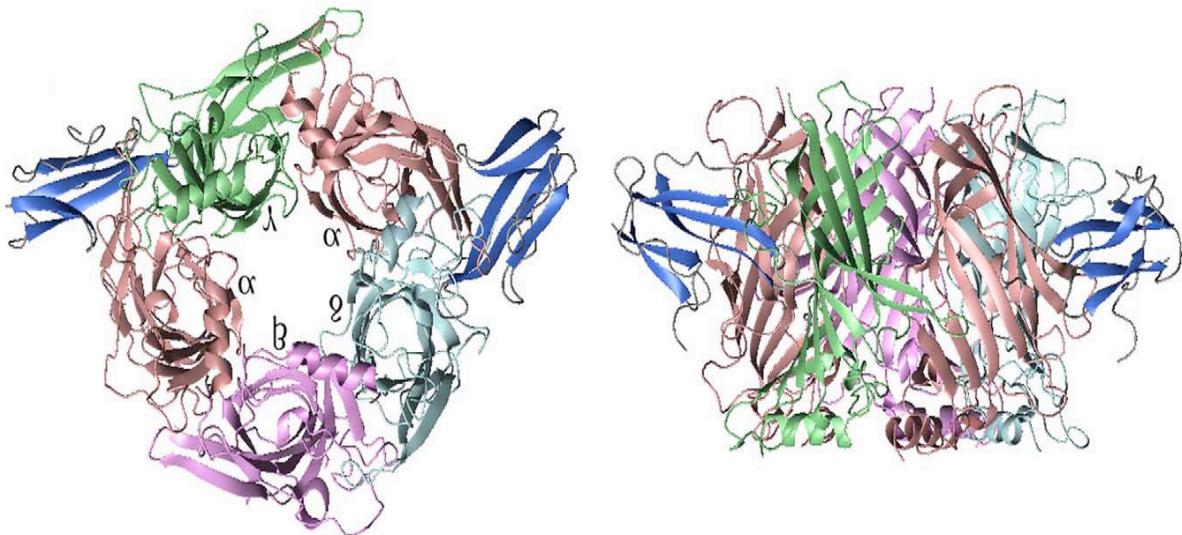


Figura 10. Interacción el dominio transmembranal del canal de acetilcolina neuronal con la bungarotoxina (*Bungarus multicinctus*). Formando el complejo canal-toxina altamente estable del tipo irreversible (PDB: 6UWZ).

Del lado de las  $\alpha$ -LNTX, la interacción se ha analizado utilizando mutagénesis sitio dirigida de la secuencia de la cobratoxina. Los residuos involucrados en la interacción para reconocer los subtipos los receptores de acetilcolina *Torpedo* y  $\alpha$ -7 son: W25, N27, F29, R33, R36 y F65 (Antil-Delbeke *et al.*, 1999). De igual manera se conoce que los residuos A28, K35, C26, C30 son esenciales solo en el reconocimiento del canal de acetilcolina neural  $\alpha$ -7, asimismo los aminoácidos K23 y K49 intervienen únicamente en la interacción del canal subtipo muscular *Torpedo*. En este trabajo se destacó la importancia de los residuos (C26, C30, R33, F29, R36), ver tabla 2. Ya que participan en la interacción del canal muscular *Torpedo* o neural  $\alpha$ -7. En dicho trabajo se realizaron mutaciones en estos residuos y las más importantes por su disminución en la afinidad se muestran en la tabla 2 (Antil-Delbeke *et al.*, 1999; 2000).

Tabla 2. Cambios de aminoácidos sobre la secuencia de la cobratoxina y su efecto en la disminución de la afinidad del canal de acetilcolina subtipo muscular *Torpedo* y neuronal  $\alpha$ -7.

Posición de aminoácido en la secuencia de la cobratoxina	Sustitución del aminoácido	Disminución de la afinidad con el canal de acetilcolina subtipo:	
		<i>Torpedo</i> (muscular)	$\alpha$ -7 (neural)
23	K-E	23	0
26	C-S	14	180
29	F-A	74	270
30	C-S	14	180
33	R-E	340	310
36	R-A	16	190
49	K-E	3	0

Los datos registrados en las columnas de los subtipos de canales de acetilcolina muscular *Torpedo* y neuronal  $\alpha$ -7 son el número de veces que disminuyen la afinidad por el canal respectivamente.

## 1.7 Uso de consensos proteicos en toxinas

A lo largo de la historia evolutiva de las proteínas han sufrido cambios en su secuencia específicamente mutaciones aleatorias y selección natural. Esto dio como resultado la diversidad de funciones y estructuras proteicas conocidas a la fecha. Tomando en cuenta esta afirmación, dentro de las secuencias de aminoácidos de las proteínas que tenemos hoy en día, se encuentra la evidencia de aquellos cambios que se conservaron dado que confirieron una actividad biológica o estabilidad termodinámica. Las posiciones de alta frecuencia de un mismo aminoácido proporcionan información clave sobre la relevancia de dicho residuo en la función o estabilidad de la proteína. A partir de este principio, los consensos proteicos se establecen mediante la alineación y comparación de proteínas seleccionadas, con el objetivo de identificar aminoácidos conservados. Las aplicaciones y objetivos de los consensos proteicos son variados, abarcando desde la comprensión de mecanismos estructurales y funcionales hasta el diseño de variantes con propiedades específicas adaptadas según los objetivos específicos de cada investigación. (Sternke *et al.*, 2019).

Esta poderosa herramienta de generación de consensos proteicos es altamente utilizada con diferentes fines. La gran mayoría busca mejorar la estabilidad termodinámica y estructural, la resistencia a agentes desnaturalizantes, ancestralidad, en el caso de proteínas con actividad enzimática se busca potenciar el sitio activo para hacer más eficiente el proceso, por nombrar los más utilizados (Sternke *et al.*, 2019).

Dentro de nuestro grupo de trabajo generamos proteínas consenso para obtener toxinas que posean en su secuencia los residuos aminoacídicos esenciales tanto para la función biológica (toxicidad), así como estructurales (puentes disulfuro). Con ello buscamos conservar ambos aspectos, ya que las toxinas que producimos son un vehículo para obtener anticuerpos de amplio espectro que logren neutralizar a un grupo de toxinas. De esta forma comienzan los primeros pasos para la generación de un antivenenos universales para venenos de animales ponzoñosos. Un prototipo que se ha probado en el laboratorio es la obtención del consenso de neurotoxinas de cadena corta ( $\alpha$ -ScNTX) de elápidos (De la Rosa *et al.*, 2019).

### **1.8 Antivenenos contra el veneno de elápidos peligrosos**

Los tratamientos existentes en caso de mordedura de elápidos se obtienen mayoritariamente de la inmunización de caballos con el veneno total. Estos generan anticuerpos policlonales, que tienen como fin neutralizar en su mayoría a los componentes más abundantes del veneno (Gutiérrez *et al.*, 2018). Sin embargo, las  $\alpha$ -LNTX se encuentran en bajas concentraciones dentro en la mayoría de los venenos de elápidos de importancia médica, debido a esto, pueden generar deficientes porcentajes de anticuerpos neutralizantes contra dichas neurotoxinas. En consecuencia, se obtienen generalmente una poca proporción de anticuerpos que reconocen a estas toxinas altamente tóxicas. Esto a su vez, provoca que algunos de los antivenenos sean poco eficientes para neutralizar estas toxinas ante casos de mordedura de elápidos (Gutiérrez *et al.*, 2011), ya que los efectos neurotóxicos persisten pese a la administración de antiveneno, y en la mayoría de los casos se tiene que administrar más dosis de antivenenos, lo cual podría propiciar una reacción alérgica, lo cual se traduce en mialgias y anafilaxis.

Con el fin de mejorar la eficacia de dichos antivenenos, una propuesta es producir toxinas consenso partiendo de una familia proteica específica. Con esta idea se realizó el trabajo de la Rosa *et al.* (2018), quienes elaboraron una  $\alpha$ -SNTX consenso ( $\alpha$ -ScNTX), logrando expresarla en *E. coli*. Con ella inmunización conejos y caballos, y obtener de esa forma anticuerpos que reconocen a la  $\alpha$ -ScNTX, tipo 3FTXs y a péptidos de estructura similar (de la Rosa *et al.*, 2019). Los anticuerpos obtenidos se evaluaron para demostrar su capacidad de neutralizar venenos de elápidos, y se concluyó que los anticuerpos obtenidos fueron capaces de reconocer  $\alpha$ -neurotoxinas de coralillos, cobras y mambas (*Micrurus*, *Naja* y *Ophiophagus*), y neutralizar muchos de estos venenos (De la Rosa *et al.*, 2019).

La metodología mencionada pretende formular un antiveneno único, que incluya de manera significativa anticuerpos que reconozcan a las neurotoxinas de cadena larga, para así neutralizar el veneno de un gran número de elápidos. Esto con el fin de mejorar el tratamiento en pacientes mordidos. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es la síntesis de una alfa-neurotoxina consenso de cadena larga ( $\alpha$ -LcNTX) para la generación de un antiveneno de amplio espectro que neutralice un gran número de venenos de elápidos, haciendo énfasis en aquellos de carácter más neurotóxico.

### **1.9 Anticuerpos contra neurotoxinas y el reconocimiento de $\alpha$ -LNTX**

En la generación de anticuerpos contra proteínas con actividad tóxica se requiere inocular a un mamífero con dosis crecientes de la toxina y esperar a que su sistema inmunológico reconozca al agente extraño para obtener anticuerpos contra esta proteína. Con ello se genera una cantidad elevada de anticuerpos que identifican a la molécula extraña inoculada en regiones específicas de la proteína inoculada. Los anticuerpos pueden reconocer distintas regiones proteicas de una toxina, con diferentes porcentajes de neutralización, los más importantes para el uso en antivenenos son aquellos que logran neutralizar totalmente a las toxinas en un envenenamiento. Por lo tanto, es muy importante identificar las regiones y aminoácidos que bloquean los anticuerpos en las toxinas.

Los aminoácidos clave en la interacción con los canales de acetilcolina tanto neural y muscular son los aminoácidos cargados positivamente (K23, R33, R36 y K49), estructurales (C26 y C30) y aromáticos (F29). El cambio de dichos residuos causa reducciones de hasta 340 veces la afinidad de la toxina por el canal de acetilcolina muscular *Torpedo* ver tabla 2. Hasta la fecha no se tiene información si los epítopes de los anticuerpos que reconocen a las  $\alpha$ -LNTXs abarcan estos aminoácidos, lo que podría causar a su vez la neutralización de las  $\alpha$ -LNTXs impidiéndoles la unión con su blanco.

En este contexto propusimos realizar variantes de residuos básicos y la eliminación en una de ellas del quinto puente disulfuro. Estas toxinas solo se utilizarán como vehículo para obtener anticuerpos y evaluar el porcentaje de cobertura de protección ante  $\alpha$ -LNTX mediante pruebas en animales. Con ello, observáremos si los residuos K23, C26, F29, C30, R33, R36 y K49 son reconocidos y neutralizados por los anticuerpos que reconocen a las  $\alpha$ -LNTX, la actividad biológica de las variantes en ensayos de inyección en ratones.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Dentro del veneno de la mayoría de los elápidos de importancia médica en el mundo, las toxinas  $\alpha$ -LNTX se encuentran en baja proporción. Además, la concentración de  $\alpha$ -LNTX varía en dichos venenos incluso a nivel de especie con respecto al área geográfica que habitan. Esto genera que los antivenenos que se producen por medio de la inmunización en caballos, generalmente con veneno completo contengan pocos anticuerpos que reconozcan a las  $\alpha$ -LNTX, lo cual propicia que los efectos neurotóxicos persistan aún durante la administración del antiveneno. Este problema nos lleva a proponer la síntesis recombinante de una neurotoxina de cadena larga consenso ( $\alpha$ -LcNTX), con el fin de generar anticuerpos que reconozcan una gran variedad de  $\alpha$ -LNTX provenientes de diferentes venenos de elápidos de importancia médica en el mundo.

Por otro lado, el sitio donde los anticuerpos reconocen a las  $\alpha$ -LNTX, y las neutralizan, aún no está completamente establecido. Con el fin de conocer si los anticuerpos anti- $\alpha$ -LNTX bloquean a las  $\alpha$ -LNTX en su sitio de reconocimiento de las  $\alpha$ -LNTX con los canales de acetilcolina, proponemos realizar cambios en la secuencia de la  $\alpha$ -LcNTX en los aminoácidos básicos los cuales son esenciales para el reconocimiento con los canales de acetilcolina y eliminar el segmento del quinto puente disulfuro el cual les confiere mayor toxicidad, para posteriormente obtener los anticuerpos de estas variantes y probar su eficacia. Con ello pretendemos contribuir al conocimiento del sitio de reconocimiento de los anticuerpos con las  $\alpha$ -LNTX recombinantes.

### **3. HIPÓTESIS**

Los anticuerpos que se generen a partir de la inmunización con la  $\alpha$ -LcNTX podrán neutralizar una gran variedad de venenos de elápidos.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Diseñar y expresar recombinantemente una  $\alpha$ -LcNTX y variantes para la obtención de anticuerpos para contrarrestar el envenenamiento de elápidos con  $\alpha$ -LNTXs. Determinar la importancia de los residuos básicos y el quinto puente disulfuro en la toxicidad de las  $\alpha$ -LNTX y el reconocimiento de toxina-anticuerpo.

#### **4.1 Objetivos particulares**

1. Construir la  $\alpha$ -LcNTX y sus variantes, así como determinar su toxicidad.
2. Definir el potencial neutralizante de los anticuerpos obtenidos a partir de las  $\alpha$ -LcNTX y sus variantes.
3. Demostrar la importancia de los aminoácidos básicos y el quinto puente disulfuro en la toxicidad de las  $\alpha$ -LNTX.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Selección de LNTXs

Los criterios para seleccionar las  $\alpha$ -LNTX utilizadas para un alineamiento múltiple de secuencias y obtener una  $\alpha$ -LNTX consenso ( $\alpha$ -LcNTX), fue su toxicidad (LD<sub>50</sub>) mostradas en la tabla 3.

Tabla 3. LNTXs seleccionadas de elápidos de importancia médica en el mundo.

Elápidio	Nombre		Afinidad	LD <sub>50</sub>	aa	kDa	ID
<i>Ophiophagus hannah</i>	LNTX1	1.	Receptor acetil colina (nAChR)	0.51 mg/kg ratón (Intravenosa)	94	10.5	Q2VBP8
		2.	Muscular (alpha 1/CHRNA1)				
		3.	Neuronal (alpha-7/CHRNA7)				
<i>Acanthopis antarcticus</i>	EPTX-Aa2b	4.	Receptor acetil colina (nAChR)	0.13 mg/kg ratón (Intramuscular)	73	8.1	P01385
		5.	Muscular (alpha 1/CHRNA1)				
		6.	Neuronal (alpha-7/CHRNA7)				
	EPTX-Aa2e	7.	Receptor acetil colina (nAChR)	0.05 and 0.20 mg/kg intraperitoneal en ratón, pocos ratones probados	79	8.7	P0DKW9
		8.	Muscular (alpha 1/CHRNA1)				
		9.	Neuronal (alpha-7/CHRNA7)				
<i>Bungarus multicinctus</i>	BTX A31 Síntesis recombinante	10.	Receptor acetil colina (nAChR)	0.3 mg/kg ratón (Subcutáneo)	95	10.2	P60615
		11.	Muscular (alpha 1/CHRNA1)				
		12.	Neuronal (alpha-7/CHRNA7)				
		13.	Agonista de GABA				
<i>Bungarus candidus</i>	Alpha- N3	14.	Receptor acetil colina (nAChR)	0.16 µg/g ratón (Intravenosa)	73	7.7	P85140
		15.	Muscular (alpha 1/CHRNA1)				
		16.	Neuronal (alpha-7/CHRNA7)				
<i>Dendroaspis polylepis polylepis</i>	Dpp2b	17.	Receptor acetil colina (nAChR)	0.4 mg/kg ratón (Subcutánea)	72	7.9	C0HJD7
		18.	Muscular (alpha 1/CHRNA1)				
		19.	Neuronal (alpha-7/CHRNA7)				
	Dpp2a	20.	Receptor acetil colina (nAChR)	0.12 mg/kg ratón (Subcutáneo)	72	8.03	P01396
		21.	Muscular (alpha 1/CHRNA1)				
		22.	Neuronal (alpha-7/CHRNA7)				
<i>Naja haje haje</i>	MC-5	23.	Receptor acetil colina (nAChR)	0.11 mg/kg ratón (Intravenosa)	71	7.8	P25674
		24.	Muscular (alpha 1/CHRNA1)				
		25.	Neuronal (alpha-7/CHRNA7)				
<i>Naja naja</i> (Asia)	Neurotoxina A	26.	Receptor acetil colina (nAChR)	0,15 mg/kg ratón	71	7.8	P25668
		27.	Muscular (alpha 1/CHRNA1) Neuronal (alpha-7/CHRNA7)				

### 5.2 Alineamiento múltiple de secuencia de $\alpha$ -LNTX

Al realizar el alineamiento se decidió tomar en cuenta solo hasta el aminoácido 66 del alineamiento inicial ya que la mayor identidad se encuentra del residuo 1 al 66, que además contiene las 10 cisteínas necesarias para formar los 5 PD de una  $\alpha$ -LNTX. Los aminoácidos a partir de la posición 67 tienen poca o nula identidad entre sí. Esto se destaca en el siguiente alineamiento denominado como figura 12.

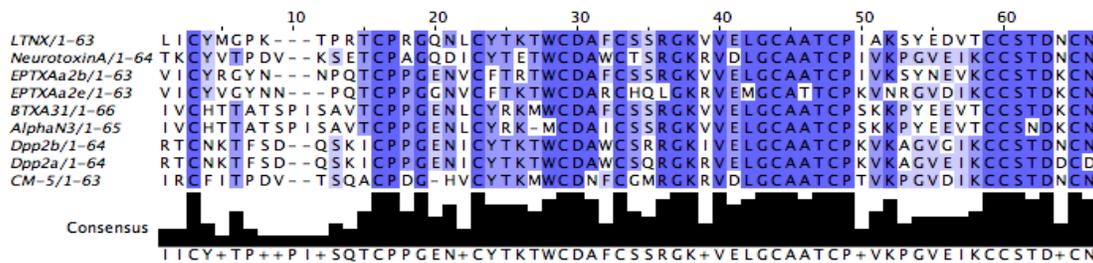


Figura 11. Aminoácidos altamente conservados en el alineamiento múltiple de secuencia de la  $\alpha$ -LNTXs (1-66).

### Secuencia de $\alpha$ -LcNTX

IICYTTPNVPIQSQTCP+GEN+CYTKTWCDAF+CSSRGK+VELGCAATCP+VKPGVEIKCCSTD+CN

Del anterior alineamiento se generó la secuencia consenso  $\alpha$ -LcNTX, donde el criterio para remover o conservar un aminoácido indefinido fue el número de repeticiones en el alineamiento y la capacidad inmunogénica de cada residuo. Una vez decidida la estructura primaria de la proteína  $\alpha$ -LcNTX se realizaron los cambios sobre la secuencia con el fin de obtener las variantes de  $\alpha$ -LcNTX, dichos cambios se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos de las variantes de  $\alpha$ -LcNTXs

Nombre	Secuencia de aminoácidos
$\alpha$ -LcNTX	IICYTTPNVPIQSQTCP+GEN+CYTKTWCDAF+CSSRGK+VELGCAATCP+VKPGVEIKCCSTD+CN
$\alpha$ -LcNTX V1 (K26E, R/36,39/E, K52E)	IICYTTPNVPIQSQTCP+GEN+CYTETWCDAF+CSSEK+VELGCAATCP+VKPVEIKCCSTD+CN
$\alpha$ -LcNTX V2 (E+DAFC)	IICYTTPNVPIQSQTCP+GEN+CYT-----KTWSSRGK+VELGCAATCP+VKPGVEIKCCSTD+CN

\* En letra color verde se muestran los aminoácidos sustituidos

En ambos casos tanto para la  $\alpha$ -LcNTX y las  $\alpha$ -LcNTX V1 y V2 se realizaron los análisis bioinformáticos para tener en cuenta el uso preferencial de codones de *E. coli*. Así se realizó la transcripción inversa para obtener la secuencia de ADN del gen  $\alpha$ -LcNTX y V1 y V2.

### 5.3 Construcción de las secuencias codificantes de las $\alpha$ -LcNTX, V1 y V2

Para la construcción de los genes *de novo* de  $\alpha$ -LcNTX y V1 y V2 en todos los casos se le adicionaron en el extremo 5' la secuencia que reconoce la enzima de restricción Bam-H1, y posterior a esta se adicionó la secuencia de reconocimiento de proteasa Xa (ATCGAGGGAAGG); en el otro extremo, el 3' se adicionó la secuencia que reconoce la enzima Pst1. Los genes completos que codifica a  $\alpha$ -LcNTX y las fue  $\alpha$ -LcNTX de 234 pb y será para las  $\alpha$ -LcNTX V1 y de 219 pb para  $\alpha$ -LcNTX V2. La obtención *de novo* del gen  $\alpha$ -LcNTX y  $\alpha$ -LcNTX V2 se llevó a cabo por medio de la extensión superpuesta de oligonucleótidos utilizando las siguientes secuencias de la tabla 5, 6 y 7 respectivamente.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la síntesis de la toxina  $\alpha$ -LcNTX

Nombre	Secuencia (5'-3')
LcNTX-Fw1	GAG GGA TCC ATC GAG GGA CGC ATT ATC TGC TAT ACC ACG CCG AAC GTG CCT ATT C
LcNTX-R1	GCA CAG ATT TTC GCC AGG CGG ACA GGT TTG GCT CTG AAT AGG CAC GTT CCG CGT G
LcNTX-Fw2	GCC TGG CGA AAA TCT GTG CTA CAC GAA AAC CTG GTG TGA TGC GTT TTG CAG TAG CCG
LcNTX-R2	CGT CGC GGC ACA GCC CAG CTC AAC ACG CTT ACC GCG GCT ACT GCA AAA CGC ATC
LcNTX-Fw3	CTG GGC TGT GCC GCG ACG TGC CCG AAA GTG AAG CCT GGT GTT GAA ATC AAA TGT TGC TCG
LcNTX-R3	CTC CTG CAG CTA TTA GTT ACA CTT GTC GGT CGA GCA ACA TTT GAT TTC AAC ACC

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la síntesis de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1

Nombre	Secuencia (5'-3')
LcNTX V1-Fw1	GAG AGG ATC CAT CGA GGG ACG CAT TAT CTG CTA TAC CAC GCC GAA CGT GCC GAT TCA GAG CCA AAC C
LcNTX V1-R1	TGC AAA ACG CAT CAC ACC ACG TCT CGG TGT AGC ACA GAT TTT CGC CCG GAG GAC AGG TTT GGC TCT GAA TCG G
LcNTX V1-Fw2	GGT GTG ATG CGT TTT GCA GCA GTG AAG GCA AAG AGG TGG AAC TGG GTT GCG CCG CGA CCT GTC CGA AGG TTG AGC
LcNTX V1-R2	TCT CCT GCA GCT ATT AGT TGC ACT TGT CGG TGC TAC AGC ATT TGA TTT CCA CGC CAG GCT CAA CCT TCG GAC AG

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la síntesis de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V2

Nombre	Secuencia (5'-3')
LcNTX V2-Fw1	GAG AGG ATC CAT CGA GGG ACG CAT TAT CTG CTA TAC CAC GCC GAA CGT GCC TAT TCA GAG CCA AAC CTG
LcNTX V2-R1	GGC TAC TCC AGG TTT TCG TGT AGC ACA GAT TTT CGC CAG GCG GAC AGG TTT GGC TCT GAA TAG G
LcNTX V2-Fw2	CGA AAA CCT GGA GTA GCC GCG GTA AGC GTG TTG AGC TGG GCT GTG CCG CGA CGT GCC CGA AAG TGA AGC CTG GTG
LcNTX V2-R2	TCT CCT GCA GCT ATT AGT TAC ACT TGT CGG TCG AGC AAC ATT TGA TTT CAA CAC CAG GCT TCA CTT TCG

Los oligonucleótidos para las variantes solo cambiaron el triplete del nucleótido (GAA) que codifica para ácido glutámico para la sustitución múltiple. En cada caso se realizó una reacción de PCR por separado, y se utilizaron los oligonucleótidos necesarios de cada gen respectivamente la proporción se muestra en la tabla 8. Se utilizó la polimerasa de alta fidelidad Vent-Pol. Posterior al ensamblaje los genes completos  $\alpha$ -LcNTX, V1 y V2 fueron tratados con las enzimas de restricción BamH1 y Pst1 para formar los extremos cohesivos en los extremos y facilitar la ligación con el plásmido pQE-30 independientemente.

Tabla 8. Proporción de oligonucleótidos utilizados para la síntesis de novo de LcNTXs

Nombre	Proporción de oligonucleótidos para la síntesis de LcNTX, V1 y V2.	
	0.4 pmol/ $\mu$ L	0.1 pmol/ $\mu$ L
PCR LcNTX	LcNTX-Fw1, LcNTX-R3	LcNTX-R1, LcNTX-Fw2, LcNTX-R2, LcNTX-Fw3
PCR LcNTX V1	LcNTX-Fw1. V1, LcNTX-R3V1	LcNTX-R1. V1, LcNTX-Fw2. V1, LcNTX-R2. V1, LcNTX-Fw3, V1
PCR LcNTX V2	LcNTX-Fw1. V2, LcNTX-R3V2	LcNTX-R1. V2, LcNTX-Fw2. V2, LcNTX-R2. V2, LcNTX-Fw3, V2

Por otra parte, el plásmido de expresión pQE-30 fue linearizado con las enzimas BamH1 y Pst1, para poder insertar el gen. La construcción final pQE-30/LcNTX, pQE-30/V1LcNTX y pQE-30/V2LcNTX fueron clonadas en *E. coli* XL1 B quimiocompetentes por choque térmico y se seleccionaron con ampicilina las colonias positivas.

A cada cepa bacteriana transformada se le extrajo la construcción correspondiente y se amplificó por PCR con los oligos plasmídicos, pQE-Fwd 5'-GAGCGGATAACAATTATAA-3' y pQE-Rev 5'-GGTCATTACTGGATCTAT-3', finalmente se secuenció para verificar que las construcciones fueran correctas esperando un tamaño de amplicón de 391pb para LcNTX, V1 de 268pb LcNTX V2.

Una vez corroborado se seleccionó una cepa, misma que se cultivó para extraer a las construcciones LcNTX, V1 y V2 con ayuda del kit Roche de extracción de plásmido, la construcción fue transformada en cepas de expresión de proteínas *E. coli* Origami, SHuffle, M15, BL-21 (MERCK), y Artic (Sigma-Aldrich), y solo se seleccionó la clona con mejor expresión para así continuar la expresión proteica a mayor escala.

#### 5.4 Expresión de proteínas $\alpha$ -LcNTX, V1 y V2

Primeramente, las cepas fueron cultivadas en matraz con medio LB con 25 mL adicionado con ampicilina a 30 °C y agitado a 160 rpm hasta alcanzar la fase logarítmica y una densidad óptica de 0.6. Posteriormente se agregó IPTG 0.1 mM y se cultivaron durante 12 horas. Con el fin de realizar la evaluación y decidir cuál de las cepas de *E. coli* (Origami, SHuffle, M15, BL21 y Artic) tuvo la mejor expresión de la LcNTX, una vez decidida la cepa ideal se realizó un cultivo a mayor volumen con medio LB con las condiciones anteriormente mencionadas. Además, se buscaron las condiciones óptimas para expresar las proteínas recombinantes modificando el medio de cultivo.

A continuación, las bacterias fueron recuperadas por centrifugación a 5,000 g por 20 min a 4°C, el pellet obtenido fue disociado para la extracción de proteínas con buffer (BugBuster, Novagen), con 0.1 mg/mL de lisozima (Roche), 90 U/mL de benzonasa (Novagen) y EDTA. Se incubó por 30 min con agitación suave a temperatura ambiente, y la proteína soluble fue recolectada del sobrenadante y el pellet descartado por centrifugación a 2,000 g a 4°C durante 30 min.

La proteína soluble LcNTX, LcNTX V1 y LcNTX V2 fue purificada mediante cromatografía de afinidad por columna de níquel (Ni-NTA) siguiendo el método de proteínas etiquetadas con polihistidinas (Qiagen). Posteriormente se purificó por medio de HPLC en fase reversa (RP-HPLC) (Agilent 110 series; Agilent, CA) con un gradiente de 20 a 60% de acetonitrilo en 40 min, con un flujo de 1 mL/min. El solvente A fue H<sub>2</sub>O con 0.1% TFA y el solvente B fue acetonitrilo con 0.1% TFA, y la columna utilizada fue una C18 (4.6 × 250 mm, VYDAC) similar a lo reportado por De la Rosa *et al.* (2018).

Los cuerpos de inclusión fueron lavados dos veces con agua mQ (18 Megaohm-cm), y en seguida fueron solubilizados en 6 M cloruro de Guanidinio y 50 mM de Tris HCl pH: 8 para posteriormente ser purificados por columna de afinidad de níquel (Ni-NTA).

Las fracciones proteicas de  $\alpha$ -LcNTX fueron sometidas a diferentes condiciones de plegamiento en un buffer compuesto de 50 mM Tris\_HCl, pH 8, con 3 mM GSH, 0.3 mM GSSG, durante 4 días a 4°C y a temperatura ambiente, o bien en un buffer de 50 mM Tris\_HCl, pH 8, con 1 mM cisteína, 0.1 mM Cistina durante 4 días a 4°C y también a temperatura ambiente. Eventualmente se utilizó el medio 50 mM Tris\_HCl, pH 8, con 1 mM cisteína, 0.1 mM Cistina, además de 0.5 mM de L-Arginina como agente caotrópico durante 4 días a 4°C. Posteriormente, se purificó por medio de HPLC en fase reversa (RP-HPLC) (Agilent 110 series; Agilent, CA) con el gradiente anteriormente mencionado. Las fracciones obtenidas procedentes de la fracción soluble, y de los plegamientos se secaron e inyectaron intracranalmente en ratones CD-1, con el fin de observar signos de neurotoxicidad, y discernir por la fracción proteica activa. Los animales utilizados recibieron agua y comida, fueron mantenidos en buenas condiciones. El Comité de Bioética aprobó el cuidado de los animales y todos los experimentos en el proyecto (IT200321-411).

### 5.5 Estructura secundaria $\alpha$ -LcNTX, V1 y V2 por dicroísmo circular

El plegamiento de la bungarotoxina y las proteínas  $\alpha$ -LcNTX, V1 y V2, fue evaluado por dicroísmo circular en UV-lejano, 260 a 190 nm, utilizando un espectropolarímetro Jasco modelo J-720 (Jasco, Tokio, Japón). Brevemente, las muestras de proteínas se disolvieron en una solución de 60 % de trifluoroetanol (TFE) se midieron en una celda de cuarzo de 1 mm de camino óptico, y se escanearon a 50 nm/min con una constante de tiempo de 0.5 s. una metodología previamente validada con resultados sólidos (De la rosa *et al.*, 2018). Se adquirió el promedio de tres lecturas separadas y se analizó con el software de deconvolución Bestsel. La bungarotoxina se utilizó como control comparativo bajo las mismas condiciones.

### 5.6 Inmunización con $\alpha$ -LcNTX, $\alpha$ -LcNTX V1 y $\alpha$ -LcNTX V2 en conejos

El proceso de inmunización en conejos se describe a detalle en la tabla 11, el cual es similar para las otras fracciones seleccionadas. Los animales recibieron agua y alimento *ad libitum* y fueron mantenidos en condiciones óptimas. El Comité de Bioética aprobó tanto el cuidado de los animales como todos los experimentos realizados en el marco del proyecto (IT200321-411).

Tabla 9. Esquema de inmunización en conejos utilizado con las isoformas seleccionadas de toxina  $\alpha$ -LcNTX.

Inmunización	Día	Inmunógeno	Adyuvante	No. de toma de muestra
		( $\alpha$ -LcNTX, $\alpha$ -LcNTX V1 y $\alpha$ -LcNTX V2)		
1	0	40	IFA	
2	7	40	ALUM	
3	14	80	IFA	1
4	21	80	ALUM	
5	28	160	IFA	
6	35	160	ALUM	2
7	42	320	-	
8	49	320	IFA	
9	56	320	ALUM	3
10	63	640	-	
11	70	640	IFA	
12	77	640	ALUM	4

Como se demostró anteriormente existen 2 versiones de plegamiento de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V2, decidimos inmunizar a los 2 conejos con las 2 isoformas proteicas de  $\alpha$ -LcNTX V2 ya que tiene las mismas masas moleculares continuamos con el protocolo de inmunización de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V2 se inició inoculando 2 conejas de la cepa nueva zelanda con cantidades crecientes de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1, este proceso de inmunización es equivalente al mostrado anteriormente y se encuentra descrito en la tabla 16.

### **5.7 Monitoreo y reconocimiento de neurotoxinas de cadena larga consenso y sus variantes por técnica de ELISA**

La evaluación de los títulos obtenidos, producto del protocolo de la inmunización en conejos con las toxinas  $\alpha$ -LcNTX, V1 y V2, fueron obtenidos por medio de la técnica de ELISA. Por medio de esta técnica se cuantificó el nivel de reconocimiento de anticuerpos y/o anti-venenos hacia los venenos, así como de las proteínas recombinantes  $\alpha$ -LcNTX, V1 y V2 obtenidas a partir de la expresión en sistemas heterólogos. El título obtenido de anticuerpo se define como la cantidad de anticuerpo necesario para alcanzar la mitad de la respuesta máxima (Abs 405 nm). El procedimiento es el siguiente, primero se sensibilizan las placas de ELISA de 96 pozos a una concentración de 5  $\mu$ g/mL de proteína recombinante reconstituido en buffer carbonato de sodio 0.1 M, pH 9.5 e incubar toda la noche a 4 °C. posteriormente se lavan los pozos 3 veces con 200  $\mu$ L/pozo de solución de lavado para ELISA. Posteriormente, se bloquean las uniones inespecíficas con 150  $\mu$ L de solución de bloqueo para ELISA, y se incuban 2 h a temperatura ambiente ó 4 °C toda la noche. Seguidamente, se coloca en la columna 1, 150  $\mu$ L de antivenenos y/o anticuerpos a una dilución 1:10 en buffer de reacción para ELISA, y se adicionan 100  $\mu$ L/pozo de la solución de reacción para ELISA de la columna 2 a la 12 y se realizan diluciones seriadas 1:3 de los antivenenos y/o anticuerpos hasta la columna 10 dejando la 11 y 12 como controles. Se incuban 1 h a temperatura ambiente.

El procedimiento es el siguiente, primero se sensibilizan las placas de ELISA de 96 pozos a una concentración de 5  $\mu$ g/mL de proteína recombinante reconstituido en buffer carbonato de sodio 0.1 M, pH 9.5 e incubar toda la noche a 4 °C. posteriormente se lavan los pozos 3 veces con 200  $\mu$ L/pozo de solución de lavado para ELISA. Posteriormente, se bloquean las uniones inespecíficas con 150  $\mu$ L de solución de bloqueo para ELISA, y se incuban 2 h a temperatura ambiente ó 4 °C toda la noche. Seguidamente, se coloca en la columna 1, 150  $\mu$ L de antivenenos y/o anticuerpos a una dilución 1:10 en buffer de reacción para ELISA, y se adicionan 100  $\mu$ L/pozo de la solución de reacción para ELISA de la columna 2 a la 12 y se realizan diluciones seriadas 1:3 de los antivenenos y/o anticuerpos hasta la columna 10 dejando la 11 y 12 como controles. Se incuban 1 h a temperatura ambiente.

La reacción se detiene con 25  $\mu$ L/pozo de 20% SDS, y se lee la absorbancia en un lector de ELISA a 405 nm. El reconocimiento no está directamente relacionado con la posible neutralización de efecto de las proteínas nativas de cadena larga por lo que los anticuerpos totales se les probó su efectividad para neutralizar a las proteínas de cadena larga y venenos de elápidos siguiendo la metodología descrita por de la Rosa *et al.* (2018).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 $\alpha$ -LcNTX

Se realizó el ensamblaje de la secuencia codificante de la toxina  $\alpha$ -LcNTX por medio de PCR utilizando seis oligonucleótidos. El resultado de la amplificación se muestra en la figura 13.

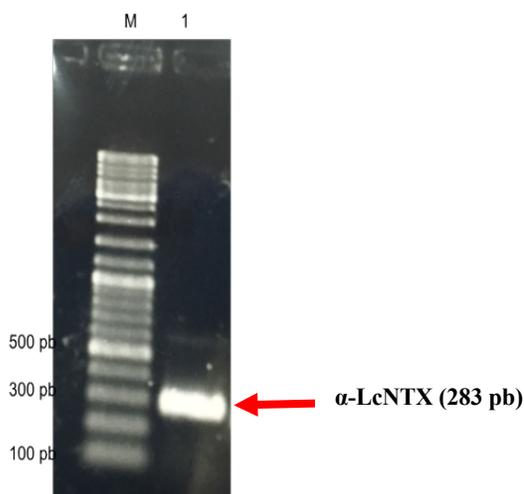


Figura 12. Producto de PCR del ensamblaje de los 6 oligonucleótidos para dar origen al gen  $\alpha$ -LcNTX. M) Marcado de peso molecular, Carril 1: Producto de PCR del ensamblaje de  $\alpha$ -LcNTX.

Una vez verificada la presencia del gen ensamblado con el tamaño aparente esperado (283 pb), se procedió a su purificación, y posteriormente a su clonación en el vector pQE-30. La construcción pQE-30/LcNTX se transformó en la bacteria *E. coli* XL1-Blue donde se obtuvieron 14 colonias positivas a las que, a su vez, se les realizó el ensayo de PCR de colonia obteniendo el resultado que se muestra en la figura 14. Con el fin de verificar la integridad del gen, el plásmido correspondiente fue extraído, y el gen perteneciente a la  $\alpha$ -LcNTX fue secuenciado corriente arriba y abajo. También se confirmó la presencia de la caja TATA el gen  $\alpha$ -LcNTX sin mutaciones en el vector de expresión nombrado pQE-30/LcNTX.

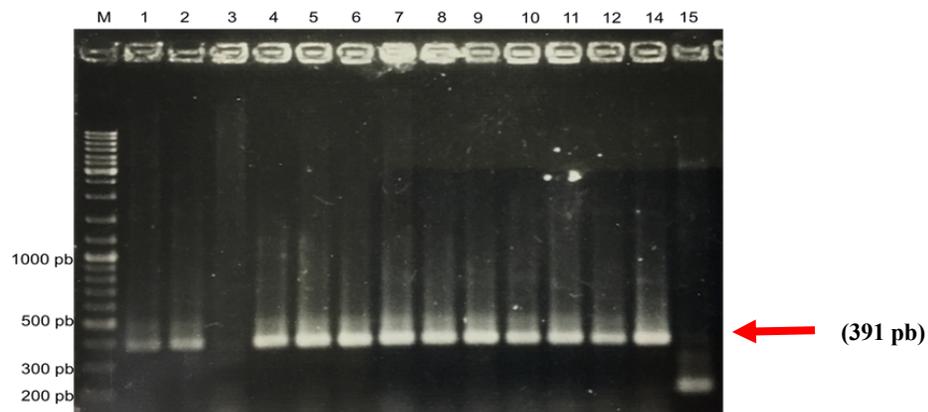


Figura 13. PCR de colonia de 14 clones de *E. coli* XL1B que contienen la construcción pQE-30/LcNTX. M) Marcado de peso molecular, Carril 1-14: Producto de PCR 14 clones *E. coli* XL1B tamaño esperado de 391 pb, Carril 15: Vector vacío 234 pb.

## 6.2 Expresión de $\alpha$ -LcNTX en *E. coli* Origami, SHuffle, M15, BL21 y Artic en medio de cultivo LB

El plásmido pQE-30/LcNTX fue utilizado para transformar diferentes cepas de *E. coli*, y así expresar la proteína de interés. Las cepas utilizadas fueron *E. coli* Origami, SHuffle, M15, BL21 y Artic. Una vez expresada la proteína, esta se recolectó de los cuerpos de inclusión y se solubilizó para determinar su presencia. El resultado de la expresión se observa en el gel de SDS PAGE al 15%, mismo que se exhibe en la figura 15. La masa molecular aparente esperada de la  $\alpha$ -LcNTX es de alrededor de 9 kDa. Sin embargo, el peso molecular aparente observado es mayor a 10 kDa, lo que puede atribuirse a la abundancia de cargas positivas presentes en el péptido  $\alpha$ -LcNTX, lo cual, de acuerdo con observaciones en nuestro laboratorio, este tipo de proteínas se mueven más lento en el sistema utilizado. Se observó que solo 3 cepas de *E. coli*: Origami, SHuffle y BL21 expresaron en mayor cantidad a la  $\alpha$ -LcNTX. Además, se realizó un western blot utilizando el anticuerpo rabbit anti-His para confirmar la presencia de la  $\alpha$ -LcNTX expresada esto se muestra en la figura 16.

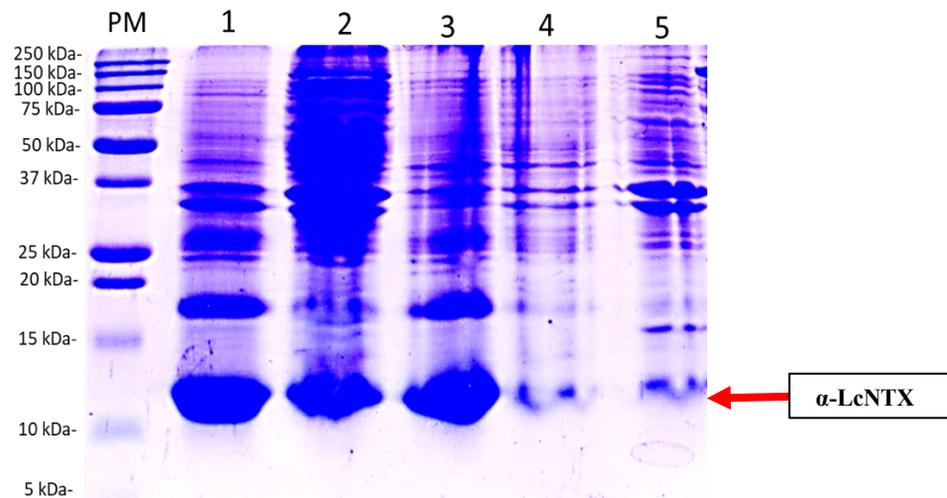


Figura 14. SDS-PAGE (15% SDS-tricina) derivado de los cuerpos de inclusión de las cepas de *E. coli* Carril 1: Origami, Carril 2: SHuffle, Carril 3: M15, BL-21 y Carril 5: Artic expresadas mediante el plásmido pQE30-LcNTX.

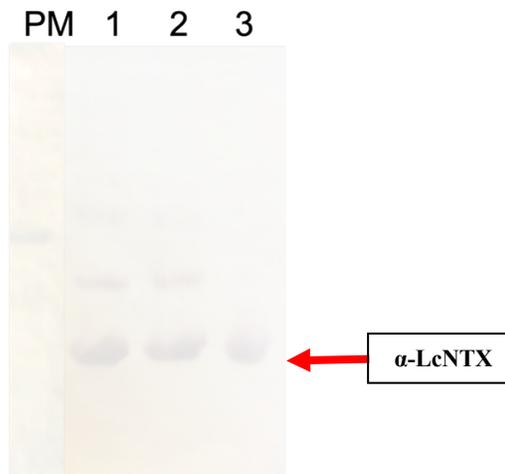


Figura 15. Western blot IgG rabbit anti-His de la proteína contenida en los cuerpos de inclusión solubilizados de la bacteria *E. coli*, carril 1: SHuffle, carril 2: Origami, carril 3: BL-21 con la construcción pQE30-LcNTX.

### 6.3 Modificaciones en el cultivo de *E. coli* ML15 pQE-30/LcNTX para optimizar la producción $\alpha$ -LcNTX en forma soluble citoplasmática en medio mMLB

El análisis de la expresión con modificaciones de temperatura a 16 y 30°C con concentración de IPTG de 0.25, 0.5 y 1 mM con la cepa *E. coli* M15 pQE-30/LcNTX en medio mMLB se muestran en el gel de SDS-PAGE al 15 % rotulado como figura 17 (letra A). En dicho gel se observan bandas que corresponden a la  $\alpha$ -LcNTX debido a su peso molecular, con el propósito de corroborar esto se realizó una prueba de western blot, el cual se encuentra expuesto en la figura 17 (letra B), Con esto se muestra que la  $\alpha$ -LcNTX puede expresarse en muy poca cantidad en forma soluble citoplasmática en condiciones de cultivo a 30°C con concentración de IPTG de 0.25, 0.5 y 1 mM.

Se monitoreo la producción de proteína  $\alpha$ -LcNTX en cuerpos de inclusión con el propósito de registrar la disminución de la proporción con respecto a la proteína  $\alpha$ -LcNTX citoplasmática, esto se encuentra plasmado en el SDS-PAGE al 15 % (figura 18), en él se aprecia la producción de proteína insoluble en las 6 condiciones probadas donde es apreciablemente menor a temperatura de 16°C, y mayor a 30°C. Aunque su proporción en las 6 condiciones aun es considerable.

De acuerdo con los resultados obtenidos la cepa *E. coli* M15 pQE-30/LcNTX se perfiló como la ideal para producir a la proteína  $\alpha$ -LcNTX en forma soluble citoplasmática ya que hasta el momento fue la que presentó los mejores resultados de producción.

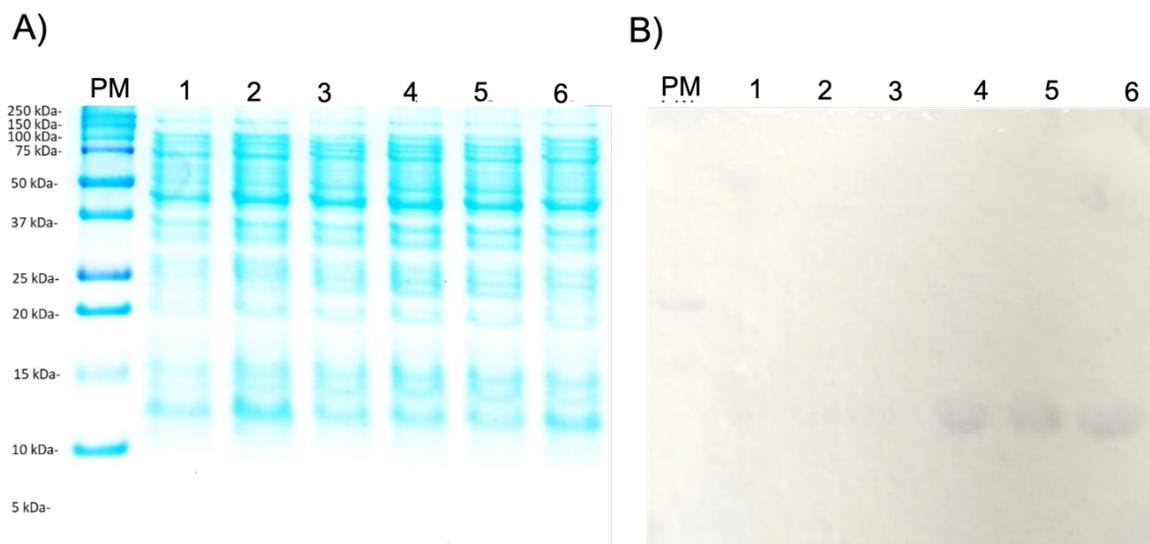


Figura 16. A) SDS-PAGE (15% SDS-tricina) derivado del análisis de 15  $\mu$ L la fracción soluble de las fermentaciones de la cepa *E. coli* M15. Carril 1: 16 °C, 18 h con 0.25 mM de IPTG, carril 2: 16 °C, 18 h con 0.5 mM de IPTG, carril 3: 16 °C, 18 h con 1 mM de IPTG, carril 4: 30°C, 6 h con 0.25 mM de IPTG, carril 5: 30°C, 6 h con 0.5 mM de IPTG, carril 6: 30°C, 6 h con 1 mM de IPTG en medio mMLB. B) Western blot IgG Rabbit anti-His derivado del análisis de 30  $\mu$ L de la fracción soluble las cepas *E. coli* M15. Carril 1: 16 °C, 18 h con 0.25 mM de IPTG, carril 2: 16 °C, 18 h con 0.5 mM de IPTG, carril 3: 16 °C, 18 h con 1 mM de IPTG, carril 4: 30°C, 6 h con 0.25 mM de IPTG, carril 5: 30°C, 6 h con 0.5 mM de IPTG, carril 6: 30°C, 6 h con 1 mM de IPTG en medio mMLB.

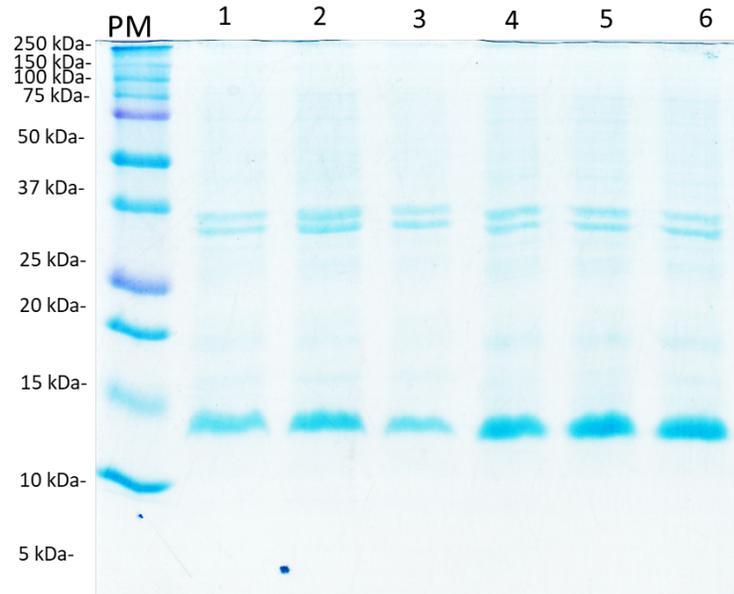


Figura 17. SDS-PAGE (15% SDS-tricina) derivado del análisis de 10  $\mu$ L la fracción insoluble de las fermentaciones de *E. coli* M15. Carril 1: 16  $^{\circ}$ C, 18 h con 0.25 mM de IPTG, carril 2: 16  $^{\circ}$ C, 18 h con 0.5 mM de IPTG, carril 3: 16  $^{\circ}$ C, 18 h con 1 mM de IPTG, carril 4: 30 $^{\circ}$ C, 6 h con 0.25 mM de IPTG, carril 5: 30 $^{\circ}$ C, 6 h con 0.5 mM de IPTG, carril 6: 30 $^{\circ}$ C, 6 h con 1 mM de IPTG en medio mMLB.

Tomando en cuenta los anteriores resultados, las cepas M15 y SHuffle dieron resultados similares, por lo que se decidió expresar la  $\alpha$ -LcNTX en la cepa *E. coli* SHuffle por las características genéticas de la cepa, y por la experiencia que se tiene en el laboratorio con esta en la producción de toxinas en cuerpos de inclusión. Una vez expresada  $\alpha$ -LcNTX en 1 litro de medio LB se colectaron los cuerpos de inclusión se solubilizaron y purificaron por columna de níquel-agarosa, las eluciones se colectaron en tubos de 2 mL.

#### 6.4 $\alpha$ -LcNTX

Los plegamientos que utilizamos con par redox no resultaron exitosos, así que intentamos una metodología diferente, tomando en cuenta que nuestro sistema de expresión (*E. coli* Origami) tiene la capacidad generar todos los puentes disulfuro se decidió purificar a el producto directo de la purificación de la columna de níquel por una columna C18, el resultado de dicha purificación se muestra en la figura 19. En la ilustración se logran apreciar diferentes fracciones cromatográficas definidas; las cuales se analizaron por espectrometría de masas, el resultado del experimento se encuentra plasmado en la tabla 9.

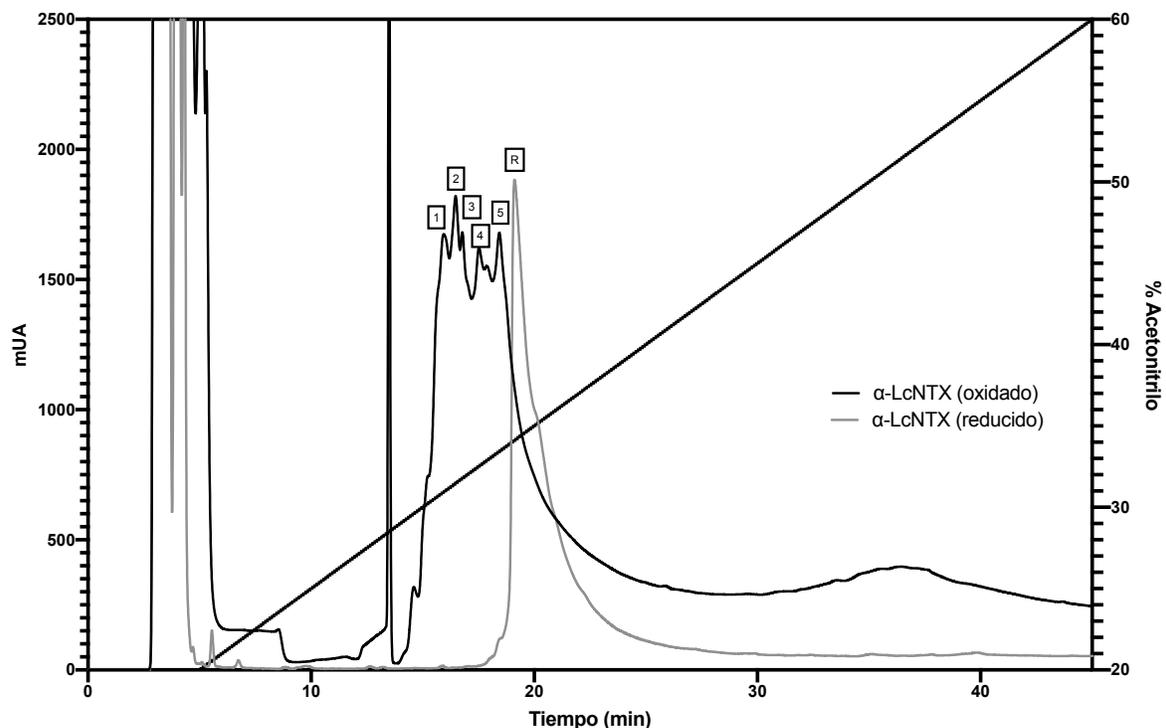


Figura 18. Cromatograma de la purificación del producto de la elución de la purificación por columna de afinidad Ni-agarosa de la  $\alpha$ -LcNTX por medio de columna C18.

Tabla 10. Resultado de análisis de espectrometría de masa de las fracciones cromatográficas de la purificación de la toxina  $\alpha$ -LcNTX por columna C18 preparativa.

Isoforma	Tiempo de retención de la fracción cromatográfica producto de la purificación por columna C18 de la $\alpha$ -LcNTX (min)
1	16.2
2	16.7
3	17.2
4	17.7
5	18.5

Los resultados mostrados producto de la purificación de la toxina  $\alpha$ -LcNTX en columna C18, son relevantes ya que con ellos observamos que la proteína  $\alpha$ -LcNTX es capaz de plegarse en cinco isoformas en el sistema de expresión. Con el fin de determinar si se encontraban activas, se probaron las fracciones cromatográficas en ensayo de inyección intracraneal, ya que un plegamiento similar al nativo está relacionado directamente en la actividad neurotóxica.

## 6.5 Dicroísmo circular de las isoformas $\alpha$ -LcNTX

Al observar diversidad de isoformas proteicas realizamos experimentos adicionales de dicroísmo circular, con el objetivo de observar el contenido de estructura secundaria  $\alpha$ -hélice y lámina  $\beta$  antiparalela y compararlas directamente con el control de bungarotoxina, con esto confirmar indirectamente un plegamiento análogo al de las  $\alpha$ -LNTXs. Los resultados mostraron que al menos las isoformas 2, 4 y 5 conservan un patrón similar al de la bungarotoxina. La imagen presentada como la figura 20, sugiere visualmente que la isoforma 4 adopta un plegamiento análogo. Sin embargo, es necesario realizar un análisis de deconvolución de los datos experimentales para determinar con precisión las proporciones de  $\alpha$ -hélice y lámina  $\beta$  antiparalela (Tabla 10). Tras este análisis, se observó que la isoforma 5 mostró la mayor similitud al control (bungarotoxina), con una variación del 1.9%, seguida por la isoforma 2, que presentó una diferencia del 4.6% (Tabla 10).

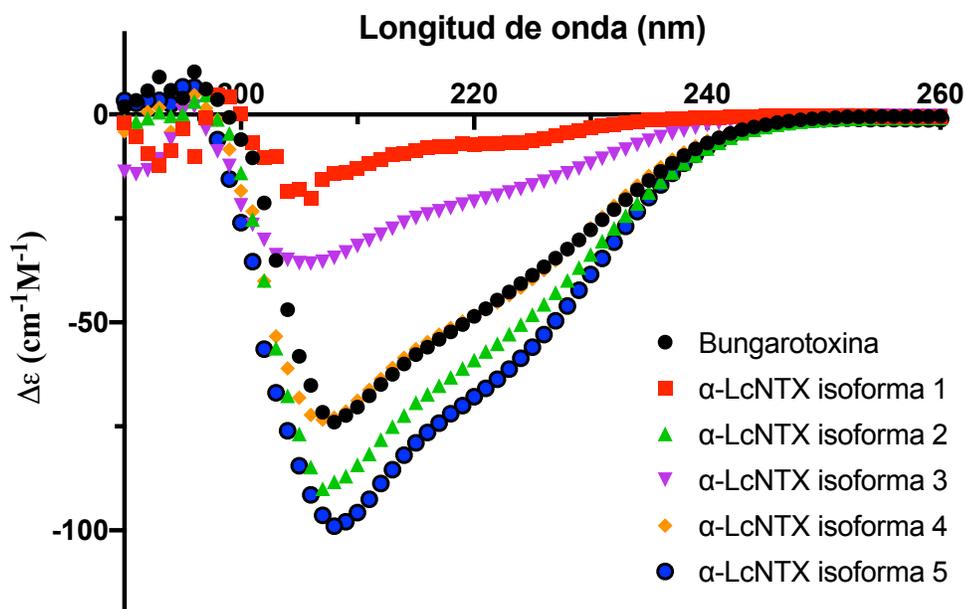


Figura 19. Espectros de dicroísmo circular de las isoformas de la  $\alpha$ -LcNTx.

Con base al análisis de DC determinamos que las isoformas 2 y 5 eran análogos del plegamiento de las  $\alpha$ -LNTXs, por lo que se optó por utilizar las isoformas 2 y 5 como inmunógenos individualmente. Adicionalmente, al contar con las fracciones restantes, decidimos probar si la combinación equimolar de las isoformas podría generar mejores anticuerpos. La evolución de la respuesta inmunológica en los tres grupos de conejos se muestra más adelante.

Tabla 10. Porcentajes de estructura secundaria de la bungarotoxina y las isoformas de  $\alpha$ -LcNTX

	Bungarotoxina	Isoforma 1	Isoforma 2	Isoforma 3	Isoforma 4	Isoforma 5
Hélice	89.6	47.3	85.1	81.9	80.7	87.7
Antiparalela	10.4	52.7	14.9	18.1	19.3	12.3

<sup>a</sup>Los datos de la figura 20 fueron deconvolucionados usando el programa Bestsel (<http://bestsel.elte.hu/index.php>) (Micsonai *et al.*, 2018).

Con la intención de evaluar el reconocimiento de los anticuerpos producidos de la inmunización con las isoformas de la toxina  $\alpha$ -LcNTX, se decidió tomar muestras de suero a las conejas en intervalos de 3 semanas, posterior a esto se recuperó el suero total y se probó la capacidad de reconocer a las isoformas de la toxina  $\alpha$ -LcNTX por medio de la técnica de ELISA. Los títulos obtenidos en el esquema de inmunización con las distintas isoformas de la toxina  $\alpha$ -LcNTX se muestran en la Figura 21. En la imagen, se observa que la isoforma 5 de la  $\alpha$ -LcNTX genera la mayor respuesta inmunogénica en los conejos, presentando los títulos más altos durante el proceso de inmunización, seguida por el cóctel de isoformas. En contraste, la isoforma 2 indujo la respuesta inmunológica más baja en los conejos monitoreados.

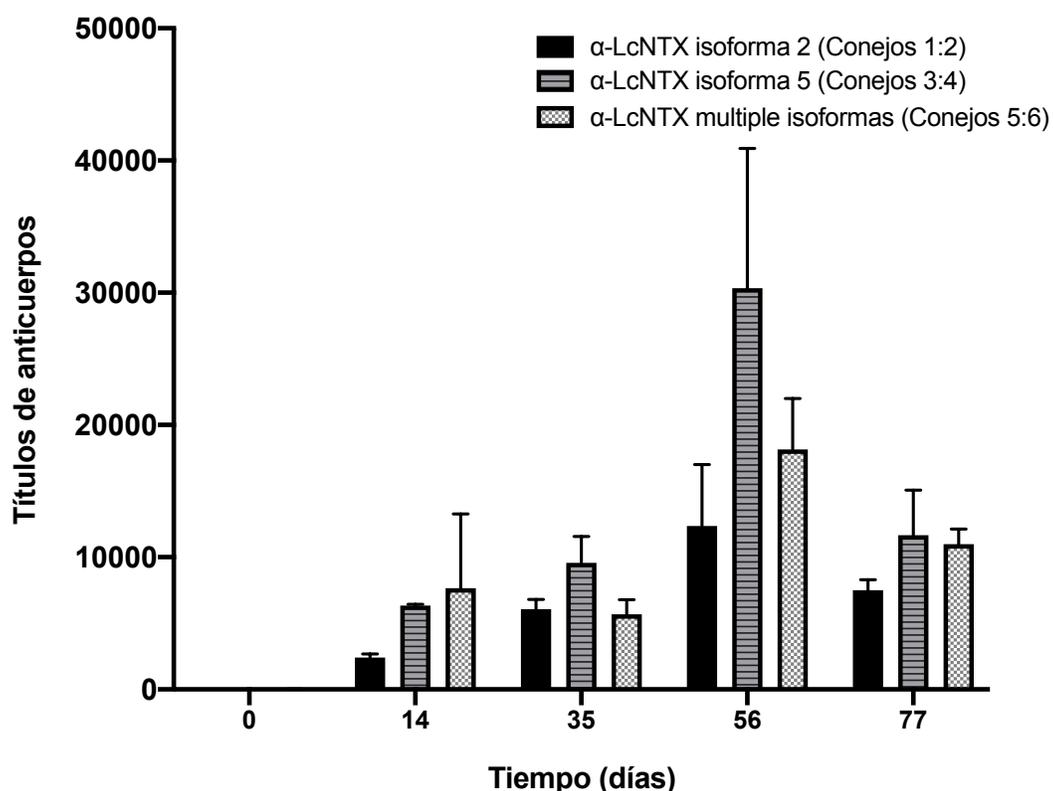


Figura 20. Títulos de los anticuerpos obtenidos por medio de la técnica de ELISA del reconocimiento de las isoformas proteicas de la  $\alpha$ -LcNTX. Títulos obtenidos para la isoforma 2, 5 e isoformas 1, 2, 3, 4 y 5.

## 6.6 Reconocimiento de los anticuerpos a $\alpha$ -LNTXs, 3FTXs y a venenos de elápidos por medio de técnica de ELISA

Al culminar el proceso de inmunización en conejos con las toxinas  $\alpha$ -LcNNTX y sus isoformas cosechamos los tres anticuerpos resultantes para posteriormente evaluar el reconocimiento por medio de ensayo de ELISA a venenos de elápidos de importancia médica. El reconocimiento a los venenos fue diferencial. Evaluando los resultados en los ensayos se demuestra que los tres tipos de anticuerpos obtenidos con las isoformas de la toxina  $\alpha$ -LcNNTX reconocen a venenos de elápidos de importancia médica, aunque con  $EC_{50}$  alta como se muestra en la figura 21, los mejores reconocimientos registrados fueron a elápidos africanos (*A. lubricus* y *D. polylepis*) y a un veneno de un elárido asiático *O. hannah*, seguido de *A. antarcticus* elárido australiano (figura 22).

Como se definió en los antecedentes del proyecto las  $\alpha$ -LNXTs se encuentran en baja proporción dentro de los venenos de elápidos de importancia médica, por lo que se decidió separar a los venenos por medio de RP-HPLC con una columna C18, con el propósito de identificar a proteínas de tres dedos y a las  $\alpha$ -LNXTs presentes en dichos venenos. Una vez fraccionados los venenos, las fracciones cromatográficas obtenidas se analizaron por medio de espectrometría de masas, y con base a su masa molecular experimental solo aquellas toxinas que presentaron masas que correlacionaran con proteínas 3FTXs o  $\alpha$ -LNXTs fueron seleccionadas para ser utilizadas en ensayos de reconocimiento por ELISA. Los resultados de la evaluación del reconocimiento de toxinas  $\alpha$ -LNTX por los anticuerpos derivados de distintas isoformas de  $\alpha$ -LcNNTX se ilustran en las Figuras 23 y 24. En general, se observó que las toxinas  $\alpha$ -LcNNTX provenientes de venenos de elápidos africanos, como *N. haje* (PM: 7,901 Da) y *A. lubricus* (PM: 7,744 y 7,902.3 Da), fueron las mejor reconocidas. Por el contrario, la toxina de *D. polylepis* (PM: 8,636.1 Da) presentó una baja afinidad de reconocimiento con los tres anticuerpos empleados.

En el caso de las toxinas 3FTX, el reconocimiento general fue inferior al observado para las  $\alpha$ -LNTX. Las toxinas de *A. lubricus* (PM: 6,788.6 y 7,902.4 Da) y *N. kaouthia* (PM: 6,846.6 Da) mostraron un mayor nivel de reconocimiento. Sin embargo, la toxina de *N. mossambica* (PM: 6,889.2 Da) fue la menos reconocida, con fracciones de masa molecular que sugieren una correlación con citotoxinas.

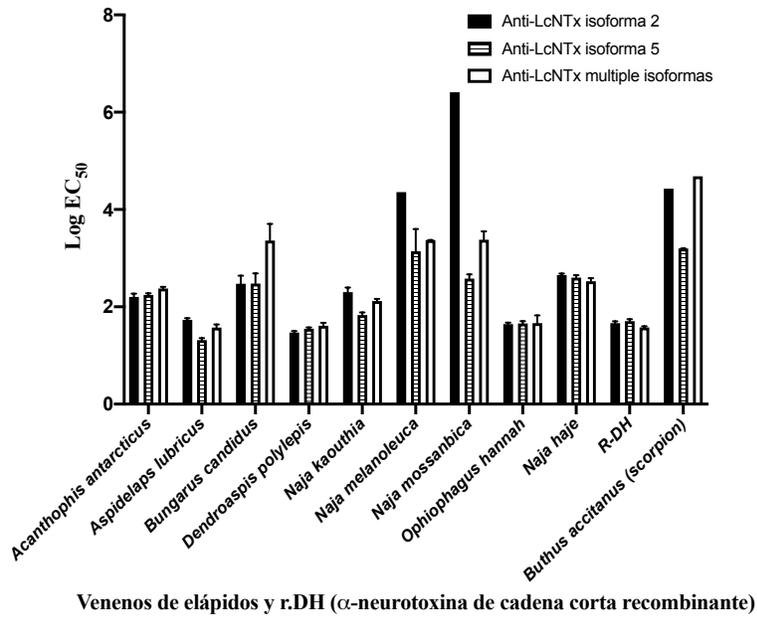


Figura 21. Representación gráfica del reconocimiento de los anticuerpos anti-LcNTX isoforma 2, anti-LcNTX isoforma 5 y anti-LcNTX isoformas 1, 2, 3, 4 y 5 a venenos de elápidos de importancia médica.

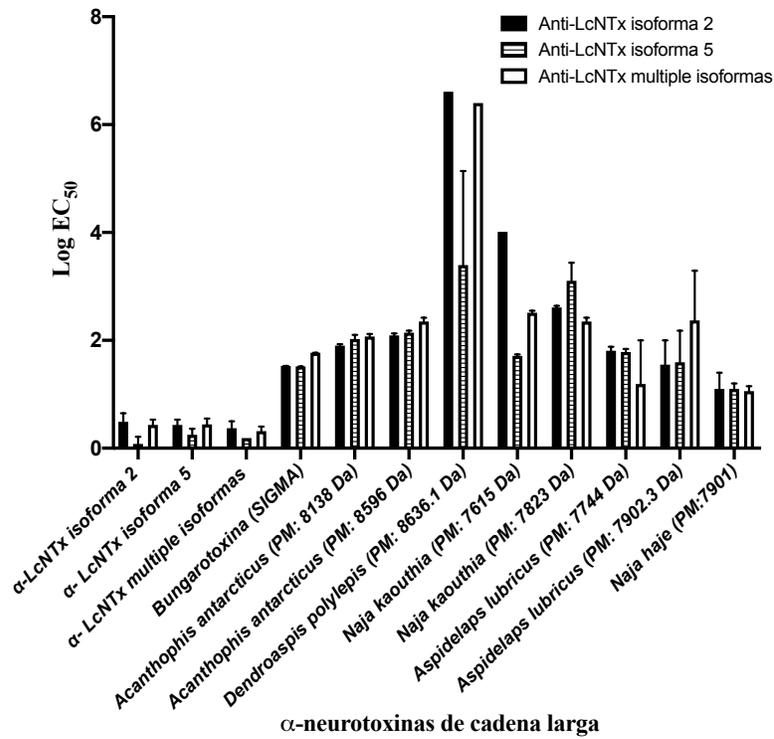


Figura 22. Representación gráfica del reconocimiento de los anticuerpos anti-LcNTX isoforma 2, anti-LcNTX isoforma 5 y anti-LcNTX isoformas 1, 2, 3, 4 y 5 a venenos de elápidos de importancia médica.

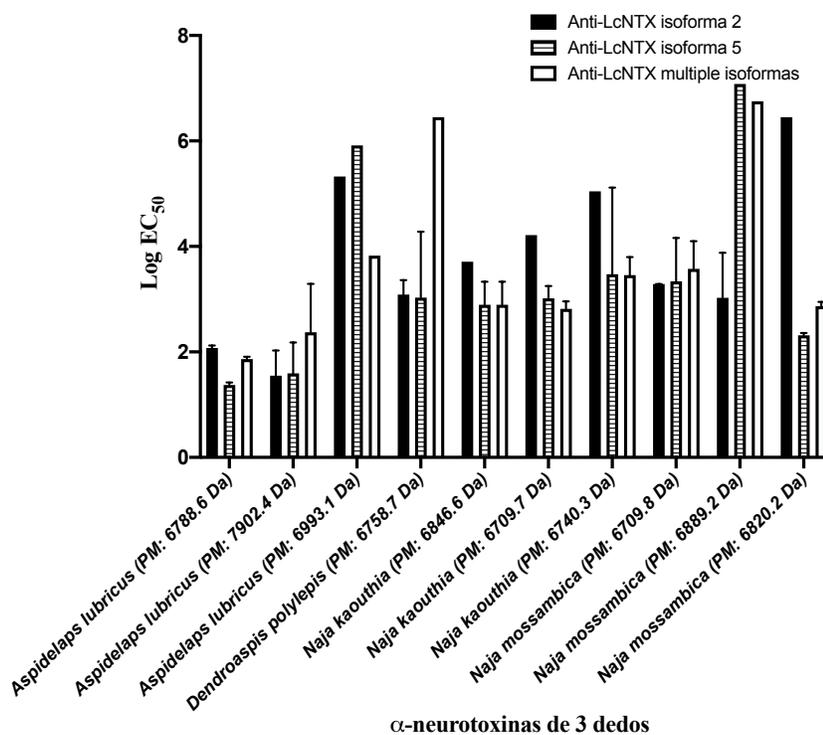


Figura 23. Representación gráfica del reconocimiento de los anticuerpos anti-LcNTX isoforma 2, anti-LcNTX isoforma 5 y anti-LcNTX isoformas 1, 2, 3, 4 y 5 a venenos de elápidos de importancia médica.

### 6.7 Ensayo de neutralización de venenos de elápidos de importancia médica y a bungarotoxina utilizando los anticuerpos anti-LcNTX.

La efectividad de la neutralización de las tres versiones de los anticuerpos anti-LcNTX frente a venenos de elápidos y la bungarotoxina se presenta en la tabla 11 y 12. Se logró la neutralización de los venenos de *A. lubricus* y *D. polylepis*, aunque en ningún caso se alcanzó el 100 % de neutralización. En vista de esto, se optó por probar la combinación del anti-ScNTX y el anti-LcNTX isoforma 2, dado que mostró los resultados más prometedores en ensayos previos

Tabla 11. Resultados obtenidos del ensayo de neutralización de la bungarotoxina y venenos de *A. lubricus* y *D. polylepis* utilizando los anticuerpos anti-LcNTX isoforma 2.

Veneno / Neurotoxina	DL <sub>50</sub> (µg/g ratón)	2DL <sub>50</sub> (µg/g ratón)	Sin anticuerpo <sup>b</sup> (Muerto/vivo)	Anti-LcNTx Isoforma 2 <sup>a</sup> (Muerto/Vivo)	Anti-LcNTx Isoforma 5 <sup>a</sup> (Muerto/ Vivo)	Anti-LcNTx multiple isoformas <sup>a</sup> (Muerto/Vivo)
<i>A. lubricus</i>	5.8	11.5	3/0	1/2	3/0	3/0
<i>D. polylepis</i>	7.5	15	3/0	1/2	2/1	1/2
bungarotoxina <sup>b</sup>	4	8	3/0	3/0	3/0	3/0

<sup>a</sup> Los venenos de *A. lubricus* y *D. polylepis* se incubaron con 25 mg de anticuerpos de los anti-LcNTX.

<sup>b</sup> El control sin anticuerpos resultó en la muerte de ratones cuando se inyectaron con 2LD<sub>50</sub> de veneno o toxina.

Tabla 12. Ensayos de neutralización de los venenos de *A. lubricus* y *D. polylepis* utilizando una mezcla de anticuerpos anti-isoforma 2 de LcNTx y anticuerpos anti-ScNTx.

Veneno <sup>a</sup>	DL <sub>50</sub> (µg/g ratón)	2DL <sub>50</sub> (µg/g ratón)	Sin anticuerpo <sup>b</sup> (Muerto/ Vivo)	Anti-LcNTx isoforma 2/anti-ScNTx <sup>a</sup>	
				(Muerto/Vivo)	
				1:1	4:1
<i>A. lubricus</i>	5.8	11.5	3/0	3/0	0/3
<i>D. polylepis</i>	7.5	15	3/0	0/3	ND

<sup>a</sup> Los venenos de *A. lubricus* y *D. polylepis* se incubaron con 12.5 mg de anticuerpos anti-isoforma 2 de LcNTx y 12.5 mg de anticuerpos anti-ScNTx (1:1), o 20 mg de anticuerpos anti-isoforma 2 de LcNTx y 5 mg de anticuerpos anti-ScNTx (4:1).

<sup>b</sup> El control sin anticuerpos resultó en la muerte de ratones cuando se inyectaron con 2LD<sub>50</sub> de veneno.

## 7. $\alpha$ -LcNTX V1

Se realizó el ensamblaje de la secuencia codificante de la  $\alpha$ -LcNTX V1 por medio de PCR de mega primer sobrenadante. El resultado de la amplificación se muestra en la figura 25.

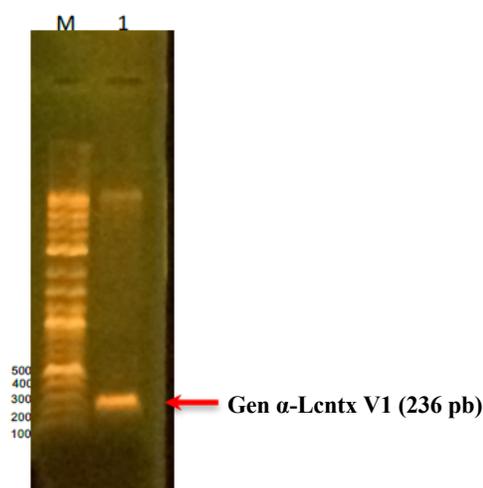


Figura 24. Producto de PCR del ensamblaje de los 4 oligonucleótidos para dar origen al gen  $\alpha$ -LcNTX V1. M) Marcado de peso molecular, Carril 1: Producto de PCR del ensamblaje de  $\alpha$ -LcNTX V1.

Una vez verificada la presencia de la secuencia codificante ensamblada con el tamaño aparente esperado (236 pb), se procedió a su purificación, y posteriormente a su clonación en el vector pQE-30. La construcción pQE-30/LcNTX V1 se transformó en *E. coli* XL1-Blue donde se obtuvieron 5 colonias positivas a las que, a su vez, se les realizó el ensayo de PCR de colonia obteniendo el resultado que se muestra en la figura 26. Con el fin de verificar la integridad de la secuencia codificante, el plásmido correspondiente fue extraído y secuenciado.

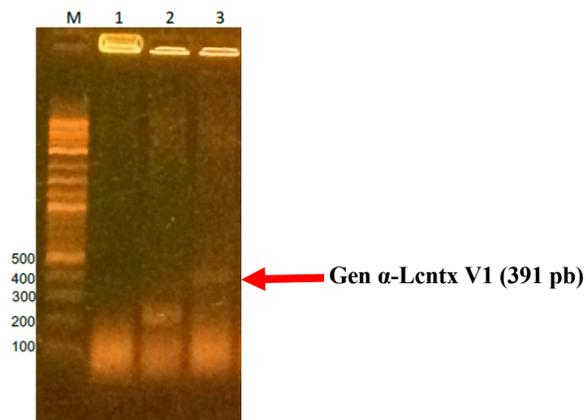


Figura 25. PCR de colonia de 5 clonas de *E. coli* XL1B que contienen la construcción pQE-30/LcNTX V1. M) Marcado de peso molecular, Carril 1-3: Producto de PCR 5 clonas *E. coli* XL1B tamaño esperado de 391 pb.

### 7.1 Expresión de $\alpha$ -LcNTX V1 en *E. coli* Origami

Tomando en cuenta los resultados anteriores en la expresión proteica de la toxina  $\alpha$ -LcNTX en la cepa de *E. coli* Origami, se decidió momentáneamente solo transformar esta cepa con el plásmido pQE-30/LcNTX V1. Posteriormente al proceso de expresión proteica de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 se analizaron las 2 fases proteicas cuerpos de inclusión y fracción soluble citoplasmática.

Primeramente, se realizó el análisis de los cuerpos de inclusión ya que comúnmente dentro de estas estructuras se encuentra mayor cantidad de proteína recombinante. Una vez terminado el proceso de purificación proteica de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 por columna de afinidad a níquel, se analizaron las fracciones recolectadas en el gel de SDS-PAGE al 15% rotulado como figura 27. La masa molecular aparente esperada de la  $\alpha$ -LcNTX V1 es de alrededor de 9 kDa. Sin embargo, el peso molecular aparente observado es mayor a 10 kDa, lo que puede atribuirse a la abundancia de cargas positivas presentes en el péptido  $\alpha$ -LcNTX V1. En dicha ilustración se logra apreciar la poca cantidad de proteína producida en forma agregada. Mostrando que estas condiciones de cultivo no son las ideales para expresar la proteína  $\alpha$ -LcNTX V1 en forma de cuerpos de inclusión.

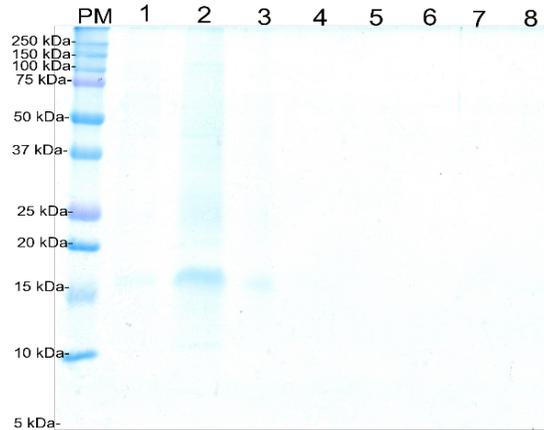


Figura 26. SDS-PAGE (15 % SDS-tricina), posterior a la purificación por columna de níquel-agarosa de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1, 1-15: tubos de 2 mL con proteína recolectada, se cargó al gel 100  $\mu$ L de la solución de cada tubo.

Tomado en cuenta el anterior resultado se decidió analizar la fracción soluble citoplasmática de la expresión con M15 transformada con el plásmido pQE-30/LcNTX V1 por medio de un gel de electroforesis SDS-PAGE al 15%, el cual se muestra en la figura 28. En dicha imagen se muestra una banda que podría corresponder a la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1. Con el fin de corroborar si se trataba verdaderamente de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 se realizó un western blot utilizando el anticuerpo IgG rabbit anti-His como se muestra en la figura 28. La característica de migración en gel de proteínas mayor al peso molecular teórico es una característica observada con anterioridad en proteínas consenso de elápidos y esto se debe a la presencia de aminoácidos básicos en la secuencia de estas proteínas (de la Rosa 2018).

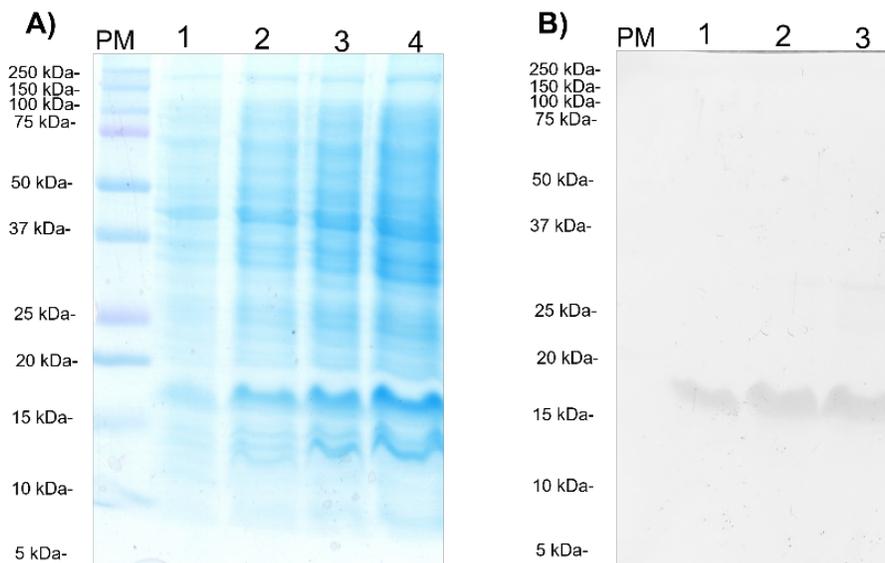


Figura 27. A) SDS-PAGE (15% SDS-tricina) derivado de la fracción soluble de Origami que expresa la  $\alpha$ -LcNTX V1. Carril 1: 1  $\mu$ L, carril 2: 2  $\mu$ L, carril 3: 2.5  $\mu$ L y carril 4: 5  $\mu$ L. B) Western blot IgG rabbit anti-His derivado del análisis de la fracción soluble de *E. coli* Origami. Carril 1: 2  $\mu$ L, carril 2: 3  $\mu$ L y carril 3: 5  $\mu$ L.

Con base en este resultado se realizó el proceso de purificación por medio de columna de afinidad a níquel, las eluciones se analizaron por medio de un gel de electroforesis de SDS-PAGE al 15% el cual se muestra en la figura 28. En él se logra observar la presencia mayoritaria de la proteína  $\alpha$ -LcNTX V1 en la fracción soluble citoplasmática.

A continuación, la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 se trató con DTT para romper los puentes disulfuro y con ello tener la proteína en estado reducido para enseguida ser purificada por HPLC en fase reversa (RT-HPLC) con un gradiente de 20-60% acetonitrilo en 40 min y con flujo de 1 mL/min, el cromatograma que se obtuvo se muestra en la figura 29. La toxina en estas condiciones presenta un tiempo de retención de 24 min. La fracción proteína de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 se secó y cuantificó para corroborar su masa molecular por lo cual se envió a analizar 3  $\mu$ g de esta proteína en un espectrómetro de masas. La masa molecular esperada teórica es de 9,136.2 Da. El resultado arrojado en el análisis de masas es de 9,131.8 Da. Con ello comprobamos la masa molecular de la  $\alpha$ -LcNTX reducida, es cercana a la esperada, aunque la diferencia de 4.4 Da se puede deberse a la variación por la calibración del equipo.

Conocida la masa molecular se purificó la fracción soluble citoplasmática de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 por medio de RT-HPLC con una columna C18, con un gradiente de 20-60% de acetonitrilo con un flujo de 1 mL/min. El cromatograma resultante se muestra en la figura 30, la fracción cromatográfica recolectada 19 min resultante se analizaron primeramente por medio de un gel de electroforesis SDS-PAGE al 15%, el cual se muestra en la figura 29. Una vez observado que se tienen un perfil electroforético igual al control de proteína  $\alpha$ -LcNTX V1 reducida. Se procedió a secar y cuantificar para posteriormente analizar 3  $\mu$ g por espectrometría de masas. Las masas obtenidas en las tres muestras analizadas se encuentran en el rango esperado de la proteína  $\alpha$ -LcNTX V1 oxidada de 9,126.3 Da.

Las fracciones cromatográficas producto de la purificación de la fracción soluble de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 rotulado como 19, fueron probadas en inyección intracraneal en ratones CD-1, obteniéndose resultados negativos, al no observarse signos neurotóxicos en los ratones tratados.

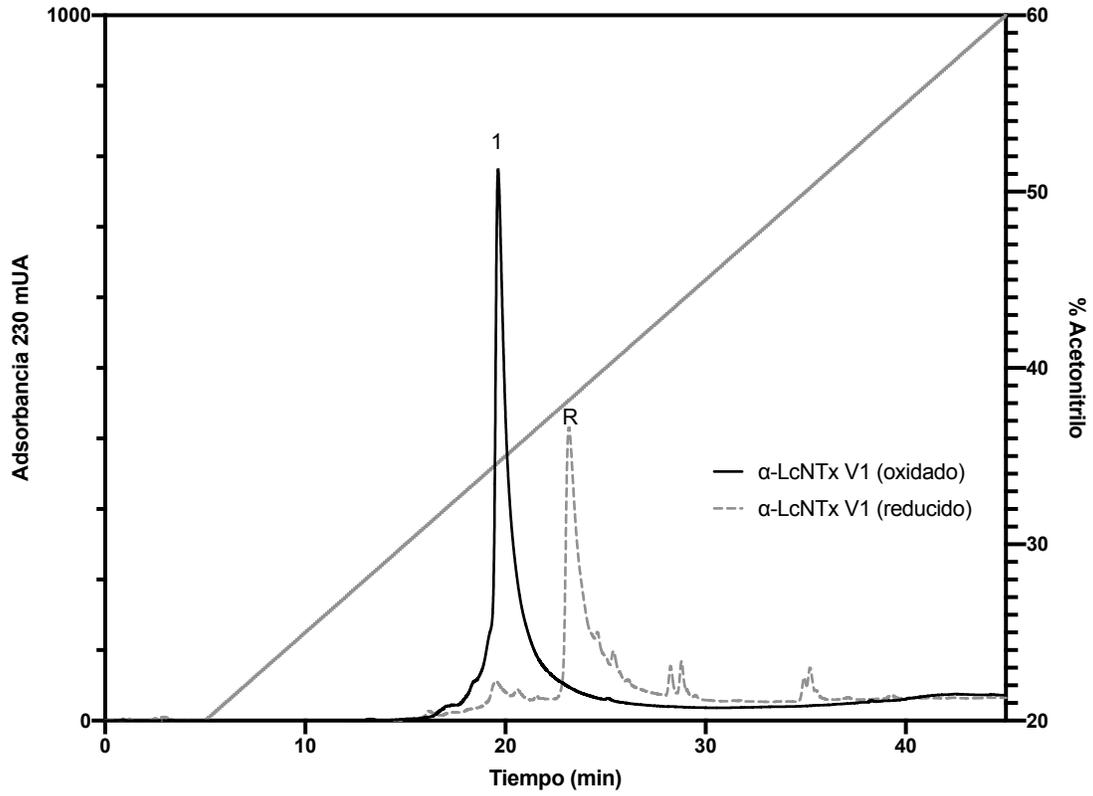


Figura 28. Cromatograma de la fracción soluble citoplasmática de la toxina  $\alpha$ -LcNTx V1 expresada en *E. coli* Origami de la proteína reducida y oxidada.

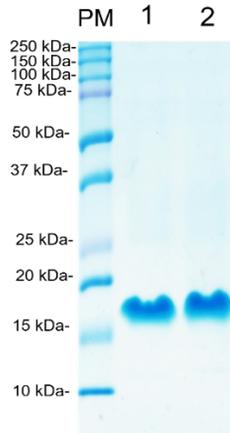


Figura 29. SDS-PAGE (15% SDS-glicina) derivado de las fracciones cromatográficas de la purificación de la fracción soluble de la toxina  $\alpha$ -LcNTx V1 expresada en *E. coli* Origami. Carril 1: Control proteína  $\alpha$ -LcNTx V1 reducida, carril 2: min 19.

## 7.2 Dicroísmo circular de $\alpha$ -LcNTX V1

Al observar una sola versión de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 realizamos el ensayo de dicroísmo circular, con el objetivo de analizar el contenido de estructura secundaria  $\alpha$ -hélice y lámina  $\beta$  antiparalela y compararlas directamente con el control de bungarotoxina, con esto confirmar indirectamente un plegamiento análogo al de las  $\alpha$ -LNTXs. Los resultados mostraron un patrón similar al de la bungarotoxina lo que correlaciona un plegamiento similar a neurotoxinas de cadena larga. Los datos graficados, que se presentan en la Figura 31, muestran una diferencia del 4.6% en la proporción de hojas antiparalelas y hélices, lo que indica una variación en el plegamiento de las proteínas analizadas. Esta diferencia sugiere que, aunque las estructuras primarias de las isoformas puedan ser similares, los cambios en la configuración secundaria pueden ser notables. Sin embargo, creemos que esta variación podría estar relacionada con las modificaciones en la polaridad, como se observa en la Tabla 13.

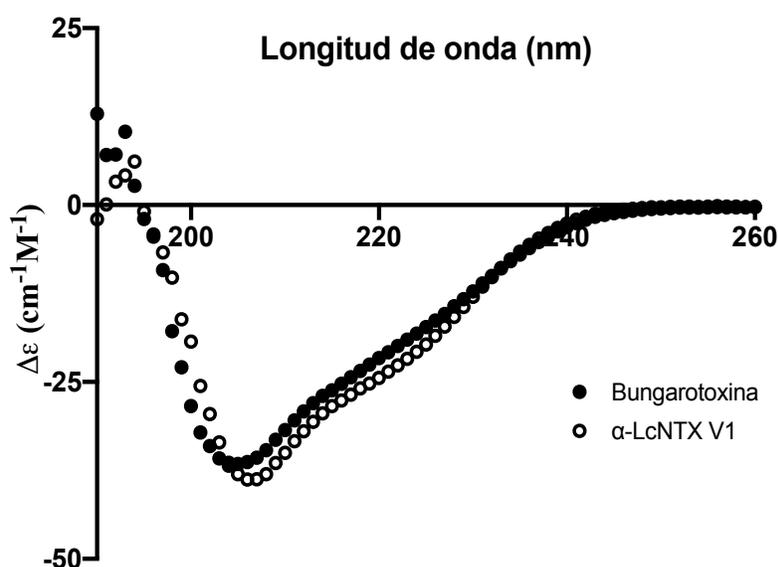


Figura 30. Espectros de dicroísmo circular de la proteína  $\alpha$ -LcNTx V1.

Con base en el análisis de dicroísmo circular (DC), se determinó que la  $\alpha$ -LcNTx V1 presenta un plegamiento análogo al de las  $\alpha$ -LNTXs. Considerando los resultados obtenidos, decidimos utilizar la  $\alpha$ -LcNTx V1 como inmunógeno en conejos.

Tabla 13. Porcentajes de estructura secundaria de la bungarotoxina y de la toxina  $\alpha$ -LcNTX

	Bungarotoxina	$\alpha$ -LcNTx V1
Hélice	89.6	85
Antiparalela	10.4	15

<sup>a</sup>Los datos de la figura 31 fueron deconvolucionados usando el programa Bestsel (<http://bestsel.elte.hu/index.php>)(Micsonai *et al.*, 2018).

### 7.3 Reconocimiento de anticuerpos obtenidos del proceso de inmunización con la toxina $\alpha$ -LcNTX V1

Se tomó la decisión de solo inmunizar con la fracción cromatográfica que fluye en el minuto 18.8 producto de la purificación por columna C18 de la fracción soluble de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1, ya que es la más representativa y su masa molecular corresponde a la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 oxidada. El protocolo de inmunización de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 se inició inoculando 2 conejas de la cepa nueva Zelanda con cantidades crecientes de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1, este proceso de inmunización es similar al mostrado anteriormente.

Con la intención de evaluar el reconocimiento de los anticuerpos producidos de la inmunización con la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1, se decidió tomar muestras de suero a las conejas en intervalos de 3 semanas, posterior a esto se recuperó el suero total y se probó la capacidad de reconocer a la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 por medio de la técnica de ELISA. Los títulos obtenidos en el esquema total de la inmunización con la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 se encuentran plasmados en la figura 32. La respuesta inmunológica generada contra el antígeno  $\alpha$ -LcNTX V1 mostró un incremento gradual en los títulos de anticuerpos, alcanzando un nivel máximo en el día 56 del proceso de inmunización. A partir de ese punto, los títulos de anticuerpos comenzaron a disminuir paulatinamente. Esta reducción en los niveles de anticuerpos podría deberse a la maduración del sistema inmunológico

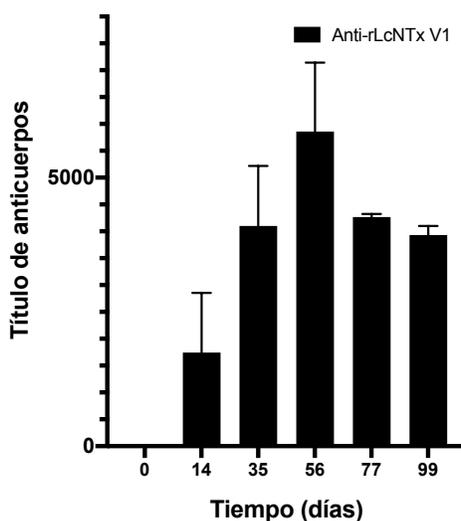


Figura 31. Títulos de los anticuerpos obtenidos por medio de la técnica de ELISA del reconocimiento de la proteína  $\alpha$ -LcNTX V1.

#### 7.4 Reconocimiento de los anticuerpos anti-LcNTX V1 a venenos de elápidos por medio de técnica de ELISA

Para tener una perspectiva sobre el reconocimiento de los anticuerpos anti- $\alpha$ -LcNTX V1 en venenos de elápidos y a sus componentes ( $\alpha$ -LNTXs y 3FTXs), se realizó el análisis por medio de la técnica de ELISA, utilizamos como control a la bungarotoxina, toxina nativa purificada del veneno de *B. multicinctus*. Adicionalmente probamos el reconocimiento a venenos de elápidos de importancia médica que se distribuyen en África, Asia y Australia. Los valores recaudados en los ensayos muestran en las figuras 33, 34 y 35.

Aunque las ilustraciones muestran un reconocimiento diferencial entre los distintos venenos evaluados, cabe destacar que el veneno de *N. haje* y *A. antarcticus* presenta el reconocimiento más significativo. Esta tendencia se mantiene al analizar las  $\alpha$ -LNTXs de estos venenos. Sin embargo, los resultados obtenidos no son directamente comparables con los niveles de reconocimiento registrados para los anticuerpos producidos contra las isoformas de la toxina  $\alpha$ -LcNTX. Observamos además que el reconocimiento hacia las toxinas 3FTXs fue considerablemente bajo en todos los casos. Esto sugiere que las modificaciones en los aminoácidos de las isoformas de  $\alpha$ -LcNTX afectan drásticamente la capacidad de los anticuerpos para reconocer epítopos presentes en toxinas y venenos nativos, lo cual implica una disminución significativa en la reactividad cruzada de los anticuerpos tras estos cambios estructurales.

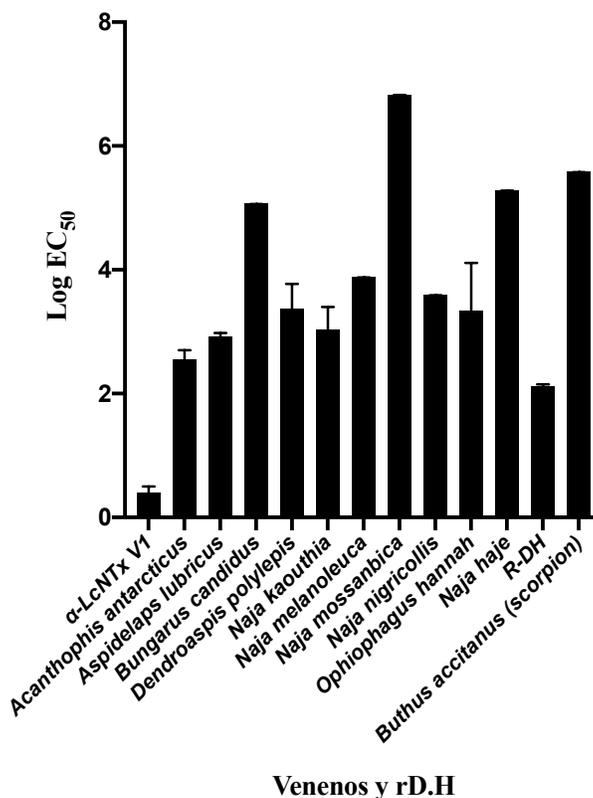


Figura 32. Representación gráfica del reconocimiento del anticuerpo anti-LcNTX V1 frente a venenos de elápidos de importancia médica.

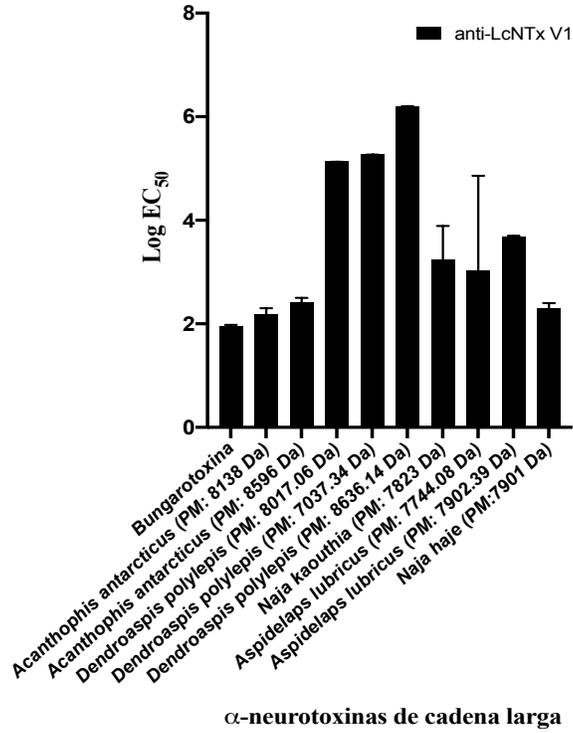


Figura 33. Visualización del reconocimiento del anti-LcNTX V1 a α-LNTX's de elápidos de importancia médica.

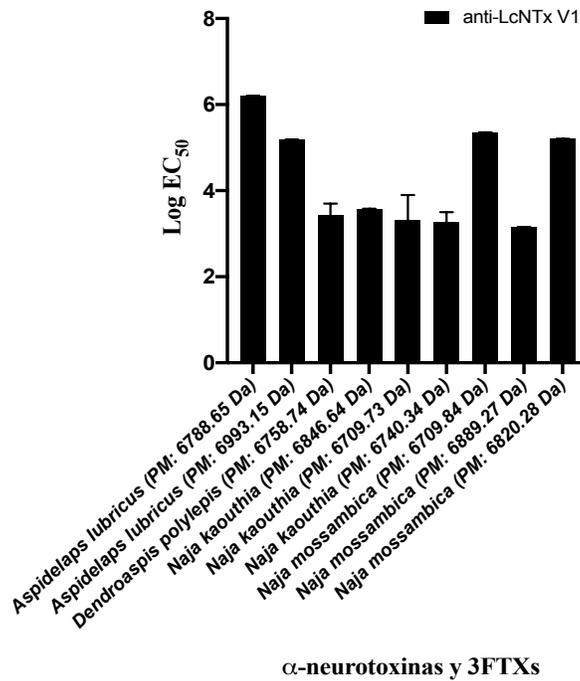


Figura 34. Representación gráfica del reconocimiento del anticuerpo anti-LcNTX V1 a toxinas de tres dedos (3FTX) de elápidos de importancia médica.

## 7.5 Ensayo de neutralización de la bungarotoxina utilizando los anticuerpos anti-LcNTX V1

Tomando en cuenta los resultados mostrados en los ensayos de ELISA, se decidió evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-LcNTX V1 para neutralizar los efectos neurotóxicos de una toxina nativa (bungarotoxina). Los resultados generados se muestran en la tabla 14. Los datos arrojados no fueron positivos, dado que no se observó ningún ratón sobreviviente en el ensayo de neutralización, desafortunadamente nuestro anti-LcNTX V1 no logró retrasar la muerte, ni disminuir los signos neurotóxicos. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la posición de los residuos K23, R33, R36 y K49 es crucial para el reconocimiento y la neutralización de proteínas recombinantes de cadena larga de elápidos producidas en *E. coli*. La localización específica de estos residuos en la estructura de la toxina parece jugar un papel determinante en la capacidad de los anticuerpos para interactuar eficazmente con las proteínas del veneno de elápidos de importancia médica.

Tabla 14. Resultados obtenidos del ensayo de neutralización de bungarotoxina utilizando los anticuerpos anti-LcNTX V1.

Veneno / Neurotoxina	DL <sub>50</sub> (µg/g ratón)	2DL <sub>50</sub> (µg/g ratón)	Sin anticuerpo <sup>b</sup> (Muerto/vivo)	Anti-LcNTx V1 <sup>a</sup> (Muerto/Vivo)
<i>A. lubricus</i>	5.8	11.5	3/0	3/0
<i>D. polylepis</i>	7.5	15	3/0	3/0
bungarotoxina <sup>b</sup>	4	8	3/0	3/0

<sup>a</sup>. Los venenos de *A. lubricus* y *D. polylepis* se incubaron con 25 mg de anticuerpos ant rLcNTx V2.

<sup>b</sup>. El control sin anticuerpos resultó en la muerte de ratones cuando se inyectaron con 2LD<sub>50</sub> de veneno o toxina.

## 8 $\alpha$ -LcNTX V2 (CDAFC)

Se realizó el ensamblaje de la secuencia codificante de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V2 por medio de PCR de mega primer sobrenadante el resultado de la amplificación se muestra en la figura 36.

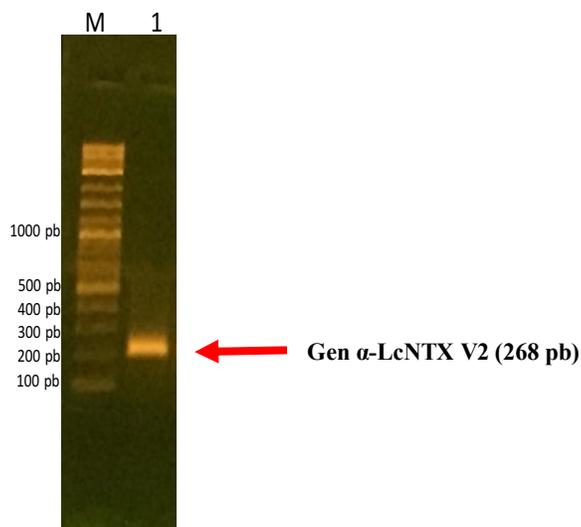


Figura 35. Producto de PCR del ensamblaje de los 4 oligonucleótidos para dar origen al gen  $\alpha$ -LcNTX V2. M) Marcado de peso molecular, Carril 1: Producto de PCR del ensamblaje de  $\alpha$ -LcNTX V2.

Se logró obtener la secuencia codificante de la  $\alpha$ -LcNTX V2, y se digirió con las enzimas de restricción Bam-H1 y Pst-1 al igual que el plásmido pQE30 para incubar la secuencia  $\alpha$ -LcNTX V2. A continuación, el producto de ligación se transformó en la cepa *E. coli* XL1 B quimiocompetentes por choque térmico utilizando en el medio de cultivo LB sólido el marcador de selección ampicilina, una vez realizado esto incubaron durante 12 horas a 24°C. Las colonias resultantes fueron analizadas mediante un PCR de colonia con los oligonucleótidos del plásmido pQE30, los cuales flanquean desde la caja TATA hasta el factor de terminación del fago T7, con ello se espera un producto de PCR de un peso molecular de 376 pb para la  $\alpha$ -LcNTX V2 dicho análisis se muestra en la figura 37.

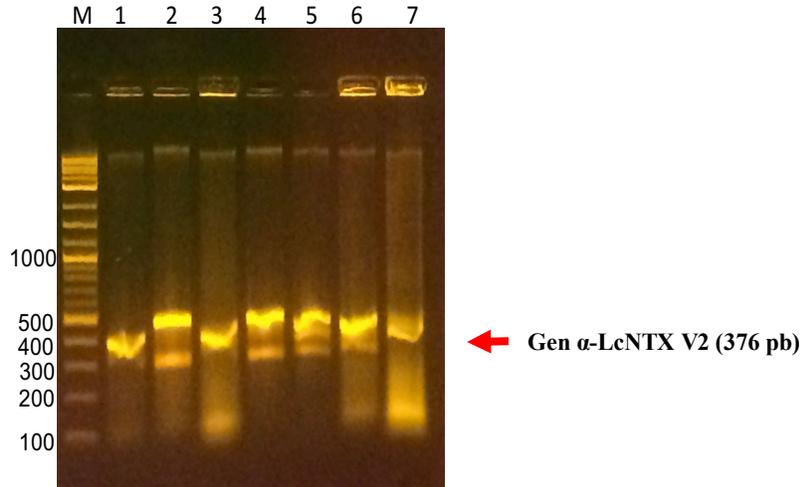


Figura 36. Resultado de la amplificación de las clonas obtenidas con la construcción  $\alpha$ -LcNTX V2.

### 8.1 Expresión de $\alpha$ -LcNTX V2 en *E. coli* Origami

Una vez expresada la  $\alpha$ -LcNTX V5 en las células de *E. coli* Origami, se recolectaron las proteínas de los cuerpos de inclusión, se solubilizaron y purificaron por columna de afinidad a níquel. Posteriormente se analizaron las eluciones por medio de un gel de SDS-PAGE al 15 %, mismo que se exhibe en la figura 37. La masa molecular esperada de la  $\alpha$ -LcNTX V2 es de 8,476.0 Da, sin embargo, el peso molecular aparente es mayor a 10 kDa, lo que puede atribuirse a la gran cantidad de cargas positivas presentes en el péptido  $\alpha$ -LcNTX V2. Lo cual de acuerdo con observaciones en nuestro laboratorio hace que se retengan más durante la elución en este tipo de separaciones.

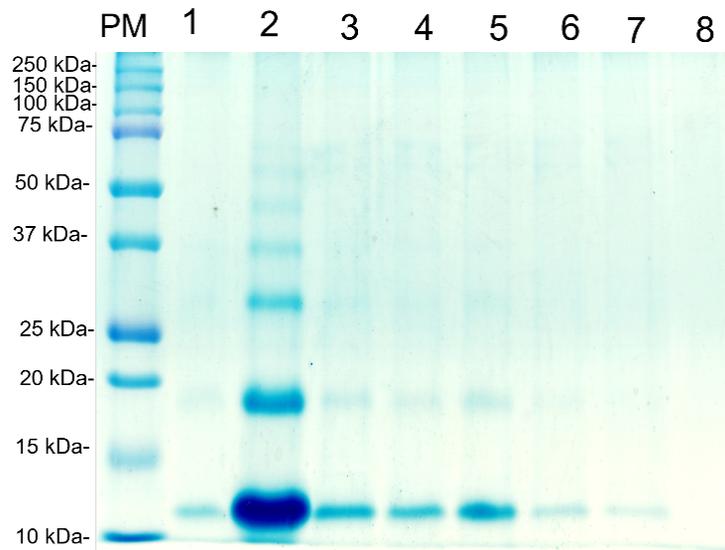


Figura 37. SDS-PAGE (15 % SDS-tricina), posterior a la purificación por columna de níquel-agarosa de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V2, 1-15: tubos de 2 mL con proteína eluida, se cargó al gel 100  $\mu$ L de la solución de cada tubo.

A continuación, la toxina  $\alpha$ -LcNTX V2 se trató con DTT para romper los puentes disulfuro y con ello tener la proteína en estado reducido para enseguida ser purificarla por HPLC en fase reversa (RT-HPLC) con un gradiente de 20-60% acetonitrilo y un de flujo de 1 mL/min, el cromatograma que se obtuvo se muestra en la figura 39. La toxina en estas condiciones presenta un tiempo de retención de min 16.

La fracción proteína se secó y cuantificó para corroborar su masa molecular por lo cual se envió a analizar 3  $\mu$ g de esta proteína en un espectrómetro de masas. La masa molecular esperada teórica es de 8,473.7 Da. El resultado arrojado en el análisis de masas es de 8,473.7 Da. Con ello comprobamos la masa molecular de la  $\alpha$ -LcNTX V2 reducida.

## 8.2 Producción de la $\alpha$ -LcNTX V2 oxidada contenida en los cuerpos de inclusión

Analizando las cantidades necesarias de toxina  $\alpha$ -LcNTX V2 que se requieren para el proceso de inmunización decidimos explorar la opción de buscar la  $\alpha$ -LcNTX V2 oxidada en los cuerpos de inclusión, ya que tenemos el antecedente de que proteínas con 4 puentes disulfuro se pueden plegar eficientemente. Purificamos por medio de HPLC en fase reversa con la columna C18, las eluciones recolectadas en la purificación por afinidad a níquel. El cromatograma resultado de la purificación se muestra en la figura 39.

Las fracciones cromatográficas recolectadas en los minutos 14.5 y 15 se analizaron por espectrometría de masas obteniendo un valor de 8,470.7 Da lo que correlaciona con la masa molecular oxidada de la  $\alpha$ -LcNTX V2, al observar los resultados favorables decidimos probar estas fracciones cromatográficas en ensayos de inyección intracraneal en ratones CD-1, en dicho experimento no logramos observar signos neurotóxicos en los ratones. Posterior al ensayo de toxicidad decidimos continuar con el proceso de inmunización pese que las fracciones cromatográficas no presentaron actividad neurotóxica.

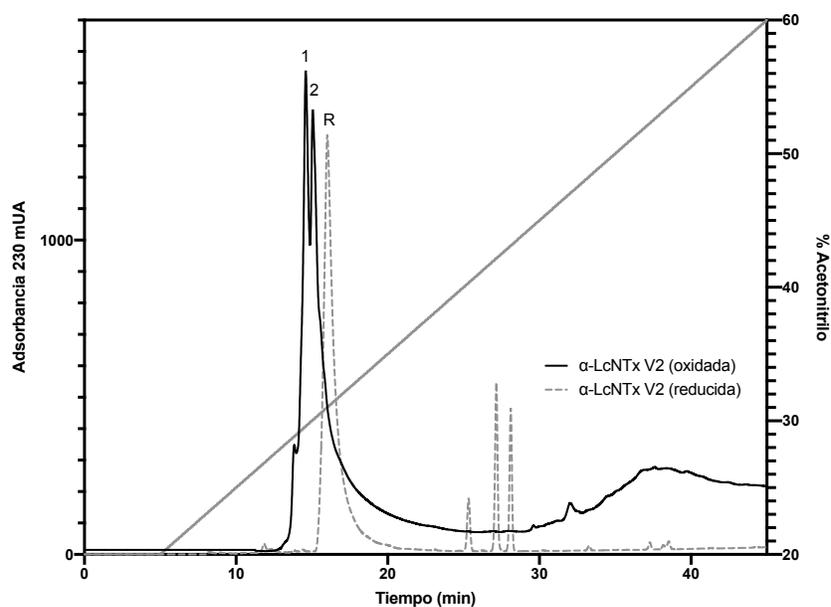


Figura 38. Cromatograma de toxina  $\alpha$ -LcNTX V2 resultado de la purificación de la columna C18 de las eluciones recolectadas de la purificación por afinidad níquel-agarosa de la proteína reducida y oxidada.

### 8.3 Dicroísmo circular de las isoformas $\alpha$ -LcNTX V2 (1, 2)

Al observar las 2 isoformas proteicas realizamos experimentos adicionales de dicroísmo circular, con el objetivo de observar el contenido de estructura secundaria  $\alpha$ -hélice y lámina  $\beta$  antiparalela y compararlas directamente con el control de bungarotoxina, con esto confirmar indirectamente un plegamiento análogo al de las  $\alpha$ -LNTXs. Los resultados mostraron que al menos las isoformas  $\alpha$ -LcNTX V2 (1, 2) conservan un patrón similar al de la bungarotoxina, como se muestra en la Tabla 15. La imagen correspondiente se presenta en la Figura 40. En la gráfica, se observa que ambas isoformas tienen patrones de dicroísmo circular semejantes al de la bungarotoxina (control). Sin embargo, la isoforma 2 muestra un ajuste más cercano al plegamiento nativo de las  $\alpha$ -LNTX, con solo un 0.8% de diferencia en las hojas antiparalelas y las hélices en comparación con el control (Tabla 15). Por otro lado, la isoforma 1 presentó una variación de 1.4%. A partir del análisis de dicroísmo circular, se determinó que ambas isoformas exhiben un plegamiento análogo al de las  $\alpha$ -LNTX, lo que llevó a la decisión de utilizar ambas isoformas como inmunógenos.

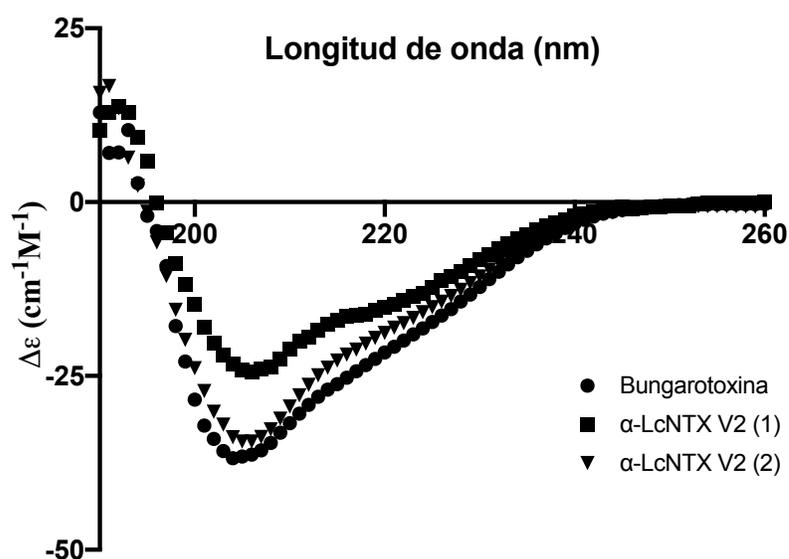


Figura 39. Espectros de dicroísmo circular de las isoformas de la  $\alpha$ -LcNTx V2.

Tabla 15. Porcentajes de estructura secundaria de la bungarotoxina y las isoformas de  $\alpha$ -LcNTX

	Bungarotoxina	$\alpha$ -LcNTX V2 (1)	$\alpha$ -LcNTX V2 (2)
Hélice	89.6	88.8	88.2
Antiparalela	10.4	11.2	11.8

<sup>a</sup>Los datos de la figura 40 fueron deconvolucionados usando el programa Bestsel (<http://bestsel.elte.hu/index.php>) (Micsonai *et al.*, 2018).

Como se demostró anteriormente existen 2 versiones de plegamiento de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V2, decidimos inmunizar a los 2 conejos con las 2 isoformas proteicas de  $\alpha$ -LcNTX V2 ya que tiene las mismas masas moleculares continuamos con el protocolo de inmunización de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V2 se inició inoculando 2 conejas de la cepa Nueva Zelanda con cantidades crecientes de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1, este proceso de inmunización es equivalente al mostrado anteriormente y se encuentra descrito en la tabla 16.

Para evaluar la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos generados a partir de la inmunización con la toxina  $\alpha$ -LcNTX V2, se realizaron extracciones de suero en intervalos de 3 semanas. Posteriormente, se recuperó el suero total y se evaluó su capacidad de reconocimiento hacia la toxina  $\alpha$ -LcNTX V2 mediante la técnica de ELISA. Los títulos obtenidos a lo largo del esquema de inmunización con la toxina  $\alpha$ -LcNTX V2 se presentan en la figura 42.

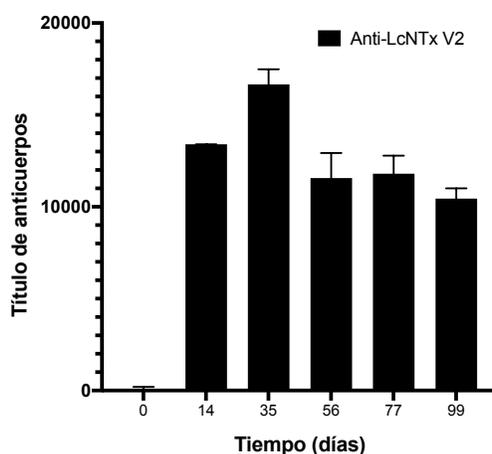


Figura 40. Títulos de los anticuerpos obtenidos por medio de la técnica de ELISA del reconocimiento de la proteína  $\alpha$ -LcNTX V2.

### 8.5 Reconocimiento de los anticuerpos anti-LcNTX V2 a venenos de elápidos por medio de técnica de ELISA

Para obtener una perspectiva sobre el reconocimiento de los anticuerpos anti-LcNTX V2 en venenos de elápidos y sus componentes ( $\alpha$ -LNTXs y 3FTXs), realizamos un análisis mediante la técnica de ELISA. Como control, utilizamos la bungarotoxina. Además, probamos el reconocimiento de los venenos de elápidos de importancia médica ya descritos. Los resultados obtenidos en estos ensayos se muestran en las figuras 43, 44 y 45.

Aunque las ilustraciones muestran claramente un reconocimiento diferencial de los anticuerpos hacia los distintos venenos evaluados, es importante destacar que los venenos con mayor reconocimiento son los de *A. antarcticus*, *A. lubricus* y *N. kaouthia* (Figura 43). Esta tendencia también se observa al hibridar con las  $\alpha$ -LNTXs, lo que sugiere que, a pesar de la eliminación del segmento correspondiente al quinto puente disulfuro, el reconocimiento de las toxinas nativas no se vio afectado de manera significativa (Figura 44). De hecho, algunos de los resultados obtenidos son comparables con los registros de reconocimiento generados con los anticuerpos producidos contra las isoformas de la toxina  $\alpha$ -LcNTX.

Por otro lado, se observó un reconocimiento notablemente bajo hacia las toxinas de tres dedos (3FTXs) en ciertos casos, lo que indica que la eliminación del segmento del quinto puente disulfuro permitió mantener un nivel de reconocimiento similar al obtenido con los anticuerpos dirigidos contra las isoformas de  $\alpha$ -LcNTX.

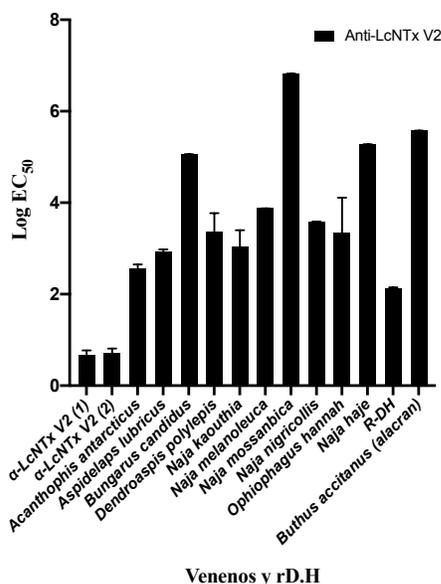


Figura 41. Representación gráfica del reconocimiento del anticuerpo anti-LcNTX V2 a venenos de elápidos de relevancia médica.

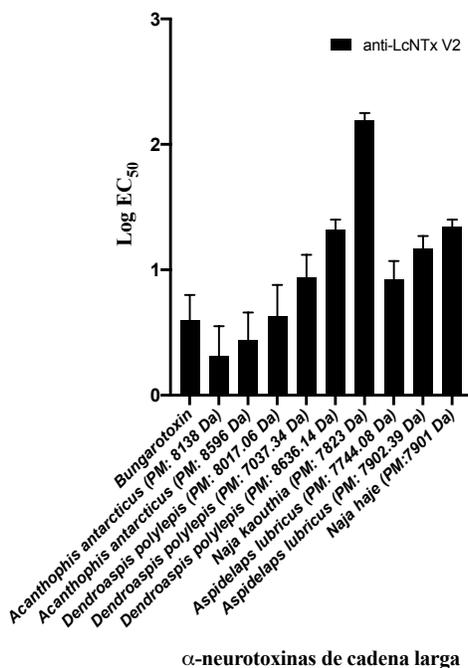


Figura 42. Representación gráfica del reconocimiento del anticuerpo anti-LcNTX V2 a  $\alpha$ -LNTX's de elápidos de importancia médica

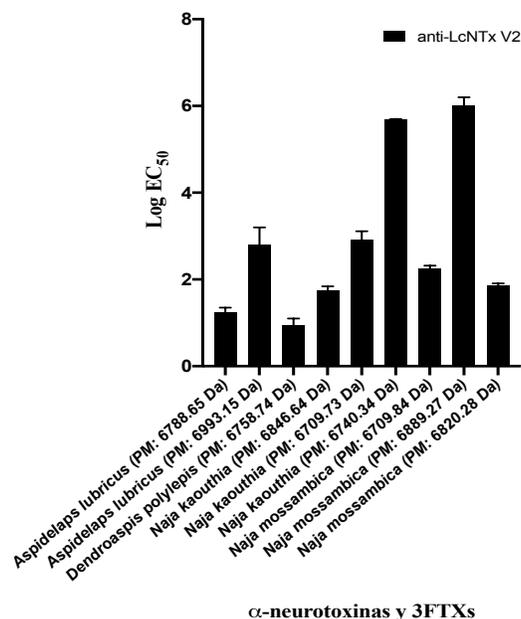


Figura 43. Representación gráfica del reconocimiento del anticuerpo anti-LcNTX V2 a toxinas de tres dedos (3FTX's) de elápidos de relevancia médica.

## 8.6 Ensayo de neutralización de la bungarotoxina utilizando los anticuerpos anti-LcNTX V1

Considerando los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA, se decidió evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-LcNTX V2 para neutralizar los efectos neurotóxicos de la toxina nativa bungarotoxina (Sigma). Los resultados de esta evaluación se presentan en la tabla 17. Lamentablemente, los datos no fueron alentadores, ya que no se observó ningún ratón sobreviviente en el ensayo de neutralización. Nuestro anticuerpo anti-LcNTX V2 no logró retrasar la muerte ni mitigar los signos de neurotoxicidad. Esto sugiere que el segmento de 5 puente disulfuro de las  $\alpha$ -LcNTX recombinantes producidas en *E. coli* es relevante al producir anticuerpos en conejos. A pesar de mantener el reconocimiento, la capacidad de neutralización de las toxinas se perdió, lo que tuvo implicaciones en la eficacia terapéutica de estos anticuerpos.

Tabla 16. Resultados obtenidos del ensayo de neutralización de la bungarotoxina utilizando los anticuerpos anti-LcNTX V2.

Veneno / Neurotoxina	DL <sub>50</sub> ( $\mu$ g/g ratón)	2DL <sub>50</sub> ( $\mu$ g/g ratón)	Sin anticuerpo <sup>b</sup> (Muerto/vivo)	Anti-LcNTx V2 <sup>a</sup> (Muerto/Vivo)
<i>A. lubricus</i>	5.8	11.5	3/0	3/0
<i>D. polylepis</i>	7.5	15	3/0	3/0
bungarotoxina <sup>b</sup>	4	8	3/0	3/0

<sup>a</sup> Los venenos de *A. lubricus* y *D. polylepis* se incubaron con 25 mg de anticuerpos anti LcNTx V2.

<sup>b</sup> El control sin anticuerpos resultó en la muerte de ratones cuando se inyectaron con 2LD<sub>50</sub> de veneno o toxina.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 $\alpha$ -LcNTX

Debido a la experiencia del laboratorio se decidió trabajar solo con la cepa de *E. coli* SHuffle que expresa la toxina  $\alpha$ -LcNTX en forma de cuerpos de inclusión. Aunque la cantidad de expresión de  $\alpha$ -LcNTX en forma soluble citoplasmática en la cepa BL-21 fue muy baja, es algo que hasta la fecha no se ha reportado en ningún trabajo. Consecuencia de eso decidimos tratar de mejorar los niveles de expresión modificando las condiciones y la cantidad de inductor en cultivo en medio LB.

Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que las cantidades de toxina no aumentaron, y se mantuvieron similares a lo observado con anterioridad. No obstante, decidimos probar las cepas de *E. coli* BL-21, Origami, SHuffle y M15 transformadas con el plásmido  $\alpha$ -LcNTX/pQE30 para la producción de la toxina en  $\alpha$ -LcNTX citoplasmática con el medio mMLB, el cual fue utilizado previamente con buenos resultados de expresión de toxina soluble tal como se demostró en el trabajo de la Rosa *et al.* (2018). En nuestro trabajo corroboramos la efectividad de este medio en la producción de alfa neurotoxinas de elápidos ya que se observó que solo la cepa *E. coli* Origami no presentó producción de toxina de forma soluble.

Posteriormente, con el fin de mejorar los rendimientos, se modificaron las condiciones de cultivo y la cantidad de inductor de las cepas BL21 y M15, sin embargo, los resultados generados fueron diversos. Primeramente, se esperaba que la cepa de *E. coli* BL21 fuera la mejor para producir toxina en forma soluble bajo las condiciones probadas, debido a los resultados mostrados en cultivos anteriores en medio rico LB, contrario a esto los resultados mostraron una disminución considerable de la expresión de la  $\alpha$ -LcNTX bajo los parámetros probados. Por otra parte, la expresión de la toxina  $\alpha$ -LcNTX soluble citoplasma de la cepa *E. coli* M15, los resultados fueron satisfactorios a 30°C durante 3 h con 0.5 mM de IPTG.

Por otro lado, en los geles de proteínas, se observa que la masa molecular aparente de la  $\alpha$ -LcNTX es mayor a 15 kDa, lo cual no coincide con su masa teórica calculada *in silico*. Este patrón de migración es característico de proteínas de elápidos y se atribuye principalmente a la composición y cantidad de aminoácidos en su secuencia. Este fenómeno ha sido previamente documentado en otras toxinas, como la  $\alpha$ -ScNTX, rDH y mLAT (Clement *et al.*, 2016; de la Rosa *et al.*, 2018).

Tomando en cuenta lo anterior, la cepa M15 fue la mejor para producir toxina en el citoplasma sin agregarse y se perfilaba momentáneamente para producir toxina en forma soluble, estos resultados contrastan con los reportes anteriores pues en ellos solo reportan la expresión de  $\alpha$ -LNTXs en cuerpos de inclusión (Lyukmanova *et al.*, 2009; Shulepko *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015). Aun así, se probó la actividad biológica de la  $\alpha$ -LcNTX soluble citoplasmática producida por la cepa BL-21 y M15. Recientemente, se reportó un trabajo en el que se obtuvieron toxinas de tres dedos de cadena corta y larga de elápidos solubles con actividad biológica (Liu *et al.*, 2021).

A diferencia del presente trabajo, su construcción plasmídica incluyó la adición de un gen accesorio que codifica para la proteína DsdC y que contribuye al plegamiento proteico en el citoplasma de *E. coli* y a la formación de los puentes disulfuro más intrincados. Con la ayuda de este gen accesorio mencionan obtener un patrón de plegamiento correcto similar al nativo de la  $\alpha$ -cobratoxina del elápidio *Naja kaouthia* en la bacteria *E. coli* Rosseta (Liu *et al.*, 2021).

Uno de los objetivos de este trabajo fue obtener la toxina  $\alpha$ -LcNTX con actividad biológica, y su expresión soluble citoplasmática en la cepa *E. coli* BL-21 y M15 con mejores características estructurales y de actividad. Sin embargo, la cantidad obtenida fue menor comparada con la producida en los cuerpos de inclusión. Además, trabajos previos en nuestro laboratorio sobre plegamiento de proteínas ricas en puentes disulfuro a partir de cuerpos de inclusión han logrado obtener proteínas recombinantes con actividad biológica por lo que decidimos trabajar con estos agregados proteicos, sin descartar la proteína en la fracción soluble (Drevet *et al.*, 1997; Lyukmanova *et al.*, 2009; Lyukmanova *et al.*, 2010; Shulepko *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015).

Las condiciones probadas en cuatro condiciones de plegamiento de la toxina  $\alpha$ -LcNTX no fueron exitosas ya que ninguna fracción cromatográfica presentó actividad biológica en ratones. En trabajos anteriores, se ha reportado diferentes agentes caotrópicos para disolver los CI, en nuestro caso particular usamos cloruro de guanidinio 6 M, y en la mayoría de los reportes utilizan urea al 1.5 M. Además, el tiempo de duración de la reacción de plegamiento utilizada por nosotros fue de 4 días, a diferencia de 7 días reportados en Xu *et al.*, 2015; Drevet *et al.*, 1997; Lyukmanova *et al.*, 2009; Lyukmanova *et al.*, 2010; Shulepko *et al.*, 2011, lo que se describe detalladamente en la tabla 18.

La gran mayoría de trabajos de expresión de las 3FTXs reportan el plegamiento de la toxina probada, y realizan pruebas de actividad *in vitro* mediante ensayos de patch-clamp mostrando su actividad biológica (Utkin *et al.*, 2001; Lyukmanova *et al.*, 2009; Lyukmanova *et al.*, 2010; Shulepko *et al.*, 2017). En nuestro caso elegimos probar las fracciones proteicas producto de los plegamientos directamente en ratones, ya que al tratarse de un consenso proteico derivado de toxinas de elápidos altamente tóxicas se esperaba alta toxicidad. Aunque no resultó.

Tabla 17. Condiciones de plegamiento para proteínas de cadena larga ( $\alpha$ -LNTX) de elápidos producidas en *E. coli*.

Proteína	Condiciones óptimas de plegamiento	Cita
$\alpha$ -bungarotoxin V31	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 75 mM Tris-HCl pH:8.62</li> <li>• 0.2 M NaCl</li> <li>• 8 M urea</li> <li>• 32 mM l-cysteine,</li> <li>• Ph: 8 durante 7 días</li> </ul>	Xu <i>et al.</i> , 2015
Lynx1 TRX	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM de Tris HCl pH 9.5</li> <li>• 1.5 M de urea</li> <li>• 0.5 M de L-arginina</li> <li>• 3 mM de GSH</li> <li>• 0.3 mM de GSSG</li> </ul>	Shulepko <i>et al.</i> , 2011
Weak” Toxin, a Disulfide Rich Protein ( <i>Naja kaouthia</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM Tris_HCl, pH 8.5</li> <li>• 1.5 M urea</li> <li>• 3 mM GSH</li> <li>• 0.3 mM GSSG</li> <li>• 3 días a 4°C.</li> </ul>	Lyukmanova <i>et al.</i> , 2009
WTX	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM Tris_HCl, pH 8.5</li> <li>• 1.5 M urea</li> <li>• 3 mM GSH</li> <li>• 0.3 GSSG</li> <li>• 3 días a 4°C</li> </ul>	Lyukmanova <i>et al.</i> , 2010
Neurotoxinas ricas en puentes disulfuro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 M de buffer de fosfatos, pH: 8</li> <li>• 5 mM de EDTA</li> <li>• 1.5 M urea</li> <li>• 0.4 GSH</li> <li>• 4 Mm GSSG</li> </ul>	Drevet <i>et al.</i> , 1997
Cytotoxin 1, <i>N. oxiana</i> , 4 PD, 60 aa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM Tris-HCl</li> <li>• 1.5 M urea</li> <li>• 0.5 ML-arginine,</li> <li>• 2 mM GSH</li> <li>• 0.2 mM GSSG durante 3 días a 4 °C</li> </ul>	Shulepko <i>et al.</i> , 2017

Se decidió explorar si dentro de los cuerpos de inclusión encontrábamos  $\alpha$ -LcNTX oxidada, es decir, bien plegada, se observaron fracciones cromatográficas definidas que corresponden a isoformas de plegamiento y la masa experimental correlacionadas con la  $\alpha$ -LcNTX oxidada.

Nos resulta interesante resaltar que bajo esta metodología logramos observar cinco isoformas de la  $\alpha$ -LcNTX, lo que contrasta directamente con los resultados obtenidos en los intentos de plegamiento *in vitro* en el que no logramos obtener fracciones cromatográficas definidas. Tomando en cuenta estos resultados decidimos inmunizar a conejos con estas isoformas. Los anticuerpos producidos con las isoformas de la  $\alpha$ -LcNTX presentaron buen reconocimiento a las  $\alpha$ -LNTX's de venenos de elápidos y la bungarotoxina, solo en algunos casos se muestran reconocimientos menores, aun así, este resultado sigue siendo novedoso.

Otra inquietud que surgió durante el transcurso del proyecto fue demostrar, sí existía reconocimiento diferencial a la familia de las 3FTXs por lo que al tener los venenos fraccionados decidimos medir el reconocimiento a esta familia proteica. Los resultados mostraron que los anticuerpos reconocieron a las 3FTXs, pero en menor grado con respecto a las  $\alpha$ -LNTXs, ya que se reconocen con mejor eficiencia a las toxinas de *A. lubricus*, *N. kaouthia* y *D. polylepis*. Un objetivo de este proyecto fue que una toxina consenso fuera capaz de generar anticuerpos y neutralizar el veneno de varios elápidos de importancia

médica. Los anticuerpos fueron capaces de reconocer los venenos de *A. antarcticus*, *A. lubricus*, *B. candidus*, *D. polylepis*, *N. kaouthia*, *N. melanoleuca*, *N. mossambica*, *N. nigricollis*, *O. hannah* y *N. haje*, aunque con diferente grado, los mejores resultados se obtuvieron con los venenos de *A. lubricus* seguido por *D. polylepis*, *O. hannah*, *N. kaouthia* y *A. antarcticus*.

Analizando los anteriores resultados, decidimos probar la neutralización del veneno de *A. lubricus*, *D. polylepis* y de la bungarotoxina, pero no se logró neutralizar a la bungarotoxina con ningún anticuerpo generado en este trabajo, aunque en contraste neutralizamos 2DL<sub>50</sub> del veneno de *A. lubricus*, *D. polylepis* con 25 mg del anticuerpo anti-LcNTX isoforma 2.

Algo interesante hasta el momento es el resultado obtenido de neutralización del veneno de *D. polylepis* ya que en el reporte de de la Rosa *et al.* (2018) no se logró neutralizar este veneno. Una explicación podría ser que la potencia o la afinidad de este veneno se encuentra en las  $\alpha$ -LNTXs y no en las  $\alpha$ -SNTXs. Al revisar el estado del arte de anticuerpos producidos con toxinas recombinantes obtenidas en *E. coli* resalta la publicación de Liu y colaboradores en el 2021, en dicho trabajo lograron neutralizar venenos del continente asiático, hasta la fecha podemos decir que nuestros anticuerpos enfocan su neutralización primordialmente en elápidos del continente africano, es prudente resaltar la idea que en nuestro caso utilizamos una única toxina y logramos neutralizar la acción del veneno completo, aun nos resta probar venenos del continente asiático y australiano y con ello avanzar en el establecimiento de un anti-veneno que abarque los tres continentes. Con nuestro trabajo se demostró que se pueden extraer toxinas de elápidos de los cuerpos de inclusión, que, aunque no presenten actividad neurotóxica pueden ser utilizados como inmunógenos y los anticuerpos resultantes logren neutralizar la acción completa del veneno de *A. lubricus* y *D. polylepis*.

El estudio del diseño de toxinas de elápidos evidencia que la incorporación de un péptido auxiliar de plegamiento, como lo propone Liu *et al.*, 2021, no es necesaria ya que, *E. coli* Origami demuestra ser adecuada para la producción de toxinas consenso funcionales de elápidos, eficientes en la generación de anticuerpos policlonales con capacidad neutralizante frente a venenos de elápidos de alta peligrosidad.

Por otro lado, capto nuestra atención que, durante el proceso de inmunización, los conejos que recibieron la isoforma 5 de  $\alpha$ -LcNTX exhibieron los títulos de anticuerpos más altos en comparación con los dos anticuerpos generados simultáneamente. Esto sugiere que esta isoforma podría ser la más efectiva en términos de reconocimiento de antígenos y neutralización. Sin embargo, la característica distintiva que se mantuvo constante fue el reconocimiento, ya que a menudo demostró una capacidad superior para identificar venenos y neurotoxinas de cadena larga.

Esto puede indicar que expone aminoácidos en su superficie que son reconocidos de manera eficiente por el sistema inmunológico, aunque no necesariamente los más adecuados para lograr valores óptimos de neutralización. Este hallazgo está respaldado por el hecho de que ambos anticuerpos lograron al menos una neutralización parcial de los venenos de elápidos africanos. Este patrón indica que la inclusión de múltiples isoformas proteicas podría ser perjudicial para este propósito, produciendo anticuerpos con eficacia reducida en la neutralización de venenos de elápidos. La efectividad de esta clase de anticuerpos necesita ser asistida por anticuerpos que neutralicen otras 3FTxs como  $\alpha$ -LNTx o incluso PLA2s de elápidos.

Nuestro enfoque de utilizar neurotoxinas consenso recombinantes ha demostrado ser efectivo, como se describe en nuestro trabajo de investigación anterior, donde los anticuerpos producidos con la asistencia de ScNTx lograron neutralizar venenos de los géneros *Micrurus*, *Naja* y *Ophiophagus* (de la Rosa *et al.*, 2018). Aunque el uso de un LcNTx de consenso como antígeno no fue tan exitoso como la ScNTx, por primera vez se señaló la importancia de seleccionar neurotoxinas con plegamientos análogos para usarlas como inmunógenos

## 9.2 $\alpha$ -LcNTX V1

Se obtuvo la expresión de la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 en la cepa bacteriana *E. coli* Origami, obteniendo altos niveles de expresión proteica en forma soluble citoplasmática. Este resultado concuerda con el trabajo realizado por Liu *et al.* (2021). Aunque a diferencia del grupo asiático nosotros no requerimos de la ayuda de una proteína accesoria para obtener la proteína  $\alpha$ -LcNTX V1 en forma soluble citoplasmática, la diferencia con respecto al método de cultivo fue la bacteria utilizada (*E. coli* Rosseta), y la temperatura de cultivo de 12°C. Sin embargo, esto contrasta con los resultados mostrados en anteriores trabajos en donde se han expresado  $\alpha$ -neurotoxinas de cadena larga favoreciendo la expresión en forma de cuerpos de inclusión (Lyukmanova *et al.*, 2009; Shulepko *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015). Este resultado es importante dado que la toxina se encuentra en forma soluble citoplasmática y no requerirá proceso de plegamiento *in vitro*.

Los anticuerpos generados en el protocolo de inmunización con la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 presentan títulos de reconocimiento bajos por el sistema inmunológico, comparados con los generados en el trabajo de de la Rosa *et al.* (2018), en donde se utilizó como inmunógeno la toxina  $\alpha$ -ScNTX, en dicho trabajo se lograron registrar títulos de reconocimiento de hasta 10,000, es decir 2 veces más a las registradas en nuestro trabajo utilizando 400  $\mu$ g de proteína recombinante. Lo que equivale a 2.5 veces menos con respecto a la cantidad de  $\alpha$ -LcNTX V1 utilizada en el protocolo de inmunización.

En conclusión, la toxina  $\alpha$ -ScNTX es más inmunogénica con respecto a la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1. Sin embargo, una de las posibles explicaciones de este fenómeno pudiera ser la diferencia que existe en cuanto a las secuencias de ambas proteínas, ya que la toxina  $\alpha$ -LcNTX V1 presenta cambios de polaridad en los aminoácidos clave en la interacción con el canal de acetilcolina y estos pueden estar involucrados en el reconocimiento del sistema inmunológico.

Posterior a la obtención de los anti-LcNTX V1, se evaluó su capacidad para reconocer a venenos completos y a toxinas nativas presentes de elápidos de importancia médica. Los datos recabados demuestran, en primera instancia el reconocimiento a la bungarotoxina, con ello demostramos el reconocimiento de epítomos presentes en  $\alpha$ -LNTXs nativas, aunque el resultado que llama la atención es el mostrado en el título de reconocimiento al veneno completo de la serpiente de la muerte australiana (*A. antarticus*). Este resultado pudiera deberse a que en dicho veneno se ha descrito a más de tres  $\alpha$ -LNTXs (Tyler *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1981), los que podría explicar esta respuesta en el ensayo de ELISA.

Los resultados de reconocimiento a venenos completos de *D. polylepis*, *N. kaouthia* y de *A. lubricus* son poco alentadores ya que títulos altos se puede correlacionar directamente con inexistencia de neutralización. Una posible explicación a los resultados observados es que debido a que las  $\alpha$ -LNTXs se encuentran en baja proporción en los venenos de los elápidos anteriormente mencionados, esto pudo generar el bajo reconocimiento evidenciado.

En cuanto a los resultados de neutralización de la bungarotoxina, estos fueron negativos. A pesar del reconocimiento observado en el ensayo de ELISA, los anticuerpos anti-LcNTX V1 no lograron retrasar la muerte ni disminuir los signos neurotóxicos inducidos por la bungarotoxina. Las posibles explicaciones de la nula neutralización y reconocimiento sobresaliente en ensayo de ELISA, pudiera deberse a los cambios de polaridad de los aminoácidos dentro de la secuencia de esta toxina (K26E, R36E, R39E, K52E). Lo que puede traducirse directamente en que el reconocimiento de los anti-LcNTX V1 no sea el ideal y el reconocimiento del anti-LcNTX V1 se de en epítomos no esenciales para bloquear actividad de la bungarotoxina, la anterior aseveración nos podría dar un panorama con respecto a la importancia de aminoácidos (K26, R36, R39, K52) en el reconocimiento  $\alpha$ -LNTXs-anticuerpo. Reforzando la anterior hipótesis, en la literatura se han probado la efectividad anticuerpos producidos a partir de  $\alpha$ -LNTX o  $\alpha$ -ScNTX recombinantes (Liu *et al.*, 2021; de la Rosa *et al.*, 2018). En ambos casos se ha probado eficientemente su reconocimiento y neutralización a venenos de elápidos de importancia médica.

Comparando nuestros resultados con los reportados en la literatura, en primera instancia no logramos encontrar un artículo que reporte la producción de un anticuerpo policlonal o monoclonal a partir de una  $\alpha$ -LNTX nativa. Debido a lo anterior ampliamos la búsqueda a la existencia de un anti-veneno que hubiese sido producido con un veneno que tuviera en su composición una cantidad considerable de  $\alpha$ -LNTXs.

Existe una publicación de Oh y colaboradores en el 2021, en el que evalúan dos anti-venenos. El primero producido en China por la empresa BMMAV (Biological Technology Co., Ltd., China) y el segundo producido en Taiwán por NBAV (Centres for Disease Control) donde realizan la combinación de los venenos de *B. multicinctus* y *N. atra*. En dichos antivenenos la respuesta al reconocimiento es diferencial. No obstante, logran reportar una  $EC_{50}$  de 1.1 con el veneno de *B. multicinctus* de china (52 % de la bungarotoxina), y de una  $EC_{50}$  de 1.1 de la *B. multicinctus* taiwanes (41.2% de la bungarotoxina). Comparando nuestros resultados en reconocimiento en ELISA, nuestro anti-LcNTX V1 están reconociendo con menor eficiencia a la bungarotoxina. esto evidencia aún más la importancia de los aminoácidos (K26, R36, R39, K52) en el reconocimiento de  $\alpha$ -LNTXs y anticuerpos neutralizantes, ya que anticuerpos producidos a partir de toxinas nativas presentan un excelente reconocimiento y buena neutralización.

### 9.3 $\alpha$ -LcNTX V2

Se probó la expresión de la  $\alpha$ -LcNTX V2 en la cepa SHuffle, y se observó que la forma de expresión favorecida es la agregada en forma de cuerpos de inclusión. Estos resultados concuerdan con los reportados anteriormente en la bibliografía en donde han expresado neurotoxinas de tres dedos en *E. coli* (Drevet *et al.*, 1997; Lyukmanova *et al.*, 2009; Lyukmanova *et al.*, 2010; Shulepko *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015). Aunque en esos trabajos la cepa predilecta para expresar estas proteínas es *E. coli* BL-21.

Teniendo en cuenta que la cantidad necesaria de requerida en un protocolo de inmunización es alta, se busca alta eficiencia en los procesos de obtención de toxinas recombinantes. Particularmente, en el caso de la  $\alpha$ -LcNTX V2 logramos obtener una  $\alpha$ -LcNTX V2 oxidada; aunque sin actividad biológica, estos mismos resultados los vimos registrados con la  $\alpha$ -LcNTX V2 encontrada en los cuerpos de inclusión, ambas tienen masas moleculares que correlacionan con la  $\alpha$ -LcNTX V2 oxidada y sin actividad neurotóxica, por lo que en este trabajo se decidió trabajar con la  $\alpha$ -LcNTX V2 oxidada encontrada en los cuerpos de inclusión. Ya que siguiendo esta metodología se requieren solo un paso de purificación por RP-HPLC. Tras la obtención de los anticuerpos anti-LcNTX V2, se evaluó su capacidad para reconocer venenos completos y toxinas nativas de elápidos de importancia médica. Los datos recabados demostraron. En primer lugar, reconocimiento a la bungarotoxina, evidenciando la capacidad para detectar epítomos presentes en las LNTX nativas.

Sin embargo, el resultado que más llama la atención es el relacionado con el reconocimiento del veneno completo de la serpiente africana *D. polylepis*, que mostró un Log EC<sub>50</sub> de 0.8. Este resultado es especialmente relevante, ya que en el veneno de esta serpiente se han descrito al menos dos  $\alpha$ -LNTX, lo que podría explicar la respuesta observada en el ensayo ELISA. La presencia de múltiples  $\alpha$ -LNTX en el veneno podría estar contribuyendo a una mayor interacción y, por lo tanto, a una mayor señal en el ensayo, subrayando la capacidad de los anticuerpos anti-LcNTX V2 para reconocer una variedad de epítomos presentes en diferentes toxinas.

En general, la respuesta del anticuerpo anti-LcNTX V2 a las  $\alpha$ -LNTX fue favorable, con los mejores resultados obtenidos en las toxinas del elárido *A. antarcticus* y, en segundo lugar, en las toxinas del veneno de *D. polylepis*. Este comportamiento es especialmente interesante, ya que sugiere una posible promiscuidad de los anticuerpos, que podrían estar reconociendo epítomos compartidos entre diferentes toxinas de la familia 3FTX. Este fenómeno se observó al monitorear individualmente al menos una toxina de esta familia, registrando valores de Log EC<sub>50</sub> de 0.94. Estos resultados resaltan la capacidad de los anticuerpos para interactuar con una variedad de toxinas dentro de los venenos de eláridos.

Sin embargo, aunque inicialmente los anticuerpos mostraron resultados prometedores en cuanto al reconocimiento, presentando valores comparables a los de la neurotoxina consenso original, esta eficacia no se mantuvo. El anticuerpo anti-LcNTX V2 no fue capaz de neutralizar ni la bungarotoxina, ni los venenos evaluados. Este resultado nos lleva a reflexionar sobre la importancia crítica de este epítomo en el reconocimiento por parte del sistema inmunológico de los conejos. Al poseer este epítomo, los anticuerpos lograron una neutralización parcial de los venenos, lo que sugiere un papel esencial en la respuesta inmune.

Es importante destacar que somos los primeros en observar esto, lo que subraya la relevancia de este segmento de aminoácidos en el reconocimiento por parte del sistema inmune de los mamíferos. Estos resultados abren nuevas perspectivas en la comprensión de la interacción entre toxinas y el sistema inmunológico, lo que podría tener implicaciones significativas para el diseño de estrategias inmunológicas más efectivas contra envenenamientos por eláridos.

Nuestro enfoque de generación de anticuerpos que reconocen a las  $\alpha$ -LNTX de diferentes eláridos provenientes de consensos proteicos no es el único que se ha abordado a la fecha. Con el fin de afrontar el problema de la alta toxicidad de las  $\alpha$ -LNTX. Existe un trabajo que aborda este tema desde la perspectiva del canal de acetilcolina, partiendo de que se conocen los aminoácidos involucrados en la interacción de las  $\alpha$ -LNTX con los canales de acetilcolina tanto neuronal como muscular. En un trabajo de este tipo, los autores se valieron de eso, y sintetizaron un péptido con solo los aminoácidos, esto es W1, R2, Y3, Y4, E5, S6, S7, L8 y Y9.

El péptido tiene una conformación secundaria tipo  $\beta$  y con ello se pretendía emular el sitio de reconocimiento del canal de acetilcolina, y así generar competencia por la unión con las  $\alpha$ -LNTX (Scherf *et al.*, 2010). De acuerdo con su resultado, dicho péptido fue capaz de interactuar con la bungarotoxina impidiendo la unión con el canal de acetilcolina muscular. En simulaciones computacionales futuras pretendemos registrar la afinidad de este péptido con las estructuras tridimensionales construidas y registrar su afinidad tanto para este péptido, así como con el canal de acetilcolina neuronal y muscular.

Hasta el momento solo se ha probado el bloqueo de la bungarotoxina (Scherf *et al.*, 2010), pero no se descarta la posibilidad que logren bloquear otras  $\alpha$ -LNTX. A diferencia de este reporte, creemos que nuestro enfoque es más contundente ya el uso de anticuerpos provenientes de consensos de toxinas es más efectivo, pues no solo ofrecen protección contra la familia proteica a la que están dirigidos, sino que logran bloquear incluso otras familias de proteínas como es el caso de los anticuerpos procedentes de  $\alpha$ -ScNTX, los cuales brindan protección en contra de  $\alpha$ -neurotoxinas de coralillos, cobras y mambas.

Existen otros enfoques que abordan la problemática de la variación intra específica de los venenos. Recientemente, se ha reportado un trabajo en que se utilizan las toxinas más letales dentro del veneno de cobras asiáticas producidas en *E. coli* Rosseta, o BL-21, en forma soluble citoplasmática y con ellas proceder a inmunizar mamíferos tomado como rango de inoculación de la proteína recombinante en cuestión de su LD<sub>50</sub>. En dicho trabajo se ha logrado obtener anticuerpos neutralizantes de venenos completos de cobras del continente asiático y africano (Liu *et al.*, 2021).

No obstante, esta metodología se enfoca únicamente en venenos de cobras a nivel de género y la utilizada en nuestro proyecto pretende abordar la problemática de variación intraespecífica de veneno a nivel de familia utilizando un consenso, el cual contempla a elápidos de 5 géneros distribuidos en 3 continentes. Con nuestra propuesta pretendemos utilizar solo una toxina en los protocolos de inmunización y poder neutralizar venenos de diferentes elápidos de importancia médica que habitan en el continente asiático, africano y australiano.

Otra metodología que ha comenzado a tomar fuerza para la obtención de anticuerpos neutralizantes de venenos de elápidos asiáticos de diferente área geográfica, y con variación intraespecífica de la composición del veneno, se basa en solo tomar en cuenta las toxinas más letales dentro de los venenos de elápidos de importancia médica del continente asiático, inocularlas en caballos y obtener anticuerpos. Con ayuda de esta metodología se ha logrado neutralizar venenos completos de cobras asiáticas, africanas y kraits (Ratanabanangkoon *et al.*, 2016). La perspectiva de este tipo de proyectos es similar a nuestro enfoque. No obstante, con nuestra propuesta estamos buscando reducir el número de toxinas utilizadas en un protocolo de inmunización, y la evidencia generada en nuestro laboratorio señala que con la utilización de una toxina ScNTX en un esquema de inmunización es suficiente para generar anticuerpos neutralizantes de venenos completos de elápidos de los géneros *Micrurus*, *Naja* y *Ophiophagus*.

## 10. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo evidencian que los tres anticuerpos derivados de las isoformas de  $\alpha$ -LcNTx reconocieron a venenos de elápidos de importancia médica en África, Asia y Australia. Destaca el hecho de que únicamente una versión de anticuerpos exhibió la capacidad de neutralizar 2LD<sub>50</sub> de dos venenos de elápidos africanos. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que el uso de proteínas consenso sintéticas de los componentes principales del veneno de elápidos podría constituir una estrategia experimental eficaz para mejorar los antivenenos. Asimismo, es pertinente señalar que este trabajo representa el uso por primera vez de una  $\alpha$ -LcNTX, y que solo una de sus isoformas demostró la capacidad de producir anticuerpos neutralizantes contra ciertas  $\alpha$ -LNTXs y venenos de elápidos asociados. No obstante, es crucial destacar como limitación la necesidad de una selección cuidadosa de la isoforma durante el proceso de inmunización, dado que no todas las isoformas exhiben la misma eficacia en la inducción de anticuerpos neutralizantes.

Con respecto a la mutante  $\alpha$ -LcNTx V1, como se anticipaba, no mostró toxicidad y sus anticuerpos resultaron ser poco eficaces en el reconocimiento de venenos de elápidos,  $\alpha$ -LNTXs y 3FTXs. Este hallazgo pone de manifiesto que las modificaciones en la secuencia de la toxina llevaron a que los anticuerpos generados con este inmunógeno no pudieran neutralizar ni los venenos ni las  $\alpha$ -LNTXs. La importancia de estos aminoácidos para el reconocimiento por el sistema inmunológico del conejo se refleja claramente en nuestros resultados. Estos datos subrayan la necesidad de ejercer cautela al realizar mutaciones en la secuencia de  $\alpha$ -LNTX recombinantes producidas en *E. coli*, ya que tales cambios pueden reducir significativamente la eficacia de los anticuerpos.

Por otro lado, la eliminación del quinto puente disulfuro en la mutante  $\alpha$ -LcNTX V2 resultó en una pérdida de actividad biológica en ratones. Sin embargo, cuando se utilizó como inmunógeno, los anticuerpos generados mostraron características interesantes, como un buen reconocimiento de venenos de elápidos y  $\alpha$ -LNTXs. Este resultado fue alentador, pero al evaluar su eficacia, los anticuerpos demostraron no ser capaces de neutralizar venenos de elápidos ni la bungarotoxina. Estos hallazgos sugieren que, aunque la proteína  $\alpha$ -LcNTX mantuvo epítomos estructurales similares a los nativos, la eliminación de este segmento específico resultó en la pérdida de capacidad para neutralizar venenos de elápidos. Esto subraya la importancia de los puentes disulfuro en la estructura y función de la  $\alpha$ -LcNTX, y proporciona una valiosa información para el diseño de futuros antivenenos y la optimización de inmunógenos.

En general, este estudio en general representa un avance significativo en la comprensión de la inmunización frente al veneno de serpiente, y abre perspectivas prometedoras para el desarrollo de antivenenos mejorados y proporciona información clave para el diseño y mejora de antivenenos y la selección de inmunógenos efectivos con potenciales aplicaciones clínicas en el tratamiento envenenamiento por elápidos.

## 11. PERSPECTIVAS

- Determinar la dosis efectiva del anticuerpo anti-LcNTX isoforma 2 para neutralizar los venenos de *A. lubricus* y *D. polylepis*, y evaluar su capacidad para neutralizar otros venenos de elápidos de importancia médica.
- Evaluar la eficacia de los anticuerpos anti-LcNTX isoforma 5 y de las combinaciones de anti-LcNTX isoformas 1, 2, 3, 4 y 5 en la neutralización de venenos de elápidos.
- Identificar los factores que influyen en la agregación de las  $\alpha$ -LcNTX y explorar si estos factores pueden ser aplicables a otras proteínas de tres dedos que tienden a formar cuerpos de inclusión.
- Escalar la producción de anticuerpos anti-LcNTX utilizando un modelo de producción equino.
- Investigar la posible sinergia entre el anticuerpo anti-LcNTX y el anti-ScNTX para mejorar la neutralización de venenos de elápidos de importancia médica.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Antil, S., Servent, D., & Ménez, A. (1999). Variability among the sites by which curaremimetic toxins bind to Torpedo acetylcholine receptor, as revealed by identification of the functional residues of  $\alpha$ -cobratoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34851-34858.
2. Antil-Delbeke, S., Gaillard, C., Tamiya, T., Corringer, P. J., Changeux, J. P., Servent, D., & Ménez, A. (2000). Molecular determinants by which a long chain toxin from snake venom interacts with the neuronal  $\alpha$ 7-nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29594-29601.
3. Albrand, J. P., Blackledge, M. J., Pascaud, F., Hollecker, M., & Marion, D. (1995). NMR and restrained molecular dynamics study of the three-dimensional solution structure of toxin FS2, a specific blocker of the L-type calcium channel, isolated from black mamba venom. *Biochemistry*, 34(17), 5923-5937.
4. Bhaskaran, R., Huang, C. C., Tsai, Y. C., Jayaraman, G., Chang, D. K., & Yu, C. (1994). Cardiotoxin II from Taiwan cobra venom, *Naja naja atra*. Structure in solution and comparison among homologous cardiotoxins. *Journal of Biological Chemistry*, 269(38), 23500-23508.
5. de la Rosa, G., Corrales-García, L. L., Rodríguez-Ruiz, X., López-Vera, E., & Corzo, G. (2018). Short-chain consensus alpha-neurotoxin: a synthetic 60-mer peptide with generic traits and enhanced immunogenic properties. *Amino acids*, 50(7), 885-895.
6. De la Rosa, G., Olvera, F., Archundia, I. G., Lomonte, B., Alagón, A., & Corzo, G. (2019). Horse immunization with short-chain consensus  $\alpha$ -neurotoxin generates antibodies against broad spectrum of elapid venomous species. *Nature communications*, 10(1), 1-8.
7. Drevet, P., Lemaire, C., Gasparini, S., Zinn-Justin, S., Lajeunesse, E., Ducancel, F., ... & Ménez, A. (1997). High-level production and isotope labeling of snake neurotoxins, disulfide-rich proteins. *Protein expression and purification*, 10(3), 293-300.
8. de Weille, J. R., Schweitz, H., Maes, P., Tartar, A., & Lazdunski, M. (1991). Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(6), 2437-2440.
9. Barber, C. M., Isbister, G. K., & Hodgson, W. C. (2013). Alpha neurotoxins. *Toxicon*, 66, 47-58.
10. Clement, H., Flores, V., la Rosa, G. D., Zamudio, F., Alagon, A., & Corzo, G. (2016). Heterologous expression, protein folding and antibody recognition of a neurotoxin from the Mexican coral snake *Micrurus laticorallus*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 22.
11. Chang, C. C. (1979). The action of snake venoms on nerve and muscle. In *Snake venoms* (pp. 309-376). Springer, Berlin, Heidelberg.
12. Chang, C. C. (1999). Looking back on the discovery of  $\alpha$ -bungarotoxin. *Journal of biomedical science*, 6(6), 368-375.
13. Eastman, J., Wilson, E. J., Cerveñansky, C., & Rosenberry, T. L. (1995). Fasciculin 2 binds to the peripheral site on acetylcholinesterase and inhibits substrate hydrolysis by slowing a step involving proton transfer during enzyme acylation. *Journal of Biological Chemistry*, 270(34), 19694-19701.
14. Fruchart-Gaillard, C., Mourier, G., Marquer, C., Stura, E., Birdsall, N. J., & Servent, D. (2008). Different interactions between MT7 toxin and the human muscarinic M1 receptor in its free and N-methylscopolamine-occupied states. *Molecular pharmacology*, 74(6), 1554-1563.

15. Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D., King, G. F & Renjifo, C. (2009). The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual review of genomics and human genetics*, 10, 483-511.
16. Grant, G. A., & Chiappinelli, V. A. (1985). . kappa.-Bungarotoxin: complete amino acid sequence of a neuronal nicotinic receptor probe. *Biochemistry*, 24(6), 1532-1537.
17. Gutierrez M, J., León, G., Lomonte, B., & Angulo, Y. (2011). Antivenoms for snakebite envenomings. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*, 10(5), 369-380.
18. Gutiérrez, J. M. (2018). Antivenoms: Life-saving drugs for envenomings by animal bites and stings. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 150, 11.
19. Hia, Y. L., Tan, K. Y., & Tan, C. H. (2020). Comparative venom proteomics of banded krait (*Bungarus fasciatus*) from five geographical locales: Correlation of venom lethality, immunoreactivity and antivenom neutralization. *Acta Tropica*, 105460.
20. Jerusalinsky, D., Kornisiuk, E., Alfaro, P., Quillfeldt, J., Alonso, M., Verde, E. R., ... & Harvey, A. (1998). Muscarinic toxin selective for m4 receptors impairs memory in the rat. *Neuroreport*, 9(7), 1407-1411.
21. Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A. R., de Silva, N., Gunawardena, N. K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R & de Silva, H. J. (2008). The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med*, 5(11), e218.
22. Karlsson, E., Jolkkonen, M., Mulugeta, E., Onali, P., & Adem, A. (2000). Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie*, 82(9-10), 793-806.
23. Kini, R. M., & Doley, R. (2010). Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon*, 56(6), 855-867.
24. Kim, H. S., & Tamiya, N. (1981). Isolation, properties and amino acid sequence of a long-chain neurotoxin, *Acanthophis antarcticus* b, from the venom of an Australian snake (the common death adder, *Acanthophis antarcticus*). *The Biochemical journal*, 193(3), 899–906.
25. Kini, R. M., & Evans, H. J. (1989). Role of cationic residues in cytolytic activity: modification of lysine residues in the cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activity. *Biochemistry*, 28(23), 9209-9215.
26. Le Du, M. H., Housset, D., Marchot, P., Bougis, P. E., Navaza, J., & Fontecilla-Camps, J. C. (1996). Structure of fasciculins 2 from green mamba snake venom: evidence for unusual loop flexibility. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 52(1), 87-92.
27. León, G., Vargas, M., Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Sánchez, A., ... & Gutiérrez, J. M. (2018). Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. *Toxicon*, 151, 63-73.
28. Laustsen, A. H., Lomonte, B., Lohse, B., Fernandez, J., & Gutiérrez, J. M. (2015). Unveiling the nature of black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom through venomomics and antivenom immunoprofiling: Identification of key toxin targets for antivenom development. *Journal of proteomics*, 119, 126-142.
29. Liu, B. S., Jiang, B. R., Hu, K. C., Liu, C. H., Hsieh, W. C., Lin, M. H., & Sung, W. C. (2021). Development of a broad-spectrum antiserum against cobra venoms using recombinant three-finger toxins. *Toxins*, 13(8), 556.
30. Oh, A. M. F., Tan, K. Y., Tan, N. H., & Tan, C. H. (2021). Proteomics and neutralization of *Bungarus multicinctus* (Many-banded Krait) venom: Intra-specific comparisons between specimens from China and Taiwan. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 247, 109063.
31. Lyukmanova, E. N., Shulepko, M. A., Shenkarev, Z. O., Dolgikh, D. A., & Kirpichnikov, M. P. (2010). In vitro production of three-finger neurotoxins from snake venoms, a disulfide rich

- proteins. Problems and their solutions. Russian journal of bioorganic chemistry, 36(2), 137-145
32. Lyukmanova, E. N., Shulepko, M. A., Tikhonov, R. V., Shenkarev, Z. O., Paramonov, A. S., Wulfson, A. N., ... & Tsetlin, V. I. (2009). Bacterial production and refolding from inclusion bodies of a “Weak” toxin, a disulfide rich protein. *Biochemistry (moscow)*, 74(10), 1142-1149.
  33. Malih, I., Tee, T. Y., Saile, R., Ghalim, N., & Othman, I. (2014). Proteomic analysis of Moroccan cobra *Naja haje* legionis venom using tandem mass spectrometry. *Journal of proteomics*, 96, 240-252.
  34. Meng, Q. X., Wang, W. Y., Lu, Q. M., Jin, Y., Wei, J. F., Zhu, S. W., & Xiong, Y. L. (2002). A novel short neurotoxin, cobrotoxin c, from monocellate cobra (*Naja kaouthia*) venom: isolation and purification, primary and secondary structure determination, and tertiary structure modeling. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 132(1), 113-121.
  35. Montecucco, C., & Rossetto, O. (2000). How do presynaptic PLA2 neurotoxins block nerve terminals? *Trends in biochemical sciences*, 25(6), 266-270.
  36. Nirathanan, S., Awal, W., & Niranjana, N. R. (2017). Snake alpha-Neurotoxins and the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Snake Venoms*, 215-252.
  37. Nirathanan, S., & Gwee, M. C. (2004). Three-finger  $\alpha$ -neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *Journal of pharmacological sciences*, 94(1), 1-17.
  38. Rajagopalan, N., Pung, Y. F., Zhu, Y. Z., Wong, P. T. H., Kumar, P. P., & Kini, R. M. (2007).  $\beta$ -Cardiotoxin: a new three-finger toxin from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom with beta-blocker activity. *The FASEB Journal*, 21(13), 3685-3695.
  39. Oh, A. M. F., Tan, C. H., Ariarane, G. C., Quraishi, N., & Tan, N. H. (2017). Venomics of *Bungarus caeruleus* (Indian krait): Comparable venom profiles, variable immunoreactivities among specimens from Sri Lanka, India and Pakistan. *Journal of proteomics*, 164, 1-18.
  40. Sánchez, G., de Oliveira Alvares, L., Oberholzer, M. V., Genro, B., Quillfeldt, J., da Costa, J. C., ... & Kornisiuk, E. (2009). M4 muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of Schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. *Journal of neuroscience research*, 87(3), 691-700.
  41. Scheske, L., Ruitenbergh, J., & Bissumbar, B. (2015). Needs and availability of snake antivenoms: relevance and application of international guidelines. *International journal of health policy and management*, 4(7), 447.
  42. Sternke, M., Tripp, K. W., & Barrick, D. (2019). Consensus sequence design as a general strategy to create hyperstable, biologically active proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(23), 11275-11284.
  43. Samson, A. O., & Levitt, M. (2008). Inhibition mechanism of the acetylcholine receptor by  $\alpha$ -neurotoxins as revealed by normal-mode dynamics. *Biochemistry*, 47(13), 4065-4070.
  44. Skejic, J., Steer, D. L., Dunstan, N., & Hodgson, W. C. (2018). Venoms of related mammal-eating species of taipans (*Oxyuranus*) and brown snakes (*Pseudonaja*) differ in composition of toxins involved in mammal poisoning. *bioRxiv*, 378141.
  45. Shan, L. L., Gao, J. F., Zhang, Y. X., Shen, S. S., He, Y., Wang, J., ... & Ji, X. (2016). Proteomic characterization and comparison of venoms from two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) from China. *Journal of proteomics*, 138, 83-94.
  46. Shulepko, M. A., Lyukmanova, E. N., Kasheverov, I. E., Dolgikh, D. A., Tsetlin, V. I., & Kirpichnikov, M. P. (2011). Bacterial expression of the water-soluble domain of lynx1, an endogenous neuromodulator of human nicotinic receptors. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 37(5), 543.
  47. Shulepko, M. A., Lyukmanova, E. N., Shenkarev, Z. O., Dubovskii, P. V., Astapova, M. V., Feofanov, A. V., ... & Dolgikh, D. A. (2017). Towards universal approach for bacterial

- production of three-finger Ly6/uPAR proteins: Case study of cytotoxin I from cobra *N. oxiana*. *Protein expression and purification*, 130, 13-20.
48. Scherf, T., Kasher, R., Balass, M., Fridkin, M., Fuchs, S., & Katchalski-Katzir, E. (2001). A  $\beta$ -hairpin structure in a 13-mer peptide that binds  $\alpha$ -bungarotoxin with high affinity and neutralizes its toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6629-6634.
  49. Silva, A., & Isbister, G. K. (2020). Current research into snake antivenoms, their mechanisms of action and applications. *Biochemical Society transactions*.
  50. Petras, D., Heiss, P., Süssmuth, R. D., & Calvete, J. J. (2015). Venom proteomics of Indonesian king cobra, *Ophiophagus hannah*: integrating top-down and bottom-up approaches. *Journal of proteome research*, 14(6), 2539-2556.
  51. Ramos-Cerrillo, B., de Roodt, A. R., Chippaux, J. P., Olguín, L., Casasola, A., Guzman, G & Stock, R. P. (2008). Characterization of a new polyvalent antivenom (Antivipmyn® Africa) against African vipers and elapids. *Toxicon*, 52(8), 881-888.
  52. Ratanabanangkoon, K., Tan, K. Y., Eursakun, S., Tan, C. H., Simsiriwong, P., Pamornsakda, T., ... & Tan, N. H. (2016). A simple and novel strategy for the production of a pan-specific antiserum against elapid snakes of Asia. *PLOS neglected tropical diseases*, 10(4), e0004565.
  53. Utkin, Y. N. (2013). Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom—milestones of discovery. *Toxicon*, 62, 50-55.
  54. Utkin, Y. N., Kukhtina, V. V., Kryukova, E. V., Chiodini, F., Bertrand, D., Methfessel, C., & Tsetlin, V. I. (2001). “Weak toxin” from *Naja kaouthia* is a nontoxic antagonist of  $\alpha 7$  and muscle-type nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 15810-15815.
  55. Unwin, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 346(4), 967-989.
  56. Tan, C. H., Tan, K. Y., & Tan, N. H. (2016). Revisiting *Notechis scutatus* venom: on shotgun proteomics and neutralization by the “bivalent” Sea Snake Antivenom. *Journal of proteomics*, 144, 33-38.
  57. Tyler, M. I., Retson-Yip, K. V., Gibson, M. K., Barnett, D., Howe, E., Stöcklin, R., ... & Mirtschin, P. (1997). Isolation and amino acid sequence of a new long-chain neurotoxin with two chromatographic isoforms (Aa el and Ae e2) from the venom of the Australian death adder (*Acanthophis antarcticus*). *Toxicon*, 35(4), 555-562.
  58. Theakston, R. D. G., & Warrell, D. A. (2000). Crisis in snake antivenom supply for Africa. *The Lancet*, 356(9247), 2104. Tsetlin, V. I., & Hucho, F. (2004). Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS letters*, 557(1-3), 9-13.
  59. Tsetlin, V., Utkin, Y., & Kasheverov, I. (2009). Polypeptide and peptide toxins, magnifying lenses for binding sites in nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical pharmacology*, 78(7), 720-731.
  60. Yap, M. K. K., Fung, S. Y., Tan, K. Y., & Tan, N. H. (2014). Proteomic characterization of venom of the medically important Southeast Asian *Naja sumatrana* (Equatorial spitting cobra). *Acta tropica*, 133, 15-25.
  61. Wongtay, P., Sangtanoo, P., Sangvanich, P., & Karnchanatat, A. (2019). Variation in the Protein Composition and Biological Activity of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venoms. *The protein journal*, 38(5), 565-575.
  62. Wong, K. Y., Tan, C. H., Tan, K. Y., Quraishi, N. H., & Tan, N. H. (2018). Elucidating the biogeographical variation of the venom of *Naja naja* (spectacled cobra) from Pakistan through a venom-decomplexing proteomic study. *Journal of proteomics*, 175, 156-173.

63. Xu, J., Li, J., Wu, X., Song, C., Lin, Y., Shen, Y., ... & Liu, Y. (2015). Expression and refolding of bioactive  $\alpha$ -bungarotoxin V31 in *E. coli*. *Protein Expression and Purification*, 110, 30-36.
64. Zouridakis, M., Giastas, P., Zarkadas, E., Chroni-Tzartou, D., Bregestovski, P., & Tzartos, S. J. (2014). Crystal structures of free and antagonist-bound states of human  $\alpha$ 9 nicotinic receptor extracellular domain. *Nature structural & molecular biology*, 21(11), 976-980.



## A consensus recombinant elapid long-chain $\alpha$ -neurotoxin and how protein folding matters for antibody recognition and neutralization of elapid venoms

Víctor Carpanta, Herlinda Clement, Iván Arenas, Gerardo Corzo\*

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 61500, Mexico

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Antibodies  
Elapid  
Folding  
Neurotoxin  
Protein expression  
Venom

### ABSTRACT

Antivenoms are essential in the treatment of the neurotoxicity caused by elapid snakebites. However, there are elapid neurotoxins, e.g., long-chain  $\alpha$ -neurotoxins (also known as long-chain three-finger toxins) that are barely neutralized by commercial elapid antivenoms; so, recombinant elapid neurotoxins could be an alternative or complements for improving antibody production against the lethal long-chain  $\alpha$ -neurotoxins from elapid venoms. This work communicates the expression of a recombinant long-chain  $\alpha$ -neurotoxin, named HisrLcNTx or rLcNTx, which based on the most lethal long-chain  $\alpha$ -neurotoxins reported, was constructed *de novo*. The gene of rLcNTx was synthesized and introduced into the expression vector pQE30, which contains a proteolytic cleavage region for excising the mature protein, and His residues in tandem for affinity purification. The cloned pQE30/rLcNTx was transfected into *Escherichia coli* Origami cells to express rLcNTx. After expression, it was found in inclusion bodies, and folded in multiple Cys-Cys structural isoforms. To observe the capability of those isoforms to generate antibodies against native long-chain  $\alpha$ -neurotoxins, groups of rabbits were immunized with different cocktails of Cys-Cys rLcNTx isoforms. *In vitro*, and *in vivo* analyses revealed that rabbit antibodies raised against different rLcNTx Cys-Cys isoforms were able to recognize pure native long-chain  $\alpha$ -neurotoxins and their elapid venoms, but they were unable to neutralize bungarotoxin, a classical long-chain  $\alpha$ -neurotoxin, and other elapid venoms. The rLcNTx Cys-Cys isoform 2 was the immunogen that produced the best neutralizing antibodies in rabbits. Yet to neutralize the elapid venoms from the black mamba *Dendroaspis polylepis*, and the coral shield cobra *Aspidelaps lubricus*, it was required to use two types of antibodies, the ones produced using rLcNTx Cys-Cys isoform 2 and antibodies produced using short-chain  $\alpha$ -neurotoxins. Expression of recombinant elapid neurotoxins as immunogens could be an alternative to improve elapid antivenoms; nevertheless, recombinant elapid neurotoxins must be well-folded to be used as immunogens for obtaining neutralizing antibodies.

### 1. Introduction

Snakebite, including elapids, is a neglected disease in less developed tropical countries [1,2], where hundreds of snakebites occur [3,4]. Today, the only useful medication against snakebites is the application of antibodies that neutralize their venoms [5]. Nevertheless, elapid envenoming has driven attention to creating alternatives for better antivenoms [6]. In antivenom production, the venoms from medically important elapids, which cause the highest morbidity are usually preferred as immunogens, and they could be single venoms or a mixture of them to create monovalent or polyvalent antivenoms, respectively [7]. Since elapid venoms contain components that are toxic and

non-toxic to mammals, they all cause humoral immune response, in immunized animals, resulting in antibodies that recognize and neutralize either toxic or non-toxic components which, from a total perspective, reduce antivenom efficacy [8].

For instance, elapid antivenom profiling has described immunodominance among three-finger toxins (3FTx) and phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) showing in many cases that most 3FTxs in the venom contain non-dominant epitopes, particularly associated with those with low molecular masses [9,10]. Consequently, some antivenoms have shown low neutralization potency against neurotoxins that are critical during envenomation [11,12]. Short- and long-chain  $\alpha$ -neurotoxins belong to the family of 3FTxs of elapid venoms and are usually poorly recognized

\* Corresponding author. Institute of Biotechnology-UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62210, Mexico.  
E-mail address: [corzo@ibt.unam.mx](mailto:corzo@ibt.unam.mx) (G. Corzo).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150420>

Received 31 May 2024; Received in revised form 10 July 2024; Accepted 16 July 2024

Available online 18 July 2024

0006-291X/© 2024 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

by current antivenoms [9,13]. Using antivenomics, it was demonstrated that the neurotoxic short- and long-chain  $\alpha$ -neurotoxins of the monocled cobra *Naja kaouthia* venom were less recognized by the commercial Vins polyvalent elapid antivenom indicating that the produced antibodies are not sufficiently effective for recognizing these types of  $\alpha$ -neurotoxins [14].

Since the short- and long-chain  $\alpha$ -neurotoxins in the venom of elapids are the most toxic components [15], they must be the main target of antibodies in commercial antivenoms. Interestingly, these two types of neurotoxins belong to families of proteins with high identity in both amino acid sequence and structure. For example, representative short-chain  $\alpha$ -neurotoxins from elapid venoms from America, Africa, and Asia share up to 85 % identity among them [16]. Also, long-chain  $\alpha$ -neurotoxins, although mostly restricted to the elapid venoms from Africa and Asia share up to 75 % identity among them. Hence, they have been created and maintained throughout the evolution of elapids for prey-paralyzing and defensive functions. As a result, they also share important immunological epitopes, which could be useful for antivenom production [17–19].

The size and content of Cys residues within the short- and long-chain  $\alpha$ -neurotoxins are used to classify them on their pharmacological properties [20]. Concerning long-chain  $\alpha$ -neurotoxins, they contain from 70 to 95 residues crisscrossed by five disulfide bridges. They block cholinergic receptors that produce paralysis of striated muscles by nullifying neuromuscular communication in the neuromuscular junction [21]. Although commercial antivenoms have specific antibodies against long-chain  $\alpha$ -neurotoxins to neutralize neurotoxicity [22], in this work, long-chain  $\alpha$ -neurotoxin sequences from different species of elapids considered by WHO as category 1 snakes of the topmost medical importance were selected to build a consensus amino acid sequence. A synthetic DNA sequence was constructed by reverse transcription from long-chain  $\alpha$ -neurotoxin multiple alignments. The consensus long-chain  $\alpha$ -neurotoxin, named rLcNTx, was expressed in *E. coli*; however, the disulfide bridge folding was not straightforward and multiple Cys-Cys structural isoforms were found. Even so, to observe the potential of those isoforms to generate antibodies, they were used to produce rabbit antisera. Anti-rLcNTx Cys-Cys isoforms recognized native long-chain  $\alpha$ -neurotoxins and whole elapid venoms.

## 2. Material and methods

### 2.1. Venoms

Crude lyophilized venoms were acquired from different sources. *Ophiophagus hannah* (923.090), *Dendroaspis polylepsis polylepsis* (218.020), *Naja kaouthia* (506.000), *Naja nigricollis* (105.030), were from Latoxan (Valence, France). *Naja melanoleuca*, *Naja mossambica*, *Naja haje*, *Aspidelaps lubricus*, *Acanthophis antarcticus*.  $\alpha$ -bungarotoxin (Sigma, USA), *Buthus occitanus* (kindly donated by Dr. Figen Caliskan from Eskisehir Osmangazi University was used as control), and rDH from *Micrurus diastema* (kindly donated by Dr. Alejandro Alagón from Instituto de Biotecnología – UNAM).

### 2.2. Primary structure alignments of long-chain- $\alpha$ -neurotoxins

Amino acid sequences of long-chain  $\alpha$ -neurotoxins were collected from the UniProt Protein knowledge database (<http://www.uniprot.org>) and the National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Only those neurotoxins with the lower LD<sub>50</sub>s were considered. So, neurotoxins from *O. hannah*, *A. antarcticus*, *B. multicaudatus*, *B. candidus*, *D. polylepsis polylepsis*, *N. haje haje*, and *N. naja* were selected. The online Jalview program executed multiple structure alignments to define a consensus amino acid sequence [23]. In those positions with amino acid discrepancies, the most abundant or those with the best immunogenicity index were selected [24].

### 2.3. rLcNTx gene construction

The protein sequence of rLcNTx, obtained from the long-chain  $\alpha$ -neurotoxin consensus, was used to synthesize oligonucleotides by reverse translation with the preferential codon usage of *E. coli*. Four overlapping designed oligonucleotides (Table S1) were synthesized based on the DNA sequence to assemble the rLcNTx gene. Additionally, a forward (LcNTx-Fw1) and a reverse (LcNTx-R3) oligonucleotides were synthesized to create restriction sites for *Bam*HI and *Pst*I, respectively. To remove the N-terminal fusion protein, a nucleotide site for Factor Xa protease (ATCGAGGGAAGG) was introduced downstream of the *Bam*HI restriction site LcNTx - Fw1 (Table S1). The rLcNTx gene was built *in vitro* by "overlapping extension" of the four oligonucleotides using the Polymerase Chain Reaction (PCR). That is, reaction one was LcNTx-Fw1 plus LcNTx-R1, reaction two was LcNTx-Fw2 plus LcNTx-R2, and reaction three was LcNTx-Fw3 plus LcNTx-R3, each pair with complementary 3' sequences (overlapping 17 and 18 nucleotides, respectively) were mixed, annealed (61 °C) and amplified by PCR using Vent-Pol, generating a mega-primer. The PCR products were separated on 1 % agarose gels with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light (New England Biolabs, Frankfurt, Germany). Afterward, the LcNTx gene was removed and purified from the agarose gel using QIAquick (QiaGen, Hilden, Germany).

An enzymatic restriction was performed with enzymes *Bam*HI and *Pst*I (New England Biolabs, Frankfurt, Germany) to verify the size of the assembled gene. The resulting DNA fragment was purified from agarose gel and inserted into the vector pQE30, previously digested with the same restriction *Bam*HI and *Pst*I enzymes. The vector containing the molecular construction (pQE30/rLcNTx) was transformed into *E. coli* XL1-Blue. Then, the transformed bacterial cells were grown under ampicillin selection. Ten colonies were chosen and tested by PCR using oligonucleotides pQE30-Fwd (GAGCGGATAACAATTATAA) and pQE30-Rev (GGTCATTACTGGATCTAT). Four colonies containing the vector and the expected size of DNA were purified and sequenced at the Instituto de Biotecnología, UNAM, Mexico.

### 2.4. rLcNTx overexpression and purification

The plasmid was constructed and named pQE30/rLcNTx. It expressed the coding sequence designated as rLcNTx, and it was introduced into chemically competent *E. coli Origami* cells through a heat shock method. The pre-culture was grown on LB agar medium complemented with ampicillin (100  $\mu$ g/mL). A colony was randomly selected to proceed with the intensive expression of the recombinant protein rLcNTx. Then, it was kept overnight at 37 °C in LB supplemented with ampicillin, and cells were deposited in a 1 L LB/amp flask and grown at the same temperature to log phase ( $A_{600} = 0.6$ ). Finally, IPTG (0.1 mM) was added to the culture and incubated at 16 °C for 12 h more. The cellular mass was extracted by centrifugation at 4000 g for 20 min, and the resulting cells were resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 8. Subsequently, the cellular suspension was lysed using a "constant cell disruption" French press at 30 kpsi. The soluble fraction and the inclusion bodies were separated again by centrifugation at 4000 g for 20 min. Once the recombinant protein fraction was identified, it was separated from the other proteins by nickel affinity columns (QiaGen, Hilden, Germany). Fractions containing the eluted rLcNTx were purified by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) (Agilent 1100 series; Agilent, Santa Clara, CA). For purification, it was used an analytic C<sub>18</sub> column (4.6  $\times$  250 mm, VYDAC®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) with a 20–60 % gradient of solutions A and B at a flow rate of 1 mL/min, running first from 20 % of solution B for 5 min and reaching 60 % in 40 min. The solution A consisted of dH<sub>2</sub>O with 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) and the solution B was acetonitrile with 0.1 % TFA. The rLcNTx identity was confirmed by Western blot and mass spectrometry.

### 2.5. Electrophoretic analysis and western blotting

SDS-PAGE analysis of the protein fractions was performed, and the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue [25]. For Western blot, the proteins from SDS-PAGE were transferred to a polyvinylidene difluoride (PVD) membrane in a semidry electroblotting system (Owl™ HEP Series, Daigger Scientific Inc., Vernon Hills, IL) for 1 h at 400 mA. The PVD membrane was incubated for 2 h at room temperature (RT) with 5 % nonfat milk in TBST (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 % Tween 20). Then, the PVD membrane was washed with TBST three times, and incubated with a horseradish peroxidase-conjugated rabbit monoclonal anti-His<sub>6</sub> antibody (1:4000) for 1 h. Membranes were again washed three times with TBST, and developed with TMB ready-to-use solution (Zymed, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

### 2.6. Molecular mass determination of rLcNTx

The molecular masses of peptides were determined on a Thermo Scientific LCQ Fleet ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) according to de la Rosa [8].

### 2.7. Secondary structure of rLcNTx isoforms

Bungarotoxin and all five rLNTx structural isoforms were evaluated by circularly polarized absorbance, from 260 to 190 nm, which was acquired from a Jasco model J-720 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan). Briefly, protein samples were dissolved in a solution of 60 % trifluoroethanol (TFE), measured in a 1-mm pathlength quartz cell, and scanned at 50 nm/min with a time constant of 0.5 s. The concentration of rLcNTx isoform, 1, 2, 3, 4, 5, and bungarotoxin was 1 g/L. The average of three separate recordings was collected and analyzed by the deconvolution software Bestsel [26]. Bungarotoxin was used as a comparative control under the same conditions. The percentages of secondary structure are shown in table S2.

### 2.8. Animals

Mice strain CD-1 (18–20 g) and New Zealand White male rabbits (3.5 kg) were provided by The Bioterium Facility of the Instituto de Biotecnología (UNAM, Mexico). Animals received water and food *ad libitum*, and they were kept under good conditions. The Animal Care and Bioethics Committee approved all experiments under the project (IT200321-411). The protocol for testing the biological activity of recombinant and venom peptides was also according to the Animal Care and Bioethics Committee of our Institute, and the ARRIVE guidelines, keeping the number of animals to a minimum.

### 2.9. Rabbit rLcNTx antisera production

Rabbits were subjected to immunization with different isoforms of rLcNTx. Two pairs of rabbits were immunized separately with either isoforms 2 or 5. A third pair of rabbits were administered with a pool of the five isoforms in equimolar amounts. All rabbits were immunized starting with 40 and finalizing with 1000 µg of rLcNTx per rabbit. The immunogen suspension consisted of 500 µL PBS plus 500 µL complete Freund's adjuvant [1]. Second, rabbits were boosted on the 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 63, 77, 91, and 105 days later with 40, 40, 80, 80, 160, 160, 320, 640, 640, 640, and 1000 µg of rLcNTx/rabbit, respectively, in incomplete Freund's adjuvant and then alternating it with aluminum hydroxide (Alum). Rabbit's pre-immune blood was obtained before the first immunization, and then at 14 days intervals.

### 2.10. Antiserum titration

Each serum sample was tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to observe the evolution of specific antibodies against the

rLcNTx or the paraspecific recognition of long-chain neurotoxins within whole crude elapid venoms. Shortly, flat bottom 96 MicroWell™ polystyrene microtiter plates (Maxisorp Nunc, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were coated with 100 µL/well of 5 µg/mL rLcNTx or whole crude venom in carbonate/bicarbonate stock solution at pH 9.5 and incubated overnight at 4 °C. After incubation, wells were washed three times with 200 µL/well of buffer containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, and pH 8 (WB). Next, 150 µL/well of blocking buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mg/mL gelatin, 0.2 % Tween 20, and pH 8) were added and incubated for 2 h at 37 °C. After the second washing cycle with WB, serum anti-rLcNTx was mixed with saline buffer (50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mg/mL gelatin, 0.05 % Tween 20, and pH 8) diluting 1:30, and placed in the first well (200 µL) and serially diluted 1:3 from wells 2 to 11, and well 12 contained just saline buffer. Plates were incubated for 1 h at 37 °C, and after washing twice with WB; plates were again incubated with 100 µL/well of peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (5 × 10<sup>-4</sup> µg/mL, Zymed, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) for 1 h at 37 °C. Once more plates were rinsed three times with WB and, finally, 100 µL/well of peroxidase was supplied with a soluble solution BM Blue POD substrate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and incubated for 10 min at RT, in darkness. At the end of the incubation, the reaction was blocked with 100 µL/well SDS 5 %. The absorbance of the plates was read at 450 nm and analyzed using Prism 6.0 (GraphPad, Inc., San Diego, CA) [27].

### 2.11. Lethal potency of bungarotoxin and venoms, and sera effectiveness

The toxicity of bungarotoxin and whole venoms was verified according to the previous LD<sub>50</sub>s reported in the literature. Briefly, mice (n = 5) were injected by either intravenous or intraperitoneal route and observed for up to 24 h, then, based on the mice mortality versus toxin or venom dose used, the LD<sub>50</sub> was verified. Bungarotoxin and whole venoms were dissolved in PBS, and the injected volume used was either 200 µL intravenously or 500 µL intraperitoneally [27,28].

The immunogenic properties of the antisera and their effectiveness were assayed using CD-1 mice. Either bungarotoxin or elapid venom (2DL<sub>50</sub>) was incubated for 30 min at 37 °C with defined concentrations of antibodies [2]. Then, the mice were injected intravenously with a final volume of 200 µL [28,29]. Animal conduct was recorded for 24 h, and values were analyzed by Kaplan-Meier analysis [30] using Prism 6.0 to plot the survival rate (GraphPad, Inc., San Diego, CA).

### 2.12. Statistics

ANOVA test, multiple comparisons test, and Tukey's test were used for the analysis of biological tests (significant p-value < 0.05). Prism 6.0 software (GraphPad Inc., San Diego, CA) was used for nonlinear regression analyses (ELISA assays) and the determination of mean values, standard deviations, coefficients of variation, and 95 % confidence intervals.

## 3. Results

### 3.1. Consensus sequence and rLcNTx recombinant expression

Nine long-chain α-neurotoxins were selected from the venom of elapids *Ophiophagus hannah*, *Acanthophis antarcticus*, *Bungarus multicinctus*, *Bungarus candidus*, *Dendroaspis polylepsis polylepsis*, *Naja haje haje*, and *N. naja*. The size of such neurotoxins was from 79 to 95 amino acid residues and their lethality (LD<sub>50</sub>) was from 0.05 to 51 mg/kg mouse, determined by different administration routes. A sixty-six amino acid consensus sequence with seven undetermined residues was proposed. For each not-determined residue, we selected an equivalent amino acid for the following reasons: 1) the more recurrent, 2) the one with similar chemical properties, or 3) the one with the greatest immunogenicity. Thus, the undefined residues of LcNTx were complete with Thr5, Asn8,

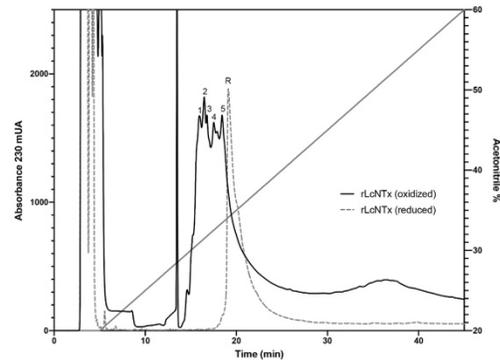
Val9, Gln12, Leu22, Asg39, Lys50, and Lys 64. Therefore, the mature LcNTx primary structure enclosed 66 amino acids including 10 cysteines plus 6 negatively and 10 positively charged residues (Table 1).

Furthermore, besides the mature consensus sequence of the recombinant protein, named rLcNTx, its N-terminus contained sixteen extra residues (MRGSHHHHHHSIEGR), that integrate the restriction site *Bam*HI, a His-Tag region and the proteolytic cleavage site (FXa), resulting in 82 amino acids, such as MRSGHHHHHHHSIEGRII-

CYTTNPVPIQSQTCPGENLYCTKWDAFCSSRGKRVELG-CAATCPKVKPGVEIKCCSTDKCN. After that, the synthetic oligonucleotides, LcNTx-Fw1, LcNTx-R1, LcNTx-Fw2, LcNTx-R2, LcNTx-Fw3 and LcNTx-R3 (Table S1), were assembled by oligonucleotide overlapping extension. The synthesized gene rLcNTx was then cloned to obtain the plasmid pQE30/rLcNTx, which was confirmed by DNA sequencing. One of the transformed colonies was randomly selected to conduct expression experiments. Recombinant rLcNTx overexpression was tested in 1 L of LB under the culture conditions described in *Material and Methods*. After the induction period, bacterial cells were collected by centrifugation, and disrupted by a French press. The recombinant protein was expressed mainly as protein aggregates, namely inclusion bodies. The inclusion bodies were dissolved in a chaotropic agent (GndHCl), and the dissolved proteins were subjected to a two-step purification: Ni-NTA affinity column chromatography and RP-HPLC (Fig. 1).

The HPLC chromatographic profile was obtained, revealing five different structural isoforms of rLcNTx because all five fractions had the experimental molecular mass of 9006.3 Da. These five fractions were loaded onto an SDS-PAGE gel (15 % SDS-glycine), as shown in Fig. 2A. Through Western blot analysis, the histidine tag at the N-terminal end was identified (Fig. 2B), confirming the expression of at least five isoforms of rLcNTx.

The fractions having the same molecular mass are explained by the formation of structural isoforms; that is, they were generated during protein oxidation forming different disulfide bridge connectivity, and the different elution times could be explained because of the differences in the exposition of hydrophobic and hydrophilic residues on the protein surfaces caused for such variation in Cys-Cys pairs. This result urged us



**Fig. 1.** RP-HPLC purification of the recombinant rLcNTx. A pool of Ni-NTA protein eluates was separated by RP-HPLC. An analytical  $C_{18}$  column was used under a gradient from 20 to 60 % aqueous acetonitrile containing 0.1 % TFA for 45 min at a flow rate of 1 mL/min.

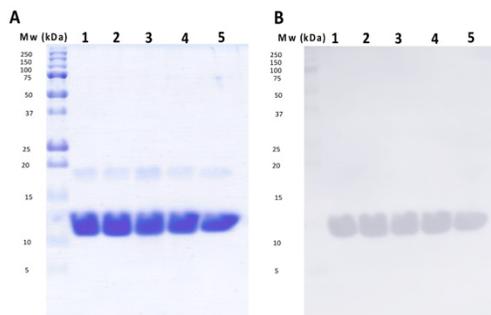
to reduce chemically the disulfide pairings of such five fractions to prove that they come from a single protein identity. The overlapped HPLC chromatogram in Fig. 1 (dotted lines) shows the result after the chemical reduction of the five structural isoform fractions using dithiothreitol (DTT). So, the reduced isoforms were lessened to a single protein form with a molecular mass of 9016.3 Da. To be exact, 10 Da more than the Cys-Cys oxidized molecular mass because of the reduction of the five disulfide bonds. So, it was confirmed that rLcNTx was folded in at least five structural isoforms inside the *E. coli* cell or during the extraction procedure. The reduced rLcNTx was folded *in vitro* conditions using different pair redox and buffers; however, after purification, a similar HPLC profile with mainly the five oxidized structural isoforms was obtained, and none of the Cys-Cys isoforms were toxic to mice neither by intravenous (100  $\mu$ g/20 g mouse) nor intracranial injection (30  $\mu$ g/20 g mouse).

**Table 1**  
Multiple sequence alignment of long-chain  $\alpha$ -neurotoxins.

Toxin	Amino acid sequence <sup>a</sup>	Mw (Da)	Identity (%)	LD <sub>50</sub> <sup>b</sup> (mg/kg)	ID
LNTX-1	LICYMGPK—TPRTCPRGQNLCTYTKTWCDAFCSRGKRVELGCAATCPKIASYEDVTCSTDCNDNCNPFPG- RPRP—————HP	8050.3	69.84	0.51 (IV)	Q2VBP8
EPTX-Aa2b	VICYRGIN—NPQTCPPGENVCFTRTWCDAFCSRGKRVELGCAATCPVKSYNEVKCCSTDKCNPFPG- RPRR—————PP	8125.4	76.19	0.13 (IM)	P01385
EPTX-Aa2e	VICYVGIN—NPQTCPPGGNVCFTRTWCDARHQLGKRVMGCAATCPKVNRRGVDIKCCSTDKCNPFPG T- TPPWKRPRGK	8751.2	71.43	0.05 (IP)	PODKW9
BTXA31	IVCHITATSPISAVTCCPPGENLYCRKMWCDAFCSRGKRVELGCAATCPKPKYEEVTCSTDCNDNPHPK Q- R—————PG	7984.2	74.24	0.3 (SC)	P60615
AlphaN3	IVCHITATSPISAVTCCPPGENLYCRK-MCDAICSSRGKRVELGCAATCPKPKYEEVTCSTDCNDNPHPK Q- R—————PG	7777.0	70.77	0.6 (IV)	P85140
Dpp2b	RTCNKTFSD-QSKICPPGENICYTKTWCDAWCSRRKRVELGCAATCPKVKAGVIRKCCSTDCNDNLFKF G- K—————PR	7929.3	69.84	0.4 (SC)	P25667
Dpp2a	RTCNKTFSD-QSKICPPGENICYTKTWCDAWCSRRKRVELGCAATCPKVKAGVEIKCCSTDDCDKQF G- K—————PR	8033.2	71.43	0.12 (SC)	P01396
CM-5	IRCFITPDV—TSQACPDG-HVCYTKMWCDNFCMRGKRVLDGCAATCPVKGVDIKCCSTDCNDNCPFPPT R- K—————RS	7811.1	69.84	0.11 (IV)	P25674
Neurotoxin A	TKCYVTPDV-KSETCPAGQDICYTETWCDAWCTSRGKRVLDGCAATCPVKGVEIKCCSTDCNDNCPFPPTWR- K—————RP	8096.3	73.44	0.15 (SC)	P25668
Consensus aa	IICY+TP++PI+SQTCPPGEN+CYTKTWCDAFCSRRGK+VELGCAATCP+VKPGVEIKCCSTD+CNPFPG- RPRK—————PP	—	—	—	—
LcNTx	IICYTTPNPVPIQSQTCPGENLYCTKWDAFCSSRGKRVELGCAATCPKVKPGVEIKCCSTDKCN	7152.3	100	—	—

<sup>a</sup> The nine selected toxins were aligned to obtain a consensus sequence: amino acid gaps are represented by a dash, and cysteine residues are shown in red. Long neurotoxin LNTX1 from *O. hannali*, EPTX-Aa2b, and EPTX-Aa2e from *A. antarcticus*, BTXA31 from *B. multicaudatus*, AlphaN3 from *B. candidus*, Dpp2b and Dpp2a from *D. polyplepis polyplepis*, CM-5 from *N. haje haje*, Neurotoxin A from *N. naja*. The amino acid sequence of LcNTx shows both consensus and rationalized immunogenic residues used.

<sup>b</sup> LD<sub>50</sub> are in mg/kg mouse; IM stands for intramuscular, IV for intravenous, SC for subcutaneous, and IP for intraperitoneal injection.

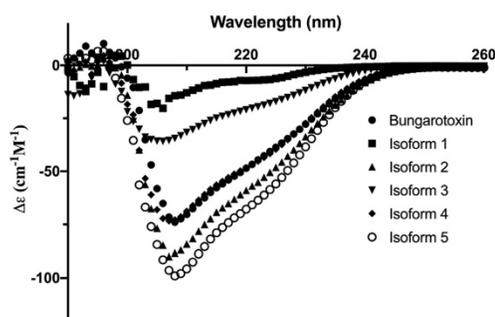


**Fig. 2.** SDS-PAGE and Western blot of rLcNTx isoforms. Illustrates the isoforms of the rLcNTx obtained through a two-step purification process involving Ni-NTA and RP-HPLC. The purification targeted the recombinant rLcNTx present in the insoluble fraction, specifically in inclusion bodies. SDS-PAGE (A) and Western blot (B) of the five protein fractions from RP-HPLC. Lane Mw represents protein markers, and lanes 1 to 5 correspond to protein fraction isoforms 1, 2, 3, 4, and 5, respectively.

### 3.2. Secondary structure

To observe the secondary structure of these five Cys-Cys isoforms, they were tested for their content of alpha and beta structures. The results showed similar minimum absorption (208–210 nm) of the circularly polarized light compared to bungarotoxin, a classical elapid long-chain  $\alpha$ -neurotoxin (Fig. 3). Here to be noted, a concentration of TFE up to 60 % was used to improve hydrogen bonding; so, the percentage of secondary structures may differ from other elapid long-chain  $\alpha$ -neurotoxins that have been tested using different solvents. To compare the secondary structure of the Cys-Cys isoforms, the absorbance data was deconvoluted using the software Bestsel [26]. The percentages of alpha and beta secondary structures of the five Cys-Cys isoforms and bungarotoxin are shown in Supplementary Table S2. Overall, the observed CD spectra indirectly confirmed analogous folding to that of the classical long-chain  $\alpha$ -bungarotoxin. All six peptides presented a similarly large proportion of  $\alpha$ -helices, and low amounts of beta-antiparallel secondary structures (Supplementary Table S2).

Based on the alpha and beta structures of the rLcNTx isoforms, fractions 2 and 5 were selected to conduct immunization of rabbits. Such selection was based on their similar percentages of alpha and beta structures to that found for bungarotoxin. Also, fractions 2 and 5 were the most prominent and abundant fractions among all five Cys-Cys isoforms; therefore, they were re-purified to observe if these two Cys-



**Fig. 3.** Circular dichroism spectra of bungarotoxin and the Cys-Cys isoforms.

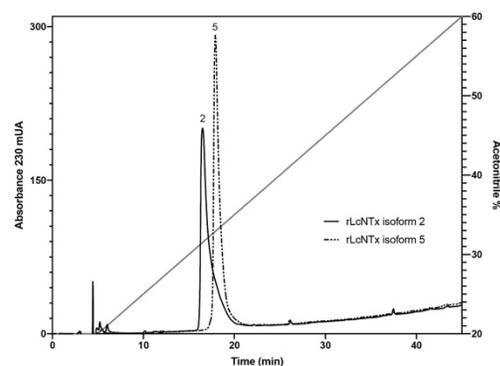
Cys isoforms were immunogenic and able to generate antibodies to neutralize elapid venoms (Fig. 4).

As observed, fractions 2 and 5 have the second largest difference in elution times, so they were relatively easy to isolate, although some few amounts of the other isoforms may be included in such fractions (Fig. 4). Also, a pool of all Cys-Cys isoforms (fractions 1 to 5, named multiple isoforms) was used to test their capacity to raise recognizing and neutralizing antibodies in rabbits against long-chain  $\alpha$ -neurotoxins.

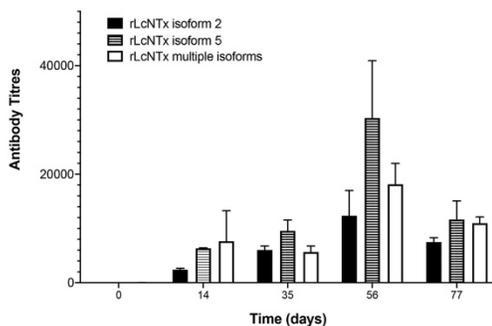
### 3.3. Cys-Cys rLcNTx isoforms as immunogens and antibody effectiveness

All fractions of the Cys-Cys rLcNTx isoforms (2, 5, and the pool of the multiple isoforms) were immunogenic when inoculated in rabbits. The three groups of rabbits immunized with increasing concentrations of Cys-Cys rLcNTx isoforms, 2, 5, and multiple isoforms, produced antibodies that recognized themselves (Fig. 5). The antibody progression during the immunization (14, 35, 56, and 77 days) was monitored by serum titration, and antibody titers increased up to the 56th day to decrease comparable to the 35th day of immunization. All Cys-Cys rLcNTx isoforms were immunogenic in rabbits (Fig. 5).

After immunization, rabbits were sacrificed and bled, and the serum from each group was collected. Then, the antibodies were separated from plasma by caprylic acid (5 %) precipitation and freeze-dried. IgG solutions (50 mg/mL) were prepared and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Then, the capability to recognize the recombinant Cys-Cys isoforms, native elapid long-chain  $\alpha$ -neurotoxins, and whole elapid venoms was tested (Fig. 6). The concentration of the antibodies (mg/mL) required to bind half of the neurotoxins ( $\text{IC}_{50}$ ) was calculated. The  $\text{IC}_{50}$  values against the recombinant rLcNTx Cys-Cys isoforms were the lowest suggesting common epitopes among them (Fig. 6A). To observe the recognition of native elapid neurotoxin fractions from representative elapid venoms, several venoms were fractionated and selected protein fractions were used for this purpose (Supplementary Figs. S1–S8). The results showed that antibodies against isoforms 2, 5 and the pool of isoforms had comparable recognition against neurotoxin fractions with molecular masses in the range of that of the long-chain  $\alpha$ -neurotoxins from bungarotoxin (7984 Da), *Acanthopis antarticus* (8138 and 8596 Da), *Aspidelaps lubricus* (7744 and 7902.3 Da) and *Naja haje* (7901 Da) (Fig. 6A). Yet, the antibodies from isoform 2 had slightly better  $\text{IC}_{50}$  values than those of isoform 5 and the pool of isoforms (Table 2). Comparing the recognition of these antibodies towards the elapid venoms, the venoms from *Aspidelaps lubricus*, *Dendroaspis polylepsis* and *Ophiophagus hannah* were the best recognized, with  $\text{IC}_{50}$  values of 54.2, 29.6 and 44.0 mg/mL



**Fig. 4.** RP-HPLC purification of the recombinant rLcNTx isoform 2 and 5. An analytical  $\text{C}_{18}$  column was used under a gradient from 20 to 60 % aqueous acetonitrile containing 0.1 % TFA for 45 min at a flow rate of 1 mL/min.



**Fig. 5.** Evolution of rabbit antibodies against rLcNTx isoforms. Titers were obtained by ELISA assays ( $n = 3$ ) using rabbit sera. Titers obtained for isoform 2, (Rabbits 1 and 2); Titers obtained for isoform 5 (Rabbits 3 and 4). Titers obtained for the pool of isoforms 1, 2, 3, 4, and 5 (Rabbits 5 and 6).

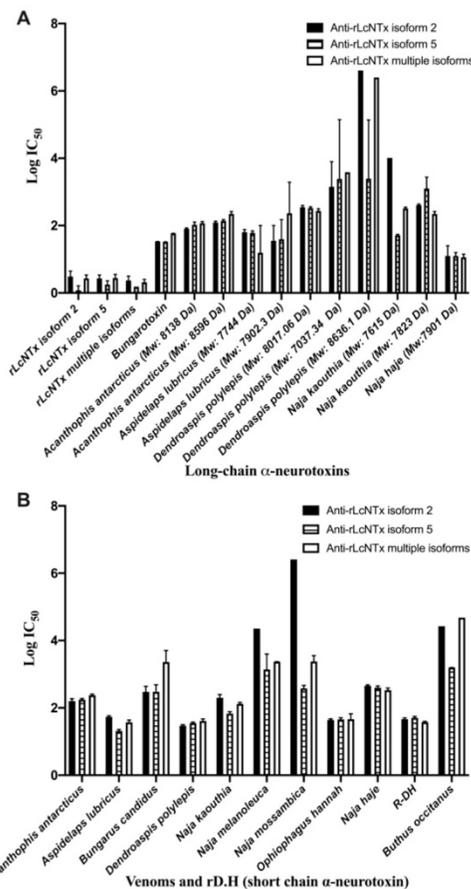
for antibodies of the isoform 2, 20.7, 35.5 and 45.6 mg/mL for antibodies of the isoform 5, and 37.3, 40.9 and 46.3 mg/mL for antibodies of the multiple isoforms, respectively (Fig. 6B and Table 2). In contrast, the venom of an unrelated species *Buthus occitanus* (scorpion venom), used as a negative control, had  $IC_{50}$  values  $> 500$  mg/mL (Table 2).

On the other hand, the elapid venoms of *B. candidus*, *N. melanoleuca*, *N. mossambica*, and *N. nigricollis* were poorly recognized by the anti-rLcNTxs (Table 2). Since, the titers exemplify the concentration of antibodies ( $IC_{50}$  in mg/mL) to identify epitopes in these long-chain  $\alpha$ -neurotoxins related to rLcNTx (for the anti-rLcNTx), or epitopes in the family of the three-finger toxins such as ScNTxs, a short-chain  $\alpha$ -neurotoxins from an American elapid, rD.H, was used also as a control for such rabbits' antibodies.

The three types of anti-rLcNTx antibodies 2, 5, and multiple isoforms recognized the short-chain  $\alpha$ -neurotoxin with  $IC_{50}$  values of 46.3, 50.9, and 37.5 mg/mL, respectively (Table 2). Although ELISA values do not predict the neutralization of either  $\alpha$ -neurotoxins or venoms, interesting statements could be inferred from such information. For example, the long-chain  $\alpha$ -neurotoxins related to rLcNTx from *A. antarcticus*, Alpha-elapitoxin-Aa2b and Alpha-elapitoxin-Aa2e, seem to be well recognized, as well as the long-chain  $\alpha$ -neurotoxins and CM-5 from *A. lubricus* and *N. haje*, respectively (Table 2). However, the selected fractions from *D. Polylepis*, including the Alpha-elapitoxin-Dpp2a (8017.0 Da), were poorly recognized, and two of them seem to be dendrotoxins I (7037.3 Da) and K (8636.1 Da), which their amino acid sequence is quite different to the long-chain  $\alpha$ -neurotoxins (Table 3).

Since antibody recognition had lower  $IC_{50}$  values for the venoms of *A. lubricus* and *D. polylepis*, whose lethality is driven by long-chain  $\alpha$ -neurotoxins, and some of its LNTxs (*A. lubricus*, 7745.0 and 7902.3 Da; *D. polylepis*, 8017.0 Da) were well recognized, they were tested for neutralization using the rabbit anti-rLcNTxs (Table 4).

Unfortunately, the anti-rLcNTx isoforms did not neutralize  $2LD_{50}$  of bungarotoxin up to 25 mg/20 g of mouse; however, anti-rLcNTx antibodies delayed the mortality of mice (Supplementary Fig. S9). Yet, the anti-rLcNTx from recombinant isoform 5 and the pool of the multiple isoforms hardly neutralized  $2LD_{50}$  of *D. polylepis* venom, but they could not neutralize  $2LD_{50}$  of *A. lubricus* venom. Nevertheless, the anti-rLcNTx from immunized rabbits with the recombinant isoform 2 was the most effective compared to the other two anti-rLcNTxs (Table 4). Since these two venoms, *Aspidelaps lubricus* and *Dendroaspis polylepis*, also contain significant amounts of short-chain  $\alpha$ -neurotoxins, a blend of antibodies, anti-rScNTx (raised against a recombinant short-chain  $\alpha$ -neurotoxin, see de la Rosa et al., 2018) and anti-rLcNTx isoform 2, was employed to neutralize such elapid venoms. The mixture of these two types of



**Fig. 6.** Graphic representation of the recognition of anti-rLcNTx isoforms to toxins and venoms of medical importance. A) Long-chain  $\alpha$ -neurotoxins and dendrotoxins from *A. antarcticus*, *D. polylepis*, *N. kaouthia*, *A. lubricus*, *N. haje*. B) Elapid venoms from *A. antarcticus*, *A. lubricus*, *B. candidus*, *D. polylepis*, *N. kaouthia*, *N. melanoleuca*, *N. mossambica*, *N. nigricollis*, *O. hannah*, *N. haje*, rD.H (short chain  $\alpha$ -neurotoxin) and *B. occitanus* (scorpion venom).

antibodies in a ratio of 1:1 and 4:1 of anti-rLcNTx isoform 2: anti-rScNTx, respectively, neutralized  $2LD_{50}$  of the venoms of *D. polylepis* and *A. lubricus*, respectively (Table 5).

This result backs up our previous observation for the neutralization of elapid venoms, expressing that upon antibody combination a better neutralization could occur [31,40]. Also, an increase in the survival time of mice was observed with the use of anti-rLcNTx isoform 2 (Supplementary Fig. 9).

#### 4. Discussion

Long-chain neurotoxins are typically found in low proportions in most elapid venoms [41]. This limitation has encouraged the investigation of strategies for their production via heterologous protein expression using *E. coli* [41–43]. However, a significant challenge with

**Table 2**  
IC<sub>50</sub>s of venoms and toxins.

Venom/Toxin	Anti-rLcNTx isoform 2 <sup>a</sup>			Anti-rLcNTx isoform 5 <sup>b</sup>			Anti-rLcNTx multiple isoforms <sup>a</sup>		
	IC <sub>50</sub>	CI	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>	CI	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>	CI	R <sup>2</sup>
rLcNTx isoform 2	3.1	1.9–4.5	0.96	1.2	0.8–1.6	0.96	2.7	2–3.4	0.97
rLcNTx isoform 5	2.7	2.1–3.4	0.99	1.7	1.2–2.3	0.99	2.7	2–3.6	0.99
rLcNTx multiple isoforms	2.3	1.4–3.7	0.93	1.5	0.5–1.6	0.83	2.1	1.4–2.9	0.96
Bungarotoxin (7984.2 Da)	33.5	30.8–36.5	0.99	32.7	30.2–35.4	0.99	58.9	55.4–62.7	0.99
<i>A. antarcticus</i> (8183.6 Da)	79.7	73.4–86.8	0.99	106	90.5–125.9	0.99	118.7	105.7–134.5	0.99
<i>A. antarcticus</i> (8596.0 Da)	122.9	110.6–137.2	0.99	139.1	125.8–154.4	0.99	228.1	198.6–267.1	0.99
<i>A. lubricus</i> (7745.0 Da)	64.2	54.3–75.9	0.99	60.7	53–69.5	0.99	82.9	66.9–101.6	0.98
<i>A. lubricus</i> (7902.3 Da)	35.4	10.1–106.3	0.81	39.3	4.1–153.5	0.57	235.1	106.6–195.1	0.85
<i>D. polylepis</i> (8017.0 Da)	354.2	300.7–431.9	0.99	337.7	310.9–370.1	0.99	279.9	217.4–389.5	0.97
<i>D. polylepis</i> (7037.3 Da)	1433	810.5–9678	0.94	2496	1148–140167	0.99	3895	ND	0.94
<i>D. polylepis</i> (8636.1 Da)	>500	ND	0.94	>500	ND	0.94	>500	ND	0.94
<i>N. kaouthia</i> (7615.5 Da)	>500	ND	0.97	51.4	47.3–55.8	0.99	323.8	294.7–358.7	0.99
<i>N. kaouthia</i> (7823.1 Da)	405.2	375.5–440.8	0.99	>500	ND	0.94	225.4	186.9–265.5	0.98
<i>N. haje</i> (7884.9 Da)	9.3	6.2–13.4	0.96	12.8	9.5–16.8	0.98	11.6	9.3–14.3	0.98
<i>A. antarcticus</i>	160	139.5–186.4	0.99	175.1	162.7–189.2	0.99	237.8	220.6–257.7	0.99
<i>A. lubricus</i>	54.2	50.3–58.4	0.99	20.7	18.9–22.7	0.99	37.3	31.9–43.5	0.99
<i>B. candidus</i>	296.9	225.6–435.9	0.99	300.3	216.7–486.2	0.99	>500	ND	0.94
<i>D. polylepis</i>	29.6	27.5–31.8	0.99	35.5	33.5–37.6	0.99	40.9	35.7–47	0.99
<i>N. kaouthia</i>	199.3	165.4–248.2	0.99	67.6	60–76.5	0.99	131.3	119.2–145.4	0.99
<i>N. melanoleuca</i>	>500	ND	0.94	>500	880.2–3969	0.94	>500	ND	0.94
<i>N. mossambica</i>	>500	ND	0.94	379.6	321.8–465.9	0.99	>500	ND	0.94
<i>N. nigricollis</i>	>500	ND	0.94	427.3	362.2–525.7	0.99	>500	ND	0.94
<i>O. hannah</i>	44.02	40.8–47.4	0.99	45.6	41–50.6	0.99	46.3	31.8–66.5	0.96
<i>N. haje</i>	451.4	424.0–483.3	0.99	398.8	360.4–447.4	0.99	334.1	292.4–389.7	0.99
rD.H (short chain α-ntx)	46.3	42.5–50.4	0.99	50.9	46.7–55.6	0.99	37.5	35.4–39.7	0.99
<i>B. occitanus</i> (scorpion)	>500	ND	0.98	>500	ND	0.86	>500	ND	0.77

ND – not determined by the model used.

**Table 3**  
Some of the used toxins and their correlation with known LNTxs and dendrotoxins in the elapid venoms tested.

Venom	Experimental molecular mass (Da)	Closest reported molecular mass (Da)	Toxin name	ID
<i>A. antarcticus</i>	8183.6	8125.4	Alpha-elapitoxin-Aa2b	P01385
	8596.0	8751.2	Alpha-elapitoxin-Aa2e	P0DKW9
<i>D. polylepis</i>	8017.0	8033.2	Alpha-elapitoxin-Dpp2a	P01396
	7037.3	7145.3	Dendrotoxin I	P00979
<i>N. kaouthia</i>	8636.1	8841.5	Dendrotoxin K	P00981
	7615.5	NF	NF	NF
	7823.1	7821.1	Alpha-cobratoxin	P01391
<i>A. lubricus</i>	7745.0	7447.6	Long neurotoxin 1	P25670
	7902.3	7447.6	Long neurotoxin 1	P25670
<i>N. haje</i>	7884.9	7811.1	CM 5	P25674

NF – no found.

**Table 4**  
Neutralization assays of α-bungarotoxin and *Aspidelaps lubricus* and *Dendroaspis polylepis* venoms using anti-rLcNTx isoform antibodies.

Venom/neurotoxin	DL <sub>50</sub> (μg/20 g mouse)	2DL <sub>50</sub> (μg/20 g mouse)	No antibody <sup>b</sup> (Dead/Alive)	Anti-rLcNTx isoform 2 <sup>a</sup> (Dead/Alive)	Anti-rLcNTx isoform 5 <sup>a</sup> (Dead/Alive)	Anti-rLcNTx multiple isoform <sup>a</sup> (Dead/Alive)
<i>A. lubricus</i>	5.8	11.5	3/0	1/2	3/0	3/0
<i>D. polylepis</i>	7.5	15	3/0	1/2	2/1	1/2
α-bungarotoxin <sup>b</sup>	4	8	3/0	3/0	3/0	3/0

<sup>a</sup> *A. lubricus* (intravenously), *D. polylepis* (intraperitoneally) venoms, and α-bungarotoxin (intraperitoneally) were incubated with 25 mg of anti-rLcNTx isoform antibodies [29,34,38, 39].<sup>b</sup> Control without antibody resulted in the death of mice when injected with 2LD<sub>50</sub> of venom or toxin.

this approach is the tendency of these rich-cysteine peptides to aggregate within inclusion bodies. Achieving functional rich-cysteine neurotoxins has necessitated the application of *in vitro* folding methodologies [41–44], which have demonstrated limitations in terms of yield. Given

**Table 5**  
Neutralization assays of *Aspidelaps lubricus* and *Dendroaspis polylepis* venoms using a blend of anti-rLcNTx isoform 2 and anti-rScNTx antibodies.

Venom/neurotoxin <sup>a</sup>	DL <sub>50</sub> (μg/20 g mice)	2DL <sub>50</sub> (μg/20 g mice)	No antibody <sup>b</sup> (Dead/Alive)	Anti-rLcNTx isoform 2 <sup>a</sup> /anti-rScNTx <sup>a</sup> (Dead/Alive)	Anti-rLcNTx isoform 2 <sup>a</sup> /anti-rScNTx <sup>a</sup> (Dead/Alive)
<i>A. lubricus</i>	5.8	11.5	3/0	3/0	0/3
<i>D. polylepis</i>	7.5	15	3/0	0/3	ND

<sup>a</sup> *A. lubricus* (intravenously) and *D. polylepis* (intraperitoneally) venoms were incubated with 12.5 mg of anti-rLcNTx isoform 2 and 12.5 mg of anti-rScNTx (1:1) or 20 mg of anti-rLcNTx isoform 2 and 5 mg of anti-rScNTx antibodies (4:1).<sup>b</sup> Control without antibody resulted in the death of mice when injected with 2LD<sub>50</sub> of venom.

these challenges, our study focused on the expression of the recombinant rLcNTx, which unfortunately was predominantly found in multiple Cys-Cys isoforms in inclusion bodies. Although alternative bacterial strains were explored to produce soluble and active rLcNTx, the results proved unsatisfactory. Nevertheless, *Escherichia coli* has proven to be highly efficient as a heterologous expression system for elapid 3FTxs. In BL-21 (DE3) cells, successful expression has been achieved of cytotoxin 1 from *Naja kaouthia* [32] and neurotoxin II from *Naja oxiana* [33]. Specifically, only two recombinant LNTxs have been obtained; that is,  $\alpha$ -bungarotoxin V31 from *Bungarus multicinctus* [34] and  $\alpha$ -cobratoxin from *Naja naja siamensis* [35,36]. Although, a recombinant  $\alpha$ -cobratoxin, from *Naja kaouthia*, with neurotoxic activity has been expressed as soluble in the bacterial cytoplasm [37], it has been also refolded using glutathione as a pair redox [35,36], and in the case of  $\alpha$ -bungarotoxin V31 from *B. multicinctus*, L-cysteine was used [34]; however, in such reports, not account of the yield of such recombinant toxins after *in vitro* folding was informed [34–36]. As demonstrated in earlier reports, some elapid 3FTxs tend to aggregate in inclusion bodies, leading to the application of *in vitro* folding methodologies. In this work, the recombinant rLcNTx was found only in inclusion bodies. An option to produce a soluble active rLcNTx was the use of different bacterial strains for the expression of this neurotoxin; however, the results were unsatisfactory. Previously, we have used an *E. coli Origami* strain, which had been proven to be effective for obtaining a soluble short  $\alpha$ -neurotoxin, named rScNTx [8]. Unlike that work, here the expression of rLcNTx was not soluble, and it was found dissolvable from inclusion bodies where after extraction and purification at least five chromatographic protein fractions were obtained. Upon mass spectrometry analysis, the five fractions revealed molecular masses that correspond to the expected oxidized rLcNTx; so, they could be considered structural isoforms of rLcNTx, since all of them after Cys-Cys reduction conveyed into a single protein fraction with an increase of 10 Da in their molecular mass. The Cys-Cys structural isoforms absorbed the circularly polarized light likewise to that of the native bungarotoxin, but with lower or higher intensity probably because of the different angular positions of amino acids in such Cys-Cys structural forms. Despite their lack of biological activities, the isoforms 2 and 5 were selected to generate antibodies in rabbits, and also a pool of all Cys-Cys isoforms was chosen for this purpose; so, three types of antibodies were raised against Cys-Cys isoforms 2, 5, and a pool of them, which presented distinctive  $IC_{50}$  values towards recognition of long-chain  $\alpha$ -neurotoxins and elapid venoms. The recognition of the long-chain  $\alpha$ -neurotoxins by the anti-rLcNTx antibodies further confirmed the presence of LNTxs in the elapid venoms with immunological and structural similarities to the consensus rLcNTxs. All three types of antibodies exhibited avid recognition of the venoms from *A. antarcticus*, *A. lubricus*, *D. polylepsis*, and *O. hannah*. Conversely, their recognition was less pronounced towards neurotoxins from *B. candidus*, *N. melanoleuca*, *N. mossambica*, and *N. nigricollis* possibly due to the absence or low abundance of long-chain  $\alpha$ -neurotoxins in these elapid species [45–47]. For *A. antarcticus*, *N. kaouthia*, and *N. haje*, the correspondence between neurotoxin detection and neutralization was not evident, probably because of the exposure of other 3FTxs with modest or no role in venom lethality. Even though the venom of *O. hannah* was detected by antibodies from all rLcNTx isoforms, this may be because the epitope recognition of non-toxic three-finger toxins is immunochemically and structural like toxic neurotoxins present in elapid venoms. Another opinion is that antibodies recognized the most abundant epitopes, but they were related to toxicity and did not affect their neutralization. On the other hand, the neutralization results are significant in that it was achieved the neutralization of  $2LD_{50}$  of two medically important African elapid venoms, both of which contain long- and short-chain  $\alpha$ -neurotoxins in their composition. It is of particular interest due to observations made with bungarotoxin, which was unable to be neutralized. This lack of neutralization could be attributed to various factors, including folding and sequence changes between rLcNTx and bungarotoxin, which only share a 74.2 % identity (Table 1).

Our research highlights the critical importance of selecting the protein isoform in an immunization protocol when producing neutralizing antibodies from recombinant, or even, synthetic immunogens. It was evident that the neutralization efficiency of anti-rLcNTx isoform 2 was significantly superior when dealing with two medically relevant African elapid venoms. However, we emphasize that the effect of the venom was evident, as the mice exhibited few signs of envenomation during the trial. Nevertheless, after 48 h, the survivors were recovered entirely. In contrast, the anti-rLcNTx with multiple isoforms only manages to partially neutralize the venom of *Dendroaspis polylepsis*. Notably, throughout the immunization process, rabbits receiving LcNTx isoform 5 exhibited the highest antibody titers compared to the other two types of antibodies generated simultaneously. This suggests that this isoform could be the most effective in terms of epitope recognition but neutralization. Yet, the distinctive feature that remained consistent was recognition, as it often demonstrated a superior ability to identify venoms, long-chain  $\alpha$ -neurotoxins, and recombinant immunogens [48]. This may indicate that it exposes amino acids on its surface that are efficiently recognized by the immune system, although not necessarily the most suitable for achieving optimal neutralization values [49]. This finding is supported by the fact that both types of antibodies, anti-rLcNTx isoforms 2 and 5, could achieve at least partial neutralization of African elapid venoms. Moreover, the inclusion of multiple protein Cys-Cys isoforms as immunogens could be detrimental for this purpose, yielding antibodies with reduced efficacy in neutralizing elapid venoms. The effectiveness of this class of neutralizing antibodies needs to be assisted for antibodies that neutralize other 3FTxs such as short-chain consensus  $\alpha$ -neurotoxin or even elapid PLA<sub>2</sub>s.

The proof of concept that utilizing recombinant  $\alpha$ -neurotoxins has proven effective, as described in our previous research work, where antibodies produced with the assistance of rScNTx managed to neutralize venoms from the genera *Micrurus*, *Naja*, and *Ophiophagus* (de la Rosa, 2018). Although the benefit of a consensus rLcNTx as an immunogen was not as successful as the previous rScNTx, for the first time, it was pointed out the importance of selecting well-folded neurotoxins for use as immunogens.

## 5. Conclusions

The three antibodies derived from the isoforms of rLcNTx recognized venoms of medically significant elapids from Africa, Asia, and Australia. It is noteworthy that only one of these types of antibodies exhibits the ability to neutralize  $2LD_{50}$  of two African elapid venoms. These findings support the hypothesis that the implementation of synthetic consensus proteins from main elapid venom components could be an effective experimental strategy for improving commercial antivenoms. Also, it is worth highlighting that this communication reports the creation of a consensus long-chain  $\alpha$ -neurotoxin for the first time, from which one of its possible Cys-Cys structural isoforms could produce effective neutralizing antibodies against elapid venoms. As a drawback, it is imperative to underscore that the judicious selection of an isoform in the immunization protocol is crucial, as not all isoforms demonstrate equal efficacy in inducing neutralizing antibodies. In summary, this work constitutes a significant advance in understanding immunization against snake venoms and opens promising prospects for the development of enhanced experimental antivenoms, with potential clinical applications in the treatment of elapid envenomation. The neutralization potency by the combination of two types of antibodies against elapid venoms was described. In other words, a blend of antibodies that distinguish LNTxs (anti-rLcNTx) and SNTxs (anti-rScNTx) improves the neutralization towards elapid venoms. This is the first report that communicates the use of a blend of antibodies, obtained by immunization with recombinant short- and long-chain  $\alpha$ -neurotoxins, to neutralize the venom of elapids. These types of immunogens could be used to enrich poor or non-neutralizing antisera to improve their efficacy and to improve their neutralizing capacity.

### CRedit authorship contribution statement

**Víctor Carpanta:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Herlinda Clement:** Supervision, Methodology, Formal analysis, Data curation. **Iván Arenas:** Validation, Supervision, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Gerardo Corzo:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Resources, Investigation, Funding acquisition, Data curation, Conceptualization.

### Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgments

We acknowledge Dr. Paul Gaytán, M.C. Eugenio López-Bustos and Q. I. Santiago Becerra from Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN, and Dr. Fernando Zamudio for the mass spectrometry determination at Instituto de Biotecnología. We also acknowledge Mr. Ricardo Mondragon and BSc. Felipe Olvera for assisting in antibody purification. We are also grateful to Oswaldo López, Sergio González, BSc. Graciela Cabeza, and DVM Elizabeth Mata from the Institute Animal House for helping with the experimental animal, and Kenia Lisceth Garcia Barrera and Miguel Angel Mejia Sánchez for the technical support. This work received funding from the DGAPA-UNAM grant number IT200724, and from CONAHCYT-PRONAH grant number 303045. VC is a PhD student from “Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas” at UNAM and received a fellowship CVU: 738206 from CONAHCYT.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2024.150420>.

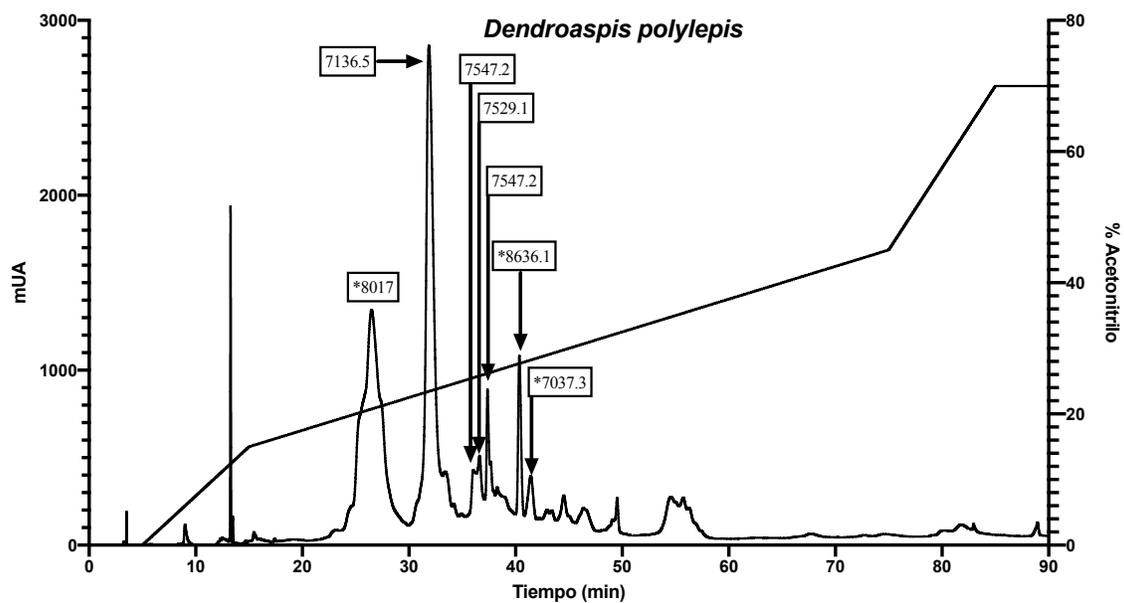
### References

- B. Avau, V. Borra, P. Vandekerckhove, E. De Buck, The treatment of snake bites in a first aid setting: a systematic review, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 10 (2016) e0005079, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005079>.
- J.-P. Chippaux, Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: a meta-analytic approach, *Toxicon* 57 (2011) 586–599, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.12.022>.
- A. Kasturiratne, A.R. Wickremasinghe, N. De Silva, N.K. Gunawardena, A. Pathmeswaran, R. Premaratna, L. Savioli, D.G. Lalloo, H.J. De Silva, The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths, *PLoS Med.* 5 (2008) 1591–1604, <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>.
- D.A. Groneberg, V. Geier, D. Klingelhöfer, A. Gerber, U. Kuch, B. Kloft, Snakebite envenoming – a combined density equalizing mapping and scientometric analysis of the publication history, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 10 (2016) e0005046, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005046>.
- L. Scheske, J. Ruitenbergh, B. Bissumbhar, Needs and availability of snake antivenoms: relevance and application of international guidelines, *Int. J. Health Pol. Manag.* 4 (2015) 447–457, <https://doi.org/10.15171/ijhpm.2015.75>.
- D.J. Williams, J.M. Gutiérrez, J.J. Calvete, W. Wüster, K. Ratanabanangkoon, O. Paiva, N.I. Brown, N.R. Casewell, R.A. Harrison, P.D. Rowley, M. O’Shea, S. D. Jensen, K.D. Winkel, D.A. Warrell, Ending the drought: new strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa, *J. Proteomics* 74 (2011) 1735–1767, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.027>.
- J.M. Gutiérrez, G. Leon, B. I. Y. Angulo, Antivenoms for snakebite envenomings, *Inflamm. Allergy - Drug Targets* 10 (2011) 369–380, <https://doi.org/10.2174/187152811797200669>.
- G. de la Rosa, L.L. Corrales-García, X. Rodríguez Ruiz, E. López-Vera, G. Corzo, Short-chain consensus alpha-neurotoxin: a synthetic 60-mer peptide with generic traits and enhanced immunogenic properties, *Amino Acids* 50 (2018) 885–895, <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2556-0>.
- P. Sunthornandh, P. Matangkasombut, K. Ratanabanangkoon, Preparation, characterization and immunogenicity of various polymers and conjugates of elapid postsynaptic neurotoxins, *Mol. Immunol.* 29 (1992) 501–510.
- S. Sriprapat, S. Aeksowan, S. Sapsuthipras, C. Chotwiwathanakun, P. Suttitjipaisal, R. Pratanaphon, O. Khow, V. Sitpraja, K. Ratanabanangkoon, The impact of a low dose, low volume, multi-site immunization on the production of therapeutic antivenoms in Thailand, *Toxicon* 41 (2003) 57–64, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00209-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00209-X).
- J.J. Calvete, Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology, *Toxicon* 75 (2013) 44–62, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.020>.
- J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, G. León, A. Alape-Girón, M. Flores-Díaz, L. Sanz, Y. Angulo, J.J. Calvete, Snake venomomics and antivenomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming, *J. Proteomics* 72 (2009) 165–182, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.008>.
- G. Richard, A.J. Meyers, M.D. McLean, M. Arbabi-Ghahroudi, R. MacKenzie, J. C. Hall, In vivo neutralization of ??Cobratoxin with high-affinity llama single-domain antibodies (VHHs) and a VHH-Fc antibody, *PLoS One* 8 (2013) 1–14, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069495>.
- A. Deka, A. Gogoi, D. Das, J. Purkayastha, R. Doley, Proteomics of Naja kaouthia venom from North East India and assessment of Indian polyvalent antivenom by third generation antivenomics, *J. Proteomics* 207 (2019), <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103463>.
- H. Sewall, Experiments on the preventive inoculation of rattlesnake venom, *J. Physiol.* 8 (1887) 203–210.
- G. de la Rosa, F. Olvera, L.G. Archundia, B. Lomonte, A. Alagón, G. Corzo, Horse immunization with short chain consensus  $\alpha$ -neurotoxin generates antibodies against broad spectrum of elapid venomous species, *Nat. Commun.* 10 (2019), <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11639-2>.
- A. Kozminsky-Atias, N. Zilberberg, Molding the business end of neurotoxins by diversifying evolution, *Faseb. J.* 26 (2012) 576–586, <https://doi.org/10.1096/fj.11-187179>.
- A. Ricciardi, M.-H.L. Du, M. Khayati, F. Dajas, J.-C. Boulain, A. Ménez, F. Ducancel, Do structural deviations between toxins adopting the same fold reflect functional differences? *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18302–18310, <https://doi.org/10.1074/jbc.275.24.18302>.
- T.A. Reeks, B.G. Fry, P.F. Alewood, Privileged frameworks from snake venom, *Cell. Mol. Life Sci.* 72 (2015) 1939–1958, <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1844-z>.
- C.M. Barber, G.K. Isbister, W.C. Hodgson, Alpha neurotoxins, *Toxicon* 66 (2013) 47–58, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.019>.
- U.K. Ranawaka, D.G. Lalloo, H.J. de Silva, Neurotoxicity in snakebite: the limits of our knowledge, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 7 (2013), <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002302>.
- A. Silva, W. Hodgson, G. Isbister, Cross-neutralisation of in vitro neurotoxicity of Asian and Australian snake neurotoxins and venoms by different antivenoms, *Toxins* 8 (2016) 302, <https://doi.org/10.3390/toxins8100302>.
- A.M. Waterhouse, J.B. Procter, D.M.A. Martin, M. Clamp, G.J. Barton, Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench, *Bioinformatics* 25 (2009) 1189–1191, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.
- A.S. Kolaskar, P.C. Tongaonkar, A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens, *FEBS Lett.* 276 (1–2) (1990 Dec 10) 172–174, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80535-q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80535-q). PMID: 1702393.
- U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (5259) (1970 Aug 15) 680–685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>. PMID: 5432063.
- A. Miconai, F. Wien, E. Bulyáki, J. Kum, É. Moussong, Y.H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) W315–W322, <https://doi.org/10.1093/nar/gky497>.
- H. Vázquez, F. Olvera, J. Paniagua Solís, A. Alagón, C. Sevcik, Pharmacokinetics in rabbits and anti-splinyngonelysinase D neutralizing power of Fab, F(ab)<sub>2</sub>, IgG and IgG(T) fragments from hyper immune equine plasma, *Int. Immunopharmacol.* 10 (2010) 447–454, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.01.005>.
- World Health Organization Annex 5, Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 964, WHO Tech Rep Ser., 2017, pp. 197–388.
- F.O. Ochola, M.O. Okumu, J.K. Gikunju, J.M. Mbaria, G.M. Muchemi, J.G. Nderitu, Neutralization of the lethality of the venom of *Dendroaspis polylepis* (black mamba) in mice by two polyvalent antivenoms used in Kenyan hospitals: results of a 2009–2011 study, *Sci Afr* 5 (2019), <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00118>.
- E.L. Kaplan, P. Meier, Nonparametric estimation from incomplete observations, *J. Am. Stat. Assoc.* 53 (1958) 457–481, <https://doi.org/10.2307/2281868>.
- J. Li, H. Zhang, J. Liu, K. Xu, Novel genes encoding six kinds of three-finger toxins in *Ophiophagus hannah* (king cobra) and function characterization of two recombinant long chain neurotoxins, *Biochem. J.* 398 (2006) 233–242, <https://doi.org/10.1042/BJ20060004>.
- M.L. Tyler, K.V. Retson-Yip, M.K. Gibson, D. Barnett, E. Howe, R. Stöcklin, R. K. Turnbull, T. Kachel, P. Mirtschin, Isolation and amino acid sequence of a new long-chain neurotoxin with two chromatographic isoforms (Aa el and Ae e2) from the venom of the Australian death adder (*Acanthophis antarcticus*), *Toxicon* 35 (1997) 555–562, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00159-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00159-6).
- H.S. Kim, N. Tamiya, Isolation, properties and amino acid sequence of a long-chain neurotoxin, *Acanthophis antarcticus* b, from the venom of an Australian snake (the common death adder, *Acanthophis antarcticus*), *Biochem. J.* 193 (1981) 899–906, <https://doi.org/10.1042/bj1930899>.
- B. Lin, J.R. Zhang, H.J. Lu, L. Zhao, J. Chen, H.F. Zhang, X.S. Wei, L.Y. Zhang, X. B. Wu, W.H. Lee, Immunoreactivity and neutralization study of Chinese bungarus multicinctus antivenin and lab-prepared anti-bungarotoxin antisera towards purified bungarotoxins and snake venoms, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 14 (2020) 1–19, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008873>.

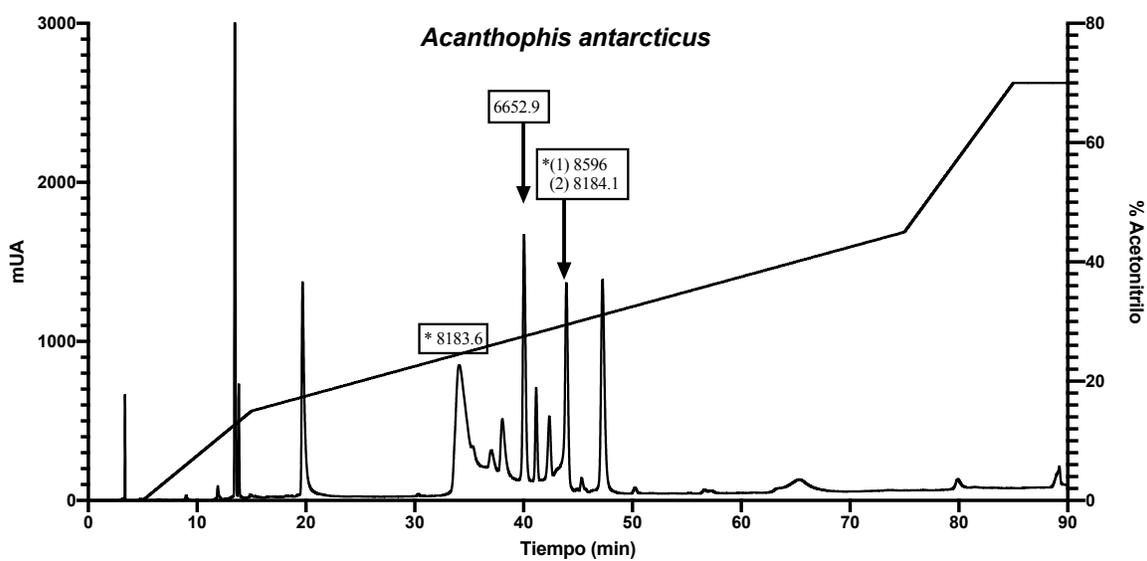
- [35] S.A. Karsani, I. Othman, Isolation, complete amino acid sequence and characterization of a previously unreported post-synaptic neurotoxin - AlphaN3, from the venom of *Bungarus candidus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389 (2009) 343–348, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.145>.
- [36] D.J. Strydom, Snake venom toxins, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 4029–4042, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45135-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45135-1).
- [37] F. Joubert, N. Taljaard, Purification, some properties and the primary structures of three reduced and S-carboxymethylated toxins (CM-5, CM-6 and CM-10a) from Naja haje haje (egyptian cobra) venom, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct.* 537 (1978) 1–8, [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(78\)90597-4](https://doi.org/10.1016/0005-2795(78)90597-4).
- [38] K. Nakai, T. Sasaki, K. Hayashi, Amino acid sequence of toxin a from the venom of the Indian cobra (*Naja naja*), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44 (1971) 893–897, [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(71\)90795-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(71)90795-9).
- [39] G. Whiteley, N.R. Casewell, D. Pla, S. Quesada-Bernat, R.A.E. Logan, F.M.S. Bolton, S.C. Wagstaff, J.M. Gutiérrez, J.J. Calvete, R.A. Harrison, Defining the pathogenic threat of envenoming by South African shield-nosed and coral snakes (genus *Aspidelaps*), and revealing the likely efficacy of available antivenom, *J. Proteomics* 198 (2019) 186–198, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.019>.
- [40] L.G. Archundia, G. de la Rosa, F. Olvera, A. Calderón, M. Benard Valle, A. Alagón, G. Corzo, Assessment of neutralization of *Micrurus* venoms with a blend of anti-*Micrurus tener* and anti-*ScNtx* antibodies, *Vaccine* 39 (2021) 1000–1006, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.12.052>.
- [41] S. Antil-Delbeke, C. Gaillard, T. Tamiya, P.J. Corring, J.P. Changeux, D. Servent, A. Ménez, Molecular determinants by which a long chain toxin from snake venom interacts with the neuronal  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 29594–29601, <https://doi.org/10.1074/jbc.M909746199>.
- [42] D. Servent, S. Antil-Delbeke, C. Gaillard, P.-J. Corring, J.P. Changeux, A. Ménez, Molecular characterization of the specificity of interactions of various neurotoxins on two distinct nicotinic acetylcholine receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 393 (2000) 197–204, [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00095-9).
- [43] J. Xu, J. Li, X. Wu, C. Song, Y. Lin, Y. Shen, W. Ye, C. Sun, X. Wang, Z. Li, Y. Liu, L. Wei, Z. Li, Z. Xu, Expression and refolding of bioactive  $\alpha$ -bungarotoxin V31 in *E. coli*, *Protein Expr. Purif.* 110 (2015) 30–36, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.12.016>.
- [44] S. Antil, D. Servent, A. Ménez, Variability among the sites by which curare-mimetic toxins bind to Torpedo acetylcholine receptor, as revealed by identification of the functional residues of  $\alpha$ -cobratoxin, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 34851–34858, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34851>.
- [45] O. Katali, L. Shippingana, P. Nyaragó, M. Pääkkönen, E. Haindongo, T. Rennie, P. James, J. Eriksson, C.J. Hunter, Protein identification of venoms of the African spitting cobras, *naja mossambica* and *naja nigricincta nigricincta*, *Toxins* 12 (2020), <https://doi.org/10.3390/toxins12080520>.
- [46] F.A. Adamude, E.J. Dingwoke, M.S. Abubakar, S. Ibrahim, G. Mohamed, A. Klein, A.B. Sallau, Proteomic analysis of three medically important Nigerian *Naja* (*Naja haje*, *Naja katiensis* and *Naja nigricollis*) snake venoms, *Toxicon* 197 (2021) 24–32, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.03.014>.
- [47] C.R. Wang, A.C. Harlington, M.F. Snel, T.L. Pukala, Characterisation of the forest cobra (*Naja melanoleuca*) venom using a multifaceted mass spectrometric based approach, *Biochim. Biophys. Acta Protein Proteomics* 1872 (2024) 140992, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2023.140992>.
- [48] H. Clement, V. Flores, G. De la Rosa, F. Zamudio, A. Alagon, G. Corzo, Heterologous expression, protein folding and antibody recognition of a neurotoxin from the Mexican coral snake *Micrurus laticorallus*, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 22 (2016), <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0080-9>.
- [49] Y.W. Chan, C.H. Tan, C.H. Heh, K.Y. Tan, An immunoinformatic approach to assessing the immunogenic capacity of alpha-neurotoxins in elapid snake venoms, *Front. Pharmacol.* 14 (2023), <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1143437>.

## 10. ANEXOS

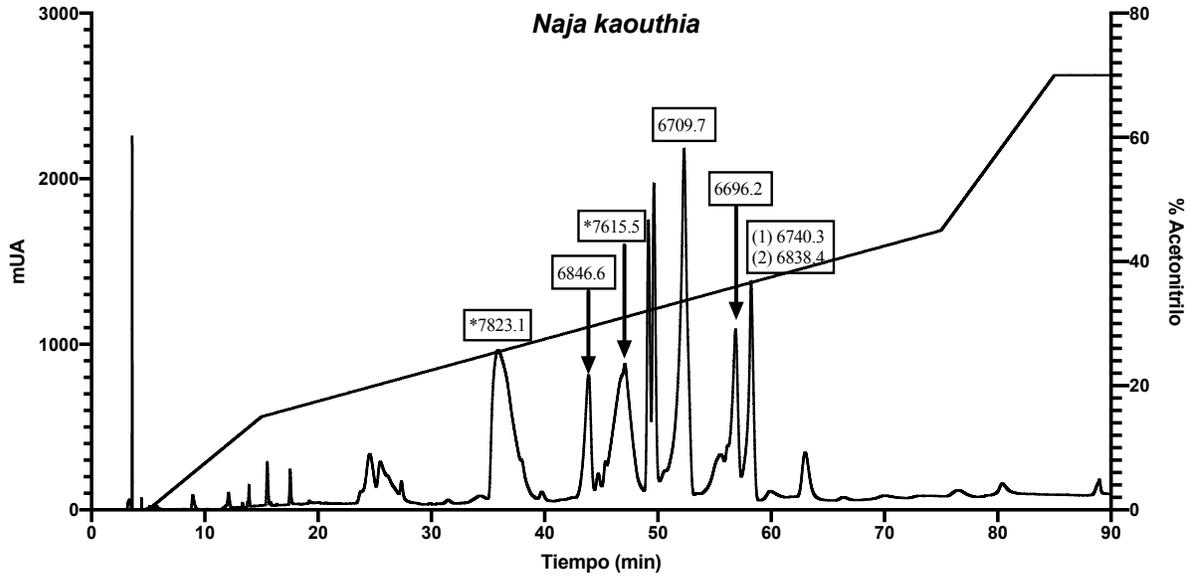
### a) Cromatogramas de la purificación de los venenos



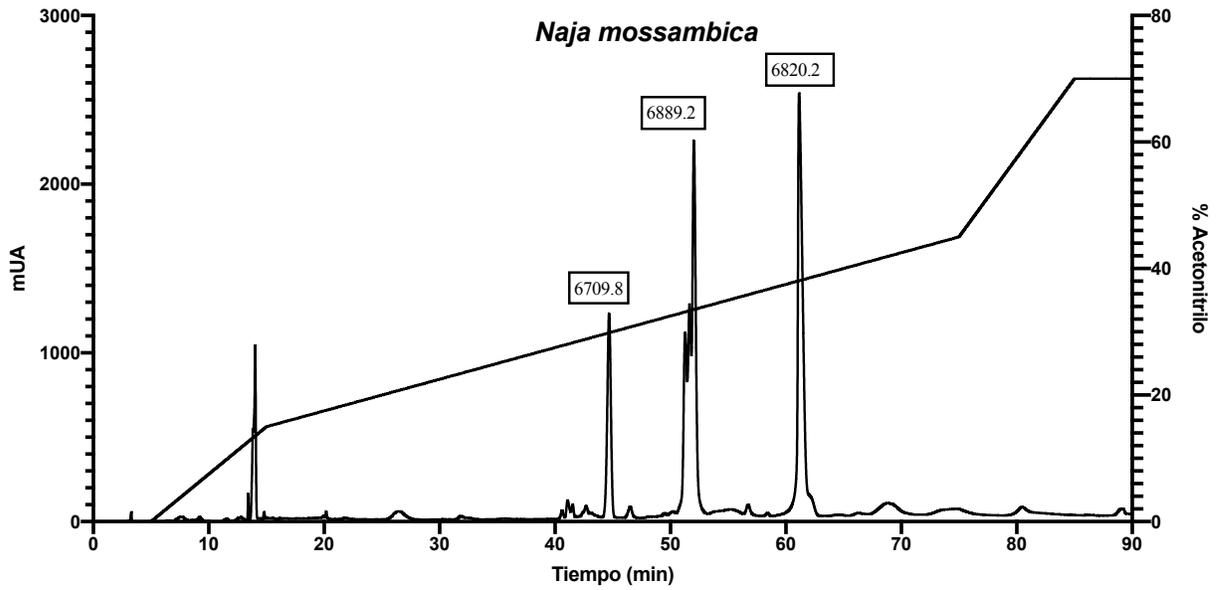
A1) HPLC del veneno de *Dendroaspis polylepis*



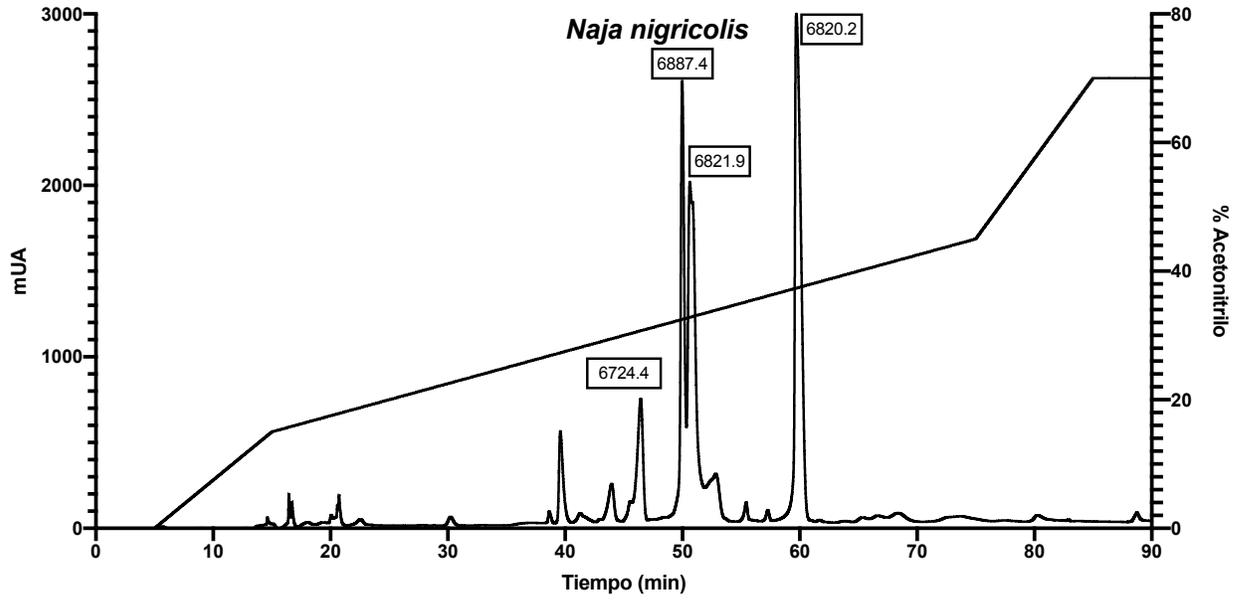
A2) HPLC del veneno de *Acanthophis antarcticus*



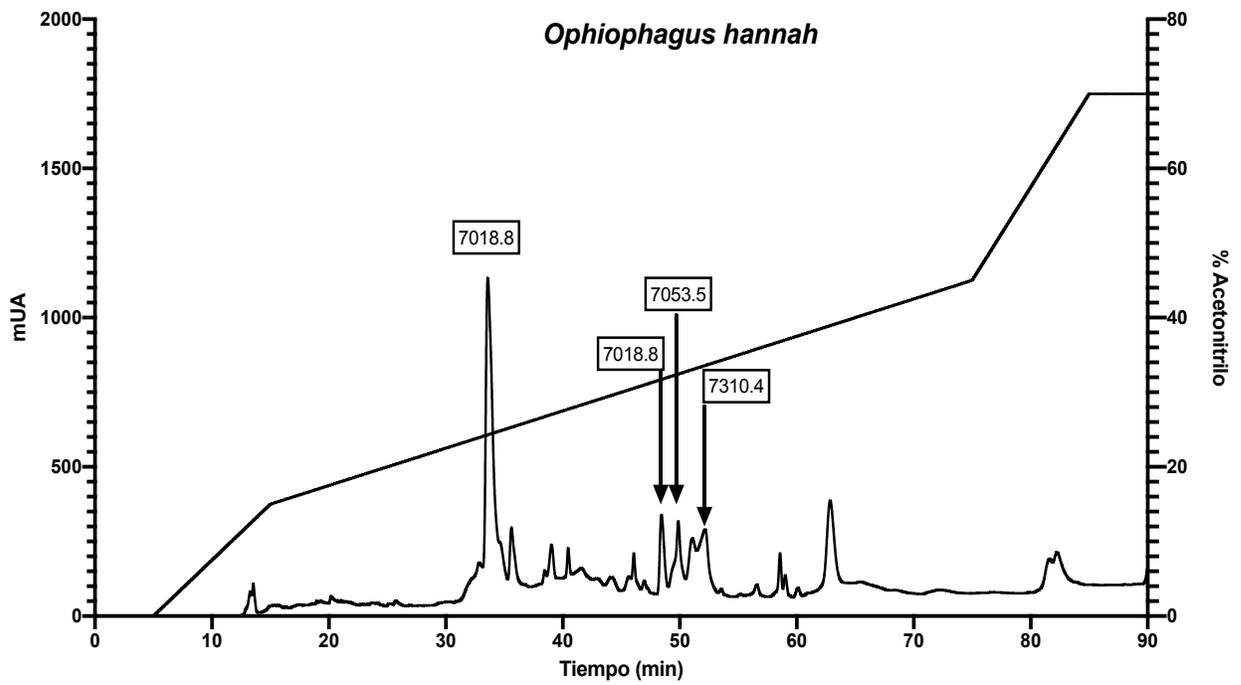
**A3) HPLC del veneno de *Naja kaouthia***



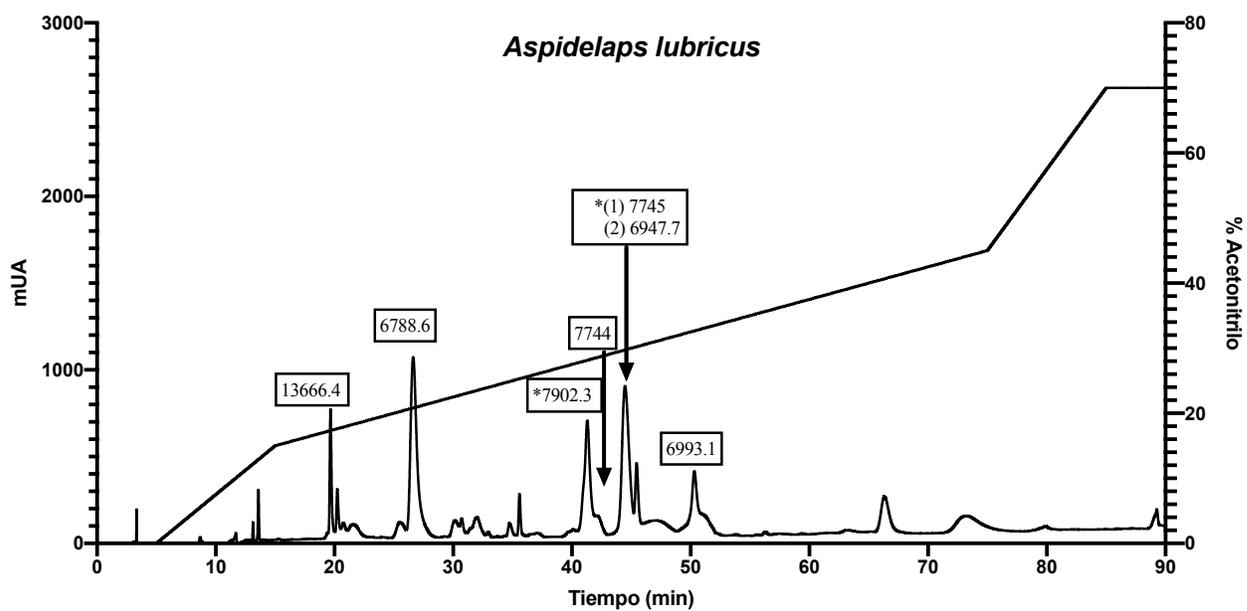
**A4) HPLC del veneno de *Naja mossambica***



A5) HPLC del veneno de *Naja nigricolis*



A6) HPLC del veneno de *Ophiophagus hannah*



A7) HPLC del veneno de *Aspidelaps lubricus*

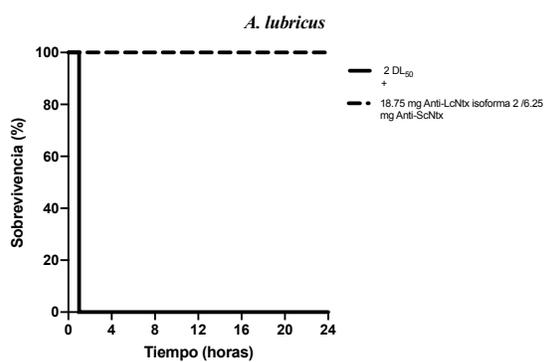
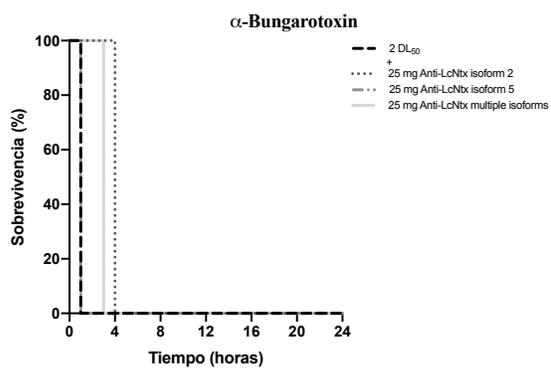
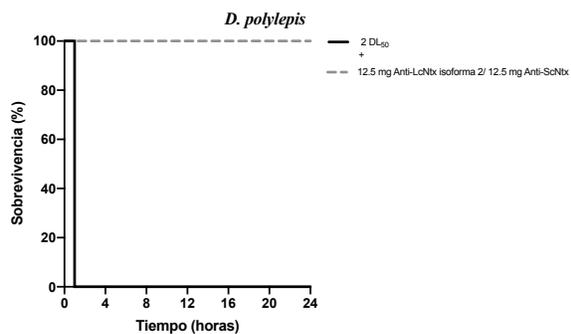
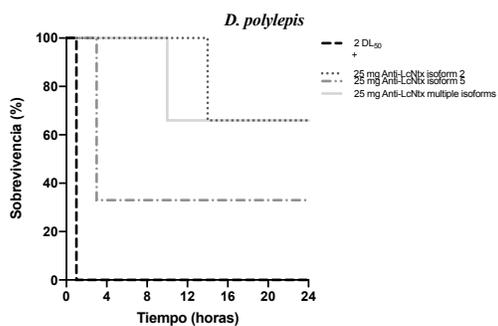
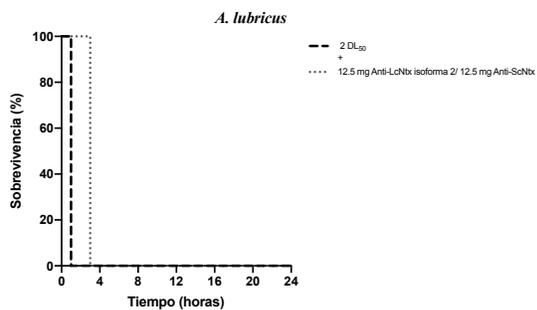
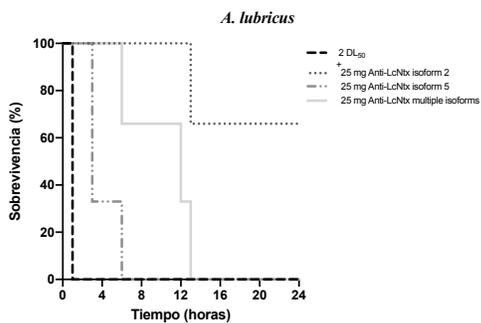
**b) Algunas de las toxinas utilizadas y su correlación con las LNTXs, 3FTXs y dendrotoxinas obtenidas de los venenos de elápidos evaluados.**

<b>Veneno</b>	<b>Masa molecular experimental (Da)</b>	<b>Masa molecular reportada (Da)</b>	<b>Nombre de la toxina</b>	<b>ID</b>
<i>A. antarcticus</i>	8,183.6	8,125.4	Alpha-elapitoxin-Aa2b	P01385
	8,596.0	8,751.2	Alpha-elapitoxin-Aa2e	P0DKW9
	8,017.0	8,033.2	Alpha-elapitoxin-Dpp2a	P01396
<i>D. polylepis</i>	7,037.3	7,145.3	Dendrotoxin I	P00979
	8,636.1	8,841.5	Dendrotoxin K	P00981
	6,709.84	6,715	Cytotoxin 4	P01452
<i>N. mossambica</i>	6,820.2	6,826	Cytotoxin 1	P01467
	6,889.2	6,845	Cytotoxin 5	P25517
	6,740.3	6,737	Cytotoxin	P01445
<i>N. kaouthia</i>	6,846.6	6,845	Nakoroxin	P0DSNO
	7,615.5	NF	NF	NF
	7,823.1	7,821.1	Alpha-cobratoxin	P01391
<i>A. lubricus</i>	6,993.1	6,952	Cobratoxin	P60770
	6,788.6	6,873	Short neurotoxin 1	P60773
	7,745.0	7,447.6	Long neurotoxin 1	P25670
<i>N. haje</i>	7,902.3	7,447.6	Long neurotoxin 1	P25670
	7,884.9	7,811.1	CM-5	P25674

c) IC<sub>50</sub>s obtenidas de los ensayos de ELISA con los anticuerpos obtenidos con las isoformas de la LcNTx con los venenos y toxinas.

Veneno/Toxinas	Anti-LcNTx isoforma 2 <sup>a</sup>			Anti-LcNTx isoforma 5 <sup>a</sup>			Anti-LcNTx multiple isoformas <sup>a</sup>		
	EC <sub>50</sub>	CI	R <sup>2</sup>	EC <sub>50</sub>	CI	R <sup>2</sup>	EC <sub>50</sub>	CI	R <sup>2</sup>
α-LcNTx isoforma 2	3.1	1.9-4.5	0.96	1.2	0.8-1.6	0.96	2.7	2-3.4	0.97
α-LcNTx isoforma 5	2.7	2.1-3.4	0.99	1.7	1.2-2.3	0.99	2.7	2-3.6	0.99
α-LcNTx multiple isoformas	2.3	1.4-3.7	0.93	1.5	0.5-1.6	0.83	2.1	1.4-2.9	0.96
Bungarotoxin (7,984.2 Da)	33.5	30.8-36.5	0.99	32.7	30.2-35.4	0.99	58.9	55.4-62.7	0.99
<i>A. antarcticus</i> (8,183.6 Da)	79.7	73.4 - 86.8	0.99	106	90.5-125.9	0.99	118.7	105.7-134.5	0.99
<i>A. antarcticus</i> (8,596.0 Da)	122.9	110.6-137.2	0.99	139.1	125.8-154.4	0.99	228.1	198.6-267.1	0.99
<i>A. lubricus</i> (7,745.0 Da)	64.2	54.3-75.9	0.99	60.7	53-69.5	0.99	82.9	66.9-101.6	0.98
<i>A. lubricus</i> (7,902.3 Da)	35.4	10.1-106.3	0.81	39.3	4.1-153.5	0.57	235.1	106.6-1951	0.85
<i>D. polylepis</i> (8,017.0 Da)	354.2	300.7-431.9	0.99	337.7	310.9-370.1	0.99	279.9	217.4-389.5	0.97
<i>D. polylepis</i> (7,037.3 Da)	1433	810.5 - 9678	0.94	2496	1148-140167	0.99	3895	ND	0.94
<i>D. polylepis</i> (8,636.1 Da)	>500	ND	0.94	>500	ND	0.94	>500	ND	0.94
<i>N. kaouthia</i> (7,615.5 Da)	>500	ND	0.97	51.4	47.3-55.8	0.99	323.8	294.7-358.7	0.99
<i>N. kaouthia</i> (7,823.1 Da)	405.2	375.5 - 440.8	0.99	>500	ND	0.94	225.4	186.9-265.5	0.98
<i>N. haje</i> (7,884.9 Da)	9.3	6.2-13.4	0.96	12.8	9.5-16.8	0.98	11.6	9.3-14.3	0.98
<i>A. antarcticus</i>	160	139.5-186.4	0.99	175.1	162.7-189.2	0.99	237.8	220.6-257.7	0.99
<i>A. lubricus</i>	54.2	50.3-58.4	0.99	20.7	18.9-22.7	0.99	37.3	31.9-43.5	0.99
<i>B. candidus</i>	296.9	225.6-435.9	0.99	300.3	216.7-486.2	0.99	>500	ND	0.94
<i>D. polylepis</i>	29.6	27.5-31.8	0.99	35.5	33.5-37.6	0.99	40.9	35.7-47	0.99
<i>N. kaouthia</i>	199.3	165.4-248.2	0.99	67.6	60-76.5	0.99	131.3	119.2-145.4	0.99
<i>N. melanoleuca</i>	>500	ND	0.94	>500	880.2-3969	0.94	>500	ND	0.94
<i>N. mossambica</i>	>500	ND	0.94	379.6	321.8-465.9	0.99	>500	ND	0.94
<i>N. nigricollis</i>	>500	ND	0.94	427.3	362.2-525.7	0.99	>500	ND	0.94
<i>O. hannah</i>	44.02	40.8-47.4	0.99	45.6	41-50.6	0.99	46.3	31.8-66.5	0.96
<i>N. haje</i>	451.4	424.0-483.3	0.99	398.8	360.4-447.4	0.99	334.1	292.4-389.7	0.99
rD.H	46.3	42.5-50.4	0.99	50.9	46.7-55.6	0.99	37.5	35.4-39.7	0.99
<i>B. occitanus</i>	>500	ND	0.98	>500	ND	0.86	>500	ND	0.77

## d) Curvas de supervivencia de los anticuerpos de las isoformas anti-LcNTxs



e) IC<sub>50</sub>s obtenidas de los ensayos de ELISA con los anticuerpos obtenidos con las variantes de la LcNTx con los venenos y toxinas

Veneno/Toxinas	Anti-rLcNTx V1			Anti-rLcNTx V2		
	EC <sub>50</sub>	CI	R <sup>2</sup>	EC <sub>50</sub>	CI	R <sup>2</sup>
α-LcNTx V1	1.1	0.5 - 1.7	0.93	1.3	0.7 - 2.3	0.91
α-LcNTx V2 (1)	4.6	3.4 - 5.9	0.98	1.7	0.8 - 2.9	0.91
α-LcNTx V2 (2)	5.1	3.9 - 6.5	0.98	1.4	0.6 - 2.4	0.91
Bungarotoxin (7,984.2 Da)	88.84	81.4 - 97.1	0.99	5.1	3.3 - 7.6	0.95
<i>A. antarcticus</i> (8,183.6 Da)	154.4	122.5 - 204	0.99	2.07	1 - 3.5	0.95
<i>A. antarcticus</i> (8,596.0 Da)	257.3	209.2 - 322.1	0.98	2.7	1.3 - 4.7	0.91
<i>A. lubricus</i> (7,745.0 Da)	1,080	693.5 - 73,915	0.96	8.42	5.8 - 11.9	0.98
<i>A. lubricus</i> (7,902.3 Da)	4,683	ND	0.99	14.9	11.8 - 18.9	0.98
<i>A. lubricus</i> (6,788.65 Da)	1,614,670	ND	0.93	16.9	12.6 - 22.5	0.98
<i>A. lubricus</i> (6,9993.12 Da)	154,909	ND	0.99	655.3	427 - 1711	0.98
<i>D. polylepis</i> (8,017.0 Da)	135,191	ND	0.90	4.3	2.2 - 7.6	0.91
<i>D. polylepis</i> (7,037.3 Da)	185,489	ND	0.98	8.7	5.4 - 13.4	0.96
<i>D. polylepis</i> (8,636.1 Da)	1,599,095	ND	0.93	21.1	17.8 - 25.1	0.99
<i>N. kaouthia</i> (7,823.1 Da)	82,028	ND	0.99	156.4	135.3 - 181	0.99
<i>N. kaouthia</i> (6,846.64 Da)	3,805	ND	0.96	55.4	43.7 - 70.3	0.98
<i>N. kaouthia</i> (6,709.73 Da)	2,098	ND	0.99	827.2	620.2 - 1,307	0.99
<i>N. kaouthia</i> (6,740.34 Da)	1,886	ND	0.98	598,386	ND	0.99
<i>N. haje</i> (7,884.9 Da)	245.7	ND	0.99	22.2	17.8 - 27.6	0.98
<i>N. mossambica</i> (6,709.84 Da)	226,333	ND	0.97	174.9	147.2 - 209.1	0.99
<i>N. mossambica</i> (6,889.27 Da)	1,443	ND	0.93	1,020,065	ND	0.99
<i>N. mossambica</i> (6,820.28 Da)	160,692	ND	0.90	71.5	63 - 81.3	0.99
<i>A. antarcticus</i>	356.7	300.9 - 441.6	0.99	219.6	182.8 - 265.5	0.99
<i>A. lubricus</i>	834.9	739.2 - 975	0.99	19.9	14.4 - 27.1	0.97
<i>B. candidus</i>	115,697	ND	0.99	50.4	36.2 - 69.5	0.96
<i>D. polylepis</i>	2,292	1475 - 5954	0.99	6.3	4 - 9.5	0.94
<i>N. kaouthia</i>	1,081	775.4 - 2657	0.99	15.97	10 - 24.9	0.93
<i>N. melanoleuca</i>	7,552	ND	0.99	74.4	59.5 - 92.4	0.98
<i>N. mossambica</i>	6,662,196	ND	0.99	80.8	51.1 - 120.7	0.94
<i>N. nigricollis</i>	3,871	ND	0.95	31.9	17.7 - 54.3	0.92
<i>O. hannah</i>	2,141	1234 - 13078	0.99	12.96	8.7 - 18.8	0.96
<i>N. haje</i>	189,152	ND	0.98	16.2	11.6 - 22.3	0.96
rD.H	130.4	120.4 - 141.6	0.99	13.4	10.1 - 17.7	0.97
<i>B. occitanus</i>	377,598	ND	0.93	9,266,545	ND	0.99