

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Facultad de Ciencias experimentales



BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Análisis *in silico* comparativo de las interacciones proteína-proteína entre fármacos anti-VEGF y VEGF-A, mediante modelado molecular para la optimización terapéutica en DMAE húmeda.

TRABAJO FIN DE GRADO

Alba Román Vallina

Tutores: Gema Concepción Martínez Navarrete

Ángel Eduardo Parra Sánchez

Departamento de Histología y Anatomía

Área de Biología Celular

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

2024-2025

RESUMEN

La degeneración macular asociada a la edad en su forma húmeda (DMAE húmeda) es una de las principales causas de pérdida de visión irreversible en países desarrollados. En su fisiopatología, la neovascularización coroidea mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) representa un elemento clave. El presente trabajo tiene como objetivo comparar las interacciones proteína-proteína entre distintos fármacos anti-VEGF y la proteína VEGF-A, utilizando herramientas de modelado estructural y acoplamiento molecular (docking). Para ello, se obtuvieron y refinaron las estructuras tridimensionales de los principales agentes terapéuticos (*Bevacizumab*®, *Ranibizumab*®, *Aflibercept*®, *Brolucizumab*®, *Faricimab*® y *Abicipar*®), mediante metodologías como el modelado por homología, modelado por fragmentos y ensamblaje estructural. Posteriormente, se identificaron los sitios activos utilizando aprendizaje automático con P2RANK, y se llevaron a cabo los análisis de interacción mediante el servidor HADDOCK 2.4. Los resultados obtenidos permitieron evaluar la afinidad y estabilidad de los complejos formados, lo cual podría contribuir a optimizar las estrategias terapéuticas actuales frente a la DMAE húmeda, facilitando una selección racional de fármacos.

Palabras clave: *In silico*, interacciones proteína-proteína, anti-VEGF, VEGF-A, modelado molecular, DMAE húmeda.

ABSTRACT

Wet age-related macular degeneration (wet AMD) is one of the leading causes of irreversible vision loss in developed countries. In its pathophysiology, choroidal neovascularization mediated by vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) plays a key role. This study aims to compare protein–protein interactions between various anti-VEGF drugs and the VEGF-A protein using structural modeling and molecular docking tools. To this end, the three-dimensional structures of the main therapeutic agents (*Bevacizumab*®, *Ranibizumab*®, *Aflibercept*®, *Brolucizumab*®, *Faricimab*®, and *Abicipar*®) were obtained and refined through methodologies such as homology modeling, fragment-based modeling, and structural assembly. Active sites were then identified using machine learning with P2RANK, and interaction analyses were performed using the HADDOCK 2.4 server. The results allowed the assessment of the affinity and stability of the resulting complexes, which may contribute to the optimization of current therapeutic strategies against wet AMD and support the rational selection of anti-VEGF drugs.

Keywords: *In silico*, protein-protein interactions, anti-VEGF, VEGF-A, molecular modelling, wet AMD.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	4
1. El sistema visual	4
1.1. La retina	4
1.1.1. Fotorreceptores	5
1.1.2. Mácula	6
1.2. Coroides	7
2. Patologías de la retina y la mácula.	8
2.1. Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)	9
2.1.1. DMAE tipo húmeda o exudativa	10
2.1.2. Angiogénesis.	11
2.1.3. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	12
2.2. Prevalencia y datos de la DMAE	14
3. Fármacos anti-VEGF	14
3.1. Bevacizumab®	15
3.2. Ranibizumab®	15
3.3. Aflibercept® (VEGF-Trap Eye)	15
3.4. Brolucizumab®	16
3.5. Faricimab® (RG7716)	16
3.6. Abicipar pegol® (AGN-150998)	16
4. Docking molecular	17
ANTECEDENTES	19
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Bases de datos y selección de estructuras.	21
2. Obtención de secuencias para modelado por homología con SWISS-MODEL	21
3. Modelado por fragmentos para la obtención de Aflibercept® y Faricimab®	21
4. Refinamiento de estructuras y ensamblaje de dominios.	22
5. Identificación de residuos activos de las proteínas con el software P2RANK	24
6. Análisis comparativo de interacciones proteína-proteína entre VEGF-A y fármacos anti-VEGF	25
RESULTADOS	26
1. Predicción de sitios activos en las proteínas con el software P2RANK	26
2. Análisis interacciones proteína-proteína entre fármacos anti-VEGF y VEGF-A con HADDOCK.	30
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	36
BIBLIOGRAFÍA	37

INTRODUCCIÓN

1. El sistema visual

El sistema visual es el encargado de adquirir información del entorno en forma de luz, analizarla e interpretarla. El proceso de visión y percepción visual engloba un complejo sistema de estructuras, cada una de las cuales está designada para un propósito específico. La organización de cada una de esas estructuras, les permite llevar a cabo su función específica [1].

El sistema visual está conformado por el globo ocular, la vía y la corteza visual. La integración de los tres soporta el conjunto de las funciones visuales. El globo ocular es una esfera de 26-28 milímetros de diámetro formada por tres capas que son de dentro a fuera: retina, úvea (dividida a su vez en coroides, cuerpo ciliar e iris) y esclerótica [2] (Figura 1). La información óptica ingresa al globo ocular en forma de señales electromagnéticas, las cuales son recibidas y transducidas por los fotorreceptores de la retina en impulsos nerviosos, para posteriormente transmitirse por la vía hacia la corteza visual, donde tienen lugar la sensopercepción de las imágenes y la interpretación de elementos como la forma, la profundidad, el color y el movimiento [3].

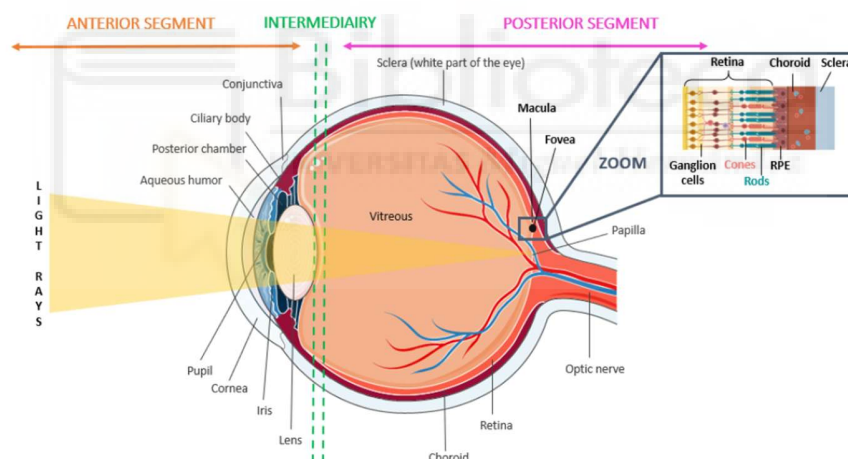


Figura 1: Anatomía del ojo dividida en segmentos diferenciados (anterior, intermedio y posterior). Detalle de las capas que conforman la zona macular (retina, coroides y esclera) [4].

1.1. La retina

La retina es una membrana fina, incolora y transparente. Se trata de la capa más interna. Externamente la rodean dos capas, la coroides para alimentarla y la esclerótica para protegerla, mientras que internamente delimita con el cuerpo vítreo [2]. Está especializada en recoger, elaborar y transmitir, a través el nervio óptico los impulsos nerviosos visuales hacia el cerebro.

Está formada por una serie de células que se relacionan entre sí y se organizan formando una sucesión de capas. La capa más superficial es el epitelio pigmentario, compuesto por una monocapa de células epiteliales. Su función es proporcionar una membrana reflectante de las radiaciones luminosas y, por otro lado, fagocitar las porciones apicales degradadas de los conos y bastones. Por debajo de esta se sitúa una túnica nerviosa en la que podemos destacar varios tipos celulares [5]: fotorreceptores (captan la luz y la transforman en impulsos eléctricos), células horizontales (modulan la transmisión sináptica entre los fotorreceptores y las células bipolares), células bipolares (actúan como un puente entre los fotorreceptores y células ganglionares, pudiendo distinguir entre células bipolares para los conos y para los bastones respectivamente, según el tipo celular con el que hagan sinapsis), células amacrinas (conectan las células bipolares con las ganglionares, modulando su excitación) y las células ganglionares (son las que en última instancia mandan el impulso sináptico al sistema nervioso central a través del nervio óptico) [6]. Por último, cabe destacar una capa de células de sostén o gliales, conocidas como células de Müller, las cuales crean un soporte físico para los elementos neuronales gracias a su morfología alargada y con numerosas expansiones citoplasmáticas. Además, sintetizan y almacenan glucógeno, y ceden glucosa a las células nerviosas. [5] (Figura 2).

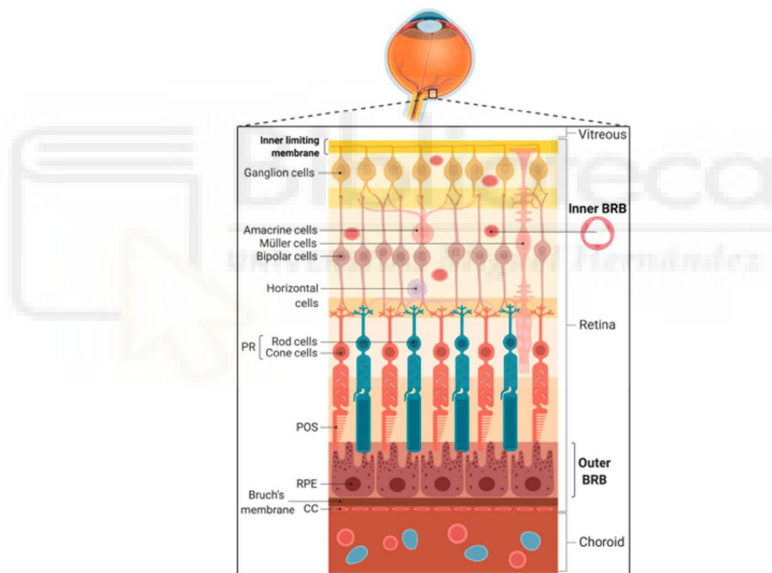


Figura 2. Representación de las capas celulares que conforman la retina, la cual se encuentra delimitada por la coroides (externamente) y el cuerpo vítreo (internamente). De fuera a dentro podemos diferenciar el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y una túnica nerviosa compuesta por varios tipos celulares: los fotorreceptores (PR), células horizontales, bipolares, amacrinas y ganglionares. Finalmente, la membrana limitante interna es la frontera entre la retina y el cuerpo vítreo, y está formada por las placas basales de las células de Müller [7].

1.1.1. Fotorreceptores

La visión y formación de imágenes en vertebrados, esta mediada por dos tipos de fotorreceptores diferentes según su morfología y funciones: conos y bastones. Se tratan de células especializadas en el proceso de fototransducción en el cual señales luminosas desencadenan una señal eléctrica en estas células fotorreceptoras [8]

Lo primero que cabe destacar es que presentan sensibilidades lumínicas diferentes. Los bastones son muy sensibles a la luz, pudiendo detectar fotones individuales. Es por esta razón que actúan bajo condiciones de luz tenue. Por otro lado, tenemos los conos, los cuales presentan una sensibilidad mucho menor, actuando por tanto en condiciones de elevada luminosidad. Existen tres tipos de conos: sensibles al azul, verde y al rojo; pero sólo un tipo de bastones: los sensibles al verde. Es por esta razón que solo podemos discriminar los colores cuando la luz es lo suficientemente brillante como para provocar la estimulación de los conos [9].

Ambos fotorreceptores emplean diferentes isoformas de múltiples proteínas en la cascada de fototransducción. Su activación esta mediada por su respuesta a la luz. En este caso, la absorción de un fotón provoca la isomerización de una molécula de fotorpigmento (rodopsina o su equivalente en los conos) resultando en su configuración activa. Esta, activación desencadena una cascada de señalización, que, en última instancia hidroliza el mensajero citoplasmático GMP cíclico. La reducción en la concentración de GMPc, provoca el cierre de los canales iónicos, disminuyendo el flujo de cationes al interior celular y desencadenando respuesta eléctrica hiperpolarizante de los fotorreceptores a la luz [10].

La retina humana presenta aproximadamente 125 millones de bastones y 7 millones de conos. El mayor número de conos se concentra en un área denominada mácula, llegando a ser el único fotorreceptor en la fóvea (zona central de la mácula). Por otro lado, los bastones se localizan en zonas más periféricas de la retina [3].

1.1.2. Mácula

La mácula es una región especializada que se encuentra en el centro de la retina en primates superiores y humanos. Se trata de la región con mayor discriminación visual, y en ella predominan los conos (fotorreceptores responsables de la visión en color). En esta zona, a diferencia de la región periférica de la retina, donde la luz que llega debe atravesar varias capas de células neurales antes de alcanzar los fotorreceptores; existe una mayor exposición a la irradiación, ya que estas capas están ausentes, lo cual contribuye a explicar este grado de agudeza visual [11]. La mácula comprende menos del 4% del área retiniana total, sin embargo, es la responsable de prácticamente toda nuestra visión fototópica.

Está dividida en diferentes regiones anatómicas: la perifovea (zona de transición entre la zona central especializada y la periferia), presenta una alta vascularización, así como un elevado ratio bastones: conos; la parafovea caracterizada por presentar una densidad de vasos sanguíneos relativamente baja y una disminución en la ratio bastones: conos; y finalmente tenemos la fóvea, la cual podemos dividir en pendiente foveal y foveola. La pendiente foveal presenta dos transiciones de gran importancia. Por un lado, pasamos de un área de la retina dominada por bastones a otra dominada por conos, y, por otro lado, de un área vascularizada a otra avascularizada. Finalmente, la foveola es el área más central de la macula y presenta una elevada concentración de conos [12] (Figura 3).

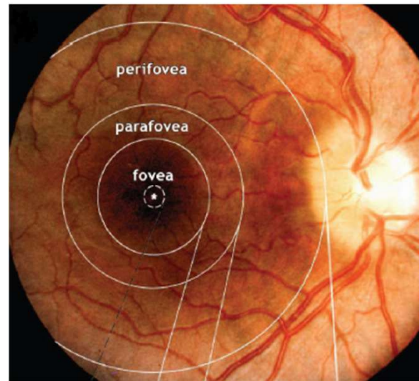


Figura 3: Regiones anatómicas de la mácula [12].

Cabe destacar que la mácula está abastecida por la vascularización retiniana, la cual presenta una distribución determinada. El ojo, es una estructura que ha evolucionado de forma que la densidad de capilares sanguíneos es limitada en la retina, a través de la cual debe pasar la luz para llegar a los fotorreceptores. Por otro lado, se ha demostrado que la retina presenta una elevada demanda de oxígeno, sobre todo en el área macular. Por lo que la alta demanda metabólica de la zona y la escasa vascularización retiniana, contribuyen a la vulnerabilidad de la macula a sufrir enfermedades vasculares [13].

1.2. Coroides

Se conoce como coroides a la parte posterior de la úvea, la túnica intermedia del ojo [14]. Se extiende desde los márgenes del nervio óptico hasta la pars plana, donde continúa hacia la parte anterior, donde pasa a ser el cuerpo ciliar. Anatómicamente se compone de 5 capas, pudiendo distinguir de dentro a fuera: la membrana de Bruch, la coriocapilar, la capa de Sattler (donde se encuentran los vasos de tamaño mediano), la capa de Haller (donde se localizan los vasos grandes) y la lámina supracoroidea.

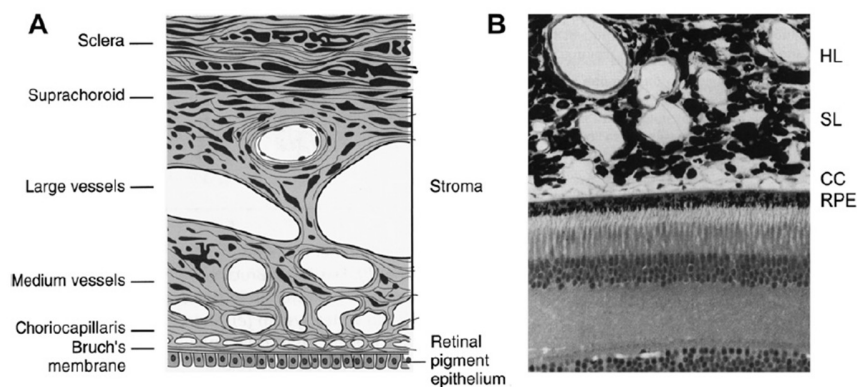


Figura 1. (A) Histología de la coroides. Representación esquemática de sus capas [15]. (B) Sección de la retina externa y coroides de un primate. EPR: epitelio pigmentario de la retina; CC: coroides capilar; SL: capa de Sattler; HL: capa de Haller [16].

Se trata de una estructura vascular esencial para suministrar nutrientes y oxígeno a la retina [17], ya que, a pesar de la prominencia de los vasos sanguíneos retinianos, la coroides es su principal suministro de sangre [14]. Además, elimina tanto desechos como células muertas provenientes de los fotorreceptores y de las capas más externas de la retina [17]. Presenta otras funciones como pueden ser la termorregulación, liberación de factores de crecimiento o el ajuste de la posición de la retina a través de cambios en el grosor coroidal. Sin embargo, a pesar [14].

Las células endoteliales de la coriocapilar, expresan receptores para los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF-1 y 2), así como moléculas de adhesión intracelular- 1 (ICAM-1), responsables de la adhesión de leucocitos a través de las integrinas [18]. Las células del epitelio pigmentario secretan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de forma basal hacia la coriocapilar, en donde se expresan sus correspondientes receptores [19]. Además, teniendo en cuenta la naturaleza vascular de la coroides, es de esperar que, en esta, también se dé la síntesis de factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis, como pueden ser el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) [20]. Estos factores son los responsables de alteraciones en la neovascularización, lo cual está relacionado con patologías como la degeneración macular asociada a la edad [14].

2. Patologías de la retina y la mácula.

La degeneración retiniana y macular son las principales causas de discapacidad visual, y conllevan una importante carga tanto económica como social a nivel mundial [21].

La retina esta abastecida por un sistema de suministro único, solución a la necesidad de eliminar los vasos sanguíneos inmediatamente anteriores a los segmentos externos de los fotorreceptores. Esto constituye, por un lado, una adaptación clave para la función visual, ya que los eritrocitos que circulan por los vasos sanguíneos contienen hemoglobina, la cual absorbe la luz; pero por otro, un desafío importante para el suministro de oxígeno y nutrientes a los fotorreceptores, desafío que se intensifica si tenemos en cuenta su alta actividad metabólica.

La circulación coroidea resuelve este problema gracias a su flujo sanguíneo extremadamente alto y a la formación de la coriocapilaris, un denso plexo de capilares que permite que el plasma bañe el epitelio pigmentario de la retina (EPR). Sin embargo, dado que las exigencias del EPR y las células vasculares retinianas son altas, estas presentan una elevada vulnerabilidad a enfermedades. Estas patologías se clasifican como enfermedades vasculares retinianas, mientras que aquellas que afectan al RPE pueden dar lugar a enfermedades vasculares coroideas.

Una de las principales consecuencias de estas patologías es la neovascularización. Existen dos tipos de neovascularización que afectan a la retina: neovascularización retiniana (tiene lugar en un grupo de enfermedades conocidas como retinopatías isquémicas) y la neovascularización subretiniana y coroidea, la cual se da en enfermedades de la retina externa y la membrana de Bruch, siendo la más común la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) [22].

2.1. Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE).

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es la causa más común de pérdida progresiva de visión en países desarrollados. Su prevalencia, aumenta con el envejecimiento de la población [23]. Esta patología engloba una serie de lesiones que afectan a la parte posterior del ojo, concretamente la mácula, una región de la retina con una elevada concentración de fotorreceptores, los cuales son responsables de la visión central [4].

La severidad de los síntomas determina el estadio de la enfermedad, pudiendo diferenciar 3 formas: temprana, intermedia y avanzada. La etapa temprana suele ser asintomática, aunque se pueden detectar pequeños depósitos extracelulares amarillentos ricos en lípidos y proteínas llamados drusas. En la etapa intermedia, el tamaño de estos depósitos es mayor ($> 125 \mu\text{m}$). Finalmente, la enfermedad puede evolucionar a dos estadios avanzados diferenciados, dando lugar a la DMAE atrófica (seca) o a la DMAE exudativa (húmeda). La DMAE seca se caracteriza por una atrofia geográfica avanzada. Este término se emplea para describir áreas en las que las células del epitelio pigmentario de la retina, así como fotorreceptoras han sido dañadas completamente o han muerto [24]. Por otro lado, la DMAE húmeda o neovascular, se caracteriza principalmente por una neovascularización coroidea que desencadena la pérdida de visión [4] (Figura 5)

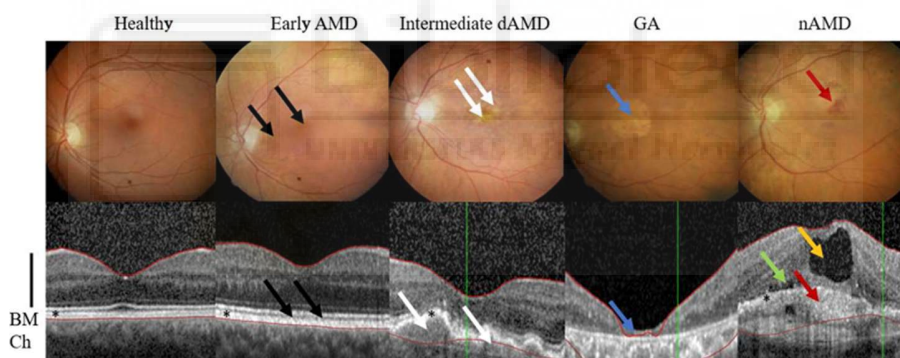


Figura 5. Tomografías del fondo de ojo (panel superior) y tomografías de coherencia óptica (panel inferior) de un individuo sano, DMAE temprana con moteado pigmentario (flechas negras), DMAE seca intermedia con drusas (flechas blancas), atrofia geográfica (GA, flechas azules) y DMAE neovascular (nDMAE) con neovascularización coroidea y hemorragia (flechas rojas), que coinciden con líquido intrarretiniano (flecha amarilla) y subretiniano (flecha verde). La barra negra indica la capa neural de la retina y el asterisco señala la capa del epitelio pigmentario de la retina (EPR), ambas atróficas o ausentes en GA [24].

La DMAE se da como resultado de una interacción multifactorial entre el metabolismo, la función celular, la genética y el ambiente. La interacción de estos factores puede dar lugar a un entorno propicio para cambios estructurales crónicos en la zona macular, afectando a la coriocapilar, membrana de Bruch, EPR y los fotorreceptores [25].

Aunque la patogénesis de la enfermedad no se conoce completamente, diversos estudios indican que varios mecanismos patogénicos a nivel tanto molecular como bioquímico pueden desencadenar la DMAE. Estos incluyen: metabolismo anómalo de los lípidos, apoptosis, cambios estructurales en los segmentos externos de los fotorreceptores, disfunción de los canales iónicos del EPR, alteraciones del sistema inmunológico, anomalías en la matriz extracelular y daño oxidativo [26]. El envejecimiento contribuye a la acumulación de daño oxidativo, el cual es considerado como el principal desencadenante de enfermedades degenerativas relacionadas con la edad. Este estrés oxidativo promueve la alteración de diversas biomoléculas como proteínas, lípidos y ADN, así como a la disfunción mitocondrial; generando epítomos específicos de oxidación, que son reconocidos como señales de daño por el sistema inmunológico, induciendo respuestas proinflamatorias [25].

Ambas formas de la enfermedad (exudativa y atrófica) se caracterizan por una inflamación crónica. Esta inflamación local promueve la formación de drusas, la alteración de la membrana de Bruch, el desarrollo de neovascularización coroidea y la degeneración del EPR [4]. La disfunción y atrofia del EPR afectan a la salud de la capa de fotorreceptores y por consecuencia al proceso de fototransducción, lo cual conlleva en última instancia la alteración de la transmisión de señales desde la retina al cerebro y da como resultado, la pérdida progresiva de la visión [27] (Figura 6)

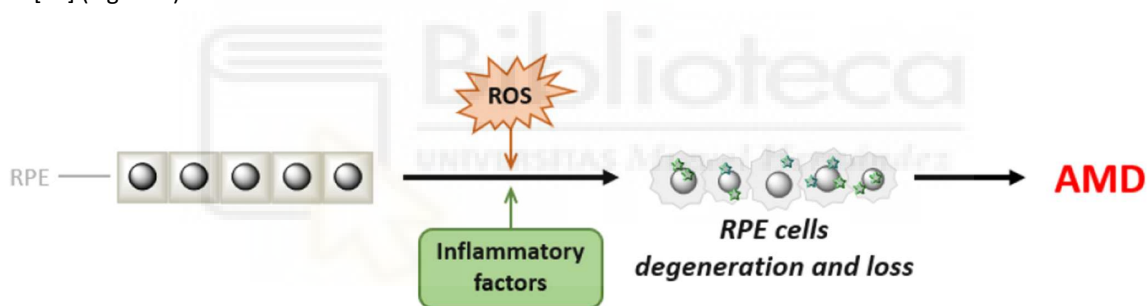


Figura 6. Desarrollo de DMAE como consecuencia de la presencia de daño oxidativo (ROS) y factores inflamatorios [4].

2.1.1. DMAE tipo húmeda o exudativa.

Esta variedad de la enfermedad no es la más común (afecta a un 10% de los pacientes con DMAE), sin embargo, es la responsable del 90% de casos de pérdida de visión asociados a la patología [23].

La DMAE tipo seca es la precursora de la DMAE tipo húmeda. Una de las características de la DMAE atrófica o seca, es la drusogénesis o formación de drusas, entre el EPR y la membrana de Bruch disminuyendo la perfusión desde la coroides y desplazando el EPR y la capa de fotorreceptores, lo que provoca distorsión visual y muerte de los fotorreceptores y células del EPR (atrofia geográfica). Estas drusas no solo actúan como una barrera mecánica, sino que también activan el sistema inmune (son un estímulo para la activación local del sistema del complemento), induciendo inflamación local. Como resultado de la fuerte actividad quimotáctica de los productos de la activación

del complemento, hay una afluencia de células inflamatorias, que pueden provocar un crecimiento adicional de las drusas y finalmente, la muerte oxidativa de las células del EPR. Además, estos depósitos extracelulares contribuyen a la isquemia local de las células del EPR, lo que provoca a su vez la liberación de estímulos angiogénicos y el desarrollo de la neovascularización coroidea, dando lugar a la DMAE tipo húmeda o exudativa [28] (Figura 7).

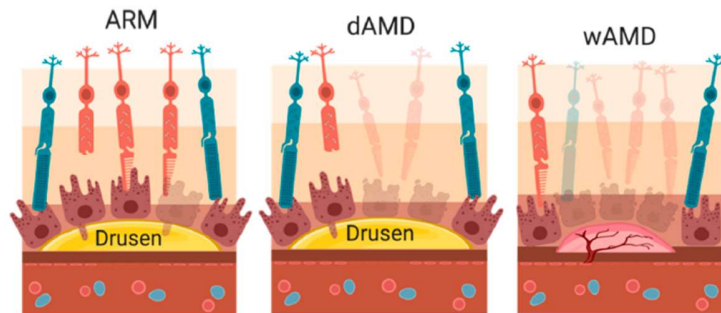


Figura 7. (A) Progresión de una retina sana hacia una maculopatía asociada a la edad (ARM), caracterizada por la presencia de pigmentación anómala o drusas. (B) Degeneración macular asociada a la edad seca (dAMD), donde se puede apreciar la formación de drusas, entre el EPR y la membrana de Bruch causando la muerte de fotorreceptores y células del EPR. (C) Degeneración macular asociada a la edad húmeda (wAMD), la cual se identifica por desprendimiento del EPR y/o neovascularización coroidea (CNV). La pérdida aguda de visión puede ocurrir debido a la acumulación de líquido subretiniano y/o intrarretiniano [7].

En la DMAE tipo húmeda las células del EPR producen cantidades excesivas de factores de crecimiento (entre los que cabe destacar el VEGF) como respuesta no solo a los niveles de oxígeno, sino también a la inflamación o la presencia de estrés oxidativo, estimulando por tanto el crecimiento vascular. Un incremento en los niveles de estos factores desencadena una neovascularización coroidea, la cual se caracteriza por un crecimiento anormal de vasos sanguíneos desde la coroides hacia el EPR y regiones subretinianas avasculares [24]. Estos nuevos vasos sanguíneos inmaduros son permeables y provocan hemorragias, fugas de suero, acumulación de líquido (edemas), desprendimiento del EPR distorsión visual y finalmente, pérdida de visión central [26].

En la etapa final de la enfermedad, eventualmente se da una regresión de la neovascularización y cese de la inflamación. Esta etapa involutiva se caracteriza por procesos de cicatrización y fibrosis [7], los cuales acaban dando lugar a una cicatriz macular atrófica (cicatriz disciforme), que posteriormente, causa daño permanente e irreversible a la visión central [29]. Si no se trata, la DMAE exudativa progresa de manera irreversible hacia la ceguera central [4].

2.1.2. Angiogénesis.

Una de las características más distintivas de la DMAE tipo húmeda, es la elevada producción de factores de crecimiento por parte del ERP (principal regulador de la homeostasis angiogénica en la retina), macrófagos y el sistema del complemento; lo cual estimula el crecimiento vascular [7].

La formación de vasos sanguíneos se puede dividir en vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis conlleva el desarrollo de vasos sanguíneos de novo, así como la diferenciación de células endoteliales a partir de angioblastos, lo cual tiene lugar en la embriogénesis; mientras que la angiogénesis, es el desarrollo de capilares vasculares a partir de vasos sanguíneos preexistentes, provocando una modificación adicional de las redes vasculares. Se trata de un proceso fundamental en la regeneración de tejidos.

El proceso de angiogénesis es estimulado cuando los tejidos dañados, hipóxicos o enfermos producen y liberan factores de crecimiento (como el VEGF). Estos factores de crecimiento proangiogénicos estimulan la migración y proliferación de células endoteliales desde los vasos preexistentes, dando lugar a la formación de capilares sanguíneos que finalmente se estabilizan, generando los nuevos vasos sanguíneos [24].

La circulación retiniana requiere de la expresión del VEGF para mantener una vascularización sana. Sin embargo, su expresión anómala, desencadena una angiogénesis anormal, la cual juega un papel fundamental en el desarrollo de la neovascularización coroidea que se da en el caso de la DMAE húmeda [27]. Esta neovascularización se puede dividir en 3 subtipos:

- Extrafoveal: la neovascularización se localiza entre 200 y 2500 μm del centro geométrico de la zona avascular de la fovea.
- Juxtafoveal: la neovascularización está restringida en un área de hasta 199 μm del centro geométrico de la zona avascular de la fovea.
- Subfoveal: aquí la neovascularización se da justo debajo del centro geométrico de la zona avascular de la fovea [4].

Diversos estímulos pueden desencadenar una expresión anormal del VEGF, y, por tanto, angiogénesis. Algunos ejemplos pueden ser la hipoxia y la inflamación.

La retina presenta una alta actividad metabólica y necesita un constante abastecimiento de nutrientes y oxígeno, por lo que se requiere de un adecuado suministro sanguíneo por parte de la coroides. Alteraciones como la formación de drusas o el engrosamiento de la membrana de Bruch, disminuyen la perfusión coroidea y el abastecimiento de oxígeno, favoreciendo una situación de hipoxia y de inflamación, que es la que en última instancia fomenta una angiogénesis anómala y la formación de vasos sanguíneos con fugas [24].

2.1.3. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el factor más estudiado relacionado con la neovascularización ocular. Se trata de un potente factor proangiogénico, inicialmente considerado un mitógeno específico para las células endoteliales. Presenta funciones fisiológicas entre las que se encuentran la formación ósea,

la hematopoyesis, la cicatrización de heridas y el desarrollo de los sistemas vascular y linfático. Además, este factor se encuentra sobreexpresado en muchos tumores, contribuyendo a la angiogénesis tumoral [28].

El gen VEGF codifica para una familia de glicoproteínas cuya función principal es la formación de novo de vasos sanguíneos (vasculogénesis), como ocurre en el desarrollo embrionario; así como la formación de vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes (angiogénesis) [30]. En el caso de la DMAE tipo húmeda el excesivo crecimiento de vasos anormales se conoce como neovascularización coroidea. En ella, la familia de factores VEGF juega un papel relevante.

La familia VEGF incluye al VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y al factor de crecimiento placentario (PlGF). Concretamente, el VEGF-A es un factor crítico en la neovascularización coroidea, y la principal diana de las terapias anti-VEGF [31].

En ojos sanos el VEGF producido por el ERP juega un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento de la coriocapilar [22], así como de la formación de sus fenestraciones características [30]. De hecho, en experimentos con ratones knockout para las isoformas del VEGF-A en las células del ERP, se pudo observar una rápida muerte de la coriocapilar, seguida de la del ERP y los fotorreceptores [32]. Además, el VEGF también evita que las neuronas de la retina entren en apoptosis en condiciones isquémicas [4]. Bajo estas condiciones, su producción, incrementa la expresión vía el ERP del PEDF (factor derivado del epitelio pigmentario), un potente regulador negativo de la angiogénesis.

En condiciones patológicas (como es el caso de la DMAE), la desregulación del ERP, disminuye el papel protector del PEDF. Diversos estudios han señalado una disminución de PEDF en la coroides de ojos con DMAE, lo que sugiere a su vez que, esta disminución en la interfaz coroides-membrana de Bruch-ERP favorece la creación de un espacio no restrictivo para la progresión hacia la DMAE neovascular [33] y provocando la activación, supervivencia y proliferación de nuevos vasos en la fovea [4].

En situaciones de hipoxia para la retina y la coroides se puede inducir una sobreexpresión del VEGF por parte del ERP, promoviendo, por tanto, la formación anómala de vasos sanguíneos desde la coroides (principalmente) y la retina (menos común) [30]. Cuando las células se encuentran en condiciones de oxígeno escaso, activan la transcripción del factor inducible por hipoxia alfa 1 (HIF-1 alfa), lo que induce la liberación de VEGF-A, el cual actúa a través de su unión a tirosinas quinasas específicas (VEGFR-1 y VEGFR-2) ubicadas en las células endoteliales, siendo el VEGFR-2 el más importante para la angiogénesis. Por otro lado, el estrés oxidativo activa cascadas de señalización que también concluyen con una sobreexpresión del factor VEGF. [28].

Sólo la elevada expresión del VEGF por parte de las células del ERP no es suficiente como para causar la neovascularización en algunos modelos preclínicos, es decir la fisiopatología de la DMAE debe englobar más causas que sólo un incremento en la producción de VEGF-A por parte del ERP [34].

2.2. Prevalencia y datos de la DMAE.

La DMAE es una de las causas más comunes de pérdida de visión irreversible en pacientes mayores de 65 años. Se trata de la tercera causa de ceguera a nivel mundial [31], y la principal en países desarrollados, con mayor prevalencia entre europeos, en comparación con poblaciones africanas, hispánicas y asiáticas. El número de afectados por la DMAE a nivel mundial era de 196 millones en el año 2020, y se espera que este incremente a 288 millones en 2040 como consecuencia del aumento en la esperanza de vida de la población, así como por la occidentalización de la dieta y el estilo de vida [35].

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado una fuerte correlación positiva entre la prevalencia de la DMAE y la edad de los individuos: BEAVER DAM (América) [36]; BLUE MOUNTAINS (Australia) [37]; y EUREYE, un estudio en la población europea [38].

Existen diversos factores que juegan un papel importante en la determinación de la predisposición de la DMAE. Estos se pueden dividir en dos categorías:

- Factores de riesgo no modificables. Entre los que se encuentran: la edad avanzada; el género; la raza o el color del iris (va relacionado con la cantidad de melanina presente, ya que una mayor cantidad de este pigmento, permite absorber una mayor cantidad de luz, previniendo la producción de ROS inducida por la exposición a esta, y disminuyendo la demanda metabólica del ERP en individuos con iris oscuras en comparación con individuos de iris claros) [39].
- Factores de riesgo modificables. Entre los que tenemos: fumar, consumo de alcohol, el índice de masa corporal y la dieta [40].

En cuanto a datos, en el caso de Europa, según los resultados obtenidos en un metaanálisis, en el que se incluían 42,080 sujetos de 10 países europeos diferentes, la prevalencia para individuos de 70 años o más, fue de un 13.2% y 3.0% para la DMAE temprana y tardía respectivamente [41]. Por otro lado, en el caso de España un estudio en el que participaron 2132 individuos mayores de 65 años, se obtuvieron resultados que reflejaban que la prevalencia general de la DMAE era del 3.4%, y que esta aumentaba del 1.3% en individuos de entre 65 a 74 años, al 8.5% en aquellos de 80 años o más. Además, se pudieron establecer cifras para el caso de la DMAE tipo húmeda y atrófica, siendo estas del 1.9% y 1.5% respectivamente. Si tenemos en cuenta que en España hay alrededor de 7.5 millones de individuos mayores de 65 años, el estudio sugiere que aproximadamente 255,000 individuos (3.4%) padecen DMAE en nuestro país [42].

3. Fármacos anti-VEGF

La terapia anti-VEGF es el tratamiento de referencia para la degeneración macular húmeda asociada a la edad [43], ya que afecta a múltiples vías patogénicas clave. El primer agente anti-VEGF aprobado para su uso en la

DMAE húmeda fue el Pegaptanib. Desde entonces, han surgido nuevas terapias anti-VEGF que han sustituido su uso, como *Bevacizumab*®, *Ranibizumab*®, *Aflibercept*®, *Brolucizumab*® o *Faricimab*® [28].

3.1. Bevacizumab®

Bevacizumab® es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) (Tabla 1). Esta inmunoglobulina humana G1 de tamaño completo de 149 kDa [44], se une al dominio de unión al receptor de todas las isoformas de VEGF-A, impidiendo la interacción entre el VEGF-A y sus receptores (Flt-1 y KDR) en la superficie de las células endoteliales, lo cual inicia la vía de señalización intracelular que conduce a la proliferación de las células endoteliales y a la formación de nuevos vasos sanguíneos, es decir, *Bevacizumab*® inhibe la señalización proangiogénica al unirse a las diferentes isoformas del VEGF.

Este anticuerpo fue estudiado y diseñado inicialmente con el fin de desarrollar una terapia anti angiogénica para tratar una variedad de tumores sólidos. Tras su aprobación por la FDA con este fin y su habilidad para inhibir la neovascularización, *Bevacizumab*® ganó acceso al campo de la oftalmología, promoviéndose su uso off-label en el tratamiento de varios tipos de patologías subretinianas, como la neovascularización coroidea (CNV) en la degeneración macular asociada a la edad [45].

3.2. Ranibizumab®

Ranibizumab® es un fragmento Fab (antigen-binding fragment) de 48 kDa del anticuerpo A4.6.1, precursor de *Bevacizumab*® y uno de los cuatro anticuerpos del isotipo IgG1 que se une y neutraliza de manera más efectiva los diferentes isómeros del VEGF-A [28] (Tabla 1). Este fragmento Fab originado partir de *Bevacizumab*®, presenta una afinidad aumentada por el VEGF-A lo que le permite inhibir su interacción con los receptores presentes en la superficie de las células endoteliales. De este modo, bloquea procesos fundamentales como la permeabilización vascular o la neovascularización, ambos cruciales en la fisiopatología de la DMAE tipo húmeda. *Ranibizumab*® cuenta con un único sitio de unión al VEGF, por lo que se requieren dos moléculas del fármaco para neutralizar completamente un dímero de VEGF-A. Además, su menor tamaño molecular, facilita la difusión hacia la retina [46].

3.3. Aflibercept® (VEGF-Trap Eye)

Aflibercept® es una proteína de fusión recombinante completamente humana de 115 kDa formado por el segundo dominio de unión del VEGFR-1 y el tercer dominio de unión del VEGFR-2, que luego se fusionan con la región Fc de una IgG1 humana [28]. Dado que VEGFR-1 posee una mayor afinidad por VEGF que VEGFR-2, los desarrolladores de fármacos han utilizado sus secuencias de unión para VEGF Trap-eye.

Una diferencia funcional clave entre *Aflibercept*® y otros fármacos anti-VEGF actualmente en uso es su capacidad para unirse e inhibir no solo a VEGF-A, sino también a PlGF-1, PlGF-2 y VEGF-B, factores que también están implicados en el remodelado vascular patológico (Tabla 1). Esta acción bloquea la interacción de los ligandos con los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, suprimiendo la neovascularización y reduciendo la permeabilidad vascular.

La evidencia experimental espalda que la inhibición simultánea de VEGF-B y PlGF reduce la neovascularización coroidea (CNV) y sugiere que el PlGF actúa de manera sinérgica con VEGF en la promoción de la patología vascular en la DMAE húmeda [47].

3.4. Brolucizumab®

Brolucizumab® es un fragmento variable de cadena simple (scFv) humanizado que actúa como un potente inhibidor del VEGF-A (Tabla 1). Este scFv comprende los dominios de las cadenas ligera y pesada variables de un anticuerpo monoclonal, unidos por un enlace flexible. Este tamaño reduce la inmunogenicidad, aumenta la biodisponibilidad y permite mejor penetración en los tejidos oculares. [28].

Se trata de un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que actúa sobre las principales isoformas del VEGF-A. La inhibición de estas isoformas reduce la proliferación de células endoteliales, la vascularización del tejido y la permeabilidad de los vasos sanguíneos.

Fue creado mediante ingeniería farmacéutica a partir de fragmentos de anticuerpos de cadena simple (scFv) completamente humanos, obtenidos de ADNc de bazo humano. Estos scFv demostraron ser altamente estables y solubles. Posteriormente, se modificaron insertando regiones determinantes de complementariedad (CDR) derivadas de un anticuerpo anti-VEGF de conejo, lo que permitió generar un scFv humanizado con alta afinidad por VEGF. El resultado es *Brolucizumab*®, una molécula con un peso molecular de aproximadamente 26 kDa, siendo el anticuerpo anti-VEGF más pequeño evaluado en humanos [48].

3.5. Faricimab® (RG7716)

Faricimab® es el primer anticuerpo monoclonal biespecífico diseñado para uso intravítreo (Tabla 1), con un peso molecular de 150 kDa y desarrollado mediante la tecnología CrossMAb CH1-CL, que utiliza un mecanismo de ensamblaje tipo "knob and hole" para permitir la correcta unión entre cadenas pesadas heterodiméricas. A diferencia de los anticuerpos monoespecíficos tradicionales, *Faricimab*® cuenta con cadenas ligeras distintas en cada región Fab, lo que le permite unirse simultáneamente a dos dianas terapéuticas: el VEGF-A y la angiopoyetina-2 (ANG-2).

Esta doble especificidad permite neutralizar y agotar de forma eficiente ambos factores proangiogénicos, cuya coexpresión está fuertemente implicada en la fisiopatología de las enfermedades vasculares retinianas. El bloqueo conjunto de VEGF-A y ANG-2 ha demostrado ser más eficaz que la inhibición individual, ya que reduce de manera más significativa el número de lesiones vasculares, la permeabilidad vascular y el edema retiniano y la pérdida neuronal en modelos experimentales de neovascularización coroidea (CNV) [49].

3.6. Abicipar pegol® (AGN-150998)

Abicipar® es una proteína recombinante de la familia DARPIn (Designed Ankyrin Repeat Protein) de 14 kDa acoplada a una moiety de polietilenglicol (PEG) de 20 kDa, lo que da lugar a una molécula de 34 kDa (Tabla 1). Las

proteínas DARPIn se basan en repeticiones de anquirina presentes de forma natural en proteínas multifuncionales, conocidas por su capacidad de interacción con múltiples moléculas. En el caso de *Abicipar*[®], su diseño incluye una pila de repeticiones internas, flanqueadas por repeticiones terminales (N- y C-Caps) que estabilizan el núcleo hidrofóbico de la proteína. La disposición específica de aminoácidos en la superficie de estas repeticiones internas forma un parátipo que permite la unión altamente específica y con gran afinidad a su proteína diana [50]. Esta estructura, le permite unirse y neutralizar eficazmente al VEGF-A, en particular a VEGF-A₁₆₅, con una con una afinidad y potencia comparables a las de *Aflibercept*[®] y superiores a las de *Ranibizumab*[®] y *Bevacizumab*[®]. Además, *Abicipar* bloquea eficazmente tanto la angiogénesis como la permeabilidad vascular. Estos datos respaldan su uso como tratamiento para enfermedades retinianas caracterizadas por neovascularización y fuga vascular. [51].

Tabla 1. Características comerciales de los principales fármacos anti-VEGF A.

Fármaco	Mecanismo de acción	Frecuencia de aplicación	Perfil de seguridad	Ventajas	Desventajas	Fase clínica	Laboratorio
Ranibizumab [®]	Anticuerpo fragmentado contra VEGF-A	Mensual	Endoftalmitis (0.1-1.4%), uveítis (0-1.3%)	Buen control visual a corto plazo	Costoso, requiere inyecciones frecuentes	Aprobado	Novartis, Genentech
Aflibercept [®]	Proteína de fusión que inhibe VEGF-A, VEGF-B y PlGF	Cada 8 semanas o mensual	Baja incidencia de eventos trombóticos (0.7-2.6%)	Intervalos más largos entre inyecciones	Riesgo de eventos trombóticos, efecto temporal	Aprobado	Regeneron, Bayer
Bevacizumab [®]	Anticuerpo monoclonal anti-VEGF-A (uso off-label)	Mensual o según necesidad	Mayor incidencia de eventos adversos sistémicos (24.1% vs 19% en <i>Ranibizumab</i> [®])	Costo más bajo	No aprobado para uso ocular, posible menor consistencia en formulación	Aprobado (uso off-label)	Genentech
Brolucizumab [®]	Fragmento de anticuerpo anti-VEGF-A (baja masa molecular)	Cada 12 semanas después de dosis de carga	Inflamación intraocular (4.7%), oclusión vascular retiniana	Mejor penetración en retina y coroides	Alta incidencia de inflamación intraocular	Aprobado	Novartis
Faricimab [®]	Anticuerpo biespecífico contra VEGF-A y Ang-2	Cada 12-16 semanas	Baja incidencia de inflamación intraocular (1.2-2.0%)	Tratamiento más duradero	Riesgo potencial de inflamación ocular, aunque bajo	Aprobado	Roche, Genentech
Abicipar [®]	Proteína DARPIn que inhibe VEGF-A	Cada 6-8 semanas	Alta incidencia de inflamación intraocular (8.9%-15.4%)	Menor frecuencia de inyecciones	Alta inflamación ocular, rechazo por FDA	Fase III (rechazada por FDA)	Allergan

4. Docking molecular

El docking molecular es uno de los métodos in silico basados en la estructura más populares y exitosos utilizado el diseño racional de fármacos, especialmente en las etapas iniciales del descubrimiento. Este enfoque,

permite identificar nuevos compuestos de interés terapéutico, así como predecir cómo se posicionan e interaccionan ligandos en los sitios activos de macromoléculas diana.

En la industria farmacéutica, su uso se ha consolidado como una de las metodologías más potentes de la química medicinal moderna, no solo para analizar relaciones estructura-actividad (SAR), sino también para determinar datos farmacodinámicos (como la potencia, afinidad, eficacia y selectividad) y propiedades farmacocinéticas (ADMET: absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) [52].

Además de estas aplicaciones más tradicionales, el docking se ha integrado en flujos de trabajo más complejos que incluyen dinámica molecular o inteligencia artificial. lo que amplía su utilidad en la predicción de efectos adversos, el diseño de compuestos multitarget y la identificación de nuevos usos terapéuticos para moléculas conocidas [53].

Sin embargo, es especialmente importante destacar el papel del docking molecular como paso previo fundamental antes de llevar a cabo ensayos in vitro e in vivo. Esta técnica permite evaluar y priorizar compuestos en función de su afinidad de unión al ligando objetivo, descartando así aquellos con baja probabilidad de éxito y optimizando los recursos destinados al desarrollo experimental. En este contexto, el docking no solo orienta la síntesis de nuevos candidatos, sino que valida estructuralmente su viabilidad como futuros agentes terapéuticos [54].



ANTECEDENTES

Actualmente, la pérdida irreversible de la visión representa uno de los principales desafíos globales, no solo desde el punto de vista médico, sino también socioeconómico. La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) ocupa el tercer lugar entre las causas más comunes de ceguera a nivel mundial, después de las cataratas y el glaucoma, y su prevalencia continúa en aumento [55]. En 2020, se estimaba que 196 millones de personas padecían DMAE, y se proyecta que esta cifra alcanzará los 288 millones para el año 2040 [35]. Frente a este panorama, el desarrollo de tratamientos eficaces constituye una prioridad urgente en el ámbito de la salud pública.

El primer enfoque terapéutico propuesto, en la década de 1980, fue la fotocoagulación con láser, un procedimiento que, si bien ofrecía cierto control de la enfermedad, conllevaba efectos secundarios severos. Afortunadamente, a partir del siglo XXI, el descubrimiento de nuevas dianas moleculares y la validación de agentes terapéuticos innovadores han impulsado de forma significativa la evolución del tratamiento de la DMAE [4].

En este contexto, dada la alta prevalencia de la enfermedad y la necesidad creciente de terapias más eficaces y seguras, el uso de herramientas computacionales como el docking molecular y otras técnicas de modelado estructural se ha consolidado como una estrategia fundamental en las etapas iniciales del desarrollo farmacológico. Estas metodologías permiten predecir, de manera rápida y rentable, la interacción entre fármacos candidatos y sus dianas moleculares, facilitando la selección racional de compuestos con mayor potencial terapéutico antes de avanzar a estudios in vivo.

Actualmente, numerosos estudios han incorporado estas herramientas en sus metodologías con el objetivo de predecir la eficacia de diferentes compuestos con potencial terapéutico en el tratamiento de diversas enfermedades de elevada incidencia en la sociedad, como la tuberculosis [56] o el cáncer [57]. Además, el uso de estos enfoques permite encontrar las dianas moleculares correspondientes a diversos compuestos bioactivos, [58] [59], así como determinar su mecanismo molecular [60] [61]; lo cual puede ayudar en la creación de nuevas terapias específicas para distintas enfermedades. Por otro lado, en el campo de la nanotecnología, avances recientes en técnicas de modelado molecular, han permitido predecir la interacción entre nanopartículas como ZnO, CuO, Ag y Au y macromoléculas de origen biológico [62]

OBJETIVOS

General:

Comparar las interacciones proteína-proteína entre distintos fármacos anti-VEGF y la proteína VEGF-A, mediante técnicas de modelado estructural y acoplamiento molecular, con el fin de evaluar diferencias en afinidad, estabilidad y características estructurales que puedan influir en su eficacia terapéutica en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad en su forma húmeda (DMAE húmeda).

Específicos:

- Obtener y preparar las estructuras cristalográficas de proteínas anti-VEGFA a partir del *Protein Data Bank* (PDB), empleando herramientas de modelado estructural para su posterior análisis.
- Predecir la estructura tridimensional de proteínas anti-VEGFA no resueltas por cristalografía de rayos X, utilizando la plataforma SWISS-MODEL.
- Ensamblar dominios estructurales de proteínas anti-VEGFA modeladas por homología, asegurando la integridad conformacional para su aplicación en estudios de acoplamiento molecular (docking).
- Detectar residuos activos implicados en interacciones proteína-proteína mediante el software de aprendizaje automático P2Rank, con el fin de predecir sitios potenciales de unión.
- Analizar las interacciones proteína-proteína entre fármacos anti-VEGF y la proteína VEGF-A utilizando HADDOCK, evaluando afinidad, estabilidad y propiedades estructurales de los complejos generados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Bases de datos y selección de estructuras.

Se realizó la búsqueda y selección de las estructuras correspondientes a cada uno de los fármacos a analizar, así como de la proteína VEGF-A. Para ello, se utilizó la base de datos Protein Data Bank (PDB, RCSB, Rutgers University, NJ, USA) (<https://www.rcsb.org/> accedido el 14 de octubre 2024) [63], desde la cual se descargaron las estructuras completas de *Bevacizumab*[®] (PDB: [7V5N](#)) y al VEGF-A (PDB: [1VPE](#)) en formato .pdb (ver Tabla 2).

En el caso del resto de los fármacos, no se encontraron disponibles sus estructuras cristalográficas completas en dicha base de datos. Por ello, fue necesario recurrir a enfoques alternativos para la obtención de sus modelos.

2. Obtención de secuencias para modelado por homología con SWISS-MODEL

Se obtuvieron las secuencias en formato FASTA correspondientes a los fármacos anti-VEGF con el fin de realizar un modelado por homología utilizando el servidor SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) [64], lo que permitió generar sus respectivas estructuras tridimensionales en formato .pdb. Las secuencias fueron obtenidas, por un lado, para *Ranibizumab*[®] ([DB01270](#)), desde la base de datos DrugBank (University of Alberta, Edmonton, Canada) (<https://go.drugbank.com/> accedido el 2 abril 2025) [65], y por otro para *Brolucizumab*[®] ([D11083](#)) y *Abicipar pegol*[®] ([D11517](#)) a partir de la base de datos Kegg (Kyoto University Bioinformatics Center, Kyoto, Japan) (<https://www.genome.jp/kegg/> accedido el 13 Abril 2025) [66] (Tabla 2).

3. Modelado por fragmentos para la obtención de Aflibercept[®] y Faricimab[®]

Como alternativa a las metodologías previamente descritas, se recurrió al modelado por fragmentos para los fármacos *Aflibercept*[®] y *Faricimab*[®].

En el caso de *Aflibercept*[®], su estructura completa no se encuentra disponible en la base de datos Protein Data Bank. Aunque su secuencia en formato FASTA está registrada en DrugBank ([DB08885](#)), al introducirla en el servidor SWISS-MODEL, ninguno de los modelos generados mediante modelado por homología logró representar la secuencia completa. Por esta razón, se optó por el modelado por fragmentos. Para ello, se consideró que *Aflibercept*[®] es una proteína de fusión recombinante completamente humana, compuesta por el segundo dominio de unión del receptor VEGFR-1, el tercer dominio de unión del VEGFR-2, y la región Fc de una inmunoglobulina G1 (IgG1) humana. Con base en esta información, se procedió a buscar por separado la estructura de cada uno de sus componentes.

El dominio de unión 2 del VEGFR-1 (PDB: [5ABD](#)) y la región Fc de una IgG1 humana (PDB: [5VGP](#)) se obtuvieron en formato .pdb desde la base de datos Protein Data Bank. En cuanto al dominio de unión 3 del VEGFR-2, se extrajo su secuencia a partir de la proteína completa ([P35968](#)) disponible en UniProt (UniProt Consortium, European Bioinformatics Institute, Hinxton, UK) (<https://www.uniprot.org/> accedido el 4 de mayo 2025) [67]. Esta secuencia, en formato FASTA, fue luego introducida en SWISS-MODEL para generar su estructura tridimensional.

Por otro lado, para el caso de *Faricimab*[®], tampoco se dispone de su estructura completa en la Protein Data Bank. Si bien su secuencia en formato FASTA está registrada en KEGG ([D11516](#)), los modelos obtenidos mediante SWISS-MODEL tras introducir la secuencia completa sólo cubrían una porción muy limitada del total. Por ello, al igual que con *Aflibercept*[®], se optó por el modelado por fragmentos. En este caso, se contó con la secuencia individual en formato FASTA de cada una de las cuatro cadenas que conforman el fármaco: cadena A (cadena pesada anti-VEGF), cadena B (cadena pesada anti-Ang2), cadena C (cadena ligera anti-VEGF) y cadena D (cadena ligera anti-Ang2).

4. Refinamiento de estructuras y ensamblaje de dominios.

Se llevó a cabo un proceso de depuración estructural en algunas de las moléculas previamente obtenidas, específicamente en aquellas descargadas directamente en formato .pdb desde la base de datos Protein Data Bank. En muchos de estos archivos, además de la molécula de interés, se incluyen otras entidades (como ligandos, iones o solventes cristalográficos) que pueden interferir en los análisis posteriores de interacción molecular. Para la limpieza de estas estructuras se utilizó el software Swiss-PDB Viewer (<https://spdbv.unil.ch/>) [68], una herramienta que permite visualizar, editar y analizar estructuras en formato .pdb.

En el caso de *Bevacizumab*[®], la estructura obtenida de la Protein Data Bank correspondía a un complejo con un aptámero de ADN. Por ello, se eliminó la cadena correspondiente al aptámero, así como otras moléculas presentes en el cristal, incluyendo 1,2-etanoediol, iones sulfato, imidazol y moléculas de agua (ver Tabla 2). Asimismo, se limpiaron las estructuras correspondientes al dominio de unión 2 del VEGFR-1 (PDB: [5ABD](#)) y a la región Fc de IgG1 humana (PDB: [5VGP](#)), ambas también descargadas desde la Protein Data Bank y destinadas a la posterior construcción del modelo de *Aflibercept*[®]. En estos casos, se eliminaron iones de sodio, cobre y sulfato en el dominio de unión 2 del VEGFR-1, así como los oligosacáridos presentes en la Fc de la IgG1 humana.

Una vez completada la limpieza estructural, se procedió al ensamblaje de las cadenas constituyentes de *Faricimab*[®] y de los dominios que componen *Aflibercept*[®]. Para ello, se utilizó PyMOL, un software de visualización y edición de estructuras moleculares de código abierto (<https://www.pymol.org/>) [69].

Durante este proceso, se observó que algunas cadenas parecían superponerse espacialmente al ser cargadas en PyMOL. Esta situación es común en el modelado por fragmentos, ya que las coordenadas atómicas de las estructuras generadas por separado suelen estar centradas en el origen del sistema de coordenadas tridimensional (0,0,0). Como resultado, al importar múltiples cadenas independientes sin ajustes previos de orientación o posición relativa, estas se visualizan solapadas. Este fenómeno es esperable y se resuelve posteriormente mediante alineamiento y ensamblaje estructural adecuados.

Ante este problema, la mejor opción es alinear las cadenas según una plantilla. Para ello se emplearon las siguientes estructuras descargadas del Protein Data Bank como plantillas para modelar el *Faricimab*[®] [49]:

- (PDB: [4IML](#)): Estructura de CrossFab anti-Ang2, que representa la porción de unión a Angiopoietina-2.

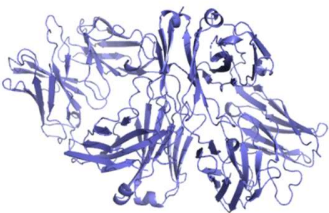
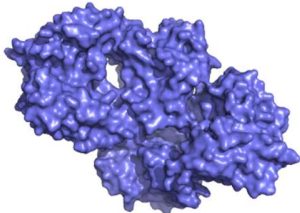
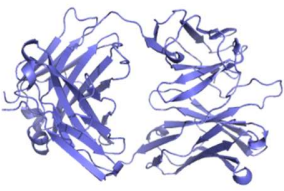
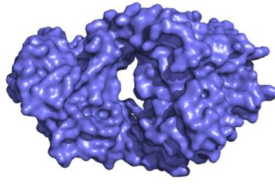
- (PDB: [1CZ8](#)): Estructura de un Fab anti-VEGF, correspondiente a la porción de unión a VEGF-A.
- (PDB: [1HZH](#)): Estructura de una IgG1 completa, utilizada para modelar la región Fc.

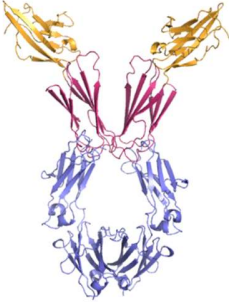
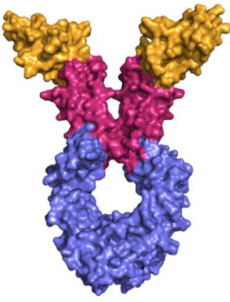
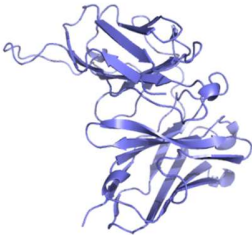
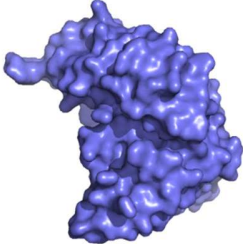
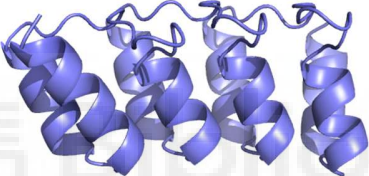
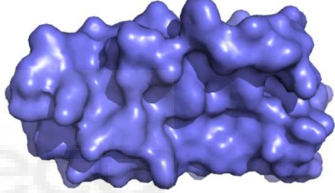
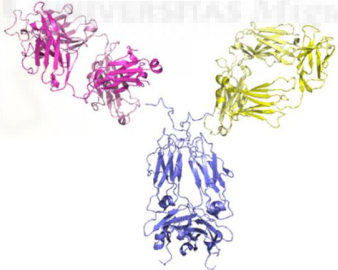
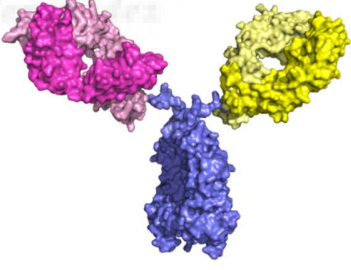
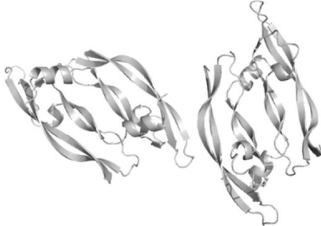
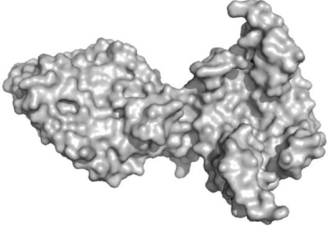
Estas estructuras se limpiaron empleando el programa Swiss-PDB Viewer y eliminando los oligosacáridos que aparecen en el archivo (PDB: [1HZH](#)) y los ligandos que aparecen en los archivos (PDB: [1CZ8](#)) y (PDB: [4IML](#)). A continuación, se cargaron todos los archivos (los correspondientes a las cadenas y a las plantillas) en Pymol, (*my_A*, *my_B*, *my_C*, *my_D*, *ref_Ang2*, *ref_VEGF*, *ref_IgG*) y se asignaron nombres de cadena únicos a los modelos, para que cada cadena esté representada por una única letra. Tras esto, ya se puede pasar al alineamiento de las estructuras.

En primer lugar, se seleccionó una de las plantillas como referencia central para alinear las cadenas y el resto de plantillas respecto a esta. La plantilla elegida como referencia fue la correspondiente a la estructura de la IgG1 (PDB: [1HZH](#)), ya que contiene la región Fc completa y además es ideal como base para construir la geometría global del anticuerpo. Una vez hecho esto, primero se alinearon las dos plantillas restantes: *ref_Ang2* (PDB: [4IML](#)) y *ref_VEGF* (PDB: [1CZ8](#)) a la de referencia *ref_IgG* (PDB: [1HZH](#)) y en segundo lugar las cadenas modelo (*my_A*, *my_B*, *my_C*, *my_D*) a las plantillas ya alineadas. Para realizar este segundo paso, se deben de tener en cuenta las cadenas pesadas y ligeras de cada plantilla para poder llevar a cabo el alineamiento correctamente. Tras esto, se obtuvo la estructura final de *Faricimab*[®] (Tabla 2).

Por otro lado, en el caso de *Aflibercept*[®] se cargaron las estructuras correspondientes al dominio de unión 2 del VEGFR-1 (PDB: [5ABD](#)), dominio de unión 3 del VEGFR-2 y Fc de una IgG1 humana (PDB: [5VGP](#)) en el programa UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) [70], donde teniendo en cuenta los residuos terminales de las misma se llevó a cabo el ensamblaje de la estructura final (Tabla 2).

Tabla 2. Estructuras finales representativas de cada uno de los fármacos involucrados en el estudio, así como de su diana molecular, el VEGF-A. Representaciones en “cartoon” (a la izquierda) y “surface” (a la derecha), obtenidas empleando el sistema de visualización y edición de estructuras moleculares PyMOL (<https://www.pymol.org/>) [69].

Bevacizumab[®] (PDB: 7V5N)		
Ranibizumab[®] (PDB: DB01270)		

Aflibercept®		
Brolucizumab® (D11083)		
Abicipar® (D11517)		
Faricimab®		
VEGF-A (PDB: 1VPF)		

5. Identificación de residuos activos de las proteínas con el software P2RANK.

Se llevó a cabo la identificación de residuos activos de cada una de las moléculas empleando la herramienta basada en aprendizaje automático P2RANK (<https://prankweb.cz/> accedido el 7 de mayo 2025) [71], el cual predice lugares de unión a ligandos en las proteínas. Tras el análisis de cada una de las estructuras se generan una serie de archivos, de los cuales nos centramos en aquel con formato “.pdb_predictions.csv”. Este archivo contiene una tabla

de todos los sitios de unión predichos (pockets), de los cuales nos quedaremos con el que presenta rank = 1 y mayor puntuación (score), ya que se trata del sitio activo más probable. Además, en la tabla, aparecen indicados los residuos involucrados en dicho sitio activo (residues), que es lo que nos interesa para posteriormente poder realizar el análisis comparativo de interacciones proteína-proteína.

6. Análisis comparativo de interacciones proteína-proteína entre VEGF-A y fármacos anti-VEGF.

Para llevar a cabo el análisis de interacciones proteína-proteína entre el VEGF-A y los diferentes fármacos se empleó HADDOCK (<https://rascar.science.uu.nl/haddock2.4/> accedido el 20 mayo 2025) [72], un software de docking informático que predice cómo 2 o más moléculas interactúan entre sí. Se usaron para ello los parámetros por defecto.

Cabe destacar que el programa funciona en tres etapas principales:

- It0 (Docking rígido): las moléculas se tratan como cuerpos rígidos. Se generan 1000 complejos iniciales con y se prueban diferentes orientaciones entre las moléculas
- it1 (Refinamiento semiflexible): se permite cierta flexibilidad en la zona de interacción. Se seleccionan las 200 mejores para esta etapa
- itw (Refinamiento en agua): se refinan los 100 mejores modelos en entorno acuoso.

Previamente a la ejecución del programa se introdujeron para cada uno de los fármacos, los residuos determinados por el programa P2RANK como los involucrados en el sitio activo más probable, con el fin de restringir el análisis de interacciones. Tras esto, el programa genera valores para una serie de parámetros entre los que están:

- Puntuación HADDOCK: es el principal criterio para seleccionar entre diferentes clústeres y modelos. En su cálculo se consideran la energía de Van der Waals, energía electrostática, energía de desolvatación y penalizaciones por violación de restricciones. Cuanto más negativo, más estable es el complejo.
- Tamaño del clúster: es el número de modelos similares agrupados en un mismo clúster (basándose en el RMSD estructural). Un clúster grande indica que ese modelo de acoplamiento se repite en varios de los complejos generados por el programa, lo que sugiere que la solución es más confiable.
- RMSD de la estructura global de menor energía: se trata de la desviación cuadrática media respecto a la mejor estructura del clúster. Cuanto menor es, más parecidas son entre si las estructuras que del clúster.
- Energía de Van der Waals, electrostática, de desolvatación y violación de restricciones de energía: parámetros energéticos que nos dan una idea de la fuerza y tipo de interacción predominante. Cuanto menor sea su valor más favorable es la interacción.
- Área de superficie enterrada: es el área que queda oculta al formarse el complejo. Cuanto más superficie enterrada, más fuerte y específica suele ser la interacción
- Z score: mide cuán buena es una solución en comparación con las demás. Cuanto más negativo sea el valor, mejor.

RESULTADOS

1. Predicción de sitios activos en las proteínas con el software P2RANK.

El análisis con la herramienta basada en aprendizaje automático P2RANK (<https://prankweb.cz/>) [71], nos predice potenciales lugares de unión a ligandos en las proteínas, y nos proporciona una serie de parámetros de gran utilidad, como nº de sitios activos y el rank que ocupa cada uno de ellos considerando diferentes valores como la probabilidad de que ese sitio de unión sea real (derivada de aprendizaje automático), la conservación evolutiva (valores más altos indican que los residuos están más conservados entre especies, lo que sugiere importancia funcional) o la puntuación obtenidas tras el análisis (cuanto mayor sea, más probable es que ese sitio sea funcional), con el fin de estimar cuál de ellos es el más representativo. Aunque en el análisis se identificaran varios sitios activos para los diferentes fármacos, sólo consideraremos los datos de los grupos de residuos activos con puntuaciones considerablemente superiores al resto.

Tabla 3. Resultados obtenidos en el análisis de predicción de sitios activos de los diferentes fármacos empleando la herramienta basada en aprendizaje automático P2RANK.

Fármaco	Nº sitios activos	Rank	Puntuación	Probabilidad	Nº residuos	Conservación
Ranibizumab®	7	1	8.94	0.526	12	0.308
		2	4.23	0.186	11	0.266
Aflibercept®	3	1	2.43	0.065	10	1.199
		2	2.02	0.043	10	1.007
Bevacizumab®	10	1	8.74	0.514	11	0.358
		2	8.33	0.489	11	0.489
Brolucizumab®	5	1	4.16	0.180	12	0
		2	2.24	0.055	10	1.341
Faricimab®	23	1	6.81	0.381	14	0.774
Abicipar®	2	1	1.8	0.033	6	0.598
		2	0.98	0.006	7	0.465
VEGF-A®	9	1	6.69	0.371	17	2.485

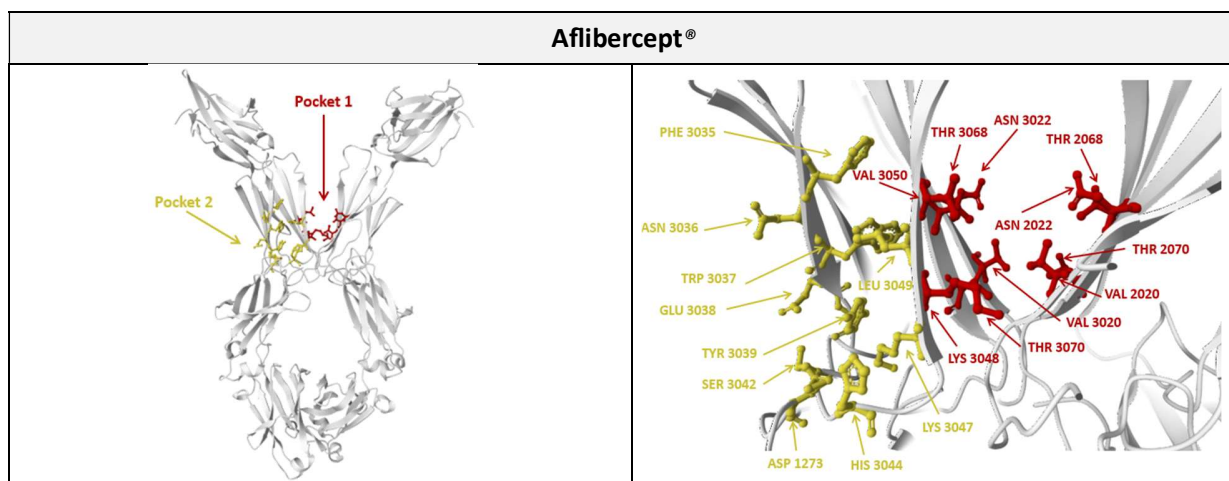
En el caso de *Bevacizumab*® se identificaron 10 grupos de residuos activos, de los cuales solo se consideraron los dos primeros en el rank, ya que el resto presentaron puntuaciones considerablemente bajas en comparación con la de los seleccionados (8.74 y 8.33 respectivamente). Estos sitios activos formados por 11 residuos cada uno (Tabla 4), obtuvieron unos valores de probabilidad de 0.514 y 0.489, y 0.358 y 0.489 de conservación respectivamente (Tabla 3). *Ranibizumab*® presentó una totalidad de 7 sitios activos, de los cuales se consideran 2 de ellos, con 12 y 11 residuos (Tabla 4) y puntuaciones de 8.94 y 4.23 respectivamente. Además, se obtuvieron para estos, valores de probabilidad de 0.526 y 0.186 y de conservación de 0.308 y 0.266 (Tabla 3). Siguiendo en esta línea tenemos a *Brolucizumab*®, con

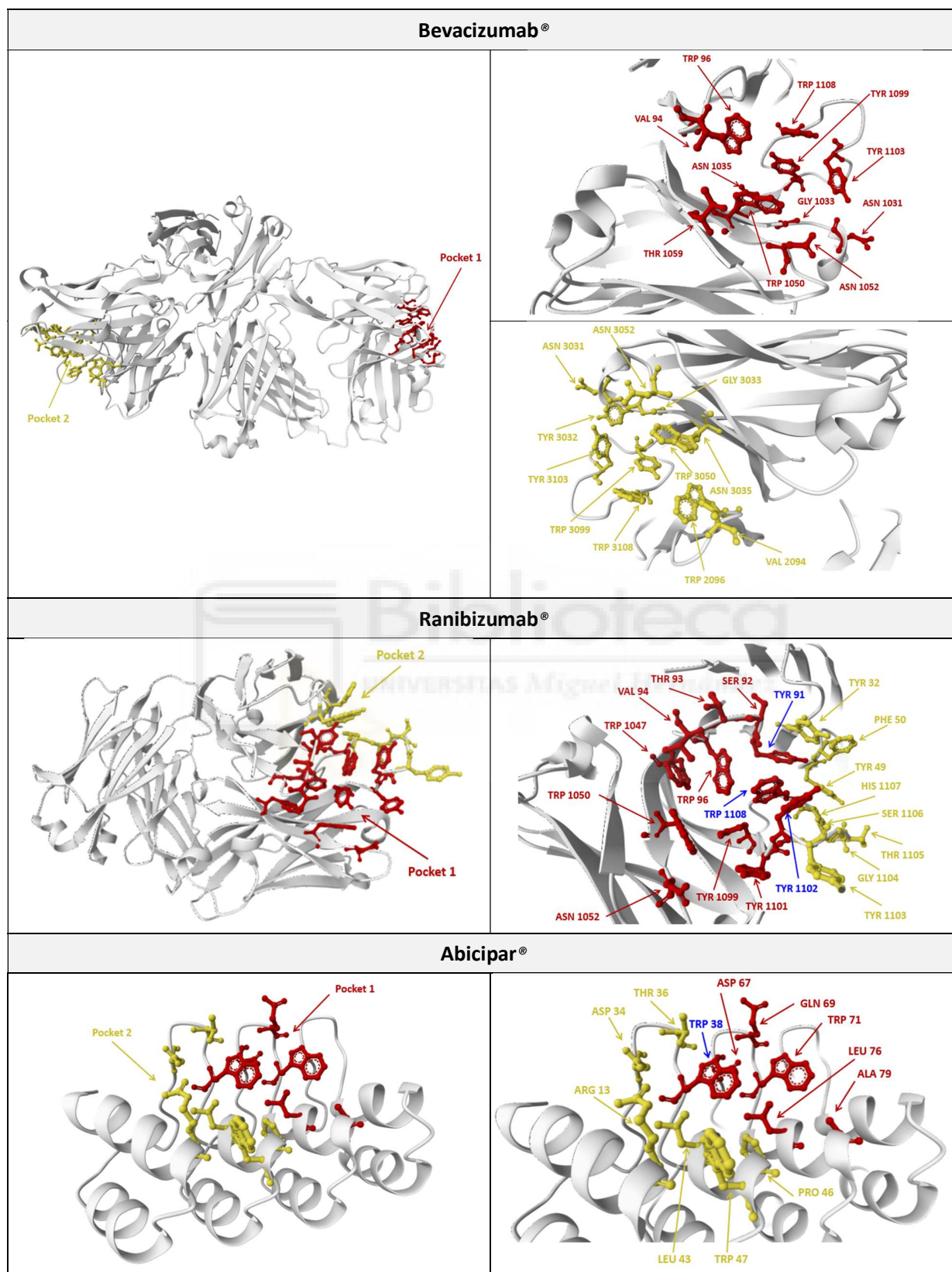
5 grupos de residuos activos identificados. Los 2 primeros, de 12 y 10 aminoácidos (Tabla 4), presentan puntuaciones de 4.16 y 2.24 respectivamente, y valores de probabilidad fueron de 0.180 y 0.055. Por otro lado, no hubo conservación de los residuos en el sitio activo con rank 1, aunque sí que la hubo para el restante (1.341) (Tabla 3). *Aflibercept*[®] presentó 3 sitios activos, donde 2 de ellos (formados por 10 residuos cada uno) (Tabla 4) obtuvieron una puntuación significativamente más alta (2.43 y 2.02), así como valores de conservación (1.199 y 1.007). Los valores de probabilidad registrados fueron de 0.065 y 0.043.

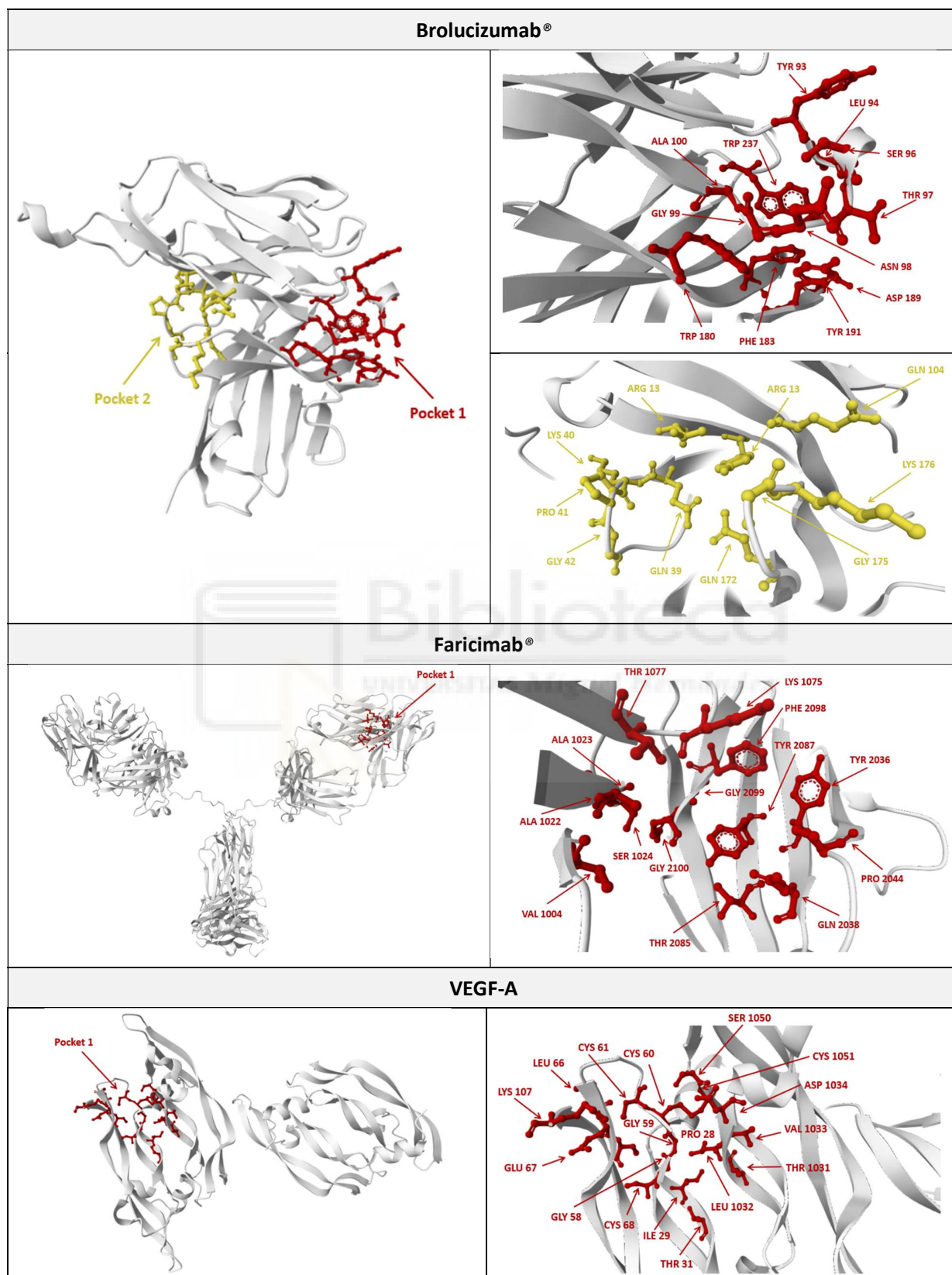
En el caso de *Faricimab*[®], se identificaron 23 sitios activos tras el análisis, de los cuales, a 1 de ellos (de 14 residuos) (Tabla 4) se le otorgó una puntuación considerablemente superior al resto (6.81 y 6.32). El valor de probabilidad fue de 0.381, mientras que el de conservación fue 0.774 (Tabla 3). Mientras tanto, para *Abicipar*[®] sólo se identificaron 2 grupos de residuos activos de 6 y 7 aminoácidos respectivamente (Tabla 4) y puntuaciones bastante bajas en comparación con el resto de fármacos (1.8 y 0.98). En este caso los valores de probabilidad también fueron bajos (0.033 y 0.006), mientras que la conservación de los residuos activos fue mayor (0.598 y 0.465) (Tabla 3).

Finalmente, en la molécula de VEGF-A se identificaron 9 sitios activos diferentes de los cuales, solo consideraremos el primero (formado por 17 residuos) (Tabla 4). Este presentó una puntuación significativamente más alta que el resto (6.69), y un valor de probabilidad de 0.371. Por último, cabe destacar que la molécula de VEGF-A obtuvo el valor más alto de conservación (2.485) (Tabla 3).

Tabla 4. Izquierda: Estructuras de los diferentes fármacos involucrados en el estudio y del VEGF-A con los principales sitios activos (pockets 1 y 2) identificados por P2RANK señalados. Derecha: detalle de los residuos que conforman cada sitio activo (rojo = pocket rank 1, amarillo = pocket rank 2, azul = residuos pertenecientes a ambos sitios activos).







2. Análisis interacciones proteína-proteína entre fármacos anti-VEGF y VEGF-A con HADDOCK.

Considerando la notación de los residuos que componen el sitio activo más probable predicho por P2RANK para cada uno de los fármacos, se ejecutó el software de docking informático HADDOCK 2.4 (<https://rascar.science.uu.nl/haddock2.4/>) [72], con el fin de analizar las interacciones proteína-proteína entre cada uno de estos y su diana molecular, el VEGF-A.

El análisis con este software, el cual se basa en información experimental y permite la simulación física flexible, generó una serie de resultados que nos permite deducir la calidad, estabilidad y confiabilidad del complejo formado, así como visualizar la orientación relativa de las moléculas participantes, es decir, ver cómo se unen en un espacio 3D.

Para nuestros complejos fármaco anti-VEGF-VEGF-A, los resultados obtenidos en el análisis para cada uno de los parámetros descritos previamente, se pueden ver reflejados a continuación (Tabla 5). Cabe destacar que para el estudio sólo se considera el clúster obtenido con HADDOCK score más negativo para cada una de las interacciones.

Tabla 5. Valores obtenidos en cada parámetro para las interacciones proteína-proteína entre cada uno de los fármacos anti-VEGF y el VEGF-A, obtenidos mediante HADDOCK 2.4 (<https://rascar.science.uu.nl/haddock2.4/>) [72]

	Abicipar®- VEGF	Aflibercept®- VEGF	Bevacizumab®- VEGF	Brolucizumab®- VEGF	Faricimab®- VEGF	Ranibizumab® -VEGF
Puntuación HADDOCK	-109.3 +/- 5.1	-93.4 +/- 4.9	-114.7 +/- 2.1	-88.2 +/- 3.3	-76.1 +/- 12.4	-103.6 +/- 7.5
Tamaño del clúster	89	21	20	168	4	19
RMSD de la estructura global de menor energía	2.9 +/- 0.3	10.4 +/- 0.4	23.1 +/- 0.3	9.0 +/- 0.5	0.9 +/- 0.5	0.8 +/- 0.5
Energía de Van der Waals	-63.2 +/- 3.4	-58.8 +/- 4.3	-64.5 +/- 0.8	-50.7 +/- 5.0	-59.7 +/- 8.0	-60.2 +/- 7.9
Energía electroestática	-190.2 +/- 27.0	-347.7 +/- 49.3	-213.4 +/- 29.0	-252.2 +/- 12.5	-233.2 +/- 19.7	-187.3 +/- 7.8
Energía de desolvatación	-14.4 +/- 5.4	2.5 +/- 3.9	-18.1 +/- 2.7	-12.9 +/- 1.7	0.8 +/- 3.3	-19.9 +/- 3.4
Violación de restricciones de energía	63.3 +/- 27.2	324.5 +/- 21.4	106.0 +/- 37.3	257.6 +/- 52.9	294.7 +/- 62.6	140.2 +/- 34.5
Área de superficie enterrada	2038.2 +/- 155.2	2366.3 +/- 82.6	2332.4 +/- 90.0	1907.1 +/- 108.0	2065.2 +/- 65.2	2027.7 +/- 186.6
Z-Score	-1.1	-1.3	-1.7	-1.4	-1.4	-1.8

En el caso de *Abicipar*[®], se obtuvieron 169 estructuras que se agruparon en 7 clústeres. De ellos, se seleccionó uno de 89 estructuras con una puntuación HADDOCK de -109.3 ± 5.1 y un RMSD de 2.9 ± 0.3 , lo que sugiere poca diferencia estructural entre ellas. En cuanto a las energías, estas presentan valores bastante negativos, donde predomina la energía electrostática (-190.2 ± 27.0) frente al resto. El valor asociado a la violación de restricciones de energía es 63.3 ± 27.2 , y el área de superficie enterrada es de 2038.2 ± 155.2 . Finalmente, el valor Z-score resultante del clúster es de -1.1 (Tabla 5).

Para *Bevacizumab*[®] el software, generó 165 estructuras que se agruparon en 8 clústeres. Se seleccionó en este caso uno que agrupaba 20 estructuras con una puntuación HADDOCK de -114.7 ± 2.1 (la mayor de todos los complejos estudiados), y un RMSD de 23.1 ± 0.3 . Al igual que en el caso de *Abicipar*[®], los valores asociados a las energías fueron bastante negativos, predominando también las energías electrostáticas (-213.4 ± 29.0). El valor asociado a la violación de restricciones de energía es de 106.0 ± 37.3 , y el área de superficie enterrada es de 2332.4 ± 90.0 , lo que nos sugiere que se trata de una interacción bastante fuerte y específica. Finalmente, el valor Z-score resultante del clúster es de -1.7 (Tabla 5).

Por otro lado, *Brolucizumab*[®] obtuvo 197 estructuras agrupadas en 3 clústeres diferentes, de los cuales se tuvo en cuenta en el estudio uno conformado por 168 estructuras que presentó un valor de HADDOCK de -88.2 ± 3.3 , y un RMSD de 9.0 ± 0.5 . Al igual que en los casos anteriores, los parámetros energéticos mostraron valores significativamente negativos, predominando otra vez la energía electrostática (-252.2 ± 12.5). En este caso, el valor asociado a la violación de restricciones de energía es de 106.0 ± 37.3 y el área de superficie enterrada es de 1907.1 ± 108.0 . Por último, el valor Z-score del clúster fue de -1.4 (Tabla 5).

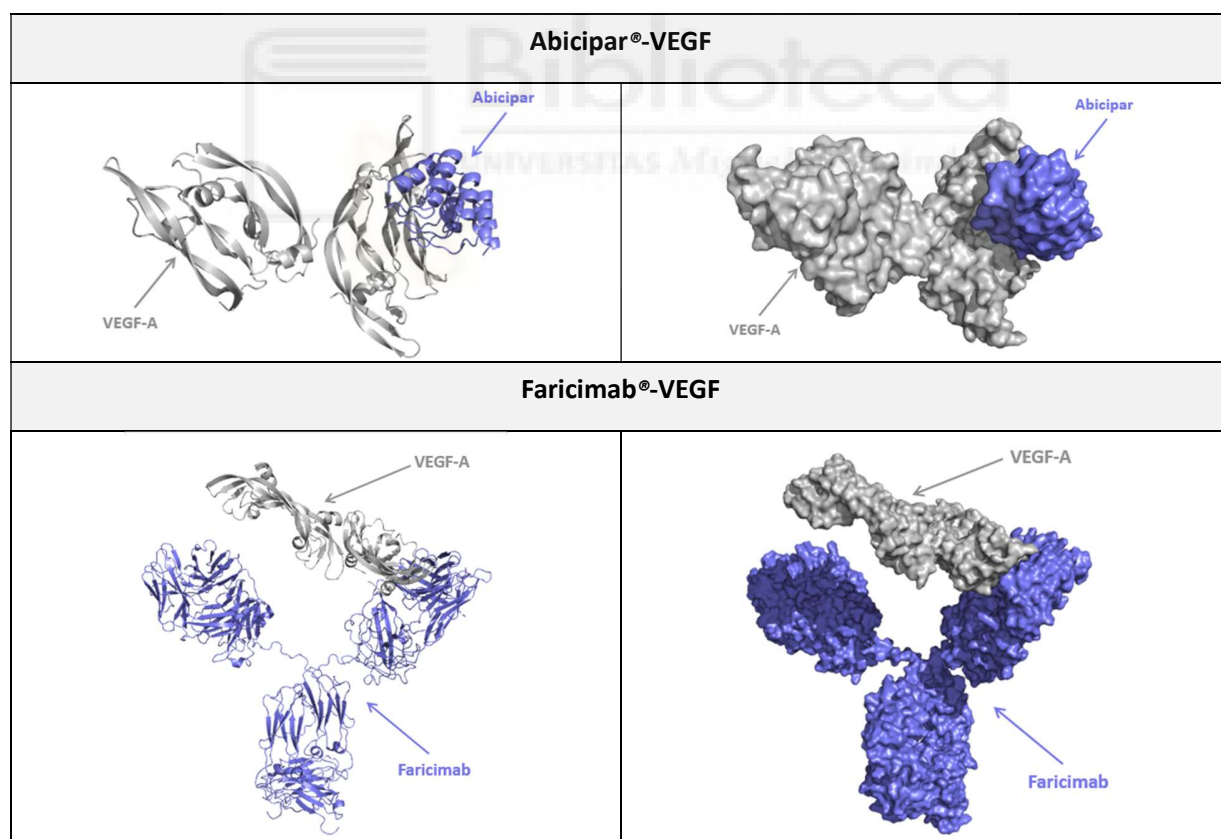
Para el caso de *Aflibercept*[®], el software generó 85 estructuras que fueron agrupadas en 10 clústeres. De todos ellos se seleccionó uno compuesto por 21 estructuras, con un valor de HADDOCK de -93.4 ± 4.9 y un RMSD de 10.4 ± 0.4 . En este caso los valores energéticos presentaron valores negativos, menos el correspondiente a la energía de desolvatación, que presentó un valor positivo de 2.5 ± 3.9 . Sin embargo, volvieron a predominar las interacciones electrostáticas (-347.7 ± 49.3). Por otro lado, tanto el valor asociado a la violación de restricciones de energía como de área de superficie enterrada fueron bastante altos en comparación con los casos anteriores, siendo estos de 324.5 ± 21.4 y 2366.3 ± 82.6 respectivamente. Finalmente, el Z-score para el clúster fue de -1.3 (Tabla 5).

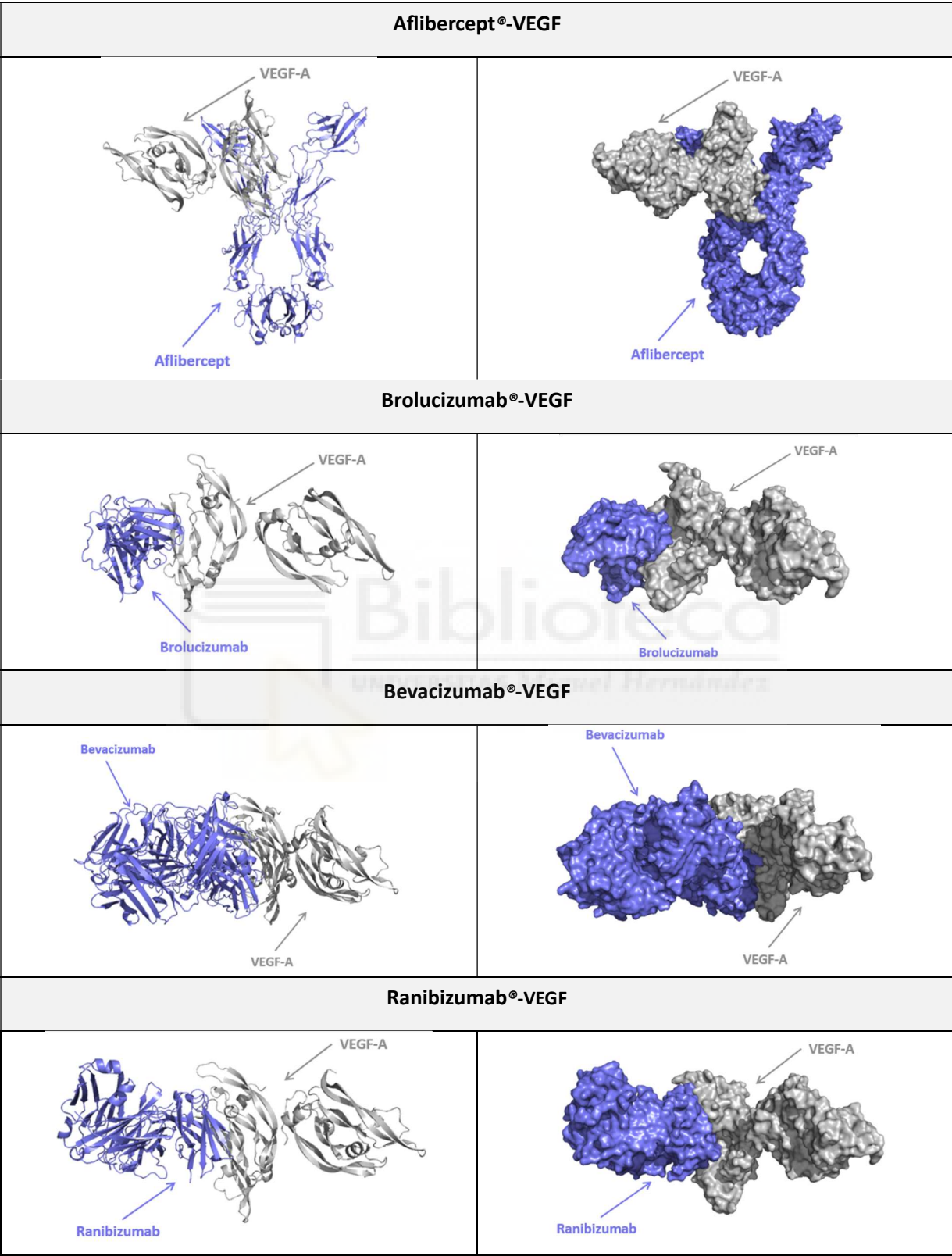
En el análisis de *Faricimab*[®] se generaron 112 estructuras que se dividieron en 12 clústeres diferentes. En este caso el clúster elegido presentó 4 estructuras, un valor de HADDOCK de -76.1 ± 12.4 y un RMSD de 0.9 ± 0.5 , lo que indica gran parecido entre las estructuras que conforman el clúster, algo de esperar si tenemos en cuenta de que se trata de una agrupación pequeña. Los valores energéticos, al igual que en el caso de *Aflibercept*[®], presentaron valores negativos, menos el correspondiente a la energía de desolvatación, que presentó un valor positivo de 0.8 ± 3.3 , y volvió a predominar la energía electrostática (-233.2 ± 19.7). En cuanto al valor relacionado con la violación de restricciones de energía, también fue bastante alto, pero menor que en el caso de *Aflibercept*[®]. Finalmente, el área de superficie enterrada fue de 2065.2 ± 65.2 y el Z-score registrado de -1.4 (Tabla 5).

Por último, tenemos a *Ranibizumab*®, para el cual, el software generó 182 estructuras que fueron agrupadas en 10 clústeres. El clúster seleccionado agrupó 19 estructuras, y presentó un valor de HADDOCK y un RMSD de -103.6 +/- 7.5 y 0.8 +/- 0.5 respectivamente. Este último valor, al igual que en el caso de *Faricimab*®, nos indica gran similitud entre las estructuras agrupadas. Los valores energéticos, como en el caso de *Abicipar*®, *Bevacizumab*® y *Brolucizumab*® fueron negativos, presentando predominancia de energías electrostáticas (-187.3 +/- 7.8). En cuanto al valor asociado a la violación de restricciones de energía fue de 140.2 +/- 34.5 y a la superficie enterrada de 2027.7 +/- 186.6. Finalmente, el Z-score resultante fue de -1.8, el menor obtenido de todos los análisis realizados (Tabla 5).

Además de los parámetros expuestos hasta el momento, HADDOCK te proporciona la estructura representativa asociada a cada uno de los clústeres generados tras el análisis del complejo para poder visualizar como interaccionan en el espacio tridimensional ambas proteínas (Tabla 6).

Tabla 6. Representación gráfica del complejo de interacción formado entre los fármacos anti-VEGF involucrados en el estudio y el VEGF-A obtenidas del software de docking informático HADDOCK 2.4 (<https://rascar.science.uu.nl/haddock2.4/>) [72]. Visualizaciones en “cartoon” (izquierda) y “surface” (derecha) realizadas con el sistema de visualización y edición de estructuras moleculares PyMOL (<https://www.pymol.org/>) [69].





DISCUSIÓN

Diversos estudios científicos respaldan la terapia anti-VEGF como tratamiento de referencia para la degeneración macular húmeda asociada a la edad [43]. En particular, el VEGF-A se reconoce como un factor clave en la neovascularización coroidea, constituyendo de esta forma, la principal diana terapéutica de estas estrategias [31].

En base a esto, y teniendo en cuenta el considerable aumento en la incidencia de la enfermedad en un futuro cercano, continuamente surgen nuevos fármacos dirigidos contra diferentes formas de VEGF y otros factores implicados en el desarrollo de la DMAE tipo húmeda. En este contexto el uso de técnicas computacionales como el docking molecular se ha convertido en una herramienta muy valiosa, sobre todo en las primeras etapas del desarrollo farmacológico, ya que son capaces de predecir la interacción entre fármacos candidatos y sus dianas moleculares, optimizando así la selección de compuestos con mayor potencial terapéutico y reduciendo la necesidad de ensayos costosos en etapas clínicas tempranas.

Empleando estas técnicas *in silico*, se llevó a cabo un análisis de las interacciones entre los fármacos anti-VEGF más populares actualmente (*Bevacizumab*®, *Ranibizumab*®, *Aflibercept*®, *Brolucizumab*®, *Faricimab*® y *Abicipar*®) y su diana molecular, el VEGF-A, con el fin de predecir el candidato más eficaz.

En un primer lugar en el análisis de sitios activos mediante la herramienta P2RANK, las estructuras de *Bevacizumab*®, *Ranibizumab*® y VEGF-A presentaron puntuaciones notablemente superiores, seguidas de *Faricimab*®, *Brolucizumab*®, *Aflibercept*® y *Abicipar*®. Estos valores elevados indican que los residuos identificados conforman cavidades con características estructurales similares a sitios de unión conocidos en proteínas cristalizadas con ligandos. En consecuencia, estas regiones destacan como posibles zonas calientes de interacción, lo que refuerza su relevancia como dianas potenciales para la unión de ligandos de interés. En cuanto a la conservación cabe destacar, el caso de VEGF-A, en el cual la elevada puntuación obtenida, junto con la alta conservación de su sitio activo (notablemente superior a la de los demás bolsillos identificados), podría reforzar su papel como diana terapéutica universal para los fármacos anti-VEGF. Por otro lado, cabe destacar también el caso de *Aflibercept*®, el cual también presentó un alto grado de conservación, lo cual podría correlacionarse con su capacidad de inhibir no solo VEGF-A, sino también PlGF y VEGF-B, ampliando su espectro terapéutico.

Los resultados obtenidos empleando el software HADDOCK posicionaron a *Bevacizumab*®, *Abicipar*® y *Ranibizumab*® como principales agentes anti-VEGF, al presentar una mayor afinidad predicha hacia VEGF-A. Esta predicción se basa en los valores HADDOCK más negativos. Dichos valores se calculan en base a diversos parámetros energéticos como la energía de Van der Waals, electrostática, de desolvatación y penalizaciones por violación de restricciones. Lo que en su conjunto sugiere una fuerte estabilidad y complementariedad entre las moléculas analizadas lo cual podría traducirse en una mayor eficacia inhibidora *in vivo*. No obstante, es fundamental considerar que la potencia y estabilidad de unión no siempre se correlaciona directamente con el perfil clínico óptimo, ya que factores como la inflamación intraocular (elevada en *Abicipar*®, por ejemplo) o la frecuencia de administración juegan

un papel crucial en la práctica médica. Además, cabe señalar que una puntuación HADDOCK score más negativa, no se traduce necesariamente en mejor eficacia clínica, ya que también se deben de tener en cuenta factores farmacodinámicos, fisiológicos e inmunológicos, por ejemplo.

En este contexto y considerando todo lo anterior, podemos deducir que los fármacos *Bevacizumab*® y *Ranibizumab*® se posicionan como los mejores candidatos como agentes anti-VEGF para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, al presentar las mayores puntuaciones tanto en el análisis de sitios activos con P2RANK como en el de interacciones con su molécula diana. Estos resultados concuerdan con diversos estudios en los cuales se proponen estos fármacos como tratamientos eficaces y seguros. Estudios defienden que un protocolo de tratamiento escalonado con *Bevacizumab*® es eficaz para el tratamiento a largo plazo de la DMAE neovascular [73]. Además, existe amplia evidencia que demuestra la igual eficacia del *Bevacizumab*® en comparación con los agentes aprobados por la FDA en el tratamiento de la DMAE neovascular (nAMD) [74][75]. En el caso de *Ranibizumab*®, su eficacia y seguridad en el tratamiento de esta patología ha sido demostrada en dos ensayos clínicos de fase III, prospectivos, multicéntricos internacionales: los estudios ANCHOR [76] (Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic CHORoidal Neovascularization in AMD) y MARINA [77] (Minimally classic/occult trial of the Anti-VEGF antibody Ranibizumab In the treatment of Neovascular AMD) [78], mientras que su eficacia a largo plazo está siendo evaluada actualmente a través del programa LUMINOUS [79].

Por su parte la elevada puntuación de HADDOCK en el caso de *Abicipar*®, se podría explicar por su pertenencia a la familia de las DARPin, proteínas diseñadas artificialmente de tamaño considerablemente inferior a los otros fármacos estudiados. Este menor tamaño podría facilitar su accesibilidad a los sitios activos, presentando valores energéticos más favorables, concretamente en el caso del valor asociado a violaciones de restricciones de energía, en cuyo caso, es considerablemente inferior al resto de candidatos.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos mediante el docking molecular deben de ser interpretados en el marco de sus limitaciones, ya que por ejemplo el modelado por fragmentos empleado en *Faricimab*® y *Aflibercept*®, aunque era necesario dada la falta de estructuras cristalográficas completas, puede introducir errores en la orientación de los dominios o en las interacciones entre las diferentes cadenas que conforman la molécula. Por otra parte, la ausencia de simulaciones dinámicas limita la evaluación de los complejos en un entorno que simule las condiciones fisiológicas.

Pese a todo esto, la aproximación computacional resulta de gran valor predictivo y de gran importancia en el diseño racional de fármacos. En este caso, el uso de metodologías como el aprendizaje automático (P2RANK), el docking flexible (HADDOCK) o el modelado molecular de estructuras, han permitido obtener una idea de la afinidad entre el VEGF-A y diferentes fármacos anti-VEGF disponibles a día de hoy, así como de la estabilidad de los complejos formados, con el fin de predecir la potencial eficacia terapéutica de los mismos. Estos resultados no solo pueden contribuir a optimizar terapias existentes, sino también guiar el desarrollo de nuevos fármacos, más eficaces y con perfiles de seguridad mejorados.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se plantean las siguientes conclusiones:

- Los análisis computacionales llevados a cabo permitieron predecir y comparar las interacciones entre VEGF-A y diversos fármacos anti-VEGF. Entre estos, *Bevacizumab*[®] y *Ranibizumab*[®] se posicionaron como los candidatos con mayor afinidad y estabilidad teórica, al presentar tanto puntuaciones HADDOCK más negativas como residuos bien definidos y conservados, lo que respaldaría su eficacia terapéutica.
- El caso de *Abicipar*[®] destacó por su elevado score HADDOCK pese a su baja puntuación en el análisis de sitios activos con P2RANK, lo cual podría explicarse por su estructura tipo DARPin de menor tamaño y elevada accesibilidad a la diana. Este es un ejemplo de la importancia de integrar los análisis estructurales con el conocimiento del diseño molecular de cada fármaco.

Por otro lado, en cuanto a las perspectivas futuras:

- Los resultados obtenidos para *Bevacizumab*[®], *Abicipar*[®] y *Ranibizumab*[®], los cuales mostraron mayor afinidad teórica hacia VEGF-A, abren la puerta a futuros estudios centrados en simulaciones de dinámica molecular y validación experimental de estos complejos, con el objetivo de confirmar su estabilidad y eficacia en un entorno fisiológico. Además, la profundización en el análisis estructural de los candidatos restantes, que presentaron afinidades más moderadas, permitiría identificar posibles limitaciones o ventajas relacionadas con su diseño molecular o modo de interacción.
- La implementación sistemática de estos enfoques in silico, podría acelerar el desarrollo racional de nuevas terapias dirigidas contra VEGF, para el tratamiento de la DMAE tipo húmeda, y otras dianas de relevancia biomédica, optimizar recursos y fomentar una toma de decisiones más informada y eficiente en la investigación farmacéutica.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lee Ann Remington, *Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System*. Elsevier, 2012. doi: 10.1016/C2009-0-56108-9.
- [2] Rafael Ferreruela, "La visión y el ojo," *Apunts Educación Física y Deportes*, vol. 88, pp. 8–14, 2007.
- [3] J. C. Suárez-Escudero *et al.*, "Actualización desde la anatomía funcional y clínica del sistema visual: énfasis en la vía y la corteza visual," *Revista Mexicana de Oftalmología*, vol. 96, no. 2S, pp. 71–81, Apr. 2022, doi: 10.24875/RMO.M22000218.
- [4] M. Fabre *et al.*, "Recent Advances in Age-Related Macular Degeneration Therapies," *Molecules*, vol. 27, no. 16, p. 5089, Aug. 2022, doi: 10.3390/molecules27165089.
- [5] Manuel Herrera Lara, Francisco Martínez Soriano, Amparo Ruiz Torner, and Francisco Sánchez del Campo, *Anatomía del sistema visual humano*. 2006.
- [6] M. Hoon, H. Okawa, L. Della Santina, and R. O. L. Wong, "Functional architecture of the retina: Development and disease," *Prog Retin Eye Res*, vol. 42, pp. 44–84, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.06.003.
- [7] E. G. Jensen, T. S. Jakobsen, S. Thiel, A. L. Askou, and T. J. Corydon, "Associations between the Complement System and Choroidal Neovascularization in Wet Age-Related Macular Degeneration," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 24, p. 9752, Dec. 2020, doi: 10.3390/ijms21249752.
- [8] Y. Fu and K.-W. Yau, "Phototransduction in mouse rods and cones," *Pflugers Arch*, vol. 454, no. 5, pp. 805–819, Jun. 2007, doi: 10.1007/s00424-006-0194-y.
- [9] S. Kawamura and S. Tachibanaki, "Molecular bases of rod and cone differences," *Prog Retin Eye Res*, vol. 90, p. 101040, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.preteyeres.2021.101040.
- [10] T. D. Lamb, "Photoreceptor physiology and evolution: cellular and molecular basis of rod and cone phototransduction," *J Physiol*, vol. 600, no. 21, pp. 4585–4601, Nov. 2022, doi: 10.1113/JP282058.
- [11] H. GERSTER, "Review: Antioxidant Protection of The Ageing Macula," *Age Ageing*, vol. 20, no. 1, pp. 60–69, 1991, doi: 10.1093/ageing/20.1.60.
- [12] J. M. Provis, P. L. Penfold, E. E. Cornish, T. M. Sandercoe, and M. C. Madigan, "Anatomy and development of the macula: specialisation and the vulnerability to macular degeneration," *Clin Exp Optom*, vol. 88, no. 5, pp. 269–281, Sep. 2005, doi: 10.1111/j.1444-0938.2005.tb06711.x.
- [13] D.-Y. Yu *et al.*, "An assessment of microvascular hemodynamics in human macula," *Sci Rep*, vol. 13, no. 1, p. 7550, May 2023, doi: 10.1038/s41598-023-33490-8.
- [14] D. L. Nickla and J. Wallman, "The multifunctional choroid," *Prog Retin Eye Res*, vol. 29, no. 2, pp. 144–168, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.preteyeres.2009.12.002.
- [15] Lee Ann Remington, *Clinical Anatomy of the Visual System*. Elsevier, 2005. doi: 10.1016/B978-0-7506-7490-4.X5001-7.
- [16] John V. Forrester, Andrew D. Dick, Paul G. McMenamin, Fiona Roberts, and Eric Pearlman, *The Eye: Basic Sciences in Practice*, Fourth edition. Elsevier, 2016.
- [17] E. Sadeghi *et al.*, "Choroidal biomarkers in age-related macular degeneration," *Surv Ophthalmol*, vol. 70, no. 2, pp. 167–183, Mar. 2025, doi: 10.1016/j.survophthal.2024.10.004.
- [18] S. Fragiotta *et al.*, "Choroidal Vasculature Changes in Age-Related Macular Degeneration: From a Molecular to a Clinical Perspective," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 19, p. 12010, Oct. 2022, doi: 10.3390/ijms231912010.
- [19] D. S. McLeod, R. Grebe, I. Bhutto, C. Merges, T. Baba, and G. A. Luty, "Relationship between RPE and Choriocapillaris in Age-Related Macular Degeneration," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 50, no. 10, p. 4982, Oct. 2009, doi: 10.1167/iovs.09-3639.
- [20] W. Hu *et al.*, "Differences in the temporal expression of regulatory growth factors during choroidal neovascular development," *Exp Eye Res*, vol. 88, no. 1, pp. 79–91, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.exer.2008.10.014.

- [21] A. Hoshino *et al.*, "Molecular Anatomy of the Developing Human Retina," *Dev Cell*, vol. 43, no. 6, pp. 763-779.e4, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.devcel.2017.10.029.
- [22] P. A. Campochiaro, "Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases," *Prog Retin Eye Res*, vol. 49, pp. 67–81, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.002.
- [23] M. Gałuszka, D. Pojda-Wilczek, and I. Karska-Basta, "Age-Related Macular or Retinal Degeneration?," *Medicina (B Aires)*, vol. 59, no. 5, p. 920, May 2023, doi: 10.3390/medicina59050920.
- [24] H. Heloterä and K. Kaarniranta, "A Linkage between Angiogenesis and Inflammation in Neovascular Age-Related Macular Degeneration," *Cells*, vol. 11, no. 21, p. 3453, Nov. 2022, doi: 10.3390/cells11213453.
- [25] W. Tan, J. Zou, S. Yoshida, B. Jiang, and Y. Zhou, "The Role of Inflammation in Age-Related Macular Degeneration," *Int J Biol Sci*, vol. 16, no. 15, pp. 2989–3001, 2020, doi: 10.7150/ijbs.49890.
- [26] H. Vyawahare and P. Shinde, "Age-Related Macular Degeneration: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment," *Cureus*, Sep. 2022, doi: 10.7759/cureus.29583.
- [27] C. J. Thomas, R. G. Mirza, and M. K. Gill, "Age-Related Macular Degeneration," *Medical Clinics of North America*, vol. 105, no. 3, pp. 473–491, May 2021, doi: 10.1016/j.mcna.2021.01.003.
- [28] A. Pugazhendhi, M. Hubbell, P. Jairam, and B. Ambati, "Neovascular Macular Degeneration: A Review of Etiology, Risk Factors, and Recent Advances in Research and Therapy," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 3, p. 1170, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijms22031170.
- [29] A. Gheorghe, L. Mahdi, and O. Musat, "AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION.," *Rom J Ophthalmol*, vol. 59, no. 2, pp. 74–7, 2015.
- [30] F. Ricci, F. Bandello, P. Navarra, G. Staurenghi, M. Stumpp, and M. Zarbin, "Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Therapeutic Management and New-Upcoming Approaches," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 21, p. 8242, Nov. 2020, doi: 10.3390/ijms21218242.
- [31] A. R. Fernandes *et al.*, "Exudative versus Nonexudative Age-Related Macular Degeneration: Physiopathology and Treatment Options," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 5, p. 2592, Feb. 2022, doi: 10.3390/ijms23052592.
- [32] T. Kurihara, P. D. Westenskow, S. Bravo, E. Aguilar, and M. Friedlander, "Targeted deletion of Vegfa in adult mice induces vision loss," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 11, pp. 4213–4217, Nov. 2012, doi: 10.1172/JCI65157.
- [33] N. M. Hlekamp, N. Bouck, and O. Volpert, "Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration," *Internet Advance publication at ajo.com*. May 7, 2002., *Am J Ophthalmol*, vol. 134, no. 2, pp. 220–227, Aug. 2002, doi: 10.1016/S0002-9394(02)01549-0.
- [34] Y. Oshima *et al.*, "Increased expression of VEGF in retinal pigmented epithelial cells is not sufficient to cause choroidal neovascularization," *J Cell Physiol*, vol. 201, no. 3, pp. 393–400, Dec. 2004, doi: 10.1002/jcp.20110.
- [35] W. L. Wong *et al.*, "Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis," *Lancet Glob Health*, vol. 2, no. 2, pp. e106–e116, Feb. 2014, doi: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.
- [36] R. Klein, B. E. K. Klein, and K. L. P. Linton, "Prevalence of Age-related Maculopathy," *Ophthalmology*, vol. 99, no. 6, pp. 933–943, Jun. 1992, doi: 10.1016/S0161-6420(92)31871-8.
- [37] J. J. Wang *et al.*, "Ten-Year Incidence and Progression of Age-Related Maculopathy," *Ophthalmology*, vol. 114, no. 1, pp. 92–98, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.ophtha.2006.07.017.
- [38] C. A. Augood, "Prevalence of Age-Related Maculopathy in Older Europeans," *Archives of Ophthalmology*, vol. 124, no. 4, p. 529, Apr. 2006, doi: 10.1001/archophth.124.4.529.
- [39] C. M. Nicolas *et al.*, "Iris colour, ethnic origin and progression of age-related macular degeneration," *Clin Exp Ophthalmol*, vol. 31, no. 6, pp. 465–469, Dec. 2003, doi: 10.1046/j.1442-9071.2003.00711.x.
- [40] N. A. Chapman, R. J. Jacobs, and A. J. Braakhuis, "Role of diet and food intake in age-related macular degeneration: a systematic review," *Clin Exp Ophthalmol*, vol. 47, no. 1, pp. 106–127, Jan. 2019, doi: 10.1111/ceo.13343.

- [41] J. M. Colijn *et al.*, "Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe," *Ophthalmology*, vol. 124, no. 12, pp. 1753–1763, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.ophtha.2017.05.035.
- [42] "Prevalence of age-related macular degeneration in Spain," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 95, no. 7, pp. 931–936, Jul. 2011, doi: 10.1136/bjo.2010.187773.
- [43] A. M. Joussen and N. Bornfeld, "The Treatment of Wet Age-Related Macular Degeneration," *Dtsch Arztebl Int*, May 2009, doi: 10.3238/arztebl.2009.0312.
- [44] A. de C. S. Alves, F. A. Bruinsmann, S. S. Guterres, and A. R. Pohlmann, "Organic Nanocarriers for Bevacizumab Delivery: An Overview of Development, Characterization and Applications," *Molecules*, vol. 26, no. 14, p. 4127, Jul. 2021, doi: 10.3390/molecules26144127.
- [45] S. Grisanti and F. Ziemssen, "Bevacizumab: Off-label use in ophthalmology," *Indian J Ophthalmol*, vol. 55, no. 6, p. 417, 2007, doi: 10.4103/0301-4738.36474.
- [46] U. Vaidyanathan and M. Moshirfar, *Ranibizumab*. 2025.
- [47] F. Semeraro, Morescalchi, S. Duse, F. Parmeggiani, Gambicorti, and C. Costagliola, "Aflibercept in wet AMD: specific role and optimal use," *Drug Des Devel Ther*, p. 711, Aug. 2013, doi: 10.2147/DDDT.S40215.
- [48] Q. D. Nguyen *et al.*, "Brolucizumab: Evolution through Preclinical and Clinical Studies and the Implications for the Management of Neovascular Age-Related Macular Degeneration," *Ophthalmology*, vol. 127, no. 7, pp. 963–976, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.ophtha.2019.12.031.
- [49] J. T. Regula *et al.*, "Targeting key angiogenic pathways with a bispecific Cross <sc>MA</sc> b optimized for neovascular eye diseases," *EMBO Mol Med*, vol. 8, no. 11, pp. 1265–1288, Nov. 2016, doi: 10.15252/emmm.201505889.
- [50] J. Schilling *et al.*, "Thermostable designed ankyrin repeat proteins (DARPin)s as building blocks for innovative drugs," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 298, no. 1, p. 101403, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101403.
- [51] G. A. Rodrigues *et al.*, "Functional Characterization of Abicipar-Pegol, an Anti-VEGF DARPin Therapeutic That Potently Inhibits Angiogenesis and Vascular Permeability," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 59, no. 15, p. 5836, Dec. 2018, doi: 10.1167/iovs.18-25307.
- [52] L. Ferreira, R. Dos Santos, G. Oliva, and A. Andricopulo, "Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies," *Molecules*, vol. 20, no. 7, pp. 13384–13421, Jul. 2015, doi: 10.3390/molecules200713384.
- [53] L. Pinzi and G. Rastelli, "Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 18, Sep. 2019, doi: 10.3390/ijms20184331.
- [54] G. Bottegoni, "Protein-ligand docking," *Frontiers in Bioscience*, vol. 16, no. 1, p. 2289, 2011, doi: 10.2741/3854.
- [55] T. M. Komarova, O. P. Vitovska, J. I. Komisarenko, and V. M. Kohan, "AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION – CURRENT STATE OF THE PROBLEM AND PROPHYLAXIS METHODS," *Wiadomości Lekarskie*, vol. 74, no. 3, pp. 767–772, Mar. 2021, doi: 10.36740/WLek202103238.
- [56] C. D. K. Amengor, E. Orman, C. A. Danquah, I. O. Ben, P. D. Biniyam, and B. K. Harley, "Pyridine-N-Oxide Alkaloids from *Allium stipitatum* and Their Synthetic Disulfide Analogs as Potential Drug Candidates against *Mycobacterium tuberculosis* : A Molecular Docking, QSAR, and ADMET Prediction Approach," *Biomed Res Int*, vol. 2022, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.1155/2022/6261528.
- [57] A. Ramalingam, N. Mustafa, W. J. Chng, M. Medimagh, S. Sambandam, and N. Issaoui, "3-Chloro-3-methyl-2,6-diarylpiperidin-4-ones as Anti-Cancer Agents: Synthesis, Biological Evaluation, Molecular Docking, and In Silico ADMET Prediction," *Biomolecules*, vol. 12, no. 8, p. 1093, Aug. 2022, doi: 10.3390/biom12081093.
- [58] P. C. Agu *et al.*, "Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management," *Sci Rep*, vol. 13, no. 1, p. 13398, Aug. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-40160-2.
- [59] Y. Dong *et al.*, "Molecular mechanism of Epicedium treatment for depression based on network pharmacology and molecular docking technology," *BMC Complement Med Ther*, vol. 21, no. 1, p. 222, Dec. 2021, doi: 10.1186/s12906-021-03389-w.

- [60] J. Liu *et al.*, "Dissecting the molecular mechanism of cepharanthine against COVID-19, based on a network pharmacology strategy combined with RNA-sequencing analysis, molecular docking, and molecular dynamics simulation," *Comput Biol Med*, vol. 151, p. 106298, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.compbimed.2022.106298.
- [61] J. Ye, L. Li, and Z. Hu, "Exploring the Molecular Mechanism of Action of Yincheng Wuling Powder for the Treatment of Hyperlipidemia, Using Network Pharmacology, Molecular Docking, and Molecular Dynamics Simulation," *Biomed Res Int*, vol. 2021, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1155/2021/9965906.
- [62] P. Kar, A. O. Oriola, and A. O. Oyediji, "Molecular Docking Approach for Biological Interaction of Green Synthesized Nanoparticles," *Molecules*, vol. 29, no. 11, p. 2428, May 2024, doi: 10.3390/molecules29112428.
- [63] H. M. Berman, "The Protein Data Bank," *Nucleic Acids Res*, vol. 28, no. 1, pp. 235–242, Jan. 2000, doi: 10.1093/nar/28.1.235.
- [64] A. Waterhouse *et al.*, "SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes," *Nucleic Acids Res*, vol. 46, no. W1, pp. W296–W303, Jul. 2018, doi: 10.1093/nar/gky427.
- [65] C. Knox *et al.*, "DrugBank 6.0: the DrugBank Knowledgebase for 2024," *Nucleic Acids Res*, vol. 52, no. D1, pp. D1265–D1275, Jan. 2024, doi: 10.1093/nar/gkad976.
- [66] M. Kanehisa, M. Furumichi, Y. Sato, M. Kawashima, and M. Ishiguro-Watanabe, "KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes," *Nucleic Acids Res*, vol. 51, no. D1, pp. D587–D592, Jan. 2023, doi: 10.1093/nar/gkac963.
- [67] A. Bateman *et al.*, "UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025," *Nucleic Acids Res*, vol. 53, no. D1, pp. D609–D617, Jan. 2025, doi: 10.1093/nar/gkae1010.
- [68] N. Guex and M. C. Peitsch, "SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling," *Electrophoresis*, vol. 18, no. 15, pp. 2714–2723, Jan. 1997, doi: 10.1002/elps.1150181505.
- [69] L. Schrödinger, "The PyMOL Molecular Graphics System," 2022, 2.6.0.
- [70] E. F. Pettersen *et al.*, "UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis," *J Comput Chem*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, Oct. 2004, doi: 10.1002/jcc.20084.
- [71] L. Polák, P. Škoda, K. Riedlová, R. Krivák, M. Novotný, and D. Hoksza, "PrankWeb 4: a modular web server for protein–ligand binding site prediction and downstream analysis," *Nucleic Acids Res*, May 2025, doi: 10.1093/nar/gkaf421.
- [72] R. V. Honorato *et al.*, "The HADDOCK2.4 web server for integrative modeling of biomolecular complexes," *Nat Protoc*, vol. 19, no. 11, pp. 3219–3241, Nov. 2024, doi: 10.1038/s41596-024-01011-0.
- [73] J. Siktberg, S. J. Kim, P. Sternberg, and S. Patel, "Effectiveness of bevacizumab step therapy for neovascular age-related macular degeneration," *Eye*, vol. 37, no. 9, pp. 1844–1849, Jun. 2023, doi: 10.1038/s41433-022-02253-6.
- [74] D. F. Martin *et al.*, "Ranibizumab and Bevacizumab for Treatment of Neovascular Age-related Macular Degeneration," *Ophthalmology*, vol. 119, no. 7, pp. 1388–1398, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.ophtha.2012.03.053.
- [75] "Ranibizumab and Bevacizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration," *New England Journal of Medicine*, vol. 364, no. 20, pp. 1897–1908, May 2011, doi: 10.1056/NEJMoa1102673.
- [76] D. M. Brown, M. Michels, P. K. Kaiser, J. S. Heier, J. P. Sy, and T. Ianchulev, "Ranibizumab versus Verteporfin Photodynamic Therapy for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Two-Year Results of the ANCHOR Study," *Ophthalmology*, vol. 116, no. 1, pp. 57–65.e5, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.ophtha.2008.10.018.
- [77] N. M. Bressler *et al.*, "Vision-Related Function after Ranibizumab Treatment by Better- or Worse-Seeing Eye," *Ophthalmology*, vol. 117, no. 4, pp. 747–756.e4, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.ophtha.2009.09.002.
- [78] T. Y. Lai and Fong, "Long-term effectiveness of ranibizumab for age-related macular degeneration and diabetic macular edema," *Clin Interv Aging*, p. 467, Apr. 2013, doi: 10.2147/CIA.S36811.
- [79] F. G. Holz *et al.*, "RANIBIZUMAB TREATMENT IN TREATMENT-NAIVE NEOVASCULAR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION," *Retina*, vol. 40, no. 9, pp. 1673–1685, Sep. 2020, doi: 10.1097/IAE.0000000000002670.