



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Obtención de hidrogeles químicos, mediante metodología “click”, a partir de polímeros tipo elastina para liberación controlada de fármacos

Autora: Andrea Hidalgo Misas

Tutor/es: Francisco Javier Arias Vallejo

Raquel Muñoz Martínez

No quisiera acabar este proyecto sin mostrar mi más sincero agradecimiento a todo el equipo de BIORFORGE, que han sido unos excelentes compañeros de trabajo, en especial a Reinal, Jesús y Sofía, me llevo tres grandes amigos, siempre dispuestos a ayudar en cualquier momento. A Merche, por hacer el camino más sencillo, por su dedicación y sus consejos, siempre con una sonrisa en la cara. A mis tutores Javier y Raquel, muchas gracias por vuestro apoyo y enseñanzas.

A mis palentinos Noelia y David, a las químicas, que han sufrido a mi lado estos años, y qué bien lo hemos pasado, a mis compañeros de la Residencia Rio Esgueva, y a todos mis amigos nadadores, mi segunda familia.

Por último agradecer a mis padres Jesús y Cristina, mis abuelos y al resto de mi familia todo el apoyo recibido durante estos años.

GRACIAS.

ÍNDICE

Resumen/Abstract.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. La elastina y los polímeros tipo elastina.....	5
1.2. Liberación controlada de fármacos a través de hidrogeles de ELRs.....	8
1.3. Glaucoma y tratamientos actuales.....	9
1.4. 4 Planteamiento y desarrollo de la química click para la formación de hidrogeles por entrecruzamiento de ELRs modificados químicamente.....	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1. Equipamiento empleado.....	15
2.2. Materiales.....	15
2.2.1. Reactivos Químicos.....	15
2.2.2. Biopolímero VKVx24.....	17
2.3. Procedimientos.....	18
2.3.1. Bioproducción y Purificación del “Elastin Like Recombinamer” VKVx24.....	18
2.3.1.1. Siembra de la bacteria Escherichia coli modificada genéticamente para expresar el polímero VKVx24.....	19
2.3.1.2. Selección de colonias mediante análisis electroforético y cultivo del inóculo para el proceso bioproducción del polímero VKVx24.....	20
2.3.1.3. Proceso de bioproducción del polímero VKVx24.....	22
2.3.1.4. Lavado y preparación de las células bacterianas para el proceso de extracción del biopolímero.....	23
2.3.1.5. Extracción y purificación del polímero VKVx24.....	23
2.3.2. Modificación química del “Elastin Like Recombinamer” VKVx2.....	26
2.3.2.1. Protocolo de modificación de vkvx24 con un derivado de ciclooctino.....	27
2.3.2.2. Protocolo de modificación de vkvx24 con azida tríflica.....	27
2.3.3. Formación de hidrogeles por entrecruzamiento químico vía química click.....	29
2.3.4. Preparación de nanogeles con los polímeros VKV-ciclo y VKV-N3.....	30
2.3.5. Preparación de una solución de mucina en agua MQ para comprobar el grado de mucoadhesión del polímero VKVx24.....	31
2.3.6. Ensayo de mucoadhesión del polímero VKVx24 por ángulo de contacto.....	31
2.3.7. Protocolo de preparación de la solución salina lacrimal.....	33
2.3.8. Cálculo de la solubilidad del fármaco acetazolamida (AZM) en la solución salina lacrimal.....	33

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1. Bioproducción y purificación del “elastin like recombinamer” VKVx24.....	35
3.2. Caracterización del polímero VKVX24 obtenido tras el proceso de bioproducción y purificación.....	37
3.3. Modificación química del “Elastin Like Recombinamer” VKVX24.....	40
3.3.1. Modificación del polímero VKVx24 con un derivado de ciclooctino....	41
3.3.2. Modificación del polímero VKVx24 con azida triflica.....	45
3.4. Formación de hidrogeles por entrecruzamiento químico vía química click y caracterización de su temperatura de transición inversa.....	48
3.5. Preparación de nanogeles con los polímeros VKV-CICLO y VKV-N3 que permitan extrapolar el valor de carga iónica del hidrogel.....	50
3.6. Preparación de una solución de mucina en agua MQ y determinación de su índice de refracción y tamaño de partícula.....	52
3.7. Ensayo de mucoadhesion del polímero VKVX24 por ángulo de contacto.....	53
3.8. Cálculo de la solubilidad del fármaco acetazolamida (AZM) en la solución salina lacrimal.....	55
4. CONCLUSIONES.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	59
ANEXOS.....	62
LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS.....	67

RESUMEN

El estudio desarrollado en este Trabajo de Fin de Grado utiliza como metodología de trabajo la formación de hidrogeles, basados en recombinámeros de tipo elastina (ELRs), un material biocompatible, biodegradable y bioactivo, con comportamiento termosensible y capacidad de autoensamblado. Los hidrogeles se forman en presencia del fármaco azetazolamida (AZM), utilizado en el tratamiento del glaucoma, de manera que una vez encapsulado en la matriz proteica pueda ser liberado de manera controlada en el ojo. El ELR (VKVx24) es bioproducido mediante fermentación empleando la bacteria *Escherichia coli* modificada genéticamente. El ELR purificado es modificado químicamente con los grupos ciclooctino y azido permitiendo el entrecruzamiento de los biopolímeros, mediante la metodología “*química click*”, para la formación del hidrogel adecuado para su unión a las mucinas oculares. Se ha llevado a cabo la caracterización del polímero sin modificar y de los polímeros modificados mediante las técnicas de RMN, FTIR, DSC y MALDI-TOF. Se han realizado varios ensayos de mucoadhesión del biopolímero VKVx24 en una disolución de mucina ocular preparada con un tamaño de partícula adecuado y se ha determinado la solubilidad del fármaco AZM en solución lacrimal.

ABSTRACT

This work is based on hydrogels formation. To get this aim chemical crosslinking of elastin like recombinamers (ELRs) is used as a work methodology. The ELRs are biocompatible, biodegradable and bioactive, with a thermo sensitive behavior and the ability of self-assembly. Hydrogels are formed in the presence azetazolamide (AZM) , used in the glaucoma treatment, so that, once the drug is encapsulated in the protein matrix, AZM can be released in a controlled manner to the eye. The ELR (VKVx24) is bioproduced by fermentation using genetically modified *Escherichia coli* bacteria. The ELR is chemically modified with cyclooctine and azide groups and the crosslinking of biopolymers is allowed, by using the “*click chemistry*” methodology, for the formation of a suitable hydrogel for his attachment to the ocular mucins. The characterization of the unmodified and modified biopolymers was carried out using NMR, FTIR, DSC and MALDI-TOF. Several mucoadhesion tests have been done between VKVx24 and an ocular mucin solution prepared with a suitable particle size. The AZM drug solubility in lacrimal solution, was determined.

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo versa sobre la obtención, purificación y utilidad de polímeros recombinantes de naturaleza proteica del tipo de la elastina, denominados recombinámeros tipo elastina, ELRs, que se caracterizan por su alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. Su estructura se basa en repeticiones de pentapéptidos frecuentemente presentes en la secuencia de la elastina natural, en las que, de forma específica y controlada, se introducirán nuevos motivos peptídicos que permitirán la modificación química posterior de los polímeros.

El **objetivo general** del trabajo es crear un hidrogel por entrecruzamiento entre moléculas de un biopolímero tipo elastina, con modificaciones químicas diferentes, que permita el encapsulamiento y la liberación del fármaco acetazolamida, en vista a un potencial desarrollo y utilización en la enfermedad ocular de glaucoma.

Los **objetivos específicos** para el trabajo fin de grado “**Obtención de hidrogeles químicos, mediante metodología “click”, a partir de polímeros tipo elastina para liberación controlada de fármacos**” son los siguientes:

- Bioproducir, utilizando una cepa de la bacteria *Escherichia coli* modificada genéticamente, el polímero tipo elastina VKVx24
- Extraer a partir de las células bacterianas el polímero tipo elastina VKVx24.
- Purificar y comprobar, a través de diversas técnicas de análisis químico, el grado de pureza del biopolímero extraído.
- Modificar químicamente el biopolímero bioproducido.
- Conseguir la formación de hidrogeles por entrecruzamiento químico, entre moléculas de biopolímero modificadas, a través de reacciones tipo *química click*.
- Probar el grado de mucoadhesión del polímero VKVx24.
- Determinar la solubilidad del fármaco acetazolamida en solución salina lacrimal.

1.1 LA ELASTINA Y LOS POLÍMEROS TIPO ELASTINA

La elastina es una proteína estructural elástica del tejido conjuntivo de los vertebrados. Está presente en la matriz extracelular de arterias, ligamentos, pulmones y piel. Esta proteína no solo se encarga de proporcionar elasticidad a los tejidos y órganos [1,2], sino que es capaz de regular el comportamiento celular y promover la reparación tisular [3]. En cuanto a su composición está formada por secuencias de aminoácidos que se repiten a lo largo de su cadena tales como VPGG, VPGVG, APGVG Y VGVAPG (siendo V=valina P=prolina G=glicina A=alanina).

Los polímeros tipo elastina (ELP "*Elastin Like Polymers*") son polipéptidos artificiales cuya secuencia está inspirada en la propia elastina natural. Los más utilizados son los que contienen repeticiones de la secuencia de aminoácidos (VPGXG)_n siendo el residuo "X" cualquiera de los aminoácidos excepto prolina, "n" representaría el número de veces que se repite dicha secuencia pentapeptídica a lo largo de la cadena.

Podemos obtener "a la carta" estos polímeros recombinantes gracias al desarrollo del campo de la Biología Molecular que permite, mediante técnicas de ingeniería genética, obtenerlos con un control absoluto de su secuencia [4]. A los polímeros obtenidos biosintéticamente se les denomina **ELRs** ("*Elastin Like Recombinamers*") o simplemente recombinámeros.

Además de las propiedades específicas proporcionadas por un diseño particular en su síntesis, estos recombinámeros mantienen las propiedades inherentes de la elastina natural [5] tales como las propiedades mecánicas, la biocompatibilidad [6,7] la naturaleza inteligente y el comportamiento autoensamblable [8].

Es necesario mencionar especialmente, por su importancia en este trabajo, la conducta de estos polímeros respecto a los cambios de temperatura. Así en disolución acuosa y por debajo de su temperatura de transición (T_t), las cadenas libres del polímero se encuentran desordenadas y completamente hidratadas, hidrofóbicamente, formando las moléculas de agua a su alrededor una estructura ordenada tipo clatrato (figura 1.1) que rodea los residuos apolares del polímero tales como las valinas, que poseen una cadena lateral hidrocarbonada lo que les hace ser especialmente hidrofóbicas [9].

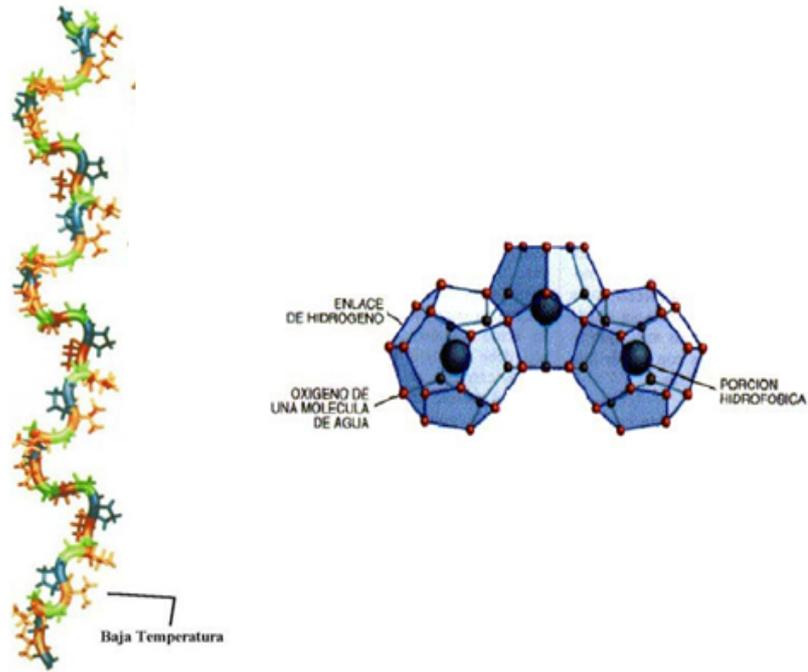


Figura 1.1 Representación de la cadena polimérica extendida por debajo de la Tt. Esquema de la estructura tipo clatrato que forma el agua alrededor de los restos apolares del polímero.

En cambio, por encima de su Tt, las moléculas de agua que rodean los restos apolares del polímero pierden la conformación tipo clatrato debido a la agitación térmica. La cadena polipeptídica se pliega hidrofóticamente y se ensambla mediante enlaces amino y puentes de hidrógeno entre los diferentes aminoácidos dando lugar a una estructura regular llamada espiral β (figura 1.2) constituida por una sucesión de horquillas β . En este caso la hidratación se reduce pero se mantiene en un 25% de agua.

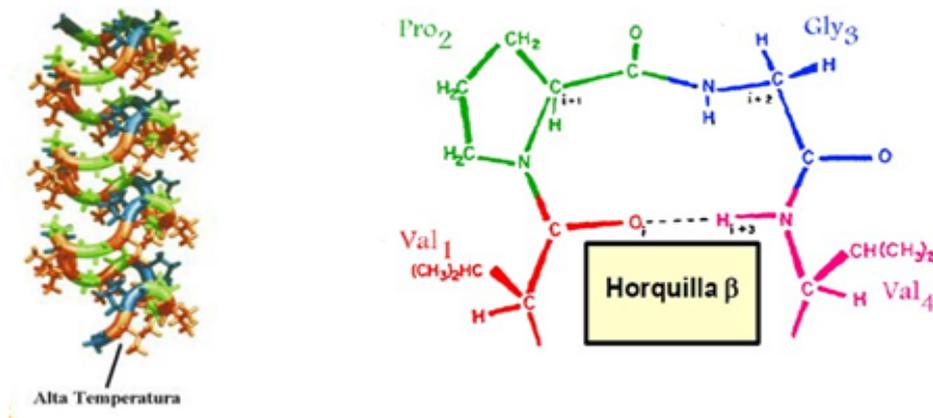


Figura 1.2 Representación de la cadena polimérica plegada por encima de la Tt. Estructura de la Horquilla β en la que se observan las interacciones químicas que se producen entre los aminoácidos.

En gran parte de las proteínas, un aumento de la temperatura provoca el comportamiento contrario, es decir, su desplegamiento y su desnaturalización, por lo que a esta transición se le denomina Transición Inversa con la Temperatura (ITT).

Es necesario explicar este proceso desde un punto de vista termodinámico haciendo uso de la ecuación de la Energía Libre de Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

Siendo:

ΔG =energía libre de reacción

ΔH =variación de entalpía del sistema

T=temperatura

ΔS = variación de entropía del sistema

Durante el calentamiento, el polímero se pliega y se rompe la estructura tipo clatrato que formaban las moléculas de agua, esto provoca un mayor desorden en el medio y como consecuencia un aumento del valor entrópico ($\Delta S > 0 \uparrow \uparrow$) en el entorno. Por lo tanto, el aumento de la entropía es el causante de que la energía libre de Gibbs sea menor que cero ($\Delta G < 0$) y que el plegamiento del polímero sea un proceso espontáneo.

Al igual que a cambios de temperatura, los ELRs también responden a cambios de luz o de pH. Son capaces de percibir las condiciones ambientales y sufrir cambios en respuesta a ellas, convirtiéndolos en unos compuestos muy atractivos en investigación biomédica y biotecnológica [10,11] por lo que se les califica como “polímeros inteligentes” [12].

1.2 LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE HIDROGELES DE ELRs

Actualmente se están desarrollando numerosos sistemas de dosificación de fármacos tales como hidrogeles, micelas y nanopartículas con el objetivo de aumentar el tiempo de residencia de algunos fármacos, mejorar la dosificación controlada y desarrollar terapias dirigidas a tejidos o células diana [13].

La dosificación controlada de fármacos, supone un gran avance dentro del campo oftalmológico ya que, debido a los mecanismos de protección del ojo (parpadeo, reflejo corneal, drenaje lacrimal) el uso de preparaciones convencionales para tratar problemas oculares es poco eficiente al perderse fármaco y en algunos casos puede presentar toxicidad sistémica [14,15].

En el presente trabajo, se pretende diseñar un hidrogel, a través del entrecruzamiento de diferentes biopolímeros tipo elastina, formando un sistema mucoadhesivo capaz de ser portador y liberador del fármaco acetazolamida (AZM) para el tratamiento de un trastorno ocular, el glaucoma. En su diseño nos enfrentamos a dos retos importantes, por una parte, el grosor del hidrogel ha de ser el menor posible para su correcta colocación en el ojo y para una mayor comodidad del paciente. Por otra parte, el hidrogel como sistema mucoadhesivo, debe adherirse adecuadamente a las mucinas secretadas por las mucosas oculares, compuestas por proteínas altamente glicosiladas, por lo que las interacciones químicas hidrogel-mucina ocular han de ser fuertes.

Las mucinas son proteínas de gran tamaño producidas por las células de los tejidos epiteliales. Cumplen funciones que van desde la lubricación a la señalización celular pasando por la formación de barreras físicas y químicas. El 80% de su composición son carbohidratos y en su composición básica podemos encontrar los aminoazúcares, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina; el monosacárido galactosa; el azúcar ácido siálico; trazas del monosacárido manosa y grupos sulfato [16]. Existen diferentes tipos de mucinas en función de su composición y de su localización en el organismo.

1.3 GLAUCOMA Y TRATAMIENTOS ACTUALES

El glaucoma es un grupo de trastornos oculares que conducen a un deterioro en el nervio óptico, que es el encargado de llevar la información visual del ojo al cerebro. En la mayoría de los casos, este trastorno ocular es causado por el aumento de la presión intraocular (PIO).

La cámara anterior, parte frontal del ojo, está llena de un líquido claro llamado humor acuoso, el cual es producido en el iris-cuerpo ciliar (ubicado en la cámara posterior), circula alrededor del cristalino y fluye a la cámara anterior a través de la pupila. El

humor acuoso es drenado, fuera del ojo, principalmente a través de unos conductos denominados red trabecular. Este líquido se encarga de nutrir y oxigenar al cristalino y a la córnea. El balance entre su producción y drenaje fuera del ojo condiciona la PIO. Un bloqueo en el drenaje de este líquido fuera del ojo provoca un aumento notable de la presión intraocular, lo que puede conducir al glaucoma por afectación del nervio óptico [17].

El principal tratamiento farmacológico para esta dolencia son los compuestos químicos inhibidores de la anhidrasa carbónica (AC). La anhidrasa carbónica está presente en las células del epitelio del cuerpo ciliar y va a tener un papel importante en la formación y secreción del humor acuoso. Esta enzima perteneciente a la familia de las metaloenzimas, pues presenta un átomo de Zinc en su centro activo, mantiene el equilibrio iónico entre sales y agua, a nivel celular, catalizando la reacción de hidratación del CO₂ para formar iones H⁺ y HCO₃⁻ permitiendo también la regulación del pH. El ion HCO₃⁻ es responsable del movimiento del Na⁺, que junto con agua, permite formar el humor acuoso [18].

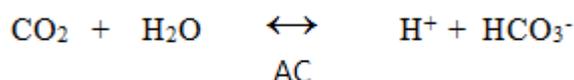


Figura 1.3 Reacción de hidratación del dióxido de carbono catalizado por la AC.

En la tabla 1.1 figura un listado de principios activos que promueven la inhibición de la anhidrasa carbónica [19], indicándose la vía de administración. De entre todos ellos se ha elegido la acetazolamida o N(5-aminosulfonil-1,3,4-tiadiazol-2-il) (AZM) para estudiar el potencial de los biopolímeros en el encapsulamiento y liberación del fármaco.

Nombre comercial	Principio activo	Vía de administración	Estructura química
Diamox	Acetazolamida	Oral	
Azopt	Brinzolamida	Tópica (colirio)	
Trusopt	Dorzolamida	Tópica (colirio)	
Cosopt	Dorzolamida y Timolol	Tópica (colirio)	
Neptazane	Metazolamida	Oral	

Tabla 1.1 Fármacos basados en la inhibición de la anhidrasa carbónica

Estos compuestos se unen al centro activo de la enzima mediante el átomo de nitrógeno del grupo sulfonamida y forman enlaces con los aminoácidos del bolsillo hidrofóbico del centro activo, impidiendo la unión de la molécula de agua con el átomo de zinc y bloqueando con ello la actividad enzimática [20].

La administración oral de forma prolongada de AZM puede provocar daños en órganos como el hígado o el riñón. Cuando la administración es tópica estos efectos secundarios se minimizan, sin embargo, tiene la limitación de la baja biodisponibilidad del fármaco como consecuencia de sus propiedades fisicoquímicas [21]:

-baja solubilidad acuosa (0,6 mg/mL)

-baja permeabilidad corneal ($4,1 \times 10^6$ cm/s)

En este contexto se estudia el desarrollo de hidrogeles de polímeros tipo elastina que posibiliten una nueva forma de administración vía tópica de una dosificación controlada del fármaco.

1.4 PLANTEAMIENTO Y DESARROLLO DE LA QUÍMICA CLICK PARA LA FORMACIÓN DE HIDROGELES POR ENTRECruzAMIENTO DE ELRS MODIFICADOS QUÍMICAMENTE

La química “click” es un término introducido por K.B.Sharpless, H.C. Kolb y colaboradores en 2001 [22] para describir un grupo de reacciones de formación de enlace carbono-heteroátomo altamente eficientes y relativamente sencillas de realizar.

Este término engloba a una serie de reacciones que cumplen las siguientes características:

-reacción fácil de llevar a cabo desde el punto de vista experimental

-uso de reactivos de fácil acceso

-tolerante a una amplia variedad de grupos funcionales

-productos fácilmente aislables

-reacción selectiva y estereoespecífica

-rendimientos elevados

-purificación posterior mínima o nula

A continuación se citan los ejemplos más destacados de reacciones que cumplen los requisitos anteriores (figura 1.4) [23]:

1-cicloadiciones 1,3-dipolar de Huisgen o las cicloadiciones [4+2] como las hetero Diels-Alder

2-reacciones de sustitución nucleofílica de anillos

3-reacciones del grupo carbonilo de tipo no aldólica, como la formación de éteres de oxima

4- reacciones de adición a enlaces múltiples C-C (epoxidación, dihidroxilación y algunas reacciones de Michael)

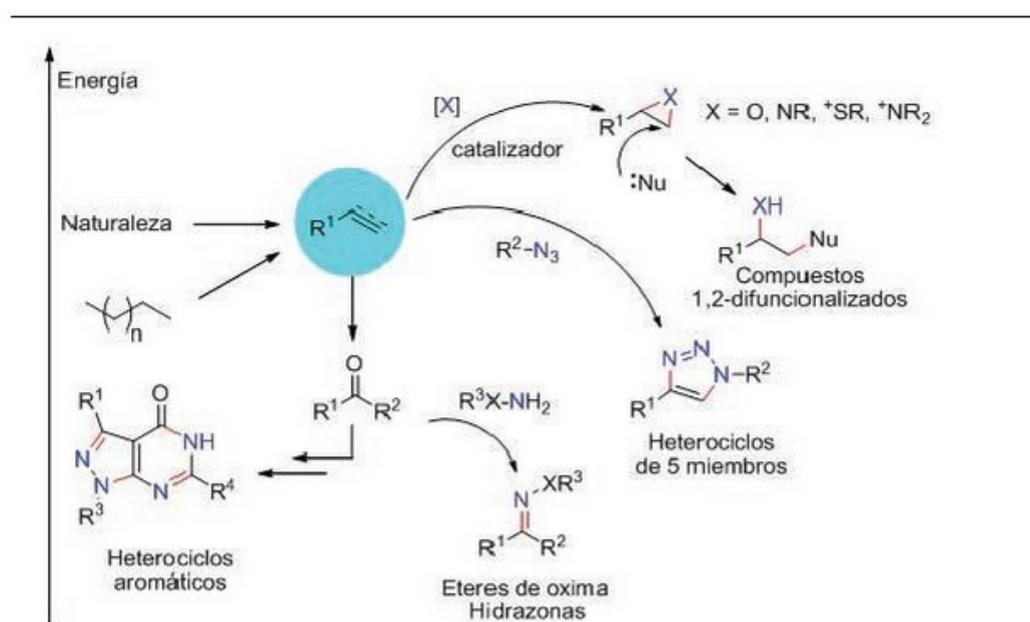


Figura 1.4 Reacciones tipo “click” de formación de enlace C-X.

Dentro de la “química Click”, la reacción más popular y ampliamente utilizada es la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen [24]. Esta reacción tiene lugar entre un grupo azido y un grupo alquínico generando estructuras cíclicas 1,2,3-triazoles (figura 1.5) de una manera muy eficiente, usando como catalizador cobre (Cu (I)) que aumenta la velocidad de reacción hasta 10^7 veces, logrando además una regioselectividad absoluta con la formación de un único isómero.

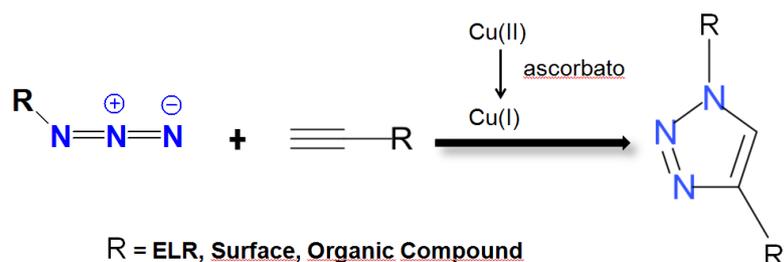


Figura 1.5 Representación de la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada por el ión cobre (I).

El uso de esta reacción dentro del campo biomédico ha aumentado notablemente durante los últimos años y se debe a dos ventajas principales:

- estabilidad en sistemas biológicos
- limitada formación de productos secundarios no deseados

Sin embargo, el uso del ion Cu^+ como catalizador supone una importante desventaja ya que puede ocasionar problemas de citotoxicidad [25]. Este problema se resolvió con el uso de alquinos activados tales como derivados de ciclooctino (figura 1.6), la tensión anular de estos compuestos cíclicos les hace reaccionar con el grupo azido sin necesidad de catalizador en el medio [26].

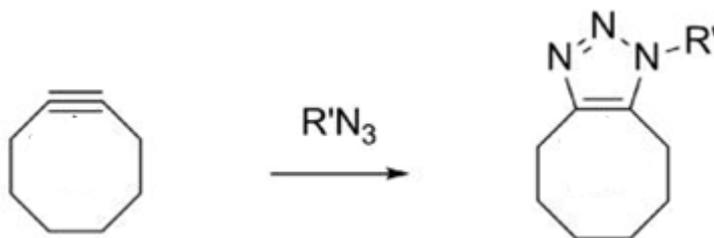


Figura 1.6 Reacción de un grupo azida con ciclooctino.

En el presente trabajo se utilizarán este tipo de reacciones para la formación de hidrogeles por entrecruzamiento de biopolímeros modificados con grupos azido y derivados de ciclooctino [27].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 EQUIPAMIENTO EMPLEADO

A lo largo de este trabajo se han empleado diversos equipamientos, a continuación se realiza una enumeración de ellos:

Equipo	Casa comercial
Ángulo de contacto OCA LSplus	NeuterkDataphysics
Autoclave	J.P. Selecta
Centrifuga ST 16R	Thermo- Scientific
Centrifuga Avanti	Beckman
DSC 8822°	Mettler Toledo
Espectrómetro de masas BrukerAutoflex.	Bruker
Infrarrojo Tensor27	Bruker
Nanodrop 2000c	Thermo-Scientific
Refractómetro RE50	Mettler Toledo
RMN 400	Agilent Technologies
Rotavapor R-215	BÜCHI
Sonicador	J.P. Selecta
Spin-Coater KW-4A	Chematechnology
Zeta Sizer Nano	Malvern

Tabla 2.1 Equipamiento utilizado a lo largo de este trabajo.

2.2 MATERIALES

2.2.1 Reactivos químicos

Todos los reactivos químicos empleados en este trabajo se enumeran en las siguientes tablas:

REACTIVO	CASA COMERCIAL
Acetona	Sigma-Aldrich
Acetazolamida	Sigma-Aldrich
Ácido clorhídrico	Fluka
Ácido etilendiaminotetraacético(EDTA)	Apollo
Ampicilina	Apollo
Anhídrido tríflico	Sigma-Aldrich
Azida de sodio	AcrosOrganics
Carbonato de calcio	Scharlau
Cloruro de calcio	Fluka
Cloruro de magnesio	Sigma-Aldrich
Cloruro de potasio	Sigma-Aldrich
Cloruro de sodio	Scharlau
D(+)-Glucosa	Panreac
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	Sigma-Aldrich
Hidrogenocarbonato de sodio	Panreac
Hidróxido de sodio	Panreac
Tris (hidroximetil) aminoetano (TRIS) (1R, 8S, 9S)- biciclo [6.1.0] non-4-yn-9-ilmetil succinimidil carbonato	Sigma-Aldrich
Sulfato de cobre	Fluka
Glicerol	Merck
Urea	Fisher Scientific

Tabla 2.2 Reactivos utilizados y casas comerciales proveedoras.

DISOLVENTE	CASA COMERCIAL
Acetona	Scharlau
Agua destilada	Obtención Bioforge
Agua ultrapura (miliQ)	Obtención Bioforge
Diclorometano (DCM)	Sigma Aldrich
Dietil éter	Scharlau
Dimetilformamida (DMF)	Sigma Aldrich

Dimetilsulfóxidodeuterado (DMSO)	Sigma Aldrich
Metanol	Scharlau
Etanol	Panreac
Trifluoroetanol (TFE)	Acrós

Tabla 2.3 Disolventes utilizados y casas comerciales proveedoras.

TAMPONES (purificación de <i>Elastin-like-recombinamers</i> (ELRs))	Código	Composición Buffer
Tampón de lavado	TL	Tris pH 7,5 20mM NaCl 0,2M
Tampon de sonicación	TS	Tris pH 7.5 20mM EDTA 2,5mM

Tabla 2.4 Disoluciones tamponadas para purificación de ELRs.

Los medios de cultivo utilizados en bioproducción (crecimiento y transformación bacteriana) son los siguientes:

-**LB** (Luria Broth): medio nutricionalmente rico, se prepara a una concentración de 25g/L en agua destilada y se esteriliza en autoclave (casa comercial Pronadisa).

-**LB agar**: compuesto por medio litro de medio LB con un 15% p/v de bacto-agar (agente de solidificación de elevada pureza).

-**TB** (TerrificBroth): medio de cultivo para incrementar la producción bacteriana.

-**TBm** (TerrificBroth modificado): contiene medio TB a una concentración de 50,8g/L al que se le añade Na₂HPO₄ 25mM, Na₂SO₄ 5mM, KH₂PO₄ 25mM, NH₄Cl 50mM, Glucosa 0,05% p/v, α-lactosa 0,02% p/v y Glicerol 0,8% p/v. Se prepara en agua destilada y se esteriliza.

2.2.2 Biopolímero VKVx24

El biopolímero VKVx24 se va a obtener mediante un proceso de bioproducción explicado en el apartado 2.3.1

La forma monomérica tiene la siguiente secuencia aminoacídica:

(VGVP GVGVP**K**GVPGVGVP GVGVP GVGVP G)

V=valina, P=prolina, G=glicina, K=lisina

Código de colores: **rojo**: indica los aminoácidos no polares (hidrofóbicos); **azul**: indica los aminoácidos polares con carga.

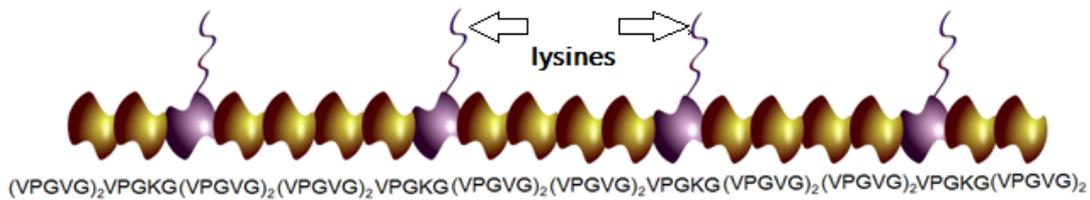


Figura 2.1 Imagen de la secuencia aminoacídica del polímero VKVx24.

El bloque VPGKG es el dominio que va a permitir la modificación química post-traduccional del biopolímero, gracias al grupo amino libre de las 24 lisinas presentes en el biopolímero. Estos aminoácidos son los que confieren al polímero cierta carga positiva a pH 7, pues el resto de los aminoácidos que lo componen son neutros.

2.3 PROCEDIMIENTOS

2.3.1 Bioproducción y Purificación del “Elastin Like Recombinamer” VKVx24

En el proceso de obtención del recombinámero VKVx24 se suceden una serie de etapas resumidas en el siguiente diagrama (figura 2.2) y que serán detalladas a lo largo de los siguientes apartados.

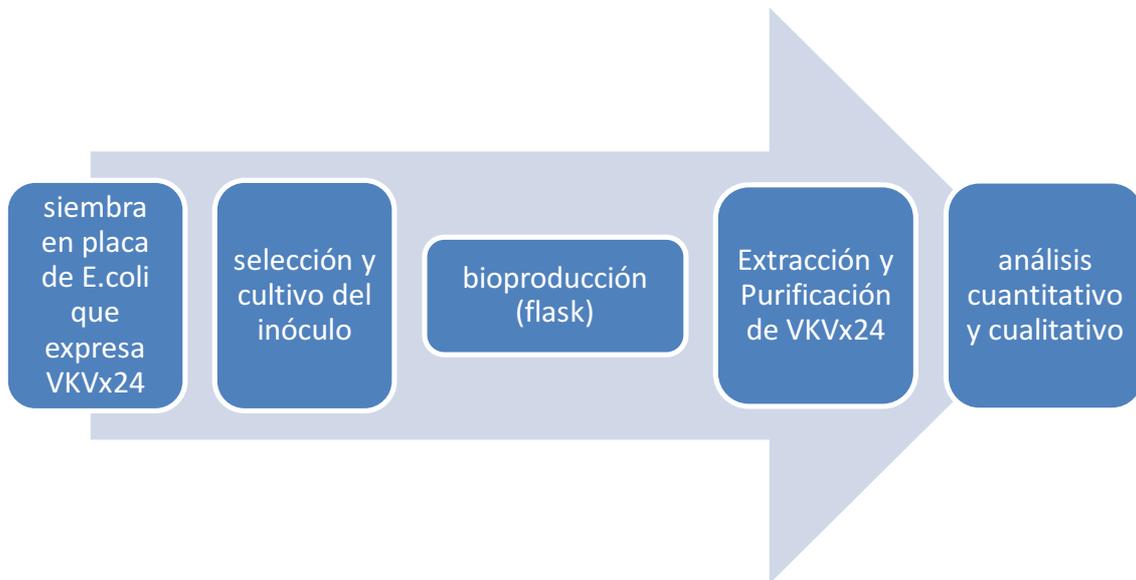


Figura 2.2 Esquema del proceso de bioproducción y purificación del polímero VKVx24.

2.3.1.1 Siembra de la bacteria *Escherichia coli* modificada genéticamente para expresar el polímero VKVx24.

Se parte de una cepa de *Escherichia coli* que ha sido modificada genéticamente en el laboratorio de biología molecular del grupo BIOFORGE por inserción de un plásmido que codifica para la expresión del polímero VKVx24. Esta cepa está guardada en una disolución de glicerol estéril al 80% y a una temperatura de -80°C .

La siembra bacteriana se realiza en placas Petri de 90mm de diámetro utilizando un asa de platino. Las placas Petri contienen medio LB agar al que se le ha añadido glucosa y el antibiótico ampicilina, frente al que la cepa ha adquirido resistencia. La adición del antibiótico nos asegura que solo crecen los clones que contengan el plásmido que codifica la proteína de interés. Este proceso se lleva a cabo en las condiciones más asépticas posibles haciendo uso de una campana de flujo laminar y utilizando material esterilizado.

Las placas se incuban a 37°C con agitación orbital a 250 rpm, durante aproximadamente 6 horas.

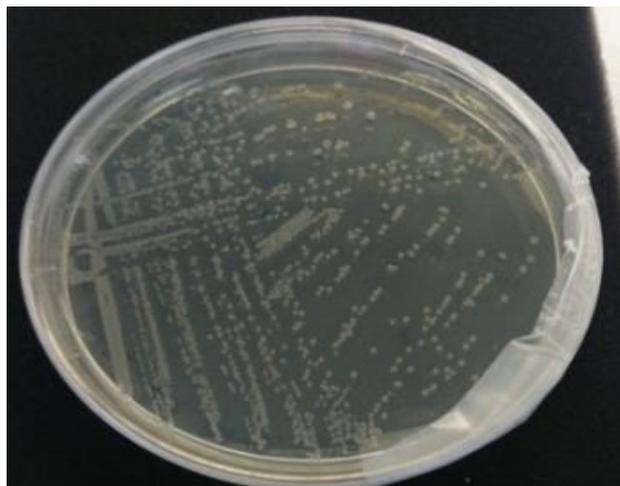


Figura 2.3 Fotografía de una placa de LB agar donde se observa el crecimiento de la bacteria E.coli en forma de colonias que es típico de la siembra con asa.

2.3.1.2 Selección de colonias mediante análisis electroforético y cultivo del inóculo para el proceso de bioproducción del polímero VKVx24.

Transcurridas seis horas de la siembra de las bacterias en las placas se observan colonias aisladas. Cada una de ellas consiste en células procedentes de la división de una única célula. Se hace el muestreo de un mínimo de 8 colonias, lo más aisladas posibles; se recoge una muestra de cada una de las colonias elegidas con la ayuda de un palillo de madera estéril. Estas colonias se incuban en falcon con 5 mL de medio de cultivo TBm que contiene el antibiótico ampicilina, a 37°C con agitación orbital a 250 rpm, durante la noche (O/N).

Con el objetivo de seleccionar la colonia cuya producción de ELRs sea la más alta, se realiza un *screening* (o cribado) de las 8 colonias crecidas durante toda la noche. La selección se realiza mediante análisis electroforético de cada una de las suspensiones bacterianas en gel de poliacrilamida y en presencia de SDS (dodecilsulfato de sodio). Se pipetea en tubos eppendorf 20 μ L de cada una de las ocho suspensiones bacterianas, a los que se añaden 5 μ L de *Loading Buffer* (LB) que contiene 0.125M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, azul de bromofenol y +/- β -mercaptoetanol. El SDS es un detergente aniónico que lisa las bacterias y desnaturaliza a las proteínas desplegándolas y cargándolas negativamente. La presencia de Azul de Bromofenol permite el seguimiento de la electroforesis. Las muestras se hierven durante 5 minutos a 100°C para desnaturalizar totalmente las proteínas y, posteriormente, se centrifugan

durante 5 minutos a 13.400 rpm para eliminar los restos menos solubles. Las muestras quedan así preparadas para ser pipeteadas en los pocillos del gel de poliacrilamida. En el primer pocillo se pipetea una mezcla de proteínas con pesos moleculares conocidos que se utilizarán como patrones. La electroforesis se desarrolla verticalmente aplicando un campo eléctrico de intensidad 25mA y un voltaje máximo de 300V. Las muestras se desplazan del polo negativo al positivo y se van separando según su peso molecular. Cuando el Azul de Bromofenol, molécula de muy bajo peso molecular, se encuentra próximo al final del gel se para la electroforesis. Tras la electroforesis se lleva a cabo la tinción de las proteínas mediante incubación con CuCl_2 , siempre con agitación suave.

De esta forma se pueden identificar las calles y bandas proteicas correspondientes a cada una de las muestras sometidas a electroforesis. Tras realizar una foto del gel, se selecciona, para preparar el inóculo de bioproducción, aquella colonia que haya expresado una mayor cantidad del polímero VKVx24. Es decir, aquella en la que la banda proteica de interés, determinada por electroforesis, sea la más gruesa.

Una muestra de 1mL de la suspensión de la colonia seleccionada se inocular en un tubo falcon que contiene 15 mL de medio LB al que se le añade glucosa al 1% y 1,5 mL del antibiótico ampicilina en concentración 100 mg/mL y se incuba a 37°C con agitación orbital a 250 rpm durante aproximadamente 6 horas.

El crecimiento bacteriano se caracteriza por presentar varias fases:

“Fase de latencia” o *“Fase lag”*. En esta fase el crecimiento bacteriano es casi imperceptible.

“Fase exponencial” o *“Fase log”*. El crecimiento de los microorganismos sigue un patrón exponencial. Cada célula bacteriana se divide dando lugar a la formación de dos células hijas.

“Fase de declinación”. Se trata de una fase de decrecimiento en la que la producción de masa celular por unidad de tiempo disminuye.

“Fase estacionaria”. En esta fase no se producen cambios considerables en la cantidad total de microorganismos. A nivel de trabajo en el laboratorio, tras esta fase se da por concluido el crecimiento bacteriano.

“Fase de mortandad”. Se reduce la población microbiana, debido a una pérdida irreversible de la capacidad de reproducción.

Es posible seguir las diferentes fases del crecimiento del inóculo bacteriano midiendo de forma periódica la densidad óptica de la suspensión celular. Para ello se toma, bajo condiciones de esterilidad, una muestra de 1mL de la suspensión celular bacteriana y se mide su absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro. La turbidez de la suspensión va a ser proporcional a la cantidad de células presentes. El crecimiento celular máximo que puede alcanzar el inóculo bacteriano, dependerá de múltiples factores tales como:

- cepa utilizada
- colonia elegida
- tiempo de crecimiento de la colonia
- medio de cultivo utilizado

2.3.1.3 Proceso de bioproducción del polímero VKVx24

La bioproducción puede realizarse de dos formas:

- mediante la utilización de un **fermentador** bajo condiciones controladas de pH, consumo de oxígeno, temperatura, agitación, aireación etc.
- mediante la utilización de **flask** o erlenmeyers bajo condiciones no controladas (a excepción de agitación y temperatura).

En el presente trabajo se ha utilizado la segunda forma de producción, mediante flask o erlenmeyer. Se realiza la producción en 12 erlenmeyers.

El primer paso consiste en la preparación de medio de crecimiento TBm. Se preparan varias botellas de 2L de medio. Se pesan 111.1 g de medio TBm y se añade 100 µL/L de antiespumante y 8 mL/L de glicerol enrasándose hasta un volumen de 2L con agua MQ. Estas botellas serán esterilizadas mediante autoclavado.

La siguiente etapa de la producción consiste en preparar 12 erlenmeyers, de 2L de capacidad, con 600 mL del medio TBm, que se ha preparado anteriormente, y a los que se añade 0.5 mL/L del antibiótico ampicilina de concentración de 100 mg/mL. El volumen total del medio no debe superar el 25% del volumen total del erlenmeyer para asegurar una buena oxigenación del cultivo. Se añade en cada uno de estos erlenmeyers 1 mL del inóculo y se mantienen en una incubadora, con agitación orbital a 250 rpm y 37°C durante aproximadamente 18-20 horas. Durante este periodo se realizan varias medidas de la absorbancia a 600nm, parándose la producción cuando el cultivo se

encuentra en fase estacionaria de crecimiento. Para finalizar el proceso de bioproducción se recogen los pellets celulares mediante una centrifugación (8000 rpm rotor JLA8.1, 20min, 4°C), dejando las células bacterianas listas para la etapa siguiente.

2.3.1.4 Lavado y preparación de las células bacterianas para el proceso de extracción del biopolímero

El objetivo de esta etapa es limpiar los pellets celulares, obtenidos en la etapa anterior, de posibles restos de medio de cultivo y resuspenderlos en un medio adecuado que permita, mediante un proceso de sonicación, la rotura celular pudiendo extraer así el biopolímero producido.

El lavado de las células, se realiza en 3 etapas sucesivas de centrifugación (8000 rpm rotor JLA8.1, 20 minutos, 4°C) y resuspensión en tampón de lavado de bacterias (Tris-base 20mM y NaCl 0,2M pH 7.5), eliminando el sobrenadante en cada etapa. Tras la última etapa de lavado, las células se resuspenden en tampón de sonicación que contiene Tris-base 20mM pH 7.5, EDTA 2,5mM y 1mM PMSF (inhibidor de proteasas), medio en el que se lleva a cabo la ruptura celular.

2.3.1.5 Extracción y purificación del polímero VKVx24

Las etapas de extracción y purificación que se detallan a continuación son necesarias para obtener el polímero en condiciones óptimas. Estos procesos se llevan a cabo de acuerdo con protocolos ya establecidos en el laboratorio BIOFORGE y aprovechando las propiedades físicas y la naturaleza inteligente del polímero ante cambios en la temperatura y el pH. En el caso del polímero VKVx24 el protocolo a seguir es el que se indica en el siguiente esquema:

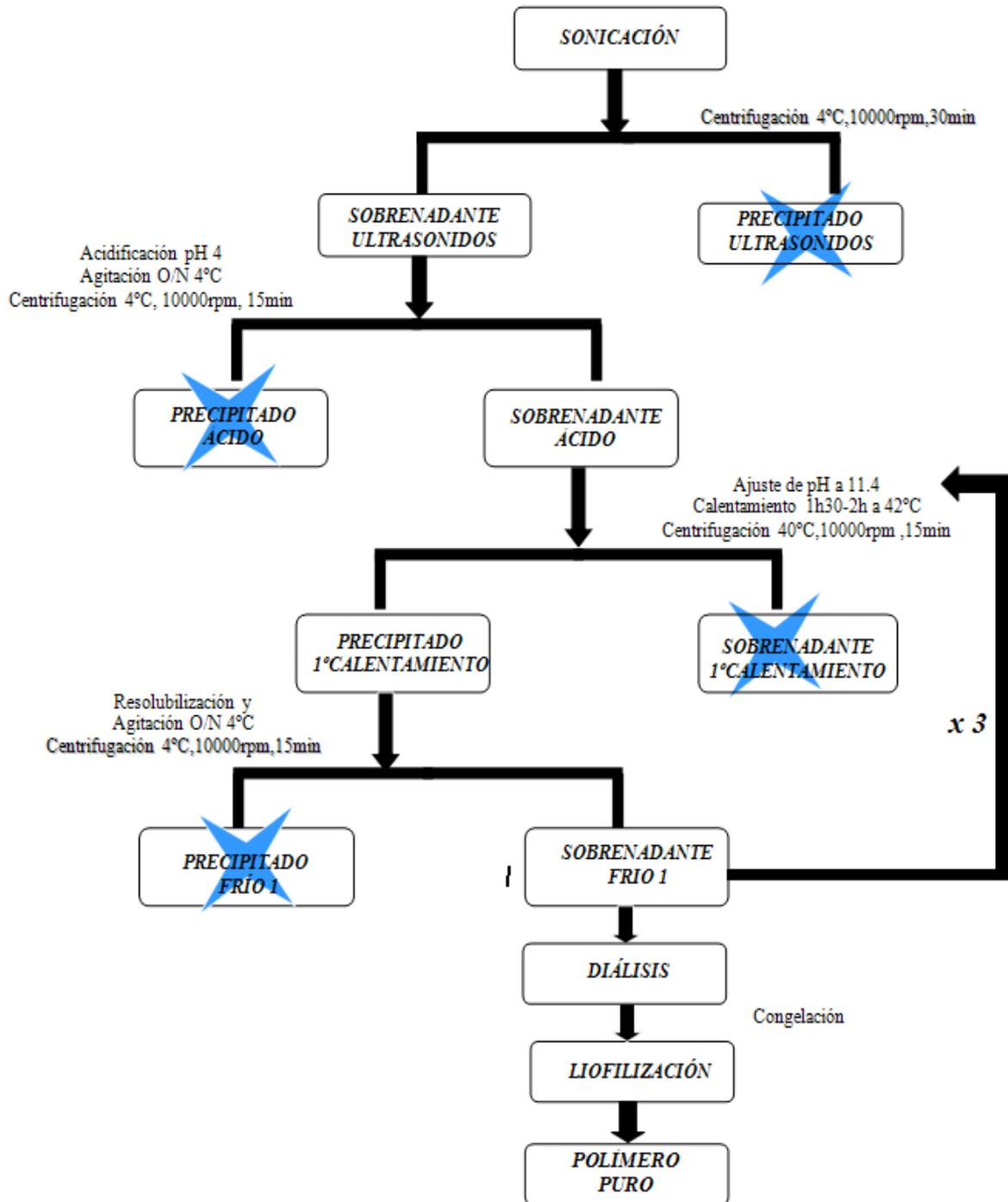


Figura 2.4 Protocolo de purificación del polímero VKVx24.

Las células se someten a un proceso de lisis celular por sonicación a temperatura de 4°C. Este método permite romper la pared celular bacteriana liberándose el biopolímero. Para evitar la acción de proteasas endógenas, que podrían degradar al biopolímero producido, el medio contiene un inhibidor de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo,

PMSF) en concentración 1mM. Las células sonicadas se recogen en un vaso de precipitados y se mantienen en un baño de hielo.

El proceso de purificación del biopolímero se lleva a cabo en una serie de cuatro etapas sucesivas de centrifugación en las que juega un papel importante el cambio de temperatura (calor-frío). Todo el proceso se realiza bajo un estricto control del pH del medio.

Primera etapa: El lisado celular se somete a una centrifugación (2000 rpm, 10 minutos, 4 °C) para eliminar la espuma producida durante el proceso de sonicación. Posteriormente se centrifuga de nuevo (10000 rpm rotor JA14, 30 minutos, 4 °C) con el objetivo de separar la fracción soluble (sobrenadante) en que se encuentra nuestro polímero. Tras la centrifugación se recoge el sobrenadante y se acidifica con HCl 0.1M hasta pH 4 para que se produzca la precipitación de las proteínas que no son de interés y así se consigue separarlas del polímero que queda disuelto. Se deja toda la noche (O/N) en agitación a 4°C. El precipitado se recoge y mantiene congelado a -4°C. Se comprueba posteriormente mediante electroforesis que durante el proceso de centrifugación no se han producido pérdidas de polímero en el precipitado.

Segunda etapa: El sobrenadante recogido y acidificado de la etapa anterior se centrifuga de nuevo (10000 rpm rotor JA14, 20 minutos, 4°C). Tras la centrifugación el sobrenadante ácido es basificado mediante NaOH 1M hasta pH 11.4 y calentado en un baño a 42°C durante 2 horas. El precipitado se recoge y mantiene congelado a -4°C.

Tercera etapa: El sobrenadante alcalinizado en la etapa anterior se somete a una centrifugación en caliente (10000 rpm, 15 minutos, 40°C). En este caso el polímero que se encuentra en el precipitado, debido a que posee una alta solubilidad a esta temperatura y pH, se resolubiliza en agua miliQ y se deja en agitación constante a 4°C durante toda la noche.

Cuarta etapa: El polímero solubilizado en agua se centrifuga (10000 rpm rotor JA14, 15 minutos, 4°C) y con el sobrenadante obtenido se iniciará nuevamente el ciclo a partir de la segunda etapa. Es preciso comprobar que el pH se mantiene en un valor aproximado de 11. Este ciclo se repetirá dos veces más.

En cada etapa se recoge una pequeña muestra del sobrenadante para analizar electroforéticamente. La electroforesis nos permite un seguimiento del proceso de purificación.

Finalmente el polímero disuelto en agua mili Q se somete a una etapa de diálisis con el objetivo de obtenerlo completamente puro, eliminando la posible presencia de sales así como de otras sustancias no deseadas. El polímero disuelto se introduce en una tripa de diálisis (el máximo tamaño molecular que permite pasar 10kDa) dentro de un bidón de 25 L lleno de agua MiliQ y con agitación. Mediante un proceso de ósmosis la disolución del polímero va perdiendo las sales. Se realiza un total de tres cambios de agua MiliQ cada 24h. Tras el proceso de diálisis, la disolución acuosa del biopolímero se liofiliza, proceso que consiste en congelar la muestra e introducirla en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación hasta la obtención del polímero en estado sólido.

Para la comprobación de la pureza del biopolímero obtenido y de su correcto estado se lleva a cabo su caracterización mediante las técnicas de DSC (calorimetría diferencial de barrido), MALDI-TOF (espectrometría de masas), FTIR (espectroscopía infrarroja) y RMN (resonancia magnética nuclear) (apartado 3. RESULTADOS).

2.3.2. Modificación química del “Elastin Like Recombinamer” VKVx24

El recombinámero obtenido tras el proceso de bioproducción se somete a modificación química, en la que se produce la transformación del grupo amino terminal libre situado en la cadena lateral de las lisinas que componen el biopolímero. Se introducen grupos reactivos de diferente naturaleza dependiendo del uso que se dé al polímero modificado.

Para obtener hidrogeles por entrecruzamiento vía química “click”, que es el objetivo de nuestro trabajo, se somete el polímero producido a dos modificaciones químicas:

- Modificación del polímero con un derivado de ciclooctino (VKV-ciclo)
- Modificación del polímero con grupos azido (VKV-N₃)

2.3.2.1 Protocolo de modificación de vkvx24 con un derivado de ciclooctino.

Una solución de (1R, 8S, 9S)-biciclo [6.1.0] non-4-yn-9-ilmetil succinimidil carbonato (0.703mmol, 205 mg, PM 291.30mg/mmol) en 2 mL de dimetilformamida (DMF) se añade a una disolución de 2964 mg del polímero VKVx24 (1.173 mmolNH₂, 24lys, 1 eq, PM 60642Da) en 75 mL de DMF. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 48 horas y bajo atmósfera de argón (Figura 2.5).

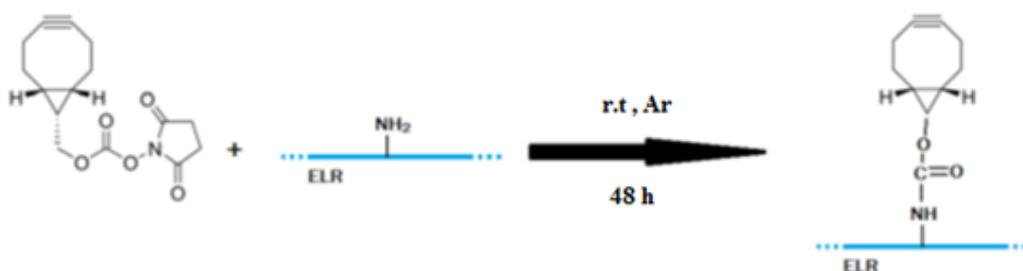


Figura 2.5 Reacción de amidación de los grupos amino libres correspondientes a las lisinas del biopolímero con un derivado de ciclooctino. r.t (temperatura ambiente), Ar (atmósfera de argón).

Después de este tiempo se añaden a la mezcla 60 mL de dietil éter (Et₂O), apareciendo un precipitado blanco correspondiente al polímero que es insoluble en este disolvente. Se centrifuga la mezcla a 10000 rpm (rotor JA14) durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se elimina. El sólido se lava con acetona (2x15mL), se seca a presión reducida y se redisuelve en 30 mL de agua MQ fría (4°C). Se somete a diálisis para purificar el polímero ya modificado (2 cambios de agua destilada y un cambio de agua MQ) y por último se liofiliza durante una semana.

Con los equivalentes de los reactivos utilizados en la reacción se espera una conversión del 50% de las 24 lisinas presentes en el polímero.

2.3.2.2 Protocolo de modificación de vkvx24 con azida tríflica

Se disuelven 3870,75mg de azida de sodio, NaN₃ (59.55 mmol, 100 eq, PM 65mg/mmol) en 11,4mL de agua milliQ, una vez disuelta, se adiciona diclorometano, DCM (14.5mL).

Sobre esa disolución, enfriada en baño de hielo, se añade lentamente “gota a gota” 2mL de anhídrido trifílico (11.91 mmol, 20 eq, d 1.68, PM 282.13mg/mmol). Se mantiene en agitación durante un período máximo de 2 horas, de las cuales será 1 hora a 0°C y 1 hora a r.t (Figura 2.6).

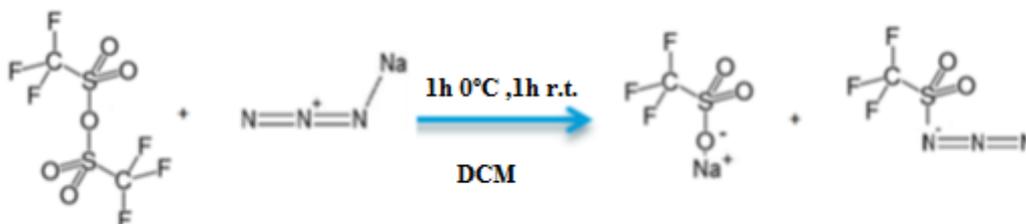


Figura 2.6 Reacción de obtención de azida triflica. r.t (temperatura ambiente).

La fase orgánica de DCM se decanta del crudo de reacción y la fase acuosa es lavada varias veces con DCM. Las fases orgánicas juntas se lavan con una disolución saturada de carbonato de sodio. Finalmente, se obtiene una disolución de azida triflica en DCM, que se utiliza en la siguiente etapa, sin purificación posterior.

Se disuelven 1500mg del polímero VKVx24 (0.595mmolNH₂, 1eq, PM 60642Da) en 18 mL de agua milliQ a 4°C. A esa disolución se le adicionan 1,13mL de una disolución de concentración 300mg/mL de NaCO₃x10H₂O (338.63 mg, 1.18 mmol, PM 286mg/mmol) y 0,19mL de CuSO₄ de concentración 10mg/mL (1.99 mg, 0.008 mmol, PM 249.68mg/mmol) que actúa como catalizador de la reacción. Se añade 1mL de metanol lentamente, en baño de hielo, para evitar precipitados. Por último se añade gota a gota la disolución de azida triflica (11.91 mmol, 100 eq) preparada anteriormente a 4°C disuelta en diclorometano, y se deja agitando a temperatura ambiente toda la noche (Figura 2.7).

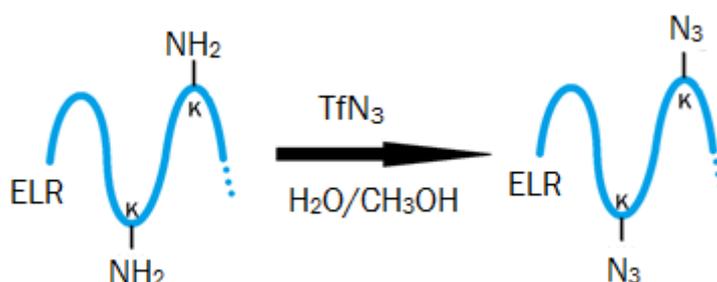


Figura 2.7 Reacción de sustitución de grupos amino libres del biopolímero con azida triflica.

A la mañana siguiente se elimina todo el DCM y el metanol mediante presión reducida en el rotavapor, sin llegar a la sequedad (peligro de explosión de los restos de azida de cobre (I) formado durante el proceso). Se añaden 20mL de agua al matraz y se deja disolviendo a 4°C. Una vez disuelto, el polímero modificado se purifica mediante diálisis, sometiéndolo a dos cambios de agua MQ con urea (5g/l), que permite eliminar las impurezas y sustancias no deseadas de la disolución, seguidos de 3 cambios de agua destilada y se liofiliza durante una semana. Con los equivalentes de los reactivos utilizados en la reacción se espera una conversión del 70% de las 24 lisinas presentes en el polímero.

2.3.3. Formación de hidrogeles por entrecruzamiento químico vía química click

A continuación se explica el protocolo mediante el cual se obtienen hidrogeles a partir de los biopolímeros modificados en el apartado 2.3.2. Primeramente se preparan dos disoluciones de concentración 100 mg/mL de los polímeros VKV-ciclo (PM 61783 Da) y VKV-N₃ (PM 61040 Da) en agua MQ fría y se dejan disolviendo toda la noche (o/n) a 4°C. A la mañana siguiente se dispensa la misma cantidad de cada disolución de polímero sobre un molde tipo disco de PDMS (Polidimetilsiloxano) de 1cm de diámetro (situado en un soporte de teflón) con la ayuda de un dispositivo de doble jeringa (figura 2.8) que permite inyectar al mismo tiempo la misma cantidad de ambas disoluciones, lo que facilita la formación de una mezcla homogénea de los dos polímeros y favorece así la reacción química entre ellos. La mezcla del polímero ramificado soluble polidispersa se denomina “sol”. Este proceso debe realizarse a 4°C (en cámara fría) evitando así la transición de los polímeros.

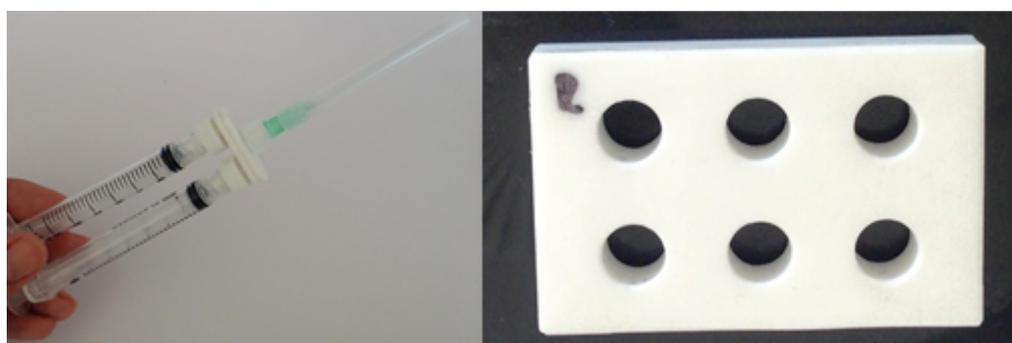


Figura 2.8 Imagen de una doble jeringa que permite inyectar ambas disoluciones poliméricas a la vez. Imagen del soporte de teflón donde se realizarán los hidrogeles, en cada uno de los orificios se introducirán los moldes de PDMS.

Tras un periodo de 60 min los moldes se ponen a temperatura ambiente otros 60 min, durante este periodo comienza a formarse el hidrogel. La transición entre ambos estados se denomina transición sol-gel o gelificación, conociéndose el punto crítico en el que aparece el gel por primera vez como “punto de gel”. Finalmente, los hidrogeles se desmoldan con sumo cuidado.

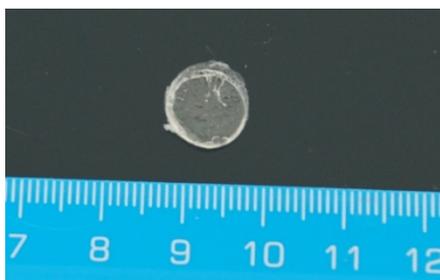


Figura 2.9 Hidrogel desmoldado tras el proceso de gelificación.

Se han realizado hidrogeles de diferente grosor:

Volumen total de mezcla(μL)	Volumen de cada polímero inyectado(μL)
100	50 VKV-ciclo + 50 VKV-N ₃
200	100 VKV-ciclo + 100VKV-N ₃
400	200 VKV-ciclo + 200VKV-N ₃

Tabla 2.5 Cantidades inyectadas en el molde de PDMS.

2.3.4. Preparación de nanogeles con los polímeros VKV-ciclo y VKV-N₃.

Es necesario comprobar que la carga iónica del hidrogel una vez formado se mantenga positiva ya que, tal como se explicó en el apartado de Introducción, es fundamental para la adhesión del hidrogel a las mucinas del ojo.

Debido a la imposibilidad de medir el potencial zeta en sólidos, se procede a preparar nanogeles de los polímeros VKV-ciclo y VKV-N₃ en disolución acuosa, esto son nanopartículas en disolución diluidas de los polímeros entrecruzados vía click. Para ello se pesa un miligramo de cada polímero y se disuelve cada uno de ellos en 1mL de agua MQ y se deja disolviendo toda la noche a 4°C. Tras este periodo de tiempo se añaden 0,5mL de cada disolución a un eppendorf. La mezcla final se deja una hora a 4°C y otra hora a temperatura ambiente. Por último se realizan varias medidas del potencial zeta de

esta disolución a 37°C con la ayuda del Zeta Sizer. Estas medidas darán una idea del potencial zeta del hidrogel.

2.3.5 Preparación de una solución de mucina en agua MQ para comprobar el grado de mucoadhesión del polímero VKVx24.

En función de la concentración de cada componente y su situación en el organismo se distinguen varios tipos de mucina, en concreto las que componen los tejidos conjuntivos y corneales del globo ocular son MUC1, MUC4, MUC16 y MUC5AC [28]. En este trabajo se emplea mucina de estómago de cerdo (MUC2) por su semejanza en composición con las mucinas de los tejidos conjuntivos y corneales del globo ocular.

El peso molecular de una molécula de mucina puede oscilar entre 0,5 y 20 MDa, debido a ello y con el objetivo de obtener una disolución de mucina con un tamaño de partícula adecuado para la correcta adhesión de esta al polímero en los ensayos de mucoadhesión (<200nm), se ha seguido el protocolo descrito por Jringjai Thongborisute y Hirofumi Takeuchi [29] con ciertas modificaciones:

En primer lugar se preparan varias disoluciones de mucina en agua MQ de concentraciones 1%-2%-5%-7%-10% y 50% en peso. Una vez preparadas se dejan agitando o/n a temperatura ambiente. Al día siguiente se mide su índice de refracción utilizando un refractómetro RE50. De todas las disoluciones, se elige una diluida, al 1%, y otra más concentrada, al 10% para someterlas a un proceso de sonicación durante 20 min seguido de una centrifugación a 4000 rpm (rotor JLA8.1) durante otros 20 min a 37°C y se comprueba el tamaño de partícula utilizando un equipo Zeta Sizer.

2.3.6. Ensayo de mucoadhesion del polímero VKVx24 por ángulo de contacto

La mucina puede considerarse como un polielectrolito aniónico a pH neutro debido a la presencia en su composición de ácido siálico y grupos sulfato. Estas cargas negativas juegan un papel importante en las propiedades de mucoadhesión de las mucinas. Los ensayos de mucoadhesión se realizarán basándonos en la “*wetting theory*” [30]. Esta teoría se aplica a los sistemas líquidos que presentan afinidad por una superficie sobre la que pueden difundir. La afinidad puede determinarse mediante la medición de ángulo de

contacto entre el líquido y la superficie. La regla general afirma que cuanto menor es el ángulo de contacto, mayor es la afinidad entre ambos sistemas (figura 2.10).

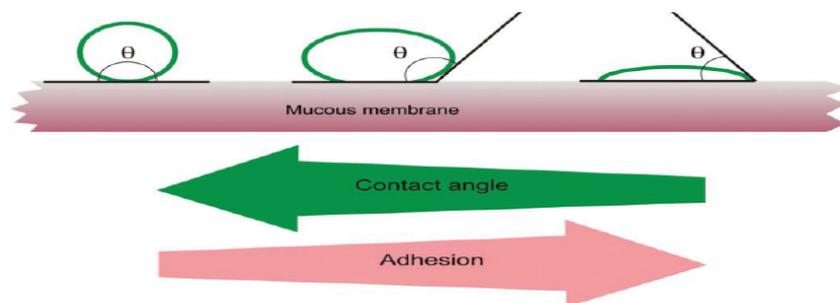


Figura 2.10 Diagrama que muestra la variación general que puede producirse en el ángulo formado entre el polímero y la mucina.

Para realizar estas pruebas primeramente se prepara una disolución de 100mg/mL del polímero VKVx24 en agua MiliQ. Se deja disolviendo durante 24h a 4C°. Al día siguiente se recubre con la disolución de polímero varios soportes de vidrio de 30 mm de diámetro que han sido previamente activados mediante un plasma de argón y oxígeno. Para el recubrimiento se utiliza la técnica de *spincoating*. Se trata de un procedimiento usado para depositar películas delgadas uniformes sobre sustratos planos. Se aplica una pequeña cantidad de material de revestimiento, en este caso la disolución polimérica, sobre el sustrato (soporte de vidrio) fijado a la plataforma del spin-coater mediante una bomba de vacío. La muestra se somete a centrifugación, a velocidad y tiempo determinados, con el fin de que el polímero se expanda uniformemente por la fuerza centrífuga. En la tabla 2.6 se muestran los volúmenes de disolución polimérica, así como las velocidades y los tiempos de centrifugación que se utilizan en seis ensayos diferentes.

Ensayo	Disolución polímero (μL)	Velocidad1 (rpm)	Tiempo1 (s)	Velocidad2 (rpm)	Tiempo2 (s)
1	80	540	9	1680	30
2	80	500	9	1680	30
3	160	450	15	1600	50
4	160	450	15	1600	50
5	180	450	15	1600	50
6	200	450	15	1600	50

Tabla 2.6 Condiciones de los ensayos de recubrimiento de placas de vidrio con disolución del polímero VKVx24.

Una vez formadas las películas delgadas sobre los soportes de vidrio, se procede a medir el ángulo de contacto de una gota de disolución de mucina al 10% sobre el soporte recubierto con el polímero VKVx24. Previamente se realizan varias medidas control con una disolución de agua MiliQ.

2.3.7. Protocolo de preparación de la solución salina lacrimal.

La preparación de una solución salina ocular o SLF (Simulated Lachrymal Fluid) ha sido descrita por N.J. Haeringen. [30] y JensCeulemans y colaboradores [31]:

Para la preparación de 0,5L de SLF se disuelven en agua MQ las cantidades de los compuestos indicados en la tabla 2.7.

Reactivo	Cantidad (g)
KCl	0,895
NaCl	3,156
NaHCO ₃	1,092
CaCl ₂	0,022
MgCl ₂	0,023

Tabla 2.7 Reactivos necesarios para la preparación de la Solución Salina Ocular (SLF).

Antes de su uso es necesario comprobar que el pH sea 7. De no ser así es necesario ajustarlo con una disolución de HCl 0,1N.

2.3.8. Cálculo de la solubilidad del fármaco acetazolamida (AZM) en la solución salina lacrimal.

Se preparan en viales de 10mL las siguientes disoluciones del fármaco acetazolamida:

A) disolución de AZM a concentración 0,3mg/mL en SLF

B) disolución de AZM a concentración 1mg/mL (sobresaturada) en SLF

Ambas disoluciones se dejan en agitación a temperatura ambiente durante 24h.

Transcurrido este tiempo se preparan seis diluciones a partir de la disolución A con las siguientes concentraciones: 0,05mg/mL, 0,10mg/mL, 0,15mg/mL, 0,20mg/mL,

0,25mg/mL y se mide el valor de la absorbancia a 265nm, longitud de onda a la que absorbe el fármaco.

Tras las 24 horas de agitación, el sobrenadante de la disolución B corresponderá a una disolución saturada de AZM en SLF quedando en el precipitado la parte no disuelta. Se realiza entonces una medida de la absorbancia a 265nm de la disolución saturada. Con este valor de absorbancia se podrá obtener la solubilidad del fármaco, en el disolvente salino, por extrapolación en la recta que se obtiene al representar absorbancia frente a concentración del fármaco en mg/mL.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. BIOPRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL “ELASTIN LIKE RECOMBINAMER” VKVx24

Para llevar a cabo la bioproducción del recombinámero VKVx24 mediante fermentación en flasks, tal como se indica en el apartado 2.3.1.3 de Materiales y Métodos, se debe seleccionar en primer lugar y a partir del cultivo de 8 colonias de *E.coli*, aquella en la que la producción de polímero VKVx24 sea mayor. Esta suspensión bacteriana servirá de inóculo para el proceso de bioproducción. La selección se realiza mediante análisis electroforético. Así la colonia seleccionada es la correspondiente a la de la calle 6 (figura 3.1) por presentar una banda más gruesa en el peso molecular correspondiente al del polímero, 60kDa.

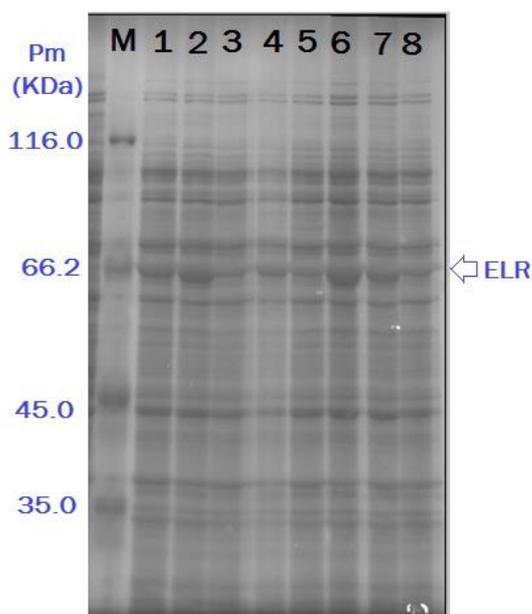


Figura 3.1 Fotografía del gel de electroforesis resultante del *screening*. En el gel se observa como las proteínas se han separado en función de su peso molecular. La flecha indica la banda correspondiente al polímero VKVx24 de 60KDa. La calle indicada con la letra M corresponde al marcador de proteínas patrón.

Una muestra de la suspensión de la colonia seleccionada se cultiva bajo condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano (apartado 2.3.1.2 Materiales y Métodos). Se hace un seguimiento de las diferentes fases del crecimiento bacteriano midiendo de forma periódica la densidad óptica de la suspensión celular. Tras tomar varios valores en la

fase estacionaria de crecimiento y comprobar que el valor de densidad óptica no varía se da por finalizado el proceso de bioproducción.

Por último, se purifica el biopolímero mediante una serie de etapas descritas en el apartado 2.3.1.5 de Materiales y Métodos y se comprueba, mediante análisis electroforético, que el polímero ha seguido la ruta esperada en el proceso de purificación y no se ha perdido en ninguno de los pasos (figura 3.2).

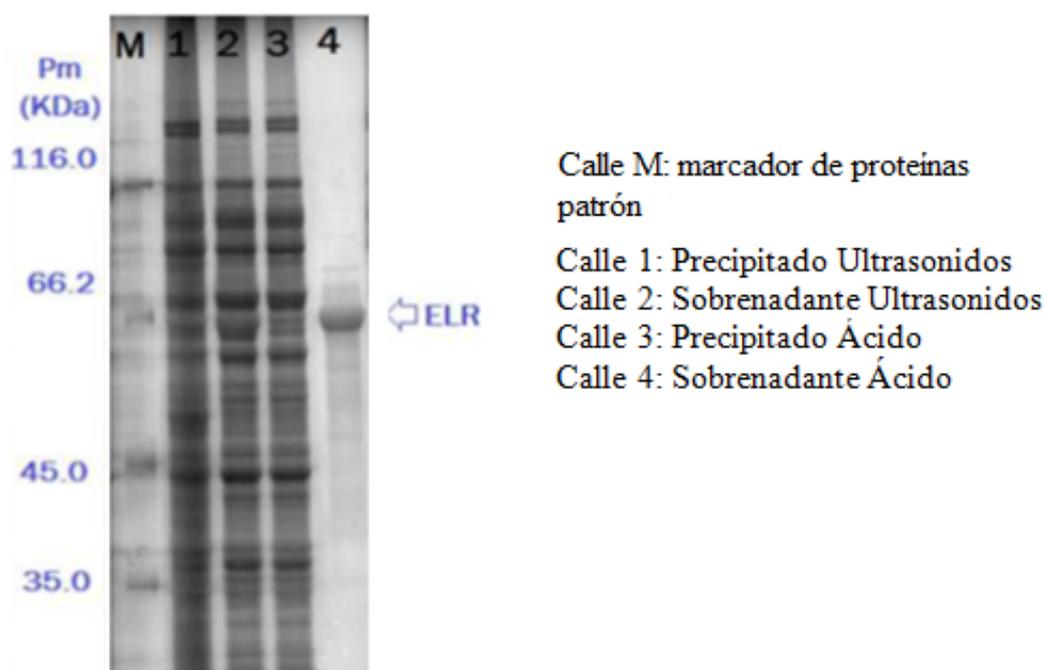


Figura 3.2 Electroforesis correspondiente a algunas etapas del proceso de purificación. En el gel se observa que en el sobrenadante ácido (calle 4) apenas hay proteínas de la bacteria, lo que indica que el polímero de peso molecular 60KDa, señalado con la flecha, está prácticamente limpio, por lo que el proceso de purificación ha sido satisfactorio.

La cantidad total obtenida del polímero es de 693 mg. Debido a que la producción se llevó a cabo en 7.2 L de medio, el rendimiento total alcanzado es de **96.25 mg/L**.

3.2. CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO VKVx24 OBTENIDO TRAS EL PROCESO DE BIOPRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN.

El recombinámero obtenido es caracterizado mediante las técnicas de espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja y calorimetría diferencial de barrido.

Espectrometría de masas (MALDI-TOF): gracias a esta técnica se puede determinar el valor del peso molecular del polímero (figura 3.3). En este caso se obtiene un peso molecular de 60647 Da que coincide con el valor teórico y con el valor aproximado obtenido en el análisis electroforético.

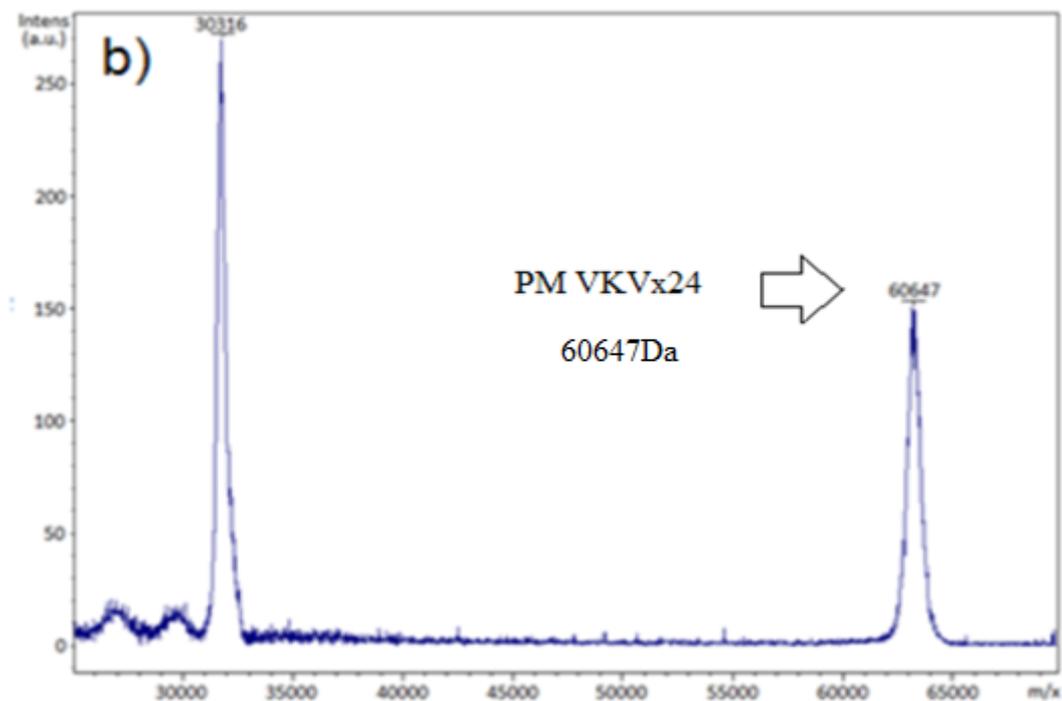


Figura 3.3 Espectrometría de masas del polímero VKVx24 donde se representa la relación masa/carga (m/z) frente a la intensidad de la señal. En el espectro se observan dos picos bien definidos, el primero corresponde al ion dicargado $M^{2+}/2$ y el segundo corresponde al ion monocargado M^+ que ofrece una idea del peso molecular del polímero completo.

Resonancia magnética nuclear (RMN): La estructura del polímero bioproducido se analiza mediante un espectro de RMN de ^1H (figura 3.4). El cálculo de las frecuencias a las que resuena cada protón de la molécula nos permite predecir el rango y la cantidad de hidrógenos que tiene el polímero a lo largo de toda su secuencia.

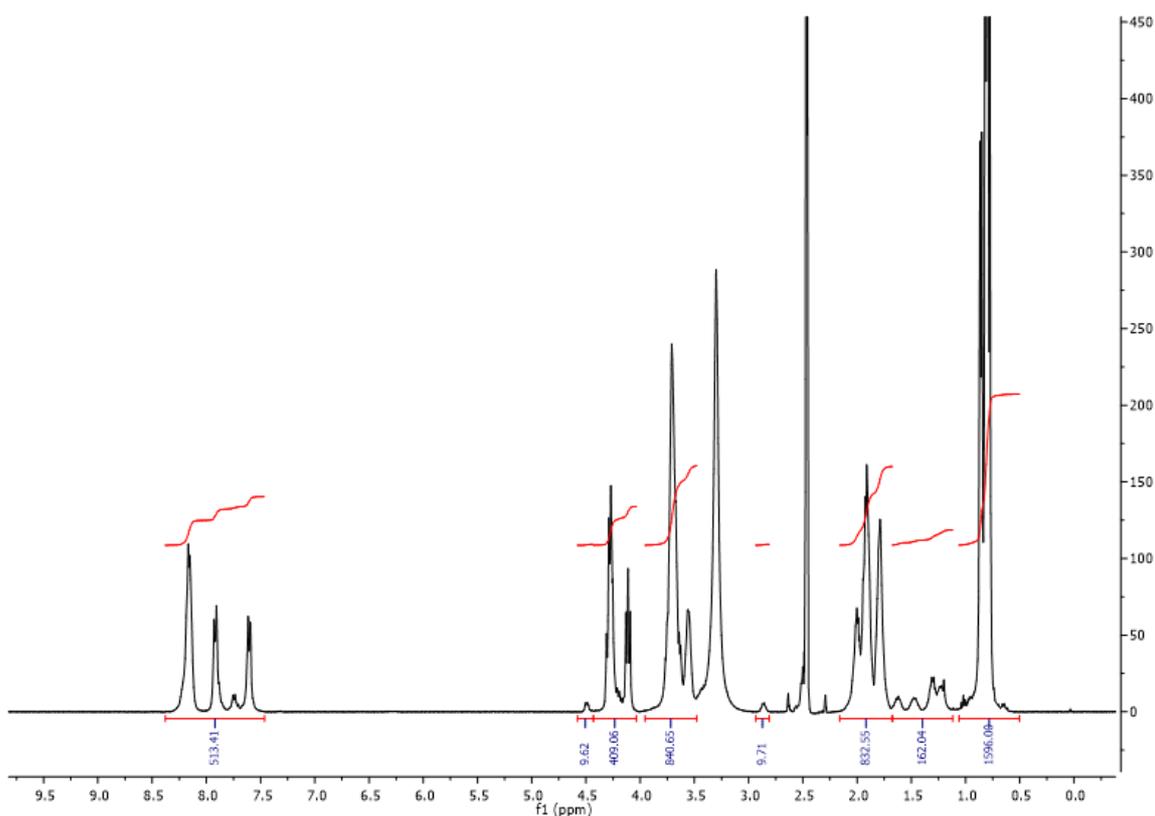


Figura 3.4 Espectro de RMN de protón del polímero VKVx24. Se representa el desplazamiento en ppm frente a la intensidad de la señal. Espectro a mayor escala adjuntado en Anexos, página 63

Espectroscopía infrarroja (FTIR): se observan varias bandas correspondientes a la absorción de luz infrarroja por parte de los diferentes grupos funcionales dependiendo de la longitud de onda. En la figura 3.5, se observa el espectro de infrarrojo del polímero VKVx24, resulta complejo determinar a qué grupos funcionales corresponden cada una de las bandas, pues el polímero es una molécula de alto peso molecular y se produce solapamiento de señales. La señal a 3400cm^{-1} corresponde con la banda de tensión (*stretching*) del enlace N-H de los grupos amido presentes en el biopolímero. A 1600cm^{-1} existe una banda intensa de vibración del enlace C=O de amidas correspondiente a un movimiento de tijereteo (*scissoring*). En torno a 1550cm^{-1} se observa una banda intensa correspondiente al movimiento de tensión del enlace N-C=O en amidas.

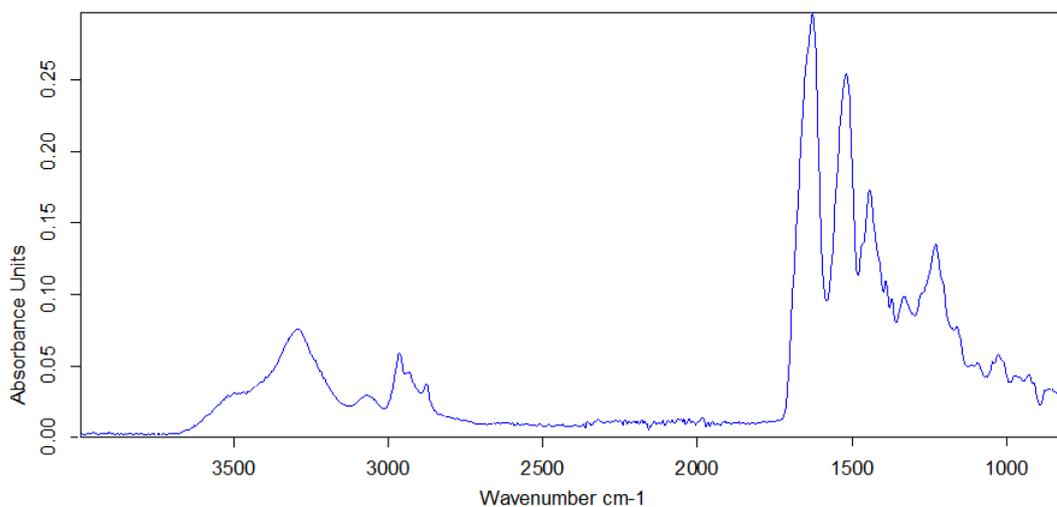
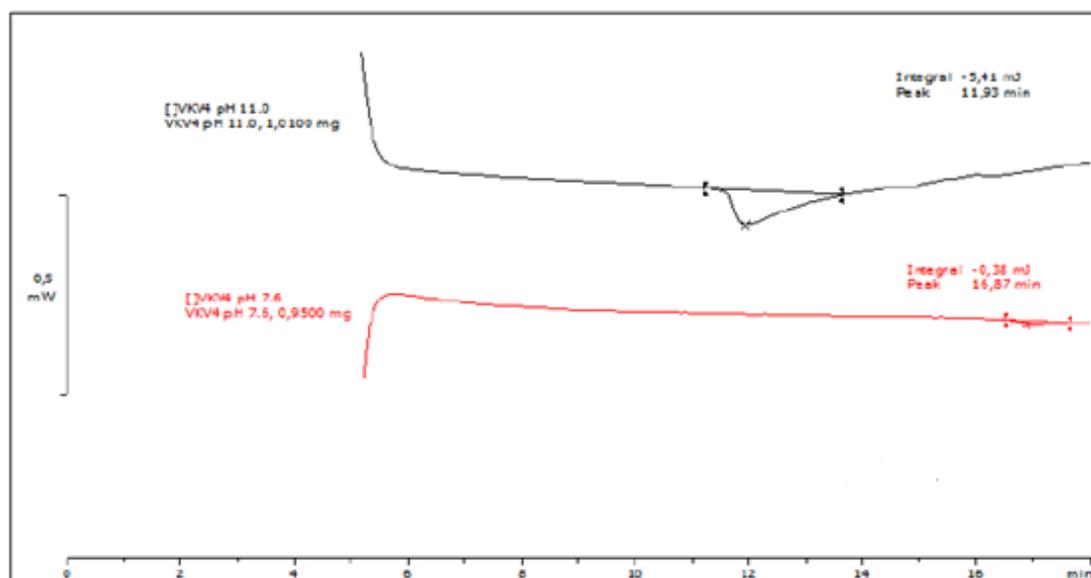


Figura 3.5 Espectro de infrarrojo del polímero VKVx24. En el eje de abscisas se representa la longitud de onda en cm^{-1} mientras que en el eje de las ordenadas se representa la absorbancia. Cada absorción observable en el espectro corresponde a una vibración determinada de algún enlace dentro de la molécula.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC): es la técnica utilizada para determinar la temperatura de transición inversa (TTI) de los polímeros en la que se basa el comportamiento inteligente de éstos. La muestra se somete a un gradiente térmico: en primer lugar se lleva a 0°C y se mantiene durante 5 min, después se eleva la temperatura hasta 60°C con una rampa de temperatura de $+5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Los resultados se recogen en la figura 3.6, para diferentes valores de pH y en dos disolventes: agua MiliQ y PBS (tampón fosfato salino). La curva negra corresponde al termograma a pH 11,6 en agua MQ, basificado con NaOH. El pico correspondiente con la TTI se observa transcurridos unos doce minutos del inicio del gradiente térmico, la muestra se encuentra en este punto a $31,7^{\circ}\text{C}$, por lo que puede afirmarse que el polímero transiciona a esa temperatura. La curva roja corresponde al termograma llevado a cabo empleando disolvente PBS a pH 7,6, el pico se observa transcurridos unos 17 minutos del inicio del gradiente térmico y la temperatura de la muestra en ese momento es de $49,1^{\circ}\text{C}$. Esta diferencia de temperaturas se debe a la variación del pH en función del disolvente utilizado, a pH 11,6 el polímero tiene una estructura no cargada, es apolar y la TTI aumenta, por el contrario a pH 7 el polímero se encuentra cargado, es polar y la TTI disminuye.



Disolvente	pH	TTI(°C)
Agua MQ	11.6	31.7
PBS	7.6	49.1

Figura 3.6 Termograma del polímero VKVx24 a una concentración de 50mg/mL y en dos condiciones experimentales diferentes: pH 11,6, en agua MQ (curva negra) y a pH 7,6 en PBS (curva roja). Se determina la temperatura de transición inversa del polímero (TTI) a través de la curva de flujo calorífico. La TTI del polímero, en cada condición experimental, corresponde con el pico observado en cada una de las curvas. Gráfica a mayor escala adjuntada en Anexos, página 64

3.3. MODIFICACIÓN QUÍMICA DEL “ELASTIN LIKE RECOMBINAMER” VKVX24

El polímero obtenido tras el proceso de bioproducción y purificación se somete a dos tipos de modificación química: modificación con un derivado de ciclooctino (VKV-ciclo) y modificación con grupos azido (VKV-N₃) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.2 de Materiales y Métodos. Para comprobar que el polímero se ha modificado correctamente se llevan a cabo pruebas de espectroscopía de masas, resonancia magnética nuclear y espectroscopia de infrarrojos y se calcula el porcentaje de sustitución de las lisinas libres por los grupos ciclooctino y azido, respectivamente.

3.3.1 Modificación del polímero VKVx24 con un derivado de ciclooctino

El recombinámero tipo elastina bioproducido se modifica químicamente transformando los grupos amino que se encuentran presentes en la cadena lateral de los restos de lisina (ly), por reacción de amidación con un carbonato activado como N-succinimidilester portador de un anillo de ciclooctino. Una vez modificado, el polímero VKV-ciclo es sometido a varias técnicas de análisis para comprobar el grado de sustitución.

Tras realizar una espectroscopia de masas (figura 3.7) se obtiene un peso molecular de 61783 Da, si lo comparamos con el peso molecular del polímero sin modificar 60783Da se observa un aumento de la masa molecular de 1136Da. Esta diferencia de masa es debida a la reacción que se produce durante la modificación del polímero donde se pierde un hidrógeno por cada grupo ciclooctino introducido, por lo tanto:

PM del derivado de ciclooctino que queda enlazado al biopolímero 177Da.

PM del polímero sin modificar 60647Da

PM del polímero modificado 61783 Da

$$PM_{\text{sin modificar}} - n PM_{\text{hidrógeno}} + n PM_{\text{ciclo}} = PM_{\text{modificado}}$$

$$60647\text{Da} - n \times 1\text{Da} + n 177 \text{ Da} = 61783 \text{ Da}$$

Donde “n” es el número de lisinas modificadas

Resolviendo la ecuación se obtiene que $n = 6,50$

Sabiendo que el número de lisinas del polímero VKV es de 24 calculamos el porcentaje de sustitución:

$$\% \text{ sustitución} = \frac{6,50}{24} \times 100 = 27\%$$

Un total de 7 ly han sido modificadas, según los equivalentes utilizados en la reacción cabe esperar una sustitución del 50% de las lisinas, es decir un total de 12 , por lo que el rendimiento de la conversión es del 54%.

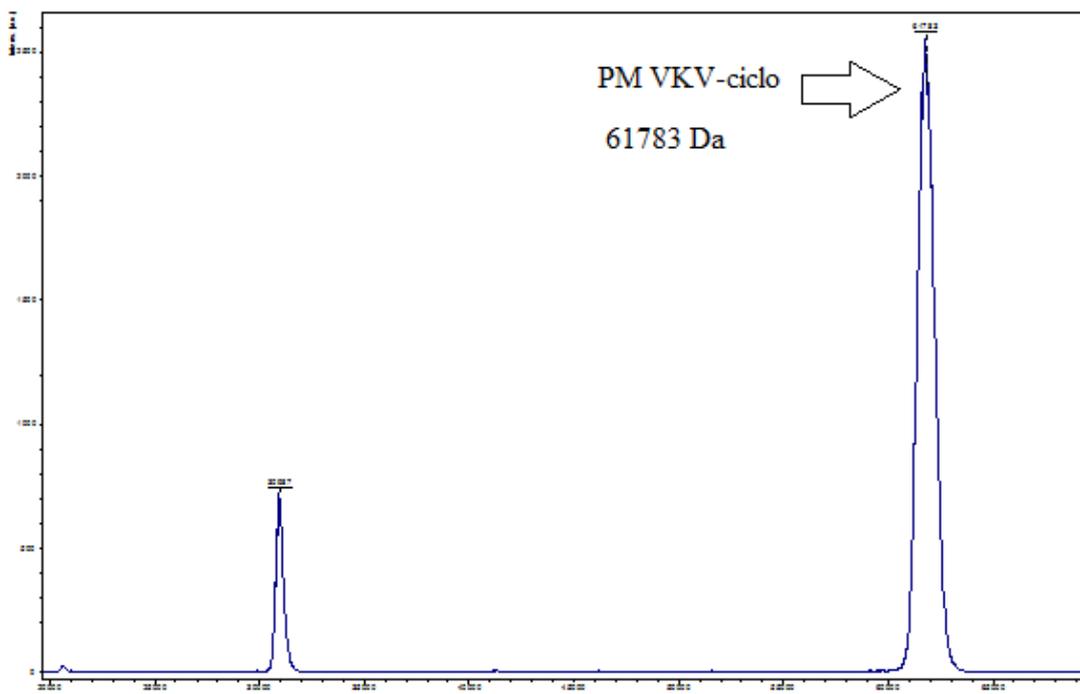


Figura 3.7 Espectrometría de masas del polímero VKV-ciclo donde se representa la relación masa/carga (m/z) frente a la intensidad de la señal. El primer pico observado corresponde con el ion dicargado $M^{2+}/2$, el segundo pico corresponde al del ion monocargado M^+ y da un valor total del peso molecular del polímero.

Gracias a la técnica de RMN podemos obtener con exactitud el grado de sustitución de las lisinas del polímero, mediante la integración de las señales que ofrece el espectro. En la figura 3.8 A) correspondiente al espectro de RMN de ^1H del polímero VKV-ciclo, se observan señales destacadas en rojo a 3, 4 y 7 ppm (partes por millón). Estas señales nos dan una idea del grado de sustitución que se ha producido tras la modificación química.

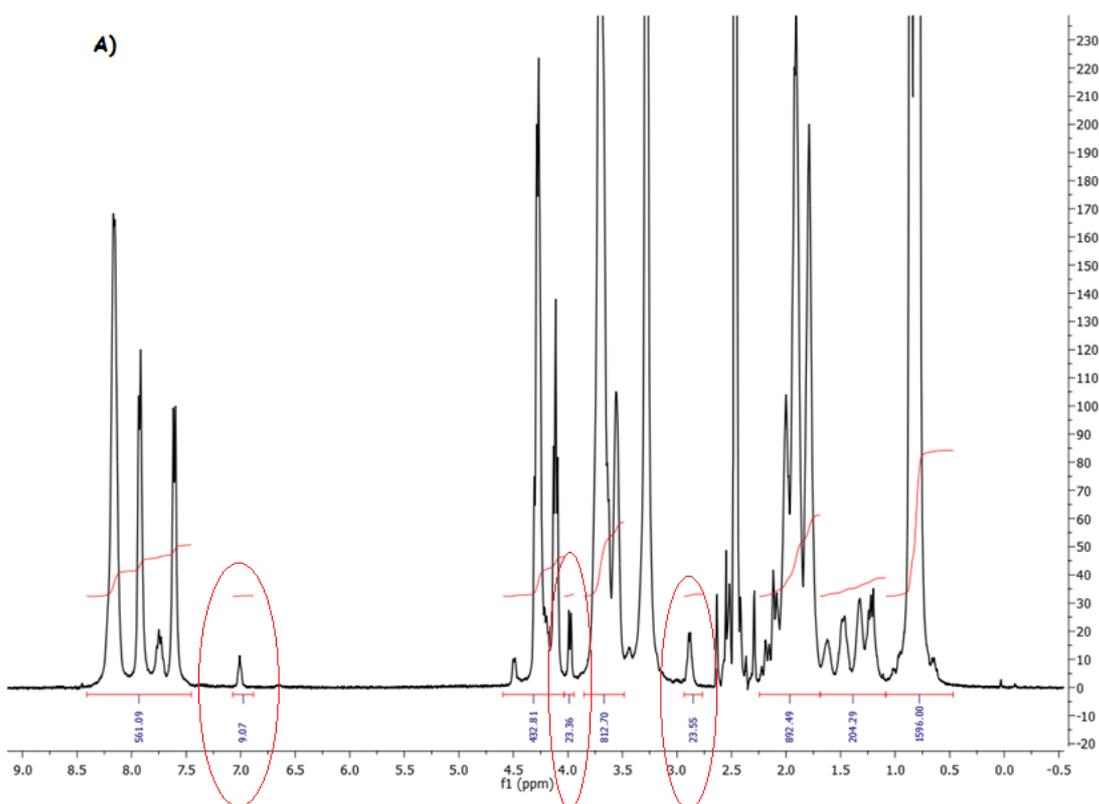
En primer lugar la señal a 3 ppm corresponde a los hidrógenos del grupo metileno adyacente al grupo amino de la cadena lateral de las lisinas, que, una vez realizada la modificación del polímero con el N-succinimidilester, queda enlazado al carbamato que se ha formado. La señal a 4 ppm corresponde a los hidrógenos del metileno situados entre el grupo ciclooctino y el carbamato. Por último la señal que aparece a 7 ppm corresponde al hidrógeno perteneciente al carbamato formado.

En la figura 3.8 B) se observan los desplazamientos químicos teóricos correspondientes al espectro de RMN de protón del derivado de ciclooctino y la cadena lateral de la lisina ya enlazados, los grupos que dan las señales de interés están

señalados con un círculo rojo. Se comprueba que los desplazamientos obtenidos en el RMN del polímero, concuerdan con los teóricos.

Para obtener el porcentaje de sustitución de las lisinas, nos centraremos en el valor de la integral obtenida a 7 ppm ya que ofrecerá más exactitud que las señales a 3 y 4 ppm debido a que se trata de una señal más aislada, por otra parte, la corrección de la línea base en la zona de 7 ppm es mayor que en el resto del espectro, donde hay un mayor número de señales.

Por lo tanto, obtenemos que un total de 9 lisinas han sido modificadas, lo que supone un 37% de sustitución. La diferencia del valor numérico respecto a la espectrometría de masas es pequeña, por lo que es un error asumible.



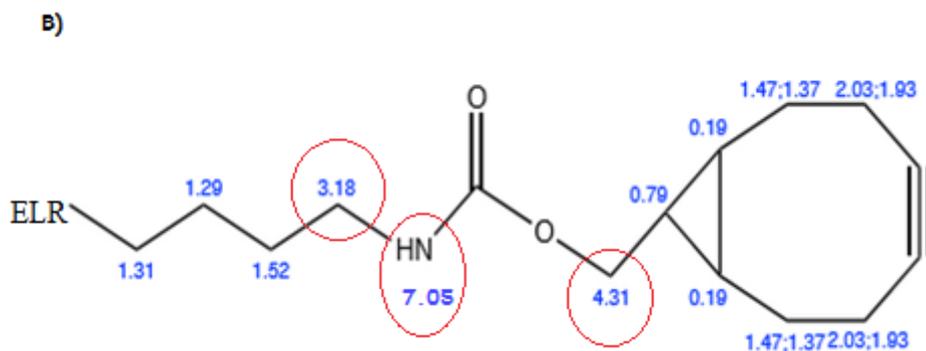


Figura 3.8 A) Espectro ^1H del polímero VKV-ciclo, las señales de interés a 3, 4 y 7 ppm Espectro a mayor escala adjuntado en Anexos, página 65. B) Desplazamientos químicos teóricos de ^1H (ppm) del espectro de RMN del derivado de ciclooctino. Rodeados en rojo aparecen los hidrógenos que dan las señales de interés.

La técnica FTIR no permite comprobar que se ha llevado a cabo la modificación del polímero con ciclooctino porque se solapan las señales con las propias del polímero de partida. En la figura 3.9 se muestra el espectro de infrarrojo correspondiente al biopolímero VKVx24 de partida y al modificado VKV-ciclo. Se observa que no existen diferencias que posibiliten la identificación del derivado de ciclooctino.

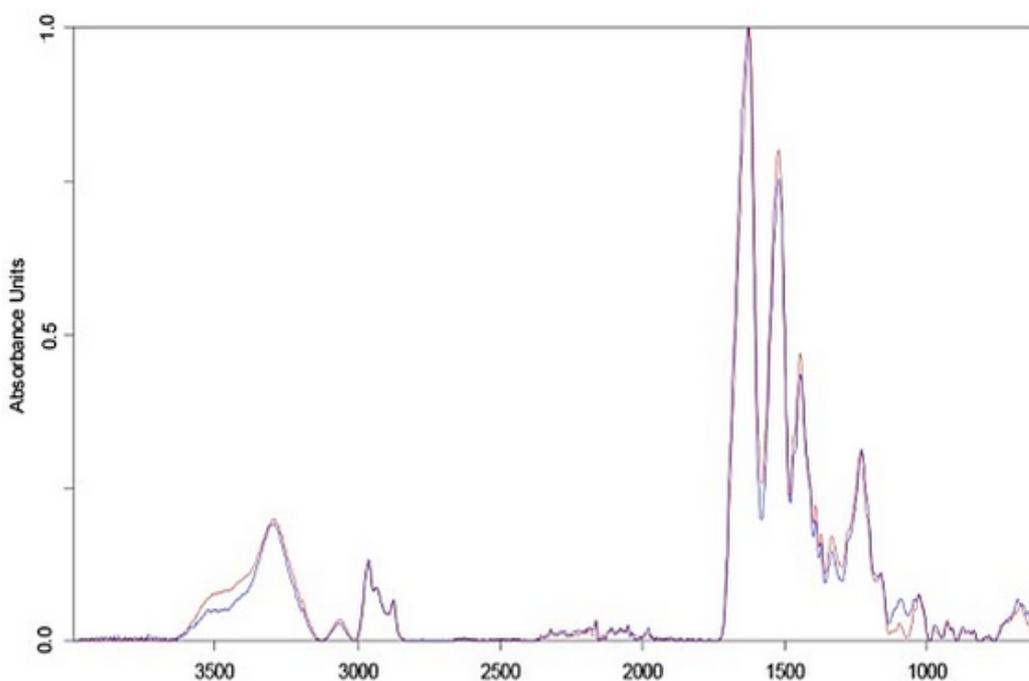


Figura 3.9 Espectro de IR del polímero VKV sin modificar (azul) y del polímero modificado con ciclooctino (rojo).

Rendimiento de la reacción de modificación del polímero VKV-ciclo:

Reacción	Masa Inicial (mg)	Moles Inicial	Masa Final (mg)	Moles Final	Rendimiento
VKV-ciclo	3000	0.0496	2240	0.0364	73%

Tabla 3.1 Rendimiento de la reacción del VKV-ciclo

3.3.2 Modificación del polímero VKVx24 con azida triflica

La reacción que se ha llevado a cabo es la modificación de los grupos aminos (-NH₂), transformándose en grupos azido (-N₃) mediante una sustitución nucleófila. En este caso se debe calcular el número de lisinas del polímero que han sido sustituidas. La espectrometría de masas (figura 3.10) indica que el peso molecular del biopolímero una vez modificado es de 61040Da, comparándolo con el PM del polímero sin modificar que era de 60647Da se observa una diferencia de 393Da. Esta diferencia de masa se debe a la reacción llevada a cabo durante la modificación del polímero, en la que se produce la transformación de los grupos aminos (NH₂) de las lisinas en grupos azido (N₃). Por lo tanto, en el proceso de reacción se pierden dos hidrógenos y se ganan dos nitrógenos.

PM del nitrógeno 14Da.

PM del polímero sin modificar 60647Da

PM del polímero modificado 61040 Da

$$PM_{\text{sin modificar}} - n \times 2PM_{\text{hidrógeno}} + n \times 2PM_{\text{nitrógeno}} = PM_{\text{modificado}}$$

$$60647\text{Da} - n \times 2\text{Da} + n \times 28\text{Da} = 61040\text{Da}$$

Donde “n” es el número de lisinas modificadas

Resolviendo la ecuación se obtiene que n= 15,11

Sabiendo que el número de lisinas del polímero VKV es de 24 calculamos el porcentaje de sustitución:

$$\% \text{ sustitución} = \frac{15,11}{24} \times 100 = 63\%$$

Un total de 15 lisinas han sido modificadas, según los equivalentes utilizados en la reacción, cabe esperar una sustitución del 70% de las lisinas, es decir un total de 17, por lo que el rendimiento de la conversión es del 90%.

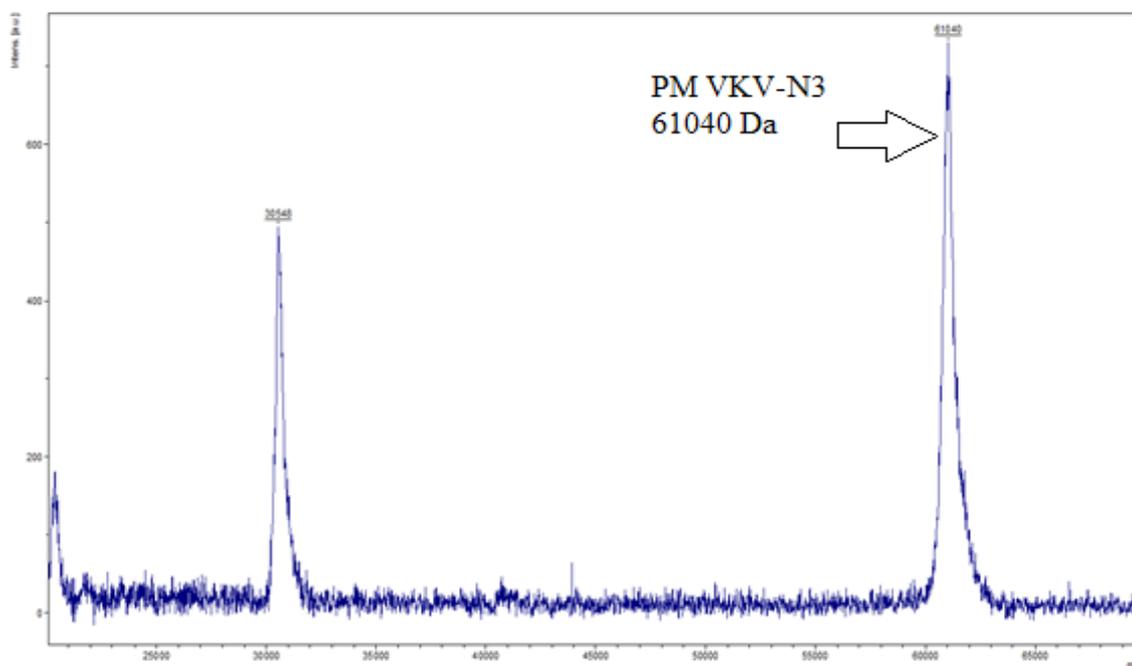


Figura 3.10 Espectrometría de masas del polímero VKV-N₃ donde se representa la relación masa/carga (m/z) frente a la intensidad de la señal. El primer pico observado corresponde con el ion dicargado M²⁺/2, el segundo pico corresponde al del ion monocargado M⁺ y da un valor total del peso molecular del polímero.

Una resonancia magnética nuclear del polímero modificado con azida tríflica (figura 3.11) no nos proporciona la información necesaria para saber si se han introducido los grupos azido en la molécula del biopolímero. Debido a la complejidad de la biomolécula modificada con la que trabajamos se produce un solapamiento de señales que dificulta su lectura y no se puede observar con claridad ninguna señal que indique la introducción de grupos azido en el biopolímero.

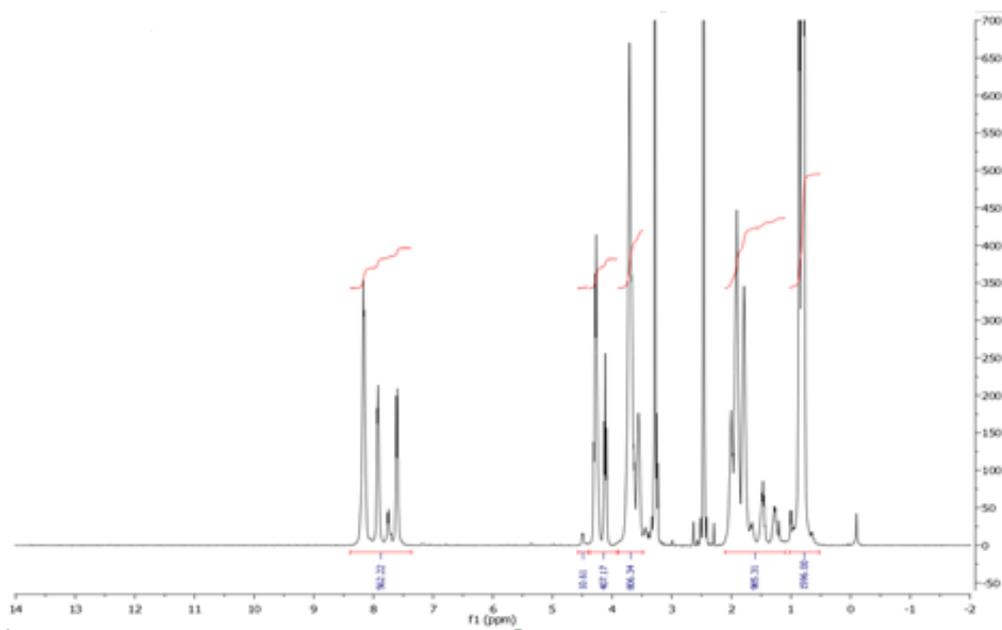


Figura 3.11 Espectro de ^1H del polímero VKV- N_3 . Se representa el desplazamiento en ppm frente a la intensidad de la señal. Espectro a mayor escala adjuntado en Anexos, página 66.

La técnica de espectroscopia infrarroja sí permite justificar la modificación química del biopolímero VKV- N_3 , pues el grupo azido presenta una banda característica a una frecuencia de 2100 cm^{-1} . Se realiza el espectro (figura 3.12) y se comprueba que la banda existe en el biopolímero modificado y que no la presenta el polímero sin modificar, lo que indica por tanto la presencia de grupos azido en el polímero.

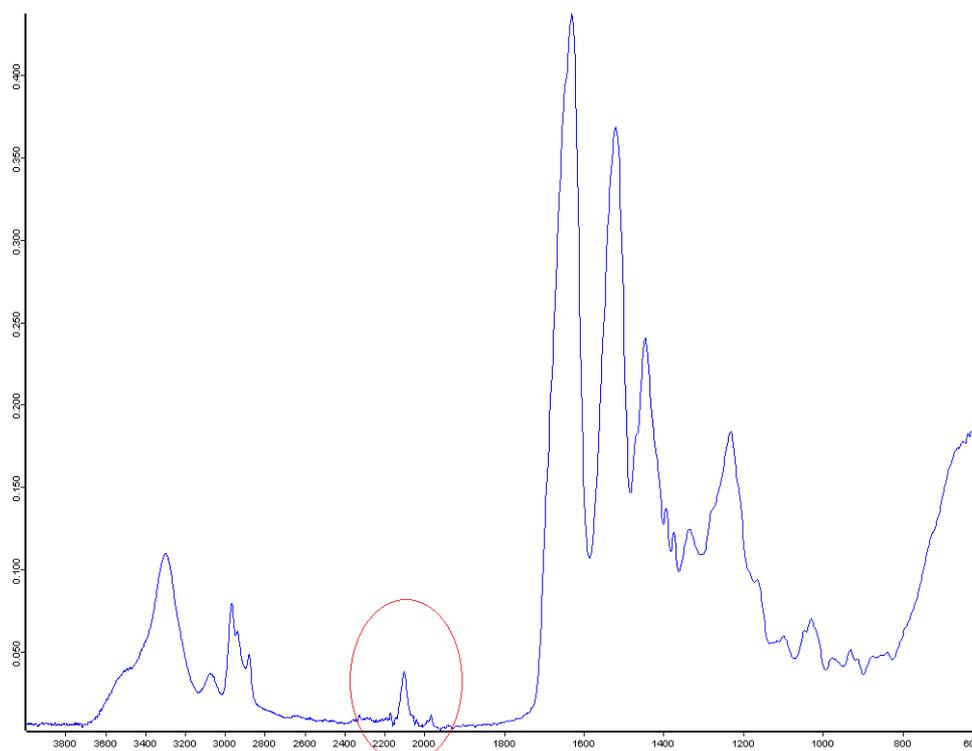


Figura 3.12 Espectro IR del VKV-N₃. Se observa a 2100cm⁻¹ la banda característica (rodeada en rojo) del grupo azido, lo que reafirma su presencia en el polímero.

Rendimiento total de la reacción de modificación del polímero VKV con el grupo azido:

Reacción	Masa Inicial (mg)	Moles Inicial	Masa Final (mg)	Moles Final	Rendimiento
VKV-N ₃	1500	0.0248	985	0.0059	65%

Tabla 3.2 Rendimiento de la reacción de VKV-N₃.

3.4. FORMACIÓN DE HIDROGELES POR ENTRECruzAMIENTO QUÍMICO VÍA QUÍMICA CLICK Y CARACTERIZACIÓN DE SU TEMPERATURA DE TRANSICIÓN INVERSA

Los hidrogeles están formados por los polímeros modificados VKV-ciclo y VKV-N₃ que, a través de los grupos introducidos en la modificación, reaccionan entrecruzándose vía química click. Se han conseguido formar hidrogeles de diferente grosor empleando diferentes volúmenes de mezcla, tal como se indica en la tabla 2.5 de Materiales y Métodos.

Para comprobar, que tras el entrecruzamiento de los polímeros y formación del hidrogel, las propiedades termosensibles de los polímeros constituyentes se mantienen intactas, se realizan varias medidas del diámetro y espesor de los hidrogeles formados a diferentes temperaturas: temperatura ambiente, 4°C y a 37°C en disolución lacrimal (se utiliza esta disolución ya que presenta la misma composición que la solución salina presente en el ojo donde potencialmente se colocará el hidrogel). Los resultados se muestran en la tabla 3.3 y en la figura 3.13.

Volumen total mezcla(μl)	Diámetro 4°C (mm)	Espesor 4°C (mm)	Diámetro T.amb. (mm)	Espesor T.amb. (mm)	Diámetro 37°C (mm)	Espesor 37°C (mm)
100	-	-	10,45	0,03	-	-
200	9,60	0,83	9,17	0,49	6,51	0,30
400	10,00	1,20	9,80	1,00	6,73	0,90

Tabla 3.3 Diametro y espesor correspondiente a tres hidrogeles de composición: 50μl VKV-ciclo+50μlVKV-N₃; 100μl VKV-ciclo+100μlVKV-N₃ y 200μl VKV-ciclo+200μlVKV-N₃ y bajo diferentes condiciones experimentales.

A 4°C los hidrogeles en disolución lacrimal experimentan un aumento de tamaño respecto al que presentan a temperatura ambiente. Así a 25°C (temp. Ambiente) el hidrogel de 200μl que presenta un diámetro de 9,17mm y un espesor de 0,49mm, a 4°C aumenta hasta dar un valor de diámetro de 9,60mm y un espesor de 0,83mm. En el caso del hidrogel de 400μl pasa de 9,80mm de diámetro y 1,00mm de espesor a 10,00 mm y 1,20mm respectivamente. Sin embargo, a 37°C disminuyen de tamaño, para el hidrogel de 200μl se observa una diferencia de 3mm entre el diámetro a temperatura ambiente y el hidrogel a 37°C que presenta un valor de 6,51mm y un espesor de 0,30. En el hidrogel de 400μl también se observa una notable disminución de tamaño, presentando un valor de 6,73mm de diámetro y un espesor de 0,90mm.

No se pudieron realizar las medidas del hidrogel formado con un volumen de 100 μl (50μl VKV-ciclo+50μlVKV-N₃) ya que a 37°C se plegaba totalmente imposibilitando realizar más medidas a otras temperaturas ser debido a su pequeño espesor .

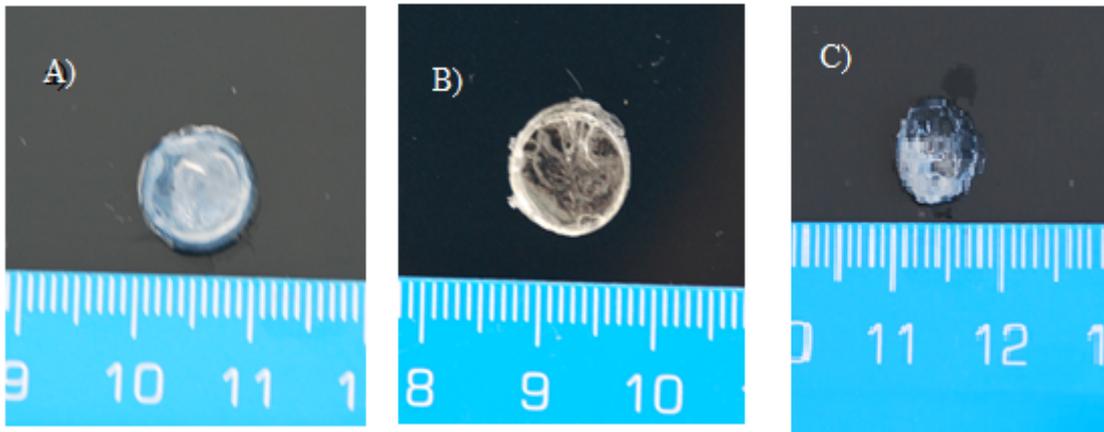


Figura 3.13 A) Imagen del hidrogel a 4°C B) Imagen del hidrogel a temperatura ambiente C) Imagen del hidrogel a 37°C.

3.5. PREPARACIÓN DE NANOGELES CON LOS POLÍMEROS VKV-CICLO Y VKV-N₃ QUE PERMITAN EXTRAPOLAR EL VALOR DE CARGA IÓNICA DEL HIDROGEL

Tal y como se indicó en el apartado 2.3.4 de Materiales y Métodos, la medida de la carga iónica del hidrogel no se puede realizar directamente ya que no se puede medir el potencial zeta en sólidos, de modo que es necesario preparar una disolución de nanogeles formados por la combinación de los polímeros VKV-ciclo y VKV-N₃ en disoluciones diluídas, que dan lugar a la formación de nanopartículas de los polímeros entrecruzados vía click, y medir el potencial zeta de estas partículas. A partir de los resultados obtenidos, nos podemos hacer una idea del potencial zeta del hidrogel. Se realizaron un total de tres medidas (tabla 3.4) del potencial zeta a 37°C. Se obtiene un valor de potencial que oscila entre 27,1 y 28,2 mV siendo la media 27,5 mV.

Medida	Potencial zeta (mV)
1	27,1
2	27,2
3	28,2
media	27,5

Tabla 3.4 Medidas del potencial zeta en mili voltios de los nanogeles. Las medidas se realizaron con un zeta sizer.

Se comprueba por lo tanto, que el potencial zeta es positivo. Esta carga es conferida por los grupos amino de las lisinas que quedan sin modificar en el polímero, que a pH fisiológico (pH 7) se encuentran protonados como grupos $-NH_3^+$. A pesar de la presencia de grupos N_3 que quedan sin reaccionar con el ciclooctino, pues estaban en exceso con respecto a este, y que, a pH 7 se encuentran cargados negativamente, el número de grupos amonio es superior, por lo que la carga total neta es positiva. En la figura 3.14 se observa la gráfica de la distribución del potencial zeta de una de las medidas realizadas.

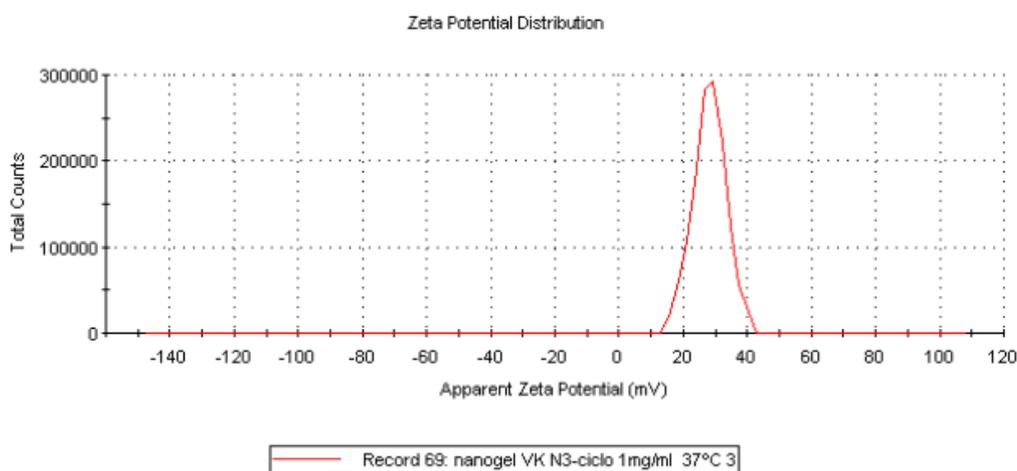


Figura 3.14 Distribución del potencial zeta de la disolución de nanogeles a 37°C.

De estos resultados cabe esperar que en los ensayos de mucoadhesión el hidrogel se adhiera a la mucina, que presenta un potencial zeta negativo (en torno a $-5mV$ a pH 7).

3.6. PREPARACIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE MUCINA EN AGUA MQ Y DETERMINACIÓN DE SU ÍNDICE DE REFRACCIÓN Y TAMAÑO DE PARTÍCULA.

Es necesario conocer el índice de refracción de la disolución de mucina en agua MQ para poder medir su tamaño de partícula con el zeta sizer. Por lo tanto, se realizaron varias medidas de diferentes concentraciones de mucina en el orden de la más diluida a la más concentrada, obteniéndose los datos de la tabla 3.5. Se observa que el valor no varía en función de la concentración y siempre permanece constante.

Concentración (% peso)	Índice de refracción
1	1,3309
2	1,3309
5	1,3309
7	1,3309
10	1,3309
50	1,3310
media	1,3309

Tabla 3.5 Medidas del índice de refracción de la solución de mucina

A continuación se comprueba el tamaño de partícula de las disoluciones al 1% y al 10% sin llevar a cabo el proceso de sonicación + centrifugado descrito en el apartado 2.3.5 de Materiales y Métodos (figura 3.15 A) y llevando a cabo el proceso de sonicated + centrifugado (figura 3.15 B). En el primer caso se observa un tamaño de partícula que oscila entre 200 y 400nm para la disolución de mucina al 1% y entre 800 y 2000nm para la disolución al 10%, esto indica, que mientras las partículas de mucina en la disolución al 1% tienen un tamaño cercano al ideal para realizar las pruebas posteriores de mucoadhesión (<200nm), las partículas de la disolución al 10% se alejan mucho del tamaño deseado.

Tras el proceso de sonicated y centrifugado de ambas disoluciones los tamaños de partícula que se obtienen son muy inferiores, estando entre 20 y 40 nm para la disolución al 1% y entre 30 y 80 para la del 10%. Lo que hace óptimo su adhesión al hidrogel.

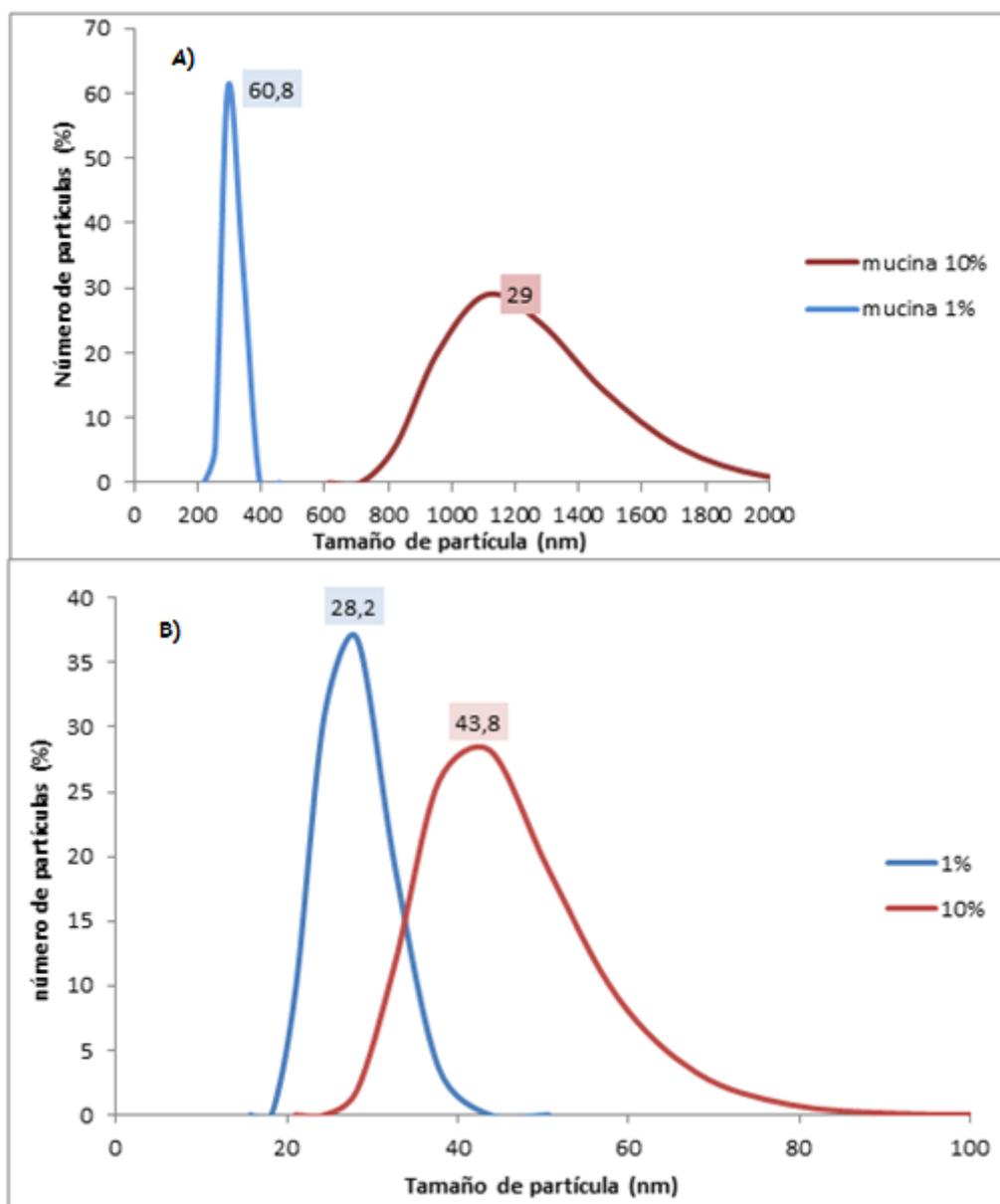


Figura 3.15 A) Gráfica de tamaño de partícula de las disoluciones de mucina sin llevar a cabo el proceso de sonicado + centrifugado. B) Gráfica de tamaño de partícula de las disoluciones de mucina llevando a cabo el proceso de sonicado + centrifugado.

3.7. ENSAYO DE MUCOADHESION DEL POLÍMERO VKVX24 POR ÁNGULO DE CONTACTO

Se realizan varios ensayos de adhesión del polímero VKVx24 a agua MQ (ensayo control) y a una disolución de mucina al 10% de concentración. Un total de seis soportes de vidrio de 30 mm de diámetro se recubrieron con el polímero mediante la técnica de *spincoating*, tal como se describe en el punto 2.3.6 de Materiales y Métodos. Se comprueba el grado de afinidad de estas superficies con la disolución de mucina

mediante la técnica del ángulo de contacto, los resultados obtenidos se recogen en la tabla 3.6.

Ensayo	Disolución polímero añadido (µl)	Ángulo de contacto agua MQ (°)	Ángulo medio (°) %DER	Ángulo de contacto disolución de mucina (°)	Ángulo medio (°) %DER
1	80	74,4-73,91-	72,55	NM-38,04-	42,99
		73,07-69,23-	1,75	41,89-37,35	5,61
		72,45-72,60		47,28- 50,22	
2	80	60,40-69,35-	66,80	NM-61,14-	54,54
		66,45-67,47-	3,39	62,19-47,64-	8,24
		69,89-67,25		47,19-NM	
3	160	NM-60,87-	42,89	NM-35,60-	42,23
		37,58-41,95-	12,66	36,94-NM-	10,46
		31,53-NM		57,82-38,56	
4	160	NM-40,60-	50,32	NM-42,25-	43,23
		46,99-41,52-	10,79	43,56-35,96-	7,54
		59,61-65,91		38,77-55,63	
5	180	34,80-37,66-	46,13	36,79-58,43-	49,20
		37,92-42,30-	12,56	60,67-53,81-	9,39
		61,70-62,40		42,25-47,27	
6	200	34,40-39,70-	51,73	37,83-57,39-	57,57
		46,80-61,03-	13,23	61,38-58,82-	9,84
		62,24-66,22		60,77-61,19	

Tabla 3.6 Medidas del ángulo de contacto de las superficies recubiertas de polímero VKVx24. NM: ángulo no medible. (%DER Desviación Estándar Relativa).

Tanto las medidas del ángulo con agua, como las de la disolución de mucina muestran una gran variabilidad. Estos resultados indican que no se ha formado una película homogénea de polímero sobre los soportes de vidrio. En las zonas donde no se ha unido

el polímero, el ángulo no es medible debido a la activación de la superficie previa al recubrimiento, realizada para mejorar la formación de la película delgada, que convierte a la superficie en hidrofílica. En otras zonas de la superficie si existe recubrimiento con el polímero y puede medirse el ángulo de contacto. El resultado que se esperaría, si el recubrimiento de la superficie hubiera sido homogéneo, es que el ángulo entre la gota de disolución de mucina y la superficie recubierta con el polímero fuera menor que el formado entre la gota de agua MQ y la superficie, lo que indicaría que existe una afinidad entre mucina-polímero, provocada por las interacciones entre las cargas negativas de la mucina y las positivas del polímero. Los valores del ángulo medio en los ensayos 1, 2, 3 y 4 si reflejan una tendencia a la disminución del ángulo polímero-mucina, sin embargo la diferencia es muy pequeña. Además los valores de la desviación estándar (%DER) relativa son muy elevados en todos los casos. Debido a que el comportamiento esperado no se observa con claridad, no puede darse por válido este ensayo de mucoadhesión del polímero VKVx24.

Será preciso realizar una optimización del ensayo de recubrimiento de superficies con el polímero y llevar a cabo nuevos ensayos de mucoadhesión en investigaciones futuras.

3.8 CÁLCULO DE LA SOLUBILIDAD DEL FÁRMACO ACETAZOLAMIDA (AZM) EN LA SOLUCIÓN SALINA LACRIMAL.

Se prepararon seis disoluciones del fármaco acetazolamida tal como se indica en el apartado 2.3.8 de Materiales y Métodos. Se mide la absorbancia a 265nm, longitud de onda a la que absorbe el fármaco. Las medidas de absorbancia se muestran en la tabla 3.7.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia (265nm)
0,05	0,179
0,10	0,338
0,15	0,538
0,20	0,716
0,25	0,869
0,30	1,016
Disolución saturada	2,020

Tabla 3.7 Medidas de absorbancia a 265 nm del fármaco AZM en disolución salina lacrimal.

Los datos obtenidos se muestran en la figura 3.16 donde se representa la concentración (mg/mL) frente a la absorbancia (265nm). El valor de concentración correspondiente al valor de absorbancia de la disolución saturada se obtiene por extrapolación en la ecuación de la recta obtenida al representar los datos. Así, la máxima cantidad de fármaco soluble en la disolución lacrimal utilizada como disolvente es de **0,572 mg/mL**. Este dato será de gran utilidad para futuros ensayos de liberación del fármaco empleando los hidrogeles formados en el presente trabajo.

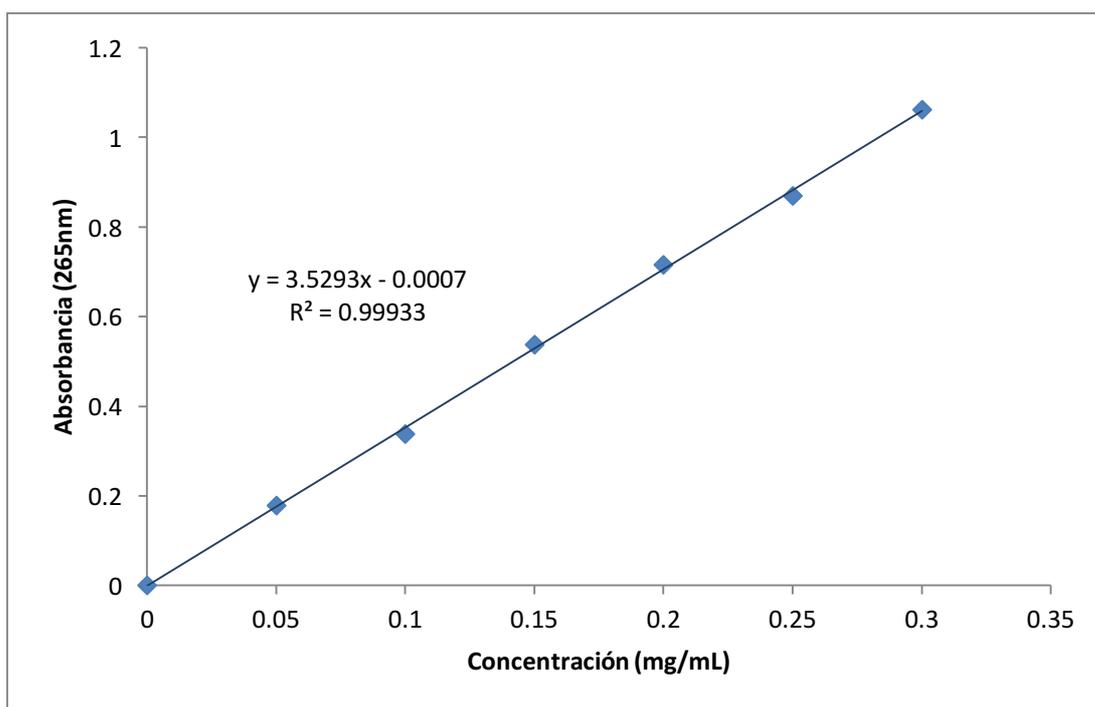


Figura 3.16 Gráfica que representa la concentración de AZM en mg/mL frente a la Absorbancia a 265nm

4. CONCLUSIONES

1. El polímero tipo elastina VKVx24 se ha producido mediante un proceso de fermentación en erlenmeyers llevado a cabo por bacterias de *Escherichia coli* modificadas genéticamente para la expresión del polímero. El proceso de bioproducción y posterior purificación ha permitido obtener el recombinámero de 60KDa prácticamente puro, de acuerdo a análisis electroforético. El rendimiento del proceso ha sido de 96.25 mg/L.
2. La caracterización del polímero VKVx24 mediante la técnica de Espectroscopía de Masas, Resonancia Magnética Nuclear y Espectroscopía infrarroja determina un PM de 60647Da que coincide con el valor teórico. Mediante estas técnicas se comprueba que el polímero se ha producido y purificado correctamente.
3. La caracterización del polímero VKVx24 mediante la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido determina que tiene una Temperatura de Transición Inversa de 31,7 °C utilizando como disolvente agua MQ y de 49,1°C utilizando PBS.
4. Se ha modificado químicamente el polímero VKVx24 introduciendo grupos ciclooctino y azido a lo largo de la secuencia aminoacídica del polímero. Con un rendimiento de la reacción del 73% y 65% respectivamente.
5. La caracterización del polímero VKV-ciclo mediante la técnica de Espectroscopía de Masas, Resonancia Magnética Nuclear y Espectroscopía infrarroja determina un PM de 61783Da. Mediante estas técnicas se determina que el porcentaje de lisinas modificadas con el derivado de ciclooctino es del 37% de las 24 presentes.
6. La caracterización del polímero VKV-N₃ mediante la técnica de Espectroscopía de Masas, Resonancia Magnética Nuclear y Espectroscopía infrarroja determina un PM de 61040Da. Mediante estas técnicas se determina que el porcentaje de lisinas modificadas es del 63% de las 24 presentes.

7. Por entrecruzamiento químico vía *química click* entre los polímeros modificados químicamente VKV-ciclo y VKV-N₃ se ha conseguido la formación de hidrogeles de diferente espesor.
8. El hidrogel, una vez formado por el entrecruzamiento de los biopolímeros, mantiene el comportamiento termosensible de estos.
9. El potencial zeta medido en nanogeles formados por los polímeros VKV-ciclo y VKV-N₃ tiene un valor medio positivo de 27,5 mV. La carga positiva es conferida por los grupos amonio de las lisinas que quedan sin modificar en el polímero. Este valor nos da una idea del potencial zeta del hidrogel.
10. Mediante un proceso de sonicación y posterior centrifugación se han obtenido disoluciones de mucina al 1 y 10% con un tamaño de partícula que oscila entre 20-40nm y 30-80nm respectivamente. Tamaños óptimos para la correcta adhesión de la mucina al hidrogel.
11. El ensayo de mucoadhesión del polímero VKVx24 a una disolución de mucina del 10% no ha dado resultados satisfactorios. Una explicación plausible a este hecho es la heterogeneidad en el recubrimiento de superficies de vidrio con el polímero mediante la técnica de *spincoating*.
12. La solubilidad del fármaco acetazolamida en solución lacrimal, previamente preparada, es de 0,57 mg/ml.

BIBLIOGRAFÍA

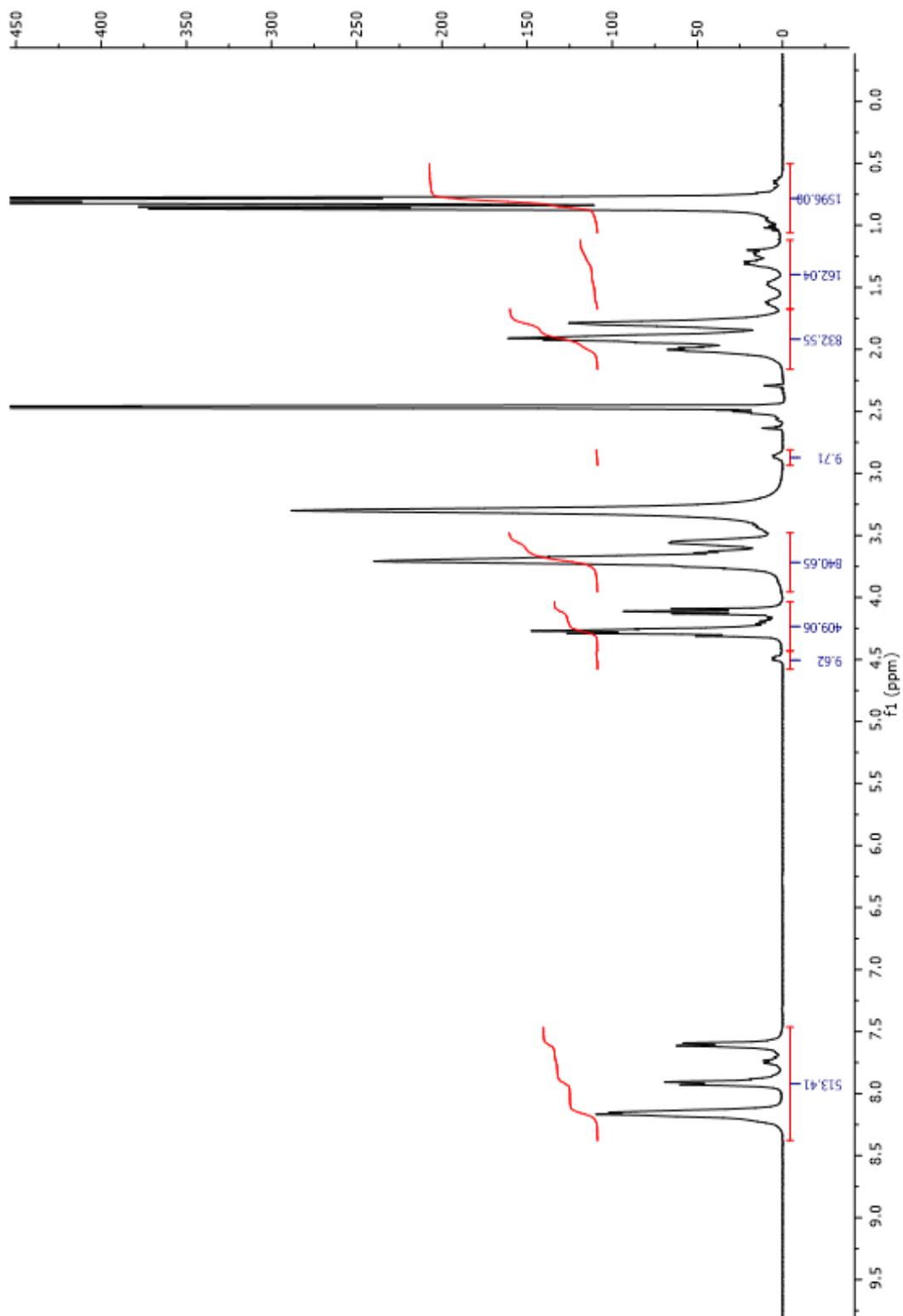
- [1] Mithieux, S.M., Weiss, A.S., Elastin. *Advances in Protein Chemistry* 2005; 70: 437-461.
- [2] Bochicchio, B., Pepe, A., Tamburro, A. M., Investigating by CD the molecular mechanism of elasticity os elastomeric proteins. *Chirality* 2008; 20: 985-994.
- [3] Rodgers, U. R., Weiss, A. S., Cellular interactions with elastin. *Pathologie Biologie* 2005; 53: 390-398.
- [4] Arias, F J., Reboto, V., Martin, S., Lopez, I., Rodriguez-Cabello, J.C., Tailored recombinant elastin-like polymers for advanced biomedical and nano(bio)technological applications. *Biotechnoly Letters* 2006; 28: 687-695.
- [5] San Biagio P. L., Madonia F., Trapani T.L., Urry D.W., *Chemical Physics Letters* 1988; 145, 571.
- [6] Urry, D.W., Parker, T. M., Reid, M. C., Gowda, D.C., Biocompatibility of the Bioelastic materials, Poly(GVGVP) and its Gamma-Irradiation Cross-Linked Matrix- Summary of generic biological test-results. *Journal os Bioactive and Compatible Polymers* 1991; 6:263-282
- [7] Sallach, R.E., Cui, W., Balderrama, F., Martinez, A. W., et al., Long-term biostability os self-assembling protein polymers in the absence os covalent crosslinking. *Biomaterials* 2010; 31: 779-791.
- [8] Keeley, F. W., Bellingham, C.M., Woodhouse, K.A., Elastin as a self-organizing biomaterial: use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 2002; 357: 185-189.
- [9] Brase S., Gil C., Knepper K., Zimmermann V., *Angewandte Chemie International Edition in English* 2005; 44: 5188.
- [10] Rodriguez-Cabello, J.C., Martin, L., Girotti, A., Garcia-Arevalo, C., et al., Emerging applications of multifunctional elastin-like recombinamers. *Nanomedicine* 2011; 6: 111-122.
- [11] Rodriguez-Cabello, J.C., Pierna, M., Fernandez-Colino, A., Garcia-Arevalo, Arias F.J., *Recombinamers: Combining Molecular Complexity with Diverse Bioactivities for Advanced Biomedical and Biotechnological Applications. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnoly* 2011; 125: 145-179.
- [12] Rodriguez-Cabello, J.C., Smart elastin-like polymers. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2004; 553: 45-57.

- [13] Gaudana R., Jwala J., Boddu S.H., Mitra A.K. Recent Perspectives in Ocular Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, 2009; 26(5):1197-1216.
- [14] Rowe-Rendleman C.L., Durazo S.A., Kompella U.B., Rittenhouse K.D., Di Polo A., Weiner A.L., Grossniklaus H.E., Naash M.I., Lewin A.S., Horsager A., Edelhauser H.F. Drug and Gene Delivery to the Back of the Eye: From Bench to Bedside. *IOVS* 2014; 55 (4): 1552-5783
- [15] Morrison P.W.J., Khutoryanskiy V.V. Advances in ophthalmic drug delivery. *Therapeutic Delivery*. 2014; 5(12): 1297–1315.
- [16] Gonzalez de la Torre I., Santos M., Quintanilla L., Testera A., Alonso M., Rodriguez-Cabello J.C. *Acta Biomaterialia* 2014; 10: 2495-2505
- [17] Anne L.C., Glaucoma. *Lancet* 1999; 354: 1803–10
- [18] Kaur I.P., Smitha R., Aggarwal D., Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002; 248: 1-14.
- [19] *Vademecum*
- [20] Sven L., Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharmacology & Therapeutics*.1997; 74: 1-20.
- [21] *Nutrición Hospitalaria* 2006; 21(supl.4): 11-128.
- [22]Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B., Click Chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed* 2001; 40:2004-21
- [23]Diaz-Diaz D., Finn M.G., Sharpless K.B., Fokin V.V., Hawker C.J. *Anales de Quimica* 2008; 104(3):173-180.
- [24] Huisgen R., 1,3-Dipolar cycloadditions. Past and future. *Angew Chem Int Ed Engl* 1963; 2:563-98.
- [25] Kennedy D.C., McKay C.S., Legault M.C.B., Danielson D.C., Blake J.A., Pegoraro A.F. et al. Cellular consequences of copper complexes used to catalyze bioorthogonal click reactions. *J Am Chem Soc* 2011; 133(44): 17993-8001.
- [26]Jewett J.C., Bertozzi C.R., Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem Soc Rev* 2010; 39:1271-9.
- [27] Yu T., Gavin P. Andrews., David J. Jones, Mucoadhesion and Characterization of Mucoadhesive. 2009; 71(3): 505-518
- [28] Ilene K. G., Distribution of mucins at the ocular Surface. *Experimental Eye Research* 2004; 78: 379–388.

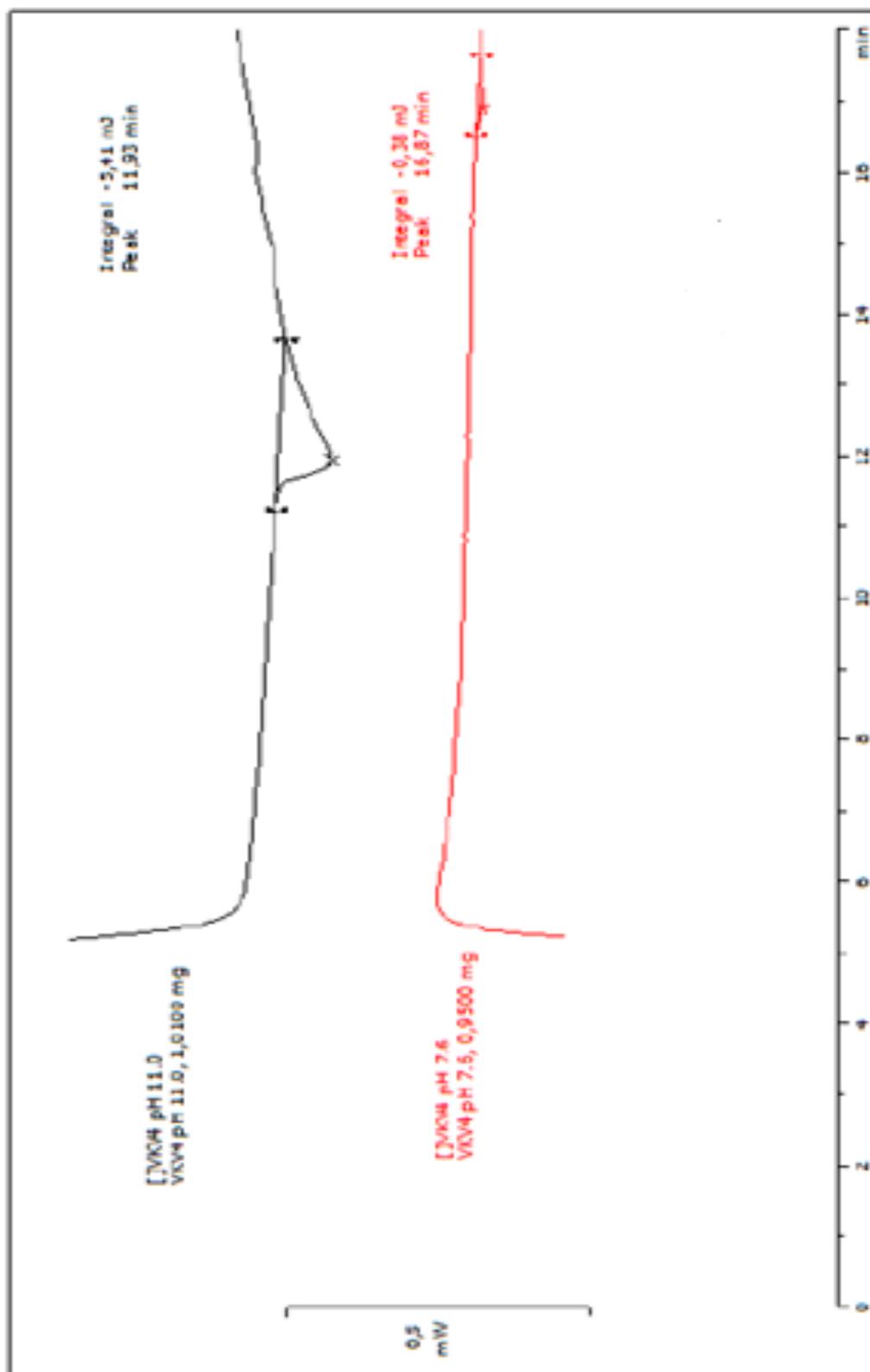
- [29] Thongborisute J., Takeuchi H. Evaluation of mucoadhesiveness of polymers by BIACORE method and mucin-particle method, *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 354: 204–209.
- [30] Singh S., Govind M., Bothara S.B. A Review on *in vitro* - *in vivo* Mucoadhesive Strength Assessment. *PharmTechMedica* 2013; 2(1): 221-229.
- [31] Van Haeringen N.J. Clinical Biochemistry of Tears. *Survey of Ophthalmology* 1981; 26: 84-96.
- [32] Ceulemans J., Vermeire A., Adriaens E., Remon JP., Ludwig A. Evaluation of a mucoadhesive tablet for ocular use. *Journal of Controlled Release* 2001; 77: 333–344.

ANEXOS

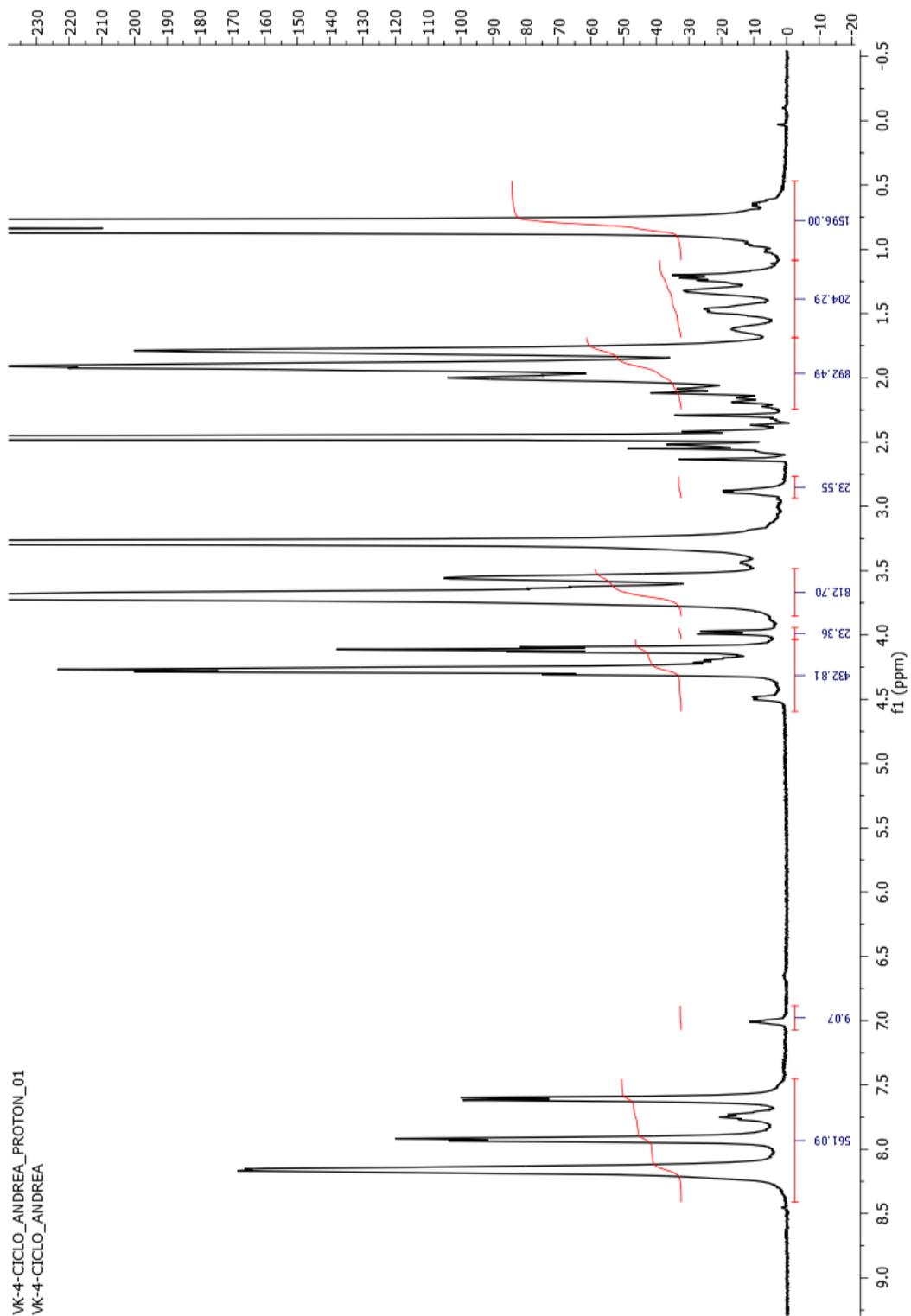
1. RMN de ^1H del polímero VKVx24



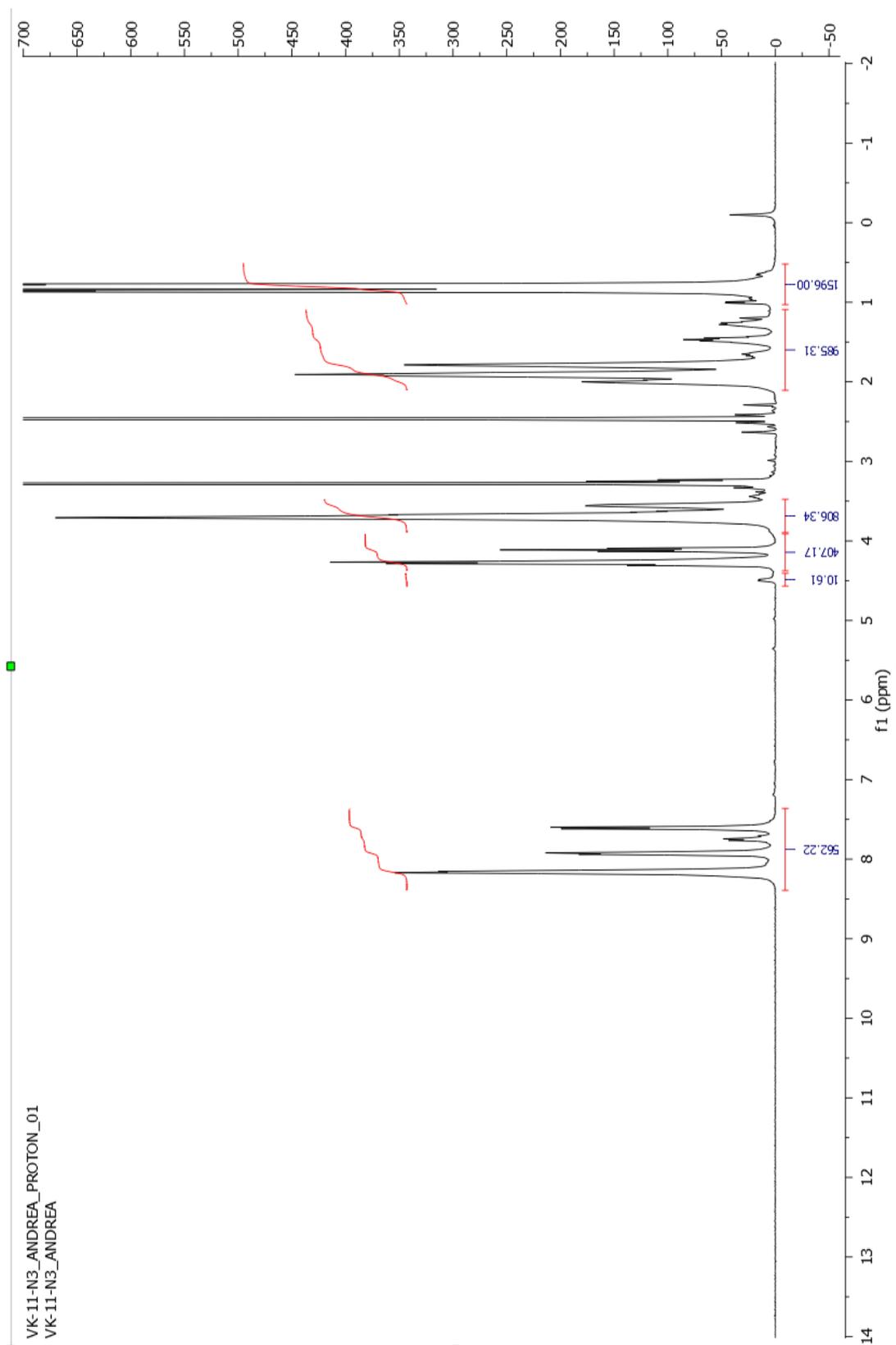
2. DSC del polímero VKVx24



3. RMN de ^1H del polímero VKV-ciclo



4. RMN de ^1H del polímero VKV-N₃



LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla	Título	Página
1.1	Fármacos basados en la inhibición de la anhidrasa carbónica	11
2.1	Equipamiento utilizado a lo largo de este trabajo.	15
2.2	Reactivos utilizados y casas comerciales proveedoras.	16
2.3	Disolventes utilizados y casas comerciales proveedoras.	17
2.4	Disoluciones tamponadas para purificación de ELRs.	17
2.5	Cantidades inyectadas en el molde de PDMS	30
2.6	Condiciones de los ensayos de recubrimiento de placas de vidrio con disolución del polímero VKVx24.	32
2.7	Reactivos necesarios para la preparación de la Solución Salina Ocular (SLF).	33
3.1	Rendimiento de la reacción del VKV-ciclo	45
3.2	Rendimiento de la reacción de VKV-N ₃ .	48
3.3	Diametro y espesor de los hidrogeles	49
3.4	Medidas del potencial zeta en mili voltios de los nanogeles	51
3.5	Medidas índice de refracción de la solución de mucina	52
3.6	Medidas del ángulo de contacto de las superficies recubiertas de polímero VKVx24.	54
3.7	Medidas de absorbancia a 265 nm del fármaco AZM en disolución salina lacrimal.	55

Figura	Título	Página
1.1	Representación de la cadena polimérica extendida por debajo de la Tt	7
1.2	Representación de la cadena polimérica plegada por encima de la Tt	7
1.3	Reacción de hidratación del dióxido de carbono catalizado por la AC	10
1.4	Reacciones tipo “click” de formación de enlace C-X.	13
1.5	Representación de la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada por el ión cobre (I).	14
1.6	Reacción de un grupo azida con ciclooctino.	14
2.1	Imagen de la secuencia aminoacídica del polímero VKVx24.	18
2.2	Esquema del proceso de bioproducción y purificación del polímero VKVx24	19
2.3	Fotografía de una placa de LB agar donde se observa el crecimiento de la bacteria <i>E.coli</i>	20
2.4	Protocolo de purificación del polímero VKVx24.	24
2.5	Reacción de amidación de los grupos amino libres correspondientes a las lisinas del biopolímero con un derivado de ciclooctino.	27
2.6	Reacción de obtención de azida tríflica	28
2.7	Reacción de sustitución de grupos amino libres del biopolímero con azida tríflica	28
2.8	Imagen de una doble jeringa. Imagen del soporte de teflón	29
2.9	Hidrogel desmoldado tras el proceso de gelificación	30
2.10	Diagrama que muestra la variación general que puede producirse en el ángulo formado entre el polímero y la mucina.	32
3.1	Fotografía del gel de electroforesis resultante del screening	35
3.2	Electroforesis correspondiente a algunas etapas del proceso de purificación	36

3.3	Espectrometría de masas del polímero VKVx24	37
3.4	Espectro de RMN de protón del polímero VKVx24	38
3.5	Espectro de infrarrojo del polímero VKVx24	39
3.6	Termograma del polímero VKVx24 a una concentración de 50mg/mL	40
3.7	Espectrometría de masas del polímero VKV-ciclo	42
3.8	A)Espectro ^1H del polímero VKV-ciclo B) Desplazamientos químicos teóricos de protón	43/44
3.9	Espectro de IR del polímero VKV sin modificar y modificado con ciclooctino	44
3.10	Espectrometría de masas del polímero VKV-N3	46
3.11	Espectro de ^1H del polímero VKV-N3	47
3.12	Espectro IR del VKV-N ₃	48
3.13	A) Imagen del hidrogel a 4°C B) Imagen del hidrogel a temperatura ambiente C) Imagen del hidrogel a 37°C.	50
3.14	Distribución del potencial zeta de la disolución de nanogeles a 37°C	51
3.15	A) Gráfica de tamaño de partícula de las disoluciones de mucina sin llevar a cabo el proceso de sonicado + cantrifugado. B) Gráfica de tamaño de partícula de las disoluciones de mucina llevando a cabo el proceso de sonicado + cantrifugado.	53
3.16	Gráfica que representa la concentración de AZM en mg/mL frente a la Absorbancia a 265nm	56