



Universidad de Valladolid



Obtención de hidrogeles químicos mediante metodología "click" a partir de polímeros tipo elastina para el tratamiento del glaucoma

Máster Interuniversitario en Química Sintética e Industrial

Andrea Hidalgo Misas
Tutores: Francisco Javier Arias Vallejo
Mercedes Santos García

Valladolid, Septiembre 2016

Gracias de corazón, a mis tutores Javier Merche, con ellos he conseguido hacer fácil lo difícil. Gracias por vuestra paciencia y dedicación. Gracias Pablo por darme la oportunidad de realizar este trabajo.

Agradecer también a todos mis compañeros del grupo BIOFORGE su ayuda a lo largo de todo este trabajo, Sergio, Tati, Arturo, Miguel, Dory, Ito, Moha, Leander, Filippo, Chus, Alicia, Soraya, Esther, Elena, Rocío, Alessandra, Luis, Carlos y Matilde. A las chicas de administración Alicia, Irene y Leticia. Juan, gracias por tu inmensa paciencia, Eduardo, echaré de menos esas charlas que amenizaban la mañana, Sofía, reafirmo lo que ya dije hace un año, me llevo a una gran amiga. Isra, gracias por tus consejos, Reinal, muchas gracias, he perdido la cuenta del número de cañas que te debo.

Gracias a todos los profesores del máster de la Universidad de Valladolid y de la Universidad del País Vasco.

Gracias a mis amigos de Palencia, a mi segunda familia, la deportiva y a mis químicas.

Y sobre todo, agradecer a toda mi familia, en especial a mis padres y abuelos todo el apoyo brindado.

*“Que los triunfos siempre van después de los intentos,
que una hoja en blanco siempre es el comienzo de algo”*

RESUMEN/ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Objetivos del presente trabajo fin de master.....	7
1.2. La elastina y los polímeros tipo elastina.....	7
1.3. Liberación controlada de fármacos a través de hidrogeles de ELRs.....	10
1.4. Glaucoma y tratamientos actuales.....	10
1.5. Desarrollo de la química “click”.....	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.1. Materiales.....	14
2.1.1. Técnicas utilizadas.....	14
2.1.2. Reactivos.....	15
2.1.3. Polímero VKVx24.....	16
2.2. Métodos.....	17
2.2.1. Producción y purificación del biopolímero VKVx24.....	17
2.2.2. Modificación química del polímero VKVx24.....	20
2.2.2.1. Modificación química del polímero VKVx24 con un compuesto derivado de ciclooctino.....	20
2.2.2.2. Modificación química del polímero VKVx24 con grupos azido.....	
2.2.3. Preparación de hidrogeles de ELRs mediante tecnología “click” sin catalizador en presencia de AZM.....	21
2.2.3.1. Preparación hidrogeles en concentración 100 mg/mL usando como disolvente agua ultra-pura.....	22
2.2.3.2. Preparación hidrogeles en concentración 50 mg/mL usando como disolvente una mezcla de agua ultra-pura, dimetil sulfóxido y etanol.....	22
2.2.3.3. Preparación hidrogeles en concentración 100 mg/mL usando como disolvente una mezcla de agua ultra-pura, dimetil sulfóxido y etanol.....	23
2.2.4. Obtención de nanogeles mediante tecnología “click” sin catalizador.....	23
2.2.5. Ensayo de mucoadhesión nanogel-mucina mediante la medida del ángulo de contacto.....	23
2.2.6. Ensayo de mucoadhesión del nanogel-mucina mediante la técnica dispersión dinámica de luz y medida del potencial zeta.....	25
2.2.7. Ensayos de liberación de fármaco acetazolamida de los hidrogeles obtenidos a través de química “click”.....	26

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
3.1. Producción y purificación del biopolímero VKVx24.....	28
3.2. Caracterización del polímero VKVx24.....	29
3.3. Modificación química del polímero VKVx24.....	31
3.3.1. Modificación química del polímero VKVx24 con un derivado de ciclooctino.....	31
3.3.2. Modificación química del polímero VKVx24 con grupos azido.....	32
3.4. Preparación de hidrogeles de ELRs mediante tecnología “click” sin catalizador.....	35
3.4.1. Preparación hidrogeles en concentración 100 mg/mL usando como disolvente agua ultra-pura.....	36
3.4.2. Preparación hidrogeles en concentración 50 mg/mL usando como disolvente una mezcla de agua ultra-pura, dimetil sulfóxido y etanol.....	36
3.4.3 Preparación hidrogeles en concentración 100 mg/mL usando como disolvente una mezcla de agua ultra-pura, dimetil sulfóxido y etanol.....	37
3.5. Obtención de nanogeles mediante tecnología “click” sin catalizador.....	38
3.6. Ensayo de mucoadhesión del nanogel-mucina mediante la medida del ángulo de contacto.....	39
3.7. Ensayo de mucoadhesión del nanogel-mucina mediante la técnica dispersión dinámica de luz y medida del potencial zeta.....	43
3.8. Ensayos de liberación del fármaco acetazolamida de los hidrogeles Obtenidos a través de química “click”.....	46
4. CONCLUSIONES.....	53
5. BIBLIOGRAFÍA.....	55
6. ANEXOS.....	59

RESUMEN El presente Trabajo Fin de Máster versa sobre la formación de hidrogeles basados en recombinámeros de tipo elastina (ELRs), un material biocompatible 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 polimérica pueda ser liberado de manera controlada en el ojo. El ELR (VKVx24) es bioproducido empleando la bacteria *Escherichia coli* modificada genéticamente y modificado químicamente con los grupos ciclooctino y azido permitiendo el entrecruzamiento de los biopolímeros, mediante la metodología “click”. El hidrogel formado, presenta ciertas propiedades mucoadhesivas que se estudiarán a lo largo del trabajo realizando varios ensayos de mucoadhesión con el objetivo de evaluar el grado de afinidad de éste por las mucosas oculares.

ABSTRACT This work is based on hydrogels formation. To achieve this goal, chemical crosslinking of elastin like recombinamers (ELRs) is used as a work methodology. The ELRs are biocompatible, with a thermo sensitive behavior and the ability of self-assembly. Hydrogels are formed in the presence of azetazolamide (AZM), which is 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 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 “click chemistry”. The hydrogel formed has certain mucoadhesive properties that will be studied along the work. Several mucoadhesion experiments were carried out in order to assess the degree of affinity of this hydrogel by the eye mucous membrane.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, uno de los objetivos de los científicos dentro del campo de investigación de biomateriales es crear nuevas formas de administración de fármacos biocompatibles que permitan el encapsulamiento de estos, mejorando con ello su liberación y evitando los efectos adversos que causen otras vías de administración.

1.1 OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO FIN DE MASTER

El objetivo general del trabajo es crear un hidrogel por entrecruzamiento químico de dos polímeros tipo elastina mediante la metodología “química click”. Para ello, se modificarán químicamente las estructuras de ELRs que portarán los grupos funcionales reactivos necesarios para la formación de dichas matrices extracelulares artificiales en condiciones citocompatibles, se pretende, que estas matrices permitan el encapsulamiento y liberación del fármaco acetazolamida utilizado para tratar el trastorno ocular denominado glaucoma, para ello, estos hidrogeles han de ser biocompatibles y formar enlaces no covalentes con las mucinas de la superficie corneal a la que se adherirán.

Otros de los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Bioproducir y purificar el biopolímero utilizado a lo largo del trabajo.
- Caracterizar los biopolímeros una vez bioproducidos y purificados, y tras ser modificados químicamente.
- Estudiar el grado de mucoadhesión de los hidrogeles formados.
- Realizar ensayos de liberación in vitro del fármaco acetazolamida encapsulado en los hidrogeles creados

1.2 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. Su principal papel es aportar elasticidad a los tejidos [1,2], es capaz además de regular el comportamiento celular y promover la reparación tisular [3]. La secuencia

aminoacídica de la elastina se compone de numerosas 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 y A= alanina.

Los polímeros tipo elastina (ELRs "*Elastin Like Recombinamers*") son polipéptidos artificiales cuya secuencia está basada en la propia elastina natural. Constituyen una nueva clase de biomateriales con una extraordinaria biocompatibilidad y una interesante bioactividad ejerciendo además un control absoluto de su secuencia [4,5]. Los ELRs más comúnmente utilizados consisten en repeticiones del motivo (VPGXG)_n, donde el residuo "X" puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y "n" representa el número de repeticiones del pentapéptido.

Estos recombinámeros presentan una gran versatilidad proporcionada por su diseño particular, además mantienen las propiedades inherentes de la elastina natural [6] tales como las propiedades mecánicas, la biocompatibilidad [7,8], la naturaleza inteligente y el comportamiento autoensamblable [9].

En especial, los polímeros tipo elastina, se caracterizan por su comportamiento inteligente debido a los cambios conformacionales que sufren al modificar la temperatura. Así, en solución acuosa y por debajo de su temperatura de transición (T_t), las cadenas poliméricas se encuentran desordenadas e hidratadas hidrofóbicamente, formando las moléculas de agua a su alrededor una estructura tipo clatrato, estas moléculas de agua rodean los residuos apolares del polímero tales como las valinas.

Sin embargo, por encima de la T_t, las moléculas de agua pierden su conformación ordenada debido a la agitación térmica y la cadena polipeptídica se pliega hidrofóbicamente formando una fase separada en la que el polímero adopta una estructura regular llamada espiral β, constituida por una sucesión de horquillas β. En este caso la hidratación se reduce, pero se mantiene en un 25% de agua (figura 1.1). Además, este cambio conformacional es completamente reversible.

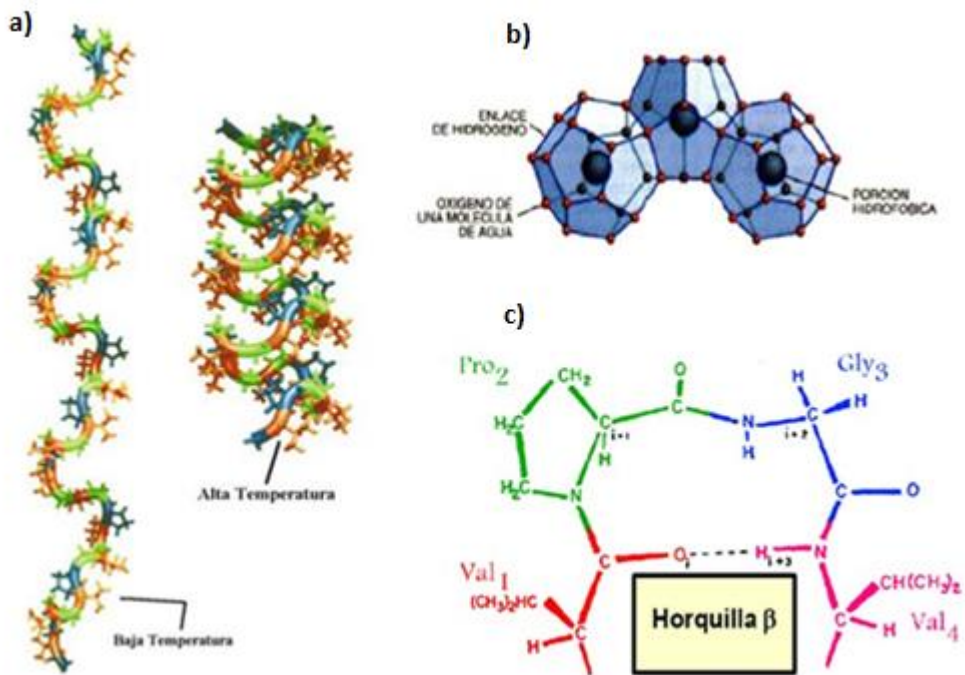


Figura 1.1 a) Representación de la cadena extendida y plegada de los ELR a bajas y altas temperaturas, respectivamente. b) Representación de la estructura tipo clatrato que forma el agua alrededor de la cadena polimérica por debajo de Tt. c) Esquema de la horquilla β que forman los aminoácidos de la cadena polimérica por encima de Tt.

Para entender este proceso desde el punto de vista termodinámico, hay que tener en cuenta el sistema en su globalidad. Durante el calentamiento, se rompe la estructura tipo clatrato y el polímero se pliega, lo que va a provocar un aumento del desorden local ($\Delta S \uparrow$). Por tanto, este aumento de la entropía es la que actúa como fuerza motora del plegamiento, facilitando que el proceso sea espontáneo ($\Delta G < 0$). La cantidad de energía térmica requerida para desencadenar el proceso de transición depende de la relación entre el número de moléculas de agua implicadas y la cadena polimérica. Numerosos parámetros, como la concentración polimérica [10], la longitud del ELR, la composición aminoacídica [11], el pH [12] o la fuerza iónica [13], son capaces de modular esta relación, determinando la formación de las estructuras clatrato de diferente grado de perfección.

1.3 LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE HIDROGELES DE ELRs

Son numerosos los sistemas de dosificación de fármacos que se están desarrollando en la actualidad, polímeros, nanopartículas, microesferas, micelas y liposomas son algunos ejemplos desarrollados con el objetivo de aumentar el tiempo de residencia del fármaco, mejorar la dosificación controlada y desarrollar terapias dirigidas a tejidos o células diana [14,15].

En el campo oftalmológico, el diseño de preparaciones convencionales para tratar problemas oculares es poco eficiente ya que el fármaco se elimina mediante los mecanismos de protección del ojo (parpadeo, reflejo corneal, drenaje lacrimal) y en algunos casos estos fármacos pueden presentar toxicidad sistémica [16,17]. Con el propósito de mejorar esta biodisponibilidad y prolongar el tiempo de residencia en la superficie ocular, se han desarrollado nuevos dispositivos tales como hidrogeles e insertos poliméricos [18-20].

En el presente trabajo se pretende diseñar un hidrogel (red tridimensional de polímeros entrecruzados, generalmente insoluble en agua, blando y elástico) portador del fármaco acetazolamida (AZM), con la capacidad de adherirse adecuadamente a las mucinas secretadas por las mucosas oculares que actúan como barrera física y química, compuestas por proteínas altamente glicosiladas, aminoazúcares, ácido siálico y trazas de manosa y grupos sulfato, entre otras [21]. Durante los últimos años, los hidrogeles se han utilizado ampliamente en aplicaciones farmacéuticas, principalmente debido a su carácter flexible y elástico, fruto de su alto contenido acuoso, a su semejanza con ciertos tejidos naturales y a la alta biocompatibilidad que presentan.

1.4 GLAUCOMA Y TRATAMIENTOS ACTUALES

El glaucoma es una neuropatía óptica que representa la primera causa de ceguera en la población mundial. Esta enfermedad produce el deterioro del nervio óptico, que es el encargado de llevar la información visual del ojo al cerebro. En la mayoría de los casos, este trastorno 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. Es drenado fuera del ojo 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 provoca un aumento notable de la presión intraocular, lo que puede conducir a la aparición del glaucoma [22].

Los compuestos químicos inhibidores de la anhidrasa carbónica (AC) son el principal tratamiento para reducir la PIO a un nivel seguro. Esta enzima perteneciente a la familia de las metaloenzimas, está presente en las células del cuerpo ciliar y va a tener un papel importante en la formación y secreción del humor acuoso y en la regulación del pH. Se encarga de catalizar la reacción de hidratación del CO₂ para formar iones H⁺ y HCO₃⁻. Este último, es responsable del movimiento de iones Na⁺ al ojo que, junto con agua, permite formar el humor acuoso (figura 1.2) [23]

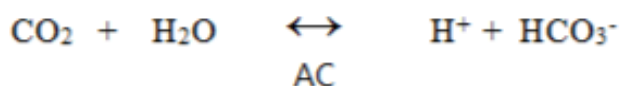


Figura 1.2 Reacción de hidratación reversible catalizada por la anhidrasa carbónica.

La vía de administración de los inhibidores de la anhidrasa carbónica puede ser tópica, oral o intravenosa. Existen numerosos principios activos utilizados para este tratamiento, de entre ellos cabe destacar el timolol, la dorzolamida o la acetazolamida. Este último es el principio activo utilizado a lo largo del este trabajo para estudiar su capacidad de encapsulamiento y liberación.

La acetazolamida (AZM) o N(5-aminosulfonil-1,3,4-tidiazol-2-il) acetamida (figura 1.3) se administra vía oral o tópica en cantidades que varían según el grado de glaucoma tratado. Este fármaco actúa uniéndose al centro activo de la anhidrasa carbónica mediante fuerzas electroestáticas y puentes de hidrógeno con los aminoácidos que

forman el bolsillo hidrofóbico de la enzima, bloqueando así su actividad enzimática [24].

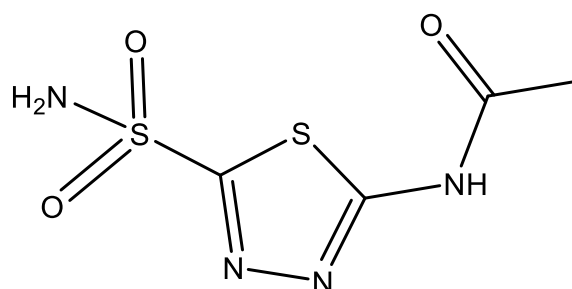


Figura 1.3 Estructura química de la acetazolamida.

El uso prolongado de grandes cantidades de este fármaco vía oral provoca graves efectos secundarios en órganos internos como hígado y riñón, así como acidosis sistémica y, en algunos casos, discrasias graves; efectos que disminuyen si la administración se lleva a cabo vía tópica. Sin embargo, la AZM presenta una baja biodisponibilidad debido a sus propiedades fisicoquímicas [25]: baja solubilidad acuosa (0,7 mg/ml) y baja permeabilidad corneal ($17,4 \times 10^6$ cm/s), por lo que se hace necesario el desarrollo de nuevas vías de administración que permitan eliminar o reducir estos efectos no deseados.

1.5 DESARROLLO DE LA QUÍMICA “CLICK”

El concepto de química “click” fue acuñado por Sharpless y col. en 2001 para definir una metodología de síntesis que permite la obtención de estructuras complejas, partiendo de una serie de moléculas más pequeñas mediante un número determinado de reacciones altamente eficientes y relativamente sencillas de realizar [26]. Este término engloba a una serie de reacciones que cumplen las siguientes características:

- a) facilidad experimental
- b) compatible con gran variedad de grupos funcionales y condiciones de reacción
- c) altamente selectiva y regioselectiva
- d) aislamiento y purificación del producto final sencilla
- e) alta economía atómica
- f) rendimientos elevados

Entre las muchas reacciones que cumplen estos requisitos (reacciones de sustitución nucleofílica de anillos, reacciones de adición a enlaces múltiples C-Cetc.), el proceso de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre azidas y alquinos se ha establecido como uno de los arquetipos de la química "click" [27]. Constituye la ruta más eficaz para sintetizar 1,2,3 – triazoles (figura 1.4) de manera muy eficiente. Usando como catalizador cobre (Cu), se consigue aumentar la velocidad de reacción hasta 10^7 veces, dando lugar además a una absoluta regioselectividad con la formación exclusiva del regiosómero 1,4.

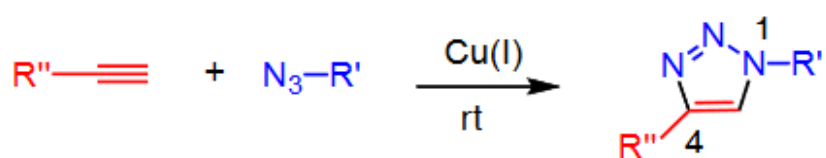


Figura 1.4 Cicloadición 1,3 dipolar de Huisgen catalizada por cobre.

El uso de este tipo de reacciones se ha extendido notablemente durante los últimos años dentro del campo biológico, debido a la alta biocompatibilidad que presentan estas reacciones, que pueden realizarse en medio acuoso, no generan productos secundarios y no reaccionan con otros grupos funcionales presentes dentro en un medio biológico.

Sin embargo, el uso de cobre supone una importante desventaja debido a los problemas de citotoxicidad que puede ocasionar [28]. Este problema se resolvió con el uso de alquinos tales como derivados de clicooctino (figura 1.5), compuestos que reaccionan con el grupo azido sin necesidad de catalizador debido a la elevada tensión anular que presentan, además de no generar ningún tipo de subproducto [29].

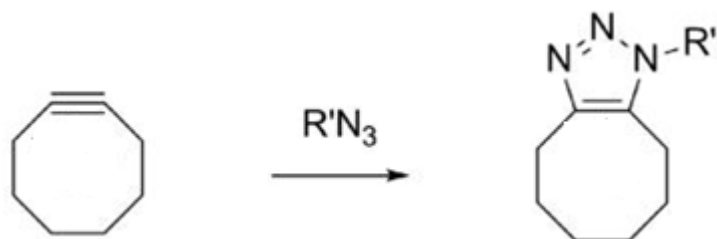


Figura 1.5 Reacción de un grupo azido con ciclooctino

2.1. MATERIALES

2.1.1. Técnicas utilizadas

Técnica instrumental	Equipo	Casa comercial
Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	DCS 8822 ^e	Mettler Toledo
Centrifugación	Centrifuga ST 16R Centrifuga Avanti	Thermo-Scientific Beckman
Destilación	Rotavapor R-215	
Dispersión dinámica de luz ("Dynamic light Scattering" DLS)	Zeta Sizer Nano	Malvern
Espectrometría de masas (MALDI TOF)	Espectrómetro de masas Bruker Autoflex (Técnico especializado Laboratorio de Técnicas Instrumentales L.T.I UVA)	Bruker
Espectroscopía infrarroja (FTIR)	Infrarrojo Tensor27	Bruker
Espectrofotometría	Nanodrop 2000c	Thermo-Scientific
Esterilización de material	Autoclave	J.P. Selecta
Formación de películas delgadas (Spin-Coating)	Spin-Coater KW-4 ^a	Chemmat Technology
Medida del Poetencial Z	Zeta Sizer Nano	Malvern
Medición del ángulo de contacto	Ángulo de contacto OCA LSplus	Dataphysics
Refractometría	Refractómetro RE50	Mettler Toledo
Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	RMN 400 (L.T.I. UVA)	Agilent Technologies

Tabla 2.1: Relación de Técnicas y equipos utilizados

2.1.2. Reactivos

Todos los reactivos empleados se enumeran en la siguiente tabla (tabla 2.2):

Reactivo	Proveedor	Reactivo	Proveedor
Acetona	Sigma-Aldrich	Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich
Acetazolamida	Sigma-Aldrich	Etanol (EtOH)	Panreac
Ácido clorhídrico	Fluka	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	Sigma-Aldrich
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Apollo	Glicerol	Merck
Ampicilina	Apollo	Hidrogenocarbonato de sodio	Panreac
Carbonato de calcio	Scharlau	Hidróxido de sodio	Panreac
Carbonato de (1R,8S,9S)-biciclo[6.1.0]non-4in-9-ilmetil succinimidilo	Synaffix	Metanol (MeOH)	Scharlau
Carbonato de 2-Azidoethyl (2,5-dioxopirrolidin-1-il)	GalChimia	Sulfato de cobre	Fluka
Cloruro de calcio	Fluka	Mucina de estómago porcino T. II	Sigma-Aldrich
Cloruro de magnesio	Sigma-Aldrich	Tampones de lavado y sonicación	
Cloruro de potasio	Sigma- Aldrich	Trifluoroetanol (TFE)	Acros
Cloruro de sodio	Shcarlau	Tris(hidroxi) aminoetano (TRIS)	Sigma-Aldrich
Diclorometano (DCM)	Sigma-Aldrich		
Dietil éter	Scharlau		
Dimetilformamida (DMF)	Sigma-Aldrich		

Tabla 2.2: Reactivos utilizados y proveedores

Tampones (purificación ELRs)	Composición
Tampón de lavado	TRIS pH 7,5 20mM NaCl 0,2M
Tampón de sonicación	TRIS pH 7,5 20 mM EDTA 2,5 mM

Tabla 2.3 Disoluciones tamponadas purificación de ELRs.

Los medios de cultivo utilizados en bioproducción son los siguientes:

- **LB (Luria Broth):** se prepara a una concentración de 25g/L en agua destilada y se esteriliza en autoclave.
- **LB agar:** medio LB con un 1,5% (p/v) de bacto-agar por litro. Se esteriliza en autoclave
- **TB (Terrific Broth):** medio de cultivo para incrementar la producción bacteriana.
- **TBm (Terrific Broth modificado):** contiene medio TB a una concentración de 50,8g/L al que se le añaden Na_2HPO_4 25mM, Na_2SO_4 5mM, KH_2PO_4 25mM, NH_4Cl 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.

2.1.3. Polímero VKVx24

El ELR denominado VKVx24 será el empleado a lo largo de este trabajo y presenta la siguiente secuencia aminoacídica:

MESLLP VG VPGVG [VPGKG (VPGVG)₅]₂₃ VPGKG VPGVG VPGVG VPGVG VPGV

Aminoácido	Código de una letra	Aminoácido	Código de una letra
Ácido glutámico	E	Metionina	M
Glicina	G	Prolina	P
Leucina	L	Serina	S
Lisina	K	Valina	V

Tabla 2.4 Tabla de correspondencia de aminoácidos presentes en el polímero VKVx24 y su abreviatura.

Está basado en la repetición del pentapéptido VPGVG, un bloque hidrofóbico que proporciona al polímero biocompatibilidad y el comportamiento inteligente termosensible. Por otro lado, la secuencia VPGKG tiene especial importancia puesto que en ella se encuentra el aminoácido lisina, portador de un grupo amino terminal que permite la modificación química posterior del polímero y le confiere un carácter sensible al pH del medio, además de pH básico y carga positiva en condiciones fisiológicas.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Producción y purificación del biopolímero VKVx24

El polímero tipo elastina utilizado durante este trabajo ha sido diseñado y sintetizado mediante tecnología de ADN recombinante. En primer lugar, se llevó a cabo la inoculación en placa Petri de la bacteria *Escherichia coli* previamente modificada genéticamente, en ella se insertó un plásmido que codifica para la expresión del polímero VKVx24. Esta placa fue incubada durante 24h a 37°C. Tras este periodo de tiempo se realizó una selección de las colonias capaces de producir una mayor cantidad de ELR y se preparó el inóculo mediante la siembra de las dos colonias de mayor producción en 500 mL (x2) de medio LB con ampicilina, en concentración de 100 mg/mL y glucosa al 1% durante 6 horas en agitador orbital, 37°C y 250 rpm. Seguidamente, se añadió 1 L del inóculo preparado anteriormente a 11 L de medio TB con 6 mL de ampicilina, 88 mL de glicerol y 1 mL de antiespumante. El cultivo se llevó a cabo en Erlenmeyer de 2 L con 111,1 g/L de medio TBm, 100 µL/L de antiespumante y 8 mL/L de glicerol enrasándose hasta un volumen de 2 L de agua destilada a los que se añadieron 0,5 mL/L de ampicilina. Por último, en cada Erlenmeyer se añadieron 1 mL del inóculo y se mantuvieron en incubadora durante 18-20 horas a 37°C y en agitación orbital a 250 rpm.

Una vez alcanzada la tasa máxima de crecimiento, se extrajo el contenido y se centrifugó a 4°C durante 15 min a 4500 rpm (rotor JLA8.1). A continuación, se procedió a lavar el concentrado celular. Se realizó en 3 etapas sucesivas de centrifugación (8000 rpm rotor JLA8.1, 20 min, 4°C) y resuspensión en tampón de

lavado de bacterias (Tris base 20 mL y NaCl 0,2 M pH 7,5). Tras el último lavado las células se resuspendieron en tampón de sonicación (Tris base 20 mM pH 7,5, EDTA 2,5 mM y 1mM PMSF (inhibidor de proteasas) donde se llevó a cabo la ruptura celular.

La producción de ELR es intracelular, por tanto, la siguiente etapa consistió en introducir el concentrado celular en un disruptor (Panda Plus, GEA), con el fin de que se produjera la lisis celular y extraer el ELR. Por último, el polímero se sometió a un proceso de purificación (figura 2.1) compuesto por cuatro etapas sucesivas de centrifugación en el que juega un papel importante el cambio de temperatura y el control del pH.

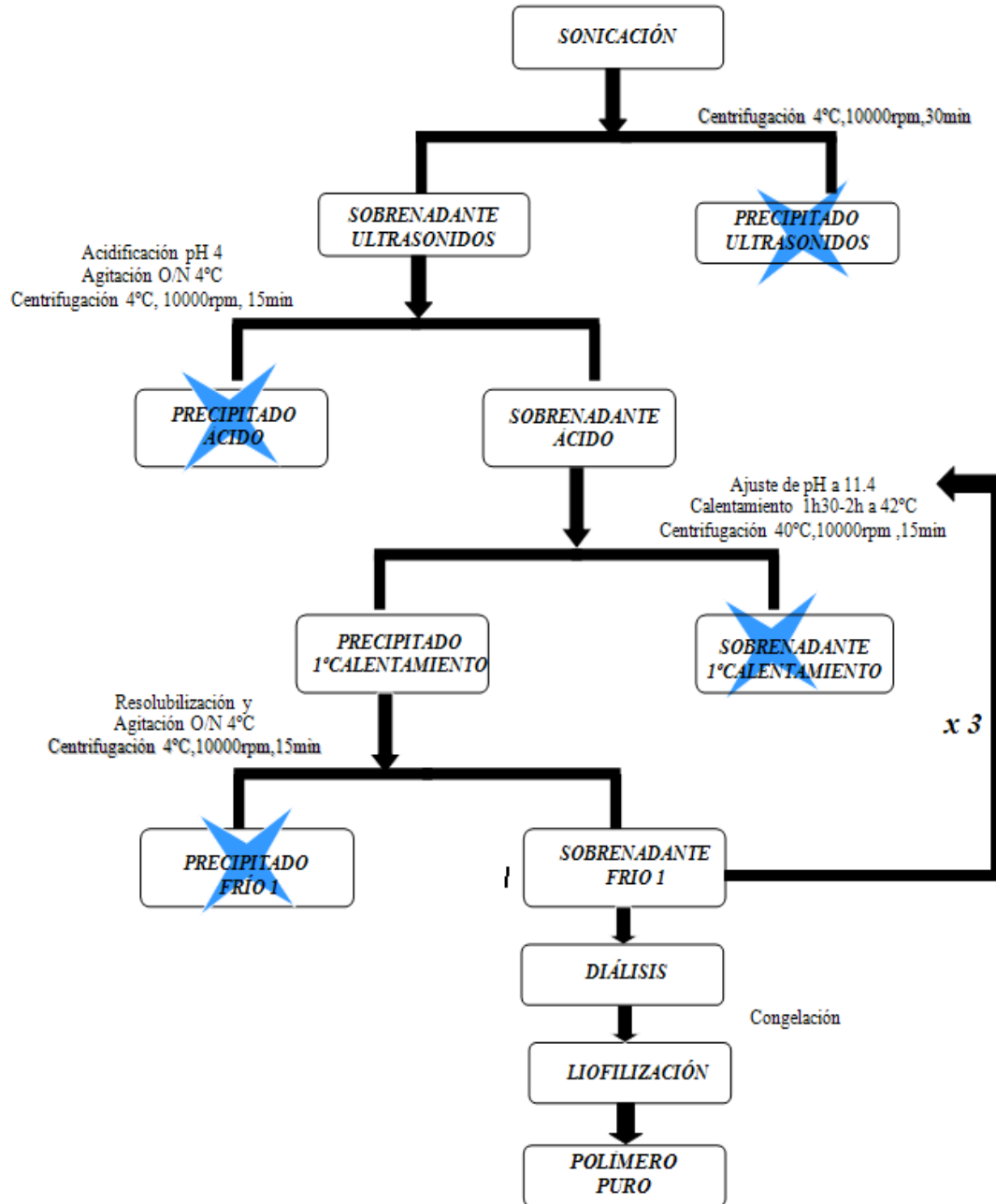


Figura 2.1 Protocolo de purificación polímero VKVx24.

Una vez obtenido el polímero puro se llevó a cabo el proceso de caracterización mediante las técnicas de espectroscopía infrarroja (FTIR), espectrometría de masas (MALDI-TOF), resonancia magnética nuclear (RMN) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

2.2.2. Modificación química del polímero VKVx24

El ELR VKVx24 anteriormente descrito se modificó químicamente para posteriores usos. Las lisinas presentes en este polímero, son modificadas para introducir grupos azido o alquino en la cadena polimérica dependiendo del uso que se le dé posteriormente al polímero.

2.2.2.1. Modificación química del polímero VKVx24 con un compuesto derivado de ciclooctino

Una solución de carbonato de (1R,8S,9S)-biciclo [6.1.0]non-4in-9-ilmetil succinimidilo (138,5 mg, 0,47 mmol, 0,6 eq., PM 291,30 mg/mmol) en DMF (1 mL) se añadió a temperatura ambiente (t.a) a una disolución de VKVx24 (2000mg, 0,79 mmol_{NH₂}, 1 eq, PM 606642 Da) en DMF (40 mL). La mezcla se agitó a t.a. durante 48 horas (figura 2.2). Transcurrido ese periodo de tiempo la disolución se distribuyó en 6 falcons y se añadieron 15 mL de Et₂O en cada uno de ellos obteniéndose un precipitado que se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con acetona (3x15 mL) y se secó a presión reducida. El sólido obtenido se disolvió en agua ultra-pura (20 mL) a baja temperatura (4°C) y se dializó en agua destilada (2x25 L) y en agua ultra-pura (1x25 L). Por último, se liofilizó para obtener finalmente el ELR modificado (VKV-ciclo) [30].

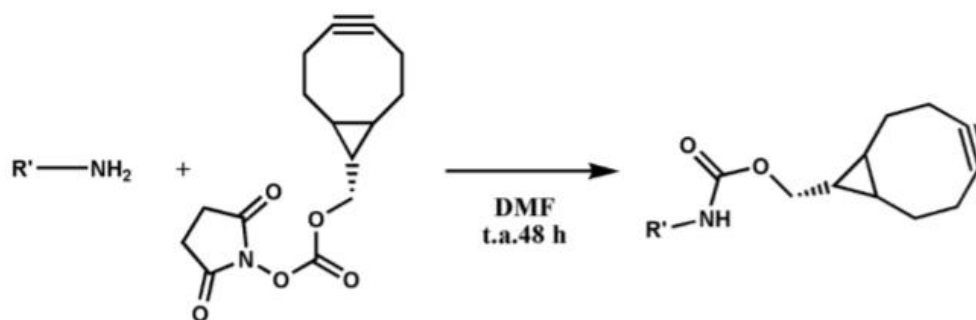


Figura 2.2 Reacción de funcionalización del ELR con ciclooctinos

2.2.2.2. Modificación química del polímero VKVx24 con grupos azido

Una solución de carbonato de 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) (54,7 mg, 0,24 mmol, 0,6 eq, PM 228,17 mg/mmol) en DMF (1 mL) se añadió a t.a a una disolución de VKVx24 (1000mg, 0,40 mmol_{NH₂}, 1eq, PM 60642 Da) en DMF (20 mL). La mezcla se agitó a t.a. durante 48 horas (figura 2.3). Transcurrido ese periodo de tiempo la disolución se distribuyó en 6 falcons y se añadieron 15 mL de Et₂ Oen cada uno obteniéndose un precipitado que se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min (rotor JLA8.1). El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con acetona (3x15 mL) y se secó a presión reducida. El sólido obtenido se disolvió en agua ultra-pura (20 mL) a baja temperatura (4°C) y se dializó en agua destilada (2x25 L) y en agua ultra-pura (1x25 L) y se liofilizó para obtener finalmente el ELR modificado (VKV-N₃).

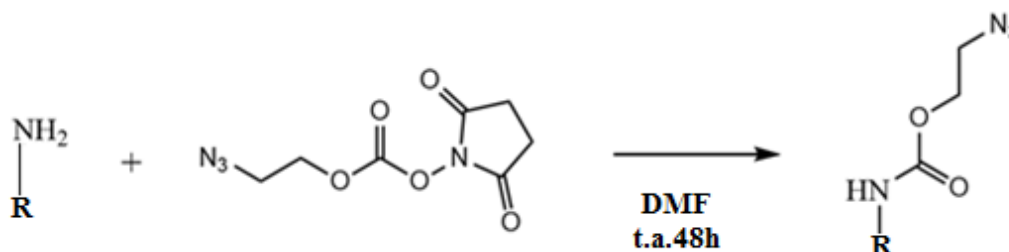


Figura 2.3 Reacción de funcionalización del ELR con grupos azido

Ambos polímeros se caracterizaron mediante las técnicas de FTIR, MALDI-TOF, RMN y DSC.

2.2.3. Preparación de hidrogeles de ELRs mediante tecnología “click” sin catalizador en presencia de AZM.

A lo largo de este trabajo se ha estudiado la formación de hidrogeles mediante metodología click modificando diferentes variables, tales como la cantidad del fármaco introducido, la concentración de los polímeros o el uso de varios disolventes.

2.2.3.1. Preparación hidrogeles en concentración 100 mg/mL usando como disolvente agua ultra-pura

Para la obtención de hidrogeles de ELRs a esta concentración mediante química click sin catalizador se prepararon por separado 500 μ L de ambas disoluciones en agua ultra-pura, a 4°C, de los biopolímeros VKV-ciclo y VKV-N₃ en concentración 100 mg/mL a las que se añadieron 0,75 mg de AZM en cada disolución y se dejaron disolviendo toda la noche a 4°C. Al día siguiente se llevó a cabo la formación de los hidrogeles:

Ambas disoluciones se mezclaron a 4°C vorteándose la disolución final de un 1 mL durante 10 s. A continuación, con la ayuda de una pipeta automática, se dispensaron volúmenes de 150 μ L de la disolución final en moldes de teflón de 1 cm de diámetro. Se mantuvieron a 4°C durante 30 min y a continuación se llevaron a temperatura ambiente. Una vez secos, se comprobó su peso, diámetro y grosor [30].

2.2.3.2. Preparación hidrogeles en concentración 50 mg/mL usando como disolvente una mezcla de agua ultra-pura, dimetil sulfóxido y etanol

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

de gelificación. Una vez los hidrogeles estuvieron secos, se realizaron medidas de diámetro, grosor y peso.

2.2.3.3. Preparación hidrogeles en concentración 100 mg/mL usando como disolvente una mezcla de agua ultra-pura, dimetil sulfóxido y etanol

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

2.2.4. Obtención de nanogeles mediante tecnología “click” sin catalizador

Para la obtención de nanogeles mediante tecnología click sin catalizador se prepararon disoluciones de 1 mL de VKV-N₃ y VKV-ciclo en agua ultra-pura, en concentración 1 mg/mL y se mantuvieron a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, ambas disoluciones se mezclaron a 4°C obteniendo un volumen total de 2 mL almacenándose la mezcla final a 37°C para obtener los nanogeles [32]. Se comprobó el tamaño de partícula y potencial zeta una vez finalizado el protocolo con la ayuda de un sistema de dispersión de luz Zeta Sizer Nano.

2.2.5. Ensayo de mucoadhesión nanogel-mucina mediante la medida del ángulo de contacto

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

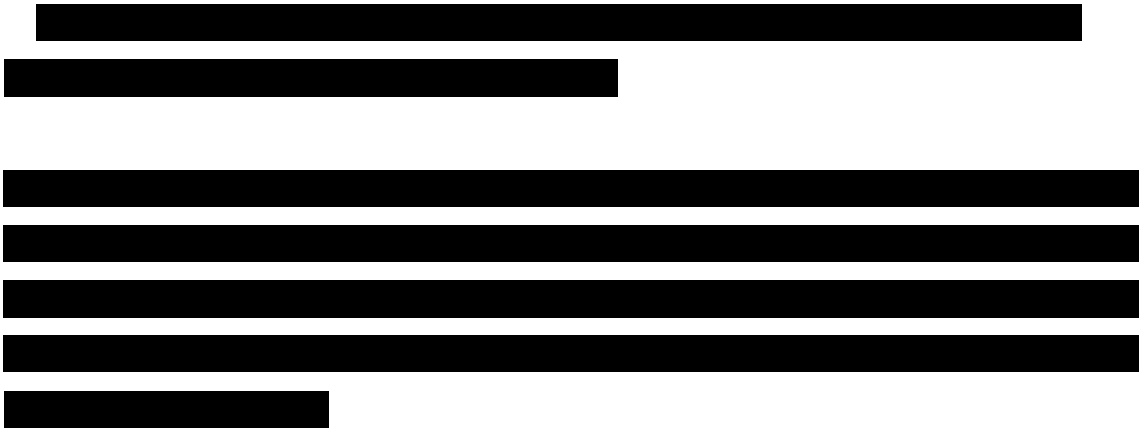
[Redacted text block]

Reactivo	Cantidad (g) para 0,5 L de disolución
KCl	0,895
NaCl	3,156
NaHCO ₃	1,092
CaCl ₂	0,022
MgCl ₂	0,023

Tabla 2.5 Reactivos necesarios para la preparación de la Solución Salina Ocular (SLF).

2.2.6. Ensayo de mucoadhesión del nanogel-mucina mediante la técnica dispersión dinámica de luz y medida del potencial zeta

[Redacted text block]



Proporción mucina: nanogel	Mucina (μg)	Nanogel (μg)	Volumen agua ultrapura (μL)
1:1	25	25	950
1:5	25	125	850
1:10	25	250	725
1:20	25	500	475
1:30	25	750	225
1:50	25	1250	-
1:75	25	1875	-
1:100	25	2500	-

Tabla 2.6 disoluciones preparadas en diferentes proporciones de masa de mucina y nanogel

2.2.7. Ensayos de liberación de fármaco acetazolamida de los hidrogeles obtenidos a través de química “click”

Los ensayos de liberación se llevaron a cabo en viales de vidrio de 5 mL, en los cuales se introdujeron cada uno de los hidrogeles obtenidos utilizando como medio dispersante 2 mL de agua ultra-pura. Estos viales son introducidos en una incubadora a 35,5°C con el fin de simular la temperatura de la superficie ocular y agitación orbital de 60 rpm.

Se realizó un primer lavado de cinco minutos, extrayendo todo el volumen de medio dispersante, y reponiéndolo de nuevo; a continuación, se tomaron medidas a los 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 1440 y 2880 minutos, extrayendo 1 mL y reponiéndolo con medio completamente nuevo con el fin de hacer el seguimiento

óptimo de la liberación. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para medir la concentración liberada de fármaco a lo largo del tiempo se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000, Thermo. Las medidas se realizaron por triplicado a la longitud de onda de 265 nm [37].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL BIOPOLÍMERO VKVx24

Para llevar a cabo la bioproducción del polímero VKVx24 mediante fermentación en Erlenmeyers (apartado 2.2.1), fue necesario seleccionar, en primer lugar, el cultivo de la colonia de *E.coli*, en el que la producción del polímero fuera mayor. La selección se realizó mediante análisis electroforético. Así, la colonia seleccionada fue 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.

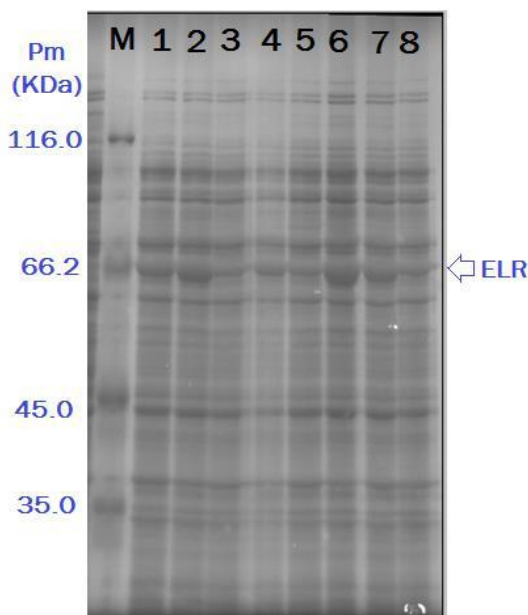


Figura 3.1 Fotografía del gel de electroforesis. En el gel se observa cómo las proteínas se han separado en función de su peso molecular. La flecha indica la banda correspondiente al polímero VKVx24 de 60KDa. La calle indicada con la letra M corresponde al marcador de proteínas patrón.

Una muestra de la suspensión de la colonia seleccionada se cultivó bajo condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano. La tasa máxima de crecimiento se comprobó mediante la medida de la densidad óptica de la suspensión, una vez que su valor no mostró cambio, se dio por finalizado el proceso de crecimiento.

Por último, se purificó el biopolímero mediante una serie de etapas descritas en el apartado 2.2.1 y se comprobó, mediante análisis electroforético, que el polímero había seguido la ruta esperada en el proceso de purificación (figura 3.2).

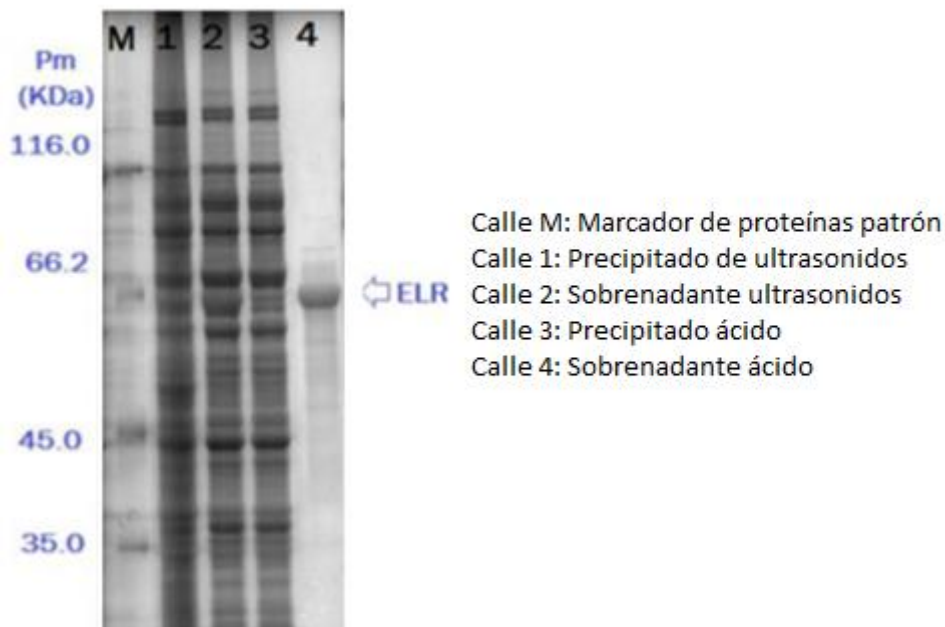


Figura 3.2 Electroforesis correspondiente a algunas etapas del proceso de purificación. En el gel se observa que en el sobrenadante ácido (calle 4) apenas hay proteínas de la bacteria, lo que indica que el polímero de peso molecular 60KDa, señalado con la flecha, está prácticamente limpio.

La cantidad total obtenida tras el proceso fue de **693 mg**. Ya que la producción se llevó a cabo en 7,2 L de medio, el rendimiento alcanzado fue de **96,25 mg/L**.

3.2 CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO VKV_{x24}

El ELR obtenido es caracterizado mediante las técnicas de espectrometría de masas (MALDI-TOF), resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía infrarroja (FTIR) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

a) MALDI-TOF: con la ayuda de esta técnica se determinó el peso molecular del recombinámero, que en este caso es de 60647 Da (ANEXO 1).

b) RMN: la estructura del polímero bioproducido fue analizada mediante resonancia magnética nuclear. Para ello se realizó un espectro de ^1H (ANEXO 2) que permitió determinar el tipo de hidrógenos en función del rango de frecuencia al que resuenan y la cantidad de estos presentes en la estructura del espectro mediante la integración del área bajo la curva del espectro.

c) FTIR: el espectro obtenido del polímero VKVx24 mediante espectroscopía infrarroja (ANEXO 3) permite identificar varios grupos funcionales presentes en la estructura, los cuales presentan bandas características correspondientes a la absorción de luz infrarroja. A pesar de que resulta complejo determinar qué grupos corresponden a cada banda, debido al elevado peso molecular del polímero y al solapamiento de bandas que se produce, sí es posible identificar una banda a 3400 cm^{-1} correspondiente a la banda de tensión del enlace N-H o una banda correspondiente al enlace C=O de amidas a 1600 cm^{-1} , entre otras.

d) DSC: mediante el uso de esta técnica se determinó la temperatura de transición (T_t) del polímero, en la que se basa el comportamiento inteligente de éstos (ANEXO 4). La muestra se sometió al siguiente gradiente térmico: en primer lugar se enfrió a 0°C manteniéndose a esta temperatura durante 5 min, después se elevó hasta 60°C con una rampa de temperatura de $+5^\circ\text{C}/\text{min}$. Los resultados son recogidos en la tabla 3.1 para diferentes valores de pH y en dos disolventes: agua ultrapura y PBS (tampón fosfato salino). A pH 11,6 en agua ultra-pura basificada con NaOH, el pico correspondiente con la T_t se encuentra a $34,7^\circ\text{C}$, por lo que puede afirmarse que el polímero transiciona a esa temperatura. Empleando como disolvente PBS a pH 7,6, el pico se observa a $55,1^\circ\text{C}$. 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 T_t disminuye por el contrario a pH 7, por debajo del pK de las lisinas, el polímero se encuentra cargado, es polar y la T_t aumenta.

<i>Disolvente</i>	<i>pH</i>	<i>Tt (°C)</i>
Agua ultra-pura	11.6	34.7
PBS	7.6	55.1

Tabla 3.1 Temperatura de transición del polímero VKVx24 en diferentes pH y disolventes.

3.3 MODIFICACIÓN QUÍMICA DEL POLÍMERO VKVx24

El polímero VKVx24 fue sometido a dos tipos de modificaciones químicas; modificación con un derivado de ciclooctino (VKV-ciclo) y modificación con grupos azido (VKV-N₃) siguiendo los protocolos descritos en el apartado 2.2.2. La caracterización de ambos polímeros se llevó a cabo mediante las técnicas de MALDI-ToF, RMN, FTIR y DSC.

3.3.1 Modificación química del polímero VKVx24 con un compuesto derivado de ciclooctino

El ELR se modificó químicamente transformando los grupos amino presentes en la cadena lateral de los aminoácidos lisina mediante una sustitución con el carbonato de (1R,8S,9S)-biciclo [6.1.0]non-4in-9-ilmetil succinimidilo portador de un anillo de ciclooctino. Una vez modificado, el polímero denominado VKV-ciclo fue sometido a varias técnicas de caracterización para comprobar el grado de sustitución.

a) MALDI-ToF: tras realizar una espectrometría de masas (ANEXO 5), se determinó que el peso molecular del VKV-ciclo era de 62559 Da, por lo que se observa un aumento del peso molecular de 1912 Da con respecto al polímero no modificado (60647 Da). Esta variación se corresponde con la introducción del derivado de ciclooctino (Peso molecular una vez ha reaccionado 176 Da), por lo que es posible calcular el porcentaje de modificación y el número de lisinas sustituidas, así:

$$\text{Lisinas modificadas} = \frac{\text{Pm VKV-ciclo} - \text{Pm VKVx24}}{\text{Pm producto}} = \frac{62559 \text{ Da} - 60647 \text{ Da}}{176 \text{ Da}} = 11$$

Un total de 11 de las 24 lisinas han sido modificadas, por lo que el porcentaje de sustitución fue del **46%**. Según los equivalentes utilizados en la reacción, se esperaba una sustitución del 60%, es decir un total de 14 lisinas, por lo que el rendimiento de la conversión fue del 79%.

b) RMN: mediante la integración de las señales del espectro de ^1H obtenido (ANEXO 6), fue posible conocer con exactitud el grado de modificación de las lisinas del polímero. El espectro muestra la aparición de 3 señales nuevas localizadas a 3, 4 y 7 ppm que coinciden con la predicción realizada. 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 y, por último, la señal que aparece a 7 ppm, que corresponde al hidrógeno perteneciente al carbamato formado, integrando esta última señal, se observó que un total de **11** lisinas habían sido modificadas, lo que concordaba con el resultado de la espectrometría de masas.

c) FTIR: esta técnica no permitió comprobar el grado de sustitución de las lisinas puesto que las señales correspondientes a la modificación con el derivado de ciclooctino se solapan con las propias del polímero sin modificar. (ANEXO 7)

3.3.2 Modificación química del polímero VKVx24 con grupos azido

Se ha llevado a cabo la sustitución de los grupos aminos correspondientes a los aminoácidos lisina del polímero mediante sustitución con el compuesto carbonato de 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) introduciendo grupos azido ($-\text{N}_3$). Una vez modificado, el polímero denominado VKV- N_3 es sometido a varias técnicas de caracterización para comprobar el grado de sustitución.

a) MALDI-ToF: mediante la técnica espectrometría de masas (ANEXO 8), se determinó el peso molecular del VKV- N_3 , que resultó ser de 61836 Da, por lo que se observa un aumento del peso molecular de 1189 Da con respecto al polímero no modificado (60647 Da). Esta variación se corresponde con la introducción del

compuesto portador de un grupo $-N_3$ (Peso molecular una vez ha reaccionado 113 Da), por lo que es posible calcular el porcentaje de modificación y el número de lisinas sustituidas, así:

$$\text{Lisinas modificadas} = \frac{\text{Pm VKV-N}_3 - \text{Pm VKV} \times 24}{\text{Pm producto}} = \frac{61836 \text{ Da} - 606427 \text{ Da}}{113 \text{ Da}} = 11$$

Un total de 11 de las 24 lisinas han sido modificadas, por lo que el porcentaje de sustitución fue del **46%**. Según los equivalentes utilizados en la reacción, se esperaba una sustitución del 60%, es decir un total de 14 lisinas, por lo que el rendimiento de la conversión fue del 79%.

b) RMN: mediante la integración de las señales del espectro de ^1H obtenido (ANEXO 9), fue posible conocer con exactitud el grado de sustitución de las lisinas del polímero. Para ello, al igual que en el caso del derivado de ciclooctino, aparecen 3 nuevas señales a 3, 4 y 7 ppm. Integrando esta última se obtiene el grado de sustitución dando un valor de 11 hidrógenos, que concuerda con lo obtenido en el MALDI-TOF.

c) FTIR: en este caso, la espectroscopía infrarroja sí permitió justificar la modificación química en el polímero VKV- N_3 , ya que el grupo azido presenta una banda característica a una frecuencia de 2100 cm^{-1} , no observada en el espectro del polímero sin modificar (ANEXO 10).

d) DSC: mediante calorimetría diferencial de barrido se obtuvo la temperatura de transición de ambos polímeros modificados. Las muestras se sometieron al siguiente gradiente térmico: en primer lugar se enfriaron a 0°C , manteniéndolas a esta temperatura durante 5 min, a continuación se van calentando hasta 60°C con una rampa de temperatura de $+5^\circ\text{C}/\text{min}$. Los resultados son recogidos en la tabla 3.2

Polímero	Peso molecular (Da)	Tt (°C) pH 7,4
VKVx24	60647	55,1
VKV-ciclo	62559	15,2
VKV-N ₃	61836	24,1

Tabla 3.2 Temperaturas de transición para los polímeros obtenidos en PBS.

Se observa cómo a pH 7,4 la Tt de los polímeros modificados disminuye notablemente con respecto a la del polímero no modificado. Esto es debido a la desaparición de parte de los grupos amino y a la introducción de grupos funcionales más apolares, lo que provoca un aumento de la hidrofobicidad media del polímero y, con ello, una disminución de la temperatura de transición.

Los rendimientos globales de las reacciones de modificación del polímero VKVx24 se recogen en la tabla 3.3:

Polímero	Masa inicial (mg)	Moles iniciales	Masa final (mg)	Moles finales	Rendimiento (%)
VKV-ciclo	2000	0,032	1780	0,028	89
VKV-N ₃	1000	0,016	760	0,012	76

Tabla 3.3 Rendimientos globales de las reacciones de modificación realizadas

Se utilizaron un total de 0,6 equivalentes de reactivo en ambas reacciones para obtener una modificación del 60% de las lisinas con el objetivo de dejar una cantidad elevada de estos aminoácidos libres ya que en condiciones fisiológicas los grupos amino terminales presentes en estos aminoácidos se encuentran protonados confiriendo al hidrogel una carga neta positiva más adecuada para realizar la adhesión a las mucinas oculares cargadas negativamente debido a los grupos sulfato y carboxilo que presentan.

3.4 PREPARACIÓN DE HIDROGELES DE ELRs MEDIANTE TECNOLOGÍA “CLICK” SIN CATALIZADOR

Los hidrogeles obtenidos en este trabajo fueron formados a partir de los polímeros VKV-ciclo y VKV-N₃ por entrecruzamiento vía química “click”, mediante cicloadición de Huisgen (figura 3.3) [38] de los grupos azido y ciclooctino introducidos previamente en las cadenas de los respectivos polímeros formándose un anillo de 1,2,3-triazol, a través del cual quedan enlazados ambos polímeros (figura 3.4).

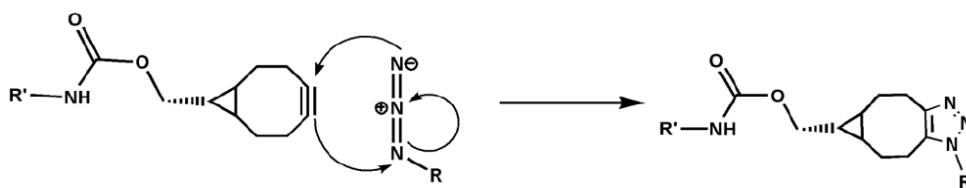


Figura 3.3 Esquema de la reacción de entrecruzamiento de las cadenas que conduce a la formación de los geles de ELRs mediante metodología click sin catalizador

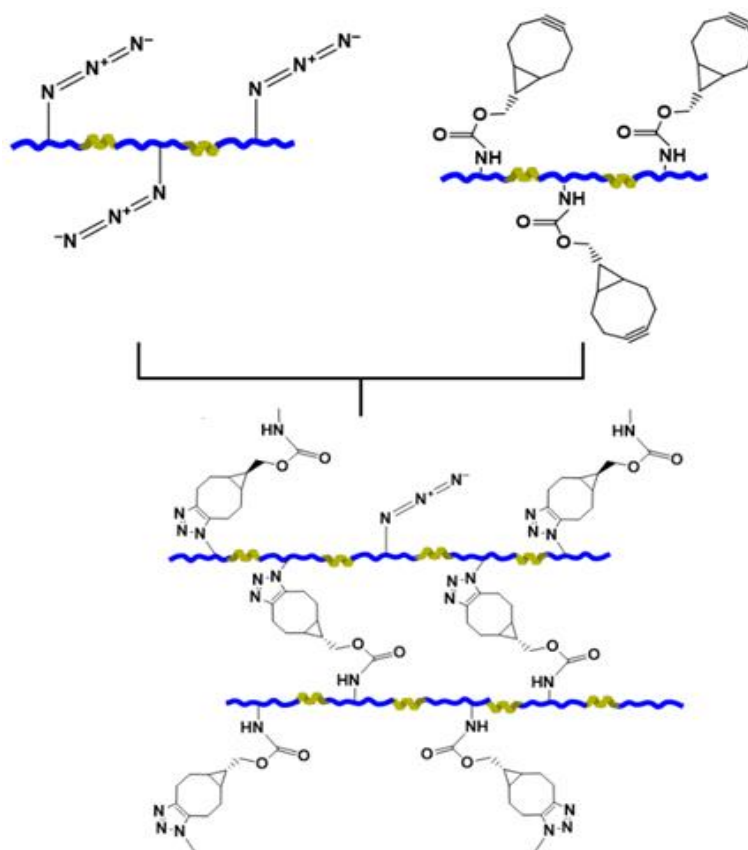


Figura 3.4 Representación de la formación del hidrogel por entrecruzamiento de los polímeros VKV-N₃ y VKV-ciclo mediante química click

3.4.1 Preparación hidrogeles en concentración 100 mg/mL usando como disolvente agua ultra-pura

Se llevó a cabo la formación de hidrogeles utilizando como único disolvente agua ultra-pura y con una concentración polimérica de 100 mg/mL siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.3.1. Se obtuvieron un total de 5 hidrogeles con una cantidad de AZM cargada de 0,18 mg/hidrogel (se superaron los límites de solubilidad ya que se demostró que el polímero los aumentaba), cuyo peso, diámetro y grosor se recogen en la tabla 3.4:

Hidrogel	Peso (mg)	Diámetro (mm)	Grosor (mm)
A1	19,26	4,11	0,80
A2	18,90	4,51	0,85
A3	19,94	4,48	0,83
A4	18,82	4,66	0,92
A5	17,68	4,98	0,90

Tabla 3.4 Peso y dimensiones de los hidrogeles obtenidos en agua ultra-pura y concentración 100 mg/mL.

3.4.2 Preparación hidrogeles en concentración 50 mg/mL usando como disolvente una mezcla de agua ultra-pura, dimetil sulfóxido y etanol

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[REDACTED]

[REDACTED]

Hidrogel	Peso (mg)	Diámetro (mm)	Grosor (mm)
B1	11,35	4,55	0,78
B2	14,24	4,65	0,80
B3	13,88	4,68	0,77
B4	14,63	4,70	0,81
B5	13,98	4,63	0,80

Tabla 3.5 Peso y dimensiones de los hidrogeles obtenidos en agua ultrapura, DMSO y Etanol en concentración 50 mg/mL.

3.4.3 Preparación hidrogeles en concentración 100 mg/mL usando como disolvente una mezcla de agua ultra-pura, dimetil sulfóxido y etanol

[REDACTED]

Hidrogel	Peso (mg)	Diámetro (mm)	Grosor (mm)
C1	17,43	4,80	0,80
C2	19,97	4,88	0,85
C3	20,20	4,92	0,88
C4	21,06	4,83	0,87
C5	22,01	4,91	0,85
C6	21,92	4,80	0,88

Tabla 3.6 Peso y dimensiones de los hidrogeles obtenidos en agua ultra-pura, DMSO y Etanol en concentración 100 mg/mL.



Figura 3.5 Imagen de uno de los hidrogeles formados, seco y desmoldado. Se observa una disminución del diámetro del 60% con respecto al molde utilizado, cuyo valor era de 10 mm

3.5 OBTENCIÓN DE NANOGELES MEDIANTE TECNOLOGÍA “CLICK” SIN CATALIZADOR

Con el objetivo de estudiar la carga iónica del hidrogel, así como sus propiedades mucoadhesivas, se prepararon nanogeles a partir de disoluciones diluidas en agua ultra-pura (1 mg/mL) de los polímeros VKV-ciclo y VKV-N₃ (apartado 2.2.4) y se realizó un estudio del tamaño y potencial zeta de sus nanopartículas, extrapolando los resultados a los hidrogeles obtenidos. Las medidas fueron realizadas a una temperatura de 35,5°C simulando la temperatura del globo ocular, obteniéndose valores de tamaño de partícula comprendidos entre 100 y 350 nm con índices de polidispersidad (PDI) que oscilaban entre 0,18 y 0,40 y valores de potencial zeta comprendidos entre +26,0 y +30,0 mV.

El potencial zeta presenta valores positivos debido a la presencia de grupos amino que se encuentran protonados a pH 7, no modificados químicamente con grupos azido o ciclooctino.

Estas nanopartículas fueron utilizadas, además, para realizar diversos ensayos en los que se pretendió comprobar el grado de mucoadhesión entre las mucinas oculares y estas extrapolando los resultados a los hidrogeles formados

3.6 ENSAYO DE MUCOADHESIÓN DEL NANOGEL-MUCINA MEDIANTE LA MEDIDA DEL ÁNGULO DE CONTACTO

Con el objetivo de comprobar el grado de mucoadhesión entre la mucina y el nanogel, para poder extrapolarlo al comportamiento de los hidrogeles con las mucosas oculares, se realizó este experimento que se basa en la denominada “*wetting theory*” [42]. Esta teoría se aplica a los sistemas líquidos que presentan afinidad por una superficie sobre la que pueden difundir. Esta afinidad puede determinarse mediante la medida del ángulo de contacto de una gota de líquido sobre la superficie. La regla general afirma que cuanto menor es el ángulo de contacto, mayor es la afinidad entre ambos sistemas.

[REDACTED]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

Tabla 3.7 Valores de ángulo del contacto obtenidos durante el primer ensayo

b) [Redacted]

[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

3.7 ENSAYO DE MUCOADHESIÓN DEL NANOGEL-MUCINA MEDIANTE LA TÉCNICA DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ Y MEDIDA DEL POTENCIAL ZETA

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] medir el tamaño y distribución de tamaños de moléculas y partículas.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

Tabla 3.10 Potencial zeta, tamaño de partícula medio e índice de polidispersidad (PDI) para las diferentes muestras de mucina:nanogel

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Variación de potencial zeta y tamaño medio

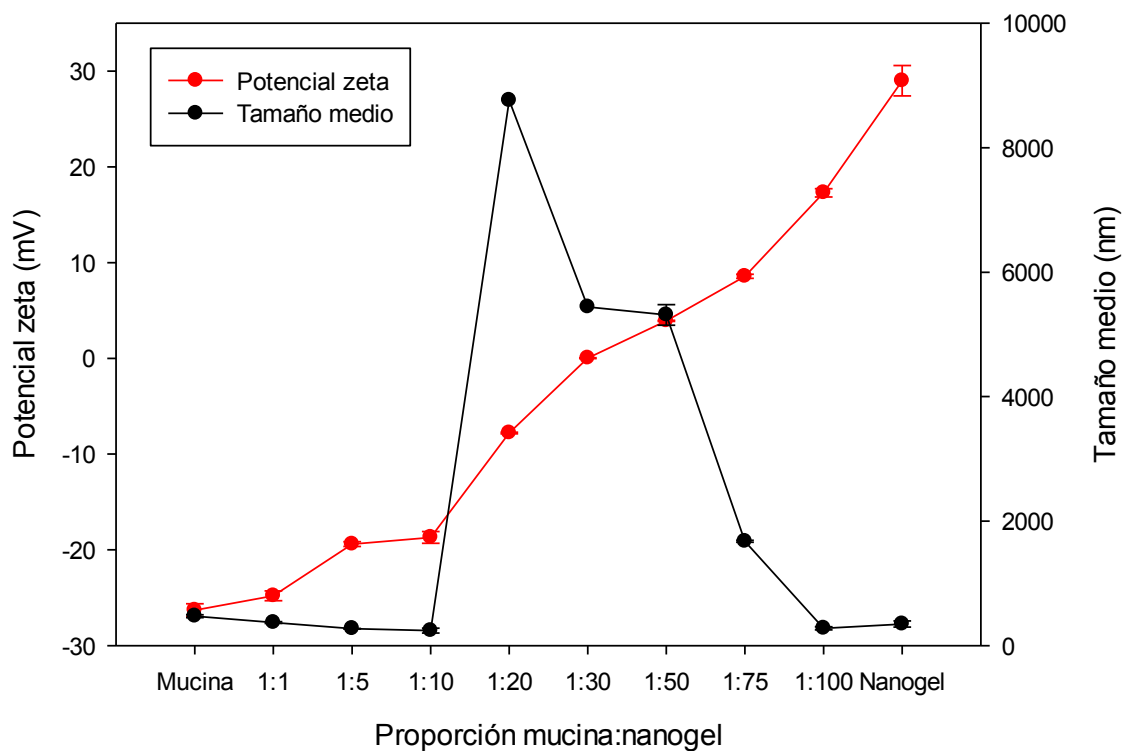
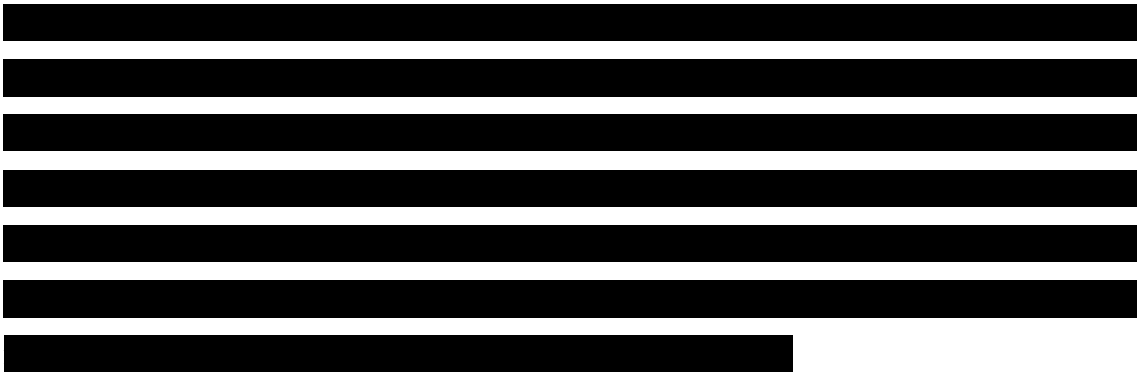


Figura 3.6 Representación gráfica de la variación del potencial zeta y el tamaño de partícula medio para las diferentes proporciones mucina: nanogel

[Redacted text block]



3.8 ENSAYOS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACO ACETAZOLAMIDA DE LOS HIDROGELES OBTENIDOS A TRAVÉS DE QUÍMICA “CLICK”

Los dispositivos para la liberación controlada de fármacos pueden ser clasificados físicamente de dos maneras: aquellos en los que el fármaco se encuentra disperso dentro de la matriz y aquellos en los que el principio activo está contenido en un reservorio o núcleo rodeado de una membrana polimérica que hace las funciones de pared controladora. En este caso, el fármaco se encuentra disperso en el seno de la matriz del hidrogel formado.

La difusión de la acetazolamida a través de la matriz ocurre como un movimiento molecular aleatorio debido a la existencia de un gradiente de concentración entre la fase polimérica (matriz) y la fase externa (medio), tendiendo a difundir hacia las zonas de menor concentración. Este proceso obedece la Primera Ley de Fick [36], que describe mediante una ecuación matemática (figura 3.7) cómo es el flujo y el coeficiente de difusión de las partículas de fármaco.

$$J = -D \frac{dC_m}{dx}$$

Figura 3.7 Ecuación de Fick. Siendo J el flujo, C_m la concentración en la membrana, dC_m/dx el gradiente de concentración y D el coeficiente de difusión. El signo negativo indica la dirección del flujo hacia la zona de menores concentraciones del soluto

[Redacted text block]

a) Hidrogeles en concentración 100 mg/mL usando como disolvente agua ultra-pura:

Masa liberada frente al tiempo

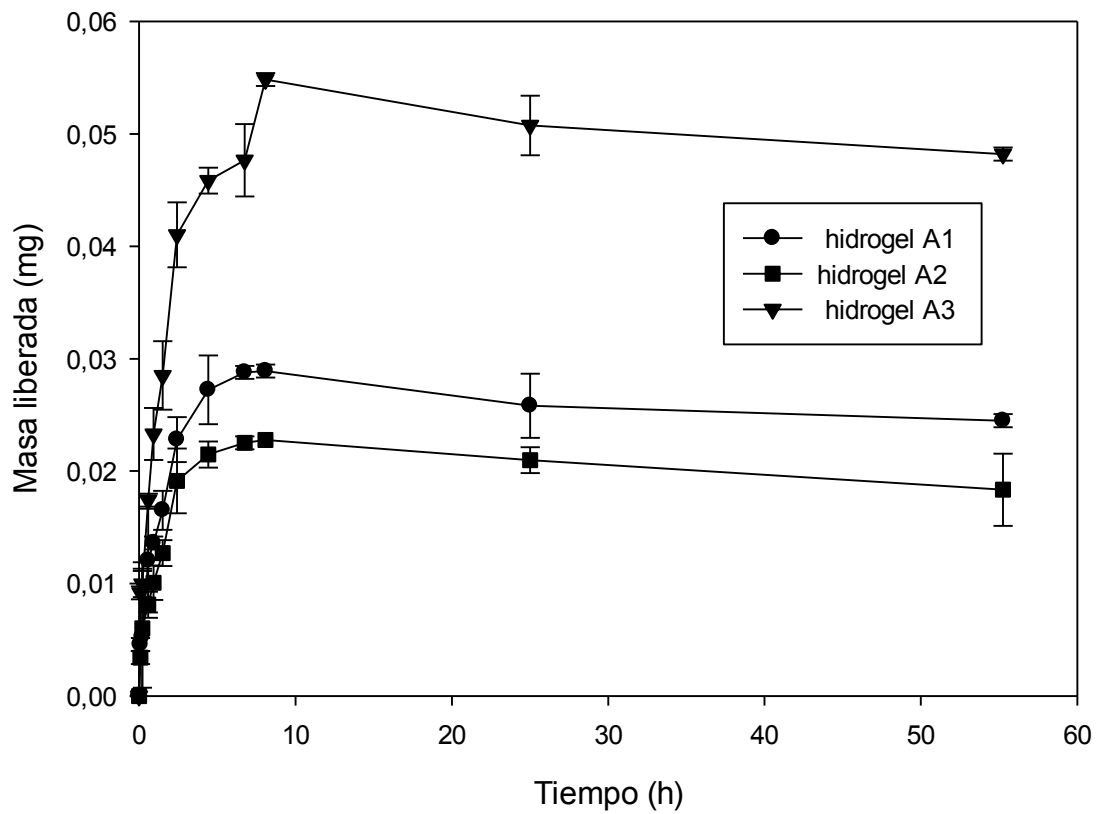


Figura 3.8 Representación de la masa de AZM liberada frente al tiempo para los triplicados del mismo tipo de hidrogeles denominados A1, A2 y A3 de concentración 100 mg/mL en agua.

Tras 55 h la cantidad de fármaco liberado fue de 0,024 mg para A1, 0,018 mg para A2 y 0,048 para el hidrogel denominado A3. Esto supone un 11, 8 y 23%, respectivamente, de la masa total de AZM presente en cada hidrogel inicialmente (0,22 mg), la mayoría del cual se libera en el primer período de 6 horas. Dado que las pérdidas de fármaco en el molde fueron mínimas (0,004 mg para A1, 0,007 mg para A2 y 0,040 para A3), se concluye que la mayor parte del fármaco se ha quedado retenido dentro de la matriz polimérica, por lo que este sistema basado en un hidrogel que utiliza disoluciones acuosas (100 mg/ml) de los biopolímeros de partida puede ser optimizado como sistema de encapsulación, de manera que pueda liberar una mayor cantidad del fármaco retenido y, a ser posible, en un período mayor de tiempo para alargar la posible dosis efectiva en el paciente.

b) Hidrogeles en concentración 50 mg/mL usando como disolvente una mezcla de DMSO (46,7 μ L), etanol (4 μ L) y agua ultra-pura (450 μ L) y una concentración de AZM de 0,7 mg/hidrogel

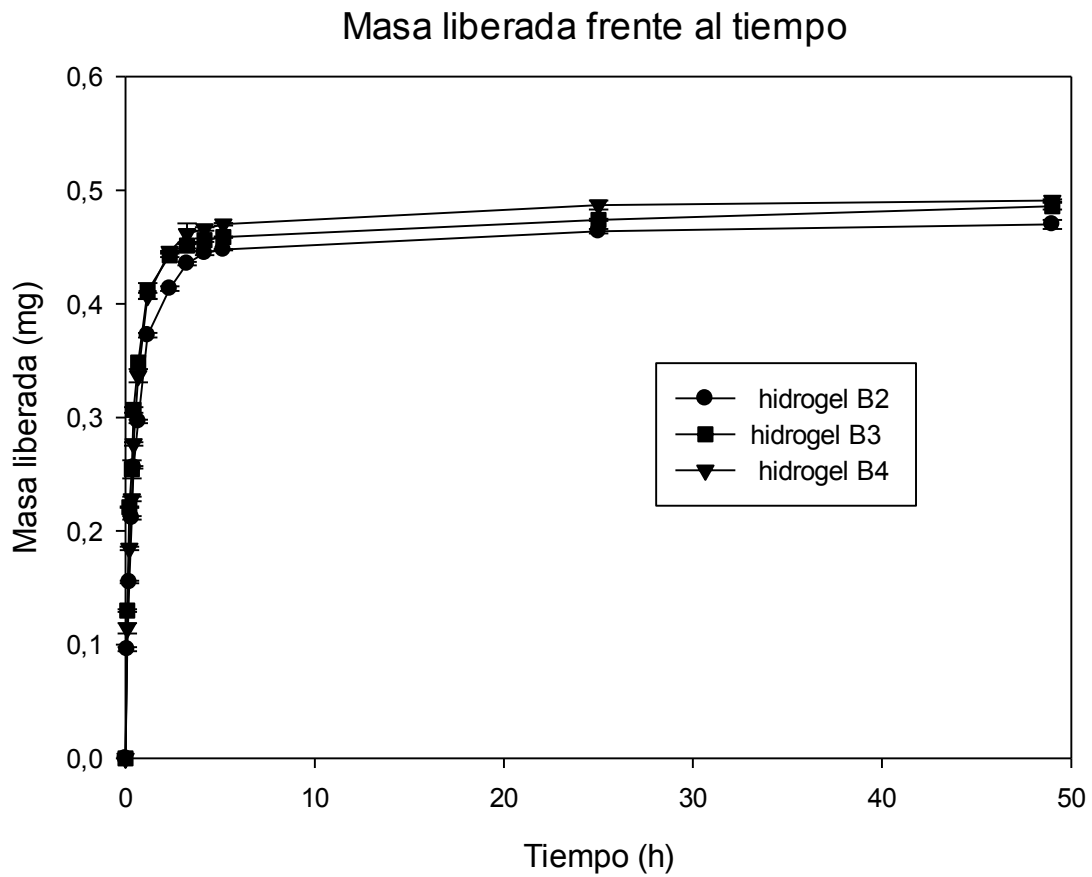
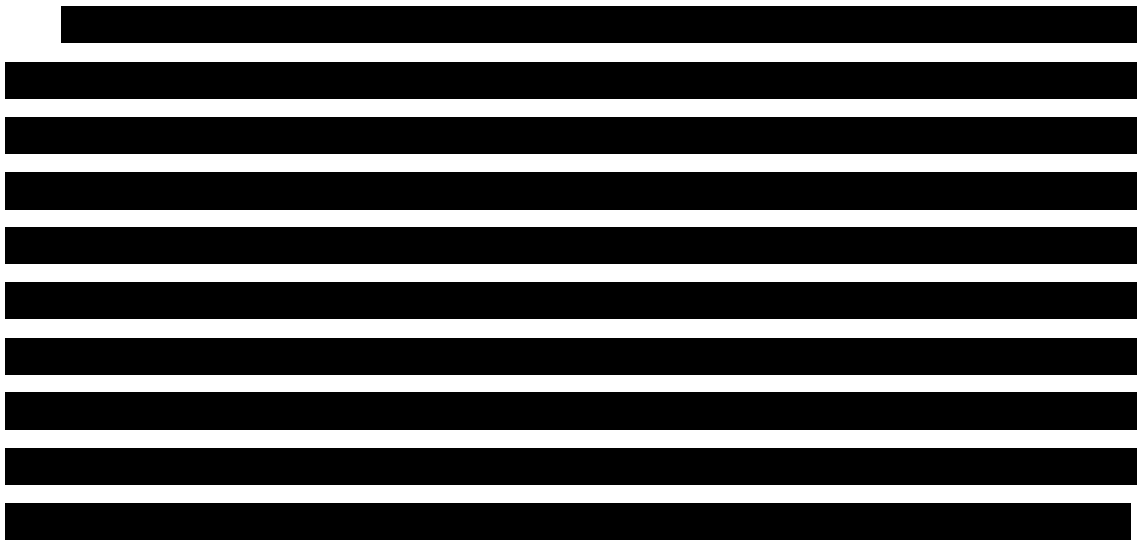


Figura 3.9 Representación de la masa de AZM liberada frente al tiempo los triplicados de este tipo hidrogel denominados B2, B3 y B4 de concentración 100 mg/mL en agua DMSO y etanol



c) Hidrogeles en concentración 100 mg/mL usando como disolvente una mezcla de DMSO (46,7 μ L), etanol (4 μ L) y agua ultra-pura (450 μ L) y una concentración de AZM de 0,7 mg/hidrogel

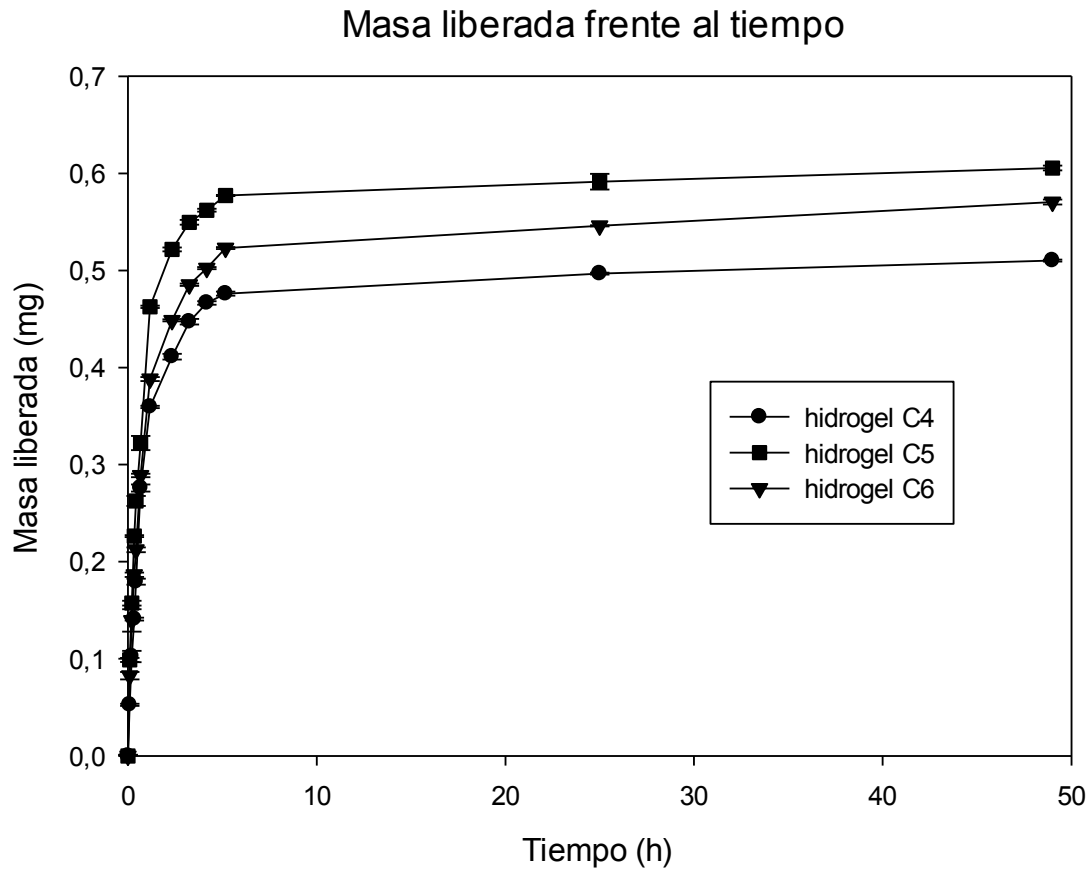


Figura 3.10. Representación de la masa liberada de AZM frente al tiempo para los triplicados de los hidrogeles denominados C4, C5 y C6 en concentración 100 mg/mL en agua DMSO y etanol.

[Redacted text block]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

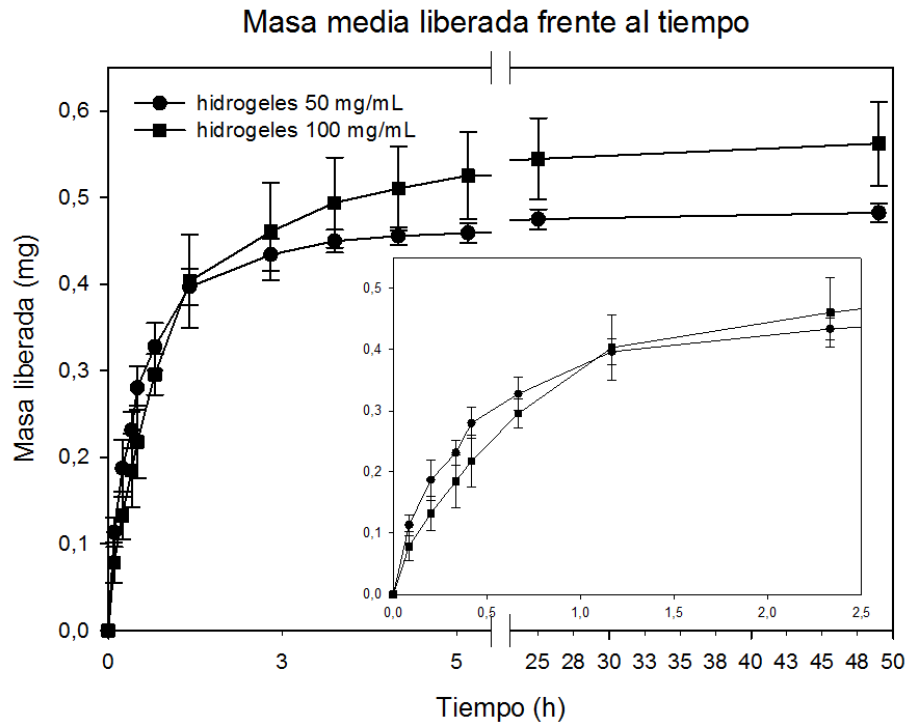


Figura 3.11 Gráfica comparativa de la masa de AZM liberada con el tiempo para los hidrogeles de concentración 50 y 100 mg/mL. En la gráfica anterior se muestra una ampliación de las tres primeras horas del ensayo, donde se observa cómo los hidrogeles de concentración 50 mg/mL liberan más rápido la AZM.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

- Se ha logrado bioproducir y purificar el polímero tipo elastina VKVx24 con un rendimiento de 96,25 mg/L de medio de cultivo.
- La caracterización del polímero VKVx24 se ha llevado a cabo mediante técnicas de Espectrometría de Masas, Resonancia Magnética Nuclear, Espectroscopía Infrarroja y Calorimetría Diferencial de Barrido, mediante estas técnicas se comprueba que el polímero se ha producido y purificado correctamente.
- Se ha modificado químicamente el polímero VKVx24 introduciendo grupos ciclooctino y azido mediante reacciones de sustitución a lo largo de la cadena polimérica obteniendo así los polímeros VKV-ciclo y VKV-N₃ respectivamente. Tras su caracterización, se ha demostrado que 11 de las 24 lisinas han sido modificadas, por lo que el porcentaje de sustitución fue del 46% y el rendimiento de la conversión fue del 79% para ambos polímeros.
- Por entrecruzamiento vía química “click” entre los polímeros VKV-ciclo y VKV-N₃ se ha conseguido la formación de hidrogeles utilizados como encapsuladores del fármaco acetazolamida. Haciendo uso de diferentes disolventes se ha logrado encapsular hasta 0,7 mg de este fármaco, por unidad de hidrogel.
- Se ha llevado a cabo la formación de nanogeles por entrecruzamiento químico de los polímeros VKV-ciclo y VKV-N₃ en concentraciones diluidas con un tamaño de partícula entre 200 y 350 nm con índices de polidispersidad que oscilan entre 0,18 y 0,40 y valores de potencial zeta comprendidos entre +26,0 y +31,0 mV a 35,5°C.
- Los ensayos de mucoadhesión realizados por medida del ángulo de contacto muestran una fuerte interacción entre las capas de mucina y nanogel, al no lograr separar ambos componentes tras las sucesivas series de lavados realizados con fluido lacrimal seguido de medio acuoso.
- El estudio de las distribuciones de los tamaños de las partículas nos muestran la formación de agregados de gran tamaño entre la mucina y el nanogel. Este hecho se corrobora también con los valores de los potenciales zeta medidos,

observando la neutralidad de las partículas para la proporción 1:30, lo que indica que toda la mucina se encuentra recubierta de nanogel.

- Los ensayos de liberación muestran una liberación del fármaco del 23% a las 48 horas en el mejor de los casos para hidrogeles formados en agua ultra-pura y concentración polimérica 100 mg/mL, del 70% para hidrogeles de concentración 50 mg/mL y del 87% para los hidrogeles de concentración polimérica 100mg/mL usando una mezcla.
- Hemos preparado diferentes dispositivos para la liberación controlada de AZM basados en hidrogeles tipo lentilla y los hemos optimizado modificando parámetros de concentración polimérica y naturaleza de disolventes utilizados, obteniendo los mejores resultados para aquellos de concentración mayor y en presencia de codisolventes que permiten aumentar aún más la carga del fármaco.
- Los ensayos realizados de mucoadhesión parecen indicar que los dispositivos de liberación basados en hidrogeles muestran una buena disposición a la adhesión a la mucosa ocular, lo que parece ser adecuado para la utilización de este dispositivo como sistema de liberación controlada de fármacos para tratamiento del glaucoma vía tópica.

- [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 of 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., Martín, S., Lopez, I., Rodríguez-Cabello, J.C., Tailored recombinant elastin-like polymers for advanced biomedical and nano(bio)technological applications. *Biotechnology Letters* 2006; 28: 687-695.
- [5] Rodríguez-Cabello, J.C, Martín, L., Alonso, M., Arias, F.J., Testera, A.M., "Recombinamers" as advanced materials for the post-oil age. *Polymer* 2009, 50, 5159-5169.
- [6] P. L. San Biagio, F. Madonia, T.L. Trapane, D. W.Urry, *Chemical Physics Letters* 1988; 145, 571.
- [7] 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 of Bioactive and Compatible Polymers* 1991; 6:263-282
- [8] Sallach, R.E., Cui, W., Balderrama, F., Martinez, A. W., et al., Long-term biostability os self-assembling protein polymers in the absence of covalent crosslinking. *Biomaterials* 2010;31: 779-791.
- [9] 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.
- [10] Martín L., Arias F.J., Alonso M., García-Arévalo C., Rodríguez-Cabello J.C, Rapid micropatterning by temperature-triggered reversible gelation of a recombinant smart elastin-like tetrablock-copolymer. *Soft Matter*, 2010. 6: p. 1121–1124.
- [11] Ribeiro, A., et al., Influence of the Amino-Acid Sequence on the Inverse Temperature Transition of Elastin-Like Polymers. *Biophysical Journal*. 97(1): p. 312-320.
- [12] Reguera, J., et al., Nanopore formation by self-assembly of the model genetically engineered elastin-like polymer [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]₁₅. *Journal of the American Chemical Society*, 2004. 126(41): p. 13212-3.

- [13] Reguera, J., et al., Effect of NaCl on the exothermic and endothermic components of the inverse temperature transition of a model elastin-like polymer. *Biomacromolecules*, 2007. 8(2): p. 354-8.
- [14] Gaudana R., Jwala J., Boddu S.H., Mitra A.K. Recent Perspectives in Ocular Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, 2009; 26, (5):1197-1216.
- [15] Mattiasson B, Galaev I. Smart polymers: Applications in Biotechnology and Biomedicine. 2007 ISBN: 9780849391613. Chapter 6: Protein-Based Smart Polymers, Rodriguez-Cabello JC, Reguera J, Prieto S, and Alonso M.
- [16] 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 *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2014; 55 (4): 1552-5783
- [17] Morrison P.W.J., Khutoryanskiy V.V. Advances in ophthalmic drug delivery. *Therapeutic Delivery* 2014; 5(12): 1297–1315.
- [18] Patel UL, Chotai NP, Nagda CD. Design and evaluation of ocular drug delivery system for controlled delivery of gatifloxacin sesquihydrate: In vitro and in vivo evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2012, 17(1),15-22.
- [19] Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Current Drug Delivery*. 2007, 4(4), 297-305.
- [20] Loftsona T, Jarvinen T. Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Advanced Drug Delivery Review*. 1999, 36(1), 59-79.
- [21] Pérez-Vilar J, Hill R.L, The Structure and Assembly of Secreted Mucins *The Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274, 31751-31754
- [22] Anne L Coleman. Glaucoma. *Lancet* 1999; 354: 1803–10
- [23] Maren T, Jankowska L., Sanyal G., Edelhauser H.F., The transcorneal permeability of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion. *Experimental eye research*. 1983; 36 (4). 457-479.
- [24] Sven Lindskog. Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharmacol. Ther.* 1997; 74: 1-20.
- [25] Baños Díez J.E, March Pujol M. *Farmacología ocular*
- [26] Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B., Click Chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition* 2001; 40:2004-21
- [27] Diaz Diaz D., Finn M.G., Sharpless K.B., Fokin V.V., Hawker C.J. *Anales de Química* 2008; 104(3):173-180.

[28] 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: 17993-8001.

[29] Jewett J.C., Bertozzi C.R., Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chemicals Society Reviews* 2010; 39:1271-9.

[30] González de la Torre I., Santos M., Quintanilla L., Testera A., Alonso M., Rodríguez Cabello J.C. Elastin-like recombinant catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties. *Acta Biomaterials*. 2014; 10(6), 2495-505.

[31] Kerth L., Walters B. D., National Toxicology Program's Chemical Solubility Compendium.

[32] González de Torre I., Quintanilla L., Pinedo-Martín G., Alonso M., Rodríguez-Cabello J.C. Nanogel Formation from Dilute Solutions of Clickable Elastin-like Recombinamers and its Dependence on Temperature: Two Fractal Gelation Modes. *Applied. Mater. Interfaces* 2014; 6, 14509–14515

[33] Thongborisute J., Takeuchi H. Evaluation of mucoadhesiveness of polymers by BIACORE method and mucin-particle method. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008; 354, 204-209

[34] Mennicke U., Salditt T. Preparation of Solid-Supported Lipid Bilayers by Spin-Coating. *American Chemical Society. Langmuir*, 2002; 18, (21), 2002 8173

[35] Van Haeringen N.J. Clinical Biochemistry of Tears. *Survey of Ophthalmology*.

[36] Takeuchi H., Thongborisute J., Matsui Y., Sugihara H., Yamamoto H., Kawashima Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 2005; 1583 – 1594.

[37] Fuentes Estévez G. Sistemas de liberación controlada a partir de biomateriales para la restauración del tejido óseo. 2013

[38] Hüisgen, R. *Angewandte Chemie International Edition in English* 1963;2, 565

[39] Dan M. Gordon. Dimethyl sulfoxide in ophthalmology, with especial reference to possible toxic effects. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1967; 1749-6632.

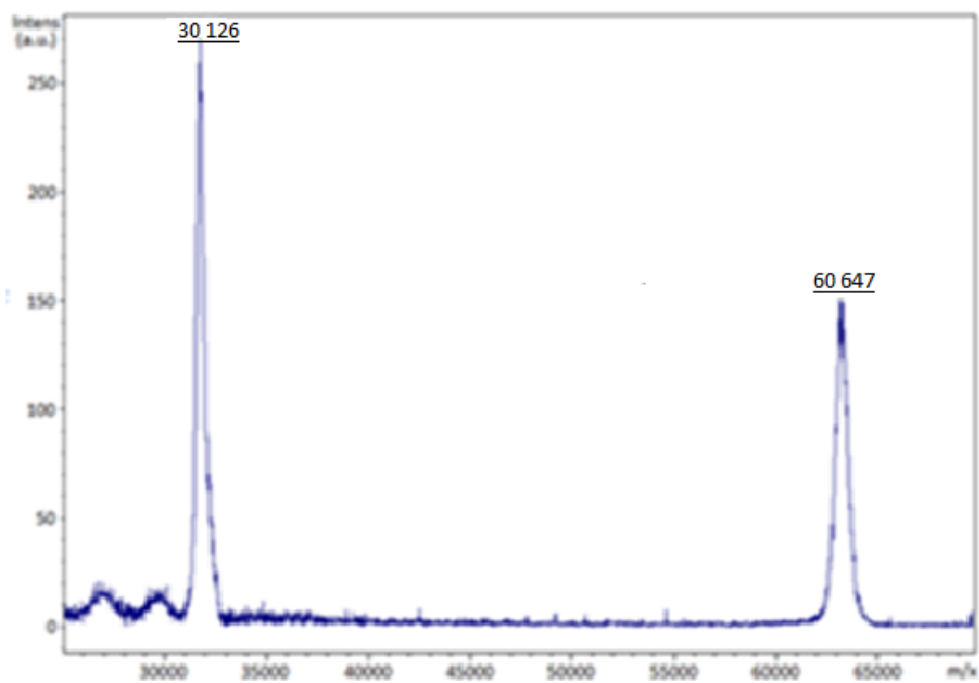
[40] International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works. Fichas técnicas disolventes, DMSO

[41] Castel A, Marruecos L, Nolla J. *Toxicología Clínica*, 2002.

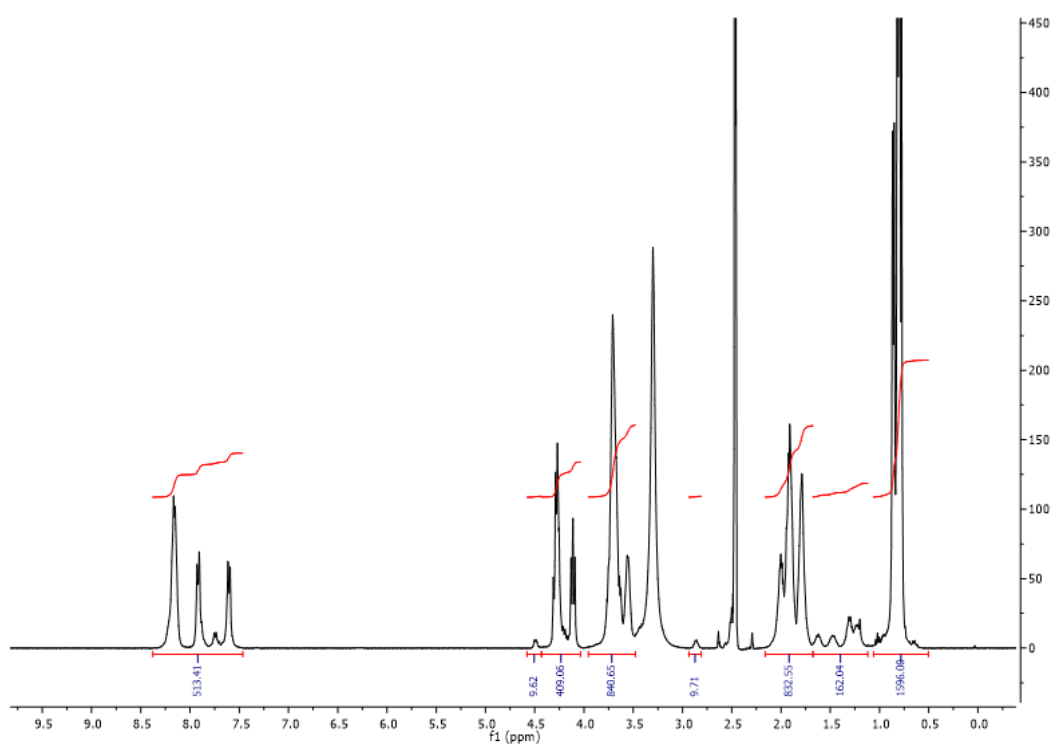
[42] Van Haeringen N.J. Clinical Biochemistry of Tears. Survey of Ophthalmology 1981; 26: 84-96.

[43] Pigman W. The carbohydrates chemistry and biochemistry.

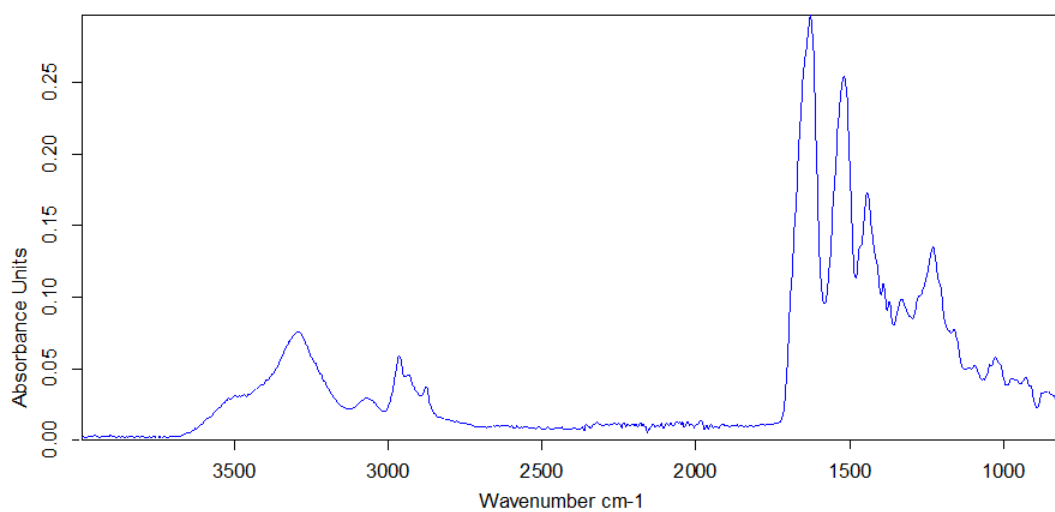
1-MALDI- TOFVKVx24



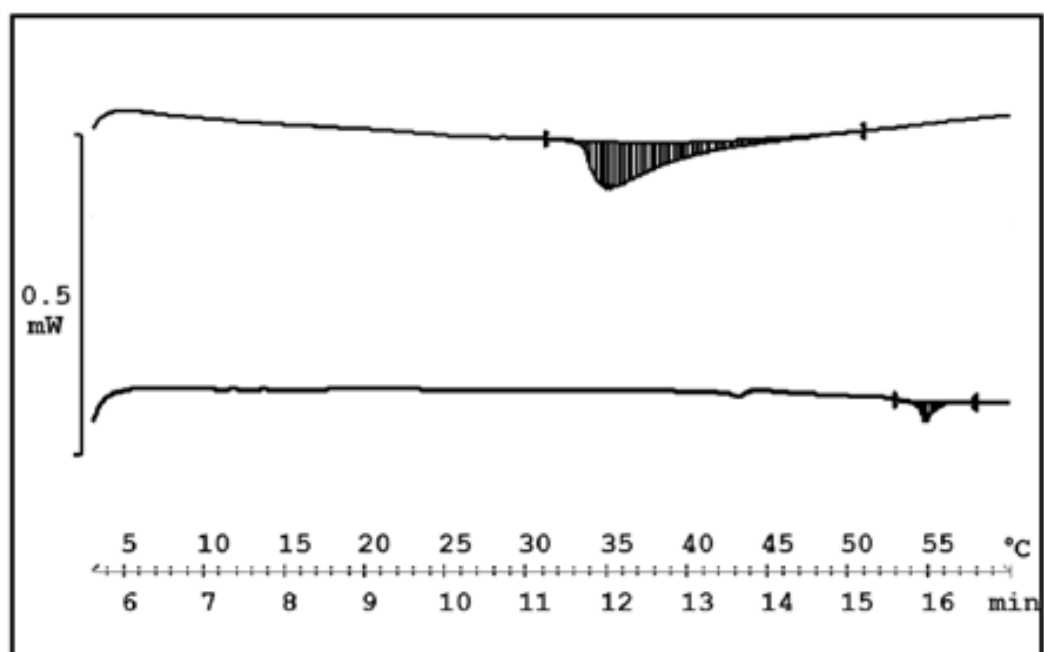
2- RMN ^1H VKVKx24



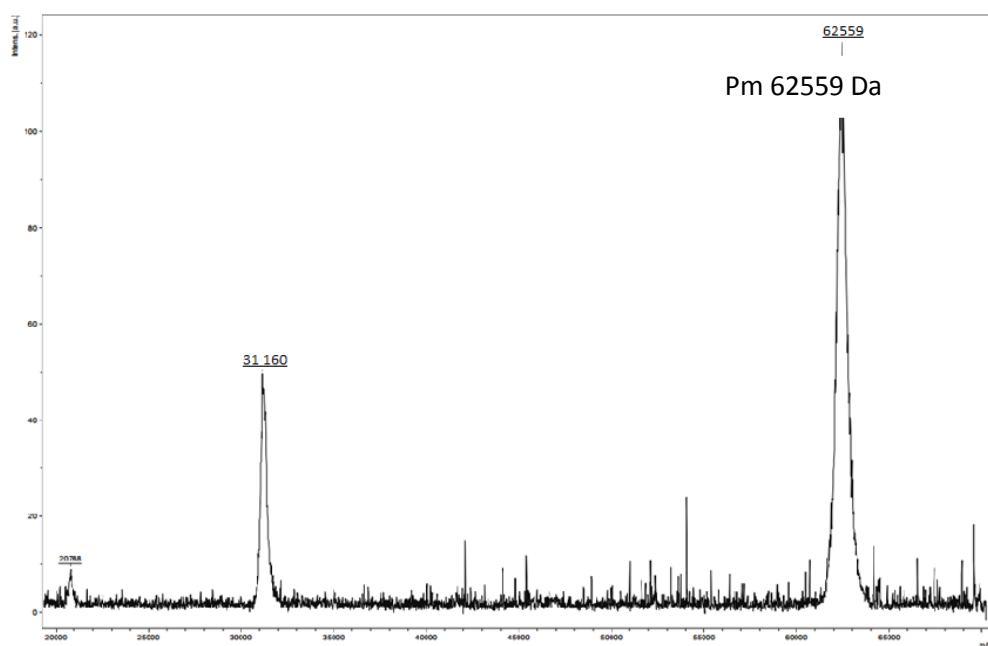
3-FTIR VKVx24



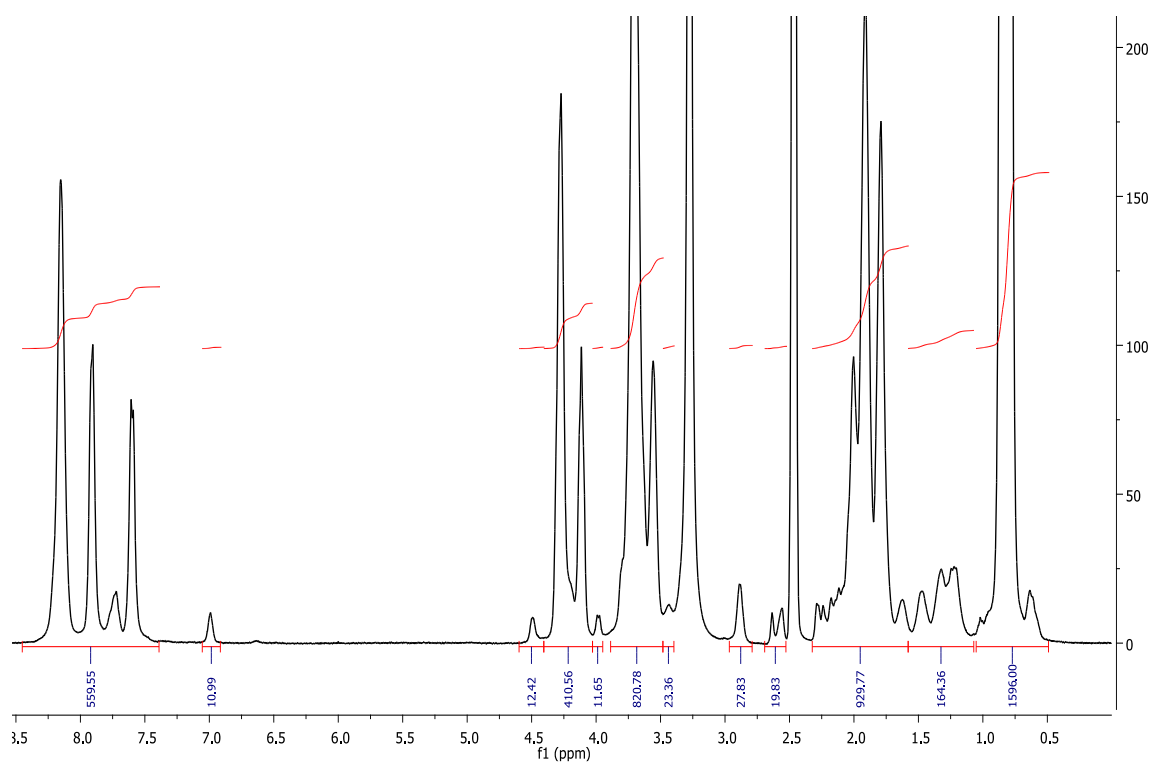
4-DSC VKVx24



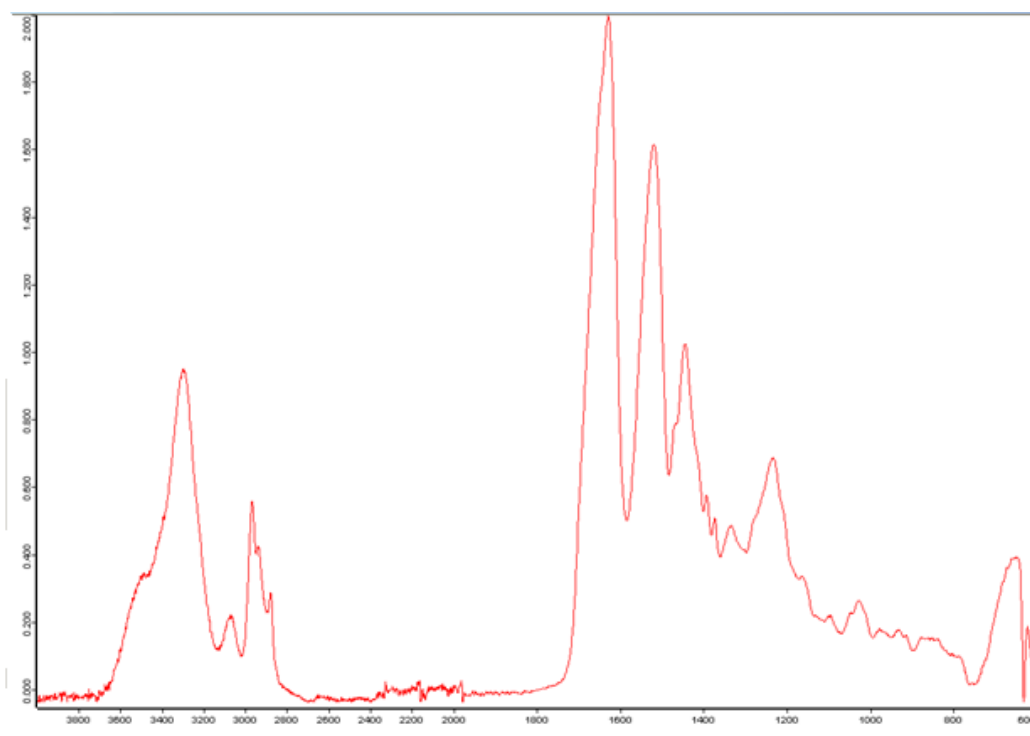
5- MALDI-TOF VKV-ciclo



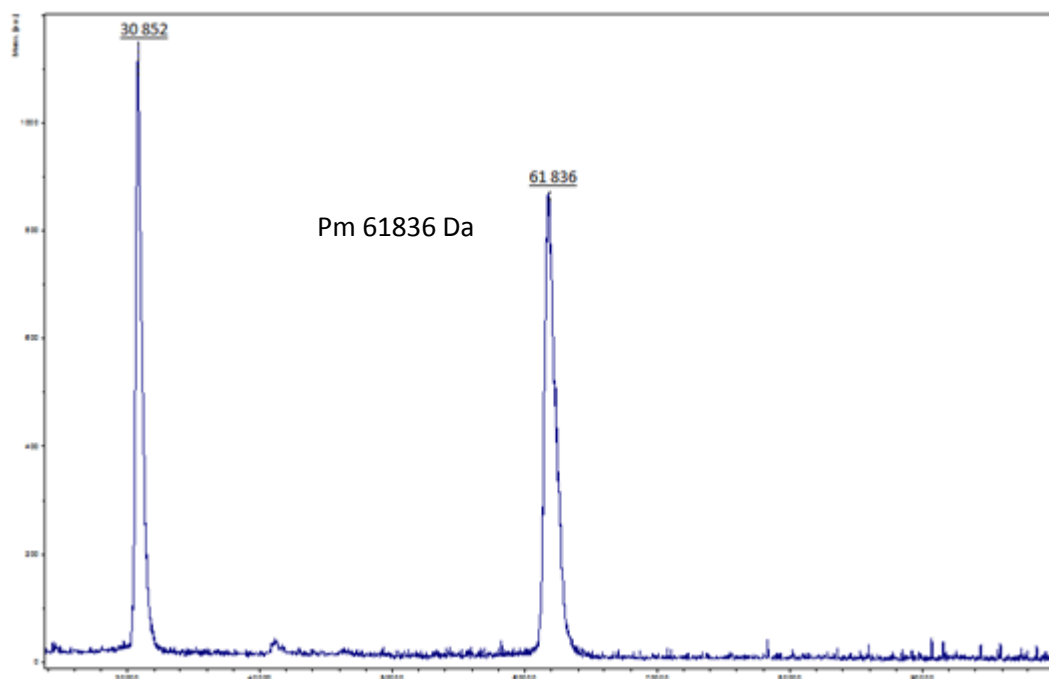
6-RMN VKVK-ciclo



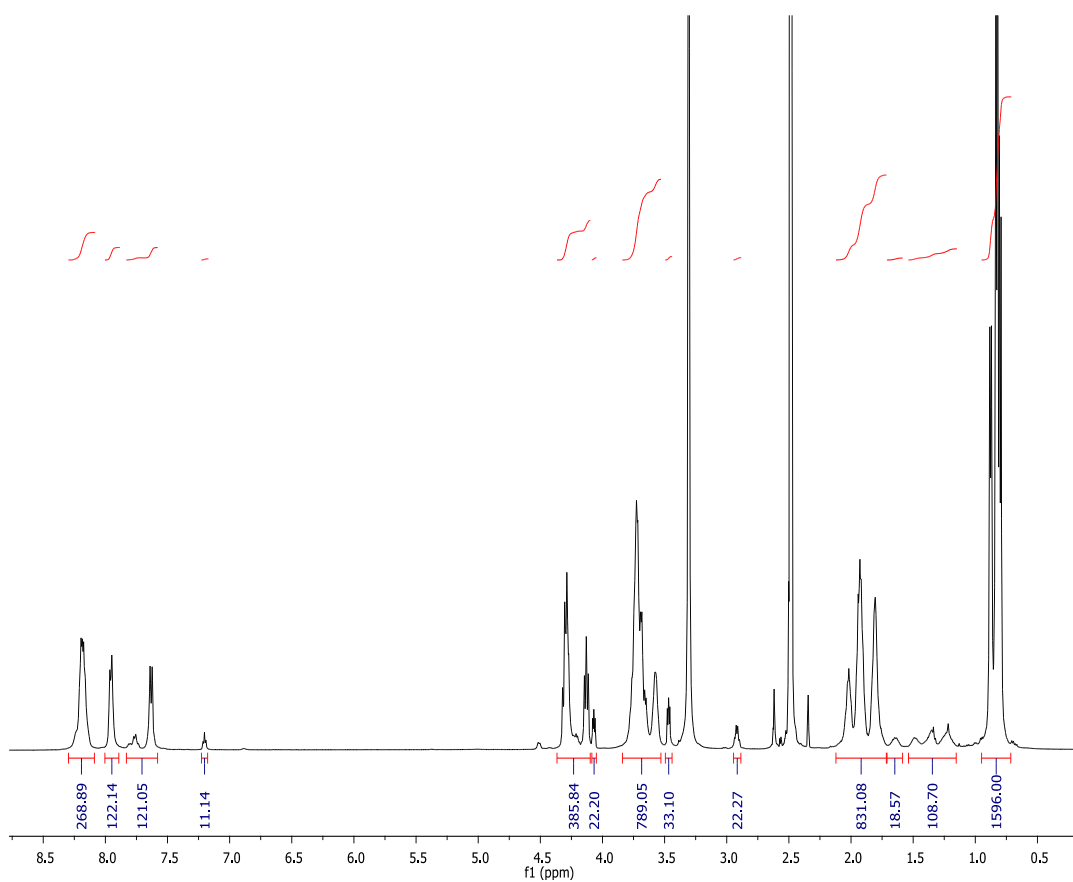
7-FTIR VKV-ciclo



8-MALDI-TOF VKV-N₃



9-RMN ¹H VKV-N₃



10-FTIR VKV-N₃

