



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

Grado en Química

**Producción y caracterización de polímeros recombinantes tipo  
elastina para terapias génicas dirigidas**

*Autora: Sandra Rodríguez Sufuentes*

*Tutor/es: Dr. Francisco Javier Arias Vallejo*

*Sara Escalera Anzola*



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el fin de una etapa en la que he podido aprender tanto en muchos ámbitos. Tengo a mucha gente a la que agradecer, tanto a las personas que empezaron conmigo esta etapa y se han mantenido, como a las personas que he encontrado gracias a esta etapa. Sin todos vosotros no habría llegado hasta aquí.

A mi tutora Sara, por guiarme y ayudarme en todo momento, y por ser más que una tutora, una amiga, con la que he podido tanto reír como llorar. Sin ti no habría sido posible nada de este trabajo, y nunca podré llegar a agradecerte todo lo que mereces.

A mi tutor Javier por permitirme la oportunidad de aprender tanto y tener tantísima paciencia conmigo, con mis agobios y mis “en plan”.

A toda la gente que forma y ha formado parte del laboratorio en lo que he estado ahí, y de la que he podido aprender mucho, en especial a Andrea que ha estado en esta última etapa y con la que he compartido risas y desgracias, y a Alessandra.

A los técnicos del LTI, en especial a Javier, por ayudarme tanto con las técnicas que eran completamente nuevas para mí.

A mis amigos y amigas, que habéis hecho toda esta etapa mucho más divertida, y que me habéis ayudado en todo lo que podíais y más.

A Kevin, que es probablemente la persona que más me ha aguantado todo este tiempo, y que ha sido un pilar fundamental para mí durante estos años.

A mis padres, abuelos y hermana, que me han soportado tantísimo todos estos años, y en especial este último, y que sin su apoyo y amor no habría llegado aquí. Gracias sobre todo por confiar más en mí que yo misma en muchos momentos.

*“Soy de las que piensan que la Ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es solo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”*

Marie Curie

# ÍNDICE

1. Resumen.....	6
2. Introducción.....	7
2.1 Biología molecular y Biomateriales Recombinantes:.....	7
2.2 Elastina:.....	8
2.2.1. Polímeros tipo elastina (ELPs).....	8
2.2.2 Polímeros recombinantes tipo elastina (ELRs).....	9
2.3 Poliplexos.....	10
2.4 Fragmentos de anticuerpos: scFv.....	10
2.5 EpCAM y su papel en el cáncer:.....	11
2.6. Terapia génica dirigida: una técnica molecular para el tratamiento de enfermedades.....	12
3. Objetivos.....	13
4. Materiales y métodos.....	14
4.1. Materiales.....	14
4.1.1 Reactivos químicos.....	14
4.1.2 Materiales de Biología Molecular:.....	15
4.1.3 Enzimas.....	15
4.1.4 Kits para el tratamiento de DNA. Purificación y extracción de DNA.....	16
4.1.5 Disoluciones tamponadas.....	17
4.1.6 Disoluciones de tñido:.....	18
4.2 Métodos.....	18
4.2.1 Electroforesis en gel.....	18
4.2.2 Purificación de DNA plasmídico.....	22
4.2.3 Digestión de DNA mediante enzimas de restricción.....	22
4.2.4 Identificación y análisis de los fragmentos de DNA.....	23
4.2.5 Determinación y análisis de la concentración y pureza de las muestras de DNA.....	23
4.2.6 Crecimiento colonias bacterianas en placas de LB-Agar.....	24
4.2.7 Preparación de muestras de electroforesis para SDS-PAGE. Preparación de muestras para la selección de colonias.....	25
4.2.8 Bioproducción de polímeros recombinantes.....	27
4.2.9 Lavado y ruptura de las células.....	29
4.2.10 Purificación de polímeros recombinantes.....	31
4.2.11 Caracterización físico-química del polímero recombinante.....	32
5. Resultados y discusión.....	38
5.1 Bioproducción de scFv(EpCAM)-VOK-H <sub>6</sub> . Proceso y optimización.....	38

<b>5.2 Purificación de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub></b> .....	41
<b>5.3 Purificación de DNA plasmídico</b> .....	43
<b>5.4 Caracterización de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub></b> .....	44
<b>5.4.1 Caracterización físico-química</b> .....	45
<b>5.4.2 Caracterización funcional de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub></b> .....	48
<b>5.5 Caracterización del poliplexo</b> .....	51
<b>5.5.1 Caracterización físico-química del poliplexo</b> .....	51
<b>5.5.2 Caracterización funcional del poliplexo</b> .....	56
<b>6. Conclusiones</b> .....	57
<b>7. Perspectivas de futuro</b> .....	57
<b>8. Bibliografía</b> .....	58
<b>9. Abreviaturas</b> .....	60
<b>10. Anexos</b> .....	62
<b>Anexo 1</b> .....	62
<b>Anexo 2</b> .....	64
<b>Anexo 3</b> .....	65
<b>Anexo 4</b> .....	65

## 1. Resumen

La elastina es una proteína de gran importancia e interés cuyas propiedades elásticas y resistentes son de gran utilidad para el desarrollo de nuevos biomateriales, como los polímeros recombinantes tipo elastina (ELR). Estos biopolímeros cuentan con una serie de características, como su elevada biocompatibilidad, que les hace ideales para aplicaciones biomédicas, como el transporte de terapias génicas dirigidas.

En este trabajo se ha producido y purificado el ELR scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, cuya secuencia de aminoácidos le permite formar poliplexos mediante la complejación de moléculas de DNA plasmídico terapéutico. Tanto al ELR como al poliplexo se les ha realizado una caracterización físico-química y funcional con diferentes técnicas: electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectroscopia de masas (MALDI-TOF), inmunoensayo Western-Blot, ELISA, dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía de fuerza atómica (AFM) y espectroscopia de RMN ordenada por difusión (2D DOSY NMR).

## Abstract

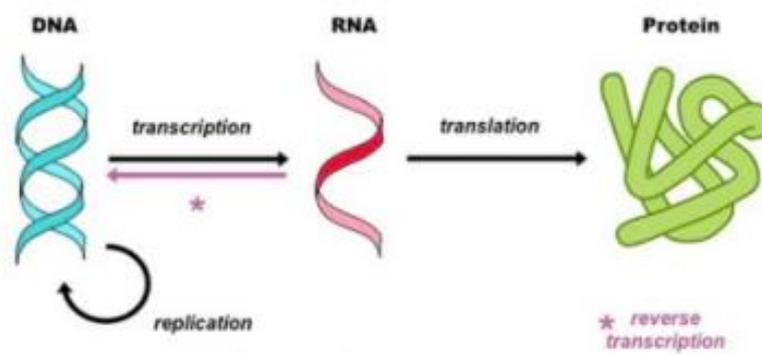
Elastin is a protein of great importance and interest whose elastic and resistance properties can be exploited in the development of new biomaterials, such as elastin-like recombinamers (ELR). These biopolymers have several characteristics, such as their high biocompatibility, which makes them ideal for biomedical applications, for example their use as carriers for targeted gene therapies.

In this work we have produced and purified the ELR scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, whose amino acid sequence enables it to form polyplexes through the complexation of therapeutic plasmid DNA molecules. Physicochemical and functional characterization was performed to both the ELR and the polyplex using different techniques: polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), mass spectroscopy (MALDI-TOF), Western-Blot immunoassay, ELISA, dynamic light scattering (DLS), atomic force microscopy (AFM) and diffusion-ordered NMR spectroscopy (2D DOSY NMR).

## 2. Introducción

### 2.1 Biología molecular y Biomateriales Recombinantes:

La Biología Molecular es un dominio de la Biología que estudia la función, estructura y composición de los componentes moleculares principales de la célula: proteínas, ácidos nucleicos, glúcidos y lípidos. Su dogma principal, representado en la ilustración 1, está basado en la forma en la que se transmite el flujo de la información genética: El DNA (ácido desoxirribonucleico) es el encargado de guardar y transmitir la información, que luego se transcribe a RNA (ácido ribonucleico), para acabar traduciéndose a proteínas.



*Ilustración 1-Representación del dogma de la Biología Molecular*

Los biomateriales se definen como aquellos materiales (naturales o sintéticos) cuyo fin es la fabricación de dispositivos que puedan reemplazar una parte o función del cuerpo de forma fiable y segura. Para que estos biomateriales sean fiables y seguros, deben cumplir unos requisitos: que sean químicamente inertes y estables, que no sean tóxicos, ni puedan causar rechazo inmunológico, que tenga propiedades mecánicas adecuadas para la función que van a desempeñar, y que sea relativamente económico y fácil de fabricar para así poder producirlo a gran escala [1]. Dentro de estos biomateriales, se encuentran los polímeros [2], los cuales toman una gran importancia dentro de la investigación en las terapias génicas dirigidas como vehículos.

Un polímero es cualquier sustancia natural o sintética, compuesta por la repetición de unidades más simples conocidas como monómeros. Un ejemplo de polímero natural que forma parte de nuestro organismo son el DNA, constituido por nucleótidos, o las proteínas, constituidas por aminoácidos [3]. Entre las proteínas pertenecientes a nuestro organismo, encontramos la elastina, la cual proporciona elasticidad a los tejidos de los vertebrados [4].

## 2.2 Elastina:

La elastina (del griego elast(o) que significa “golpeado”, “dúctil” e in(a) “sustancia” [5]) es una proteína perteneciente al grupo de las holoproteínas, dado que está compuesta por aminoácidos enteramente. Se trata de un biopolímero insoluble muy duradero, compuesto por un 90% de aminoácidos apolares, lo que le dota de una elevada hidrofobicidad. Se han descrito varias secuencias de aminoácidos para describir la estructura primaria. La secuencia más frecuente en esta proteína es Valina-Prolina-Glicina-Valina-Glicina, VPGVG. Un aminoácido natural que no está presente en esta secuencia pero que tiene una gran importancia es la lisina.

La función de la elastina es proporcionar elasticidad y resistencia a muchos tejidos de los vertebrados tales como la piel, los pulmones y los vasos sanguíneos. Sus redes de fibras elásticas se forman gracias al autoensamblaje entre las lisinas de su precursor monomérico, la tropoelastina, en la matriz extracelular durante la elastogénesis en su fase principal, a través de la acción de la enzima lisil oxidasa. Estas fibras son muy duraderas, gracias a las características intrínsecas de este precursor monomérico, y posibilita los ciclos de relajación y estiramiento repetidos en un medio hidratado [6][4][7].

Las fibras de elastina tienen dos posibles plegamientos, uno desenrollado, desplegado, y otro completamente enrollado, plegado, pudiendo pasar de una a otra mediante una transición. Esta propiedad es la que hace adecuados a los péptidos similares a la elastina (ELP) para poder usarlos como biomateriales [6].

### 2.2.1. Polímeros tipo elastina (ELPs)

Los polímeros tipo elastina (*elastin-like-polymers*, ELPs) son un tipo de biopolímeros artificiales pertenecientes a los biopolímeros termosensibles. Como su propio nombre indica, son polímeros derivados de la elastina. Por lo tanto, algunas de sus características son debidas a esta proteína, como por ejemplo su elasticidad, biocompatibilidad o su resistencia [8][9].

Su secuencia está basada en la de la elastina natural, que consiste comúnmente en repeticiones del péptido VPGVG: los ELPs se han biosintetizado generalmente como  $(VPGXG)_n$ , siendo X cualquier aminoácido natural o artificial menos la prolina [10].

Los polímeros con esta secuencia son funcionales, presentan un comportamiento inteligente. Esto significa que van a tener transiciones de fase reversibles, entre la forma plegada, enrollada, y la forma desplegada, dependientes de algunos factores tales como la temperatura o el pH. Estas transiciones también van a estar subordinados al peso molecular y a los aminoácidos que compongan el polímero y a la concentración que haya en solución. Volviendo a la dependencia con la temperatura, los ELPs

presentan una Transición Inversa con la Temperatura (ITT, del inglés *Inverse Temperature Transition*) de tal forma que a una temperatura inferior a su Temperatura de Transición  $T_t$ , las cadenas poliméricas de los ELPs van a estar desordenadas, desplegadas, mientras que, si se supera esta  $T_t$ , estas cadenas se plegaran hidrofólicamente, ensamblándose para dar estructuras más grandes. Es importante remarcar la conservación de la transición inversa con la temperatura al fusionar el polímero tipo elastina a otra proteína, lo cual lo va a hacer muy interesante en aplicaciones biomédicas, como el suministro de fármacos mediante la construcción de biomateriales de escala nanométrica, ya que puede “programarse” la temperatura de transición de cada polímero según su aplicación [8][9][11].

Otras características que le dotan de interés para aplicaciones biomédicas junto con las temperaturas de transición, son: el hecho de que se puede construir un ELP con un peso molecular determinado según lo que se necesite, puesto que este será un parámetro a tener en cuenta si su aplicación es la de transporte de fármacos, al influir en la vida de este. También su gran biocompatibilidad es muy interesante: el sistema inmune no va a generar ningún rechazo hacia los ELPs, puesto que los confunde con la elastina natural y no es capaz de distinguirlo de esta. Además, los productos que generan estos polímeros tipo elastina son aminoácidos simples y naturales fácilmente biodegradables [10].

### 2.2.2 Polímeros recombinantes tipo elastina (ELRs)

Un método de sintetizar ELPs simple y eficaz es el uso de bacterias productoras para llevar a cabo una síntesis recombinante de estos. El resultado de esta estrategia son los ELRs (*Elastin-Like Recombinamers*).

La síntesis recombinante tiene la ventaja de permitir sintetizar estructuras complejas, o polímeros grandes con total control de la secuencia, puesto que con la síntesis química esto suponía un problema, ya que se obtenían mezclas estadísticas de polímeros con distinto peso molecular, es decir, de alta polidispersidad. Al igual que los ELPs, están basados principalmente en la repetición del pentapéptido VPGXG, donde X es cualquier aminoácido exceptuando a la prolina. Al estar inspirados en la secuencia de la elastina, mantienen sus propiedades elásticas y su capacidad de autoensamblaje, y su respuesta a cambios térmicos, es decir, su transición de fase reversible con la temperatura. Por otro lado, al ser recombinantes, se pueden alterar estas secuencias fácilmente añadiendo grupos funcionales y modificando algunas propiedades mediante métodos de DNA recombinante, como el comportamiento térmico, que va a permitir ajustar esa temperatura de transición  $T_t$  (explicada en el punto 2.2.1) de forma más precisa. Estos biopolímeros, gracias a estas características tienen un futuro muy prometedor como materiales para aplicaciones biomédicas, como por ejemplo administración de fármacos en terapia génica dirigida [12][13].

## 2.3 Poliplexos

Los poliplexos son un tipo de vectores no virales químicos (esto se explica más extensamente en el apartado 2.6), que surgen por la conjugación de un polímero (generalmente catiónico, como por ejemplo la polietilamina (PEI), la poli-L-lisina (PLL), la poliamidoamina (PAMAM) y el polimetacrilato de 2-dimetilaminoetilo (PDMAEMA) con ácidos nucleicos, a través de interacciones electrostáticas. Estos van a permitir una entrega segura y eficaz de los genes en la terapia génica, dependiendo esta eficacia de la capacidad que tiene el polímero de condensar al DNA [14].

Los poliplexos catiónicos pueden ser de diferentes longitudes, estados geométricos, con distintos grupos funcionales y en procesos relativamente flexibles.

Una ventaja que tienen los poliplexos, es que, al tratarse de sistemas no virales, no presentan posibles respuestas inmunológicas como es el caso de los sistemas virales. Esto les convierte en un sistema ideal para la dosificación de genes [14].

Esto es lo que hace tan interesante la síntesis de un polímero tipo elastina para poder así formar un poliplexo estable, al conjugarse con un plásmido que contenga un gen determinado, que pueda ser usado como agente terapéutico en terapia génica para el tratamiento o la detección de enfermedades.

## 2.4 Fragmentos de anticuerpos: scFv

Los anticuerpos, como bien es sabido, son una parte del sistema inmune. Su función es la identificación y eliminación de sustancias extrañas que entran en el organismo, como toxinas, bacterias o virus. Están formados por 4 cadenas polipeptídicas, 2 cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H). Estas están unidas por puentes disulfuro y uniones no covalentes. Ambas cadenas están compuestas por dos partes, la parte constante (C), y la variable (V). Los dominios  $V_H$  y  $V_L$  son los encargados de la unión específica al antígeno, y son los que, mediante ingeniería de anticuerpos, se usan para la construcción de los scFv (*single chain variable fragment*) (Ilustración 2).

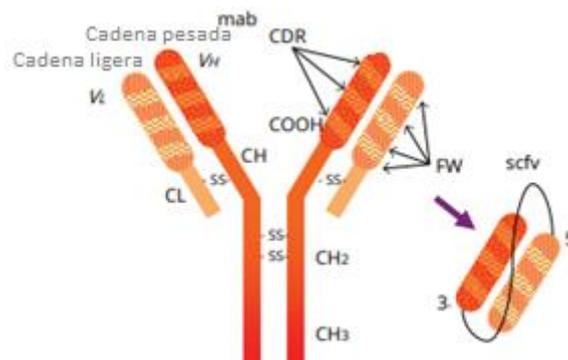


Ilustración 2- Esquema representativo de un anticuerpo (a la izquierda) y de un scFv (a la derecha)

Ambas regiones están unidas por una cadena peptídica flexible, muy fácil de expresar en *E. coli*. La longitud y composición de este conector es fundamental para conseguir el correcto plegamiento de la cadena polipeptídica [15].

Este formato de anticuerpo es capaz de retener la capacidad completa de unión al antígeno (aunque pierde su avidéz), lo que es muy útil para poder usar una molécula única contra ciertas enfermedades, especialmente el cáncer. Estos fragmentos de anticuerpos, también pueden usarse unidos a ELRs, para administrar genes terapéuticos de forma dirigida específicamente a un epítopo de tumor [15].

Los scFv tienen la ventaja de que su tamaño inferior a los anticuerpos, les permite llegar a los epítomos de los antígenos menos accesibles. Además, respecto a los anticuerpos originales, tienen una mejor capacidad de penetrar en el tumor y de forma más uniforme, una eliminación sanguínea en menor tiempo, así como una inmunogenicidad inferior [15].

## 2.5 EpCAM y su papel en el cáncer

EpCAM, también conocido como GA733-2, KSA o antígeno 17-1A, es una glicoproteína transmembrana de tipo I, compuesta por 314 aminoácidos. Está formada por tres dominios: un dominio extracelular (EpEX), un dominio transmembrana único y un dominio intracelular (EpICD). Se trata de una molécula de adhesión de células epiteliales, aunque también cumple funciones como la señalización celular, proliferación, diferenciación, formación y mantenimiento de la morfología de los órganos [16] [17].

Además de estas funciones, EpCAM desempeña un papel en los tejidos tumorales epiteliales, en los cuales esta sobreexpresada, promoviendo la proliferación celular. Sin embargo, a pesar de que se encuentre en una gran cantidad de carcinomas, no hay muchos estudios que hayan estudiado su grado de expresión a nivel clínico [16].

Inicialmente, se identificó como un antígeno que estaba asociado a tumores debido justamente a su sobreexpresión en los tumores epiteliales, y actualmente se considera que es un marcador de gran importancia de carcinomas.

Por otro lado, como se ha dicho anteriormente, EpCAM está presente en la formación y en las funciones de estructuras adhesivas y su polaridad, pero también está sobreexpresado en tejidos tumorales, en los que se pierden las estructuras adhesivas y la polaridad celular. Esto es contradictorio, lo que hace que EpCAM tenga un papel importante en la investigación de nuevas estrategias contra el cáncer, si se consigue entender claramente sus funciones en cánceres y en tejidos normales, y lo convierte en objetivo de terapia génica dirigida con scFv. Este tipo de terapias con anticuerpos lleva siendo investigada desde 1980, y se ha demostrado su potencial en cánceres con sobreexpresión de

EpCAM. Un ejemplo de este tipo de terapias, fue llevada a cabo por R. N. Souleri en sus investigaciones, en los que construyó un scFv contra el dominio extracelular (EpEX) de EpCAM, dando lugar a una estrategia exitosa [16][18][19].

## 2.6. Terapia génica dirigida: una técnica molecular para el tratamiento de enfermedades

La terapia génica usa genes para tratar enfermedades, de tal forma que permite introducir un gen directamente en la célula del paciente. Hay diferentes enfoques con respecto al uso de esta terapia, como por ejemplo: inactivar o reemplazar el gen defectuoso causante de la enfermedad por uno sano, o introducir genes nuevos en la célula cuya finalidad sea la protección de esta [20].

Este tipo de terapia se puede llevar a cabo tanto en células somáticas, como en células germinales, aunque solo se acepta la primera, dado que solo afecta a la persona con la que se usa este tratamiento, mientras que en las segundas se pasaría a la descendencia [21].

Lo que tienen en común estos enfoques son sus tres elementos claves:

- El material génico a transferir, es decir, el gen que codifica la proteína terapéutica específica.
- El método de transferencia, basado en un sistema de administración de genes que se encarga del control de la administración del gen en la célula diana. El éxito de este depende de que el gen se mantenga estable en la célula.
- El tipo celular que incorporará el material genético [20][22].

En la terapia génica hay dos pasos críticos: transferir los genes a las células dianas, paso conocido como transfección, y su posterior expresión.

Para la administración de genes, existen dos sistemas, los virales y los no virales.

- Los virales, utilizan virus que gracias a su capacidad de introducir su material genético en la célula huésped pueden infectarla y utilizarla para poder replicar su propio material genético. Es importante recalcar que no son capaces de reproducir su enfermedad en el paciente, ya que se trata de virus modificados. Un ejemplo de estos vectores son los adenovirus o los retrovirus. Estos vectores tienen el inconveniente de que únicamente se integran en células en fase de división, y de que pueden inducir mutaciones si se insertan aleatoriamente en el genoma celular [20][22].
- Los no virales pueden dividirse en métodos químicos y físicos. En los físicos encontramos la inyección con aguja del gen, inyección de DNA balístico, sonoporación, fotoporación, magnetofección e hidroporación. Los sistemas químicos, que son los que nos interesan en este

caso, suelen entrar en las células por endocitosis, y están basados en dos vías, los liposomas y los polímeros. Los basados en liposomas usan lipoplexos, que se forman espontáneamente al mezclarse el DNA cargado negativamente con el liposoma cargado positivamente. En los polímeros catiónicos, al estar cargados positivamente, interactúan con el DNA cargado negativamente y forman poliplexos. Tienen la ventaja sobre los anteriores de tener menos posibilidades de provocar la respuesta inmune [20][22].

En un inicio, el fin de la terapia génica era el tratamiento de enfermedades genéticas debidas a la ausencia de un gen, de tal forma que se buscaba sustituir el gen alterado por el gen normal. Este era el caso de algunas enfermedades como la distrofia o la fibrosis quística. Más tarde se comprobó que podía ser usado con otras enfermedades tales como el cáncer [21].

Piña *et al.*, en su artículo “*A double safety lock tumor-specific device for suicide gene therapy in breast cancer*” habla justamente sobre el uso de la terapia génica en el cáncer de mama. Esta terapia tiene la ventaja de que ofrece tratamientos para eliminar tumores sin provocar daños en el tejido sano. A pesar de que la mayoría de las investigaciones se han realizado con vectores virales, se ha avanzado mucho en el uso de vectores no virales, con polímeros convencionales como polietilamina (PEI), o polietilenglicol (PEG), o con polímeros recombinantes tipo elastina (ELRs), ya que tienen una gran biocompatibilidad y propiedades inteligentes [23].

### 3. Objetivos

Los ELRs tienen un gran futuro en la terapia génica dirigida, ya que como se ha explicado, poseen una gran biocompatibilidad y comportamiento inteligente. Con la intención de explotar estas propiedades, en este trabajo se va a llevar a cabo la bioproducción del polímero scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> y su utilización para la formación de un poliplexo complejando plásmido mediante interacciones electrostáticas para su posterior uso como vehículo de terapia génica.

Para ello, se lleva a cabo el siguiente plan de trabajo:

- Producción del ELR scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> y su purificación mediante cromatografía de afinidad.
- Caracterización físico-química y funcional del recombinámero scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, mediante distintas técnicas: Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectroscopia de masas (MALDI-TOF), inmunoensayo Western-Blot, microscopia de fuerza atómica (AFM), resonancia magnética nuclear (RMN) y ELISA.
- Formación de un poliplexo con la complejación del plásmido pCMVmKate2.
- Caracterización física y funcional del poliplexo mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y ELISA.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1 Reactivos químicos

A continuación, se muestra una lista ordenada alfabéticamente de los distintos reactivos químicos usados en este trabajo obtenidos de varios suministradores y con un alto grado de pureza. Su papel experimental será explicado a lo largo del trabajo:

-6X-HisTag Monoclonal Antibody(His-H8), HRP	-Glicerol
-Ácido acético	-Glucosa
-Ácido clorhídrico, HCl	-Green buffer fast digest 10x
-Ácido etilendiaminotetraacético, EDTA disodium	- Guanidina-HCl
-Ácido sulfúrico cdo, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-Imidazol
-Albúmina sérica bobina, BSA	-Kanamicina
-Ampicilina	-Kit de sustrato de DAB Pierce™
-Azul de bromofenol	-Leche desnatada en polvo
-Azul de Coomasie	-Prestained Protein Ladder
-Benzimidina hydrochloride hydrate 98%	-Metanol
-Bicarbonato sódico, NaHCO <sub>3</sub>	-NZY-Bluesafe: marcador de proteínas
-β-mercaptoetanol	-O-Phenylenediamine Dihydrochloride Stable peroxide, OPD
-Butanol	-Persulfato amónico, PSA
-Carbonato sódico, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-Poliacrilamida
-Cloruro de sodio, NaCl	-Biotin-Protein L
-Cloruro potásico, KCl	-SeaKem® LE Agarosa
-Ditiotreitol, DTT	-Stable Peroxide Substrate Buffer 10x
-DNA Marker: NZY DNA Ladder III	-Streptavidine-HRP
-Dodecilsulfato Sódico, SDS	-Tetrametilendiamina, TEMED
-EpCAM/Trop1, His, Human	-Tris(hidroximetil)aminometano; Tris

#### 4.1.2 Materiales de Biología Molecular:

##### 4.1.2.1 Medios de cultivo bacteriano:

Las bacterias utilizadas para llevar a cabo la producción del polímero son las BLR(DE3) *Competent Cells* (Novagen). Estas requieren para su correcto funcionamiento medios de cultivo específicos. La preparación y utilización de estos medios se han llevado a cabo según los protocolos optimizados por el fabricante para así obtener el mayor rendimiento y se esterilizan 15 min a 121°C. Los medios utilizados son los siguientes:

- **LB-Agar** (Formedium™): Este medio cuando este a una temperatura de 50-60°C, se vierte sobre placas de cultivo bacteriano en un volumen alrededor de 30mL. Una vez se enfríe solidificará. Se le puede añadir durante su preparación, o una vez este gelificado los antibióticos necesarios. Es el medio sólido en el cual van a crecer las colonias de bacterias.
- **TB (*Terrific Broth*)** (Formedium™): Está compuesto por 20g/L de triptona 24 g/L de extracto de levadura, 8mL/L de glicerol,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.017M y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.072M; pH 7.0. Este medio, junto con el LB AIM, es el elegido si se busca aumentar la expresión de los genes. Por ello es el seleccionado para producir nuestro polímero.
- **LB (*Lysogeny Broth*)** (Formedium™): Está compuesto por 10g/L de bacto triptona, 10g/L de NaCl, y 5g/L de extracto de levadura. Se usa en la fase de cultivo y crecimiento bacteriano
- **LB AIM (*Auto Induction Media Lysogeny Broth*)** (Formedium™): Está compuesto por 10g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 3.3 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6.8 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7.1  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 g/L glucosa, 2 g/L lactosa y 0.15 g/L  $\text{MgSO}_4$ ; pH 7.0. Este medio es el elegido si se busca aumentar la expresión de los genes, junto con el TB.

#### 4.1.3 Enzimas

Para este trabajo se han usado enzimas de restricción. Estas enzimas cortan DNA de doble cadena al reconocer un patrón de secuencias internas en la cadena, catalizando la reacción de hidrólisis de los enlaces fosfodiéster en las secuencias específicas que reconocen. Según justamente los tipos de secuencia que reconocen, hay cuatro familias de enzimas: las de tipo I, tipo II, tipo III y tipo IV.

- Tipo I y III: reconocen una secuencia específica, pero cortan a distancias variables de estas.

- Tipo II: reconocen secuencias palindrómicas (secuencias que se leen igual del extremo 5' a 3', que del 3' a 5' de la cadena complementaria), cortando siempre en el mismo sitio dentro de esta.
- Tipo IIS: similares a las de tipo II, pero no reconocen secuencias palindrómicas. Además, cortan fuera de las secuencias de reconocimiento.
- Tipo IV: solo cortan en cadenas de DNA modificado.

Las enzimas pueden realizar cortes en la doble hebra que generan extremos cohesivos, o extremos romos. En los primeros, dejan de dos a cuatro nucleótidos desapareados por extremo, y en el segundo, no deja bases desapareados, se corta en el centro del palíndromo. Generan fragmentos de DNA conocidos como fragmentos de restricción.

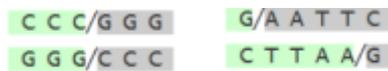


Ilustración 3--Ejemplo de extremo romo (izquierda) y extremo cohesivo (derecha)

Las enzimas que se usaron en este trabajo se utilizaron enzimas de tipo II:

Tabla 1-Función, tampón usado y secuencias diana de las enzimas EcoRI y HindIII

Enzima de restricción	Secuencia diana	Buffer o tampón	Uso en este trabajo
<i>EcoRI</i>	5' G A A T T C 3' 3' C T T A A G 5'	Green buffer Fast Digest 10x	Digestiones analíticas: Identificación de fragmentos de DNA: Linealización de plásmido
<i>HindIII</i>	5' A A G C T T 3' 3' T T C G A A 3'	Green buffer Fast Digest 10x	Digestiones analíticas: Identificación de fragmentos de DNA: Se usó junto con EcoRI para cortar el inserto mKate

#### 4.1.4 Kits para el tratamiento de DNA. Purificación y extracción de DNA

Para poder llevar a cabo la extracción de DNA plasmídico de las bacterias a través de métodos de Biología Molecular, y así poder trabajar con fragmentos de DNA conocidos, se ha utilizado el siguiente Kit:

- Nucleospin® Plasmid/Plasmid (NoLid) (*Macherey-Nagel*): gracias a este kit se puede purificar de pequeñas muestras de cultivo bacteriano (5-10mL), el DNA plasmídico. El fundamento teórico se explica en el apartado 4.2.2.1.

#### 4.1.5 Disoluciones tamponadas

En la siguiente lista, se describen las disoluciones usadas:

- **SDS-PAGE Tampón de carga 5x:** 10% (p/v) SDS, 25% (v/v) β-mercaptoetanol, 2% (v/v) azul de bromofenol (BPB), 50% (v/v) glicerol, 0.3 M Tris-base; pH 6,8.
- **Tampón de desarrollo de gel proteínas 5x:** Tris-base 0.12 M, glicerol 0.96, SDS 0.02M; pH 8.3. La disolución de SDS es preparada por separado, y añadida tras el ajuste de pH.
- **Tampón TAE 50x:** 40mM Tris-base, 19mM ácido acético, 1mM EDTA; pH 8.
- **Tampón de lavado celular:** Tris-Base 20mM, NaCl 140 mM; pH 8.
- **Tampón de lisis o de sonicado:** Tris-Base 20mM, PMSF 1mM; pH 8.
- **Tampón de equilibrado cromatográfico:** guanidina-HCl 3M, imidazol 10 mM, DTT 1mM en PBS; pH 7.
- **Tampón de lavado cromatográfico en gradiente 1:** guanidina-HCl 3M, imidazol 25 mM, DTT 10 mM en PBS; pH 7.4.
- **Tampón de lavado cromatográfico en gradiente 2:** imidazol 25 mM, en PBS; pH 7.4.
- **Tampón cromatográfico de elución:** imidazol 250 mM, en PBS; pH 7.4.
- **Tampón fosfato salino, PBS:** NaCl 173mM, KCl 2.7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8mM, pH 7.9.
- **MES tampón 10x:** 20 mM 2-(N-morpholine)- ethanesulfonic acid, NaCl 0.1 M; pH 5.
- **Tampón de transferencia para Western Blot:** 20% (v/v) Tampón de desarrollo 5x, 15% (v/v) metanol en agua destilada.
- **PBS-T:** 0.1% (v/v) Tween-20 en PBS 1x.
- **Tampón NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ELISA:** 0,23% (m/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,353% (m/v) NaHCO<sub>3</sub>. Se ajusta el pH a 9.5 con HCl 3%.
- **TBS 10%:** 2.4% (m/v) Tris-HCl, 0.56% (m/v) Tris-Base, 8.8% NaCl; pH 7.6.
- **TBST:** 0.05% Tween-20 en TBS 1x.

#### 4.1.6 Disoluciones de tñido:

##### 4.1.7.1 Geles de poliacrilamida:

- **Azul brillante de Coomassie:** Está compuesta por un 0.1% (v/v) de Azul de Coomassie, un 10% (v/v) de ácido acético, un 40% (v/v) de metanol y un 50% (v/v) de agua. Para llevar a cabo el desteñido de los geles, se usa una disolución compuesta por un 40% (v/v) de metanol, un 10% (v/v) de ácido acético, y un 50% (v/v) de agua.

##### 4.1.7.2 Geles de agarosa:

- **Disolución de tñido para gel de agarosa:** Para estos geles se usa una disolución al 0.005% de colorante SYBR Safe en tampón TAE 1x.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Electroforesis en gel

La electroforesis (electro, referido a electricidad, y forosis, del griego *phoros* que significa trasladar) es una técnica de separación de moléculas basada en la diferente migración de estas bajo la acción de un campo eléctrico. Consiste en la aplicación pues, de una corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen un gel. El gel es una sustancia semisólida formada por polímeros que constituyen una malla con un gran contenido de agua o solución tampón.

Al aplicar la corriente, las macromoléculas adquieren una velocidad constante, puesto que se equilibra la fuerza impulsora del campo eléctrico, con la resistencia que encuentra la macromolécula al desplazarse, es decir, con la fuerza de fricción.

La separación de las moléculas depende pues, de dos factores principalmente: la carga y la masa. Estas dos variables van a actuar conjuntamente.

En electroforesis se trabaja con dos tipos de gel:

- Gel de agarosa
- Gel de poliacrilamida

A continuación, se explicarán ambos geles, así como para que se usa cada uno.

#### 4.2.1.1 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE discontinuo)

SDS-PAGE significa SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, es decir, electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). El SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza la proteína y la dota de una carga neta negativa. Su finalidad es el análisis de proteínas. Este tipo de geles suelen usar un sistema tampón Tris discontinuo.

Estos geles son el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. Según la concentración y la proporción de ambas, se consiguen distintas porosidades, aunque menores que las de los geles de agarosa. Los otros componentes que forman estos geles son el tampón Tris, el SDS, el PSA (persulfato de amonio) que se encarga de formar en disolución radicales libres, que interactuarán con los grupos reactivos de la acrilamida y la bisacrilamida, y el TEMED (Tetrametil-etilen-diamina), un catalizador, que inicia la reacción de polimerización una vez se añade. Al final, se va a formar una malla, compuesta por una serie de cadenas muy larga de poliacrilamida, que se ha entrelazado con la bisacrilamida. La poliacrilamida se organiza de forma lineal, mientras que la otra forma brazos que unen las cadenas de la otra.

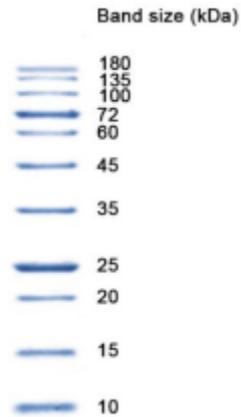
Los geles de poliacrilamida discontinuos constan de dos partes: el gel de compactación (o *stacking gel*) y gel de resolución (o *resolving gel*).

- El **gel de compactación** se prepara con una menor concentración de acrilamida para que tenga poros grandes para que los péptidos más grandes puedan migrar fácilmente. Esto permite que las proteínas en una muestra cargada se concentren en una banda apretada durante los primeros minutos de la electroforesis antes de ingresar a la porción de resolución de un gel.
- El **gel de resolución**, usa una concentración de acrilamida mayor, por lo que el tamaño de poro más pequeño del gel de resolución comienza a tener un efecto de tamizado, lo que resulta en la separación de péptidos por tamaño una vez las macromoléculas llegan a este gel.

Los geles de poliacrilamida pueden hacerse a diferentes porcentajes, como se ve en la tabla 13 (anexo 2).

En el presente trabajo se ha utilizado usado siempre un gel de resolución del 10%. Este porcentaje de elige según el peso molecular de la proteína.

Para poder realizar una semicuantificación de la proteína de interés, se necesita que haya un marcador de referencia compuesto por fragmentos protéicos con un peso molecular y cantidades conocidas. En este caso he usado el marcador NZY-Bluesafe®, que sigue el patrón que se ve a continuación (ilustración 4):



*Ilustración 4-Bandas con sus pesos correspondientes del marcador de referencia NZY-Bluesafe®*

El gel se forma dentro de un soporte, añadiendo primero el gel de resolución, y una vez este está gelificado, el gel de compactación. Antes de que gelifique, se añade un peine adecuado para formar los pocillos en los que se depositará la muestra. Este soporte se mete en una cubeta con tampón de desarrollo 1x.

La electroforesis se realiza a amperaje constante (25mA/gel) hasta que los colorantes de referencia que llevan tanto el marcador como las muestras, alcancen el final del gel, lo cual lleva una hora aproximadamente.

Por último, se lleva a cabo la tinción del gel con Azul de Coomassie. Una vez está teñida, es decir, no se distingue el color del gel del color del tinte, se destiñe con una disolución de desteñido especificada en el apartado 4.1.7.

Para poder ver el gel y observar así las bandas, se utiliza un transiluminador de luz blanca Gel Doc™ EZ Image, que permite también hacer fotografías de estos, y ver el porcentaje de banda y su peso molecular, para la caracterización. Para poder estudiar este último, hay que tener en cuenta la existencia de un retraso electroforético, debido a la lentitud de avance del ELR en el gel a causa de su elevada hidrofobicidad, que provocará que la banda aparezca a tamaños superiores a los reales.

#### 4.2.1.2 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

En el caso del DNA, plásmidos, fragmentos génicos o fragmentos resultantes de una digestión con enzimas de restricción, el gel que se usa es de agarosa

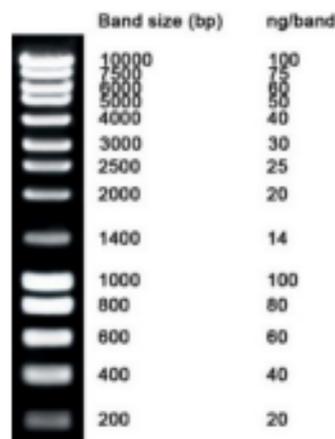
La agarosa es un polímero lineal de un peso medio de 12000Da compuesto de residuos alternantes de D -galactosa y 3,6 -anhidro - L -galactosa unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1→3) y  $\beta$  (1→4). Las cadenas del polímero de agarosa forman fibras helicoidales, que al solidificar forma una malla con

«poros» cuyo tamaño puede ser controlado mediante la concentración y tipo de agarosa. Podemos jugar mucho con estos geles, utilizando diferentes concentraciones iniciales de agarosa, o diferentes tipos de agarosa. Se emplean para separar moléculas de diferentes rangos con un peso molecular desde 20 pb hasta más de 20 Kpb. Estos geles se forman fundiendo la agarosa en tampón TAE 1x por en una temperatura entre 50º-60ºC. Este tampón tiene un pH de 8, valor en el cual los grupos fosfatos de DNA están cargados negativamente, y dado que este pH se mantiene durante todo el desarrollo de la electroforesis, la carga de todos los fragmentos de DNA será la misma. Es decir, la separación de las moléculas de DNA va a ser debida únicamente al tamaño de estas. Los fragmentos de mayor tamaño se encontrarán más cerca de los pocillos, y los más pequeños, más lejos.

Para la formación del gel se usa un formador, y una vez vertido sobre este, antes de que gelifique, se pone un peine para poder formar los pocillos en los que depositar la muestra. Para la electroforesis, estos geles se colocan en cubetas de electroforesis, sumergidos en el tampón TAE 1x, y se une a una fuente de alimentación con un cátodo y un ánodo. El DNA correrá desde el polo negativo al positivo, ya que, al tener la carga neta negativa, será repelido por el negativo, y atraído por el positivo. Estos geles se someterán a un voltaje fijo de 90V, durante 90 minutos.

La muestra de DNA se prepara añadiendo una sustancia que sirva para aumentar la densidad. Se suele añadir un colorante, una sustancia que permita seguir la migración, y un tampón. En este caso, se usó el Green Buffer 10x.

Al igual que con las proteínas, se necesita un marcador de referencia: el NZY Ladder III, que contiene 14 fragmentos de DNA de tamaños y cantidades conocidas (ilustración 5)



*Ilustración 5-Bandas con sus pares de bases correspondientes del marcador de referencia NZYLadder III*

#### 4.2.2 Purificación de DNA plasmídico

Para poder llevar a cabo la formación del poliplexo, es necesario tener el plásmido que se desea complejar con el ELR puro, es decir, tener la certeza de que el DNA usado es un único fragmento de secuencia conocida. Para este caso, interesa una purificación de DNA plasmídico procedente de cepas bacterianas (*E. coli*): Se busca la extracción y purificación del DNA plasmídico presente en el citoplasma de la bacteria. Para esto, se ha usado el Kit Nucleospin Plasmid QuickPure™ Macherey-Nagel™.

##### 4.2.2.1 Purificación con Protocolo NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid

Este tipo de purificación se basa en la lisis alcalina del cultivo bacteriano, siguiendo el esquema de la ilustración 6.

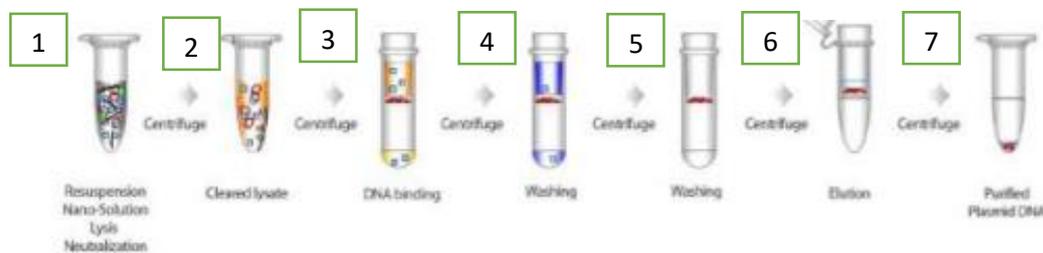


Ilustración 6-Esquema del procedimiento de purificación de plásmidos procedentes de cepas bacterianas. Las etapas son: 1- Lisis alcalina y neutralización; 2- Clarificación del lisado; 3- Extracción en fase sólida; 4-Eliminación de interferentes apolares; 5- Eliminación de interferentes polares; 6-Elución del DNA plasmídico purificado.

El paso previo a la purificación es el cultivo bacteriano en medio líquido en un volumen de 5mL, que se explica en el apartado 4.2.6. En este caso se seleccionan 4 colonias, en vez de las 8 para los screening de proteínas. El plásmido de interés es el pCMVmKate2, cuya resistencia es a la Kanamicina. Se realiza la purificación por el método de la lisis alcalina siguiendo el protocolo comercial NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid (ilustración 6).

Para medir la concentración del DNA plasmídico purificado, se usa *NanoDrop One<sup>c</sup>* (Thermo Scientific). Esto se explica en el apartado 4.2.5.

#### 4.2.3 Digestión de DNA mediante enzimas de restricción

La digestión es el proceso por el cuál una enzima de restricción con actividad endonucleasa, reconoce unas secuencias determinadas del DNA conocidas como secuencias diana, cortando esta secuencia de forma específica. Estas secuencias diana son secuencias cortas a menudo, y palindrómicas. Las enzimas de restricción usadas se explican en el apartado 4.1.3.

Las digestiones se pueden realizar con dos fines: analíticos y preparativos. En el primer caso, se trata de una identificación del tamaño de los fragmentos de DNA, para poder identificar si este fragmento es el deseado. Este es el que nos interesa en este trabajo, puesto que la digestión se ha llevado a cabo con el fin de ver si el plásmido tratado es el deseado y si está bien. El segundo caso, se lleva a cabo para recuperar y purificar el DNA contenido en la banda elegida.

En la ilustración 29, (anexo 3) podemos ver el mapa de restricción del plásmido de interés, y se pueden observar los puntos en este por donde cortan las dos enzimas usadas en este trabajo: *EcoRI* y *HindIII*. Las secuencias diana por las que cortan son explicadas en el apartado 4.1.3, en la tabla 1.

Con estas enzimas, se han llevado a cabo dos digestiones diferentes, una con *EcoRI* sola, y otra con *EcoRI + HindIII*. Es decir, a cada colonia diferente, se ha realizado dos digestiones, de la siguiente forma:

- En el caso de la digestión con *EcoRI*: En el eppendorf se añade 1  $\mu\text{L}$  del plásmido pCMVmKate, 0.5  $\mu\text{L}$  de la enzima *EcoRI*, 0.5  $\mu\text{L}$  de Green buffer y 3  $\mu\text{L}$  de agua mQ. En este caso, como se ve en el mapa de restricción, usando únicamente esta enzima, conseguimos la linealización del plásmido, con un tamaño total de 4684 pb.
- En el caso de la digestión con *EcoRI + HindIII*: En el eppendorf se añade 1  $\mu\text{L}$  del plásmido pCMVmKate, 0.5  $\mu\text{L}$  de la enzima *EcoRI*, 0.5  $\mu\text{L}$  de la enzima *HindIII*, 0.5  $\mu\text{L}$  de Green Buffer y 2.5  $\mu\text{L}$  de agua mQ. Usando ambas enzimas, se obtienen dos fragmentos, el correspondiente al inserto *mKate2*, (gen que codifica la proteína mKate2, una proteína fluorescente roja), con un tamaño de 700 pb, y el resto del plásmido, con un tamaño de 3984 pb.

#### 4.2.4 Identificación y análisis de los fragmentos de DNA

Para poder identificar los fragmentos de DNA explicados en el apartado 4.2.3, se realiza una electroforesis en gel de agarosa, que como ya se ha explicado en el apartado 4.2.1, nos permite separar los fragmentos únicamente por su diferente peso molecular.

El marcador de tamaño NZY Ladder III nos va a permitir hacer una identificación de los fragmentos, gracias a su contenido en bandas de DNA de tamaño perfectamente conocido, cumpliendo un papel de patrón comparativo (ilustración 7, apartado 4.1.2.1)

#### 4.2.5 Determinación y análisis de la concentración y pureza de las muestras de DNA

Una vez se ha purificado el plásmido, y hecho las digestiones e identificaciones para comprobar si estaba bien, el siguiente paso es el de determinar la concentración y la pureza de las muestras de

plásmidos. Para esto, se realiza un análisis de la absorbancia con el equipo *NanoDrop One<sup>c</sup>* (ThermoScientific), un espectrofotómetro de microgota, que permite realizar ensayos de determinar la pureza de muestras génicas con volúmenes del orden de 2 µL. La absorbancia se puede relacionar con la concentración según la ley de Lambert-Beer (ecuación 1):

$$A = \varepsilon * c * l$$

*Ecuación 1-Ley de Lambert-Beer*

Este espectrofotómetro mide en la región del UV-Visible completo, y usa dos lámparas para emitir la radiación: la lámpara de Deuterio para la radiación ultravioleta, y la de Wolframio para la del visible. Para poder seleccionar la longitud de onda deseada, consta de un monocromador, que consta de una rendija de entrada, un sistema dispersante (red de difracción) y una rendija de salida.

Este espectrofotómetro es capaz de evaluar las relaciones de absorbancia a dos longitudes de onda diferentes: se va a obtener dos índices de pureza, uno con relación A260/A280 (absorbancia a 260nm en relación a la corregida a 280nm), y otro con relación A260/A230 (absorbancia a 260nm en relación a la corregida a 230nm). Según los valores obtenidos, se puede evaluar la pureza según la tabla 14 (anexo 4).

Para llevar a cabo las medidas, primero se depositan 2µL de un blanco (en este caso agua mQ) con el fin de disminuir el ruido de fondo, disminuyendo también los límites de cuantificación (LOQ) para poder detectar concentraciones pequeñas con fiabilidad. Después se procede a medir la pureza de las muestras de DNA, con 2 µL también, analizando primero las muestras más diluidas (las de segunda elución obtenidas en la purificación del plásmido), y después las más concentradas (las de primera elución).

#### **4.2.6 Crecimiento colonias bacterianas en placas de LB-Agar.**

Para poder llevar a cabo la bioproducción del polímero scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, previamente se realiza el crecimiento de las colonias bacterianas transformadas con el plásmido que codifica al polímero en un medio sólido, y así poder hacer un primer screening (apartado 4.2.3) y seleccionar la colonia más productora. Con esta se llevará a cabo un segundo screening y con la colonia más productora de este, se iniciará la preparación de la bioproducción. Para esto, se utiliza un gel de LB-Agar en placas Petri. El LB es de por sí solo un medio rico en nutrientes en el que las colonias van a poder crecer.

Hay que tener en cuenta el tipo de gen de resistencia a antibiótico que tiene el plásmido que codifica la proteína de interés, con el cuál se transformó la bacteria previamente, ya que estas adquieren esa

resistencia. En el caso para el polímero de estudio scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, la resistencia es a la ampicilina, por lo que las placas de LB-Agar seleccionadas van a llevar este antibiótico.

Se sembró por agotamiento con la ayuda del mango de Kolle, a partir de un glicerol stock proveniente de una siembra realizada anteriormente con células competentes BLR transformadas con el plásmido p7-scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>. Estas placas se dejan durante la noche (es decir, entre 16-18 horas) a 37°C en una estufa boca abajo para evitar condensaciones y tapadas con papel de aluminio, para que puedan crecer las colonias.

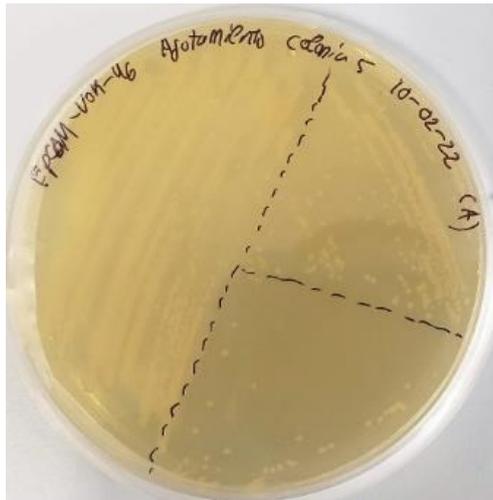


Ilustración 7-Ejemplo de una placa de LB-Agar donde se ha llevado a cabo una siembra por agotamiento

#### 4.2.7 Preparación de muestras de electroforesis para SDS-PAGE. Preparación de muestras para la selección de colonias

Como se ha explicado en el punto 4.2.2, para poder empezar la bioproducción, hay que llevar a cabo el crecimiento de las colonias bacterianas transformadas. Una vez este paso está hecho, hay que hacer un estudio de estas colonias mediante una SDS-PAGE, para poder seleccionar la más productora de estas, es decir, hay que hacer un primer *screening* de las colonias. Todos los procesos en los que se trabaja con cultivos bacterianos se llevaron a cabo en condiciones estériles en una campana de flujo laminar.

El *screening* empieza con la selección en la placa de diferentes colonias. Las colonias que se seleccionan tienen que cumplir una serie de requisitos: estar aisladas de otras colonias, no ser de diferentes formas y tamaños entre sí, y no tener satélites (estos son colonias de otras bacterias que crecen alrededor de las colonias que interesan, aprovechándose de la reducción de la presencia de antibiótico en su entorno).

Una vez se han seleccionado 8 colonias con estas características, se procede a picarlas en medio TB con ampicilina para que puedan crecer y producir el polímero en este medio líquido:

- Primero se hace una master mix: en un tubo tipo Falcon 50 se echan 45 mL de TB (5 mL por cada colonia que se vaya a picar más un control negativo que nos ayudará a ver si ha crecido algo o no), y 45  $\mu$ L de ampicilina (el antibiótico siempre se añade en una dilución 1:1000). Esto se reparte en 9 Falcon echando 5 mL en cada uno.
- Para picarlas, se esteriliza la punta del asa de siembra con fuego y se enfría en una zona de la placa Petri sin bacterias, se toca entonces la colonia seleccionada, y se lleva al medio líquido. Después la punta se vuelve a esterilizar y se repite el proceso con todas las colonias. El último Falcon con 5 mL de medio se deja sin sembrar como control negativo del crecimiento.
- Se llevan los 9 Falcon a un incubador que les mantiene a 37°C con agitación de 250rpm. Los Falcon van cerrados, pero con el tapón flojo y sujeto con cinta de carroceros, para que pueda haber intercambio de oxígeno. Se deja creciendo durante la noche(16-18h).

Al día siguiente, se separa en un tubo eppendorf 1 mL de cada una de estos Falcon con las colonias crecidas en medio líquido, para lavar las células y romperlas:

- El tubo se centrifuga a 13400 rpm durante 45 segundos. De esta forma vamos a separar las células del medio, en forma de pellet (las células) y el sobrenadante.
- El sobrenadante se descarta, y al pellet se le añade un mL de agua mQ, y se resuspende agitando con un vortex.
- Esto se vuelve a centrifugar, y se descarta el sobrenadante otra vez. Se vuelve a añadir un mL de mQ y se resuspende el pellet.
- Se centrifuga otra vez, y se descarta el sobrenadante. Esta vez, se resuspende en 200  $\mu$ L de mQ.
- De estos 200  $\mu$ L, se toman 20  $\mu$ L y se llevan a otro eppendorf que son específicos para hervir. A esto se le añaden 5  $\mu$ L de tampón de carga 5x. Los componentes de este están especificados en el apartado 4.1.5. De los componentes cabe destacar la función individual de cada uno: El SDS, como se ha explicado anteriormente es un detergente aniónico que va a desnaturalizar por completo a las proteínas, rodeándolas y dotándolas de carga neta negativa. El  $\beta$ -mercaptoetanol es un agente reductor, que, ayudado con las altas temperaturas alcanzadas en el siguiente paso, sirve para reducir los puentes disulfuro, separando así las subunidades de la proteína y permitiendo que se extiendan por efecto del SDS. El glicerol es necesario para aumentar la densidad de la muestra y que se pueda cargar en los pocillos. El azul de

bromofenol es un colorante utilizado para poder seguir el frente de la electroforesis y determinar cuándo ha acabado.

- Una vez añadido el tampón de carga, la muestra se hierve 5 minutos. Esto rompe la célula liberando los componentes presentes en ella. Después se centrifuga 5 minutos a 13400rpm.

Una vez se han llevado a cabo todos estos pasos, las muestras están preparadas para cargarse en un gel de poliacrilamida, junto con el marcador y un control negativo (una muestra proveniente de colonias de BLR, pero transformadas con otro plásmido) que permite saber cuál es nuestro polímero, comparando con las proteínas que se ven en este, y llevar así a cabo el SDS-PAGE, como se ha explicado en el apartado 4.2.1.

Una vez la electroforesis ha terminado, se tiñe con azul de Coomassie, y se destiñe con una disolución de desteñido. Después se puede hacer la foto con el equipo Doc™ EZ Image.

Para elegir la colonia más productora, tenemos que fijarnos en la cantidad de nuestro polímero con respecto a las proteínas propias de la bacteria. Queremos una colonia en la que se vea mucha cantidad de nuestro polímero, pero poca de las demás proteínas. Una vez se elige, se procede a un segundo screening con el fin de obtener las hijas de esta colonia más productora. Para este segundo screening, se toca la colonia elegida con el mango de Kolle, y se siembra por agotamiento, siguiendo a continuación el mismo proceso que con el primer screening. De esta se elige también la más productora, y con esta colonia se empieza el proceso de producción.

#### 4.2.8 Bioproducción de polímeros recombinantes

Una vez seleccionada la colonia más productora, se empieza con la Bioproducción del ELR. Este proceso tiene una duración de 3 días, en el cual se van preparando cultivos consecutivos, como vemos en la tabla 2.

*Tabla 2-Resumen de los diferentes cultivos que se realizan a lo largo de la producción*

<b>PREINÓCULO</b> <b>X1 Falcon</b> <b>Volumen recipiente: 50mL</b>	<b>INÓCULO</b> <b>X2 Erlenmeyer</b> <b>Volumen recipiente: 250mL</b>	<b>PRODUCCIÓN</b> <b>X14 Erlenmeyer</b> <b>Volumen recipiente: 2L</b>
-Colonia más productora -5mL LB -5µL Ampicilina -250µL glucosa 20% estéril	-100µL preinóculo -30mL LB -30µL Ampicilina -1.5mL glucosa 20% estéril	-5mL inóculo -250mL TB -150mL LB AIM -400µL Ampicilina

- Día 1: Preparación del preinóculo

Este cultivo se realiza al mediodía tarde, debido a las horas que tiene que estar el preinóculo en agitación y calor. Este proceso se realiza en condiciones estériles en campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.

En un Falcon de 50mL, se echan 5mL de LB, 5 $\mu$ L del antibiótico Ampicilina 100 mg/mL, y 250mL de glucosa 20%(m/v) estéril. La glucosa se añade para reprimir el operón Lac u operón de la lactosa de la célula: el operón es el conjunto de los genes estructurales y los promotores que regulan la expresión de estos genes. La bacteria prefiere a la glucosa como fuente de energía antes de a la lactosa. Al no usar la lactosa, no empieza a producir la bacteria, por lo que esta solo va a crecer en el medio sin llegar a producir. Es decir, la glucosa está inhibiendo la expresión génica actuando como represor de la traducción durante el crecimiento de la biomasa. Por último, se pica la colonia elegida como la más productora y se lleva a la disolución.

Esto se deja toda la noche en un incubador que mantiene la temperatura constante a 37°C y que agita a 250rpm. La agitación permite la oxigenación del cultivo.

- Día 2: preparación del inóculo e inoculación

El siguiente paso es transferir por la mañana a primera hora, a dos Erlenmeyer con 30mL de LB, 30 $\mu$ L de Ampicilina y 1.5mL de glucosa cada uno, 100 mL del preinóculo. Esto se deja toda la mañana a 37°C y 250 rpm en el incubador. Antes del siguiente paso se toman dos muestras de 1mL del inóculo para un seguimiento posterior del proceso de producción. A continuación, se realiza la inoculación, que debe realizarse a mediodía-tarde. Para esto, se toman 14 flask Erlenmeyer de dos litros. En cada uno, se añaden 250mL de TB, 150mL de LB AIM (esta mezcla se ha visto en experimentos anteriores que es óptima para esta producción), 400 $\mu$ L de Ampicilina, y 5mL del inóculo. Esto se deja toda la noche a 37°C y 250rpm en el incubador.

Preparar un preinóculo y luego un inóculo a partir de este, favorece el crecimiento de la biomasa, para tener la mayor cantidad de células posibles y conseguir más cantidad de producción.

- Día 3: Detención de la producción y lavado de células:

A las 8:00 de la mañana se toman 2 eppendorf con 1mL de la producción, para medir la absorbancia en un espectrofotómetro de 600nm. Se toma dos muestras porque una se centrifuga a 13400rpm durante 45 segundos, para separar sobrenadante del pellet, y usar el sobrenadante como blanco. Tanto el blanco como la muestra se diluyen 1:10(v/v) con agua destilada. Esta absorbancia se anota, ya que nos va a dar una idea del crecimiento de las bacterias, y si se encuentran en fase exponencial, o en fase estacionaria (ilustración 11), y así saber si la producción se puede parar o no. Pasados 30 minutos se repite el proceso, y si la

absorbancia no ha variado significativamente, significa que el crecimiento de la bacteria se encuentra en fase estacionaria, y la producción se para para proceder al lavado de células. Si ha variado mucho, se asume que la bacteria sigue en fase exponencial, por lo que se deja media hora más, y se toman otras dos alícuotas para poder volver a medir la absorbancia, así hasta conseguir que la absorbancia esté estable.

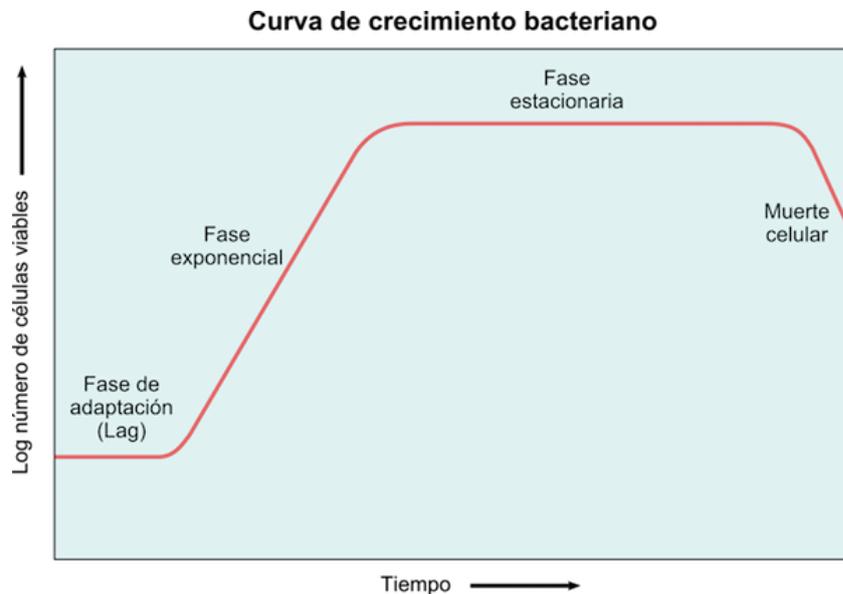


Ilustración 8-Curva de crecimiento bacteriano, donde se pueden visualizar las diferentes fases de esta: fase exponencial, fase estacionaria y la muerte celular [24].

#### 4.2.9 Lavado y ruptura de las células

Para poder obtener el polímero y purificarlo, primero hay que llevar a cabo un lavado de las células, y una posterior ruptura de estas. Primero, se lleva el contenido de la producción de los flask, a botes de centrífuga de 1litro. Esto se centrifuga a 4000rpm (rotor basculante Tx1000, Thermo Scientific™) durante 10 minutos a 4°C. Esto permite separar el sobrenadante del pellet celular. Descartamos el sobrenadante y el pellet lo resuspendemos con tampón de lavado 1x. Este proceso de lavado se repite hasta que el sobrenadante que se obtenga esté limpio, es decir, se vea incoloro y transparente.

Todo el proceso se lleva a 4°C, con el fin de minimizar la acción de las proteasas bacterianas, que provocan la degradación del polímero.

El siguiente paso es la ruptura de células. Para esto, primero se debe resuspender el pellet en buffer de sonicado, teniendo en cuenta para el volumen que se usa la ecuación 2, y se añaden los inhibidores de proteasas PMSF (1mM) y Benzamidine hydrochloride hydrate (1mM). La ruptura de células se lleva a cabo mediante sonicación, con un equipo Hielscher UP400St (perteneciente al grupo *ProcerealTech*) y una sonda de 1,4 cm. Este equipo permite llevar a cabo una serie de ciclos, de 10 segundos cada uno

(10 segundos funcionando, 10 segundos sin funcionar, para evitar sobrecalentamiento. Amplitud 100%), en los que se somete a la célula a altas presiones (entre 1500 y 1800 bar) a una temperatura de 4°C, durante 7 minutos. Estas condiciones consiguen la ruptura de la pared y de la membrana plasmática de las células, liberándose así todo el contenido intracelular al medio extracelular, entre ellos el polímero de interés.

$$V_{\text{sonicado}} = 5 * V_{\text{cultivo}} * \text{Abs}(\text{última muestra})$$

*Ecuación 1-Relación para obtener el volumen de sonicado. El  $V_{\text{cultivo}}$  es el volumen total usado en la producción (0,250L TB\*n flask + 0,150 LB AIM\*n flask) y la Abs es la absorbancia de la última muestra tomada tras la autoinducción durante toda la noche)*

Una vez el sonicador ha acabado, el contenido se lleva a Falcon de 50mL, para llevar a cabo otra centrifugación durante 1 hora a 12000 rpm (rotor Fiberlite™ F15-8X50Cy, Thermo Scientific™). y separar así pellet y sobrenadante otra vez. Se toma 1mL de la muestra antes de la centrifuga, para realizar una electroforesis en la que sea vea si el polímero está en el pellet o en el sobrenadante. En trabajos anteriores se ha visto que los ELR con scFv suelen quedarse en pellet formando cuerpos de inclusión debido a la complejidad de la secuencia del scFv.

Una vez más, el sobrenadante se separa del pellet, que se guarda en una duquesa hasta ver los resultados del seguimiento del proceso. El pellet se resuspende en agua ultrapura en 100mL. Una vez está resuspendido, se añaden 100mL de sales de guanidina 6M, de tal forma que la concentración final de sales de guanidina es 3M. Estas sales van a desnaturalizar y solubilizar todas las proteínas presentes en el pellet, incluidas las del polímero puro en los cuerpos de inclusión. Esto se deja toda la noche en un agitador magnético a 4°C.

Una vez está todo el pellet resuspendido, se toma una muestra de 1mL, para poder comprobar igual que antes en donde se encuentra el polímero mediante una electroforesis. En este caso, el polímero pasa a estar en el sobrenadante.

Se procede a la última centrífuga que separará el sobrenadante y el precipitado del tratamiento con sales de guanidina. Con el fin de dejar el sobrenadante completamente limpio, se centrifuga dos veces: 30 minutos la primera vez, y una hora la segunda, a 12000rpm (rotor F15-8X50Cy) y 4°C. Se vuelve a separar el pellet del sobrenadante. El sobrenadante va a purificarse a continuación por columna de afinidad: la resina HisPur™ Ni-NTA Resin (Thermo Scientific) recubierta de níquel en el cromatógrafo NGC Quest System (BioRad®), equipo del LTI (Laboratorio de Técnicas Instrumentales, Universidad de Valladolid).

Por otro lado, las alícuotas de 1 mL tomadas para realizar un seguimiento se preparan para realizar un SDS-PAGE:

- Las muestras tomadas para analizar la absorbancia, se tratan igual que en el apartado 4.2.7
- La muestra procedente del sonicado, y del tratamiento con sales de guanidina, se centrifuga en ambos casos 45 minutos a 13400 rpm. El sobrenadante se separa del pellet. De este se toman 20 $\mu$ L y se le añaden 5 $\mu$ L de tampón de carga. El pellet se resuspende en 1mL de agua desionizada, y se toman 20 $\mu$ L y se le añaden 5 $\mu$ L de tampón de carga. Se hierven 5 minutos y se procede con la SDS-PAGE.

#### 4.2.10 Purificación de polímeros recombinantes

Como se ha dicho antes, la purificación se lleva a cabo con la resina HisPur™ Ni-NTA Resin (Thermo Scientific), La purificación se da gracias a la cola de histidinas que tiene el polímero, que va a permitir que sea retenido por la resina al tener una gran afinidad por el Níquel. Antes de empezar la purificación, la columna se equilibra con dos volúmenes de tampón de equilibrado. La muestra se prepara añadiéndole un volumen equivalente de tampón de equilibrado.

La cromatografía se lleva a cabo en un gradiente inverso de sales de guanidina, empezando con una fase móvil de tampón de lavado en una concentración de 3M de guanidina, 1 mM de DTT y 25mM de imidazol en PBS (tampón de lavado A), y acabando en 0M de guanidina, 0 mM de DTT y 25mM de imidazol en PBS (tampón de lavado B). De esta forma, va a permitirse al polímero plegarse correctamente, al ir retirándose las sales de guanidina y el DTT paulatinamente. Este proceso se conoce como replegamiento o *refolding*. Para la elución posterior se utiliza como fase móvil un tampón de elución con 250mM de imidazol en PBS. El imidazol tiene mucha más afinidad por la resina recubierta de níquel que la cola de histidina, por lo que vamos a obtener el polímero purificado en las fracciones que eluyen de la columna. Para asegurar en qué fracciones está el polímero, se realiza un SDS-PAGE de estas, tomándose 20 $\mu$ L de cada una, añadiendo 5 $\mu$ L de tampón de carga e hirviendo 5 minutos.

Las fracciones en la que se encuentre el polímero, van a someterse a diálisis (tripas de diálisis de Medicell Membrane Ltd) para eliminar el imidazol, en dos cambios de 25L de agua destilada y de agua ultrapura, a 4°C.

Por último, la disolución que contiene el polímero purificado, se liofiliza en el equipo LyoQuest-Telstar®, perteneciente al LTI (Laboratorio de Técnicas Instrumentales, Universidad de Valladolid), obteniéndose de esta forma el polímero seco. De esta forma puede llevarse a cabo la caracterización físico química del ELR scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>.

## 4.2.11 Caracterización físico-química del polímero recombinante

### 4.2.11.1 SDS-PAGE

Todo el fundamento de esta técnica está explicado en el apartado 4.2.1.1.

La muestra para el análisis de SDS-PAGE se prepara en una concentración 1mg/mL de agua ultrapura, y se deja disolviendo toda la noche a 4°C. Se toman 20µL de este, y se añaden 5µL de tampón de carga. Después se lleva a cabo la electroforesis durante una hora a amperaje constante de 25mA/gel.

Esta técnica permite conocer el peso aparente del polímero, con la ayuda de un marcador que actúa como patrón (ilustración 6 del apartado 4.2.1.1). También sirve para poder evaluar el porcentaje de pureza del polímero, con respecto a las impurezas debidas a las degradaciones de este o a la presencia de otras proteínas ajenas.

### 4.2.11.2 Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

La espectroscopia de masas es una técnica que nos permite identificar un compuesto conociendo su masa molecular. Con esta técnica, se obtiene un ión molecular, que es el ión de mayor peso molecular, y a su izquierda productos del fraccionamiento de la muestra: Los compuestos van a romper de distinta forma, y estudiando los diferentes fragmentos, puede realizarse la identificación del compuesto.

Las etapas de la espectroscopia de masas son:

- Ionización (activación): para detectar compuestos por espectroscopia, tiene que estar ionizado, ya que las especies neutras no las detecta. La ionización la llevan a cabo las fuentes de iones.
- Extracción (Aceleración): los analitos (iones) tienen que ser extraídos de la fuente de iones para llevarlo al siguiente apartado. Se realiza con aceleración para extraerlos, que se consigue aplicando una diferencia de potencial.
- Análisis: se lleva a cabo en el analizador. Se lleva a cabo una diferenciación entre iones formados por la diferente relación masa/carga ( $m/z$ ) que tengan y así poder separarlos.
- Detección: cuando llegan los iones, se genera una corriente iónica, que se transforma en corriente eléctrica, y se obtiene un pico.

Entre las diferentes fuentes de iones y analizadores, el MALDI-TOF está compuesto por una fuente de iones MALDI (Desorción/Ionización por Láser Asistida por una Matriz) y un analizador de tiempo de vuelo (TOF). La fuente de iones MALDI permite trabajar en fase condensada (sólido o líquido), lo que le hace ideal para realizar espectroscopia de proteínas. Con otras fuentes de iones no era posible ya que no generaban iones en fase gaseosa de proteínas. Se trata de una fuente blanda, es decir,

transmite poca energía a la muestra, por lo que genera poca fragmentación. Como su propio nombre indica, es de desorción: genera directamente iones en estado gaseoso sin tener que volatilizar la muestra. Por la parte del detector de tiempo de vuelo, también es idóneo para el análisis de biopolímeros, puesto que tiene un rango de relación masa/carga muy amplia, de hasta 200-300KDa.

La prueba se realiza con el equipo Bruker Autoflex Speed (MALDI TOF), perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid. La matriz en la que se preparó la muestra es 2.5-DHAP.

#### 4.2.11.3 ELISA

El ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) es una técnica englobada dentro de los enzimoimmunoensayos (EIA). Se basa en el uso de un enzima para detectar la unión de un anticuerpo a un antígeno, con el fin de obtener un producto coloreado.

El ELISA se puede realizar de forma directa, indirecta, o tipo Sandwich.

Para este experimento, se utiliza el ELISA indirecto, fijando el antígeno EpCAM a la placa, con el fin de poder ver si el polímero con el scFv es funcional, uniéndose o no a este antígeno.

Procedimiento:

1. Primero se debe llevar a cabo el *Coating*, el recubrimiento de la placa Medisorp, de Thermo Fisher, con el que se hace el ELISA. Esto se hace con 200µl de una disolución de EpCAM/Trop1, His, Human 1ng/µL en tampón NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Para el blanco se usa BSA 1ng/µL (Álbumina de suero bovino) en tampón NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Como control positivo, una disolución de 1ng/µL de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>. Esto se deja fijando toda la noche a 4°C.
2. Al día siguiente, se realizan 3 lavados con 250µL de TBS 1x.
3. Se lleva a cabo el bloqueo durante 90 minutos a 37°C con BSA 5% en TBS, 250µL.
4. Se lava de nuevo 3 veces con 250µL de TBS 1x.
5. Se añaden 200µL de las disoluciones preparadas en diferentes concentraciones, en BSA 0.5% del polímero de interés, y el control negativo, en los pocillos recubiertos con EpCAM. En los que no, TBS 1x. Se incuba 1 hora a 37°C.
6. Se lava nuevamente 3 veces con 250µL de TBS 1x.
7. A continuación, se añade la Biotin-Protein L (GenScript) en concentración 1:50000(v/v) en BSA 0.5%, se deja 1 hora a 37°C, y después se llevan a cabo 3 lavados con TBS 1x. Después

se añade la streptavidina-HRP(GenScript) en concentración 1:100000(v/v) en BSA 0.5%, con el fin de formar el complejo Biotina-streptavidina. Ambos en cantidades de 200µL.

8. Se incuba 1 hora a 37°C, y se lava 3 veces con TBS 1x.
9. Por último, se añade el sustrato, O-Phenylenediamine Dihydrochloride Stable Peroxide, OPD 1x, un sustrato cromogénico, capaz de visualizar la actividad de la enzima peroxidasa del rábano, HRP. Se echan 100µL por pocillo.

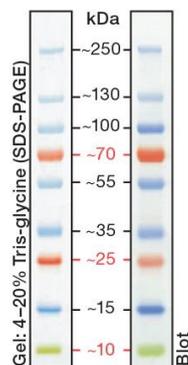
La absorbancia se mide en el equipo SpectraMax® M Series Multi-Mode Microplate Readers (Molecular Devices) a 450nm en el IOBA (Instituto de Oftalmobiología Aplicada de la Universidad de Valladolid).

#### 4.2.11.4 Western Blot

El Western Blot es una técnica usada en biología molecular. Para este trabajo, su finalidad es un estudio inmunológico: la detección de impurezas del polímero. Está basado en tres elementos:

- Separación de las proteínas por tamaño.
- Transferencia a un soporte sólido.
- Reconocimiento específico de la proteína objetivo para poder visualizarla.

Para el primer paso, se lleva a cabo un SDS-PAGE (apartado 4.2.1.1), utilizando el marcador coloreado de Western Blot PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) representado en la ilustración 9.



*Ilustración 9-Marcador de western Blot con los pesos correspondientes a las bandas*

Una vez ha acabada la electroforesis, llega el paso de la transferencia al soporte sólido: Una membrana PVDF (fluoruro de polivinilideno) (Transfer Membranes; Immobilon®). En este paso se utiliza un campo eléctrico con el fin de transferir las proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana. Para este paso, primero se debe activar la membrana dejándola un minuto en metanol, y después lavándola con el tampón de transferencia. Es muy importante manejar la membrana en todo momento con pinzas.

Se monta el módulo de transferencia de la siguiente forma: dos esponjas y un papel de filtro mojados en tampón de transferencia, el gel proveniente del SDS-PAGE, la membrana de PVDF, otro papel de filtro, y 3 esponjas. Se pone en vertical, y se llena de tampón de transferencia. Después se lleva a la cubeta con agua destilada previamente enfriada y hielos (para refrigerar) y se deja 1:30h a 300mA. Una vez acabada la electrotransferencia, se retira la membrana del módulo de transferencia.

Por último, se lleva a cabo la detección. Antes de empezar con este paso, se lleva a cabo un bloqueo de la membrana con leche en polvo al 5% en TBST, con agitación orbital de 20rpm, a temperatura ambiente, con el fin de evitar las uniones inespecíficas a la membrana. Como se realizan dos marcajes con dos proteínas diferentes, la membrana se recorta en dos partes una vez ocurrida la electrotransferencia. Es muy importante que la parte de la membrana en la que están las proteínas (la que estaba tocando el gel) este boca arriba.

Una vez pasada la hora, se lava la membrana 3 veces con TBST, en periodos de 5 minutos. Después, se añade a una membrana 6x-HisTag Monoclonal Antibody (His.H8), HRP, diluido 1:2000 en TBST con 2% de leche en polvo, que se une específicamente a la cola de histidinas del polímero, y a la otra Biotin-Protein L 1:1000 en TBST con 2% de leche en polvo, que se une a las cadenas ligeras variables del anticuerpo. Esto se deja durante la noche (16-18 horas) a 4°C con agitación orbital.

Al día siguiente, según la proteína usada, se sigue un procedimiento:

- 6x-HisTag Monoclonal Antibody (His.H8) - HRP: Se lava con PBST 3 veces, en periodos de 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se revela, añadiendo la solución de DAB 1x. El DAB permite visualizar la actividad de la enzima peroxidasa del rábano (HRP). Esto se incuba 10 minutos en agitación orbital a oscuras.
- Biotin-Protein L: se lava con TBST 3 veces. En este caso, como no hay HRP, como en el caso anterior, se añade la streptavidina-HRP en concentración 1:10000 en TBST 0,5% de leche, para formar el complejo streptavidina-biotina, el cual es la interacción biológica no covalente más fuerte que existe. Esto se deja 1 hora incubando con agitación orbital. Después, se siguen los mismos pasos que en el caso anterior.

#### 4.2.11.5 Espectrometría DLS (Dynamic Light Scattering)

El DLS (Dynamic Light Scattering) es una técnica que permite analizar el tamaño de partícula mediante la medida del movimiento browniano, el movimiento aleatorio entre las partículas en disolución debido a la interacción con las partículas del solvente. El movimiento browniano depende de la viscosidad del medio, y del tamaño de las partículas, de tal forma que las partículas de mayor tamaño

se moverán más lento al interaccionar con las partículas del solvente, y las de menor tamaño, más rápido [25].

La velocidad del movimiento browniano viene dada por el coeficiente de difusión (D). Sabiendo este valor, se puede saber el tamaño de la partícula, puesto que están inversamente relacionados, según la ecuación Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d(H)}$$

*Ecuación 3-Ecuación Stokes-Einstein.*

Donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta,  $\eta$  es la viscosidad del medio, y d(H) es el diámetro hidrodinámico de la partícula [25].

El DLS ha sido usado para medir el tamaño y carga del poliplexo, una nanopartícula formada por la complejación del plásmido purificado (apartado 4.2.2) con el polímero. Para formar este, se han mezclado scFv(EpCAM-VOK-H<sub>6</sub>) con VOK-H<sub>6</sub> en las ratios 2/3, 1/3 y 0/3, con el plásmido en una ratio de 50:1 N/P (N: lisinas presentes en el VOK; P: fosfatos presentes en el plásmido). Esta ratio ha sido optimizada previamente por el grupo Smart Devices for NanoMedicine de la Universidad de Valladolid [26]. Para ello, se han mezclado los componentes en las proporciones que se desean a 4°C, se agitan con vortex a 25°C durante 1 minuto, y se incuban a esta temperatura 30 minutos.

Las medidas de tamaño y potencial de los poliplexos se llevan a cabo en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid, en el equipo Zetasizer Nano Series (Malvern).

#### **4.2.11.6 Espectroscopia de RMN ordenada por difusión, 2D DOSY NMR.**

Este tipo de espectroscopia busca separar las señales obtenidas por RMN de diferentes especies, según su coeficiente de difusión. Se trata pues, de un experimento donde se realiza una medición de difusión molecular precisa, de forma no invasiva, y útil para biofluidos. Debido justamente a que su objetivo es el de separar las especies presentes espectroscópicamente, se le conoce como “cromatografía de RMN” [27] [28].

En estos espectros, en el eje x se muestra el desplazamiento químico, mientras que en el eje y está el coeficiente de difusión [28].

Este análisis va a permitir comprobar la formación del poliplexo, gracias a la complejación del plásmido pCMVmKate2 con el ELR scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>.

El experimento se realiza en el espectrómetro de RMN de 500 Hz de Agilent Technologies, perteneciente al LTI (Laboratorio de Técnicas Instrumentales), por técnicos pertenecientes a este laboratorio.

#### 4.2.11.7 Microscopia de fuerza atómica (AFM)

La microscopia de fuerza atómica es un tipo de microscopia de sonda de barrido, en la que una punta va barriendo la superficie de la muestra, midiendo las fuerzas de interacción entre estas.

Está basado en una punta (tip) en un a microplaca (cantiléver en voladizo) flexible, un fotodetector, un piezoeléctrico que permite que la punta se pueda mover en el eje x, y z, y un láser, cuya radiación incide sobre la superficie del cantiléver. Al hacerse el barrido, se produce una deflexión de la micropalanca, se desviarán la incidencia del láser de una forma u otra, esto se detectará en el fotodiodo, y un software cuantifica estas desviaciones, convirtiéndolas en cambios de altura, de las que se obtienen las imágenes.

El AFM tiene varios modos de operación [29]:

- Contacto continuo entre punta y muestra
  - Modo contacto (*Contact mode*)
  - Medida de fuerzas (*Force volumen*)
- Contacto intermitente entre punta y muestra
  - Contacto intermitente (*Tapping mode*)
  - Contraste de fase (*Phase contrast mode*)
- No contacto entre punta y muestra (*Non-contact mode*)

En este trabajo, el modo de operación usado es *Tapping mode*. En este modo, se mide la topografía tocando intermitentemente la superficie. El cantiléver oscila a una amplitud y fase constante durante el barrido [30]. Según la interacción de la punta con la superficie, va a haber un desfase, a partir de la cual se obtiene la imagen de fase. La imagen Height Retrace por otro lado, es la imagen generada a partir de la señal que llega al fotodiodo. El último tipo de imagen obtenido con AFM es la imagen de amplitud, imagen sin sentido físico, ya que da una cuantificación del error que se tiene en el registro de la señal.

Con esta técnica se han podido obtener imágenes de los poliplexos formados con las ratios de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> 2/3 y 0/3 (es decir, únicamente con VOK-H<sub>6</sub>).

Se usaron dos estrategias distintas de análisis:



La evaluación de la expresión se realiza en una SDS-PAGE (apartado 4.2.11.1) de un primer screening de las diferentes colonias aisladas a partir del glicerol stock en la placa Petri, con el fin de ver cuáles son las más productoras (apartado 4.2.7), que son las que más proteína de interés han producido en un tiempo dado. En la ilustración 10, se muestra la imagen de un primer screening, y de un segundo screening proveniente de las células hijas de la colonia 4 del anterior cultivo. En la ilustración 10 (izda), a parte de las colonias 1-8, se usa un control negativo de otro polímero procedente de una BLR, para poder diferenciar así la proteína deseada, de las propias de la célula.

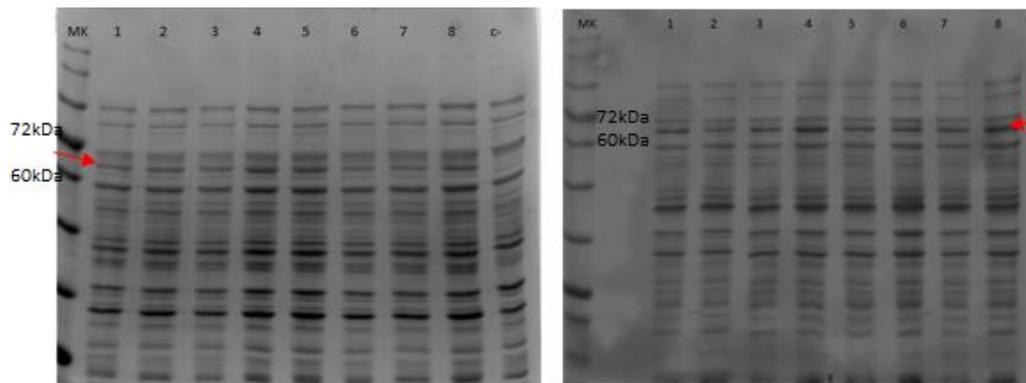


Ilustración 10-SDS-PAGE del primer (izquierda) y segundo (derecha) screening del biopolímero recombinante scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>. Se señala en rojo, la banda correspondiente al polímero scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>.

De las colonias seleccionadas para el segundo screening, se selecciona la colonia 8 como la más productora. A partir de esta, comienza el proceso de bioproducción (apartado 4.2.8) que se repetirá tres veces. Se realizan dos producciones iniciales a 37°C con la diferencia de que, en la segunda, se realiza la producción en erlenmeyers con deflactores. Mientras que, en la tercera producción, la inoculación se realizó a primera hora, dejando la producción 6 horas a 37°C con agitación, y posteriormente, traspasándolo a 4°C con agitación durante el fin de semana, en erlenmeyers con deflactores.

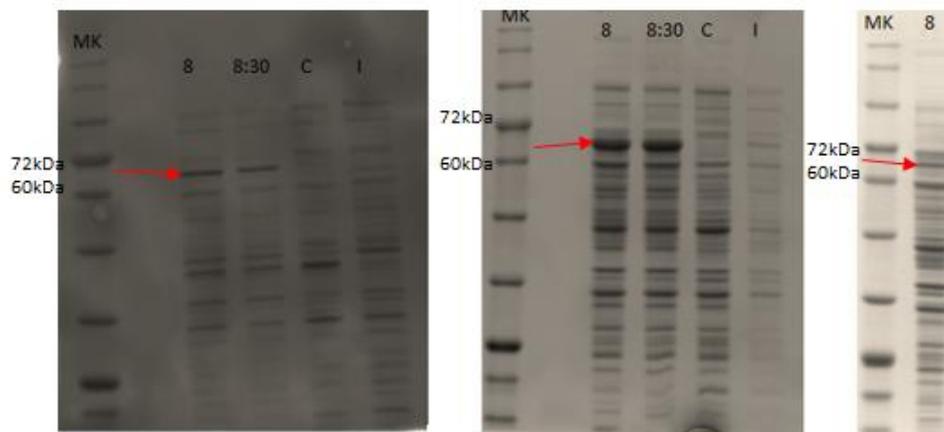
La turbidez alcanzada en las diferentes producciones realizadas se puede ver en la tabla 3. Estas absorbancias sirven para llevar un seguimiento de la cantidad de células que se obtiene:

Tabla 3-Valores de la absorbancia obtenidos en las tres producciones llevadas a cabo. La primera y segunda, llevada a cabo como en el apartado 4.2.8, la tercera, diferente: se deja a 4°C durante el fin de semana

	Absorbancia 600nm		
	1º producción	2º Producción	3º Producción
<b>Control</b>	3.6	3.41	--
<b>Inóculo</b>	2.3	2.16	--
<b>Muestra 8:00am</b>	4.04	4.06	--
<b>Muestra 8:30am</b>	3.7	3.07	4.67

La disminución en las absorbancias de las 8:30 es consecuencia de parar la producción justo al final del ciclo de vida de la bacteria. En las dos producciones llevadas a 37°C por la noche tienen una absorbancia similar. En la que se realiza a 4°C durante el fin de semana, se puede observar una absorbancia superior por lo que ha habido un mayor crecimiento celular.

Para comprobar el éxito de la producción se realiza una electroforesis SDS-PAGE (apartado 4.2.11.1) (ilustración 11).



*Ilustración 11-Producciones del scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>. Izquierda: primera producción en flask sin deflactores a 37°C durante la noche. Centro: segunda producción en flask con deflactores a 37°C durante la noche. Derecha: Tercera producción a 4°C durante el fin de semana en flask con deflactores. Señalado en rojo, el polímero scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>.*

En la ilustración 11 (izquierda y centro), se puede ver bien la diferencia en la intensidad de banda procedente de las muestras tomadas a las 8 y 8:30am, con respecto a la del inóculo: en las primeras hay mucha más producción que en la del inóculo. Esto es consecuencia de la autoinducción de la proteína. En el caso del inóculo, en el medio de cultivo, se añade glucosa, y tal como se explica en el apartado 4.2.8, es un inhibidor del promotor de la lactosa, y en presencia de esta, no va a empezar a producir. Sin embargo, en los medios de cultivo para la producción, no se añade glucosa, y las bacterias podrán producir el polímero.

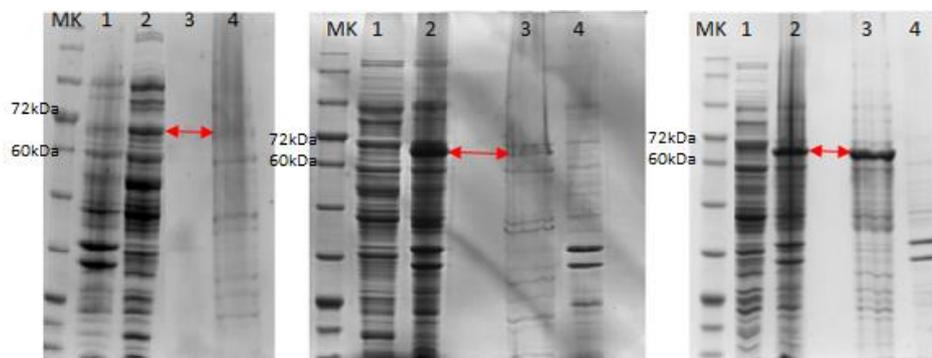
Se puede ver que con deflactores (ilustración 11 centro), se obtiene una producción del polímero mayor (la banda es mucho más intensa) a la que se hace sin deflactores (ilustración 11 izqda), debido a la mayor aireación obtenida con estos a pesar de que los crecimientos celulares fueron similares.

Por otro lado, en la tercera producción llevada a cabo a 4°C durante el fin de semana, a pesar de haberse obtenido un mayor número de células (tabla 3), la producción es inferior que las realizadas a 37°C durante la noche, en especial a la de la segunda producción, la cual se considera como la mejor producción y por tanto las condiciones óptimas de expresión.

## 5.2 Purificación de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>

Tras el cosechado celular y su posterior lavado, las bacterias fueron lisadas por sonicación (apartado 4.2.9), y centrifugadas. Se analizaron tanto el sobrenadante resultante como sus restos celulares en el pellet. Como puede observarse en la ilustración 12, la banda correspondiente al polímero se encuentra en el pellet, donde se ha acumulado en forma de cuerpos de inclusión.

Para solubilizar estos cuerpos de inclusión, se añaden sales de guanidina 3M, que desnaturalizan las proteínas, al romper todas las interacciones no covalentes (apartado 2.2.1). Tras el tratamiento durante 16-18 horas a 4°C, se clarifica por centrifugación y se analizan por SDS-PAGE ambas fracciones. En la ilustración 12 se observa cómo la banda del polímero se encuentra en el sobrenadante tras este paso.



*Ilustración 12-Análisis por SDS-PAGE del lisado por sonicación de las bacterias y extracción de los cuerpos de inclusión con sales de guanidina 3M. A la izquierda, primera producción: en las calles 1 y 2 se ve el pellet y el sobrenadante de sonicado en ese orden; en la 3 y en la 4, el pellet y el sobrenadante de sales de guanidina 3M. En el centro, segunda producción: en las calles 1 y 2 se ve el sobrenadante y el pellet de sonicado; en la 3 y en la 4, el sobrenadante y el pellet con sales de guanidina 3M. A la derecha, tercera producción: en las calles 1 y 2 se ve el sobrenadante y el pellet de sonicado; en la 3 y en la 4, el sobrenadante y el pellet de sales de guanidina 3M. Señalado en rojo, la banda correspondiente al polímero scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>*

Una vez confirmada la presencia del polímero en el sobrenadante, se lleva a cabo su purificación mediante cromatografía en columna de afinidad IMAC, tal y como se explica en el apartado 4.2.10: se realiza en un gradiente negativo de sales de guanidina (desde 3M a 0M), que permite al scFv plegarse correctamente hasta su forma funcional (proceso conocido como *refolding proteico*). Una vez eliminado cualquier resto de sales de guanidina, se realiza la elución del biopolímero con una concentración de imidazol de 250mM.

La primera purificación se realizó según se relata en el apartado 4.2.10, cargando el polímero disuelto en la columna que contiene la resina mediante una bomba peristáltica durante la noche. Sin embargo, en el caso de las segunda y tercera producciones se cargó la muestra en método *Batch*: sobre 2mL de resina, se añadió la muestra y tampón de equilibrado a partes iguales, y se incubó con la resina con agitación orbital suave toda la noche. Posteriormente la resina se empaquetó en la columna, recogiendo el sobrenadante denominado no retenido (*Flow-Through*) y lavando la columna con

tampón de equilibrado. Después, se sigue en los tres casos con la cromatografía en columna para realizar el replegamiento del scFv (apartado 4.2.10).

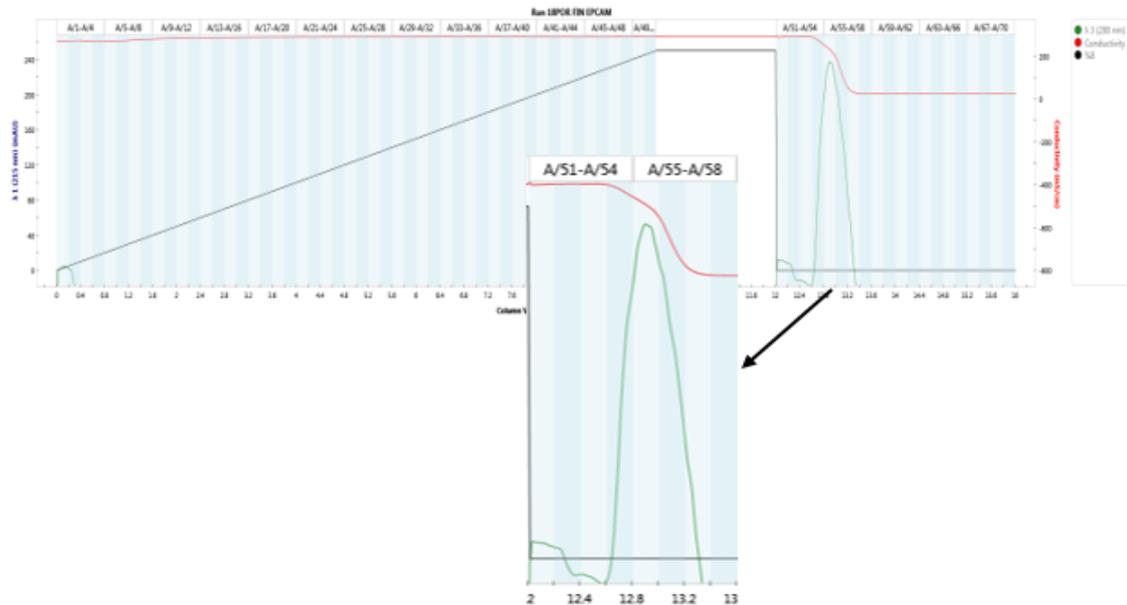


Ilustración 13- Cromatograma obtenido de la purificación de la primera producción. La línea negra muestra la evolución del gradiente negativo de sales de guanidina, con el porcentaje del tampón de lavado B (0M de guanidina, 0 mM de DTT y 25mM de imidazol en PBS): se ve un aumento progresivo en el porcentaje de este tampón, y después una estabilización, que indica que está pasando por la columna un 100% de este tampón. Por último, se ve un descenso de este tampón, correspondiente al paso del tampón de elución (250 mM imidazol en PBS) a partir de la fracción 51. La línea verde indica las fracciones que presentan absorbancia a 280nm.

Las fracciones correspondientes a la etapa de elución (ilustración 13) se analizaron por SDS-PAGE como se muestra en la ilustración 14:

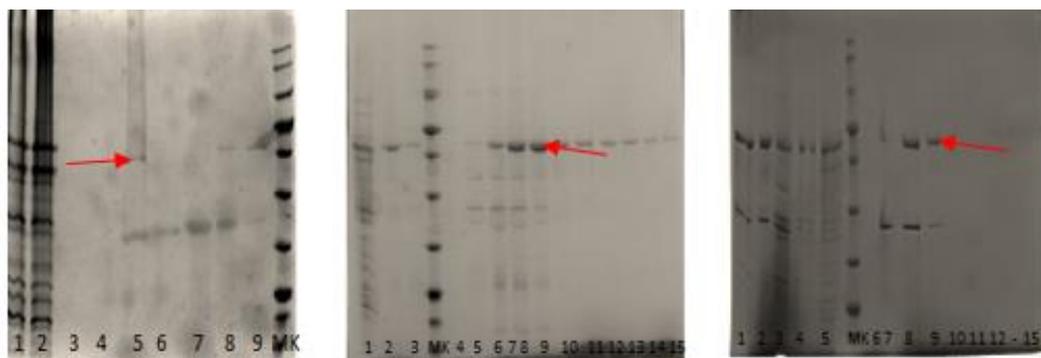


Ilustración 14-Análisis SDS-PAGE de las fracciones correspondientes a la etapa de elución obtenidas de la columna de afinidad, junto con el Flow- Through y el extracto crudo. Izquierda primera producción, en la calle 1 esta el extracto crudo; en la calle 2, el flow-through, de las calles de la 3 a la 9, las fracciones obtenidas en la etapa de elución. Centro: segunda producción, en la celda 1, el flow-through,, de las calles 2,3, y de la 4 a la 15, las fracciones correspondientes a la etapa de elución. Derecha: tercera producción, del 1 al 4, fracciones obtenidas en la etapa de lavado que mostraban un pico de absorbancia a 280nm; en la calle 5, el flow-through,, en las calles 6 -15, fracciones correspondientes a la etapa de elución. En rojo, señalada la banda correspondiente al polímero scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>.

Una vez se ha comprobado mediante la electroforesis SDS-PAGE (ilustración 14) que en las fracciones provenientes de la etapa de elución está presente la banda de tamaño correspondiente al polímero de

interés scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, se lleva a cabo su mezcla y diálisis con el fin de eliminar las sales de imidazol. Por último, se procede a la liofilización, pudiéndose obtener el polímero seco (apartado 4.2.10).

Los rendimientos obtenidos de las diferentes producciones, con sus condiciones, se muestran en la tabla 4:

Tabla 4-Rendimientos obtenidos en las tres producciones, con las condiciones usadas. O/N: Over Night; O/W: Over Weekend.

	<b>1ª producción</b>		<b>2ª producción</b>		<b>3ª producción</b>	
	<u>Condiciones</u>	<u>Carga muestra</u>	<u>Condiciones</u>	<u>Carga muestra</u>	<u>Condiciones</u>	<u>Carga muestra</u>
	37°C O/N	En columna	37°C O/N + Deflactores	Método Batch	4°C O/W + Deflactores	Método Batch
<b>Rendimiento (mg/L producción)</b>	6.7		6.43		17.44	

### 5.3 Purificación de DNA plasmídico

Como se explica en el apartado 4.2.2, para la formación del poliplexo es necesario tener puro el plásmido que actuaría como agente terapéutico. El plásmido modelo elegido es el pCMVmKate2 que contiene el gen codificante para la proteína fluorescente mKate2 bajo un promotor de mamífero CMV. Tras su purificación (apartado 4.2.2), siguiendo las instrucciones del fabricante del kit utilizado, se debe verificar que el plásmido obtenido cumple con los índices de calidad adecuados. Primero se lleva a cabo una digestión del plásmido con las enzimas *EcoRI* Y *HindIII* (apartado 4.2.3) y se analiza en un gel de agarosa (apartado 4.2.1.2):

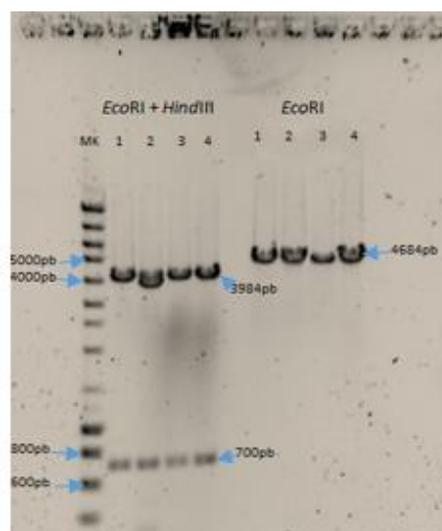


Ilustración 15- Gel de agarosa analítico. A la izquierda, tras las bandas del marcador (MK) de referencia, se muestra la digestión de los plásmidos obtenidos de cuatro colonias (1-4) con las enzimas *EcoRI*+*HindIII*. A la derecha, la digestión de las mismas colonias (1-4) exclusivamente con *EcoRI*.

En la ilustración 15, se pueden observar las dos digestiones llevadas a cabo del plásmido obtenido y purificado de las colinas 1-4 seleccionadas (apartado 4.2.2.1). Como se explica en el apartado 4.2.3, la digestión llevada a cabo con *EcoRI*+*HindIII* debería dar como resultado dos fragmentos, uno de 700pb y otro de 3984pb. Mientras que la llevada a cabo usando únicamente *EcoRI* linealiza el plásmido, obteniéndose un único fragmento de 4684pb.

Según se observa, en las colonias 1, 3 y 4, las digestiones dan el resultado esperado, mientras que la colonia 2, en la digestión con *EcoRI* y *HindIII*, genera cuatro fragmentos en vez de los dos esperados, lo que quiere decir que el plásmido no tenía la secuencia esperada, y, por lo tanto, se descarta.

Por último, para calcular la concentración del plásmido, y su pureza, se lleva un análisis con el espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (apartado 4.2.5)

*Tabla 5-Concentración y pureza de las disoluciones de plásmido obtenida con la purificación (apartado 4.2.2.1). 1, 3 y 4, las primeras eluciones, más concentradas; 1b, 2b y 3b, segundas eluciones, más diluidas.*

Colonia plásmido	C (mg/ $\mu$ L)	Abs260nm/Abs280nm	Abs260nm/Abs230nm
1b	0.313	1.92	2.27
3b	0.300	1.92	2.25
4b	0.398	1.93	2.28
1	1.103	1.93	2.32
3	1.033	1.92	2.31
4	1.150	1.93	2.31

Como se observa, las purezas en todos los casos entran dentro de los rangos óptimos: Para la ratio A260nm/A280nm, se considera de pureza óptima si el valor obtenido está comprendido en  $\geq 1.8$ -2.1. Para la ratio A260nm/A230nm, el rango de pureza óptima es  $> 2$ -2.2 (tabla 14, anexo 4). Por ello se utilizarán las tres preparaciones cuando se requiera la formación de los poliplexos con el biopolímero.

#### 5.4 Caracterización de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>

Se ha realizado una caracterización físico-química y funcional tanto del polímero scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, como del poliplexo una vez formado, utilizando las técnicas de electroforesis SDS-PAGE, espectroscopia de masas (MALDI-TOF), inmunoensayo Western Blot, ELISA, dispersión de luz dinámica (DLS), microscopía de fuerza atómica (AFM) y 2D DOSY RMN.

## 5.4.1 Caracterización físico-química

### 5.4.1.1 SDS-PAGE

En la electroforesis SDS-PAGE (apartado 4.2.1.1) llevada a cabo con el polímero obtenido tras la liofilización, se pueden observar unas bandas mayoritarias propias del polímero scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, y otras bandas de menor intensidad y menor peso molecular (ilustración 16).

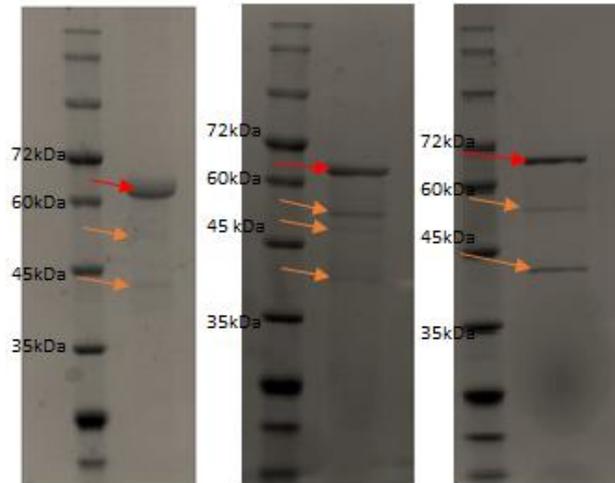


Ilustración 16-SDS-PAGE de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> obtenido tras la liofilización de las tres producciones. Izquierda: primera producción, con dos degradaciones; Centro segunda producción, con tres degradaciones; Derecha: tercera producción, con dos degradaciones. Señalado en rojo, scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>; en naranja, las degradaciones.

La banda de mayor intensidad tiene una movilidad aparente calculada según el programa del equipo de visualización (ilustración 17) de 62.6kDa que se asemeja al peso molecular teórico calculado para el polímero 61294Da. Las bandas inferiores a la del polímero de interés posiblemente sean productos de su degradación pero que mantienen la capacidad de ser captadas en la cromatografía IMAC.

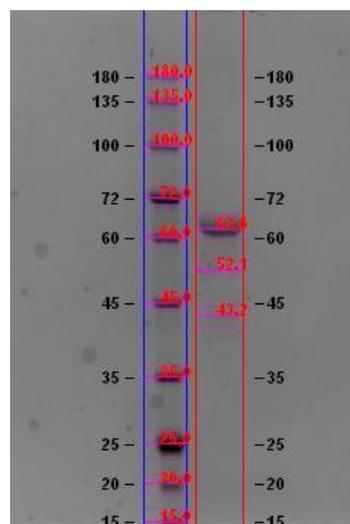


Ilustración 17-SDS-PAGE del ELR scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> obtenido tras la liofilización, donde se indican las movilidades moleculares aparentes en kDa de las proteínas separadas

En la tabla 6 se muestra la pureza del scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> de las tres producciones con respecto a estas impurezas.

*Tabla 6-Pureza de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> obtenido en las tres producciones*

<b>Producción</b>	<b>%Pureza scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub></b>
1º	93.1
2º	84.1
3º	66.4

#### 5.4.1.2 Espectrometría de masas: MALDI-TOF

En el espectro de masas obtenido con MALDI-TOF (apartado 4.2.11.2) se observa un pico mayoritario correspondiente al ión molecular de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, a 61308Da, y otro pico mayoritario correspondiente a 33504Da. En el primer caso su valor es muy similar al valor teórico de 61294 Da y la diferencia (14Da) puede deberse al error intrínseco de la técnica. Mientras que el pico de 33.5kDa posiblemente provenga de la degradación proteolítica del primero, y dado que ambos deben mantener el extremo carboxilo intacto, posición donde se encuentran las 6 histidinas, según el peso molecular obtenido debería corresponder a los bloques VOK-H<sub>6</sub>, posiblemente con el extremo amino terminal, iniciando antes de la secuencia VSSVPGKG.

Como ya se ha dicho en el apartado 4.2.11.2, es una fuente blanda, no va a haber fragmentación, pero en este caso los iones que se generan pueden tener cargas múltiples, y se pueden generar dímeros. Respecto al scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, se puede suponer que a 30656Da está su primera ionización, y a 20446Da, su segunda ionización. Del VOK-H<sub>6</sub> se puede observar una primera ionización a 16709Da, y la formación de un dímero de este a 66980Da. Por otra parte, a 47450Da se observa otra señal débil que podría ser debida a otra posible degradación pues es más evidente en las preparaciones siguientes (ilustración 16).

El resultado de pesos moleculares aparentes obtenido por SDS-PAGE (ilustración 17) coincide con lo que se puede ver en el espectro, aunque las bandas aparezcan a valores superiores a los esperados en este. Esto se debe a la elevada hidrofobicidad del polímero, que hace que avancen en la electroforesis a una velocidad inferior a la que deberían, y que aparezcan a pesos moleculares aparentes superiores.

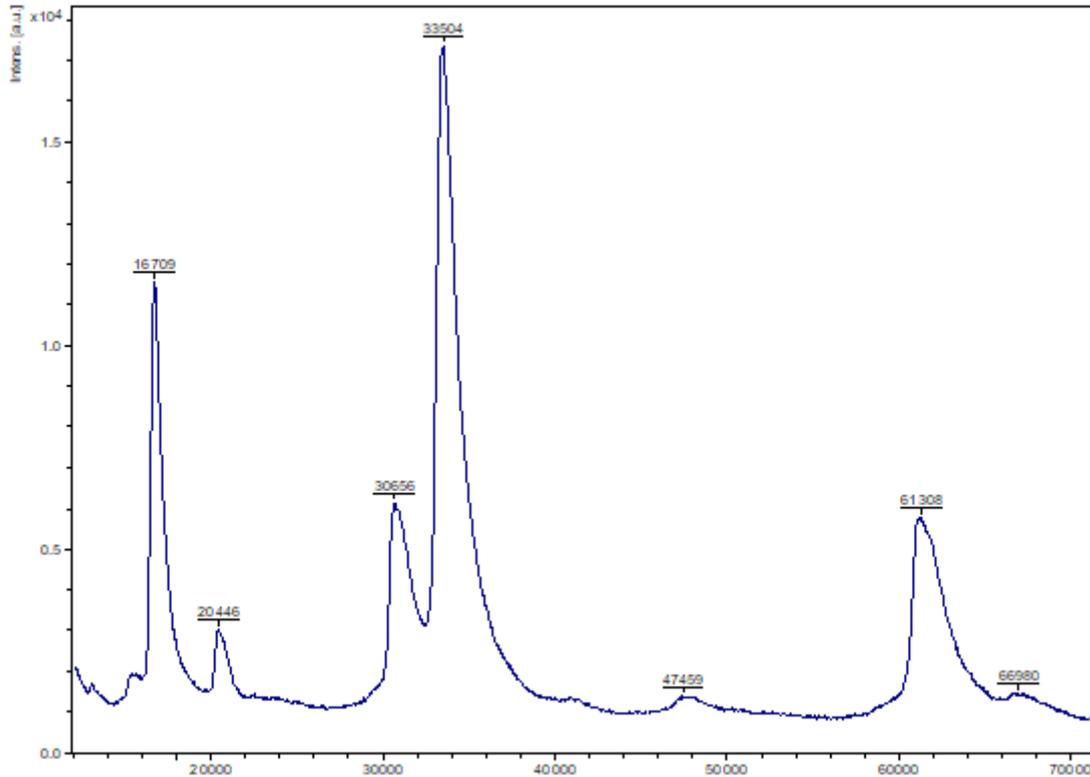


Ilustración 18-Espectro de masas de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> (1ª producción) obtenido con MALDI-TOF (matriz 2,5 DHAP) en agua mQ

#### 5.4.1.3 Inmunoensayo WESTERN-BLOT

Como se explica en el apartado 4.2.11.4, el análisis inmunológico por Western-blot de las tres preparaciones se llevó a cabo mediante dos sistemas de reconocimiento: Una en la que se usa Biotin-Protein L, que se une a las cadenas K ligeras de la cadena del scFv, y otro en el que se usa un anti-6x-HisTag mAb-HRP, un anticuerpo monoclonal que reconoce la cola de histidinas. En la ilustración 19 se puede visualizar el diferente resultado en función de la vía de detección usada.

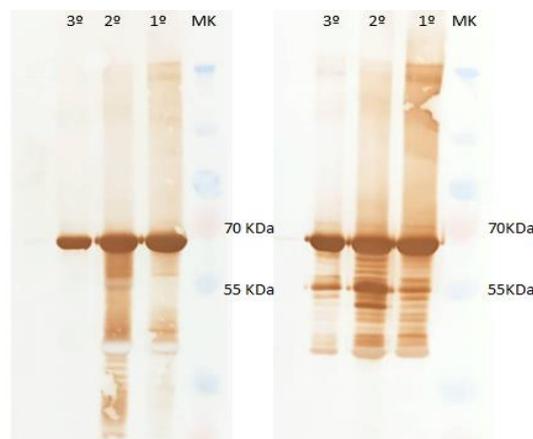


Ilustración 19-Membrana resultante del proceso de Western-Blot. A la izquierda, la detección llevada a cabo con biotin-protein L sobre las tres preparaciones del biopolimero (1ª-3ª). A la derecha, la detección llevada a cabo con 6x-HisTag Monoclonal Antibody-HRP, sobre las mismas preparaciones. El marcador de tamaño coloreado (MK) indica las posiciones más relevantes.

En el caso donde la detección se llevó a cabo con Protein L (Ilustración 19 Izquierda), se visualiza básicamente una banda intensa, correspondiente a scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, puesto que es el único que contiene el lugar de reconocimiento para esta molécula en el bloque del scFv. En este caso se observan otras bandas inferiores, débiles y poco definidas por lo que pueden deberse a interacciones inespecíficas por parte de los componentes del Western Blot (Protein L o Streptavidin), puesto que estas bandas no aparecen ni en el SDS-PAGE (Ilustración 16), ni en el espectro de masas (Ilustración 18).

En el análisis con 6x-HisTag mAb (Ilustración 19.dcha) se puede observar un mayor número de bandas intensas y nítidas. La banda mayoritaria sigue apareciendo a la altura de la molécula intacta de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, pero dado que este mAb se une específicamente a la cola de histidinas del extremo carboxilo, le permite poder detectar también las posibles degradaciones del bloque scFv que conservan ese extremo. Gracias a este experimento, puede confirmarse que todas las impurezas visualizadas en el SDS-PAGE (Ilustración 17) se corresponden con degradaciones del polímero de interés por su extremo amino terminal (es decir, la parte correspondiente al scFv), que sin embargo no son detectadas por la protein L al no tener las cadenas K ligeras que reconoce esta molécula. Entre ellas se incluye la banda de VOK-H<sub>6</sub> que aparece en el MALDI (Ilustración 18) y el pico minoritario de 47.45kDa claramente visible en la segunda preparación y que ahora tiene una movilidad similar a la banda de 55kDa del marcador por efecto del retraso electroforético indicado anteriormente.

## 5.4.2 Caracterización funcional de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>

### 5.4.2.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA

La técnica inmunológica ELISA nos permite comprobar la funcionalidad biológica del polímero, como se ha explicado en el apartado 4.2.11.3, al detectar la molécula EpCAM frente a la que debería unirse el scFv de nuestro biopolímero en caso de que el replegamiento cromatográfico hubiera tenido éxito.

En primer lugar, se realizó un ELISA con el polímero obtenido en el primer lote para definir las concentraciones idóneas. Se hizo con las siguientes condiciones de partida: para el bloqueo, BSA 2%. Las disoluciones madre del polímero scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> y su control negativo, en este caso VOK-H<sub>6</sub> (fragmento del polímero catiónico), era de 50 ng/ml. La Biotin-Protein L se usó a 1:20000, y la streptavidina-HRP a, 1:50000. Con estas condiciones (Condiciones A), se obtuvo la siguiente gráfica (Ilustración 20) variando las concentraciones de los biopolímeros y realizando la normalización de los datos en un parámetro Z (Anexo 1):

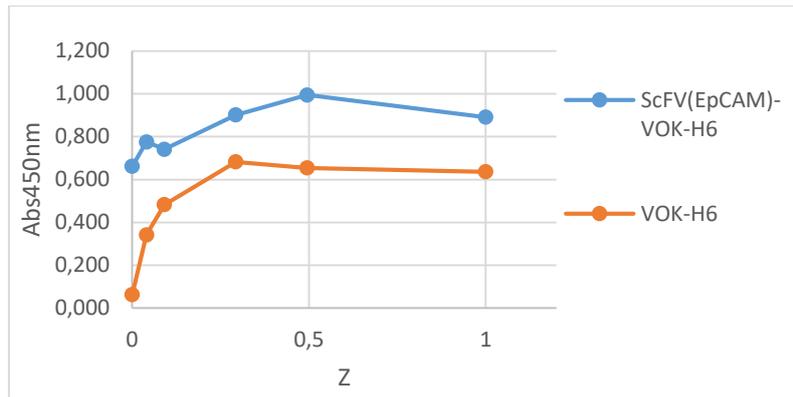


Ilustración 20-Gráfica del primer ELISA realizado con el polímero obtenido en la primera producción, en condiciones A, con un control negativo de VOK-H<sub>6</sub>, un polímero catiónico.

Como se observa, la señal del polímero específico alcanza la saturación a concentraciones muy bajas y en un lapso de revelado demasiado rápido, por lo que se decide repetir el experimento reduciendo las concentraciones de Biotin-Protein L y streptavidina-HRP, a 1:50000 y 1:100000 respectivamente (Condiciones B).

También se observa que el control negativo (VOK-H<sub>6</sub>) genera una señal excesiva, esto se debe a interacciones inespecíficas, ya que ambos polímeros son estructuralmente parecidos. Por tanto, se prueba en el siguiente ELISA la etapa de bloqueo con BSA 5%.

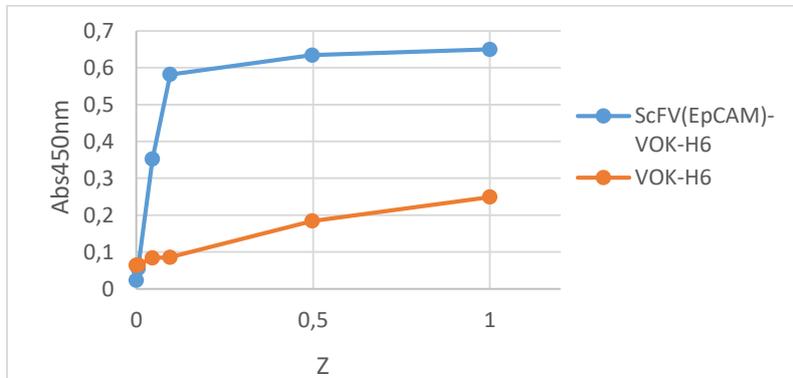


Ilustración 21-Gráfica de un segundo ELISA del polímero procedente de la primera producción, en las condiciones B

En el ELISA con nuevas condiciones (Ilustración 21), la señal específica no alcanza el máximo de absorbancia como antes y el control negativo reduce claramente su señal por lo que se asumen estas condiciones en los siguientes ELISAs.

Con el polímero obtenido de la segunda producción, se realiza el ELISA con las condiciones B, pero usando un control negativo estructuralmente diferente: un polímero tipo elastina aniónico sin bloque adicional. En la ilustración 22, se puede visualizar la gráfica correspondiente a este ELISA.

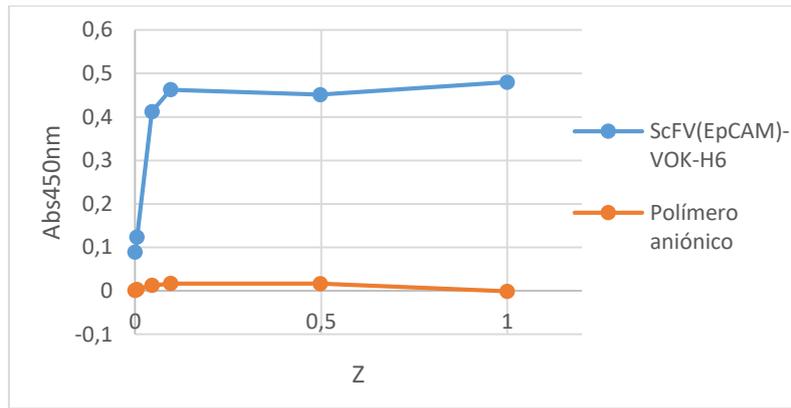


Ilustración 22-Gráfica del ELISA del polímero procedente de la segunda producción, con las condiciones B, y un control negativo de un polímero aniónico

La señal específica se ve que llega a su valor máximo a concentraciones bajas. Esto no es preocupante con respecto al anterior experimento, puesto que se trata del polímero obtenido de otra producción. En el caso del control negativo, la señal es prácticamente nula: no hay ningún tipo de interacción inespecífica. Con esto se puede confirmar que la señal obtenida al usar como control negativo VOK-H<sub>6</sub>, eran efectivamente por interacciones inespecíficas al ser estructuralmente parecido al polímero scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>.

Con el fin de comprobar comparar los polímeros de las tres producciones, se lleva a cabo un último ELISA, en las condiciones B (Ilustración 23) y con los valores de las concentraciones normalizadas según el grado de pureza calculado (Tabla 6). El control negativo analizado volvió a ser el polímero catiónico de los dos primeros ELISA.

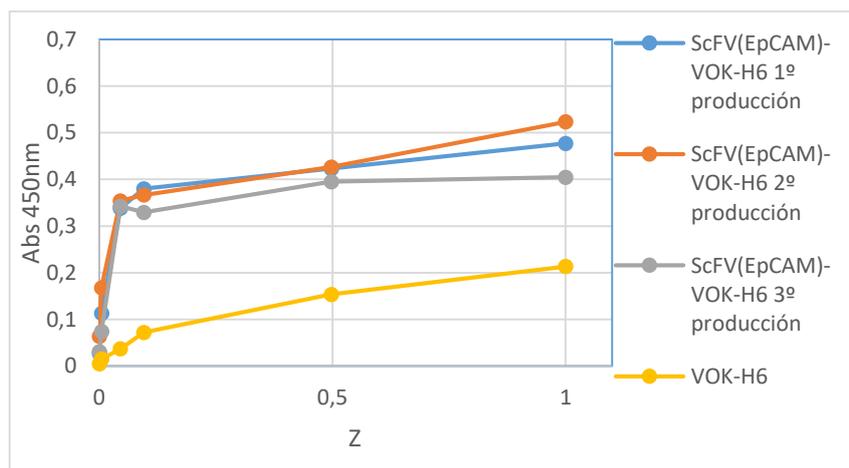


Ilustración 23-Gráfica del ELISA comparativo de los polímeros obtenidos en las tres producciones. Todos los valores se normalizaron con los porcentajes de pureza del polímero de cada producción.

Como puede observarse, las señales observadas con las tres preparaciones de los biopolímeros son claramente similares y las diferencias mínimas pueden deberse al error intrínseco de la técnica que podrían minimizarse repitiendo el ensayo varias veces. La señal observada con el bloque polimérico

se mantuvo a niveles bajos debido a una interacción básicamente inespecífica. Con todo ello podemos afirmar que la efectividad del fragmento de anticuerpo en los biopolímeros aislados respecto al reconocimiento del antígeno específico (EpCAM) son semejantes y que el procedimiento de purificación puede ser mejorado en el aspecto de la degradación proteolítica, pero muestra una alta consistencia respecto a la actividad biológica.

## 5.5 Caracterización del poliplexo

Una vez finalizada la caracterización de los polímeros se procede a la formación del correspondiente poliplexo, y a su caracterización físico-química, y funcional. El poliplexo se forma mediante la complejación del plásmido pCMVmKate2, de peso molecular 2845219.5 g/mol y 4684pb de longitud, con el polímero producido y caracterizado scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, y el polímero VOK-H<sub>6</sub>.

Para ello, se utiliza el polímero obtenido en la tercera producción (ilustración 16 derecha), ajustando las proporciones con biopolímero VOK-H<sub>6</sub> sintetizado previamente en el grupo de investigación para obtener unas relaciones de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>/VOK-H<sub>6</sub> de 2/3, 1/3 y 0/3 (apartado 4.2.11.5). Este último se forma exclusivamente con VOK-H<sub>6</sub>, con el fin de hacer una comparación de poliplexos con scFv y otros sin él.

Las tres relaciones de biopolímero se mezclan con el plásmido aislado manteniendo una relación de grupos amino/grupo fosfato de 50:1, según la proporción previamente optimizada por el grupo Smart Devices for NanoMedicine [31] .

### 5.5.1 Caracterización físico-química del poliplexo

#### 5.5.1.1 Dynamic Light Scattering, DLS

En esta técnica se analiza el diámetro hidrodinámico (d.H), carga superficial (Potencial Z) y la estabilidad del poliplexo formado con las tres condiciones descritas anteriormente. También se realiza una medida del tamaño del plásmido para poder comparar el antes y el después de haber sido complejado.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 7 mientras que en las ilustraciones 24 y 25 se exponen las representaciones gráficas de las distribuciones de tamaños y cargas obtenidos mediante esta técnica.

Tabla 7 - Valores obtenidos del poliplexo con DLS de tamaño y potencial Z para las tres condiciones y tamaño del plásmido pCMVmKate sin complejar. \* Valor extraído de la bibliografía [32].

	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)
<b>A (2/3 scFv-VOK-H<sub>6</sub>/VOK-H<sub>6</sub>)</b>	235.9	+16.79
<b>B (1/3 scFv-VOK-H<sub>6</sub>/VOK-H<sub>6</sub>)</b>	234.6	+21.45
<b>C (0/3 scFv-VOK-H<sub>6</sub>/VOK-H<sub>6</sub>)</b>	271.0	+36.56
<b>Plásmido pCMVmKate2</b>	1576.5	<-50*

Como puede observarse, entre los poliplexos formados con scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> no hay diferencia apreciable de tamaño mientras que el formado únicamente con VOK-H<sub>6</sub> presenta un diámetro hidrodinámico superior. Por otro lado, los poliplexos con scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> tienen una distribución de tamaños inferior al otro, por eso en la curva de la ilustración 24, se ven curvas más finas que en el caso del VOK-H<sub>6</sub>, con una distribución de tamaños muy amplia según su curva gaussiana.

También se observa como el plásmido sin complejar tiene un tamaño muy superior (1.5 μm) a todos los poliplexos y la carga negativa es claramente muy elevada. Con este dato se puede entender el nivel de condensación alcanzado gracias a la complejación.

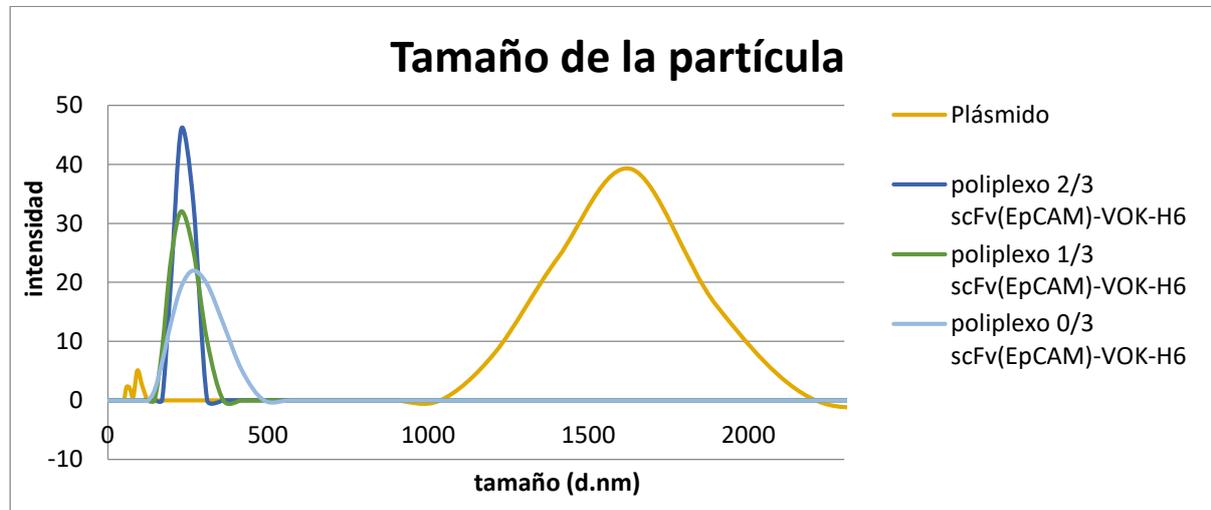
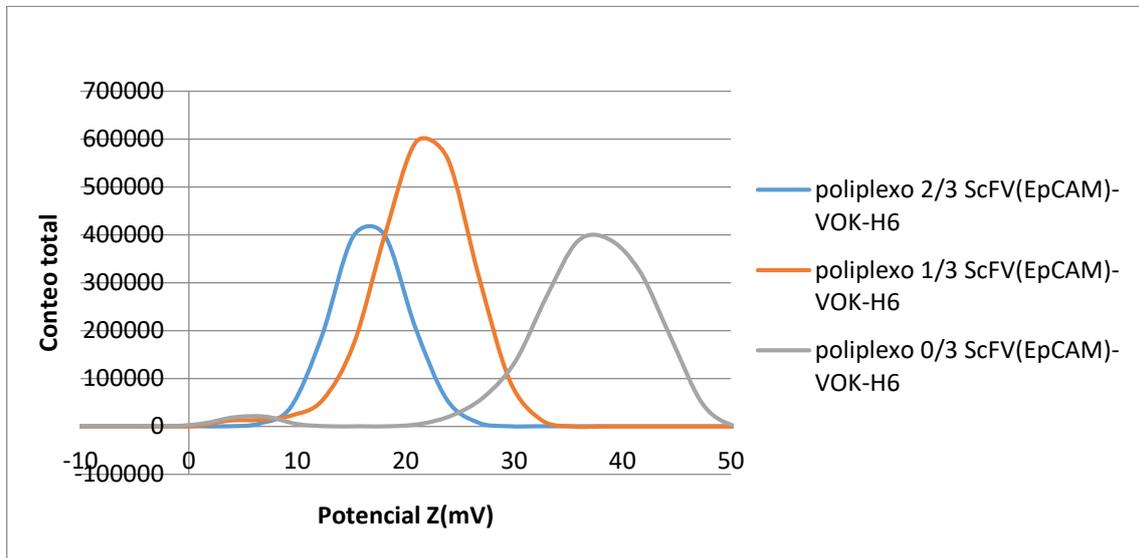


Ilustración 24-Gráfica de los tamaños del poliplexo para las tres condiciones usadas y del plásmido pCMVmKate2

Por otro lado, el potencial Z, que da una idea de la carga superficial de la partícula, debe tener un valor suficientemente positivo para poder interactuar con las membranas de la célula y así poder entrar en esta. También, debe tener un valor lo más alejado de 0, así serán más estables los poliplexos: se repelen entre sí, y tienen menos tendencia a asociarse. En estos valores se aprecia más diferencia entre las dos ratios con scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, donde se puede observar que la carga positiva expuesta es inversamente proporcional a la cantidad de scFv presente en su superficie. El poliplexo formado

exclusivamente con VOK-H<sub>6</sub> será el más estable de los 3 con una carga de +36.5mV en su superficie. Cuando aumenta la cantidad de scFv se enmascara la carga positiva del VOK-H<sub>6</sub>, pero al mismo tiempo se reduce el efecto de repulsión y se estrecha la curva del tamaño obteniendo partículas más compactas.



*Ilustración 25-Gráfica del potencial Z de los poliplexos obtenidas en las tres condiciones*

En conclusión, se puede afirmar que la ratio 1/3 es el que mejor resultado da, puesto que en ambos casos el tamaño es parecido, pero el potencial Z es ligeramente superior que en el 2/3, lo que quiere decir que los poliplexos serán más estables y potencialmente más eficaces.

#### 5.5.1.2 Espectroscopia de RMN ordenada por difusión, 2D DOSY NMR.

No se llegaron a obtener resultados concluyentes de este experimento, debido a la baja concentración de la muestra en las disoluciones, que dificultaba mucho la obtención del DOSY, al no poderse discernir bien las señales.

Por falta de tiempo, no se pudo repetir el experimento a tiempo, con unas muestras con una concentración más adecuada.

#### 5.5.1.3 Atomic Force Microscopy, AFM

En las siguientes ilustraciones, se pueden observar las diferentes imágenes obtenidas mediante las dos estrategias descritas en el apartado 4.2.11.6.

Como se ha explicado en este apartado, se obtienen 3 tipos de imagen: la imagen de amplitud, la imagen de fases, que da una idea del cambio de fase en la superficie cuando se produce un desfase en

la oscilación del cantilever consecuencia de la interacción de la punta con la superficie, y la imagen de *Height Retrace*, que es la imagen obtenida a partir de la señal que llega al fotodiodo. La escala de rojos que se ve en esta imagen, que difiere de la escala de grises observadas en las otras dos, es una modificación de la imagen para que sea mas visual. De esta imagen se obtiene la reconstrucción 3D, donde puede verse de forma mas exacta la altura. Esta altura no es la que tiene el poliplexo en realidad, puesto que en las proteínas se produce una adsorción con la mica, y eso se traduce en un descenso de la altura.

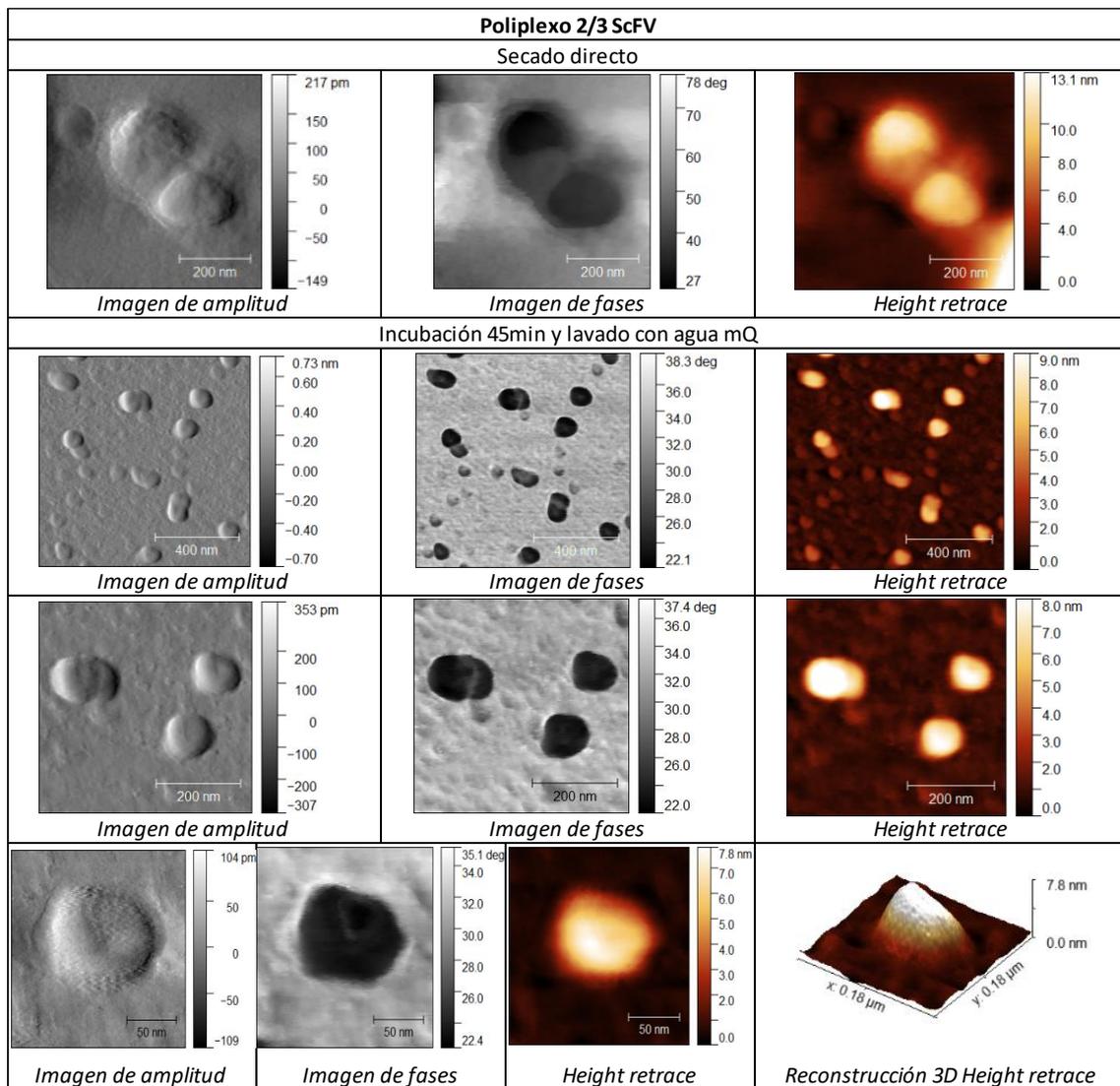


Ilustración 26-Imágenes obtenidas con AFM del poliplexo formado con 2/3 de scFv, utilizando las dos estrategias de análisis: secado directo, e incubación durante 45 min y lavado con agua mQ

En las imágenes obtenidas mediante secado directo del poliplexo formado por 2/3 de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, se observa la agregación de dos poliplexos. En las obtenidas después de haber lavado con agua mQ, se pueden visualizar poliplexos aislados. Los tamaños, alrededor de 150nm, son inferiores a los obtenidos por

DLS, pero es debido al proceso de secado al que se ha sometido la muestra con el fin de que los poliplexos se queden adheridas a la superficie de la mica [33]. Además, son dos técnicas distintas, ya que en el DLS lo que se mide es el diámetro hidrodinámico, y en este se observa una imagen 3D del poliplexo.

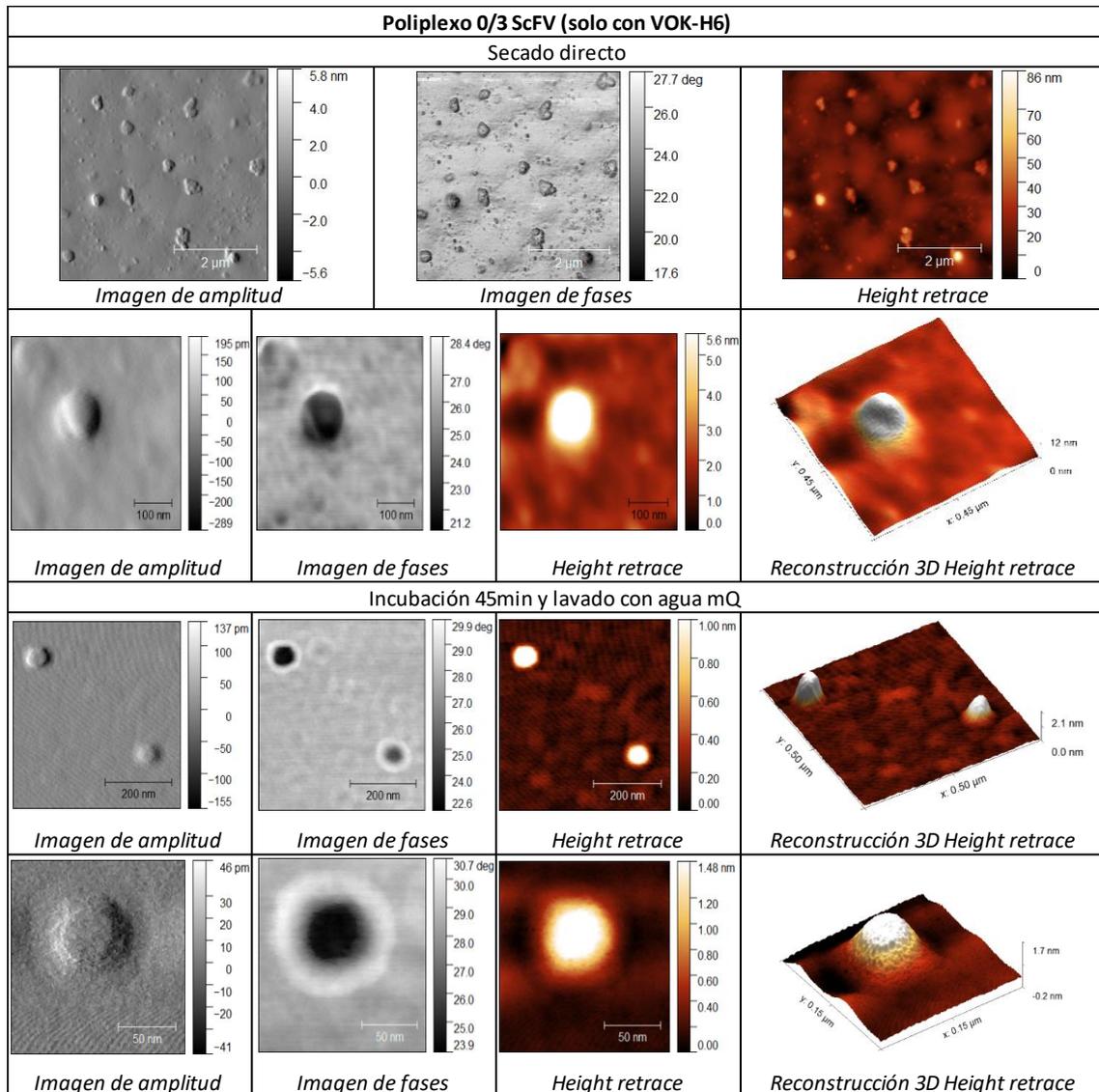


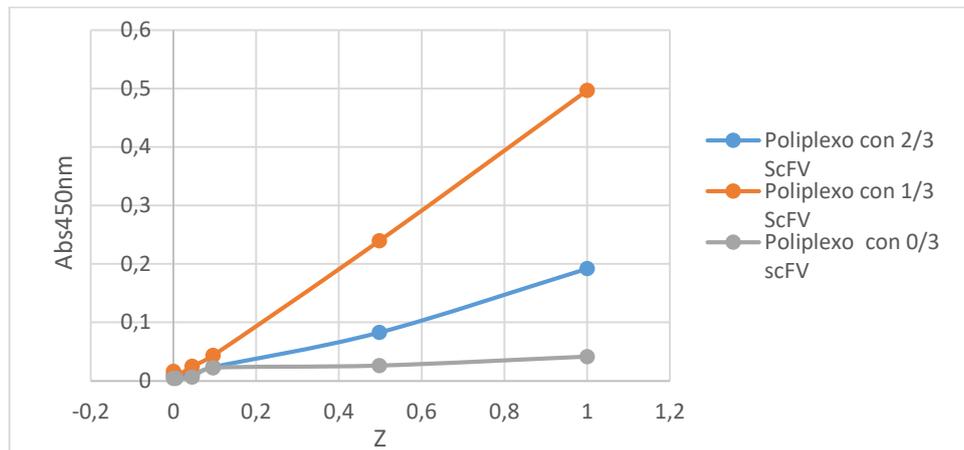
Ilustración 27-Imágenes obtenidas con AFM del poliplexo formado con 0/3 de scFv, utilizando las dos estrategias de análisis: secado directo, e incubación durante 45 min y lavado con agua mQ.

En este caso, los poliplexos tienen un tamaño inferior al obtenido con DLS, que como se ha explicado antes, no es preocupante, puesto que son dos técnicas diferentes, y en el DLS el experimento se realiza en disolución, mientras que aquí se realiza un secado, que provoca que los poliplexos se compacten.

## 5.5.2 Caracterización funcional del poliplexo

### 5.5.2.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA

Con este ELISA se pretende comprobar la funcionalidad de los poliplexos en las tres condiciones, con 2/3, 1/3 y 0/3 de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>. Las condiciones que se utilizan son las descritas en el apartado 5.4.2.1, condiciones B. Se normalizaron los datos de concentración con el parámetro Z:



*Ilustración 28-ELISA llevado a cabo con los poliplexos formados con 2/3, 1/3 y 0/3 de polímero con scFv, Este último cumple la función de control negativo, puesto que no tiene ningún tipo de especificidad por EpCAM al estar formado únicamente con VOK-H<sub>6</sub>*

Se puede observar que la mayor señal se obtiene con el poliplexo formado con 1/3 de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>. Se intuye que la razón es debido a su menor concentración de scFv con respecto al poliplexo con 2/3 de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, puesto que, en estas condiciones, sufre un efecto estérico menor, lo que le dota de una mayor eficiencia de unión a EpCAM. Habría que llevar a cabo otro estudio con poliplexos formados con menor concentración de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, con el propósito de obtener la mejor relación scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>/VOK-H<sub>6</sub>.

El poliplexo formado con 0/3 de scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, da una señal mucho más baja debido posiblemente a interacciones inespecíficas. Esto era un resultado esperado, dado que este poliplexo no contiene moléculas de scFv que le permitan unirse específicamente a la molécula de EpCAM.

Cabe destacar que el punto obtenido en Z=0.5 (a una concentración de 0.77ng/μL), es ya significativo, puesto que se puede empezar a observar una diferencia entre las señales marcadas.

Con este experimento queda confirmada la funcionalidad del poliplexo, puesto que se une de forma específica a EpCAM, por lo que puede ser una estrategia exitosa en las terapias génicas dirigidas.

## 6. Conclusiones

1-Se ha llevado a cabo la producción del polímero quimérico scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> usando dos condiciones: una primera producción en un cultivo de 5.6L, en condiciones de temperaturas de 37°C durante la noche, y una segunda producción en un cultivo de 1.6L, pero incubando primero durante 6 horas a 37°C, y luego llevándolo a 4°C durante un fin de semana. En ambos casos se ha llevado un control exhaustivo de los parámetros que lo regían. El rendimiento obtenido ha sido mucho mejor en las condiciones de 4°C durante un fin de semana: a pesar de que en estas condiciones la producción de las bacterias era inferior, el crecimiento bacteriano era superior.

2-La purificación de este ELR se ha realizado mediante una cromatografía de afinidad. La carga de la muestra se he llevado a cabo en columna, y en método Batch. Las diferencias de rendimiento en ambos casos no son muy significativas, por lo que ambos métodos son igual de válidos.

3- Se ha realizado una caracterización físico-química y funcional del polímero en la que se ha podido comprobar la existencia de degradaciones en el bloque correspondiente al fragmento proteico scFv. Sin embargo, estas impurezas no solo no impiden la formación del poliplexo, si no que se tienen en cuenta para disminuir la cantidad de scFv y los impedimentos estéricos que pueda causar. También se ha confirmado la funcionalidad del polímero mediante un ELISA.

4- Se ha comprobado que el polímero scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> es eficaz a la hora de complejar el plásmido pCMVmKate2, formando un poliplexo, que se ha caracterizado física y funcionalmente. Mediante la técnica DLS se obtuvo un diámetro hidrodinámico en torno los 230 nm, mientras que con AFM, se obtuvo un tamaño de 150 nm. Esto es debido al secado previo al que se somete la muestra en el caso del AFM. Dado que el tamaño del plásmido es de 1576.5 nm, se puede confirmar la gran capacidad de complejamiento que posee el ELR.

5-Se ha confirmado mediante un ELISA la funcionalidad de del poliplexo, y que a mayor cantidad de scFv, menor eficiencia debido a impedimentos estéricos. Por lo tanto, se puede afirmar que el ELR producido podría tener futuro en aplicaciones biomédicas, ya que es capaz de formar un poliplexo funcional mediante la complejación de un plásmido con funciones terapéuticas.

## 7. Perspectivas de futuro

Dada la degradación observada a lo largo del proceso de purificación del ELR scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, habría que llevar a cabo una optimización de este proceso, con el fin de reducir aún más el efecto de las proteasas, o probar con otras cepas bacterianas que carezcan de estas.

Para poder determinar la ratio scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>/VOK-H<sub>6</sub> ideal para la formación de poliplexos, se podrían realizar más ensayos con ratios menores a los usados en este trabajo, puesto que se pudo ver que la ratio 1/3 era más adecuado que la ratio 2/3.

Por último, sería conveniente probar los poliplexos formados con el polímero quimérico scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> como terapia génica dirigida específica contra cánceres epiteliales que presenten la sobreexpresión de la molécula de adhesión celular EpCAM.

## 8. Bibliografía

- [1] J. Park and R. S. Lakes, "1.1 Definition of Biomaterials," *Biomater. An Introd. Third Ed.*, pp. 2–8, 2007, Accessed: Jun. 24, 2022. [Online]. Available: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84900722378&partnerID=tZOtx3y1%5Cnhttp://link.springer.com/10.1007/978-0-387-37880-0>
- [2] F. Montoliu Climent, "Biomateriales I - Clasificaciones de los materiales," *Rev. la R. Acadèmia Med. Catalunya*, vol. 8, no. 3, pp. 139–151, 1993, [Online]. Available: <http://www.raco.cat/index.php/RevistaRAMC/article/viewArticle/87469/0>
- [3] "Encyclopedia Brtitannica <https://www.britannica.com/science/polymer> (accessed April 11, 2022)."
- [4] R. P. Sarah Rauscher, "The liquid structure of elastin," *Elife*, 2017.
- [5] "Elastina - Dicciomed: Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico." <https://dicciomed.usal.es/palabra/elastina> (accessed Apr. 11, 2022).
- [6] S. M. Mithieux and A. S. Weiss, "Elastin," *Adv. Protein Chem.*, vol. 70, pp. 437–461, 2005, doi: 10.1016/S0065-3233(05)70013-9.
- [7] H. Reiersen, A. R. Clarke, and A. R. Rees, "Short elastin-like peptides exhibit the same temperature-induced structural transitions as elastin polymers: implications for protein engineering," *J. Mol. Biol.*, vol. 283, no. 1, pp. 255–264, Oct. 1998, doi: 10.1006/JMBI.1998.2067.
- [8] T. Kowalczyk, K. Hnatuszko-Konka, A. Gerszberg, and A. K. Kononowicz, "Elastin-like polypeptides as a promising family of genetically-engineered protein based polymers," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 30, no. 8, pp. 2141–2152, 2014, doi: 10.1007/S11274-014-1649-5.
- [9] J. C. Rodríguez-Cabello, J. Reguera, A. Girotti, F. J. Arias, and M. Alonso, "Genetic engineering of protein-based polymers: The example of elastinlike polymers," *Adv. Polym. Sci.*, vol. 200, no. 1, pp. 119–167, 2006, doi: 10.1007/12\_047.
- [10] J. C. Rodríguez-Cabello, S. Prieto, J. Reguera, F. J. Arias, and A. Ribeiro, "Biofunctional design of elastin-like polymers for advanced applications in nanobiotechnology," <http://dx.doi.org/10.1163/156856207779996904>, vol. 18, no. 3, pp. 269–286, Mar. 2012, doi: 10.1163/156856207779996904.
- [11] J. S. Barbosa, R. R. Costa, A. M. Testera, M. Alonso, J. C. Rodríguez-Cabello, and J. F. Mano, "Multi-layered films containing a biomimetic stimuli-responsive recombinant protein,"

- Nanoscale Res. Lett.*, vol. 4, no. 10, pp. 1247–1253, Sep. 2009, doi: 10.1007/S11671-009-9388-5/FIGURES/4.
- [12] J. C. Rodríguez-Cabello, I. González de Torre, A. Ibañez-Fonseca, and M. Alonso, “Bioactive scaffolds based on elastin-like materials for wound healing,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 129, pp. 118–133, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.ADDR.2018.03.003.
- [13] J. C. Rodríguez-Cabello, A. Girotti, A. Ribeiro, and F. J. Arias, “Synthesis of genetically engineered protein polymers (recombinamers) as an example of advanced self-assembled smart materials,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 811, pp. 17–38, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-388-2\_2.
- [14] R. Aggarwal, M. Targotra, B. Kumar, P. . Sahoo, and M. K. Chauhan, “Polyplex: A Promising Gene Delivery System,” *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.*, vol. 12, no. 6, pp. 4681–4686, 2019, doi: 10.37285/ijpsn.2019.12.6.1.
- [15] Z. A. Ahmad, S. K. Yeap, A. M. Ali, W. Y. Ho, N. B. M. Alitheen, and M. Hamid, “ScFv antibody: Principles and clinical application,” *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/980250.
- [16] A. Armstrong and S. L. Eck, “EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 2, no. 4, pp. 320–325, 2003, doi: 10.4161/cbt.2.4.451.
- [17] J. U. Schmohl, M. Felices, D. Todhunter, E. Taras, J. S. Miller, and D. A. Vallera, “Oncotarget 73830 www.impactjournals.com/oncotarget Tetraspecific scFv construct provides NK cell mediated ADCC and self-sustaining stimuli via insertion of IL-15 as a cross-linker.” [Online]. Available: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
- [18] L. Huang *et al.*, “Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review),” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 42, no. 4, pp. 1771–1785, 2018, doi: 10.3892/ijmm.2018.3764.
- [19] R. N. Souları, M. Basafa, M. Rajabibazl, and A. Hashemi, “Effective Strategies to Overcome the Insolubility of Recombinant ScFv Antibody against EpCAM Extracellular Domain in E. coli,” *Int. J. Pept. Res. Ther.*, vol. 26, no. 4, pp. 2465–2474, Dec. 2020, doi: 10.1007/S10989-020-10044-4.
- [20] Y. K. Sung and S. W. Kim, “Recent advances in the development of gene delivery systems,” *Biomater. Res. 2019 231*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, Mar. 2019, doi: 10.1186/S40824-019-0156-Z.
- [21] “Terapia génica, una nueva estrategia terapéutica | Offarm.” <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-terapia-genica-una-nueva-estrategia-13019956> (accessed May 03, 2022).
- [22] “Terapia génica: ¿Qué es y para qué sirve?” [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272005000100002](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000100002) (accessed May 03, 2022).
- [23] M. J. Piña, A. Girotti, S. Serrano, R. Muñoz, J. C. Rodríguez-Cabello, and F. J. Arias, “A double safety lock tumor-specific device for suicide gene therapy in breast cancer,” *Cancer Lett.*, vol. 470, no. October 2019, pp. 43–53, 2020, doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.031.
- [24] “Crecimiento bacteriano: curva, fases, factores.” <https://www.lifeder.com/curva-crecimiento-bacteriano/> (accessed Jun. 26, 2022).
- [25] Malvern and M. Instruments, “Dynamic Light Scattering : An Introduction in 30 Minutes,” *Tech. Note MRK656-01*, pp. 1–8, 2011, [Online]. Available: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Dynamic+Light+Scattering+>

:+An+Introduction+in+30+Minutes#3

- [26] M. J. Piña, A. Girotti, M. Santos, J. C. Rodríguez-Cabello, and F. J. Arias, “Biocompatible ELR-Based Polyplexes Coated with MUC1 Specific Aptamers and Targeted for Breast Cancer Gene Therapy,” *Mol. Pharm.*, vol. 13, no. 3, pp. 795–808, 2016, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00712.
- [27] “Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy | Manchester NMR Methodology Group.” <https://nmr.chemistry.manchester.ac.uk/?q=node/25> (accessed Jun. 22, 2022).
- [28] C. M. Chatzigiannis, S. Kiriakidi, A. G. Tzakos, and T. Mavromoustakos, “Chapter 18 in Drug Delivery Systems,” vol. 2207, pp. 235–246.
- [29] G. R. Crespo, E. Carbonero, and V. Sánchez, “Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) modos de Atómica (AFM), modos de operación y aplicaciones,” 2013.
- [30] M. Cruz, R. González, and J. Castellón-Urbe, “Microscopio de Fuerza Atómica”.
- [31] M. J. Piña *et al.*, “Elastin-like recombinamers with acquired functionalities for gene-delivery applications,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 103, no. 10, pp. 3166–3178, Oct. 2015, doi: 10.1002/JBM.A.35455.
- [32] “APPLICATION NOTE Malvern Instruments Worldwide Sales and service centres in over 65 countries The use of zeta potential and DLS measurements in gene therapy research”, Accessed: Jun. 23, 2022. [Online]. Available: [www.malvern.com/contact](http://www.malvern.com/contact)
- [33] H. Armando Estupiñan Duran, D. Yesid Peña Ballesteros, P. Escobar Rivero, C. Vásquez Quintero, Y. Karina Anaya, and L. Marcela Gelves Jerez, “ESTUDIO DE LA ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE SUPERFICIES DE ACIDO POLILÁCTICO MEDIANTE TÉCNICAS GRAVIMÉTRICAS Y ELECTROQUÍMICAS ADSORPTION STUDY OF PROTEINS ON SURFACES OF POLY-LACTIC ACID BY USING ELECTROCHEMICAL AND MICROGRAVIMETRIC TECHNIQUES DIONISIO ANTONIO LAVERDE CATAÑO,” vol. 78, pp. 167–175, 2011.

## 9. Abreviaturas

**Abreviaturas utilizadas en el presente, ordenadas alfabéticamente:**

Abreviatura	Nombre completo	Abreviatura	Nombre completo
Abs	Absorbancia	PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
BSA	Albúmina sérica bovina	[pb]	Pares de bases
[Da]	Dalton	PBS	Phosphate-buffered saline
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato	PSA	Persulfato amónico
DLS	Dynamic light scattering	PMSF	Fluoruro de fenilsulfonilmetano
DNA	Deoxyribonucleid acid	PVDF	Fluoruro de polivinildeo
DTT	Ditioltreititol	RNA	Oxyribonucleic acid
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	RNAsa	Ácido ribonucleasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	[rpm]	Revoluciones por minuto
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	scFv	Anticuerpo monocatenario de fragmento variable
ELP	Polímero tipo elastina	SDS	Dodecilsulfato sódico

ELR	Recombinámero tipo elastina	SPE	Extracción en fase sólida
EpCAM	Glicoproteína de adhesión epitelial celular	TAE	Tris-ácido acético-EDTA
[g]	gravedad	TB	Terrific Broth
HRP	Peroxidasa de rábano	TBS	Tris buffered saline
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia	TEMED	Tetrametiletilendiamina
ITT	Transición inversa con la temperatura	Tt	Temperatura de transición
LB	Lysogeny Broth	TOF	Analizador de tiempo de vuelo
LB AIM	Lysogeny Broth Auto Induction Media	Tris	Tris-Hidroximetilaminometano
MALDI	Sistema de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz	(VPGKG)	Pentapéptido VPGKG
m/q	Masa/carga	(VPGKG) <sub>n</sub>	Polipentapéptido VPGKG

**Código de representación de aminoácidos:**

<b>Nombre</b>	<b>Código de tres letras</b>	<b>Código de una letra</b>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido Glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	He	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalalina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Valina	Val	V

## 10. Anexos

### Anexo 1

#### ELISA ELR primera producción 1

Tabla 8-Datos ilustración 20 del primer ELISA llevado a cabo con el ELR obtenido de la primera producción. Las medidas se realizaron por triplicado. El polímero y el VOK-H<sub>6</sub> se disolvieron con las concentraciones descritas en la primera celda, pero dado que lo que se pretende cuantificar es el scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, se tuvo en cuenta la pureza obtenida de este (tabla 6). Por ello, se llevó a cabo una normalización de los datos.

C (ng/μL)	C (ng/μL) teniendo en cuenta la pureza del ELR	z	Abs scFv(EpCAM)-VOK-H <sub>6</sub>	Desviación estándar	Abs VOK-H <sub>6</sub>	Desviación estándar
30.65	28.534	0.000	0.661	0.085	0.063	0.021
153.25	142.671	0.040	0.776	0.122	0.342	0.004
306.49	285.342	0.091	0.741	0.129	0.483	0.027
919.47	856.027	0.293	0.901	0.009	0.682	0.068
1532.45	1426.711	0.495	0.995	0.154	0.654	0.025
3064.9	2853.422	1.000	0.891	0.114	0.637	0.044

#### ELISA ELR primera producción 2

Tabla 9- Datos ilustración 21 del segundo ELISA llevado a cabo con el ELR obtenido de la primera producción. Las medidas se realizaron por triplicado. El polímero y el VOK-H<sub>6</sub> se disolvieron con las concentraciones descritas en la primera celda, pero dado que lo que se pretende cuantificar es el scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, se tuvo en cuenta la pureza obtenida de este (tabla 6). Por ello, se llevó a cabo una normalización de los datos.

C (ng/μL)	C (ng/μL) teniendo en cuenta la pureza del ELR	z	Abs scFv(EpCAM)-VOK-H <sub>6</sub>	Desviación estándar	Abs VOK-H <sub>6</sub>	Desviación estándar
0.008	0.007	0.000	0.023	0.010	0.010	0.002
0.015	0.014	0.005	0.055	0,003	0.011	0.002
0.077	0.071	0.045	0.353	0.103	0.029	0.003
0.153	0.143	0.095	0.582	0.062	0.032	0.026
0.766	0.713	0.497	0.634	0.066	0.130	0.014
1.533	1.427	1.000	0.650	0.087	0.195	0.018

### ELISA ELR segunda producción

Tabla 10. Datos ilustración 22 del ELISA llevado a cabo con el ELR obtenido de la segunda producción. Las medidas se realizaron por triplicado. El polímero de interés y el polímero aniónico usado como control negativo se disolvieron con las concentraciones descritas en la primera celda, pero dado que lo que se pretende cuantificar es el scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, se tuvo en cuenta la pureza obtenida de este (tabla 6). Por ello, se llevó a cabo una normalización de los datos.

C(ng/μL)	C(ng/μL) teniendo en cuenta la pureza del ELR	z	Abs scFv(EpCAM)-VOK-H <sub>6</sub>	Desviación estándar	Abs polímero aniónico	Desviación estándar
0.008	0.006	0.000	0.089	0.073	0.001	0.004
0.015	0.013	0.005	0.123	0.063	0.003	0.006
0.077	0.064	0.045	0.412	0.091	0.013	0.010
0.153	0.129	0.095	0.463	0.092	0.017	0.018
0.766	0.644	0.497	0.451	0.018	0.016	0.011
1.533	1.289	1.000	0.480	0.081	-0.001	0.001

### ELISA de los ELRs obtenidos en las tres producciones

Tabla 11- Datos ilustración 23 del ELISA comparativo entre los tres scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub> obtenido en las diferentes producciones. Las medidas se realizaron por duplicado. Los polímeros y el VOK-H<sub>6</sub> se disolvieron con las concentraciones descritas en la primera celda, pero dado que lo que se pretende cuantificar es el scFv(EpCAM)-VOK-H<sub>6</sub>, se tuvieron en cuenta la pureza obtenida de estos (tabla 6). Por ello, se llevó a cabo una normalización de los datos.

C(ng/μL)	C(ng/μL) teniendo en cuenta la pureza del ELR			z	Abs 1 <sup>o</sup> producción	Desviación estándar
	ELR 1 <sup>o</sup> prod.	ELR 2 <sup>o</sup> prod.	ELR 3 <sup>o</sup> prod.			
0.008	0.007	0.006	0.005	0.000	0.028	0.032
0.015	0.014	0.013	0.010	0.005	0.113	0.090
0.077	0.071	0.064	0.051	0.045	0.338	0.053
0.153	0.143	0.129	0.102	0.095	0.380	0.035
0.766	0.713	0.644	0.509	0.497	0.423	0.007
1.533	1.427	1.289	1.018	1.000	0.477	0.000
z	Abs 2 <sup>o</sup> producción	Desviación estándar	Abs 3 <sup>o</sup> producción	Desviación estándar	Abs VOK-H <sub>6</sub>	Desviación estándar
0.000	0.064	0.057	0.031	0.019	0.005	0.003
0.005	0.168	0.052	0.074	0.004	0.015	0.007
0.045	0.354	0.023	0.342	0.022	0.037	0.004
0.095	0.367	0.100	0.329	0.022	0.072	0.007
0.497	0.426	0.064	0.395	0.046	0.153	0.003
1.000	0.523	0.163	0.405	0.008	0.213	0.010

## ELISA poliplexos

Tabla 12- Datos ilustración 28 del ELISA llevado a cabo con los poliplexos. Estos se disolvieron con las concentraciones descritas en la primera celda. Las medidas se realizaron por duplicado. En este caso, como se pretende saber cuál de los tres tiene mayor eficiencia, no se tiene en cuenta el porcentaje de scFv para obtener la gráfica. Aun así, se llevó a cabo una normalización de los datos.

C(ng/μL)	z	Abs 2/3	Desviación estándar	Abs 1/3	Desviación estándar	Abs 0/3	Desviación estándar
0.008	0.000	0.009	0.004	0.016	0.007	0.004	0.010
0.015	0.005	0.009	0.000	0.007	0.000	0.004	0.010
0.077	0.045	0.010	0.001	0.025	0.004	0.006	0.009
0.153	0.095	0.024	0.001	0.044	0.004	0.022	0.029
0.766	0.497	0.083	0.027	0.239	0.000	0.026	0.031
1.533	1.000	0.192	0.025	0.497	0.030	0.041	0.052

## Anexo 2

Tabla 13-Cantidades para el SDS-PAGE.

	<i>Resolving Gel</i>				<i>Stacking Gel</i>
	7.5%	10%	12%	15%	4%
mQ	4.10mL	3.62 mL	3.25mL	2.69mL	1.585 mL
Tris pH 8,8 1,5M	1.88mL	1.88 mL	1.88mL	1.88mL	
Tris pH 6,8 0,5M					0.625mL
Acrilamida	1.40mL	1.875 mL	2.25mL	2.81mL	250 μL
SDS 10%	75μL	75μL	75μL	75μL	18.75 μL
PSA 10%	37.5μL	37.5μL	37.5μL	37.5μL	18.75 μL
TEMED	3.75μL	3.75μL	3.75μL	3.75μL	2.35μL

### Anexo 3



Ilustración 29-Mapa de restricción del plásmido pCMVmKate, con los puntos de corte de las enzimas EcoRI y HindIII indicados

### Anexo 4

Tabla 14-Grados de pureza según los valores de absorbancia en muestras de DNA obtenidos con el NanoDrop One<sup>c</sup>

<u>Relación</u>	<u>Valor (Uds. Absorbancia)</u>	<u>Pureza</u>
<b>A260/A280</b>	≥1.8-2.1	DNA de pureza óptima
	≥1.6-1.7	DNA de pureza aceptable
	<1.6	Presencia de compuestos aromáticos
	>2.1	DNA contaminado con RNA
<b>A260/A230</b>	>2-2.2	DNA de pureza óptima
	>1.8	DNA de pureza aceptable
	<1.8	DNA contaminado con sales, fenoles, hidratos de carbono
	<1.5	DNA altamente contaminado con sales, fenoles, hidratos de carbono