



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Diseño y síntesis de un polímero tipo elastina para la generación de nanopartículas dosificadoras de fármacos en células de alta vascularidad

Autora:

Irene Bugarín Labrador

Tutores:

Dr. Francisco Javier Arias

Dra. Alessandra Girotti

Año:

2023/2024

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	6
1. RESUMEN.....	9
2. INTRODUCCIÓN.....	10
2.1. BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA	10
2.2. CLONACIÓN DE DNA.....	10
2.2.1. Herramientas de clonación: sistemas vectoriales	11
2.2.2. Herramientas de clonación: enzimas	12
2.3. BIOMATERIALES: ELASTINA Y POLÍMEROS TIPO ELASTINA.....	14
2.3.1. Elastina.....	15
2.3.2. Polímeros tipo elastina (ELP)	16
2.4. NANOPARTÍCULAS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS.....	18
2.4.1. Dibloque El	18
2.4.2. LAEL	19
2.4.3. VCAM.....	19
3. OBJETIVOS	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1. MATERIALES	22
4.1.1. Reactivos químicos.....	22
4.1.2. Disoluciones tamponadas.....	23
4.1.2.1. <i>Tampones comerciales para enzimas</i>	23
4.1.2.2. <i>Disoluciones tampón</i>	23
4.1.3. Marcadores de pesos moleculares y disoluciones de teñido de geles ...	23
4.1.4. Materiales de Biología Molecular y bioproducción	24
4.1.4.1. <i>Medios de cultivo bacteriano</i>	24
4.1.4.2. <i>Cepas bacterianas</i>	24
4.1.4.3. <i>Enzimas</i>	25
4.1.4.3.1. <i>Enzimas de restricción</i>	25
4.1.4.3.2. <i>Otras enzimas</i>	25

4.1.4.4.	<i>Vectores plasmídicos</i>	26
4.1.4.4.1.	<i>Vector de clonación</i>	26
4.1.4.4.2.	<i>Vector de expresión</i>	26
4.1.4.5.	<i>Kits de purificación y extracción de DNA</i>	27
4.2.	MÉTODOS	28
4.2.1.	Preparación de placas Petri para cultivo bacteriano	28
4.2.2.	Transformación bacteriana	28
4.2.3.	Cultivo bacteriano en medio líquido	29
4.2.4.	Purificación de DNA plasmídico	29
4.2.4.1.	<i>Protocolo NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid)</i>	30
4.2.4.2.	<i>Protocolo QuantumPrep® Plasmid MidiPrep Kit</i>	30
4.2.5.	Digestión con enzimas de restricción.....	30
4.2.6.	Defosforilación de DNA	31
4.2.7.	Ligación de DNA.....	32
4.2.8.	Electroforesis de DNA	32
4.2.9.	Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa	33
4.2.10.	Determinación de la concentración y pureza de DNA	33
4.2.11.	Secuenciación de DNA.....	34
4.2.12.	Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	34
4.2.13.	Selección de colonias para la producción del polímero	35
4.2.14.	Protocolo de bioproducción de ELPs.....	36
4.2.15.	Purificación de ELPs	38
4.2.16.	Caracterización físico-química de ELPs	39
4.2.16.1.	<i>Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	39
4.2.16.2.	<i>Espectrometría de masas (MALDI-TOF)</i>	39
4.2.16.3.	<i>Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)</i>	40
4.2.16.4.	<i>Dispersión de luz dinámica (DLS)</i>	40
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1.	CONSTRUCCIÓN DEL GEN VCAM-LAEL-EI.....	42

5.1.1.	Amplificación y purificación del plásmido pD-LAEL-EI	42
5.1.2.	Escisión y purificación del inserto LAEL-EI	43
5.1.3.	Amplificación, linealización y purificación del plásmido p7-VCAM.....	43
5.1.4.	Ligación de p7-VCAM y LAEL-EI	45
5.1.5.	Amplificación del plásmido p7-VCAM-LAEL-EI	45
5.2.	SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO p7-VCAM-LAEL-EI	46
5.3.	BIOPRODUCCIÓN DEL ELP VCAM-LAEL-EI	47
5.4.	PURIFICACIÓN DEL ELP VCAM-LAEL-EI	49
5.5.	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL ELP VCAM-LAEL-EI	51
5.5.1.	SDS-PAGE	51
5.5.2.	MALDI-TOF	52
5.5.3.	RMN	54
5.5.4.	DLS	57
6.	CONCLUSIONES.....	60
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	61
ANEXOS	67
	ANEXO I. Espectros de masas.....	67
	ANEXO II. Asignación de protones en aminoácidos	69
	ANEXO III. Distribución de tamaño del polímero en rampa de temperatura (DLS) ..	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosín Trifosfato
bp	Pares de bases
BPB	Azul de bromofenol (<i>BromoPhenol Blue</i>)
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
cfu	unidades formadoras de colonias
Da	Dalton
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato (<i>DiHydroxiAcetone Phosphate</i>)
DLS	Dispersión de luz dinámica (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>DesoxiriboNucleic Acid</i>)
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELP	Polímero tipo elastina (<i>Elastin-Like Polymer</i>)
EPR	Efecto de permeación y retención aumentada (<i>Enhanced Permeability and Retention effect</i>)
FastAP	Fosfatasa alcalina termosensible (<i>Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i>)
¹ H-RMN	Espectro RMN de protón
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation spectroscopy</i>
Kan	Kanamicina
LB	<i>Luria Bertrani</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization + Time Of Flight</i>
MCS	Sitios de clonación múltiple (<i>Multiple Cloning Sites</i>)
NP	Nanopartícula
o/n	<i>over-night</i> , tiempo de espera a lo largo de una noche (16-18h)
ORI	Sitio de origen de replicación
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
pDA	pDriveAll, vector de clonación
PDI	Índice de polidispersidad (<i>PolyDispersity Index</i>)
pDNA	DNA plasmídico
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonio (<i>PhenilMetylSulfonyl Fluoride</i>)

PSA	Persulfato amónico
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico (<i>RiboNucleic Acid</i>)
rSAP	Fosfatasa alcalina de camarón (<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>)
SDS	Dodecilsulfato de sodio (<i>Sodium DodecylSulphate</i>)
SDS-PAGE	<i>PolyAcrilamide Gel Electrophoresis with SDS</i>
SOC	Medio de crecimiento super óptimo con supresor de catabolismo (<i>Super Optimal broth with Catalitic suppressor</i>)
SPE	Extracción en fase sólida (<i>Solid-Phase Extraction</i>)
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
TEMED	Tetrametilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
T _t	Temperatura de transición
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular (<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>)
δ	Desplazamiento químico
#	Número de colonia

CÓDIGO DE REPRESENTACIÓN DE BASES NITROGENADAS

NOMBRE	CÓDIGO DE 1 LETRA
Adenina	A
Citosina	C
Guanosina	G
Timina	T
Uracilo	U

CÓDIGO DE REPRESENTACIÓN DE AMINOÁCIDOS

NOMBRE	CÓDIGO DE 3 LETRAS	CÓDIGO DE 1 LETRA
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Set	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Valina	Val	V

1. RESUMEN

La elastina es una proteína de alto interés en el área de la Ciencia de biomateriales, debido a sus propiedades de autoensamblaje, resistencia y elasticidad. El análisis de su estructura permitió establecer una relación entre dicha estructura y las cualidades físico-químicas de la molécula, despertando un interés por la síntesis de nuevos materiales con un comportamiento similar. Así, surgen los polímeros tipo elastina (ELP), que se obtienen mediante técnicas de ingeniería genética, permitiendo sintetizar moléculas de alta complejidad. La posibilidad de modificar las propiedades de estas moléculas para llevar a cabo diversas funciones, así como su elevada biocompatibilidad, hace de los ELP unos excelentes candidatos para el desarrollo de biomateriales con aplicación en el área de la Biomedicina. En este trabajo se ha diseñado un gen recombinante tipo elastina que codifica para el polímero VCAM-LAEL-EI, cuya secuencia de aminoácidos determina su funcionalidad y autoensamblado en forma de micelas en disolución acuosa. Para su síntesis se han empleado distintas cepas de la bacteria hospedadora *Escherichia coli* (*E. coli*), que posee una sencilla maquinaria de replicación y traducción de DNA. La caracterización físico-química del ELP sintetizado se ha realizado mediante diversas técnicas: SDS-PAGE, MALDI-TOF, RMN y dispersión de luz dinámica (DLS).

ABSTRACT

Elastin is a protein of great interest in the area of Biomaterials Science due to its self-assembling, resistance and elasticity properties. Analysis of its structure enabled the establishment of a correlation between such structure and the physicochemical properties of the molecule, thereby sparking an interest in the synthesis of new materials with similar behavior. Thus, elastin-like polymers (ELP) have emerged, obtainable through genetic engineering techniques and allowing the synthesis of highly complex molecules. The possibility of modifying the properties of such molecules to carry out various functions, as well as their high biocompatibility, makes ELPs excellent candidates for the development of biomaterials with application in the field of Biomedicine. In this work, a recombinant elastin-like gene encoding for the polymer VCAM-LAEL-EI has been designed, and whose amino acid sequence determines its functionality and self-assembly in micelle form in aqueous solution. Different strains of the host bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*), known to possess a simple DNA replication and translation machinery, have been used for its synthesis. The physicochemical characterization of the synthesized ELP has been performed by several techniques: SDS-PAGE, MALDI-TOF, NMR and direct light scattering (DLS).

2. INTRODUCCIÓN

2.1. BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

La Biología Molecular es la disciplina científica que estudia los procesos que se desarrollan en los seres vivos desde un punto de vista molecular. Se ocupa principalmente de “la comprensión de las interacciones entre los sistemas celulares, especialmente entre el DNA (ácido desoxirribonucleico), RNA (ácido ribonucleico) y la síntesis de proteínas, y cómo se regulan estas interacciones” [1]. Su impulso como ciencia surge en el año 1953 con la propuesta de la estructura del DNA por Watson y Crick [2] y, desde entonces, los avances tecnológicos han permitido una gran evolución de esta disciplina, así como el desarrollo de nuevas técnicas de investigación, en las que nos centraremos en este trabajo [3].

La Ingeniería Genética o Tecnología del DNA recombinante se define como el conjunto de técnicas y metodologías que permiten el aislamiento, selección y manipulación del DNA de un organismo, posibilitando el control y la transferencia del material genético del mismo organismo o entre varios [4]. Así, se han podido obtener grandes avances en investigación en numerosos campos como la Bioquímica, Medicina, Farmacología, Ciencias forenses o incluso Agricultura, permitiendo el desarrollo de nuevas técnicas o la síntesis de nuevos materiales.

2.2. CLONACIÓN DE DNA

Una de las bases para la Ingeniería Genética son las técnicas de clonación de DNA. La clonación de DNA consiste en la introducción de un fragmento de DNA, denominado inserto, dentro de una molécula de DNA, denominada vector, que puede replicarse de manera autónoma e independiente al material genético de la célula hospedadora, para obtener así copias idénticas de dicho segmento génico y células modificadas genéticamente [5].

La estrategia general de clonación sigue una serie de pasos necesarios: identificación del gen y extracción, unión a un sistema vectorial y, por último, transferencia a otro organismo hospedador para su ampliación (Figura 1). Para ello, se emplean una serie de herramientas: vectores de clonaje y enzimas de restricción.

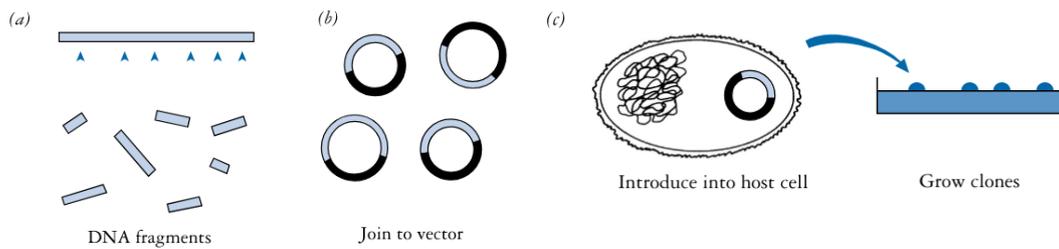


Figura 1. Esquema de la estrategia general de clonación. a) Identificación de los fragmentos génicos y aislamiento del DNA. b) Unión de los fragmentos de DNA al vector de clonaje. En la imagen se muestra un vector plasmídico. c) Introducción del vector en una célula huésped para su cultivo. [6]

2.2.1. Herramientas de clonación: sistemas vectoriales

Los sistemas vectoriales o vectores de clonación son moléculas de DNA de doble cadena, de secuencia y mapa de restricción conocidos, con capacidad de albergar un fragmento de DNA exógeno. Existen varios tipos de vectores de clonación, como bacteriófagos, cósmidos, cromosomas artificiales y plásmidos. [5]

Estos últimos, empleados en este trabajo, son moléculas de DNA circular (pDNA) de un tamaño entre 2 y 5 kbp y que pueden albergar insertos de hasta 15000 bp (pares de bases). Se diferencian dos tipos de vectores plasmídicos con los que llevar a cabo una clonación: vectores de clonación, cuya finalidad es el almacenamiento de secuencias y obtención de grandes cantidades de DNA, y vectores de expresión, que permiten la expresión del gen y por tanto la producción de proteínas y en nuestro caso, del polímero.

Los elementos básicos que conforman un vector de clonación son: un origen de replicación (ORI), que es único y permite realizar una replicación unidireccional; un marcador de selección, gen que confiere resistencia a un antibiótico, y un sitio de clonación múltiple (MCS, *Multiple Cloning Site*), que alberga una serie de secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción y en el que se produce la inserción de fragmentos de DNA. Los vectores de expresión cuentan, además, con un sitio de unión al ribosoma, precedente a la secuencia que codifica para el codón de iniciación de la traducción (AUG).

Como célula hospedadora se pueden emplear diferentes huéspedes: bacterias, levaduras, baculovirus, células humanas, *etc.* En este trabajo se emplean bacterias, por su facilidad de manipulación, propagación y ya que se conoce bien su secuencia reguladora de la expresión génica.

2.2.2. Herramientas de clonación: enzimas

Las herramientas moleculares que permiten la manipulación del DNA son las enzimas. Se han utilizado diferentes clases:

Las enzimas de restricción o endonucleasas representan uno de los grupos de enzimas más importantes para la manipulación del DNA. Catalizan la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster del DNA de doble cadena cuando reconocen patrones de secuencia específicos (Figura 2), generando fragmentos de DNA conocidos como fragmentos de restricción. La serie de fragmentos originados por el corte con una o varias enzimas se denomina mapa de restricción, y permite la caracterización del DNA.

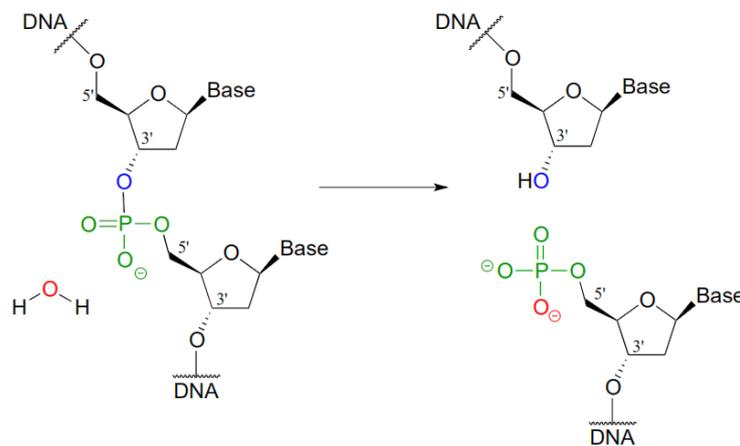


Figura 2. Mecanismo de hidrólisis del enlace fosfodiéster de una cadena de DNA por una enzima de restricción [7].

Las enzimas de restricción se agrupan en tres familias de acuerdo con sus propiedades: Tipo I, II, III. Las endonucleasas Tipo I y III reconocen secuencias específicas de DNA y cortan a una distancia variable y no específica de la secuencia, poseen actividad metilasa y se mueven a lo largo de la molécula de DNA con gasto energético (ATP). Sin embargo, las más empleadas en Ingeniería genética son las Tipo II, que reconocen y cortan la secuencia de DNA en un punto definido. Estas últimas suelen reconocer secuencias palindrómicas de 4 a 6 nucleótidos y siempre cortan en la misma secuencia, generando extremos romos o cohesivos (Figura 3). Los extremos romos se generan por corte en el centro del palíndromo, sin dejar bases desapareadas, mientras que los extremos cohesivos dejan de 2 a 4 nucleótidos desapareados en cada extremo resultante. Estos extremos cohesivos pueden aparearse entre sí o con otros extremos cohesivos complementarios de otros fragmentos de DNA [8].

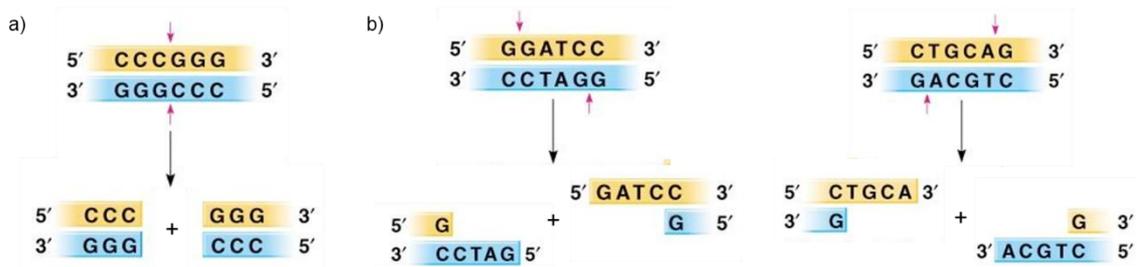
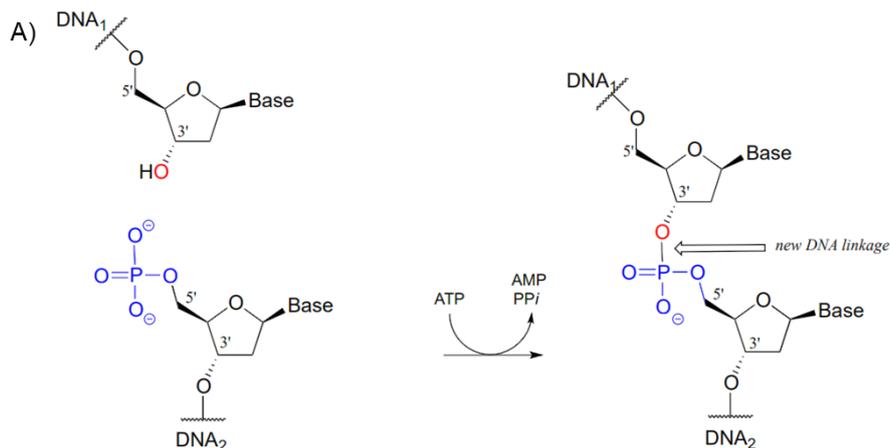


Figura 3. Tipos de corte generados por endonucleasas Tipo II. a) Extremos romos. b) Extremos cohesivos, con sobresaliente en 5' (izquierda) y 3' (derecha). [9]

La nomenclatura de las enzimas restricción se define del siguiente modo: tres letras en cursiva, correspondientes al género (primera letra) y especie (segunda y tercera letra) de la bacteria de la que han sido aisladas; una letra correspondiente a la cepa bacteriana, si la hay y, por último, un número romano que diferencia endonucleasas aisladas de la misma cepa, por orden de descubrimiento.

Si bien las enzimas de restricción cortan las hebras de DNA, otra herramienta clave será aquella que actúe como “pegamento molecular”. Las enzimas de ligación o ligasas son enzimas que catalizan la formación de uniones covalentes fosfodiéster entre diferentes fragmentos de DNA complementarios, permitiendo así la creación de nuevas moléculas recombinantes (Figura 4A).

Por último, las enzimas alcalinas fosfatasa catalizan la defosforilación de los extremos generados por los cortes con las enzimas de restricción, para prevenir la ligación no deseada de fragmentos de DNA con extremos cohesivos (Figura 4B).



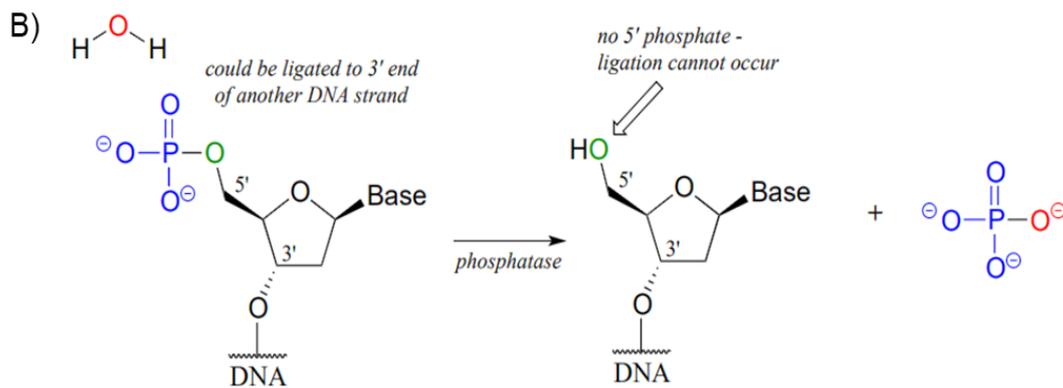


Figura 4. A) Mecanismo de formación de enlace fosfodiéster catalizado por enzimas de ligación.
B) Mecanismo de defosforilación catalizado por enzimas fosfatasas alcalinas [7].

2.3. BIOMATERIALES: ELASTINA Y POLÍMEROS TIPO ELASTINA

Se define biomaterial como “sustancia diseñada para adoptar una forma y que [...] se utiliza para dirigir, mediante el control de las interacciones con componentes de sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico”. [10]

Habitualmente empleados como soportes estructurales, esto es, prótesis funcionales, los biomateriales también abarcan otros usos en aplicaciones médicas como agentes de contraste de imágenes, productos de ingeniería tisular o sistemas de administración de fármacos, resultando esta última aplicación de especial interés en este trabajo. Antes de los años 50, la tasa de rechazo del huésped a estos materiales era muy elevada y por ello, ha sido el objetivo de las últimas décadas la comprensión de las interacciones entre los biomateriales y los sistemas vivos, primando el desarrollo de nuevos biomateriales que cumplan una serie de requisitos de funcionalidad, durabilidad y biocompatibilidad [11]. La biocompatibilidad se refiere a "la capacidad de un material para actuar con una respuesta adecuada del huésped en una aplicación específica" [12] y, por tanto, debe definirse no sólo en función del material, sino de la relación material-huésped. Factores como la temperatura, el pH o el lugar de aplicación pueden afectar al comportamiento del material, y por ello se busca la mimetización de éste con otros de origen natural. Así, las proteínas estructurales de origen natural se sitúan en el foco de atención, y una rama de la investigación en biomateriales se enfoca en la síntesis de polímeros proteicos basados en estas proteínas. Este trabajo se centra en la elastina, y en la síntesis de polímeros proteicos basados en su estructura [13, 14].

2.3.1. Elastina

La elastina es una proteína fibrosa estructural presente en la matriz extracelular de las células del tejido conjuntivo de animales vertebrados, sobre todo en pulmones, arterias, piel y ligamentos, a los que confiere propiedades elásticas [15] y que se origina a partir de su precursor tropoelastina. Este monómero de peso aparente de 70 kDa se compone principalmente de residuos aminoacídicos apolares entre los que se incluyen Glicina (G), Valina (V) y Prolina (P). Se diferencian dos tipos de dominios en su estructura: un dominio hidrofóbico, que se basa en la repetición de secuencias aminoacídicas de tipo VPGXG (con X= cualquier aminoácido salvo prolina), y un dominio hidrofílico que contiene residuos de lisina (K). La oxidación de estas lisinas por acción de lisil-oxidasas provoca el entrecruzamiento de la tropoelastina, originando así las fibras de elastina [16-18]. En humanos, la secuencia peptídica predominante en la elastina es VPGVG, en este trabajo nos centraremos en este pentapéptido.

Estudios anteriores de la estructura de la elastina [19, 20] relacionan la secuencia aminoacídica de la proteína con sus propiedades elásticas, y proponen un modelo de horquilla o *loop*- β , derivada de las prolinas que generan giros estructurales repetidos periódicamente en la secuencia peptídica, y la presencia de glicinas que poseen libertad de giro. Actualmente este modelo se toma como base para la comprensión del comportamiento del polímero, estudiando los factores termodinámicos.

En disolución acuosa, y dada la hidrofobicidad de las cadenas laterales de los aminoácidos que componen en su mayor parte la elastina, la conformación nativa del polipéptido (o sus derivados) es en forma plegada o agregada. Sin embargo, esta estructura es lábil y bajo acción de una fuerza puede estirarse, sufriendo una deformación de > 150% [21] y recuperando la forma una vez finalizado el esfuerzo. En esta forma estirada, los grupos hidrofílicos del polipéptido quedan orientados hacia el interior de las fibras, permitiendo la acumulación de agua en su interior, con una hidratación entre el 40 y 60% en composición [22]. Estudios recientes [23] defienden que la recuperación de la estructura nativa se debe principalmente a efectos hidrofóbicos. Sin embargo, hasta la fecha se ha considerado que la fuerza de re- enrollamiento de la elastina está favorecida entrópicamente en un 85% [21] y, por tanto, no se consideran factores excluyentes.

Así, desde el punto de vista termodinámico, el estado estirado se encuentra desfavorecido por la exposición al exterior de los grupos hidrofóbicos. A bajas temperaturas, sin embargo, se favorece la estructura, ya que se genera una interacción entre los aminoácidos hidrofóbicos y el agua en forma de clatrato, que es ligeramente

exotérmica y por tanto reduce el factor entrópico. Por otro lado, a altas temperaturas, se favorece la superioridad del factor entrópico sobre el entálpico, de modo que se desestabiliza la estructura de clatrato y las cadenas laterales hidrofóbicas interaccionan entre sí para dar lugar a un agregado o coacervado (Figura 5) [24, 25].

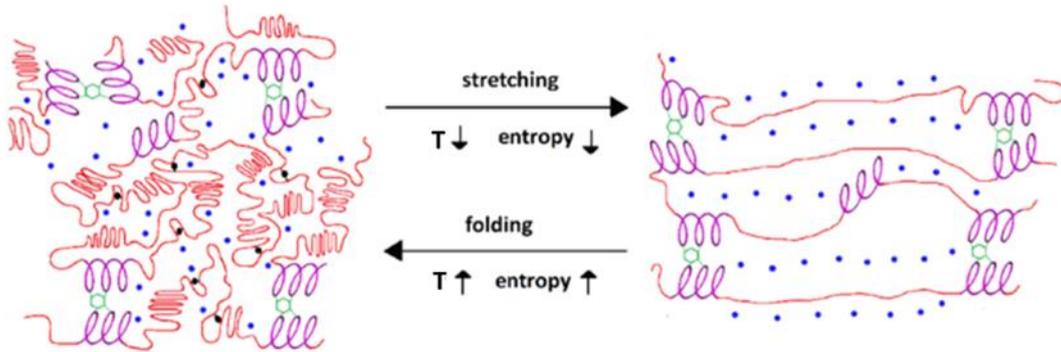


Figura 5. Esquema del cambio conformacional de la elastina de su estado agregado (izquierda) a estirado (derecha) en función de la temperatura. Se representan: dominios hidrofílicos (magenta), entrecruzamiento entre dominios hidrofílicos (verde), dominios hidrofóbicos (rojo), enlaces de hidrógeno inter-peptídicos (negro), agua (azul). [16]

Como se observa, la transición entre ambos estados con la temperatura resulta opuesta al comportamiento habitual esperado en proteínas globulares (soluble a altas temperaturas e insoluble a bajas temperaturas), por lo que se define como un sistema con transición inversa con la temperatura. Esta temperatura de cambio entre la conformación agregada y la estirada se denomina temperatura de transición (T_t o TT).

La transición inversa es dependiente no solo de la T_t , sino también de otros factores físicos del medio (fuerza iónica, pH, etc.). Las técnicas de ingeniería genética permiten la modificación o adición de secuencias aminoacídicas que componen un polipéptido de modo que modulen el comportamiento de dicho péptido ante estos factores, brindando así la posibilidad de síntesis de numerosos polímeros proteicos con propiedades diversas. [26]

2.3.2. Polímeros tipo elastina (ELP)

Los polímeros tipo elastina (ELPs, *Elastin-Like Polymers*) son biopolímeros artificiales con un esqueleto molecular basado en las secuencias peptídicas presentes en los dominios elastoméricos de la elastina natural. El modelo para este tipo de polímeros consiste en la repetición del pentapéptido $(VPGXG)_n$, donde el residuo "X" puede ser cualquier aminoácido a excepción de la Prolina (P) [27]. Todos los ELP que presentan esta fórmula general son funcionales, y presentan una naturaleza "Smart", esto es, una transición inversa con la temperatura sin pérdida de materia ni energía [28], y la

temperatura de transición será dependiente de la naturaleza del aminoácido X y del número de repeticiones (n) del esqueleto [29]. Entre sus propiedades, además, destaca su biocompatibilidad y carácter de autoensamblado [30].

Sin embargo, la síntesis de ELPs a partir de productos naturales o bien por métodos químicos presenta una serie de problemas, como la falta de control en la longitud de la cadena polipeptídica a sintetizar, en la estereoquímica y la especificidad del producto. Además, supone un alto coste y el uso de disolventes contaminantes [31]. Como solución, se plantea la síntesis de estos polímeros mediante técnicas de DNA recombinante.

La modificación de los genes permite la alteración de las propiedades fisicoquímicas y biológicas del polímero a sintetizar, logrando una alta especificidad para su aplicación y con alto grado de complejidad [32]. Entre otras ventajas en su síntesis se destaca el empleo de disolventes no contaminantes, presentándose así como una alternativa más verde [33].

La síntesis de genes que codifican para la producción de los ELP se realiza a través del método iterativo-recursivo (Figura 6), que permite controlar tanto el orden de adición como el número de fragmentos de DNA que componen el gen codificante para el polímero. Como requisito, los fragmentos de DNA de interés contenidos en vectores plasmídicos deben estar flanqueados por sitios de restricción de una subclase de endonucleasas denominada II S (2.2.2) para poder seccionarlos. Así, a través de ciclos de clonación denominados *seamless cloning* o “sin costuras” se pueden construir los genes de forma unidireccional y sin introducir DNA exógeno y, por ende, aminoácidos indeseados en los sitios de unión [34].

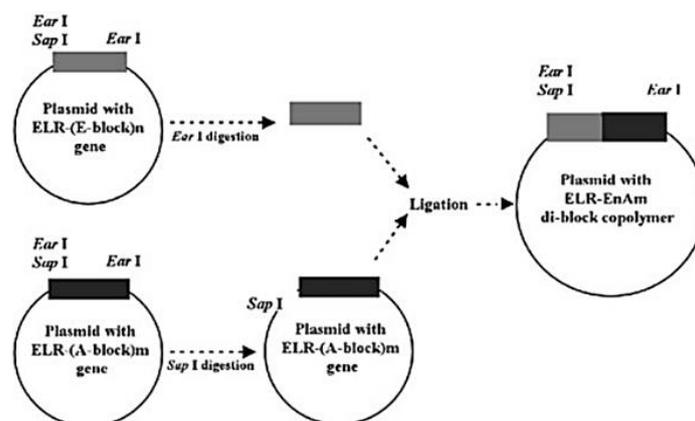


Figura 6. Esquema de síntesis de un nuevo gen mediante el método iterativo-recursivo. [34]

2.4. NANOPARTÍCULAS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

Debido a su biocompatibilidad, el estudio de las aplicaciones de ELP se centra mayormente en sus numerosas posibilidades de aplicación en el campo de la medicina [35, 36]. En los últimos años ha despertado interés la posibilidad de uso de ELPs para formar vehículos, como nanopartículas (NPs), para la administración de fármacos, y así solventar la problemática de la especificidad en los tratamientos y eliminación de residuos en el cuerpo [37]. Puesto que la síntesis de ELP está genéticamente enfocada, permite realizar modificaciones muy específicas de las secuencias del polipéptido en función de las propiedades deseadas para éste. Asimismo, su comportamiento sensible a la temperatura puede aprovecharse no sólo para su autoensamblaje, sino para la liberación del tratamiento bajo demanda y de forma dirigida a las células diana, de modo que se redistribuye para no incidir en órganos vitales y disminuir así los posibles efectos secundarios del tratamiento [38].

Uno de los usos de los ELP como nanoportadores, y en el que nos centraremos en este trabajo, es en la formación de micelas poliméricas [39]. Estas son muy estables en ambientes fisiológicos, y la posibilidad de modificar sus aminoácidos hidrofóbicos les permite distribuir fármacos insolubles en agua, que quedarán encapsulados en el centro de la molécula (Figura 7).

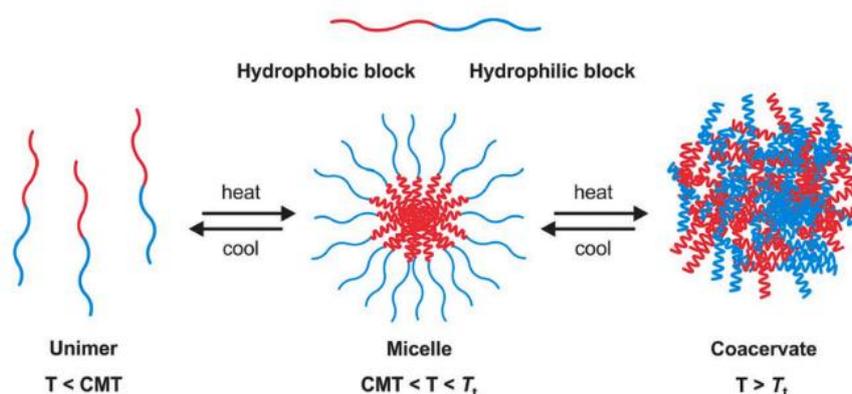


Figura 7. Esquema de la transición inversa de la temperatura de ELP que forma micelas poliméricas. CMT: Temperatura crítica micelar. [39]

2.4.1. Dibloque EI

En este trabajo se construye un ELP con un esqueleto anfifílico, compuesto por un bloque hidrofóbico (I) que contiene Isoleucina sustituyendo la primera Valina del pentapéptido y un bloque hidrofílico (E) que contiene ácido Glutámico en la posición huésped. La estructura del dibloque EI se muestra en la Figura 8. Esta estructura primaria dará lugar, al superar la T_t , a la formación de micelas, donde el *core*, o interior,

comprende la parte hidrofóbica y la corona, o exterior, la parte hidrofílica, con un diámetro aproximado de 50 nm y una T_t esperada de 15 °C [40].



Figura 8. Estructura del bloque EI y secuencias aminoacídicas que lo componen.

La presencia de los residuos de Glu afecta a la solubilidad del polímero en función del pH, que deberá regularse para su purificación a través de ciclos de cambio de temperatura (4.2.15). Además, la carga superficial del polímero puede afectar a las interacciones con la bicapa lipídica de la membrana celular. Las NP con carga neta negativa o neutra no interactúan de manera inespecífica con la membrana celular, de carga también negativa, y entrarán en las células siguiendo la vía endocítica [29].

2.4.2. LAEL

Para seguir la vía endocítica anteriormente descrita es necesario que el gen del polímero a sintetizar contenga una secuencia con carácter portador. La secuencia LAEL (LAELLAELLAEL) es un polipéptido pequeño que permite la internalización celular del polímero a través de endosomas. Durante la maduración de los endosomas tiene lugar una disminución del pH (\sim pH 5) y la secuencia LAEL cambia de conformación de bucle a α -hélice en la membrana endo-lisosomal. Este cambio conformacional aumenta la permeabilización de la membrana celular y permite el escape endosómico del polímero [41].

En tratamientos oncológicos, los nanoportadores aprovechan las características anormales de los tejidos cancerosos, como su elevada vascularización de tipo aberrante con amplias fenestraciones y falta de drenaje linfático. Esta característica se denomina efecto de permeación y retención aumentada o EPR (*“Enhanced Permeability and Retention effect”*), y provoca que las nanopartículas portadoras de fármaco se acumulen en las zonas de alta vascularidad a concentraciones altas y queden retenidas durante un período de tiempo mayor [42].

2.4.3. VCAM

Con el objeto de aportar direccionalidad al polímero tipo elastina se incluye una secuencia de adhesión celular vascular o VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*). Para comprender su función, primero se deben aclarar unos conceptos básicos.

El factor de necrosis tumoral alfa o TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) es una proteína perteneciente a la familia de las citoquinas liberada por células del sistema inmunitario y que regula la respuesta inflamatoria, provocando la expresión de otras citoquinas o de moléculas de adhesión celular, como pueden ser ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*) y VCAM-1, de interés en este trabajo [43]. VCAM-1 es una glicoproteína transmembrana cuya expresión tiene lugar en la superficie de las células del endotelio. En situaciones de niveles de inflamación elevados o condiciones crónicas en algunas enfermedades, como artritis reumatoide, asma, rechazo a trasplantes o cáncer, también puede expresarse en la superficie de otras células [44]. VCAM-1 interviene en la respuesta inflamatoria mediante el reclutamiento de leucocitos, ayudándose de distintos ligandos como $\alpha\beta$ -integrinas [45]. La unión de distintos ligandos a VCAM-1 en la superficie de las células endoteliales puede inducir una cascada de señalización que activa el flujo de calcio a través de la membrana, ocasionando la extravasación de los leucocitos [46].

La inclusión de una secuencia VCAM en el polímero tipo elastina provoca su dirección hacia células de alta vascularidad en las que se ha generado la respuesta inflamatoria, logrando una alta especificidad del tratamiento y evitando su dispersión a órganos vitales para minimizar los efectos secundarios.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es la bioproducción y posterior caracterización del polímero tipo elastina (ELP) VCAM-LAEL-EI que, debido a su composición (2.42.4), actúa como nanopartícula transportadora micelar en condiciones fisiológicas. Este ELP incorpora un sistema peptídico de afinidad por células de alta vascularidad, como pueden ser células cancerosas, permitiendo la dirección específica de tratamientos a estas zonas.

Con el fin de cumplir el objetivo global del trabajo, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Síntesis mediante técnicas de Ingeniería Genética del gen VCAM-LAEL-EI que codifica para la síntesis del polímero tipo elastina.
2. Generación del vector de expresión p7-VCAM-LAEL-EI que permite la expresión del gen codificante para el ELP en células hospedadoras y comprobación de su secuencia.
3. Producción del ELP VCAM-LAEL-EI a escala de laboratorio y purificación mediante ciclos de cambios de temperatura.
4. Caracterización físico-química del ELP VCAM-LAEL-EI mediante diferentes técnicas: electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectrometría de masas (MALDI-TOF), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y dispersión de luz dinámica (DLS).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

En el siguiente apartado se listan todos los materiales empleados para la realización de este trabajo. La pureza de los reactivos, de no indicarse otra, es de grado de biología molecular.

4.1.1. Reactivos químicos

Tabla 1. Lista de reactivos empleados ordenados A-Z

Reactivo comercial	Casa	Nº catálogo
Ácido acético, 99.5%	Thermofisher	124040025
Ácido clorhídrico, HCl	Thermofisher	463961000
Ácido etilendiaminotetraacético disodio, EDTA	Formedium	EDTA1000
Acrilamida	VWR	RC-001
Agarosa SeaKem® LE	Lonza	50004
Azul de bromofenol, BPB	Thermofisher	A18469.18
Cloruro de Cobre (II), CuCl ₂ , 98%	Thermofisher	206345000
Cloruro de Potasio, KCl	Apollo Scientific	IN2900
Cloruro Sódico, NaCl	Formedium	NAC02
Dimetil sulfóxido, DMSO, 99.5%	Thermofisher	A16893.18
Dodecilsulfato de sodio, SDS	Formedium	SDS0500
Fluoruro de menilmetilsulfonio, PMSF	Apollo	BIP0329
Hidrogenofosfato de sodio anhidro, Na ₂ HPO ₄ , ≥ 99.7%	Thermofisher	10182863
Dihidrogenofosfato de potasio anhidro, KH ₂ PO ₄ , ≥ 98%	Thermofisher	11400113
Glicerol ≥ 99%	Thermofisher	10795711
Glicina	Sigma Aldrich	G8898
Glucosa monohidrato para microrbiología	Merck Chemical	49159
Hidrocloreuro de benzamidina hidrato, 98%	Thermofisher	10000550
Hidróxido Sódico, NaOH, ≥ 97%	Thermofisher	424335000
Isopropanol	Thermofisher	327272500
Persulfato de amonio, PSA	Thermofisher	HC2005
Tabletas Pierce™ inhibidoras de proteasas	Thermofisher	A32963
Tris-base ultra pura, Tris	Formedium	TRIS01
Tetrametilendiamina, TEMED	Thermofisher	17919
β-mercaptoetanol	Thermofisher	125472500

4.1.2. Disoluciones tamponadas

4.1.2.1. Tampones comerciales para enzimas

- **Tampón FastDigest Green 10x** (ThermoFisher) (pH 8.0)
- **Tampón Tango 10x** (ThermoFisher) (pH 7.9): 33 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de Magnesio, 66 mM acetato de Potasio, 0.1 mg/mL BSA.
- **Tampón rCutSmart** (BioLabs) (pH 7.9): 50 mM acetato de Potasio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnesio, 100 µg/mL albúmina recombinante.
- **Tampón T4 DNA ligasa 10x** (ThermoFisher) (pH 7.8): 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 5 mM ATP.

4.1.2.2. Disoluciones tampón

- **Tampón TAE 1x** (pH 7.5) para electroforesis de DNA. Composición: 40 mM Tris, 19 mM ácido acético, 1 mM EDTA.
- **Tampón de muestras de DNA 5x** (pH 8): 30% (v/v) Glicerol, 0.1% SDS, 0.05% (m/v) BPB, 50 mM Tris, 0.05 mM EDTA.
- **Tampón de electroforesis 5x** (pH 8.3) para SDS-PAGE. Composición: 0.96 M Glicina, 0.12 M Tris-Base, 0.02 M SDS
- **Tampón de muestra para SDS-PAGE 5x:** (pH 6.8) 50% glicerol (v/v), 25% (v/v) β-mercaptoetanol, 10% (m/v) SDS, 2% (v/v) BPB, 0.3 M Tris.
- **Tampón de lavado 1x** (pH 7.5) 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Base
- **Tampón de sonicación** (pH 8.0) 20 mM Tris-Base, 1 mM EDTA
- **Tampón fosfato salino, PBS** (pH 7.4): 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl.

4.1.3. Marcadores de pesos moleculares y disoluciones de tñido de geles

- **NZY Ladder III DNA Maker** (NZYTech, MB04403). Marcador de pesos moleculares de DNA con un patrón de 14 bandas espaciadas en un rango de 200 a 10000 bp.
- **NZY Blue Protein Marker** (NZYTech, MB14601). Marcador de pesos moleculares de proteínas con un patrón de 11 bandas espaciadas en un rango de 10 a 180 kDa.
- **Tinción GelRed 10000x en DMSO** para geles de DNA (Biotium, 41002). Se emplea en disolución 1:10000 (v/v) en tampón TAE.
- **Tinción SYBR Safe 10000x en DMSO** para geles preparativos de DNA (ThermoFisher, S33102). Se emplea en disolución 1:10000 (v/v) en tampón TAE.
- **Cloruro de Cobre (II):** 0.3 M CuCl₂ en agua desionizada.

4.1.4. Materiales de Biología Molecular y bioproducción

4.1.4.1. Medios de cultivo bacteriano

Los medios de cultivo se preparan a partir de reactivos comerciales, con posterior esterilización en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y 1 atm.

- **Medio de autoinducción LB (*Luria Bertrani*) sin elementos traza** (Formedium, AIMLB0110): Composición: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 3.3 g/L (NH₄)₂SO₄, 6.8 g/L KH₂PO₄, 7.1 g/L Na₂HPO₄, 0.5 g/L glucosa, 2.9 g/L lactosa, 0.15 g/L MgSO₄.
- **LB-agar** (Formedium, LBD0201): medio sólido que recubre las placas para crecimiento bacteriano. Composición: 15 g/L agar, 20 g/L triptona, 15 g/L extracto de levadura, 20 g/L NaCl.
- **Medio de autoinducción TB (*Terrific Broth*) sin elementos traza** (Formedium, AIMTB0110): Composición: 12 g/L triptona, 24 g/L extracto de levadura, 3.3 g/L (NH₄)₂SO₄, 6.8 g/L KH₂PO₄, 7.1 g/L Na₂HPO₄, 0.5 g/L glucosa, 2.9 g/L lactosa, 0.15 g/L MgSO₄.
- **SOC Medium** (pH 7.0) (Fischer, 11528896): Medio de crecimiento super óptimo con supresor de catabolismo. Composición: 20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa.
- **Antibiótico Ampicilina** (Formedium, AMP100). Se prepara una disolución de concentración 1000x, tomando 100 mg/L en agua ultrapura y esterilización mediante filtración 0.2 mm en campana de flujo
- **Antibiótico Kanamicina** (Formedium, KAN0025). Se prepara una disolución de concentración 1000x, con: 30 mg/mL en agua ultrapura y esterilización mediante filtración 0.2 mm en campana de flujo.

4.1.4.2. Cepas bacterianas

En este trabajo se emplean dos tipos de células huésped provenientes de distintas cepas de la bacteria *E. coli*:

- **NZY5α Competent Cells** (NZYTech, MB00401). Poseen una eficiencia cfu/μg de plásmido $\geq 10^9$. Estas cepas se emplean para etapas de clonación en síntesis de vectores plasmídicos
- **BLR (DE3) Competent Cells** (Novagen, 69053). Con una eficiencia cfu/μg de plásmido $\geq 10^7$. Estas cepas se emplean en etapas de expresión de los plásmidos para la producción del polímero tipo elastina.

4.1.4.3. Enzimas

Tabla 2. Enzimas empleadas en este trabajo con sus tampones de trabajo asociados

Enzima	Tampón para digestión	Casa comercial	Nº Catálogo
EcoRI FastDigest	FastDigest Green Buffer 10x	Thermofisher	FD0274
EarI FastDigest	FasDigest Green Buffer 10x	Thermofisher	FD0234
EarI	Tampón Tango 10x	Thermofisher	ER0231
SapI	Tampón Tango 10x	Thermofisher	ER1931
VspI	Tampón Tango 10x	Thermofisher	ER0911
FastAP	-	Thermofisher	EF0651
rSAP	rCutSmart 10x	BioLabs	M0371S
T4 DNA Ligasa	T4 DNA ligase Buffer 10x	Thermofisher	EL0011

4.1.4.3.1. Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son proteínas capaces de hidrolizar enlaces fosfodiéster de ambas hebras de una cadena de DNA por sitios específicos, generando así fragmentos de DNA con secuencias conocidas en cada extremo denominados fragmentos de restricción. En la Tabla 3 se muestran los sitios de corte de las distintas enzimas empleadas en este trabajo.

Tabla 3. Clasificación de enzimas de restricción en función del tipo de digestión y sus correspondientes secuencias de restricción

DIGESTIÓN ANALÍTICA		DIGESTIÓN PREPARATIVA	
Enzima	Secuencia de reconocimiento	Enzima	Secuencia de reconocimiento
<i>EcoRI</i> FD	5' G A <u>A T T C</u> 3' 3' C T T A A G <u>I</u> 5'	<i>SapI</i>	5' G C T C T T C N <u>I</u> 3' 3' C G A G A A G N N N N <u>I</u> 5'
<i>EarI</i> FD	5' C T C T T C N <u>I</u> 3' 3' G A G A A G N N N N <u>I</u> 5'	<i>EarI</i>	5' C T C T T C N <u>I</u> 3' 3' G A G A A G N N N N <u>I</u> 5'
		<i>Vsp</i>	5' A T T A A T 3' 3' T A A T T A <u>I</u> 5'

4.1.4.3.2. Otras enzimas

- **FastAP** (*Thermosensitive Alkaline Phosphatase*): enzima fosfatasa alcalina que cataliza la defosforilación los extremos de las hebras de DNA.
- **rSAP** (*Shrimp Alkaline Phosphatase*): también es una enzima fosfatasa alcalina que elimina grupos fosfato de los extremos del DNA.
- **T4 DNA ligasa**: su actividad ligasa le permite catalizar formación de enlaces fosfodiéster entre extremos 3' y 5' del DNA.

4.1.4.4. Vectores plasmídicos

4.1.4.4.1. Vector de clonación

En este trabajo se usa como vector de clonación una modificación del vector pDriveAll (pDA), obtenido a partir del vector de clonación pDrive de Qiagen por el Dr. A. Ribeiro [48].

El vector modificado es pD-LAEL-EI (Figura 9), que contiene el gen que codifica para los bloques LAEL-EI. El plásmido tiene un tamaño de 5627 bp y posee genes de resistencia a los antibióticos Ampicilina (AmpR) y Kanamicina (KanR). Cuenta además con numerosos sitios de restricción para diferentes enzimas: 5 para *EarI*, 2 para *EcoRI*, 1 para *SapI* y 5 para *VspI*.

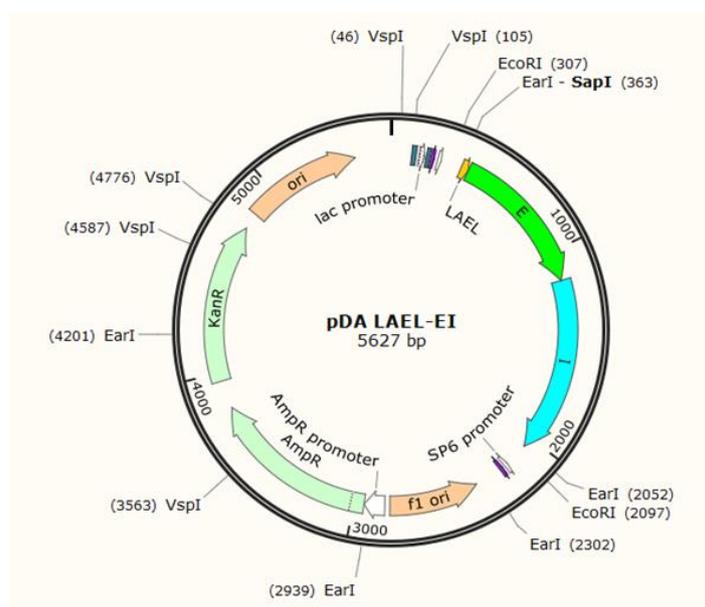


Figura 9. Esquema del plásmido pD-LAEL-EI, fragmentos génicos que lo componen y sitios de restricción de enzimas. En verde claro: genes de resistencia a Ampicilina y Kanamicina. En amarillo: bloque LAEL. En verde oscuro y azul: bloque EI.

4.1.4.4.2. Vector de expresión

Como vector de expresión se emplea una modificación del vector pET7, obtenido de trabajos anteriores [49].

El vector modificado, p7-VCAM, es un plásmido preparado por *GeneScript Biotech Corporation* (Figura 10) tiene un tamaño de 5564 bp, y contiene sólo el gen de resistencia a la Ampicilina. Cuenta con un sitio de restricción para la enzima *EcoRI*, y dos sitios de restricción para *EarI* y *SapI*, contenidos en un sitio de clonación múltiple (MCS). Al final de este MCS se encuentra una secuencia aminoacídica que contiene la última Valina y la señal de terminación de la traducción en el extremo 3'. Los ORF (*Open*

Reading Frames) son marcos de lectura de tripletes de bases nitrogenadas que codifican para un polipéptido. El codón de iniciación de la traducción (que codifica para el aminoácido Metionina), así como la secuencia codificante para VCAM se encuentran en el extremo 5' del ORF marcado por el sitio de restricción *NdeI*. Estas características permiten la modificación del vector de expresión y, por tanto, el polipéptido para el que codifique estará el contenido en este ORF y, concretamente, dentro del MCS del plásmido.

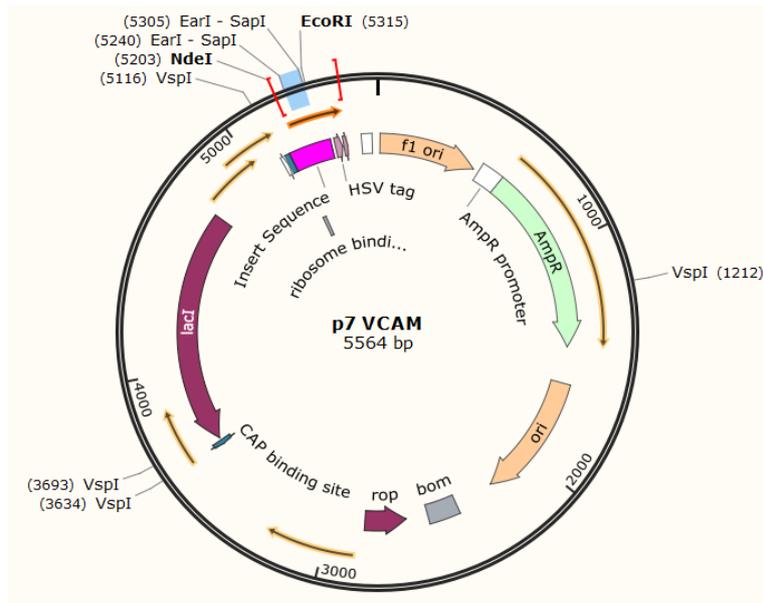


Figura 10. Esquema del plásmido p7-VCAM, fragmentos génicos que lo componen y sitios de restricción de enzimas. En verde: gen de resistencia a Ampicilina. En rojo: ORF que contiene la secuencia de iniciación de la traducción y el gen VCAM. En azul: fragmento del MCS que contiene la secuencia de terminación de la traducción.

4.1.4.5. Kits de purificación y extracción de DNA

Debido a la importancia de trabajar con fragmentos de DNA puros en todo momento, se utilizan kits que cuentan con protocolos optimizados por la casa comercial. Así, los reactivos y cantidades a emplear, así como la serie de pasos a seguir vienen especificados en detalle para minimizar el error si se siguen rigurosamente.

- **Plasmid DNA purification NucleoSpin® Plasmid MiniPrep** (Macherey-Nagel, 740588.50). Se sigue el protocolo **NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid**. Este kit permite la purificación de DNA plasmídico proveniente de cultivos de pequeño volumen (5-10 mL).
- **Quantum Prep Plasmid MidiPrep Kit** (BioRad, 7326120). Similar al anterior, permite la purificación de DNA plasmídico proveniente de volúmenes de cultivo mayores (40 mL).

- **PureLink Quick Gel Extraction Kit** (Invitrogen, K210012). Este kit permite la purificación de DNA extraído de geles de agarosa.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparación de placas Petri para cultivo bacteriano

Las placas Petri contienen LB-agar para cultivo bacteriano en medio sólido. Para su preparación, se diluye LB-agar en agua ultrapura, en proporciones especificadas por el fabricante. Se aplica un ciclo de autoclave a 121 °C durante 20 minutos para completa disolución y esterilización. Con el medio aún templado se añade, si deseado, antibiótico (4.1.4.1) en proporción 1/1000 (v/v) y se vierte un volumen aproximado de 30 mL en cada placa. Una vez enfría, el medio solidifica y las placas estarán listas para ser usadas.

4.2.2. Transformación bacteriana

Una transformación consiste en la introducción de material génico exógeno (DNA recombinante) en una célula huésped, que lo incorpora en su DNA y es capaz de expresarlo independientemente de su propio material genético, para obtener un elevado número de réplicas de este DNA recombinante. Se emplean células competentes y vectores plasmídicos que poseen gen de resistencia a un antibiótico para la diferenciación con el material genético propio de la célula huésped.

Las células competentes o en estado de competencia presentan, en condiciones determinadas, modificaciones en su pared y membrana celular que aumentan su permeabilidad. Poseen alta eficiencia de transformación (expresada en “unidades formadoras de colonias” o cfu), que permiten la obtención de gran cantidad de réplicas de DNA exógeno

Las etapas comunes para una transformación, independientemente de la cepa bacteriana empleada son las siguientes:

- 1) Incubación a 4°C del DNA recombinante y las células competentes, para su co-precipitación.
- 2) Shock térmico a 42°C que provoca la permeabilización de la membrana celular, y consiguiente introducción del material exógeno en las células. Los poros generados en la membrana se cierran de nuevo por incubación a 4 °C durante 2 minutos.
- 3) Adición de SOC que favorece la transformación. Incubación 1 hora a 37 °C con agitación constante (225 rpm), facilitando un intercambio de aire entre el interior

y el exterior del tubo de transformación para la correcta oxigenación de las células.

- 4) A continuación, se siembra un cierto volumen de la transformación (20-150 μL) en una placa LB-agar que contenga el antibiótico para el que presenta resistencia el vector plasmídico. Preferiblemente se siembran dos placas con diferente volumen de transformación, para comprobar la proporcionalidad entre número de colonias y volumen sembrado. Las placas se incuban en la estufa a 37 °C durante 16-18h.
- 5) De las placas se pueden seleccionar colonias aisladas para cultivar en medio líquido para procesos de purificación de DNA o de producción de polímeros.

En la Tabla 4, se muestran las diferencias en los protocolos de transformación para las células competentes empleadas.

Tabla 4. Diferencias entre las transformaciones con células competentes NZY5 α y BLR (DE3).

Células competentes	NZY5α Competent Cells	BLR (DE3) Competent Cells
Volumen de transformación	100 ng de DNA por cada 50 μL de células competentes	1 μL DNA en 20 μL de células competentes
Incubación a 4 °C	30 minutos	5 minutos
Shock Térmico a 42 °C	40 segundos	30 segundos
Volumen SOC añadido	450 μL	80 μL

4.2.3. Cultivo bacteriano en medio líquido

De placas Petri previamente sembradas se seleccionan de 4 a 8 colonias bien aisladas y con buena morfología, esto es, forma redondeada con los bordes definidos y no excesivamente grandes. Se introduce una lanza estéril en cada una de las colonias y estas se cultivan en un medio diferente dependiendo del propósito del cultivo y la cepa bacteriana empleada. Los medios son LB o TB, y para el cultivo se toma un volumen de 5 a 40 mL, determinado por la función de este cultivo. El cultivo se deja crecer a 37 °C por 16-18h (o/n) con agitación a 225rpm.

4.2.4. Purificación de DNA plasmídico

Para trabajar con plásmidos y llevar a cabo las reacciones enzimáticas deseadas, es necesario extraer este DNA plasmídico del citoplasma bacteriano y que este se encuentre puro en la disolución, sin otros interferentes. En este trabajo se emplean dos kits que siguen un protocolo de purificación similar, basados en la lisis alcalina de la célula huésped. Los protocolos vienen descritos en detalle por el fabricante, por lo que se describe el principio fundamental de los pasos llevados a cabo:

4.2.4.1. Protocolo NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid)

Este protocolo diferencia volúmenes de cultivo celular y reactivos empleados en función de la naturaleza del vector plasmídico a purificar: para vectores de expresión (low-copy) se empleará el doble de volumen con respecto a vectores de clonación (high-copy).

A continuación, se describen las etapas del protocolo:

- 1) Cultivo y recolección de células bacterianas. Se parte de un cultivo en 5 (o 10) mL de medio LB.
- 2) Lisis celular y ruptura de RNA. La adición de una RNAsa degrada el RNA celular para evitar la co-purificación con el plásmido. A continuación, se lleva a cabo la lisis celular con agentes desnaturalizantes (SDS y NaOH), seguido de una neutralización y renaturalización del DNA plasmídico.
- 3) Etapa de aclarado. Separación del DNA plasmídico y restos celulares por centrifugación.
- 4) Separación de DNA por centrifugación en columna de SPE con membrana de sílice.
- 5) Lavado y secado de la membrana de sílice con tampón de lavado y tampón conteniendo EtOH 95% para eliminación de interferentes (DNA genómico, RNA, interferentes polares y tampones de lavado).
- 6) Elución de DNA en 50 µL de buffer de elución (5 mM Tris-HCl, pH 8.5).

Una vez purificado, se almacena el plásmido a 4°C para uso inmediato, o bien a -20°C para largo plazo.

4.2.4.2. Protocolo QuantumPrep® Plasmid MidiPrep Kit

Similar al anterior, este protocolo permite la obtención de mayor cantidad de plásmido purificado ya que parte de un volumen inicial de hasta 50 mL.

4.2.5. Digestión con enzimas de restricción

Se denomina digestión a la reacción de corte de un fragmento de DNA mediante enzimas de restricción o endonucleasas. En este trabajo se emplean enzimas de Tipo II, que reconocen una secuencia diana y la cortan por un sitio específico, dejando extremos cohesivos en las hebras de DNA (Tabla 3, 4.1.4.3.1) que pueden unirse entre sí o con otros extremos cohesivos complementarios de otro fragmento de DNA.

La digestión se lleva a cabo en las condiciones óptimas de trabajo de la enzima, generalmente a 37 °C, en incubadora estática. Los tampones adecuados, tiempos de

reacción, condiciones de inactivación y cantidad de enzima empleada vienen especificados por la casa comercial y varían para cada enzima.

Se diferencian dos tipos de digestiones:

- Digestión analítica: consiste en una digestión rápida, de carácter cualitativo para la comprobación de reacciones que se han llevado a cabo, como clonaciones o ligaciones. Se toman 200-1000 ng de plásmido, el tampón empleado es *Green Buffer Fast Digest*, se añade la cantidad de enzima para reacciones rápidas indicadas por la casa comercial, y se añade agua ultrapura hasta completar el volumen final, generalmente de 10-15 μ L. Las digestiones analíticas requieren alrededor de 30 minutos.
- Digestión preparativa: el objetivo de estas digestiones es obtener fragmentos concretos de DNA (insertos o plásmidos) que surgen tras el corte con la enzima, para purificarlos y emplearlos en procesos posteriores. Para la digestión preparativa se toman entre 1-5 μ g de plásmido, la cantidad de enzima y tampón adecuados especificados por la casa comercial y agua ultrapura hasta completar el volumen final, de 50-80 μ L. El tiempo de reacción es mayor, variable de 1-16h.

4.2.6. Defosforilación de DNA

Antes de realizar la ligación entre un inserto de DNA y un plásmido, se debe asegurar que este último no presente su forma nativa circular o, en su defecto, superenrollada, sino que debe encontrarse linealizado para la correcta unión del inserto. La presencia del plásmido en su forma circular, al que no se ligará el inserto deseado, provocará la transformación del nuevo plásmido en muy pequeñas proporciones. Cuando un plásmido ha sido digerido por enzimas de restricción, estas dejan extremos complementarios entre sí que podrían volver a unirse en un proceso denominado *self-ligation*, dando lugar al plásmido inicial. La hidrolización de los grupos fosfato de los extremos del plásmido linealizado evita que esto tenga lugar (Figura 4, 2.2.2).

Para asegurar la efectividad de la defosforilación, etapa crucial para el éxito de la clonación, se lleva a cabo dos veces, con distintas enzimas defosforilasas: *FastAP* y *rSAP*. Las condiciones de reacción (temperatura, tiempo y buffer adecuado) vienen dadas por la casa comercial. La primera defosforilación se realiza con *FastAP*, que actúa a 37 °C durante 10 minutos y se desactiva a 65 °C 5 minutos o bien por adición de tampón de carga de muestra de DNA si se va a realizar posteriormente un gel de agarosa preparativo (4.2.8). La segunda defosforilación se realiza con *rSAP* a 37 °C durante 30 minutos y con desactivación a 65 °C durante 5 minutos.

4.2.7. Ligación de DNA

La construcción del gen que codifica para la proteína de interés se lleva a cabo mediante la unión de los insertos génicos purificados al plásmido linealizado y defosforilado. Para catalizar la reacción de ligación se emplea la enzima T4 DNA ligasa, que unirá los extremos cohesivos de DNA resultado de la digestión con enzimas de restricción siempre que sean compatibles, es decir, que sus secuencias sean complementarias.

Se trabaja con una cantidad de plásmido de 20-100 ng, y en una relación molar variable con el inserto que permita la ligación de manera óptima. La reacción se realiza en tampón T4 ligase Buffer, con una cantidad de enzima determinada por el comerciante. La incubación se puede llevar a cabo a temperatura ambiente durante 30 minutos, o bien para mayor efectividad, a 4 °C o/n.

4.2.8. Electroforesis de DNA

La electroforesis de DNA en geles de agarosa no desnaturalizantes es una técnica empleada para la separación, análisis y/o purificación de fragmentos de DNA. La separación se basa en la migración de las moléculas de DNA a través de una matriz porosa por acción de un campo eléctrico, que viajan desde el ánodo al cátodo en función de su peso molecular. La movilidad electroforética es inversamente proporcional al logaritmo del número de pares de bases de los fragmentos de DNA.

La agarosa es un polisacárido formado por β -D-galactosa y 3,6-anhidro- α -L-galactosa, soluble en agua a temperaturas entre 50-60 °C y que solidifica a temperatura ambiente. Forma la matriz porosa que ofrece un rango de separación de DNA lineal de 100 pb a 60 kpb, modificable en función del porcentaje de agarosa que conforma el gel. En este trabajo se preparan geles de agarosa del 0.8 y 1% según la finalidad del gel (Tabla 5).

Para la preparación del gel se disuelve la agarosa en tampón TAE 1x. Las muestras se introducen en los pocillos del gel con previa adición de tampón de muestra de DNA (4.1.2.2) y junto a 5 μ L de marcador de pesos moleculares (4.1.2.2) como referencia.

Una vez llevada a cabo la electroforesis, se transfiere el gel a un recipiente que contiene una disolución de tinte de un marcador fluorescente en tampón TAE 1x, se deja teñir unos minutos y se podrá capturar una imagen con el sistema de toma de imágenes *UV Gel DocTM* (BioRad).

Se distinguen dos tipos de electroforesis de DNA: analítica, que permite la identificación cualitativa de fragmentos de DNA para la comprobación del éxito de una reacción, o

preparativa, cuyo objetivo es el aislamiento, extracción y purificación de un fragmento específico de DNA (4.2.9).

Tabla 5. Principales diferencias entre las electroforesis de DNA analíticas y preparativas realizadas en este trabajo.

	Electroforesis analítica	Electroforesis preparativa
Precauciones especiales	-	Tampón <i>TAE</i> y solución de tinte sin previo uso para evitar contaminaciones
Volumen de gel	~ 30 mL	50-60 mL
Porcentaje de agarosa	1 %	0.8 %
Voltaje	90 V	60 V
Tiempo de electroforesis	~ 1h	~ 2h
Solución de tinte	<i>GelRed</i>	<i>SYBR Safe</i>

4.2.9. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Tras la realización de una electroforesis en gel de agarosa preparativa, es necesario extraer del gel el fragmento de DNA de interés y purificarlo. Para ello se emplea el kit *PureLink™ Quick Gel Extraction* (4.1.4.5), que permite la purificación de fragmentos lineales de DNA empleando una centrífuga.

La banda correspondiente al fragmento de DNA de interés se localiza con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta (*SafeVIEW Fisherbrand*) y se escinde con un bisturí. La purificación del fragmento de DNA consiste en la solubilización de la agarosa, y posterior separación del DNA por centrifugación en una columna de SPE con membrana de sílice. Tras una etapa de lavado, se eluye el DNA en 50 µL de tampón de elución, libre de agarosa del gel.

El DNA purificado se almacena a 4°C para uso inmediato o bien -20°C para almacenamiento a largo plazo.

4.2.10. Determinación de la concentración y pureza de DNA

La concentración y pureza del DNA purificado se puede medir mediante un espectrofotómetro. En este trabajo se utiliza un espectrofotómetro de microvolúmenes *NanoDrop™ One* (Thermo Scientific). La relación entre la absorbancia de la muestra y su concentración se rige mediante la ley de Lambert-Beer. Sin embargo, para ácidos nucleicos se emplea una modificación de esta ley (Ecuación 1), donde el coeficiente de extinción molar (ϵ) y el camino óptico (b) se combinan en un factor ($f = 1/\epsilon \cdot b$). Para DNA bicatenario, el factor generalmente aceptado es de $50 \text{ ng} \cdot \text{cm} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

$$c = A \cdot f$$

Ecuación 1

La medición de absorbancia se realiza a longitud de onda 260 nm, con corrección en línea base a 280 nm (A260/280) y 230 nm (A260/230). Esto proporciona dos índices de absorbancia, indicadores de la pureza de la muestra (Tabla 6).

Tabla 6. Grados de pureza del DNA asociados a los valores de absorbancia para medidas con espectrofotómetro NanoDrop™ One.

Relación	Valor /adim.	Pureza
A260/280	>2.0	Contaminación con RNA
	1.8 – 2.0	DNA de pureza óptima
	1.6 – 1.8	DNA de pureza aceptable
	< 1.6	Presencia de compuestos aromáticos
A260/230	1.8 – 2.2	DNA de pureza óptima
	< 1.8	Contaminación con sales, carbohidratos o fenoles

4.2.11. Secuenciación de DNA

Esta técnica permite conocer el orden exacto de las bases nitrogenadas (Adenina, A; Timina, T; Citosina, C y Guanina, G) presentes en el plásmido, y de este modo comprobar que las reacciones de ligación han tenido lugar adecuadamente y la secuencia del gen que codifica para el polímero de interés es correcta.

La secuenciación de muestras de DNA plasmídico se ha realizado en *Cenit Support Systems S.L.*, en el parque Científico de la Universidad de Salamanca, a través del método Sanger. Este método se basa en la desnaturalización del DNA, y posterior adición de cebadores específicos para secuencias concretas de la hebra molde, que permiten la unión de una DNA polimerasa que clonará este DNA. La DNA polimerasa adiciona nucleótidos, y aleatoriamente, nucleótidos modificados con fluorescencia (didesoxinucleótidos) que actúan como terminadores de la secuencia. Así, se obtienen fragmentos de distintos tamaños que se podrán identificar por electroforesis capilar, y ordenar en función de su longitud, obteniendo así la secuencia completa.

4.2.12. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulphate, SDS-PAGE*) es una técnica desnaturalizante que permite el análisis e identificación de proteínas. La separación de las distintas proteínas se realiza en función de su tamaño molecular, sometiendo a las muestras a un campo eléctrico que las obliga a migrar a lo largo de una matriz porosa de poliacrilamida. La reacción de

formación de esta matriz consiste en una polimerización radicalaria en cadena, iniciada por persulfato de amonio (PSA) y tetrametiletilendiamina (TEMED), que actúa como catalizador. Monómeros de acrilamida y dímeros de bisacrilamida se van uniendo para formar cadenas entrecruzadas.

Los geles de poliacrilamida utilizados, son geles discontinuos, esto es, tiene dos zonas de diferente composición y que cumplen diferentes funciones:

- Gel acumulador o concentrador (*stacking gel*): situado en la parte superior del gel y encargado de concentrar las muestras en una banda estrecha. Se compone de agua ultrapura, tampón Tris 0.5 M (pH 6.8), SDS al 10% (m/v), PSA, TEMED y un bajo porcentaje de acrilamida (4%).
- Gel separador (*resolving gel*): ocupa la mayor parte del gel, y en éste tiene lugar la separación de las proteínas en función de su peso molecular. La diferencia en composición respecto del *stacking gel* reside en el tampón Tris, a mayor concentración y pH (1.5 M y pH 8.8), y en un mayor porcentaje de acrilamida.

El porcentaje de acrilamida del gel separador se elige en función del rango lineal de separación adecuado para las muestras. En este trabajo, para identificación de muestras de ~48.9 kDa se ha empleado un gel al 12% de acrilamida.

Las muestras a introducir en los pocillos del gel se deben preparar añadiendo tampón de carga de proteínas (4.1.2.2) en una proporción 80/20 (muestra/tampón), hervir durante 5 minutos y centrifugar a 134000 rpm durante 5 minutos. Para comparar las bandas obtenidas de las muestras, se introduce en el gel un marcador de peso molecular (4.1.2.2). Las condiciones del campo eléctrico para este trabajo son: 700 mA (max), 300 V (max), 150 W.

Una vez completa la electroforesis, se transfiere el gel a una disolución de tinte de cloruro de cobre 0.3M en agua destilada durante 5 minutos y se puede capturar una imagen con el sistema de toma de imágenes UV *Gel DocTM* (BioRad).

4.2.13. Selección de colonias para la producción del polímero

Previa a la producción del polímero, se debe seleccionar una colonia bacteriana muy productora, esto es, que permita la obtención de una gran cantidad de polímero.

Se lleva a cabo una transformación del plásmido conteniendo el inserto genético de interés en una cepa bacteriana BLR, y un posterior cultivo en medio líquido de 8 colonias seleccionadas, según los pasos indicados en las secciones 4.2.2 y 4.2.3, respectivamente.

Se toma una alícuota de cada cultivo, se someten a lavados con agua ultrapura y se prepara las muestras para inserción en un gel de poliacrilamida. Tras la resolución del gel o *screening*, se identifica la colonia o colonias que producen el polímero en mayor abundancia. La colonia seleccionada se toca con el mango de Kolle, y se siembra por agotamiento en una nueva placa Petri para incubar o/n a 37 °C. Se realiza un segundo *screening* de 8 de las colonias hijas de la más productora, y entre ellas se seleccionará la colonia óptima para llevar a cabo la producción del polímero.

4.2.14. Protocolo de bioproducción de ELPs

La bioproducción de ELPs se lleva a cabo en pasos realizados en 3 días consecutivos.:

Día 1: Preparación del pre-inóculo

El primer paso para la producción de polímeros tipo elastina es la preparación de un pre-inóculo. En un tubo Falcon de 50 mL se añaden 5 mL de medio LB, 5 µL de antibiótico, en este caso Ampicilina, y 250 µL de glucosa 20% (m/V). La glucosa actúa como represor de la traducción en *E. coli*, por lo que inhibe la expresión del gen durante el crecimiento bacteriano. Con una lanza se pica la colonia seleccionada como más productora, se introduce en la disolución y esta se deja o/n en un incubador a 37 °C con agitación constante (250 rpm). Se realiza un control negativo (tubo Falcon con los mismos componentes salvo la colonia) para comprobar la esterilidad de los medios.

Día 2: Preparación del inóculo e inoculación

Una vez comprobado el correcto crecimiento del cultivo, se lleva a cabo la preparación del inóculo. En dos Erlenmeyer de 250 mL se añaden 50 mL de medio LB con 50 µL de antibiótico Ampicilina, 1.5 mL de glucosa 20% y 100 µL del pre-inóculo. Se incuba entre 4-6 h a 37 °C con agitación 250 rpm.

A continuación, se procede a la producción del polímero, que se realiza en 16 flasks de 2 L. En trabajos anteriores se ha comprobado que el volumen óptimo de producción corresponde a 250 mL de medio TB y 150 mL de LB, dando lugar a un volumen por flask de 400 mL, y un volumen final de producción de 6.4 L. En cada flask, además del medio, se añaden 400 µL de antibiótico Ampicilina y 5 mL del inóculo. De nuevo, los flask se dejan incubando o/n a 37 °C y con agitación a 250 rpm.

El volumen de cultivo por flask no supera 1/4 del volumen total del recipiente con objeto de favorecer la oxigenación del cultivo y así, el crecimiento bacteriano.

En este paso también se realizan dos controles, positivo y negativo, para comprobar el correcto crecimiento del cultivo y la esterilidad del medio.

Día 3: Detención de la producción y lavado de células

Para poder detener la producción se debe medir la absorbancia a 600 nm del cultivo. Se toma una alícuota de 1 mL de uno de los flask, y se realiza una dilución 1:10 en agua ultrapura. Para hacer el blanco de medición, la alícuota se centrifuga 45 s a 13400 rpm y se realiza una dilución 1:10 del sobrenadante. Tras media hora se realizará una segunda medida de absorbancia de una muestra tomada del mismo flask. Si el valor de la absorbancia a 600 nm permanece igual o disminuye, es un indicativo de que el crecimiento bacteriano se encuentra en fase estacionaria y se puede detener la producción.

A continuación, se lleva a cabo el lavado de células para la eliminación de subproductos del cultivo. En esta etapa es importante el mantenimiento del contenido a 4 °C para evitar la degradación por cambios de temperatura. El lavado de células comprende pasos de centrifuga, que siempre se realizarán a 4 °C, 4200 rpm y 15 min.

El contenido de los flask se reparte en botes de centrifuga de 1 L, se centrifuga y se descarta el sobrenadante. Si no se ha podido repartir anteriormente el contenido de todos los flask, se reparte en este momento en los mismos botes. Tras la centrifuga, se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado adicionando tampón de lavado 1x. La resuspensión se traspassa a botes de centrifuga de 0.5 L para mayor comodidad, se centrifuga y descarta el sobrenadante. Se repetirá este paso hasta que el sobrenadante salga incoloro.

El precipitado contiene las bacterias que han expresado el polímero de interés, por lo que la siguiente etapa requerirá romper dichas bacterias para la liberación del polímero.

Ruptura de células

El último paso en la producción del polímero supone la ruptura celular mediante sonicación para su liberación. El precipitado obtenido tras los lavados celulares se resuspende en un volumen de tampón de sonicado, calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$V_{\text{tampón sonicado}} = 5 \cdot V_{\text{cultivo}} \cdot Abs_{\text{última muestra}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Se añaden inhibidores de proteasas ya que la liberación de estas durante la ruptura celular, pueden provocar la degradación del polímero. Se añaden 2 mL de PMSF por cada litro de tampón de sonicado, 1 mM de benzamidina y una tableta con EDTA inhibidora de proteasa por cada 50 µL de tampón de sonicado.

Se realizan ciclos de sonicación de 20 segundos con pausas para refrigerar, 100% amplitud, a baja temperatura (4 °C) y altas presiones (1500-1800 bar), durante 30 minutos. El equipo empleado es un sonicador *Hielscher UP400St*, perteneciente al grupo de investigación *ProcerealTech*.

Finalizada la sonicación, se centrifuga la disolución restante durante 90 minutos, a 4 °C y 15000 x g. Se deberá purificar el polímero que, en el caso de VCAM-LAEL-EI, quedará en el sobrenadante.

Seguimiento del proceso

Durante el protocolo de producción es importante la toma de alícuotas de los distintos pasos intermedios (pre-inóculo, inóculo, cultivo antes de detener la producción) para poder realizar un *screening* (4.2.12) y comprobar que la producción se está llevando a cabo correctamente. Para preparar las muestras para electroforesis se deben centrifugar a 13400 rpm durante 45 s, descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 1 mL de agua ultrapura, de nuevo centrifugar y descartar el sobrenadante. El precipitado se resuspenderá en un volumen de agua determinado por la absorbancia final de la muestra, indicado en la Tabla 7. Se prepara la muestra con tampón de carga de proteínas en proporción 80/20 y se cargará un volumen en el pocillo del gel determinado también por la absorbancia final de la muestra.

Tabla 7. Volumen de resuspensión y de carga de muestras para electroforesis SDS-PAGE en función de la medida de sus absorbancias finales en la producción del polímero.

Abs (600 nm)	Resuspender en agua ultrapura:	Volumen a cargar:
0.1 – 0.5	20 µL	$V = 5 / Abs$
0.5 – 2	50 µL	$V = 12.5 / Abs$
2 – 5	100 µL	$V = 25 / Abs$
> 5	200 µL	$V = 50 / Abs$

También se deberán tomar muestras del sobrenadante y precipitado de sonificado para comprobar su localización para posterior purificación según el procedimiento. Su preparación se lleva a cabo como indicado en el apartado 4.2.12.

4.2.15. Purificación de ELPs

Para la purificación del polímero tipo elastina se llevan a cabo sucesivos ciclos de precipitación y resuspensión basados en las propiedades del polímero frente a los cambios de temperatura (2.3). Todos los pasos de centrifugación que comprenden las etapas de purificación se llevan a cabo a 15000 x g durante 20 minutos.

En primer lugar, el sobrenadante de sonicado a 4 °C se acidifica con HCl 2 M hasta un pH entre 3 – 4, para favorecer la precipitación de otras proteínas inespecíficas y restos de las bacterias. La disolución se centrifuga a 4 °C y en el precipitado quedarán los restos bacterianos o *debris*.

A continuación, el polímero presente en el sobrenadante se somete a una precipitación específica por temperatura a 60 °C durante 2 horas y, tras una centrifuga a 30 °C, el polímero queda contenido en el precipitado. Por último, este precipitado se resuspende o/n en agua desionizada a 4 °C.

Los ciclos de precipitación específica y resuspensión inespecífica se repiten hasta completa purificación del polímero, que se debe comprobar mediante una electroforesis de proteínas (4.2.12).

Una vez puro, el sobrenadante obtenido tras las etapas de purificación se somete a diálisis, en cuatro cambios de 25 L de agua destilada y ultrapura a 4 °C.

Por último, la disolución de polímero se liofiliza en el equipo *LyoQuest-55 Plus* perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid. Así, se obtiene el polímero puro y seco, listo para ser caracterizado.

4.2.16. Caracterización físico-química de ELPs

4.2.16.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los pasos para la formación del gel y realización de la electroforesis vienen descritos en el apartado 4.2.12.

Se realiza una disolución de la muestra en agua ultrapura de 2 mg/mL, que se resuspende a 4 °C o/n y, a partir de dicha disolución, se preparan muestras a diferentes concentraciones. Así, se puede analizar el peso molecular aparente del polímero y su movilidad electroforética, y comprobar la presencia de impurezas y su magnitud de forma cualitativa.

4.2.16.2. Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

La Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (MALDI) acoplada a analizadores de tiempo de vuelo (TOF), es una técnica analítica que permite la identificación y cuantificación de compuestos de diversa naturaleza, de forma específica y con alta sensibilidad, lo que la hace ideal para análisis de compuestos de naturaleza biológica y de elevado peso molecular.

La técnica se basa en la generación, separación y detección de iones en fase gaseosa. La fuente ionizante es una fuente débil, que no provocará la fragmentación del analito. Para favorecer la ionización de la muestra bajo acción del láser, ésta se debe disolver en un exceso de matriz acuosa/alcohólica. Se obtiene un espectro de masas que representa la abundancia iónica relativa de la muestra frente a la relación masa/carga (m/z). No aparece fragmentación del analito y pueden aparecer iones de carga múltiple.

El equipo utilizado para este trabajo fue el espectrómetro de masas *MALDI-TOF Bruker Autoflex®* del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid, bajo manejo de los técnicos del laboratorio.

4.2.16.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica de determinación estructural basada en el estudio espectroscópico de ciertos núcleos atómicos en presencia de un campo eléctrico en la región de radiofrecuencias.

En este trabajo se ha realizado un espectro de RMN de protón (^1H -RMN) y un espectro bidimensional HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation spectroscopy*), para comparar los protones teóricos correspondientes al polímero sintetizado y los protones experimentales que muestre el espectro.

El equipo empleado es un espectrómetro de 500 Hz de *Aligent Technologies*, localizado en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid, y manipulado por los técnicos encargados.

4.2.16.4. Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic Light Scattering*) es una técnica no invasiva que permite medir el tamaño y distribución de tamaño de moléculas y partículas en la región submicrométrica. Permite la caracterización de partículas, emulsiones o moléculas que se dispersan o disuelven en un líquido.

Se basa en el movimiento Browniano de dichas partículas o moléculas en suspensión, que provoca la dispersión en diferentes intensidades de la luz láser. Estas intensidades fluctúan en función del tamaño de las partículas, que se relaciona con su difusión en el medio de acuerdo a la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde: d_H es el diámetro hidrodinámico de la partícula; k la constante de Boltzman, T la temperatura, η la viscosidad del medio y D el coeficiente de difusión de la partícula

En un experimento de DLS se realizan medidas sucesivas de la dispersión generada por las partículas, y la superposición de estas medidas dará una correlación entre ellas, pudiendo construir una curva de correlación. A mayor tamaño de partícula, su movimiento será más lento por lo que la dispersión generada en dos instantes sucesivos será muy parecida. De este modo, un ajuste de la curva de correlación permite calcular el coeficiente de difusión de las partículas y, por tanto, mediante una modificación de la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 3), su tamaño (d_H).

La intersección de la curva de correlación sobre el eje y se denomina intercepto, y se emplea para evaluar la relación señal-ruido de la muestra y así examinar la calidad de los datos.

Los resultados en una DLS se muestran como una distribución por intensidad. En materiales biológicos o polímeros la intensidad de la dispersión de las partículas es proporcional al cuadrado de su peso molecular, por lo que es un indicativo del tamaño de la muestra detectada, no de su concentración en la muestra. Para conocer la concentración, se puede realizar una transformación a una distribución por volumen.

Una DLS proporciona, además, el índice de polidispersidad (PDI) de la muestra, esto es la variación en los pesos moleculares de la partícula.

Por otro lado, para obtener la medida del potencial Z se realiza un ensayo de dispersión de luz electroforética, esto es, el análisis de la movilidad de la partícula en un campo eléctrico. El resultado proporciona el valor de la carga superficial de la partícula, que da una idea de la estabilidad de la dispersión y vida media de la partícula.

El instrumento empleado ha sido el *Zetasizer Advance Pro Red Label* perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid. Las cubetas empleadas han sido DTS1070 para las medidas de diámetro hidrodinámico, y ZEN0040 para la medida del potencial Z.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CONSTRUCCIÓN DEL GEN VCAM-LAEL-EI

Para llevar a cabo la bioproducción del polímero tipo elastina VCAM-LAEL-EI, primero ha sido necesaria la construcción del gen que codifica para éste, que se ha llevado a cabo en varias etapas:

5.1.1. Amplificación y purificación del plásmido pD-LAEL-EI

Empleando células competentes NZY5 α , se lleva a cabo su transformación con 100 ng del plásmido pD-LAEL-EI (4.2.2). El vector de clonación pDA contiene genes de resistencia a los antibióticos Ampicilina y Kanamicina (4.1.4.4.1.), por lo que se realiza un cultivo en medio LB-agar-Amp-Kan para evitar el crecimiento de las bacterias que no hayan integrado el plásmido. Tras la transformación, se seleccionan cuatro colonias con buena morfología, se cultivan en medio líquido LB-Amp-Kan (4.2.3) y se purifica su DNA plasmídico (4.2.4.1.). Para comprobar la eficacia del proceso, se realiza un mapa de restricción (4.2.5) con la enzima *EcoRI*, para comprobar que los fragmentos originados corresponden con los esperados teóricamente (Figura 11). Se puede observar que los fragmentos generados para las 4 colonias tienen el tamaño esperado y es el mismo para todas, por lo que se puede confirmar que la purificación del plásmido pD-LAEL-EI ha resultado exitosa. Tras la medición de las concentraciones y pureza (4.2.10) se selecciona aquella con mayor concentración de DNA para la escisión del inserto LAEL-EI, en este caso la colonia #2, con una concentración de 353.7 ng DNA/ μ L y pureza medida por UV-Vis adecuada.

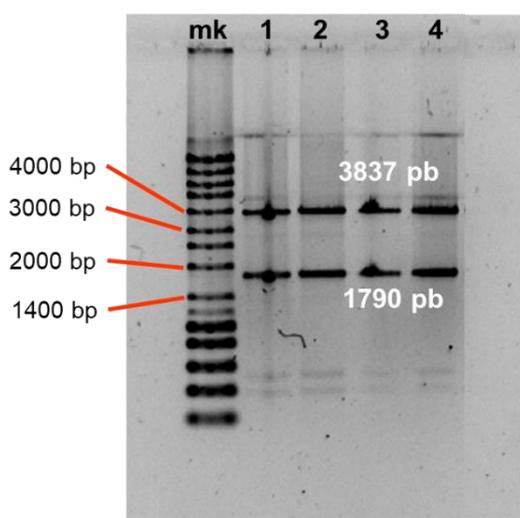


Figura 11. Mapa de restricción de pD-LAEL-EI con enzima *EcoRI*. Calle mk: marcador de pesos moleculares de DNA. Calles 1-4: colonias #1-4.

5.1.2. Escisión y purificación del inserto LAEL-EI

Para obtener el inserto LAEL-EI se realiza una digestión preparativa (4.2.5) del plásmido pD-LAEL-EI con la enzima *EarI*, que flanquea ambos lados del inserto (Figura 12A). Sin embargo, la digestión con *EarI* origina otros fragmentos de tamaño similar al inserto, de modo que no podría llevarse a cabo la separación en el gel de agarosa. Para solucionarlo, se realiza una co-digestión con *VspI*, que posee numerosos sitios de corte en el plásmido y reducirán el tamaño de los fragmentos originados por *EarI* sin digerir el inserto (4.1.4.4.1.). En la Figura 12B se muestra la banda correspondiente al inserto LAEL-EI aislado en el gel, que puede escindirse con un bisturí. La banda de gel extraída se purifica (4.2.9.) y se mide la concentración del inserto, obteniendo un valor de 9.0 ng DNA/ μ L. En un volumen de elución de 50 μ L, supone una cantidad de 450 ng.

El inserto obtenido está preparado para introducirse en otros plásmidos que hayan sido abiertos con enzimas de restricción que corten secuencias dejando extremos cohesivos complementarios, como son *EarI* o *SapI*.

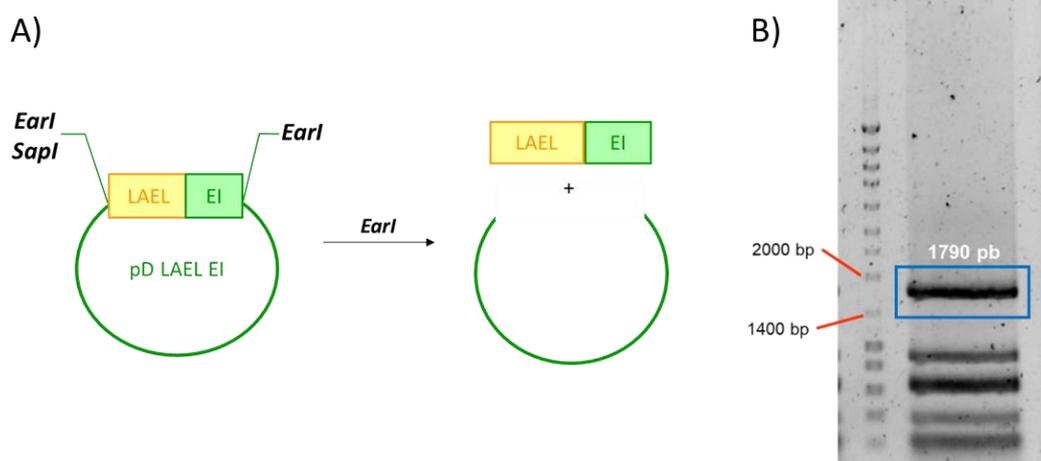


Figura 12. A) Esquema de escisión del inserto LAEL-EI del plásmido pD-LAEL-EI. B) Electroforesis preparativa en gel de agarosa con *EarI* + *VspI* del plásmido pD-LAEL-EI. En la primera calle se muestra el marcador de pesos moleculares de DNA, y en la segunda el inserto LAEL-EI marcado en azul, junto con otros fragmentos de DNA generados por la codigestión.

5.1.3. Amplificación, linealización y purificación del plásmido p7-VCAM

El plásmido p7-VCAM es un plásmido preparado por *GeneScript Biotech Corporation*, cuya concentración se ha diluido en agua ultrapura a 0.2 μ g/ μ L. Se ha llevado a cabo su transformación en células competentes NZY5 α (4.2.2.), a continuación, cultivadas en placa Petri con medio sólido LB-agar-Amp, ya que el plásmido contiene el gen de resistencia al antibiótico (4.1.4.4.2). Se realizó la transformación de 1 μ g de DNA y,

debido a la alta eficacia de transformación de las células (10^9 cfu/ μ g DNA) y la concentración de plásmido, el crecimiento en la placa ha sido excesivo, obteniendo un incontable número de colonias (orden de 10^9 colonias). Sin embargo, se ha podido seleccionar una colonia aislada para su cultivo en medio líquido LB-Amp (4.2.3.) y posterior purificación del DNA plasmídico (4.2.4.2). La concentración del plásmido obtenida es de 27.8 ng/ μ L, que en un volumen de elución de 600 μ L resulta en 16.68 μ g de DNA. Las absorbancias medidas en UV-Vis han sido las siguientes: A260/280 con un valor de 1.69, y A260/230 con un valor de 0.8. Si se realiza una comparación con la Tabla 6 (4.2.10.), se comprueba que son algo bajas, lo que puede indicar la presencia de impurezas provenientes de la propia bacteria, el medio de cultivo o el etanol presente en el kit de purificación.

Para la introducción del inserto LAEL-EI en el vector de expresión p7-VCAM, es necesario que éste se encuentre en su forma lineal y defosforilado. Se lleva a cabo una digestión preparativa de 1 μ g de DNA (4.2.5), empleando como enzima de restricción *SapI*. En el vector p7-VCAM, los sitios de corte para *SapI* se encuentran muy próximos entre sí (4.1.4.4.2), de modo que los fragmentos resultantes serán una secuencia pequeña de 65 bp que no es de interés ni puede visualizarse, y un fragmento de mayor tamaño que comprende la mayor parte del plásmido, y quedará en su forma lineal. Antes de realizar la electroforesis, se lleva a cabo el primer paso de defosforilación de los extremos del plásmido con la enzima *FastAP* (4.2.6.).

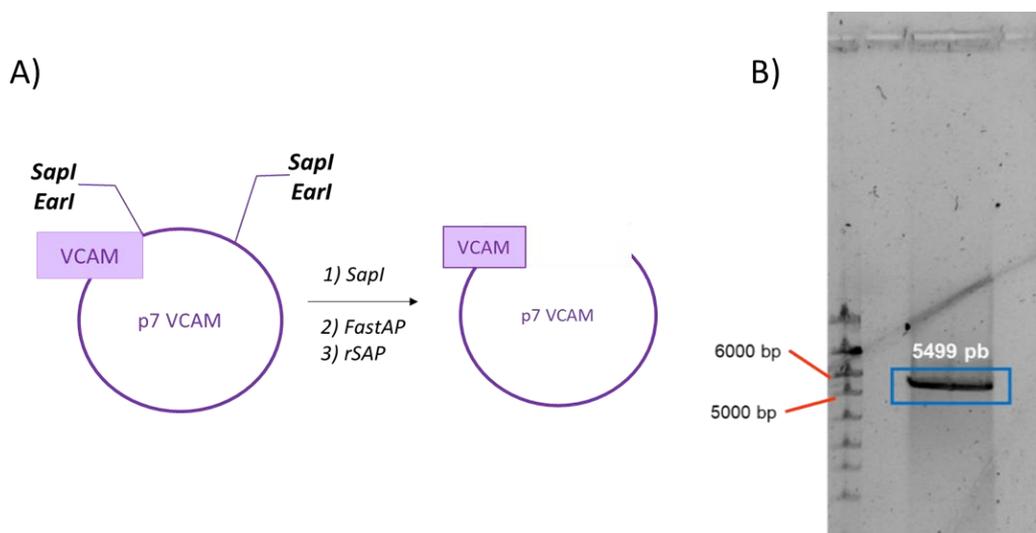


Figura 13. A) Esquema del plásmido p7-VCAM y posición de enzimas involucradas en su linealización B) Electroforesis preparativa en gel de agarosa del plásmido p7-VCAM digerido con *SapI*. En la primera calle se muestra el marcador de pesos moleculares de DNA, y en la segunda, marcado de azul, el plásmido linealizado sin un fragmento de 65 bp generado por el corte.

En la Figura 13B se observa una única banda en el gel de agarosa, correspondiente al fragmento de mayor tamaño del plásmido en su forma lineal, y que se escinde del gel con un bisturí. El fragmento lineal de DNA se purifica (4.2.9.) y se realiza el segundo paso de defosforilación con la enzima *rSAP*, para asegurar que los extremos generados por el corte con *SapI* no se unan entre sí en un proceso de “*self ligation*”. La concentración final del plásmido es de 3.7 ng DNA/ μ L, que en 50 μ L de volumen de elución supone una cantidad de 185 ng de DNA.

5.1.4. Ligación de p7-VCAM y LAEL-EI

Una vez obtenidos el inserto LAEL-EI y el vector de expresión p7-VCAM linealizado y defosforilado, se procede a la ligación de ambos mediante la enzima *T4 DNA ligasa* (4.2.7.). Las enzimas de restricción *EatI* y *SapI* dejan extremos cohesivos (esto es, una serie de nucleótidos sólo en una hebra de la doble cadena) que son complementarios entre sí, de modo que la unión específica y unidireccional entre el inserto y el vector plasmídico pueda llevarse a cabo (Figura 14). En una reacción de ligación se debe atender a la relación estequiométrica del plásmido y del inserto, ya que una adición en exceso de este último puede provocar su unión en tándem, pero una relación baja puede afectar a la efectividad de la ligación. Se toma una relación 1:3 (plásmido: inserto), haciendo reaccionar 50 ng de cada especie.

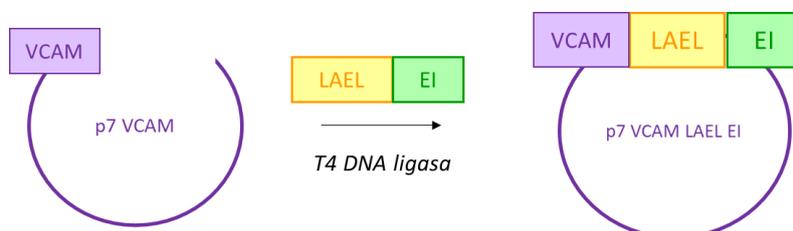


Figura 14. Esquema de la reacción de ligación de p7-VCAM y el inserto LAEL-EI mediante la enzima *T4 DNA ligasa*.

5.1.5. Amplificación del plásmido p7-VCAM-LAEL-EI

Por último, se lleva a cabo la amplificación del nuevo plásmido obtenido p7-VCAM-LAEL-EI. Primero, se realiza una transformación bacteriana en células competentes NZY5 α (4.2.2) y se cultiva en placa Petri en medio LB-agar-Amp. A continuación, se seleccionan 4 colonias para cultivo en medio líquido LB-Amp (4.2.3.) y su posterior purificación (4.2.4.1). Una vez purificado, se realiza un mapa de restricción con la enzima *EcoRI*, que posee un único sitio de corte en el plásmido, y permitirá comprobar la correcta inserción o no del fragmento LAEL-EI (Figura 15B). Se comprueba que para las colonias #1, 2 y 4, la banda obtenida en el gel corresponde al tamaño esperado para

el nuevo plásmido, mientras que para la colonia #3 la banda aparece a un tamaño mayor, pudiendo haber sucedido una inserción en tándem del fragmento LAEL-EI.

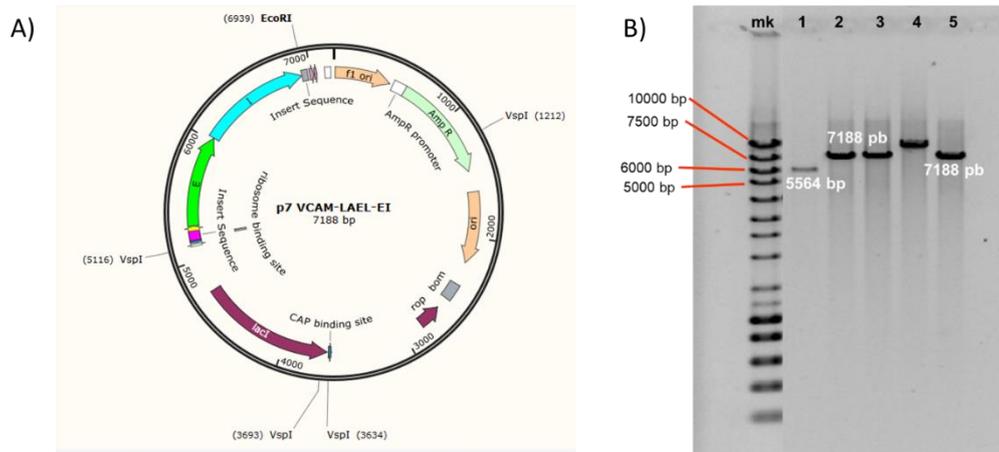


Figura 15. A) esquema del plásmido p7-VCAM-LAEL-EI, fragmentos que lo componen y sitios de corte con enzimas *EcoRI* y *VspI*. B) Mapa de restricción del plásmido p7-VCAM-LAEL-EI con enzima *EcoRI*. Calle mk: marcador de pesos moleculares de DNA; Calle 1: plásmido de control p7-VCAM; Calles 2-5: colonias #1-4.

La imagen de la electroforesis, sin embargo, no permite la diferenciación de tamaños con elevada exactitud, por lo que, para la comprobación en última instancia del correcto desarrollo de la reacción de ligación, se debe secuenciar el plásmido. Se comprueba la secuencia de la colonia para la que se haya obtenido mayor concentración, esta es la colonia #1, con un valor de 115.4 ng DNA/ μ L.

5.2. SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO p7-VCAM-LAEL-EI

La secuenciación del plásmido (4.2.11.) proporciona resultados en forma de electroferograma. En este, se observan una serie de picos, asociados a un color de fluorescencia distinto para cada base nitrogenada, y cuya altura determina la certeza en la lectura de las bases. La secuencia muestra la lectura de las bases nitrogenadas y los aminoácidos para los que codifican los codones (grupos de 3 bases nitrogenadas) desde el extremo N-terminal del plásmido al extremo C-terminal.

Así, se puede comprobar la correcta (Figura 16A) y única (Figura 16B) unión del inserto, ya que tras la última Gly del bloque EI no se ha unido un segundo inserto LAEL-EI, sino que se observa una Val final y el codón de terminación de la traducción en el extremo 3' del MCS del plásmido.

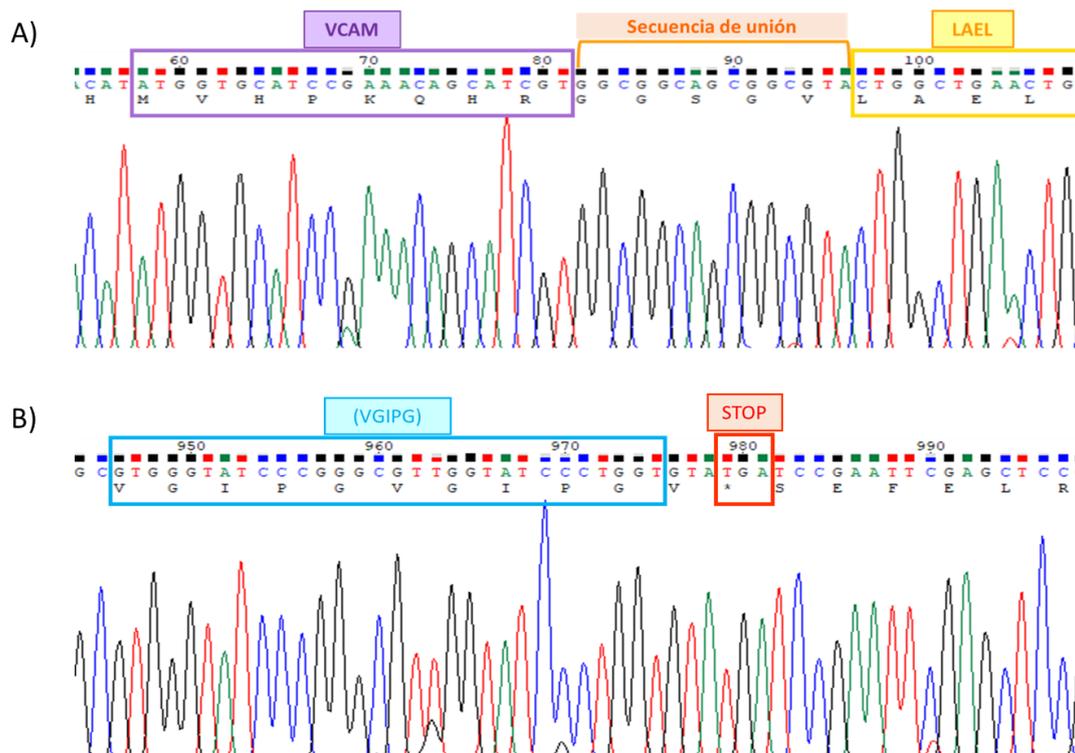


Figura 16. Electroferograma obtenido tras la secuenciación del plásmido p7-VCAM-LAEL-EI en Cenit Support Systems S.L. Dirección de lectura del DNA 5'-3' de izquierda a derecha. A) Secuencia del fragmento VCAM y su unión con el fragmento LAEL. B) Secuencia base del bloque I y finalización de la secuencia del gen VCAM-LAEL-EI con una Valina y codón de terminación.

Una vez comprobada la correcta ligación y secuencia del plásmido de expresión p7-VCAM-LAEL-EI, se procede a la bioproducción del polímero para el que codifica.

5.3. BIOPRODUCCIÓN DEL ELP VCAM-LAEL-EI

Para la expresión del polipéptido codificado por el gen se emplea una cepa de *E. coli* BLR (4.1.4.2.). Se realizan dos *screening* (4.2.13) para seleccionar la colonia más productora. Para ello, se atiende a la banda más intensa, que corresponderá al polímero. En el primer *screening* se ha puesto en evidencia una homogeneidad en la producción y se ha elegido la colonia #2 ya que muestra una banda bien definida e intensa a la altura del peso molecular esperado, ~48.89 kDa. Esta colonia, sembrada en las mismas condiciones, ha dado lugar a colonias hijas de las que se ha elegido la #2.7. (Figura 17).

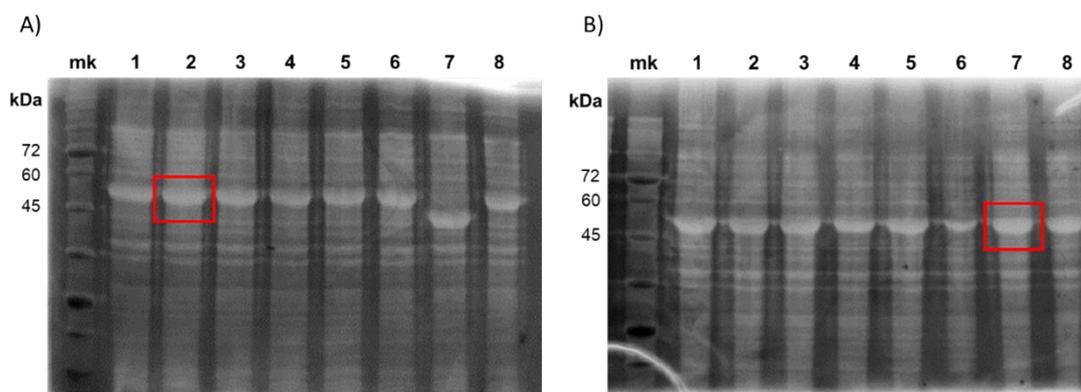


Figura 17. SDS-PAGE para análisis de la colonia más productora del polímero VCAM-LAEL-EI. A) Primer screening. Calle mk: marcador de pesos moleculares de proteínas. Calles 1-8: colonias #1-8. B) Segundo screening. Calle mk: marcador de pesos moleculares. Calles 1-8: colonias #2.1-2.8.

A partir de esta colonia se han llevado a cabo dos producciones del polímero VCAM-LAEL-EI (4.2.14.) descritas brevemente a continuación: en la primera producción se han tomado 200 μ L de pre-inóculo y se han llevado a 50 mL de medio LB (2x) para inocular. Del inóculo se han cultivado 40 mL en un volumen final de 6.4 L. En la segunda producción se han tomado 100 μ L de pre-inóculo y llevado a 100 mL de medio LB. Del inóculo se han cultivado 75 mL en 6 L.

Se ha seguido el incremento de la biomasa bacteriana mediante medidas a 600 nm de la absorbancia de los cultivos. Cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria de crecimiento se puede detener la producción. Se muestran los resultados en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores de las medias de las absorbancias medidas a 600 nm para dos muestras de ambas bioproducciones en Flask.

	Muestra	$A_{600nm} (1:10)$	A_{600nm}
Producción 1	8:30h (t_0)	0.386	3.86
	9:00h (t_{30})	0.380	3.80
Producción 2	9:00h (t_0)	0.379	3.79
	9:30h (t_{30})	0.153	1.53

Acabada la fase estacionaria de cultivo se procede con el lavado de células mediante los pasos de centrifuga descritos por el protocolo (4.2.14.). En la segunda producción se perdió 1/4 del volumen de la producción en un paso intermedio de lavado, por lo que se considera un volumen final de producción de 4.5 L.

Los valores de las absorbancias se han considerado para calcular el volumen de tampón de sonicado de acuerdo a la Ecuación 2. Sin embargo, para la segunda producción, se ajustó el valor calculado aproximándolo al volumen de 60 mL, que es el volumen mínimo que alcanza la sonda del equipo de sonicado.

Tras la ruptura de células por sonicación se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida (4.2.12.) para comprobar que la bioproducción del polímero ha sido adecuada (Figura 18). Se observa que el polímero se encuentra en el sobrenadante de sonificado, y una pequeña parte en el precipitado, que tras intentar resuspenderla se ha considerado despreciable. Así, se puede proceder a la purificación del polímero desde la fase soluble.

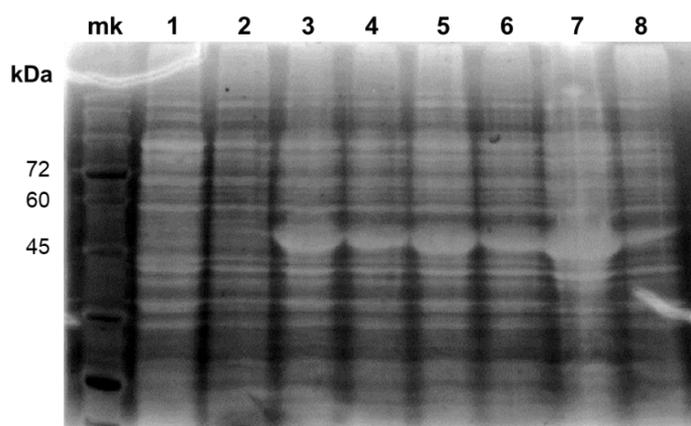


Figura 18. SDS-PAGE de la segunda producción del polímero VCAM-LAEL-EI. Calle mk: marcador de pesos moleculares de proteínas. Calle 1: pre-inóculo. Calle 2: Inóculo. Calle 3 y 4: dos muestras del flask a t_0 . Calle 5 y 6: dos muestras del flask a t_{30} . Calle 7: sobrenadante del sonificado. Calle 8: precipitado del sonificado.

5.4. PURIFICACIÓN DEL ELP VCAM-LAEL-EI

La purificación del polímero, presente en el sobrenadante de sonificado, se ha llevado a cabo mediante la metodología de ciclos de cambios de temperatura (4.2.15.).

En la purificación de la primera producción se realizaron tres etapas de ciclos de temperatura tras la acidificación inicial del sobrenadante de sonificado. Se presentaron problemas para la precipitación del polímero a 60 °C y su resuspensión a 4 °C, lo que provocó la retención del polímero en sobrenadantes y precipitados donde no correspondía. Esto conllevó a la realización de tres etapas adicionales de purificación para recuperar el polímero, en las que se probaron, por separado, los efectos de la adición de NaCl 1 M y la modificación del pH a condiciones de neutralidad. Una vez recuperadas las retenciones se juntó todo para realizar una última precipitación específica (60 °C) en iguales condiciones de pH y salinidad.

En la purificación de la segunda producción, se llevaron a cabo tres etapas de ciclos de temperatura, con adición de NaCl 1 M y modificación del pH a neutro para favorecer la precipitación específica y la resuspensión a 4°C. En la Figura 19A se muestra el

screening de seguimiento del proceso. Se detectó una retención del polímero en el precipitado a 4 °C de la primera etapa, que fue recuperado más adelante (Figura 19B). Se observa cómo las calles 8 y 10, que muestran el sobrenadante a 4 °C de la segunda y tercera etapa respectivamente, son prácticamente idénticas, por lo que la última etapa podría haberse evitado, ya que el polímero se encuentra aparentemente libre de impurezas y presenta una banda intensa.

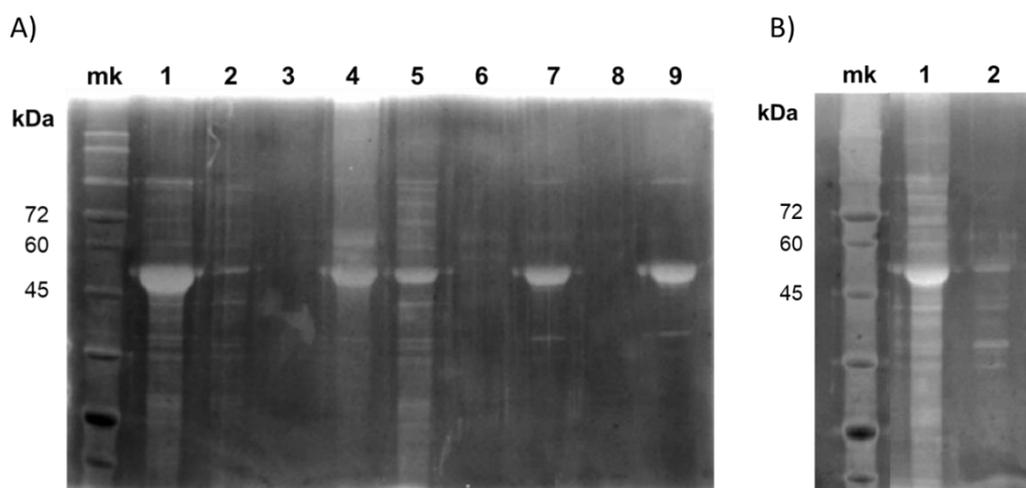


Figura 19. SDS-PAGE de seguimiento de la purificación en la segunda producción del polímero VCAM-LAEL-EI. A) Screening de seguimiento del proceso completo. Calles: mk: marcador de pesos moleculares de proteínas. Calle 1: sobrenadante tras adificación a pH 4. Calle 2: precipitado tras acidificación a pH 4. Calle 3: sobrenadante a 30°C de la etapa 1. Calle 4: sobrenadante a 4°C de la etapa 1. Calle 5: precipitado a 4°C de la etapa 1. Calle 6: sobrenadante a 30°C de la etapa 2. Calle 7: sobrenadante a 4°C de la etapa 2. Calle 8: sobrenadante a 30°C de la etapa 3. Calle 9: sobrenadante a 4°C de la etapa 3. B) Seguimiento de la recuperación del polímero retenido en el precipitado de la etapa 1. Calles: mk: marcador de pesos moleculares de proteínas. Calle 1: sobrenadante. Calle 2: precipitado

La diferencia en la ejecución de la purificación en las dos producciones ha permitido optimizar el método de purificación para el polímero VCAM-LAEL-EI: se adicionará NaCl 1 M para facilitar la precipitación específica a 60 °C y por otro lado se neutralizará el pH con Tris-base para favorecer la resuspensión en agua ultrapura a 4 °C. Esto se debe a que a pH neutro se modifican las cadenas laterales del ácido Glutámico presente en el polímero hasta su forma iónica, mejorando así su solubilidad en agua a bajas temperaturas.

Tras la purificación por ciclos de temperatura, en ambas producciones se han eliminado los restos de sales y tampón Tris mediante diálisis como se indica en el apartado 4.2.15.

Por último, se liofiliza una disolución del polímero en agua ultrapura, y se pesa el polímero obtenido una vez listo y seco. En la Tabla 9 se indica la cantidad de polímero obtenido para cada producción, así como su rendimiento por volumen de producción.

Tabla 9. Masa de polímero VCAM-LAEL-EI obtenida en dos producciones y rendimiento de producción en función del volumen de cultivo.

	Cantidad de polímero /mg	Rendimiento / mg·L ⁻¹
Producción 1	320.3	50.05
Producción 2	51.2	11.38

5.5. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL ELP VCAM-LAEL-EI

5.5.1. SDS-PAGE

Se ha realizado una electroforesis (4.2.16.1.) con distintas cantidades del polímero para analizar su peso molecular aparente y la presencia y proporción de impurezas (Figura 20). Las muestras se han preparado a partir de una disolución 2 µg/µL del polímero en agua ultrapura. El análisis de resultados se ha realizado en el programa *ImageLab*, donde se han seleccionado manualmente las bandas observadas.

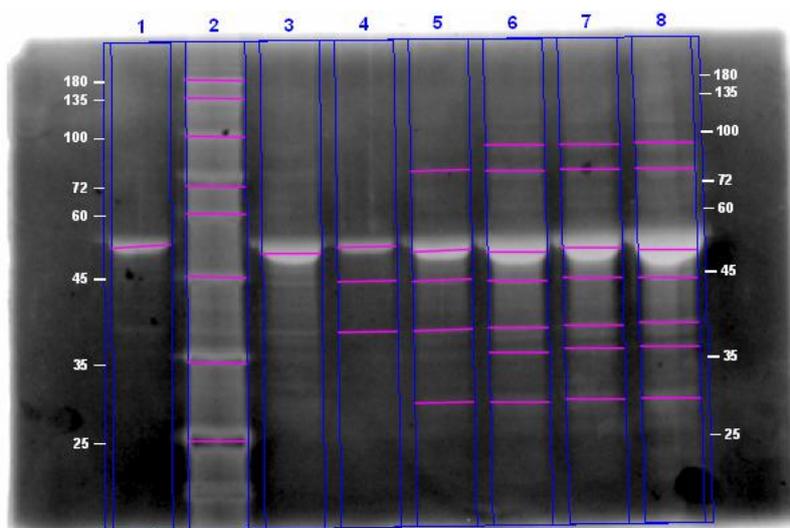


Figura 20. SDS-PAGE para caracterización de la primera producción del polímero VCAM-LAEL-EI. En rosa se muestran las bandas seleccionadas manualmente en el programa *ImageLab* para cada muestra. Calles: Calle 2: marcador de pesos moleculares de proteínas. Calles 1,3-8: 1, 2.5, 0.5, 2, 4, 6 y 8 µg de VCAM-LAEL-EI, respectivamente.

Con las dos primeras muestras se ha calculado el peso molecular (PM) aparente del polímero, obteniendo un valor medio de 50.91 kDa. El peso molecular esperado, sin embargo, es de 48.89 kDa. Esta diferencia se debe al retraso electroforético habitual de este tipo de proteína en el gel dada su alta hidrofobicidad por la presencia del bloque de isoleucinas, y este retraso tiene un valor del 4.13%.

Por otro lado, con las muestras de 0.5 a 8 μg se ha analizado la presencia de bandas correspondientes a impurezas en función del porcentaje de cada banda en cada calle, que da idea de la cantidad relativa de impurezas respecto del polímero. Como se observa en la figura, para cantidades por debajo de 4 μg no son apreciables todas las bandas, indicando que las impurezas correspondientes a tales pesos moleculares están en baja proporción. Se ha realizado la media de porcentajes de banda para las tres últimas calles, que son las que presentan todas las bandas visibles.

Tabla 10. Pesos moleculares medios y porcentaje de banda correspondientes a las bandas presentes en las calles 6-7-8 de la electroforesis de proteínas. Se numeran las bandas en orden de apariencia en el gel de arriba hacia abajo.

	PM medio	% banda medio
Impureza 1	92.55	2.03
Impureza 2	78.13	1.81
Polímero	49.86	87.42
Impureza 3	44.17	2.92
Impureza 4	38.53	2.00
Impureza 5	35.92	1.15
Impureza 6	29.22	2.67

La presencia de impurezas en baja proporción puede deberse a una leve degradación del polímero, que es altamente sensible a los cambios de temperatura. En la Tabla 10 se puede observar que los porcentajes de banda correspondientes a las impurezas toman valores menores del 3%, por lo que se pueden considerar descartables.

5.5.2. MALDI-TOF

Se ha realizado el análisis del peso molecular del polímero mediante la técnica MALDI-TOF (4.2.16.2.). Se ha preparado una disolución de la muestra de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en agua ultrapura. La matriz ha sido preparada por los técnicos de laboratorio encargados del instrumento y se compone de una disolución de 7.6 mg de 2,5-dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en 375 μL de etanol, sobre la que se añade una disolución acuosa 18 mg/mL de diamonio hidrogenocitrato (DHAC).

Se ha analizado el peso molecular del polímero obtenido en la primera producción y de una tercera producción realizada posteriormente, que ha seguido el protocolo de purificación optimizado en este trabajo. Para este último se ha disuelto la muestra en DMSO en lugar de agua ultrapura. El instrumento realiza tres análisis por cada muestra (ANEXOS). En la Figura 21 se muestra el primer espectro de masas obtenido para cada una, y en la Tabla 11 se indican los valores para las tres medidas, así como las medias.

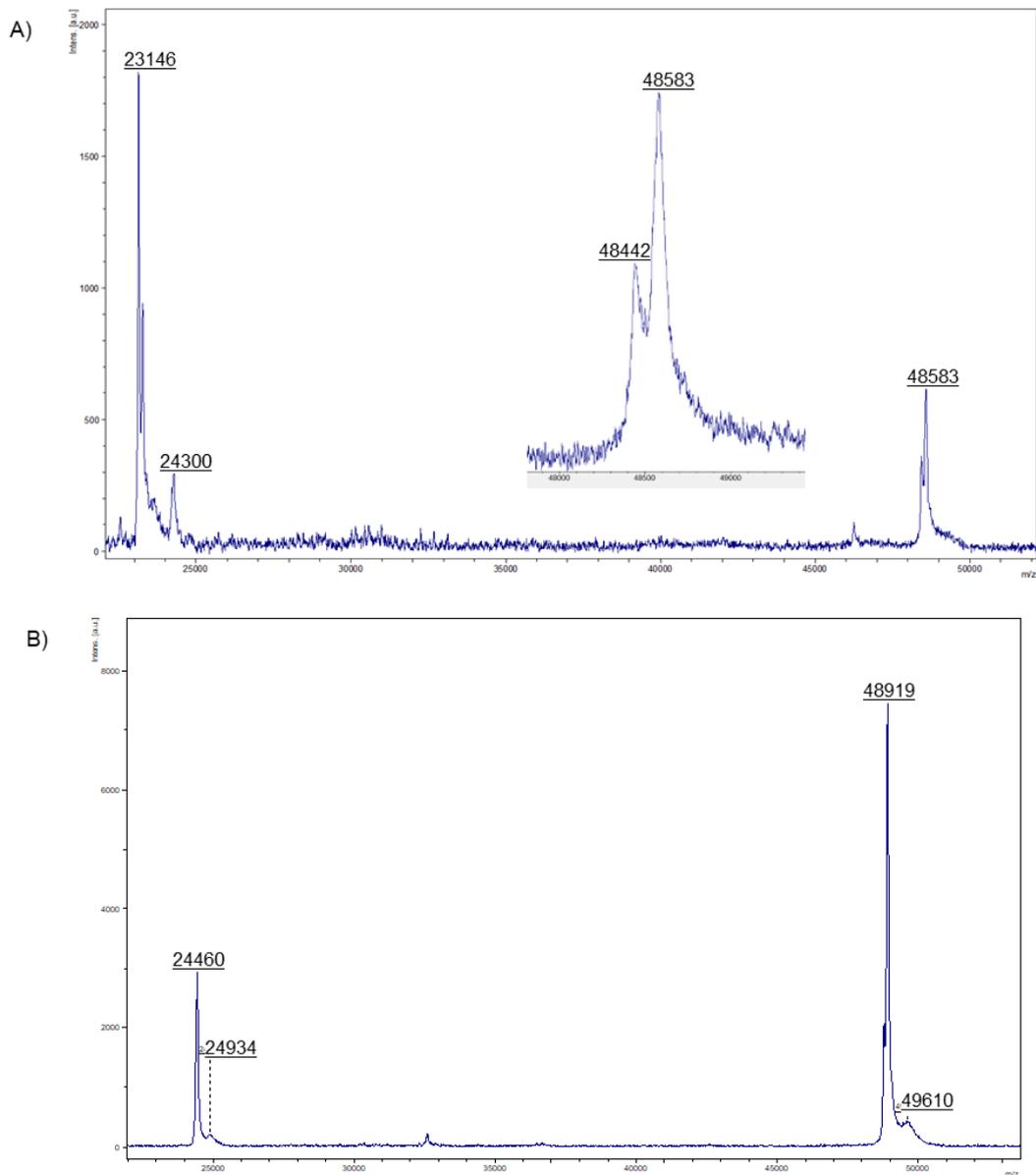


Figura 21. A) Espectro de masas obtenido para la primera producción del polímero VCAM-LAEL-EI, muestra $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en agua ultrapura. Se ha ampliado el último pico a $\sim 48\text{kDa}$. B) Espectro de masas obtenido para una tercera producción del polímero, muestra $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en DMSO.

El pico que aparece a la derecha (48583, 48919) en ambos espectros corresponde al peso molecular (PM) del polímero. A la izquierda (23146, 24460) se observa otro pico, que puede provenir de la fragmentación del polímero. También se observan dos picos minoritarios en ambos espectros, sin embargo, su intensidad es mayor en aquel de la primera producción. Puesto que el MALDI es una técnica altamente sensible, la mayor intensidad de los picos puede dar idea de la presencia de impurezas, discutidas en el apartado anterior (5.5.1.).

Tabla 11. Picos correspondientes al peso molecular obtenidos en los espectros de masas para la primera y tercera producción del polímero VCAM-LAEL-EI y error asociado a la medida por el propio equipo.

	PM /Da	PM medio \pm SD /Da
Producción 1	48583	48582 \pm 2.3
	48579	
	48583	
Producción 3	48919	48921 \pm 2.9
	48924	
	48919	
	48919	

El peso molecular esperado para el polímero es de 48.89 kDa. En la primera producción se obtiene un valor para el PM de 48.53 kDa, que se aleja del valor teórico con una desviación del 0.63%. En la tercera producción, que ha seguido el método optimizado de purificación y con muestra disuelta en DMSO, se observa una mejor línea de base para el espectro, que puede deberse al cambio de disolvente. Los picos minoritarios tienen una intensidad muy baja, casi despreciable. El PM obtenido es de 48.92 kDa, con una desviación tan solo del 0.06% por lo que puede considerarse que esta última preparación del polímero no ha sufrido degradaciones apreciables que han reducido su secuencia.

5.5.3. RMN

Para analizar la estructura molecular del polímero e identificar impurezas se ha realizado un espectro de protón (^1H -RMN) y un espectro bidimensional (HSQC) de la primera producción del polímero (4.2.16.3.). Se ha preparado para ello una disolución de 10 mg de muestra en 0.75 mL de DMSO deuterado (d-DMSO) y se ha analizado en el equipo *RMN Aligent Technologies* 500 Hz del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid con la inestimable ayuda del técnico Dr. Sergio Ferrero.

En la Figura 22 se muestran los espectros obtenidos y la asignación de señales observables.

Para realizar la asignación de las señales se ha analizado la composición en aminoácidos del polímero, que es la siguiente: A₃RG₂₂₃E₁₃QH₂I₆₀L₆KMP₁₁₁SV₁₅₃ (ANEXOS). Se han diferenciado los distintos tipos de protones presentes en cada aminoácido en función de sus desplazamientos químicos (δ) con ayuda de tablas de referencia [49] y de ese modo se han calculado los protones teóricos correspondientes al polímero.

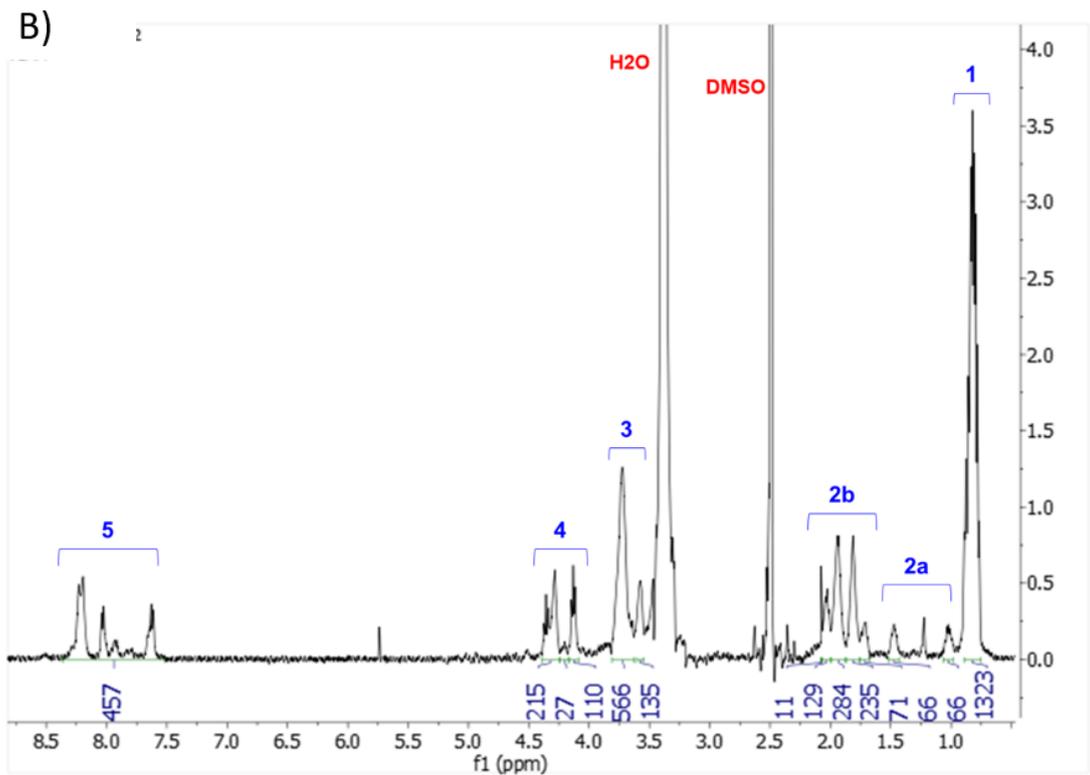
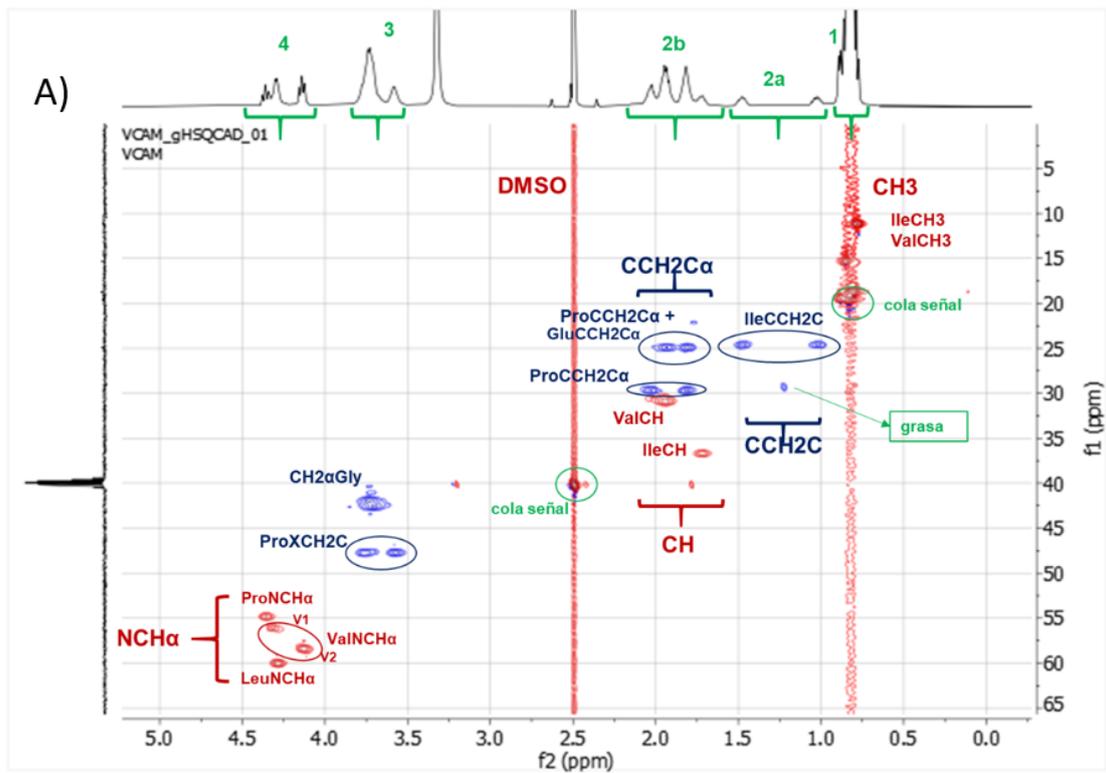


Figura 22. Espectros RMN para la primera producción de VCAM-LAEL-EI, disolvente d-DMSO. A) HSQC con la asignación de protones de los aminoácidos mayoritarios. B) 1H-RMN con integrales y zonas de picos asignadas. Los picos del disolvente: DMSO a δ 2.5 ppm; H2O a δ 3.3 ppm.

El espectro bidimensional ha permitido diferenciar los tipos de protones de los aminoácidos, y se han asignado las señales de aquellos mayoritarios en el polímero (Pro, Ile, Val, Gly), que dan señales más intensas. Por otro lado, en el espectro de protón se han calculado las integrales para los tipos de protones asignados y agrupados en bloques con desplazamientos similares. La comparación entre los cálculos teóricos y los resultados obtenidos experimentalmente se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Comparación entre valores teóricos y experimentales de las integrales de ^1H -RMN para el polímero VCAM-LAEL-EI.

Picos	Grupos	Valor teórico	Integral	Valor experimental	Desviación %
1	CH ₃	438	1314	1314	0.00
2a	CH ₃ C α (Ala)	9	137	136	0.73
	CCH ₂ C	128			
2b	XCH ₃ (Met)	3	740	729	1.49
	CCH ₂ C α	518			
	CH	219			
3	XCH ₂ C	262	708	707	0.14
	CH ₂ α	446			
4	CH α	353	353	353	0.00
5	=CH aromático	4	470	472	-0.43
	=NH yNH peptídico	466			
Desviación media absoluta %					0.56

Como se puede observar, se han logrado asignar casi todas las señales del espectro. Por comprobación de valores de desplazamiento químico en tablas de referencia, la señal comprendida en el grupo 2a que aparece a δ 1.25 ppm corresponde con valores de δ de ácidos grasos, por lo que la aparición de ese pico puede deberse a la presencia de grasa en el tubo de análisis. La señal a δ 5.7 ppm que aparece en ^1H -RMN no ha sido asignable, ya que no está presente en HSQC. En HSQC tampoco se observan las señales correspondientes a los grupos -CH₃ de la Ala y Met, dado que están en muy baja proporción respecto de los aminoácidos mayoritarios. Sin embargo, sí se ha considerado su mayor desplazamiento respecto de los grupos -CH₃ del resto de aminoácidos a la hora de calcular las integrales.

Los valores obtenidos para las integrales en ^1H -RMN se corresponden con los valores predichos teóricamente con una desviación absoluta mínima por lo que se puede afirmar que la estructura química del polímero es correcta. Cabe destacar la correspondencia tan exacta de las integrales para los protones del enlace peptídico con los valores teóricos.

5.5.4. DLS

Por último, se ha llevado a cabo el análisis del radio hidrodinámico y la carga superficial (potencial Z) del polímero mediante DLS (4.2.16.4.), así como la comprobación de la transición inversa con la temperatura y aproximación de esta T_i .

El comportamiento esperado para este polímero, debido a su carácter anfifílico, es la formación de nanopartículas micelares a temperaturas altas.

Se ha preparado una disolución de 2 mg/mL del polímero en agua ultrapura, filtrada con filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de poro 0.45 μm , y se han realizado medidas a 4 y 37 $^{\circ}\text{C}$ para estudiar el tamaño de molécula (Figura 23).

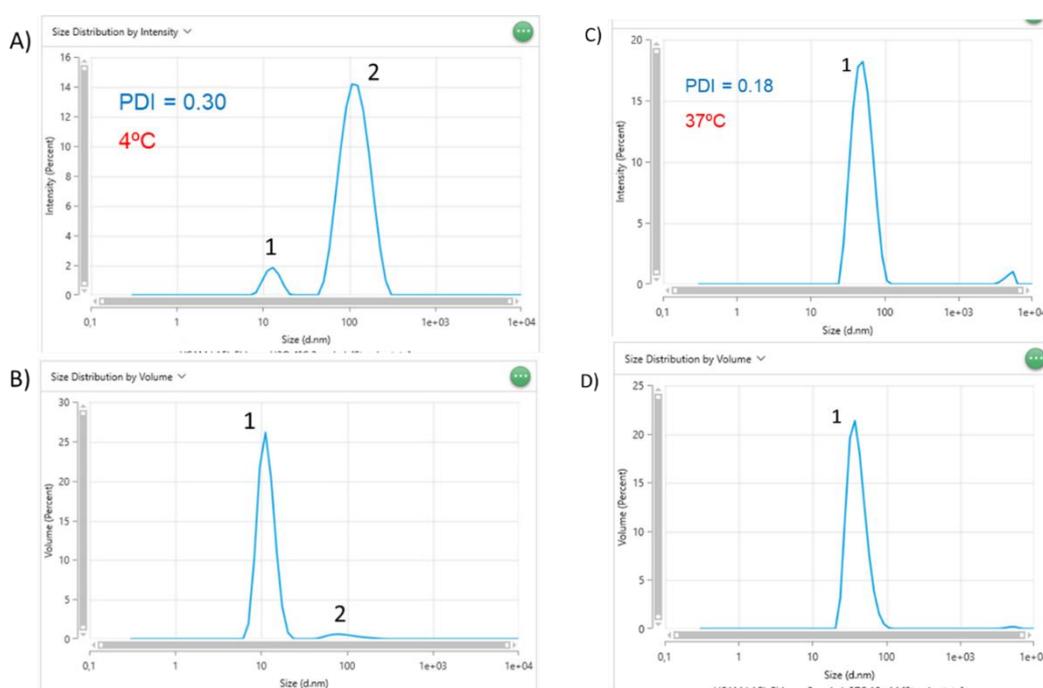


Figura 23. Espectro DLS de la segunda producción del polímero VCAM-LAEL-EI, 2 mg/mL en agua ultrapura. A) Gráfica de distribución del tamaño por intensidad a 4 $^{\circ}\text{C}$. B) Gráfica de distribución del tamaño por volumen a 4 $^{\circ}\text{C}$. C) Gráfica de distribución del tamaño por intensidad a 37 $^{\circ}\text{C}$. D) Gráfica de distribución del tamaño por volumen a 37 $^{\circ}\text{C}$.

A 4 $^{\circ}\text{C}$ se observa la presencia de dos picos diferenciados: el pico 1 corresponde al polímero, con un radio hidrodinámico de 12.97 nm. El pico 2 corresponde a partículas de mayor peso molecular, pero en baja proporción (3.9%) como puede observarse en la gráfica de distribución por volumen (B), y que pueden ser agregados previos a la transición. A 37 $^{\circ}\text{C}$, en cambio, se presenta sólo un pico correspondiente al polímero en su forma de nanopartícula, con un radio hidrodinámico de 51.50 nm y una proporción del 99% en la disolución.

Para el índice de polidispersidad (PDI) de una muestra se considera que por debajo de 0.1 la partícula es fundamentalmente monodispersa y la distribución es uniforme. Se puede observar que, a 4 °C, los valores de PDI son elevados (0.30), que se deben a la presencia de agregados moleculares en la disolución, es decir, la agregación del polímero. A 37 °C, en cambio, el PDI se reduce a 0.18, por lo que se puede considerar una distribución casi monodispersa.

El comportamiento del polímero en función de la temperatura se comprueba mediante una rampa de temperatura, de 4 a 37 °C, y en la que se espera diferenciar la T_t (Figura 24). Las gráficas de distribución por intensidad para cada temperatura se muestran en ANEXOS.

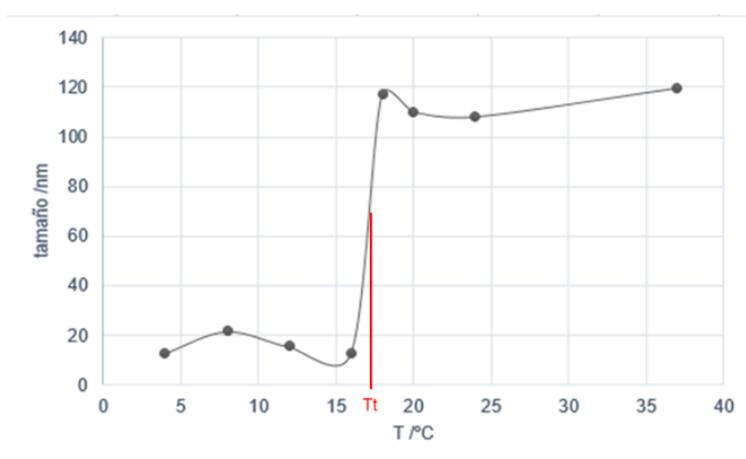


Figura 24. Distribución del tamaño del polímero VCAM-LAEL-EI en función de la temperatura. En rojo: temperatura de transición entre el estado en disolución y el estado de nanopartícula.

Se puede observar una diferencia notable del tamaño de la partícula a bajas y altas temperaturas, con una transición clara entre 16 y 18 °C, por lo que se estima que la T_t del polímero VCAM-LAEL-EI es de 17°C, por debajo de la temperatura en condiciones fisiológicas.

Los valores de tamaño de nanopartícula y T_t obtenidos se aproximan a aquellos descritos en bibliografía para ELPs con dibloque EI [40].

La medida del potencial Z se ha realizado a 37 °C y en medio ligeramente salino (10 mM NaCl), y se ha realizado una medida del diámetro hidrodinámico de la partícula en estas condiciones (Figura 25).

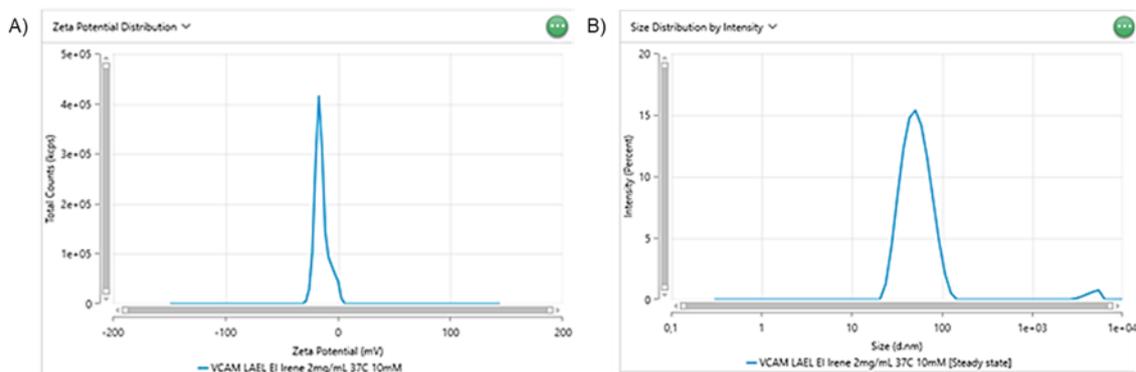


Figura 25. Espectros DLS de la segunda producción del polímero VCAM-LAEL-EI, en 2 mg/mL de agua ultrapura, 10 mM NaCl. A) Distribución del potencial Z. B) Distribución de tamaño de partícula por intensidad.

Como se observa en la Figura 25A, el valor obtenido para el potencial Z es de -14.52 mV, mientras que la nanopartícula mantiene las proporciones de tamaño indicadas anteriormente a 37 °C (Figura 25B).

Se conoce por trabajos anteriores [50] que el potencial Z para el bloque EI toma un valor de -30 mV. El potencial para el polímero VCAM-LAEL-EI se reduce debido a la presencia de aminoácidos con cadenas laterales positivas, como son la Arginina (R) y la Lisina (K). El signo del potencial Z hace referencia a la carga neta del polímero que en este caso es, como esperado, negativa, puesto que los ácidos Glutámicos se encuentran situados en la corona de la micela.

El potencial Z también da idea de la estabilidad de las partículas. Para los polímeros tipo elastina, valores de potencial en torno a ± 20 mV indican su estabilidad para no formar agregados. Por tanto, se demuestra que el polímero VCAM-LAEL-EI a temperatura fisiológica (37 °C) es estable en su forma de nanopartícula y no formará agregados moleculares.

6. CONCLUSIONES

Atendiendo al trabajo desarrollado en esta memoria, se pueden sacar una serie de conclusiones sobre el mismo:

1. Se ha sintetizado un gen codificante para el polímero tipo elastina VCAM-LAEL-EI mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido de expresión bacteriano.
2. Se ha realizado la transformación en células competentes BLR del plásmido p7-VCAM-LAEL-EI que contiene el gen codificante para el polímero tipo elastina objetivo.
3. Se ha bioproducido en dos ocasiones el polímero tipo elastina VCAM-LAEL-EI, con rendimientos de producción de 50.05 mg/L y 11.38 mg/mL, respectivamente.
4. Se ha optimizado un método de purificación para el ELP VCAM-LAEL-EI, que se ha puesto a prueba con la realización de una nueva bioproducción por otra persona, de la que se han obtenido resultados satisfactorios.
5. Se ha comprobado la presencia de impurezas en muy baja concentración en el polímero producido, mediante un análisis con SDS-PAGE.
6. Se ha comprobado, mediante la técnica MALDI-TOF, que el peso molecular del polímero obtenido corresponde al esperado con una desviación menor del 1%.
7. Se ha verificado por RMN que la estructura química del polímero corresponde a la esperada a través de los picos obtenidos para cada tipo de protones en los aminoácidos con una desviación media absoluta del 0.56% respecto del valor teórico.
8. Se ha estimado por DLS una temperatura de transición del polímero de 17 °C mediante la modulación del diámetro hidrodinámico en una rampa de temperatura de 4 a 37 °C.
9. Se ha comprobado el ensamblaje del polímero en forma de nanopartículas por encima de la T_t , con un diámetro de 51.50 nm, y con una carga superficial de -14.52 mV.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Li, Y.; Zhao, D. Basics of Molecular Biology. In: Molecular Imaging. Advanced Topics in Science and Technology in China. Springer: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 541-601. https://doi.org/10.1007/978-3-642-34303-2_16
- [2] Luque, J.; Herráez, A. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Harcourt, 2000; pp 1-8.
- [3] Lisabeth A., A. Fundamental Molecular Biology. Blackwell Publishing, 2007; pp 1-12.
- [4] Gómez-Márquez, J. La Revolución de la Ingeniería Genética. NACC. 2013, 20, 13-21.
- [5] Salazar Montes, A., Sandoval Rodríguez, A.; Armendariz Borunda, J. Vectores de clonación y expresión. En: Biología Molecular: fundamentos y aplicaciones en Ciencias de la Salud; Sandoval Rodríguez, A., Mena Enríquez, M.; Márquez Aguirre, A., Eds., McGraw-Hill Interamericana: México, 2013; pp. 127-138.
- [6] Nicholl, D. An introduction to Genetic Engineering, 3rd Ed., Cambridge, 2008; pp. 7.
- [7] Libretexts. 9.9: The Organic Chemistry of Genetic Engineering. Chemistry LibreTexts, 11 de agosto de 2018. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book:_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_v2.0_\(Soderberg\)/09:_Phosphate_Transfer_Reactions/9.09:_The_Organic_Chemistry_of_Genetic_Engineering](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book:_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_v2.0_(Soderberg)/09:_Phosphate_Transfer_Reactions/9.09:_The_Organic_Chemistry_of_Genetic_Engineering) (accedido el 15/06/2024).
- [8] Salazar Montes, A., Sandoval Rodríguez, A.; Armendariz Borunda, J. Enzimas de restricción. En: Biología Molecular: fundamentos y aplicaciones en Ciencias de la Salud; González Cuevas, J.; Bueno Topete, M.R., Eds., McGraw-Hill Interamericana: México, 2013; pp. 129-126.
- [9] Russell, P. J. iGenetics: A Molecular Approach, 3rd Edition. Pearson Education, 2014.
- [10] Hudecki, A.; Kiryczyński, G.; Łos, M. J.; Biomaterials, Definition, Overview. In: Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine, Marek J. Łos, M. J.; Hudecki, A.; Wiecheć, E., Eds. Academic Press, 2019; pp. 85-98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00007-1>
- [11] Mateu-Sanz, M., Fuenteslópez, C.V., Uribe-Gómez, J., Haugen, H.J., Pandit, A., Ginebra, M., Hakimi, O., Krallinger, M.; Samara, A. Redefining biomaterial

- biocompatibility: challenges for artificial intelligence and text mining. Trends Biotechnol. 2024, 42(4), 402-417. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.09.015>
- [12] Cacopardo, L. Biomaterials and Biocompatibility. In: Human Orthopaedic Biomechanics, Innocenti, B.; Galbusera, F.; Academic Press: 2022; pp.341-359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824481-4.00038-X>
- [13] Garanger, E.; Lecommandoux, S. Emerging opportunities in bioconjugates of Elastin-like polypeptides with synthetic or natural polymers. Adv. Drug Deliv. Rev. 2022, 191, 114589. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114589>
- [14] Hama, R.; Ulziibayar, A.; Reinhardt, J.W.; Watanabe, T.; Kelly, J.; Shinoka, T. Recent Developments in Biopolymer-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications. Biomolecules, 2023, 13, 280. <https://doi.org/10.3390/biom13020280>
- [15] Rauscher, S.; Pomès, R. The liquid structure of elastin. eLife, 6:e26526, 2017. <https://doi.org/10.7554/eLife.26526>
- [16] Trębacz, H.; Barzycka, A.; Mechanical Properties and Functions of Elastin: An Overview. Biomolecules, 2023, 13(3), 574. <https://doi.org/10.3390/biom13030574>
- [17] Richard Wang, R.; Ozsvar, J.; Yeo, G. C.; Weiss, A. S. Hierarchical Assembly of Elastin Materials. Curr. Opin. Chem. Eng. 2019, 24: 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.01.004>
- [18] Wang, K.; Meng, X.; Guo, Z. Elastin Structure, Synthesis, Regulatory Mechanism and Relationship With Cardiovascular Diseases. Front. Cell Dev. Biol. 2021, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.596702>
- [19] Venkatachalam, C. M.; Urry, D. W. Development of a Linear Helical Conformation From its Cyclic Correlate. β -Spiral Model of the Elastin Poly(pentapeptide) (VPGVG)_n. Macromolecules, 1981, 14, 1225–1229.
- [20] Debelle, L.; Tamburro, A.M. Elastin: molecular description and function. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 1999, 31(2), 261-272. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00098-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00098-3)
- [21] Depenveiller, C.; Baud, S.; Belloy, N.; Bochicchio, B.; Dandurand, J.; Dauchez, M.; Pepe, A.; Pomès, R.; Samouillan, V.; Debelle, L. Structural and Physical Basis for

- the Elasticity of Elastin. *Q. Rev. Biophys*, 2024, 57(e3), 1-23
<https://doi.org/10.1017/S0033583524000040>
- [22] Chalmers, G.W.; Gosline, J.M.; Lillie, M.A. The hydrophobicity of vertebrate elastins. *J. Exp. Biol.* 1999, 202(3), 301-314. <https://doi.org/10.1242/jeb.202.3.301>
- [23] Jamhawi, N. M.; Koder, R. L.; Wittebort, R. J. Elastin recoil is driven by the hydrophobic effect. *PNAS*, 2024, 121 (11): e2304009121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2304009121>
- [24] Perticaroli, S.; Ehlers, G.; Jalarvo, N.; Katsaras, J.; Nickels, J.D. Elasticity and Inverse Temperature Transition in Elastin. *Phys. Chem. Lett*, 2015, 6, 20; 4018-4025. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.5b01890>
- [25] Arturo Ibáñez-Fonseca, A.; Orbanic, D.; Arias, F. J.; Alonso, M.; Zeugolis, D. I.; Rodríguez-Cabello, J. C. Influence of the Thermodynamic and Kinetic Control of Self-Assembly on the Microstructure Evolution of Silk-Elastin-Like Recombinamer Hydrogels. *Small*. 2020, 16(28). <https://doi.org/10.1002/smll.202001244>
- [26] Ribeiro, A.; Arias, F. J.; Reguera, J.; Alonso, M.; Rodríguez-Cabello, J. C. Influence of the amino-acid sequence on the inverse temperature transition of elastin-like polymers. *Biophys J.* 2009, 97(1): 312-320. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.03.030>
- [27] Girotti, A.; González-Valdivieso, J.; Alonso-Sampedro, I.; Escalera-Anzola, S.; Ramos-Díez, S.; Arias, F.J. Elastin-like Polymers as Nanovaccines: Protein Engineering of Self-Assembled, Epitope-Exposing Nanoparticles. In: *Vaccine Technologies for Veterinary Viral Diseases. Methods in Molecular Biology*, 2nd Edition; Brun, A. Eds.; Humana: New York, NY, 2022; Vol. 2465, pp. 47-72. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2168-4_3
- [28] Rodríguez-Cabello, J.C.; Prieto, S.; Reguera, J.; Arias, F.J.; Ribeiro, A. Biofunctional design of elastin-like polymers for advanced applications in nanobiotechnology. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 2007, 18(3), 269-286. <https://doi.org/10.1163/156856207779996904>
- [29] González-Valdivieso, J.; Girotti, A.; Muñoz, R.; Rodríguez-Cabello, J.C.; Arias, F.J. Self-Assembling ELR-Based Nanoparticles as Smart Drug-Delivery Systems Modulating Cellular Growth via Akt. *Biomacromolecules*. 2019, 20(5), 1996-2007. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00206>

- [30] López-Barreiro, D.; Folch-Fortuny, A.; Muntz, I.; Thies, J. C.; Sagt, C. M. J.; Koenderink, G. H. Sequence Control of the Self-Assembly of Elastin-Like Polypeptides into Hydrogels with Bespoke Viscoelastic and Structural Properties. *Biomacromolecules*. 2023, 24, 1; 489-501. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01405>
- [31] Duro-Castano, A., Conejos-Sánchez, I.; Vicent, M.J. Peptide-Based Polymer Therapeutics. *Polymers*, 2014, 6(2), 515-551. <https://doi.org/10.3390/polym6020515>
- [32] Gray, M. A.; Rodriguez-Otero, M. R.; Champion, J. A. Self-Assembled Recombinant Elastin and Globular Protein Vesicles with Tunable Properties for Diverse Applications. *Acc. Chem. Res*, 2024, 57, 9: 1227-1237. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.3c00694>
- [33] Ferrazzano, L.; Catani, M.; Cavazzini, A.; Martelli, G.; Corbisiero, D.; Cantelmi, P.; Fantoni, T.; Mattellone, A.; De Luca, C.; Felletti, S.; Cabri, W.; Tolomelli, A. Sustainability in Peptide Chemistry: Current Synthesis and Purification Technologies and Future Challenges. *Green Chem.* 2022, 24; 975-1020. <https://doi.org/10.1039/D1GC04387K>
- [34] Rodríguez-Cabello, J.C.; Girotti, A.; Ribeiro, A.; Arias, F.J. Synthesis of Genetically Engineered Protein Polymers (Recombinamers) as an Example of Advanced Self-Assembled Smart Materials. In: *Nanotechnology in Regenerative Medicine. Methods in Molecular Biology*, Navarro, M.; Planell, J., Eds. Humana: New York, NY, 2012; Vol. 881, pp.17-38. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-388-2_2
- [35] Shi, X.; Chen, D.; Liu, G.; Zhang, H.; Wang, X.; Wu, Z.; Wu, Y.; Yu, F.; Xu, Q. Application of Elastin-like Polypeptide in Tumor Therapy. *Cancers*, 2022, 14, 3683. <https://doi.org/10.3390/cancers14153683>
- [36] Varanko, A. K.; Jonathan C. Su, J.C.; Chilkoti, A. Elastin-Like Polypeptides for Biomedical Applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng*, 2020, 22: 343-369 <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-092419-061127>
- [37] Garcia-Garcia, C.; Sai S. Patkar, S. S.; Wang, B.; Abouomar, R.; Kiick, K. L. Recombinant Protein-Based Injectable Materials for Biomedical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2023, 193, 114673. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114673>

- [38] Jenkins, I. C.; Milligan, J. J.; Chilkoti, A. Genetically Encoded Elastin-Like Polypeptides for Drug Delivery. *Adv. Healthcare Mater.* 2021, 10, 2100209. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100209>
- [39] Van Strien, J.; Escalona-Rayo, O.; Jiskoot, W.; Slütter, B.; Kros, A. Elastin-like polypeptide-based micelles as a promising platform in nanomedicine. *J. Control. Release*, 2023, 353, 713–726. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.12.033>
- [40] García-Arévalo, C.; Bermejo-Martin, J. F.; Rico, L.; Iglesias, V.; Martin, L.; Rodriguez-Cabello, J. C.; Arias, F. J. Immuno modulatory nanoparticles from elastin-like recombinamers: single-molecules for tuberculosis vaccine development. *Mol. Pharmaceutics*, 2013, 10, 586–597. <https://doi.org/10.1021/mp300325v>
- [41] Ohmori, N.; Niidome, T.; Wada, A.; Hirayama, T.; Hatakeyama, T.; Aoyagi, H. The enhancing effect of anionic alpha-helical peptide on cationic peptide-mediated transfection systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 235, 726–729. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6880>
- [42] Bouzin, C.; Feron, O. Targeting tumor stroma and exploiting mature tumor vasculature to improve anti-cancer drug delivery. *Drug Resist. Updat.* 2007, 10, 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2007.03.001>
- [43] Singh, V.; Kaur, R.; Kumari, P.; Pasricha, C.; Singh, R. ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in Various Inflammatory and Cardiovascular Disorders. *Clin. Chim. Acta.* 2023, 548. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117487>
- [44] Kong, D.; Kim, Y. K.; Kim, M. R.; Jang, J. H.; Lee, S. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1(VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1057. <https://doi.org/10.3390/ijms19041057>
- [45] Taooka, Y.; Chen, j.; Yednock, T.; Sheppard, D. The Integrin $\alpha 9\beta 1$ Mediates Adhesion to Activated Endothelial Cells and Transendothelial Neutrophil Migration through Interaction with Vascular Cell Adhesion Molecule-1. *J. Cell Biol.* 1999, 145(2): 413-420. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.2.413>
- [46] Marchese, M. E.; Berdnikovs, S.; Cook-Mills, J.M. Distinct Sites within the Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) Cytoplasmic Domain Regulate VCAM-1 Activation of Calcium Fluxes versus Rac1 during Leukocyte Transendothelial Migration. *Biochemistry.* 2012, 51, 41; 8235-8246. <https://doi.org/10.1021/bi300925r>

- [47] Ribeiro, A. *Functionality Development in Systems Base don Elastin-Like Recombinamers: From Nano-Objects to Macrogels*. Tesis doctoral, Universidad de Valladolid, marzo de 2010.
- [48] Girotti, A. *Desarrollo de una plataforma biotecnológica para la obtención de polímeros recombinantes tipo elastina*. Tesis doctoral, Universidad de Valladolid, noviembre de 2011.
- [49] Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Badertscher, M. *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*, 4th Ed. Springer, 2009.
- [50] García Arévalo, M. C. *Elastin-like Recombinamers, Tissue Engineering, Gene Delivery, Nanovacciones, Biomedicine*. Tesis doctoral, Universidad de Valladolid, 2012.

ANEXOS

ANEXO I. Espectros de masas

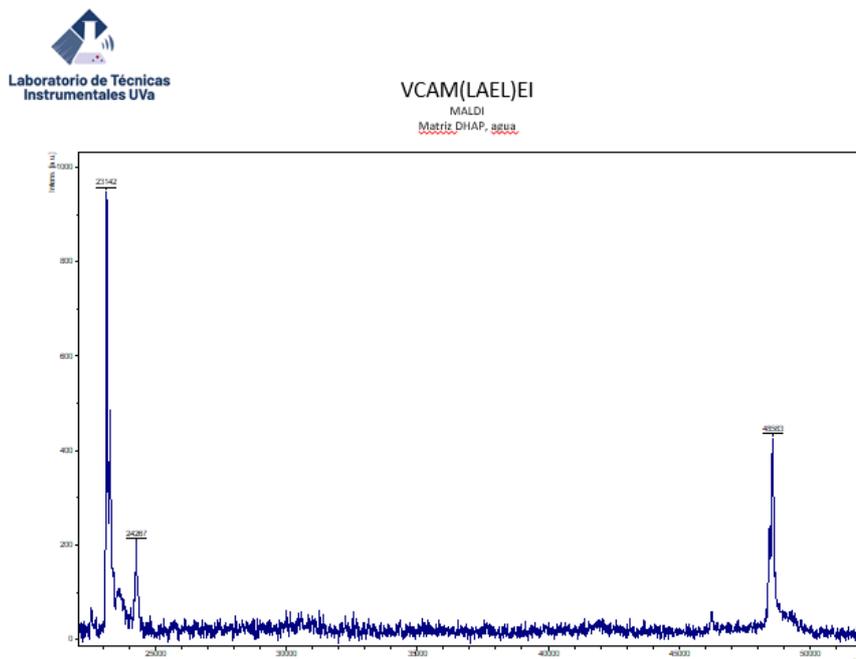


Figura 26. Espectro de masas de la primera producción de VCAM-LAEL-EI, medida 2.

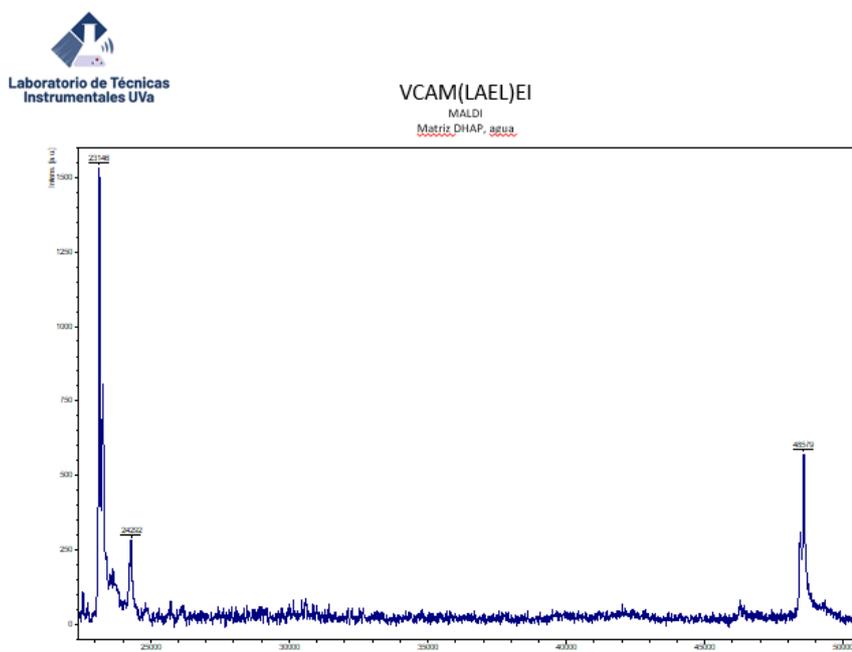


Figura 27. Espectro de masas de la primera producción de VCAM-LAEL-EI, medida 3.

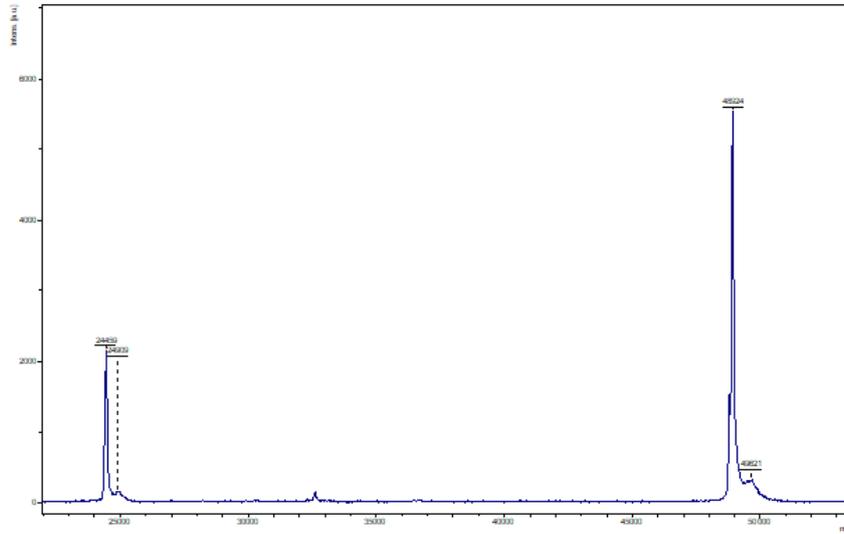


Figura 28. Espectro de masas de la tercera producción de VCAM-LAEL-EI, medida 2.

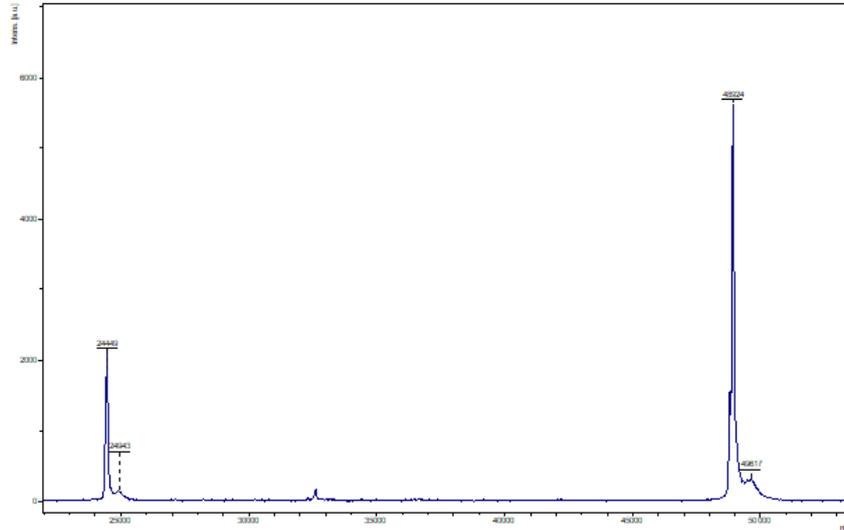


Figura 29. Espectro de masas de la tercera producción de VCAM-LAEL-EI, medida 3.

ANEXO II. Asignación de protones en aminoácidos

Aminoácido	abr	CANT	CH3	CH3Cα	XCH3	CCH2C	CCH2Cα	XCH2C	CH2α	CHα	CH	CH arom	NH pept.*	NH/NH2	OH/SH
Alanina	A	3	0	3	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0
Arginina	R	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	2	2	0
Asparagina	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aspártico	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cisteína	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenilalanina	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glicina	G	223	0	0	0	0	0	0	223	0	0	0	223	0	0
Glutámico	E	13	0	0	0	26	13	13	0	13	0	0	13	0	0
Glutamina	Q	1	0	0	0	2	1	1	0	1	0	0	1	1	0
Histidina	H	2	0	0	0	0	0	2	0	2	0	4	2	2	0
Isoleucina	I	60	120	0	0	60	0	0	0	60	60	0	60	0	0
Leucina	L	6	12	0	0	0	6	0	0	6	6	0	6	0	0
Lisina	K	1	0	0	0	2	1	1	0	1	0	0	1	1	0
Metionina	M	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0
Prolina	P	111	0	0	0	222	111	111	0	111	0	0	0	0	0
Serina	S	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
Tirosina	Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Treonina	T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Triptófano	W	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valina	V	153	306	0	0	0	0	0	0	153	153	0	153	0	0
TOTAL		576	438	3	1	64	259	131	223	353	219	4	466	6	1
	INTEGRALES		x3	x3	x3	x2	x2	x2	x2	x1	x1	x1	x1	x1	† Sus protones se van a intercambiar libremente con los D del agua por lo que quedan bajo la señal del agua y no se integran.
	PICOS	1	1314	9	3	128	518	262	446	353	219	4	466	5	
	ppm aprox		2a	2b	2a	2b	2b	3	3	4	2b	5	5	5	
	TOTALES		1314	137	740		708			353		470			
	PICOS		1	2a	2b		3			4		5			

Figura 30. Asignación de distintos tipos de protones de los aminoácidos del polímero VCAM-LAEL-EI, asignación de picos y cálculo de integrales.

ANEXO III. Distribución de tamaño del polímero en rampa de temperatura (DLS)

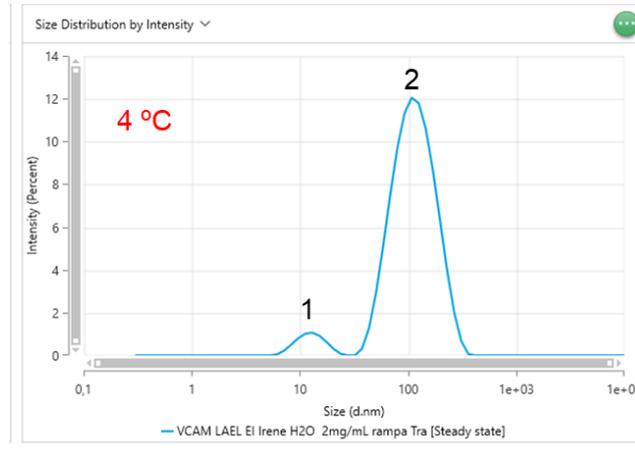


Figura 31. DLS. Gráfica distribución del tamaño por intensidad a 4 °C

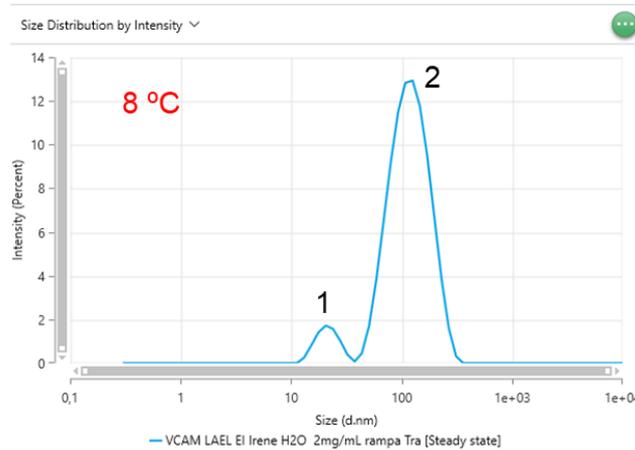


Figura 32. DLS. Gráfica distribución del tamaño por intensidad a 8 °C

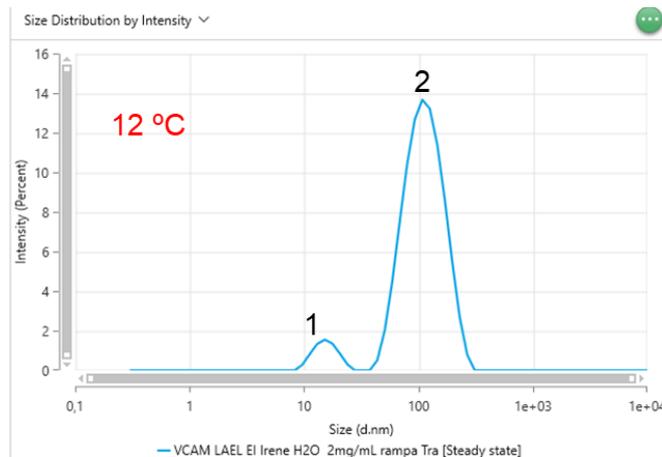


Figura 33. DLS. Gráfica distribución del tamaño por intensidad a 12 °C

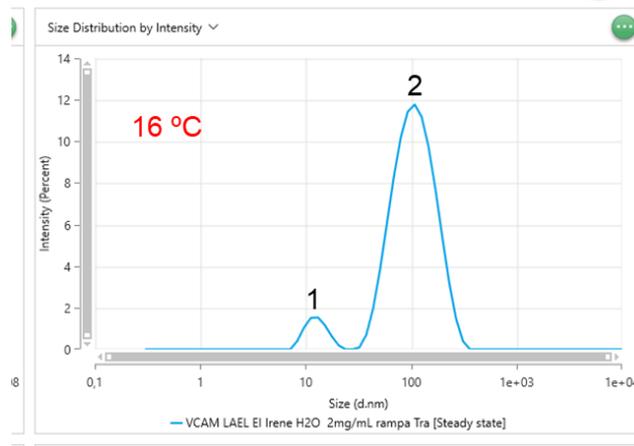


Figura 34. DLS. Gráfica distribución del tamaño por intensidad a 16 °C

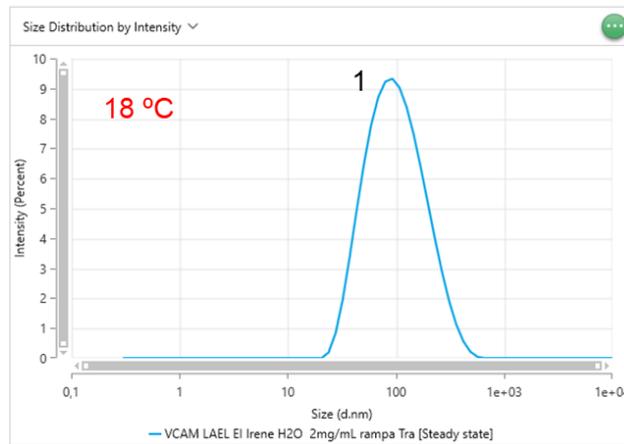


Figura 35. DLS. Gráfica distribución del tamaño por intensidad a 18 °C

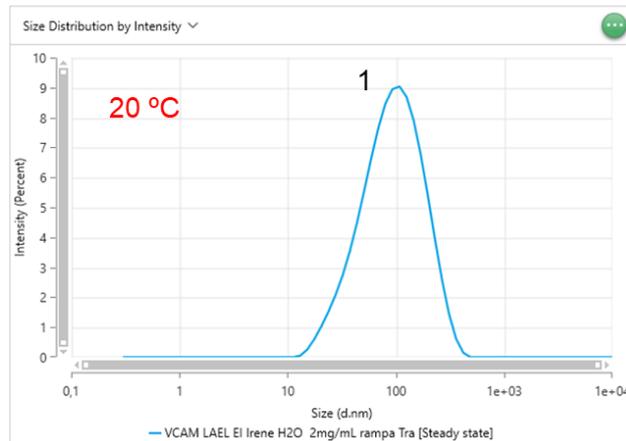


Figura 36. DLS. Gráfica distribución del tamaño por intensidad a 20 °C

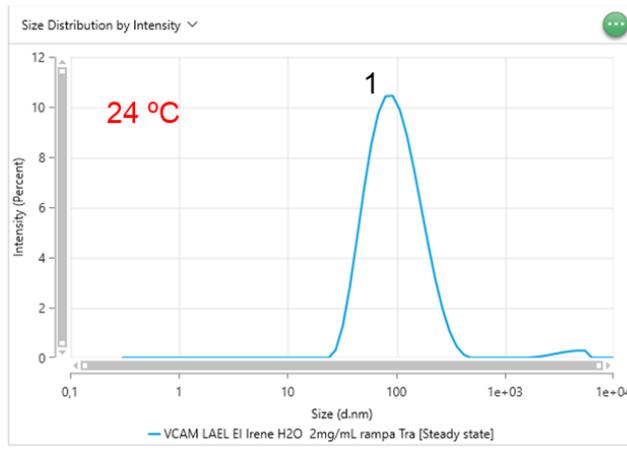


Figura 37. DLS. Gráfica distribución del tamaño por intensidad a 24 °C

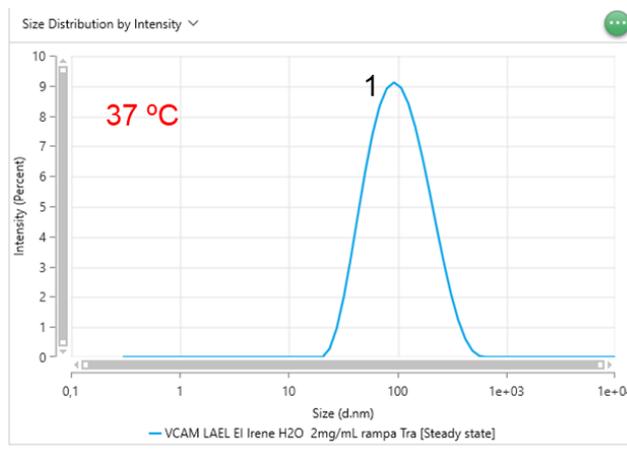


Figura 38. DLS. Gráfica distribución del tamaño por intensidad a 37 °C