



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN QUÍMICA

**SÍNTESIS DE UN COPOLÍMERO RECOMBINANTE,
MODIFICACIÓN QUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN DE LAS
NANOPARTÍCULAS FORMADAS EN CONDICIONES
FISIOLÓGICAS**

Autor:

YEIFER ERLEY MEJIA JURADO

Tutoras:

Dra. LAURA MARTIN MAROTO

Dra. ALESSANDRA GIROTTI

Año:

2024/2025

Contenido

1. RESUMEN	7
1. ABSTRACT	8
2. INTRODUCCIÓN	10
3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1 Materiales	19
4.1.1 Lista de reactivos	19
4.1.2 Medios de cultivo bacteriano.....	20
4.1.3 Buffers	20
4.1.4 Soluciones de tinción.....	20
4.2 Métodos	21
4.2.1 Transformación bacteriana	21
4.2.2 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	22
4.2.3 Selección de las colonias para la bioproducción	23
4.2.4 Producción de ELPs	24
4.2.5 Lavado de células	26
4.2.6 Ruptura de células	26
4.2.7 Toma de alícuotas y preparación de muestras para seguimiento	27
4.2.8 Purificación del ELP.....	28
4.2.9 Caracterización del ELP biosintetizado.....	30
4.2.10 Modificación química del ELP (3K(EI) ₂).....	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1 Bioproducción del 3K(EI) ₂	38
5.2 Purificación del ELP.....	40
5.3 Modificación de las lisinas terminales de ELP para incluir grupos alquino.	42
5.3.1 Modificación de las lisinas terminales del ELP con grupos ciclooctino.	42
5.3.2 Modificación de las lisinas terminales del polímero con alquino de cadena lineal.	44
5.4 Caracterización físico-química de los ELPs.....	46
5.4.1 MALDI-TOF	46
5.4.2 RMN.....	47
5.4.3 IR	49
5.4.4 Dispersión de luz dinámica (DLS, <i>DYNAMIC LIGHT SCATTERING</i>).....	50

6. CONCLUSIONES	55
7. BIBLIOGRAFIA	56
8. ANEXOS.....	60

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al causante de todo esto, Álvaro. Un profesor que demuestra tantísima pasión por lo que hace que es capaz de transmitirlo hacia otras personas.

A mis tutoras, Laura y Alessandra. Sin ninguna duda no estaría terminando este trabajo de no ser por ellas. Gracias por orientarme y ayudarme siempre que lo necesité.

A Javier Arias, que aguantó mil y un preguntas y me respondía mil y una veces.

Al grupo de SintACat que, aunque estuve poco tiempo, me recibió con los brazos abiertos y me ayudaban en todo lo que necesitase.

Andrea, Buga, Astrid, Ariadna. Me habéis ayudado un montón, de verdad, muchas gracias.

Mis padres. Que aguantaron mis indecisiones, que confiaron mas en mi que yo mismo. Muchas gracias, os lo agradezco de corazón.

La vida no se mide por el número de respiraciones que tomamos, sino por los momentos que nos quitan el aliento.

George Carlin.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	NOMBRE COMPLETO
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BCN	(1R,8S,9S)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il-metanol
CMT	Temperatura micelar crítica
CDCL ₃	Cloroformo deuterado
CuAAC	Cicloadición dipolar [2+3] azida-alquino catalizada por cobre
DCM	Diclorometano
DMSO-d ₆	Dimetilsulfoxido deuterado
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMF	Dimetilformamida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELP	Polímeros tipo elastina
ITC	Ciclos de transición inversa
ITT	Transición inversa con la temperatura
IR	Infrarrojo
LB	Luria Bertani
MALDI-TOF	Desorción/Ionización por Láser asistida por una matriz con detector de tiempo de vuelo
PDI	Índice de polidispersidad
PSA	Persulfato de amonio
PMFS	Fluoruro de fenilsulfonilmetano
RMN	Resonancia magnética nuclear
SOC	Super Optimal Broth
SPAAC	Cicloadición azida-alquino promovida por tensión
TB	Terrific Broth
TEA	Trietilamina
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TLC	Cromatografía de capa fina
T _t	Temperatura de transición

1. RESUMEN

La elastina es una proteína con capacidad de autoensamblaje, elevada resistencia mecánica y gran elasticidad. El análisis detallado de su estructura ha permitido comprender el origen de sus excepcionales propiedades fisicoquímicas, lo que ha llevado al desarrollo de polímeros recombinantes tipo elastina (*Elastin-Like polymers*, ELPs).

Los ELPs destacan en el ámbito de la nanotecnología y la biomedicina. El diseño de sistemas crecientes en complejidad, unido a sus propiedades de autoensamblado, permite obtener geles y nanopartículas muy útiles en la liberación controlada de fármacos.

En este trabajo, se ha preparado un copolímero tipo elastina anfifílico recombinante, 3K(EI)₂, capaz de formar nanopartículas en medio fisiológico a partir de una cepa de *Escherichia Coli*. El bloque hidrofílico presenta lisinas en su extremo y han sido modificadas para incluir grupos alquino terminales en su estructura, posibilitando su utilización en la química click. Esta metodología se caracteriza por su alta especificidad, rapidez y carácter no reversible, lo que la convierte en una herramienta ideal para la modificación de biopolímeros y el diseño de materiales avanzados.

La caracterización de los polímeros se ha llevado a cabo con diferentes técnicas: electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectrometría de masas (MALDI-TOF), espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear (RMN). Las nanopartículas se han caracterizado mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y presentan diámetros en torno a 50 nm. El objetivo final de este trabajo de fin de grado es optimizar la funcionalidad del ELP para aplicaciones en la administración controlada de fármacos.

1. ABSTRACT

Elastin is a protein with self-assembly capability, high mechanical resistance, and exceptional elasticity. Detailed analysis of its structure has allowed us to understand the origin of its exceptional physicochemical properties, leading to the development of elastin-like recombinant polymers (Elastin-Like Polymers, ELPs).

ELPs stand out in the fields of nanotechnology and biomedicine. The design of increasingly complex systems, combined with their self-assembly properties, allows for the creation of gels and nanoparticles that are very useful in controlled drug delivery.

In this work, an amphiphilic recombinant copolymer, 3K(EI)₂, capable of forming nanoparticles in a physiological medium from a strain of *Escherichia coli*, has been prepared. The hydrophilic block presents lysines at its end, which have been modified to include terminal alkyne groups in their structure, enabling their use in click chemistry. This methodology is characterized by its high specificity, speed, and irreversible nature, making it an ideal tool for the modification of biopolymers and the design of advanced materials.

The characterization of the polymers has been carried out using various techniques: polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), mass spectrometry (MALDI-TOF), infrared spectroscopy, and nuclear magnetic resonance (NMR). The nanoparticles have been characterized by dynamic light scattering (DLS) and have diameters around 60 nm. The final objective of this bachelor's thesis is to optimize the functionality of the ELP for applications in controlled drug delivery.

2. INTRODUCCIÓN

Un **biomaterial** es una sustancia diseñada para interactuar con sistemas biológicos y utilizada, ya sea sola o como parte de un sistema complejo, para influir y controlar las interacciones con componentes vivos en el desarrollo de tratamientos o diagnósticos médicos. Los biomateriales pueden tomar forma de implantes o dispositivos médicos (tejidos u órganos artificiales, marcapasos, válvulas, capsulas para la liberación de fármacos, etc.) con el objetivo de reemplazar o mejorar las funciones de tejidos y órganos dañados o degenerados [[1](#)].

Antes de los años 40, la mayoría de los biomateriales producían una alta tasa de rechazo por parte del cuerpo humano. Esto motivó que, en las últimas décadas, la investigación se centrara en comprender las interacciones entre los materiales y los sistemas vivos. El objetivo principal ha sido **desarrollar nuevos biomateriales** que cumplan con requisitos clave como funcionalidad, durabilidad y biocompatibilidad. Actualmente, la investigación se enfoca en el desarrollo de materiales biomiméticos que imiten las propiedades de los tejidos naturales, mejorando así la biocompatibilidad y funcionalidad de los implantes [[2](#) , [3](#) , [4](#) , [5](#)]. El concepto de biocompatibilidad se define como “la capacidad de un material para funcionar con una respuesta adecuada del huésped en una aplicación específica” [[6](#)]. Estos dispositivos pueden imitar funciones biológicas naturales y se adaptan a las necesidades únicas de cada paciente, ofreciendo soluciones más eficaces y personalizadas en campos como la ingeniería de tejidos, la monitorización de parámetros fisiológicos y la liberación controlada de fármacos [[7](#)].

Actualmente, entre los materiales biomiméticos desarrollados se encuentran los de origen proteico, que debido a su naturaleza pueden aprovecharse de los avances en **bioproducción**. Esta tecnología permite fabricar estos materiales mediante procesos biológicos combinando el uso de microorganismos, células o enzimas para generar estructuras y compuestos muy complejos con propiedades específicas.

Un ejemplo de estos biomateriales son los **polímeros tipo elastina (ELP, Elastin-Like Polymers)**. Los ELPs son materiales inspirados en la elastina natural, una proteína estructural del tejido conectivo que confiere elasticidad y resistencia a los tejidos como la piel, vasos sanguíneos o pulmones. Estos polímeros se han convertido en una herramienta importante en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.

La secuencia de aminoácidos más habitual en los ELPs es **(VPGXG)**, pentapéptido donde X puede ser cualquier aminoácido excepto la prolina, este se excluye porque neutraliza una de las propiedades más importantes de estos polímeros, que es su capacidad de transición de fase. Esto ocurre porque la prolina interfiere en el ordenamiento de las cadenas y desestabiliza la conformación de espiral- β . El aminoácido X juega un papel crucial, ya que define la hidrofobicidad del bloque y determina su **comportamiento frente** a cambios de **temperatura** [8].

Todos los ELPs que tienen esta fórmula general son funcionales y poseen una naturaleza inteligente. Es decir, son capaces de experimentar una **transición inversa con la temperatura (ITT, Inverse Temperature Transition)** sin perder masa ni energía. La temperatura de transición (T_t) dependerá tanto de la naturaleza del aminoácido X como del número de repeticiones (n) en la estructura. Además, entre sus propiedades sobresalen su biocompatibilidad y su capacidad de autoensamblaje [9 , 10].

Esta transición está influenciada por otros factores como la concentración, la presencia de cosolventes, el pH y, especialmente, la temperatura. Al **superar la temperatura de transición**, el polímero se vuelve insoluble y precipita, adoptando una conformación de espiral β en la que las cadenas laterales presentan una estructura ordenada, estabilizada por interacciones hidrofóbicas y enlaces intramoleculares (*Figura 1*). Por el contrario, al **disminuir la temperatura de transición**, el polímero se disuelve y adquiere una conformación desplegada, con las cadenas laterales desordenadas y completamente hidratadas, siendo el proceso completamente reversible [11].

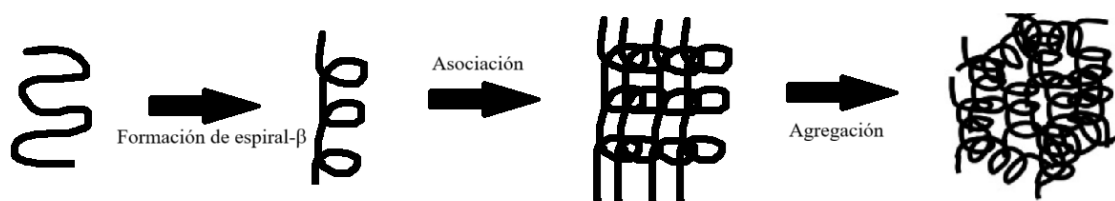


Figura 1. Agregación de los ELPs [11].

En este trabajo se emplea el ELP denominado **3K(EI)₂** que se encuentra representado en la *Figura 2*. Este ELP ha sido diseñado y producido por el grupo de *Biodispositivos Avanzados para Nanomedicina* de la *Universidad de Valladolid*, con un peso molecular de 93175 Da. Es un copolímero de bloque de naturaleza anfifílica formado por un doble dibloque o tetrabloque (**EI**)₂ con tres lisinas (**K**) en el extremo amino terminal. El **bloque hidrofílico E**, siendo E acrónimo del ácido glutámico, presente en la posición X del pentapéptido, glutamato a pH neutro, que le confiere carácter polar. Está constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a [(VPGVG)₂(VPGE_G)(VPGVG)₂]₁₀ y presenta una temperatura de transición superior a 70°C [[12](#)] en condiciones fisiológicas. El **bloque hidrofóbico I**, siendo I acrónimo de la isoleucina, presenta una secuencia (VPGIG)₆₀ y una temperatura de transición de 15°C [[13](#)].

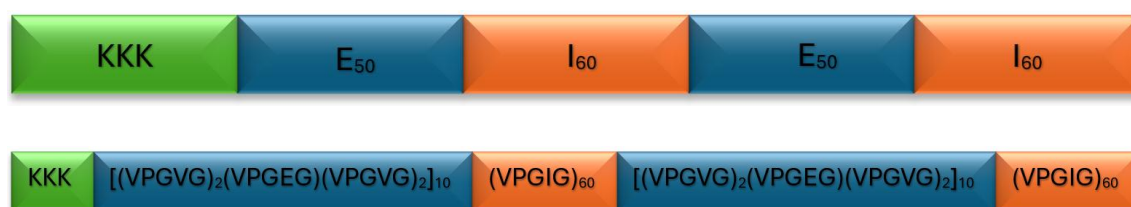


Figura 2. Representación del ELP 3K(EI)₂ con las lisinas ubicadas en el extremo del bloque E.

La diferencia entre las T_t de ambos bloques permite que, a temperatura fisiológica, uno de los bloques permanezca soluble en medio acuoso, mientras que el otro se encuentre insoluble. Como resultado, se forman micelas, en las cuales las regiones hidrófobas se orientan hacia el interior y las hidrofílicas quedan expuestas hacia el exterior, hidratándose [[14](#)] tal y como se representa en la *Figura 3*.

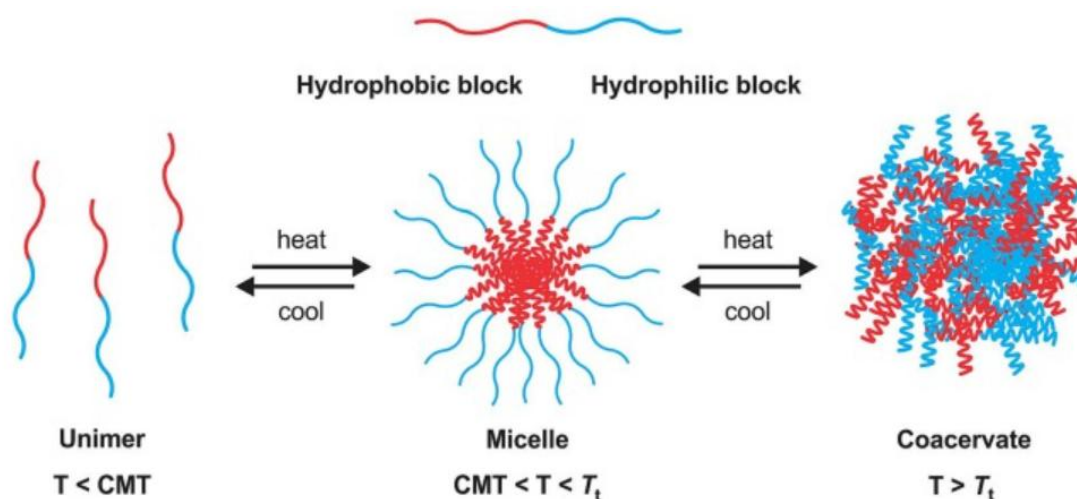


Figura 3. Formación de nanopartículas [15].

A temperaturas superiores a la temperatura crítica micelar (CMT) se forman micelas por asociación del bloque hidrofóbico. Al superar la temperatura de agregación las micelas se compactan formando agregados [15 , 16].

La mayoría de los medicamentos utilizados para tratar, prevenir enfermedades o aliviar dolores físicos son moléculas orgánicas pequeñas, como el paracetamol, el omeprazol etc. Una vez en el torrente sanguíneo, estas moléculas suelen ser filtradas rápidamente por el sistema excretor y eliminadas en cuestión de minutos. Este proceso natural de detoxificación disminuye la eficacia de los fármacos, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Además, los medicamentos hidrofóbicos requieren la adición de sustancias químicas que aumenten su solubilidad en el plasma sanguíneo, ya que solo así pueden ser absorbidos y metabolizados. Sin embargo, estos compuestos tienen un límite de exposición tolerable relativamente bajo, por lo que su uso debe ser cuidadosamente regulado. Para afrontar estos desafíos en la administración de medicamentos hidrofóbicos, se están investigando vehículos alternativos como los obtenidos con los ELPs [17]. La naturaleza química de la secuencia de aminoácidos define la afinidad de los ELPs por ciertos materiales y moléculas, permitiendo optimizar su uso en aplicaciones biomédicas. En el caso de los nano-vehículos, su diseño se basa en aprovechar las propiedades anfífilas de los ELPs, donde la parte hidrofóbica actúa como núcleo protector para encapsular medicamentos insolubles en agua, mientras que la parte hidrofílica facilita su estabilidad en el medio acuoso del plasma sanguíneo [18].

El ELP desarrollado en este trabajo se ha diseñado para incluir las lisinas, ubicadas estratégicamente en el extremo hidrófilico, que pueden modificarse químicamente para lograr la funcionalización de las nanopartículas. En este sentido, el objetivo futuro de este trabajo es, a través de las lisinas modificadas del polímero, anclar el **aptámero CD44**. Este aptámero, una corta cadena de nucleótidos, se une con gran afinidad a un receptor de membrana, CD44, ubicado en la superficie celular que se ha establecido como un marcador asociado a diferentes tipos de cáncer debido a su alta expresión en tumores tales como; colon, páncreas, mama, cabeza y cuello. Debido a esta sobreexpresión del CD44 se puede utilizar como diana específica y se puede incluir en el desarrollo de sistemas de liberación controlada para incrementar la eficacia del tratamiento y minimizar los efectos secundarios en tejidos sanos [19]. La **funcionalización** de nanopartículas con aptámeros dirigidos al CD44 se ha logrado en el grupo de investigación mediante **química click**, uniendo covalentemente aptámeros a otros polímeros [20].

La química click fue definida por Sharpless como reacciones químicas estereoespecíficas con total economía atómica realizadas bajo condiciones suaves y utilizando reactivos fácilmente disponibles [21]. Estas reacciones son rápidas, irreversibles y se llevan a cabo con altos rendimientos, generando productos de muy alta pureza y estables, que pueden aislarse fácilmente. Algunas de las reacciones que se incluyen son:

- 1) Cicloadición dipolar [2+3] azida-alquino catalizada por cobre (**CuAAC**). Es la reacción más representativa de la química click, aunque tiene como limitación el uso de cobre como catalizador debido a su toxicidad en sistemas biológicos (*Figura 4*).

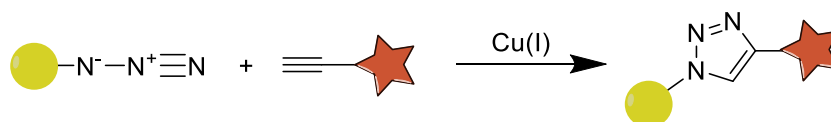


Figura 4. CuAAC [21].

- 2) Cicloadición azida-alquino promovida por tensión (**SPAAC**). Esta es una variante sin cobre, más adecuada si se va a llevar a cabo en un organismo vivo (*Figura 5*).

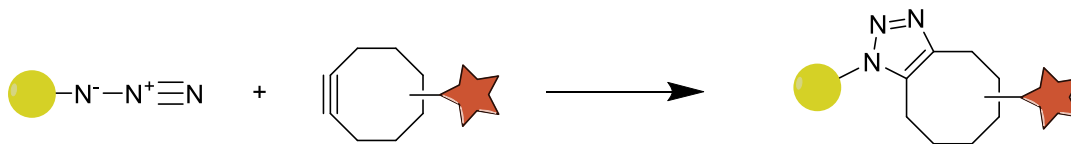
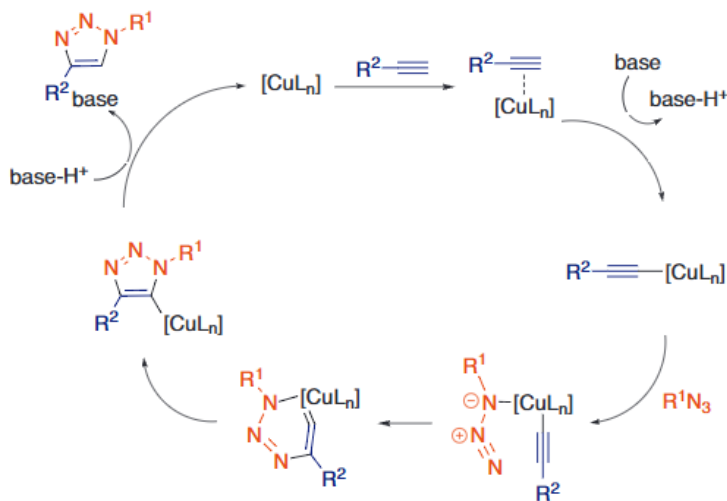


Figura 5. SPAAC [21].

La reacción **CuAAC** se caracteriza por su eficacia y selectividad, debido a la reactividad de los acetiluros de cobre (I) generadas *in situ*. La interacción de la azida con el centro de cobre del acetiluro incrementa la nucleofilia del triple enlace, desencadenando una serie de pasos que culminan en la formación de un nuevo enlace C-N entre el carbono β -nucleófilo del acetiluro y el nitrógeno electrófilo de la azida (*Esquema 1*).



Esquema 1. Mecanismo de cicloadición dipolar [2+3] azida-alquino catalizada por cobre [22].

La **SPAAC** es una reacción [3 + 2] cicloadición entre azidas y alquinos impulsada por la tensión del anillo, sin necesidad de catalizadores. Fue propuesta como alternativa a la cicloadición Huisgen catalizada por cobre (CuAAC), eliminando la toxicidad del cobre

en aplicaciones biológicas. La tensión del anillo en ciclooctinos reduce la energía de activación, permitiendo que la reacción ocurra a temperatura ambiente y en condiciones fisiológicas. Aunque SPAAC evita el uso de catalizadores tóxicos y es altamente específica, su dependencia de ciclooctinos es una limitación debido a su disponibilidad y alto coste [23 , 24].

Así, en este trabajo, se pretende preparar ambas posibilidades y para ello se prepararán ELP funcionalizados con dos alquinos diferentes en el extremo terminal del bloque hidrofílico. El primero de ellos usando un derivado del ciclooctino, denominado BCN-OH, (1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il-metanol y también, un alquino terminal de cadena lineal, utilizando el 4-pentil-1-ol (*Figura 6*).

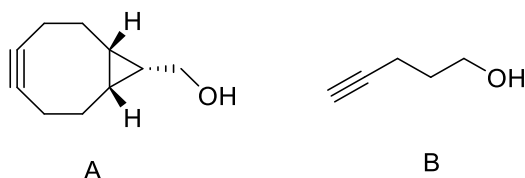


Figura 6. A) BCN-OH, B) 4-pentil-1-ol.

Una vez modificados los ELPs en su bloque hidrofílico con los grupos alquino terminales, se llevará a cabo la caracterización de los polímeros y también de sus nanopartículas. Una vez comprobada la formación de las nanopartículas y su estabilidad se podrá llevar a cabo la reacción click con el azida del aptámero en condiciones suaves con y sin cobre y el estudio de dosificación de fármacos (*Figura 7*).

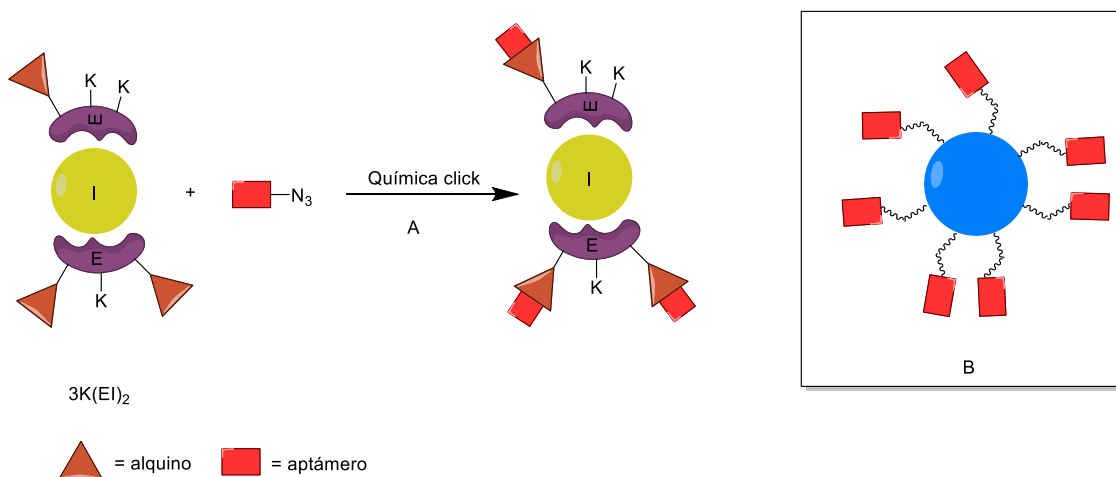


Figura 7. Esquema del diseño y funcionalización del polímero 3K(EI)₂ mediante reacción click a 25 °C. A) Reacción click entre el ELP modificado y el aptámero con azida. B) Nanopartícula funcionalizada con el aptámero.

3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo general del trabajo es la bioproducción de un ELP y su posterior funcionalización para estudiar las nanopartículas formadas en condiciones fisiológicas con el siguiente plan de trabajo:

- 1.- Bioproducción y purificación del polímero 3K(EI)₂ usando la cepa bacteriana *Escherichia coli* (*E.coli*) proporcionado por *Biodispositivos Avanzados para Nanomedicina de la Universidad de Valladolid*.
- 2.- Modificación de los grupos amino de las lisinas terminales 3K(EI)₂ dando lugar a dos terminaciones alquino distintas: una con cadena lineal y otra con un derivado de ciclooctino.
- 3.- Caracterización de los ELPs biosintetizados y modificados químicamente, así como de la formación de nanopartículas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Lista de reactivos

Tabla 1. Reactivos comerciales y proveedores.

REACTIVO COMERCIAL	CASA
Ácido clorhídrico	Thermo Fisher
Azul de bromofenol 2%	Alpha Aesar
Ácido etilendiamnotetraacético (EDTA)	Sigma Aldrich
Benzamidina	Acros Organics
BCN-OH	Cymit
4-pentin-1-ol	Sigma Aldrich
Cloruro de cobre II (CuCl ₂)	Thermo Fisher
Cloruro de sodio (NaCl)	Formedium
DNA Marker: NZYDNA Ladder III	NZYTech
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Formedium
Fluoruro de fenilsulfonilmetano (PMSF)	Sigma Aldrich
GELPed Nucleic Acid Stain	Biotium
Glicerol	Merck
Glicina	Sigma Aldrich
Glucosa	Sigma Aldrich
Kanamicina	Formedium
NZY-Blue Protein Marker	NZYTech
Persulfato amónico (PSA)	Merck
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	Thermo Fisher
Tris (Hidroximetil)aminometano (Tris base)	Sigma Aldrich
PBS	Gibco Invitrogen

4.1.2 Medios de cultivo bacteriano

Medio Luria Bertani (LB): tryptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, pH 7.0.

LB-Agar: LB, 1,5% (p/v) Agar, pH 7.0.

Medio Terrific Broth Modificado (mTB): tryptona 12 g/L, extracto de levadura 24 g/L, glicerol 4 mL/L, (NH₄)₂SO₄ 3,3 g/L, KH₂PO₄ 6,8 g/L, Na₂HPO₄ 7,1 g/L, glucosa 0,5 g/L, lactosa 2,0 g/L, MgSO₄ 0,15 g/L.

Medio SOC (Super Optimal broth + Represor Catabólico): tryptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa.

4.1.3 Buffers

Buffer de sonicación, pH 8: 10 mM Tris-base, 1 mM EDTA pH 8. Antes de su uso, se añade 1 mM PMSF.

TBS (buffer de lavado) pH 7,6: 20 mM Tris-base y 140 mM NaCl.

4.1.4 Soluciones de tinción

Cloruro de cobre II (CuCl₂): se prepara una disolución 0,2M de CuCl₂ en agua destilada

Tabla 2. Disolventes orgánicos y proveedores.

DISOLVENTES	CASA
Acetona	Scharlau
Dietiléter	Scharlau
Dimetilformamida	Sigma Aldrich
Dimetilsulfóxidodeuterado	Sigma Aldrich
Metanol	Scharlau
Etanol	Panreac

4.2 Métodos

4.2.1 Transformación bacteriana

Las placas Petri utilizadas para cultivos bacterianos en medio sólido contienen LB-agar. Se preparan diluyendo el medio LB-agar en agua ultrapura siguiendo las proporciones indicadas por el fabricante. La mezcla se somete a un ciclo de autoclave a 121°C durante 20 minutos para asegurar la esterilización completa. Posteriormente, se atempera, se completa con el antibiótico kanamicina y se distribuyen aproximadamente 30 mL de la mezcla en cada placa Petri. Al enfriarse, el medio se solidifica y las placas estarán listas para su uso.

Etapas de la transformación:

- Incubación en frío. Se descongelan en hielo muestras de 20 μ L de células competentes previamente almacenadas a -80°C y se mezclan con 20 ng de DNA plasmídico (correspondiente a 1 μ L de solución a 20ng/ μ L) purificado. La suspensión se incuba en hielo durante 30 minutos para facilitar la coprecipitación de las células y el ADN plasmídico.
- Choque térmico. Tras la incubación en frío, se aplica un choque térmico breve a 42°C durante 30 segundos. Inmediatamente después, se realiza una segunda incubación en hielo durante 2 minutos para atemperar las células transformadas.
- Adición del medio SOC. Se añade un volumen de 80 μ L de medio SOC y se incuban las células a 37°C bajo agitación constante 250 rpm durante una hora.
- Siembra en placas. Se siembra la mezcla transformada sobre placas de agar LB con glucosa y kanamicina.

Las placas son cubiertas con papel aluminio y colocadas boca abajo en una incubadora a 37°C durante un período de 16-24 horas. Durante este tiempo, las células transformadas forman colonias.

A partir de las placas sembradas previamente, se seleccionan 8 colonias aisladas con una morfología adecuada. Con una lanza estéril, se toma material de cada una de las colonias seleccionadas y se inoculan con 5 mL de medio TB (Terrific Broth) junto con 5 μ L de kanamicina. Los cultivos se incuban a 37°C durante 16-18 horas con agitación constante a 250 rpm.

4.2.2 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) es una técnica usada para el análisis e identificación de proteínas. La separación de las proteínas se basa en su tamaño molecular, lograda al someter las muestras a un campo eléctrico que las hace migrar a través de una matriz porosa de poliacrilamida. La matriz se forma mediante una polimerización en cadena iniciada por persulfato de amonio (PSA) y tetrametiletilendiamina (TEMED), que actúa como catalizador.

Los geles utilizados constan de dos zonas con composiciones y funciones específicas (*Figura 8*):

1. **Gel acumulador o concentrador (stacking gel):** Ubicado en la parte superior, su función es concentrar las muestras en una banda estrecha antes de la separación. Está compuesto por agua ultrapura, tampón Tris 0.5 M (pH 6.8), SDS al 10% (m/v), PSA, TEMED y acrilamida.
2. **Gel separador (resolving gel):** Constituye la mayor parte del gel y es donde se separan las proteínas según su peso molecular. Contiene un tampón Tris (1.5 M, pH 8.8) SDS al 10% (m/v), PSA, TEMED y acrilamida.

El porcentaje de acrilamida se ajusta según el rango de separación necesario para las muestras.

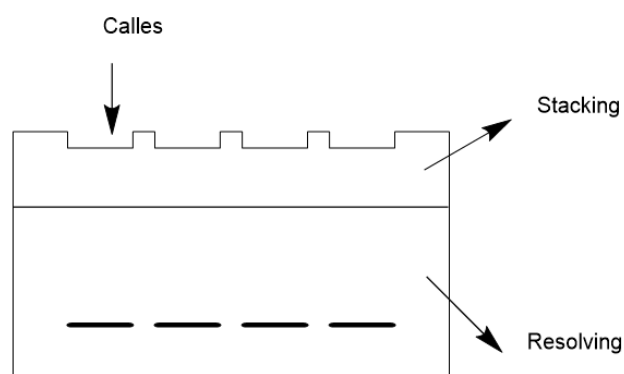


Figura 8. Representación de un gel de proteínas.

Las muestras que se cargan en los pocillos del gel se preparan mezclándolas con tampón de carga de proteínas en una proporción 80/20 (muestra/tampón). El tampón de carga contiene también SDS y beta mercaptoetanol para poder desnaturalizar completamente las proteínas y dotarle de carga negativa equiespaciadas debido a la interacción de 1 molécula SDS/aminoácido. Luego, se hierven durante 5 minutos para favorecer la reducción de los puentes disulfuro y se centrifugan a 13400 xg durante 5 minutos. Para comparar los pesos de las bandas de proteínas, se incluye un marcador de peso molecular en el gel. Se usa como marcador **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.

Las condiciones del campo eléctrico que se usan son 200V, 150mA y voltaje constante durante 45 minutos. Tras finalizar la electroforesis, el gel se transfiere a una solución de tinción con cloruro de cobre 0.3 M y luego en agua destilada durante 5 minutos. Finalmente, se captura una imagen del gel en el equipo UV Gel DocTM (BioRad).

4.2.3 Selección de las colonias para la bioproducción

Se debe seleccionar una colonia bacteriana altamente productora antes de comenzar con la producción del polímero a mayor escala. Para ello, se seleccionan ocho colonias siguiendo con el proceso que hemos mencionado previamente.

De cada colonia se toma una alícuota, que se somete a lavados con agua ultrapura y se prepara para su análisis mediante SDS-PAGE. Tras la separación de las bandas de las proteínas se identifican la colonia que produce el polímero en mayor cantidad. La colonia seleccionada se siembra por agotamiento (*Figura 9*) en una nueva placa Petri, la cual se incuba a 37 °C durante la noche.

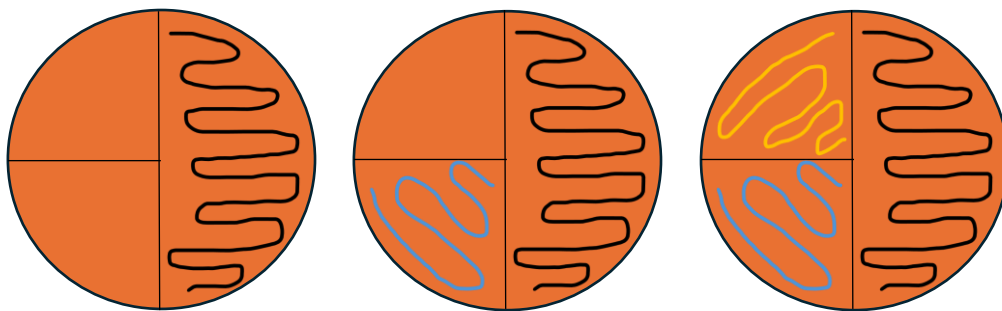


Figura 9. Siembra por agotamiento.

A continuación, se realiza un segundo screening con ocho colonias hijas derivadas de la más productora, seleccionándose finalmente la colonia óptima para proceder a la producción del ELP, siendo aquella que tenga la banda más intensa y con la morfología más adecuada.

4.2.4 Producción de ELPs

El protocolo a seguir para la bioproducción de ELPs consta de 3 días:

Día 1, preparación del preinóculo: En un tubo Falcon de capacidad 50mL se añaden 5mL de medio LB, kanamicina y 250 μ L de glucosa al 20% (m/v). Con una lanza se pica la colonia que se haya elegido como la más productora, se introduce en la disolución y se deja 18 horas en un incubador a 37°C y en agitación constante con una velocidad de 250 rpm. Se realiza un control negativo en un tubo Falcon de 50 mL con los mismos componentes, salvo la colonia, para comprobar la esterilidad del proceso.

Día 2, preparación de inóculo e inoculación: Primero se comprueba el control negativo para verificar la esterilidad del proceso y confirmar que el medio no estuviese contaminado.

Se prepara el inóculo en 3 Erlenmeyers de 250 mL cada uno. Se añaden 50 mL de medio LB, 50 μ L de kanamicina, 1.5 mL de glucosa al 20 % (m/v) y 100 μ L de preinóculo. Se incuba 6 horas a 37°C con agitación y con una velocidad de 250 rpm.

Pasado el tiempo se comienza con la producción del polímero que se realiza sobre 16 erlenmeyers de 2 L cada uno. Sobre cada uno de ellos se añaden 250 mL de medio TB y 150 mL de LB AIM como medio de cultivo, 400 μ L de kanamicina y 5 mL del inóculo. Todos los erlenmeyers se dejan incubando 18 horas a 37°C con agitación y una velocidad de 250 rpm. También se realizan 2 controles, positivo y negativo, para seguir comprobando la esterilidad del medio.

Día 3, detención de la producción y lavado de células: Antes de detener la producción, se necesita medir la absorbancia a 600 nm del cultivo. Para ello, se toma una alícuota de 1 mL de uno de los erlenmeyers y se realiza una dilución 1:10 con agua ultrapura. Como blanco de medición, la alícuota se centrifuga durante 45 segundos a 13400 xg y del sobrenadante se prepara una dilución 1:10.

Pasados 30 minutos, se toma una segunda muestra del erlenmeyer y se repite la medición de absorbancia. Si el valor permanece constante o disminuye, se concluye que el cultivo ha alcanzado la fase estacionaria y se puede detener la producción (*Figura 10*).

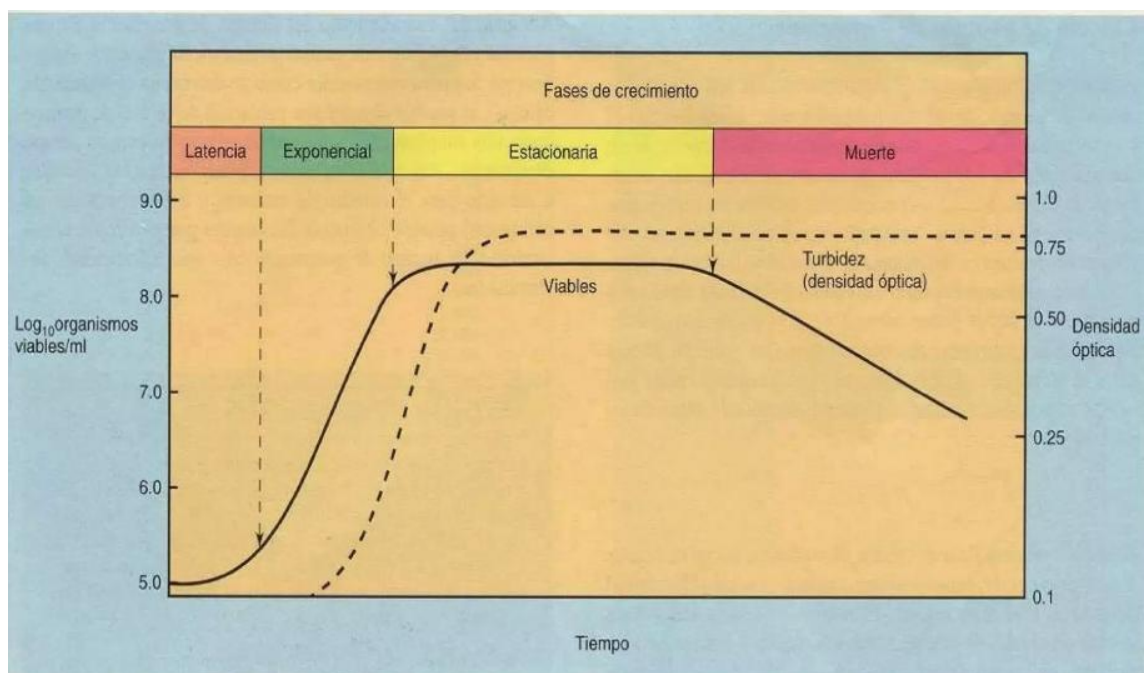


Figura 10. Crecimiento bacteriano.

La **fase de latencia** es el período inicial donde no hay aumento significativo. Durante esta, las bacterias se adaptan al medio de cultivo sintetizando enzimas y moléculas

necesarias para el crecimiento. Se continua con la fase de **crecimiento rápido** o **logarítmica** donde la población bacteriana se duplica, siguiendo una cinética exponencial. En la **fase estacionaria** el crecimiento cesa y se mantiene constante, esta es la fase donde se alcanza la máxima producción del producto. Al alcanzar la **fase de muerte** la población bacteriana comienza a disminuir progresivamente. Esta fase se caracteriza por una reducción exponencial en el número de células.

4.2.5 Lavado de células

Para eliminar los subproductos del cultivo, se procede al lavado de las células, manteniendo la temperatura a 4 °C para prevenir degradaciones. Este proceso incluye pasos de centrifugación, realizados siempre a 4 °C, 1700 xg, durante 15 minutos cada uno.

1. El cultivo se distribuye en botes de centrifuga de 1 L y se centrifuga. Posteriormente, nos queda un sólido al cual denominamos precipitado (pellet) donde se encuentran las bacterias y una disolución que llamaremos sobrenadante.
2. Si queda contenido por procesar, se redistribuye en los mismos botes. Tras la centrifugación, el pellet se resuspende añadiendo tampón de lavado.
3. La mezcla se transfiere a botes de centrifugación más pequeños de 0.5 L para facilitar el manejo, se centrifuga nuevamente y se descarta el sobrenadante. Este paso se repite hasta que el sobrenadante sea incoloro.

El precipitado resultante contiene las bacterias que han producido el polímero de interés.

4.2.6 Ruptura de células

El último paso en la producción del polímero consiste en romper las células mediante sonicación (exposición a ultrasonidos) para liberar el polímero. El precipitado obtenido tras los lavados se resuspende en un volumen de tampón de sonicado, calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$V_{\text{Tampón de sonicación}} = 5 \times V_{\text{cultivo en mL}} \times ABS_{\text{última medida}}$$

Para evitar la degradación del polímero causada por proteasas liberadas durante la ruptura celular, se añaden los siguientes inhibidores de proteasa al tampón de sonicación:

- 1) PMSF: 2 mL por cada litro de tampón de sonicación.
- 2) Benzamidina: 1 mM.
- 3) EDTA: una tableta inhibidora de proteasas por cada 50 mL de tampón de sonicación.

La resuspensión celular se somete a ciclos de sonicación con las siguientes condiciones:

- 1) Duración de cada ciclo: 20 segundos.
- 2) Pausas: Para evitar el sobrecalentamiento, manteniendo una temperatura de 4 °C.
- 3) Amplitud: 100 %.
- 4) Presión: 1500-1800 bar.
- 5) Duración total: 30 minutos.

El equipo utilizado es el sonicador Hielscher UP400St, perteneciente al grupo de investigación *ProcerealTech*.

Tras la sonicación, la mezcla se centrifuga durante 90 minutos a 4 °C y 15000 xg.

4.2.7 Toma de alícuotas y preparación de muestras para seguimiento

Durante el protocolo de producción, se toman alícuotas en las etapas de preinóculo, inóculo y cultivo antes de detener la producción, así como de los sobrenadantes y el precipitado obtenidos tras la sonicación para realizar un screening y verificar que la producción se está llevando a cabo correctamente.

Se preparan las muestras para la electroforesis de la siguiente manera:

- 1) Centrifugación inicial: Se centrifuga la alícuota a 13400 xg durante 45 segundos y se descarta el sobrenadante.

- 2) Lavado del precipitado: Se resuspende el precipitado en 1mL de agua ultrapura. Se centrifuga nuevamente a 13400 xg durante 45 segundos y se descarta el sobrenadante.
- 3) Resuspensión final: Se resuspende el precipitado en un volumen de agua determinado por la absorbancia final de la muestra. (Tabla 3)

Tabla 3. Volúmenes de resuspensión del precipitado para cargar en SDS-PAGE

Abs (600nm)	Agua ultrapura	Volumen que 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	$V=50/Abs$

- 4) Preparación para el gel: Mezclar la muestra con tampón de carga de proteínas en una proporción 80/20 (muestra/tampón). Cargar en la calle del gel un volumen que también dependerá de la absorbancia final de la muestra.

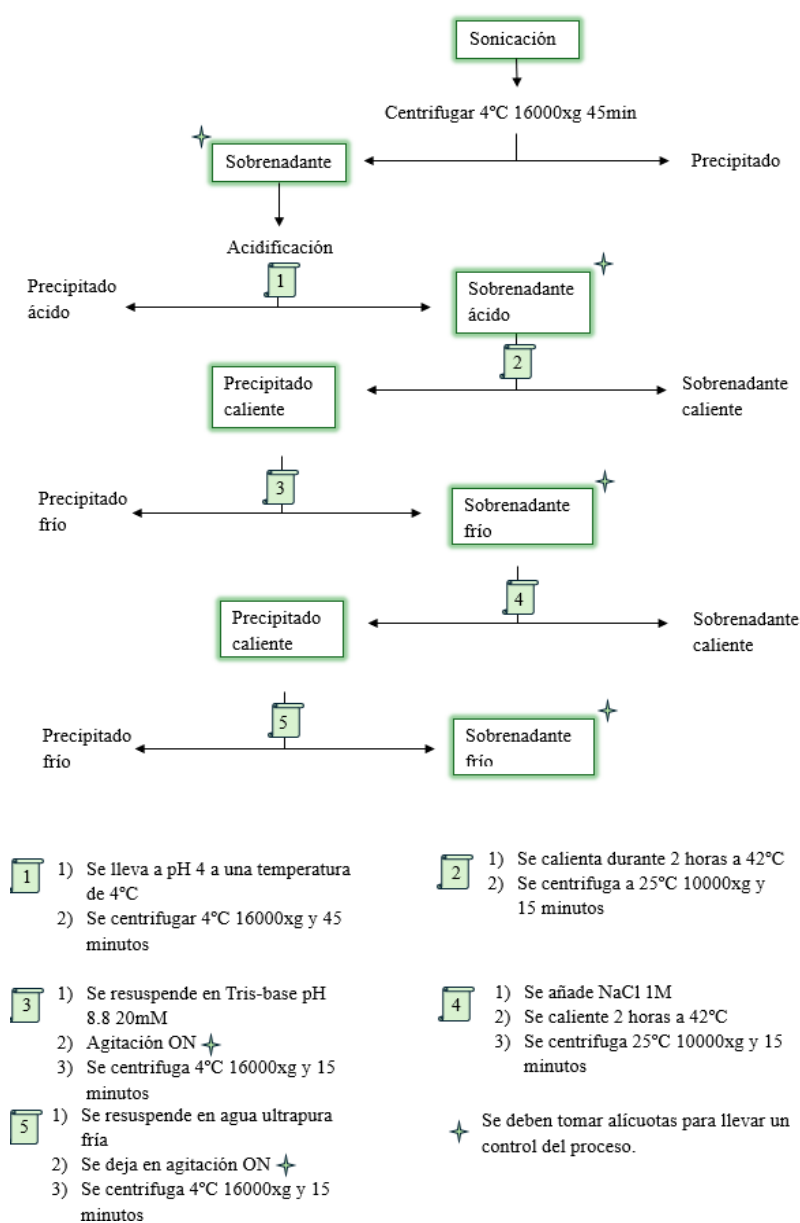
4.2.8 Purificación del ELP

La purificación del polímero se realiza mediante ciclos repetidos de precipitación y resuspensión, aprovechando las propiedades del polímero frente a cambios de temperatura. Todas las centrifugaciones durante este proceso se llevan a cabo a 16000 xg durante 45 minutos.

Antes de comenzar con esta etapa se deben tomar muestras del sobrenadante y el precipitado obtenidos tras la sonicación para determinar la presencia del polímero en el sobrenadante de sonicación.

Una vez comprobado, se lleva a cabo la etapa de acidificación. Se añade, gota a gota, HCl 2 M hasta llevarlo a pH 4 y se mantiene a una temperatura de 4°C. Con ello favorecemos la precipitación de otros restos bacterianos indeseados.

El polímero presente en el sobrenadante se somete a una precipitación a 60 °C durante 2 horas. Después, se centrifuga a 25 °C localizando el polímero sobre el precipitado. Se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en Tris-base 20 mM (pH 8.8) a 4°C en agitación durante 12 horas. El proceso de precipitación caliente se repite añadiendo NaCl 1M, lo que facilita la precipitación del polímero al superar su temperatura de transición (T_t). Esta temperatura marca el punto en el que el polímero se vuelve insoluble debido a interacciones hidrofóbicas provocadas por el aumento de la temperatura y la presencia de sales. Tras cada precipitación, el precipitado se resuspende en agua desionizada fría, repitiendo el proceso hasta eliminar las proteínas endógenas y demás contaminantes, como se refleja en el *Esquema 2*.



Esquema 2. Esquema general del procedimiento de purificación de ELPs.

Una vez confirmada su pureza por SDS-PAGE, el polímero en solución se somete a diálisis mediante 3 cambios de agua destilada y 1 cambio de agua ultrapura frente a un volumen de 25 L.

Finalmente, la solución se liofiliza utilizando el equipo LyoQuest-55 Plus del Laboratorio de *Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid*.

Este proceso permite obtener el polímero **seco**, listo para su posterior caracterización.

4.2.9 Caracterización del ELP biosintetizado

4.2.9.1 MALDI-TOF

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite tanto la identificación como la cuantificación de compuestos mediante el análisis de su masa molecular. Esta metodología se basa en la generación, separación y detección de iones en fase gaseosa, proporcionando información sobre la relación masa/carga (m/z) y la abundancia iónica relativa de los analitos presentes en la muestra. El proceso se divide en cuatro etapas:

1. **Ionización:** Los compuestos de interés deben ser ionizados para ser detectados, ya que las especies neutras no interactúan con el sistema. En el caso de la Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (MALDI), esta ionización se lleva a cabo mediante un láser pulsado de baja energía.
2. **Aceleración:** Una vez ionizados, los analitos son extraídos de la fuente de iones y acelerados utilizando diferencias de potencial eléctrico.
3. **Análisis:** Los iones acelerados son dirigidos hacia un analizador, donde se separan según su relación m/z . En el caso del analizador de Tiempo de Vuelo (TOF), esta separación se logra midiendo el tiempo que tardan los iones en alcanzar el detector, lo cual depende directamente de su masa y carga.
4. **Detección:** Los iones separados generan una corriente iónica que es convertida en señales eléctricas, representadas en forma de picos en el espectro de masas.

La técnica MALDI-TOF es especialmente adecuada para el análisis de compuestos de naturaleza biológica y elevado peso molecular. La matriz utilizada en MALDI actúa como un agente protector que evita la degradación del analito durante la ionización, además de

facilitar su desorción eficiente bajo la acción del láser. Esto resulta útil para el estudio de polímeros, dado que el rango de masa del analizador TOF abarca valores desde 200 hasta 300 kDa.

Para este trabajo, la muestra fue preparada en una concentración de 5 mg/mL en agua desionizada.

El análisis se llevó a cabo utilizando el espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker Autoflex Speed, ubicado en el *Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid*.

4.2.9.2 SDS-PAGE

Los pasos para formar un gel y la realización de un gel vienen descritos en el apartado Electroforesis de proteína (SDS-PAGE).

Se prepara una disolución inicial de la muestra en agua ultrapura a una concentración de 2 mg/mL, la cual se resuspende a 4 °C durante 16 h para asegurar una homogeneización completa. A partir de esta disolución madre, se elaboran diluciones en serie para obtener muestras a diferentes concentraciones. Este procedimiento permite evaluar tanto el peso molecular aparente del polímero como su movilidad electroforética, además de permitir la detección cualitativa de posibles impurezas y su respectiva magnitud.

4.2.9.3 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 presencia de un campo magnético, los núcleos con momento magnético, como los protones (^1H), experimentan una separación de sus estados nucleares inicialmente degenerados, originando dos niveles de energía discretos. Al absorber energía de radiofrecuencia a una frecuencia específica, estos núcleos transitan entre dichos niveles, fenómeno conocido como resonancia magnética nuclear.

En RMN, la frecuencia de resonancia de cada núcleo depende de su entorno químico, lo que permite identificar y caracterizar los distintos protones.

4.2.9.4 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica (DLS, Dynamic Light Scattering) es una técnica no invasiva que permite determinar el tamaño y la distribución de partículas o moléculas. Se basa en el movimiento browniano de las partículas en suspensión, el cual provoca fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada por un láser. Estas fluctuaciones están directamente relacionadas con el tamaño de las partículas a través de la ecuación de Stokes-Einstein:

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

Donde:

- d_H es el diámetro hidrodinámico de la partícula
- k es la constante de Boltzmann
- T es la temperatura
- η es la viscosidad del medio dispersante
- D es el coeficiente de difusión de la partícula.

En un experimento de DLS, se realizan mediciones sucesivas de la dispersión de luz generada por las partículas, y estas mediciones se correlacionan para construir una curva de correlación. A mayor tamaño de partícula, menor será su velocidad de movimiento browniano, lo que resulta en fluctuaciones más lentas en la intensidad de la luz dispersada. A partir del ajuste de la curva de correlación, se calcula el coeficiente de difusión (D), que, mediante la ecuación de Stokes-Einstein, permite determinar el diámetro hidrodinámico (d_H) de las partículas.

El intercepto de la curva de correlación sobre el eje se utiliza para evaluar la relación señal-ruido de la muestra, lo que permite verificar la calidad de los datos obtenidos. Los resultados de una medición DLS se presentan típicamente como una distribución por intensidad. En materiales biológicos o polímeros, la intensidad de la dispersión es

proporcional al cuadrado del peso molecular de las partículas, lo que indica el tamaño relativo de las especies detectadas, no su concentración. Para estimar la concentración, puede realizarse una transformación a una distribución por volumen.

Además, la DLS proporciona el índice de polidispersidad (PDI), que refleja la variabilidad en los tamaños de las partículas presente en la muestra. Un valor bajo de PDI indica una distribución homogénea, mientras que un valor alto sugiere heterogeneidad en el tamaño de las partículas.

Por otro lado, la medida del potencial zeta se realiza mediante un ensayo de movilidad electroforética, donde se analiza el desplazamiento de las partículas en un campo eléctrico aplicado. El potencial zeta es un indicador clave de la estabilidad, ya que está relacionado con la carga superficial de las partículas. Un valor elevado del potencial zeta (positivo o negativo) indica una mayor estabilidad debido a la repulsión electrostática entre partículas.

Para este estudio, se utilizó el equipo *Zetasizer Advance Pro Red Label* del *Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI)* de la *Universidad de Valladolid*. Las medidas de diámetro hidrodinámico se llevaron a cabo utilizando cubetas DTS1070, mientras que las mediciones de potencial zeta se realizaron en cubetas ZEN0040 (*Figura 11*).

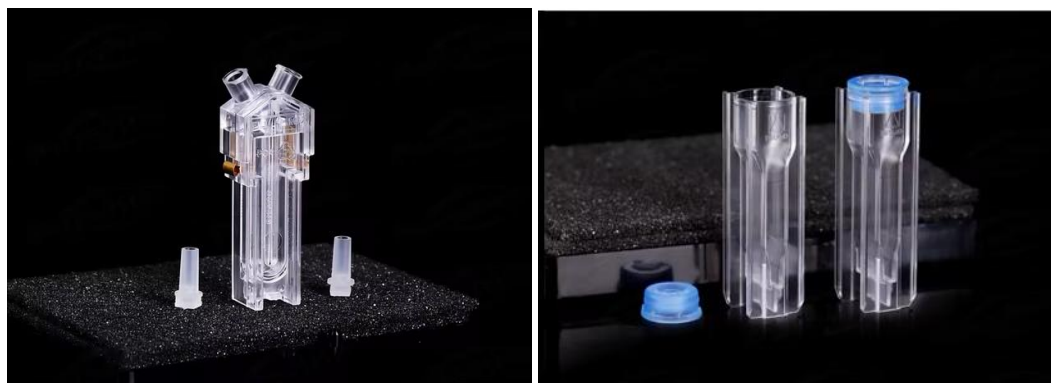


Figura 11. A la izquierda cubeta DTS1070 utilizada para medir el potencial z. A la derecha cubeta ZEN0040 utilizada para medir el diámetro de las partículas.

4.2.9.5 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR)

El **infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)** es una técnica analítica que permite estudiar las interacciones entre la radiación electromagnética en el rango infrarrojo y las moléculas, proporcionando información sobre la estructura química y funcional de los compuestos. Esta técnica se basa en la absorción selectiva de luz infrarroja por parte de las moléculas, lo que induce vibraciones en los enlaces químicos característicos.

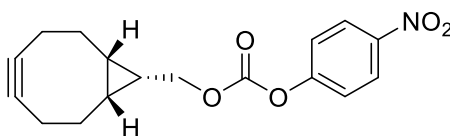
La región más utilizada en espectroscopía IR abarca longitudes de onda entre 4000 y 400 cm^{-1} . En esta zona, las bandas de absorción correspondientes a diferentes tipos de enlaces (por ejemplo, C-H, O-H, C=O, N-H) permiten deducir la presencia de grupos funcionales específicos en la molécula. Además, la región inferior a 1500 cm^{-1} proporciona información sobre la estructura global de la molécula.

4.2.10 Modificación química del ELP (3K(EI)₂)

La modificación de los extremos terminales de los grupos amino de las lisinas del ELP se llevará a cabo para incluir un grupo alquino en la estructura:

4.2.10.1 Funcionalización del polímero con un derivado de ciclooctino [ELP-I]

- 1) Síntesis del carbonato derivado del BCN-OH (1) [24].



1

Fórmula: C₁₇H₁₇NO₅

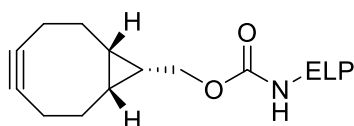
Mm: 315.11 g/mol

Se disolvió BCN-OH (50 mg, 0.333 mmol, 1 equiv.) en DCM anhidro (2 mL) y se le añadió piridina (0.27 mL, 3.33 mmol, 10 equiv.) y 4-nitrofenilcloroformiato (170 mg, 0.8 mmol, 2.4 equiv.). Después de agitar durante 3 horas a temperatura ambiente, se adicionó una disolución saturada de NH₄Cl (5 mL) y se extrajo con DCM (3 x 5 mL). La fase

orgánica se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM/Hexano 1:1) para obtener el compuesto **1** (78 mg, 0.25 mmoles, 74%) como un aceite amarillo.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.29 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 4.42 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 2.37 – 2.22 (m, 7H), 1.62 (m, $J = 12.9, 4.0, 1.6$ Hz, 2H), 1.56 – 1.49 (m, 1H), 1.12 – 1.04 (m, 2H).

2) Obtención del polímero modificado con el extremo terminal ciclooctino (**ELP-I**)



ELP-I

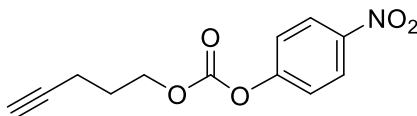
Se disolvieron 50 mg de ELP (1 equiv., $1.6 \cdot 10^{-3}$ mmoles NH_2) en 1 mL de DMF anhidra bajo atmósfera inerte. En un matraz independiente se preparó una concentración 0.01 M de **1** en DMF, y se alicuotó el compuesto **1** (0.33 mg, $1.07 \cdot 10^{-3}$ mmoles, 0.67 equiv.) en 0.1 mL de DMF junto con TEA (0.7 mL, $4.8 \cdot 10^{-3}$ mmol, 3 equiv.). Ambas soluciones se mezclaron y se agitaron a temperatura ambiente durante 48 horas. Se adicionó éter dietílico (10 mL) para precipitar el polímero. Se llevó a cabo un proceso de centrifugación, resuspensión del precipitado y lavado con éter dietílico (3 x 10 mL) y uno con acetona. Finalmente, tras completar todos los lavados, el precipitado se disolvió en agua ultrapura a 4 °C y se sometió a diálisis con agua ultrapura (3 x 5 L). Se liofilizó y se obtuvo una masa de **ELP-I** de 22.3 mg (64 %).

^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ : 8.3-7.4 (m, 1238 H), 4.5-1.0 (m, 4113 H), 1.0-0.6 (m, 2526 H) ppm

IR (ATR): 3290, 2963, 2876, 1624, 1520, 1444, 1231, 1027 cm^{-1} .

4.2.10.2 Funcionalización del polímero con un alquino lineal [ELP-II]

1) Síntesis del carbonato derivado del 4-pentin-1-ol (**2**) [25]

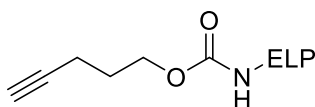


2
Fórmula: C₁₂H₁₁NO₅
Mm: 249.06 g/mol

Se disolvió 4-pentin-1-ol (50 mg, 0.59 mmol, 1equiv.) en DCM anhidro (5 mL) y se añadió TEA (0.8 mL, 5.9 mmol, 10 equiv.). Posteriormente se añadió gota a gota el 4-nitrofenilcloroformiato (305 mg, 1.42 mmol, 2.4 equiv.) disuelto en DCM (10 mL). Una vez completada la adición se dejó reaccionar durante 2 horas. Se adicionó agua a la disolución y se extrajo con DCM (3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo obtenido fue purificado mediante cromatografía en columna con sílica gel (DCM/Hexano 1:10). Se obtuvo el compuesto **2**, como aceite amarillo (88 mg, 0.35 mmol, 60 % de rendimiento).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 8.32 (d, 2H), 7.58 (d, 2H), 4.33 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H), 2.87 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 2.34 – 2.29 (m, 2H), 1.92 – 1.86 (m, 2H).

2) Obtención del polímero modificado con el extremo terminal alquino de cadena lineal (**ELP-II**) (**2**).



ELP-II

Se disolvió 50 mg de **ELP** (1 equiv., $1.6 \cdot 10^{-3}$ mmoles NH₂) en 1 mL de DMF anhidra bajo atmósfera inerte. En un matraz independiente, se preparó una concentración 0.02 M de **2** en DMF, y se adicionó una alícuota del compuesto **2** (0.27 mg, $1.07 \cdot 10^{-3}$ mmoles, 0.67 equiv.) en DMF (0.05 mL) junto con TEA (0.7 mL, $4.8 \cdot 10^{-3}$ mmol, 3 equiv.). Ambas

soluciones se mezclaron y se agitaron a temperatura ambiente durante 48 horas. Se adicionó éter dietílico (10 mL) para precipitar el polímero. Se llevó a cabo un proceso de centrifugación, resuspensión del precipitado y lavado con éter dietílico (3 x 10 mL) y uno con acetona. Finalmente, tras completar todos los lavados, el precipitado se disolvió en agua ultrapura a 4 °C y se sometió a diálisis con agua ultrapura (3 x 5 L). El polímero en disolución se recuperó y se liofilizó para obtener el producto final. La masa del **ELP-II** fue de 26 mg con un rendimiento del 74 %.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Bioproducción del 3K(EI)₂

Se procedió a la bioproducción del polímero 3K(EI)₂, cuyo peso molecular teórico era de 93175 Da. Posteriormente, el polímero fue sometido a un proceso de purificación y caracterización mediante diversas técnicas.

Para la expresión de la proteína, se empleó la cepa *Escherichia coli* BLR (DE3) Competent Cells (Novagen). Esta cepa requiere condiciones específicas de cultivo y medios definidos para garantizar su correcto funcionamiento.

Inicialmente, se realizó una transformación bacteriana, que se define como el proceso mediante el cual una bacteria internaliza ADN exógeno del medio externo y lo integra en su material genético [26]. El cultivo se sembró en placas Petri con medio selectivo para la bacteria transformada debido a la presencia del antibiótico. Tras la transformación, se llevó a cabo la siembra de colonias en el medio líquido para la producción del polímero recombinante. Se seleccionaron para la siembra colonias aisladas y con morfología adecuada, es decir, con una forma redonda, bordes bien definidos y tamaño moderado.

Para evaluar la expresión del polímero, se realizó un análisis por electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10 % (p/v) que separa las proteínas totales bacterianas respecto a su peso molecular. Cada calle representa la muestra correspondiente a las colonias seleccionadas previamente en placas de Petri durante el cultivo. El análisis permite identificar las colonias con mayor nivel de producción, seleccionándose la colonia 7 para un segundo screening (*Figura 12*).

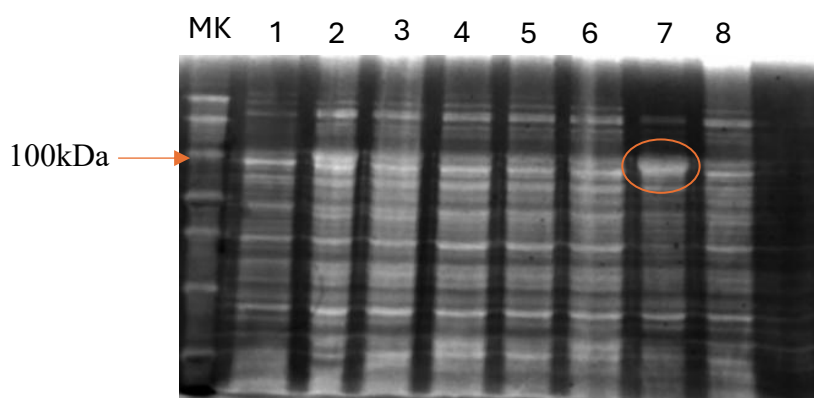


Figura 12. SDS-PAGE para análisis de la colonia más productora del polímero 3K(EI)₂ tras el primer screening.

Tras el primer screening, se procedió a identificar la colonia con mayor capacidad productora, caracterizada por presentar una banda de intensidad notable y una morfología adecuada, esto es, forma redondeada con bordes definidos y no excesivamente grandes.

Tras elegir la colonia 7 como la más productora, esta, se cultivó en una nueva placa Petri con el objetivo de obtener una población más productora. A partir de la colonia seleccionada durante el segundo análisis, se inicia el proceso de bioproducción. La producción se lleva a cabo con 6,4 L en total de en un medio TB junto con medio LB AIM, ya que esta combinación favorece significativamente la expresión génica. Durante el proceso, se toman muestras a intervalos regulares desde las primeras horas para medir la absorbancia, lo que permite monitorear el crecimiento bacteriano (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de absorbancia durante la producción.

ABSORBANCIA	1	2	3
LABORATORIO	0.112	0.159	0.149

Las mediciones de absorbancia indican si el crecimiento ha alcanzado su fase final, la fase estacionaria cuando se produce la expresión del ELP, permitiendo decidir si detener la producción y proceder con la purificación, o si se requiere prolongar la incubación. Además, estos valores dan una estimación de la cantidad de células presentes, siendo mayores valores indicativos de un mayor crecimiento celular.

5.2 Purificación del ELP

Tras detener la producción, se procede a la recolección, lavado y ruptura celular. Este proceso tiene como objetivo eliminar el medio de cultivo y los componentes intracelulares insolubles liberados tras la ruptura celular. Se recolectan muestras tanto del sobrenadante obtenido después de la sonicación como del sedimento celular para su posterior análisis mediante electroforesis.

Es fundamental realizar todas estas etapas a una temperatura constante de 4°C para prevenir dos eventos desfavorables, la proteólisis enzimática a cargo de las proteasas bacterianas y por ende la degradación del ELP, así como la precipitación de ELP, ya que este permanece soluble a bajas temperaturas, lo que asegura que se mantenga en el sobrenadante.

Una vez completadas las etapas de lavado y ruptura, se inicia la purificación del polímero. Este proceso se basa en ciclos de transición inversa (ITC), aprovechando la naturaleza termosensible de estos materiales. La purificación se lleva a cabo mediante distintos procesos descrito en el párrafo 4.2.8.

1) Primera etapa de purificación: precipitación por cambio de pH.

Se realiza un ajuste de pH a 4°C, seguido de una centrifugación que permite separar el sobrenadante (fase líquida) del precipitado (fase sólida). En estas condiciones el ELP de interés debería mantenerse soluble mientras que la mayoría de los contaminantes, las proteínas bacterianas, se desnaturalizan y precipitan. En este paso, se busca eliminar proteínas endógenas de la bacteria con carácter ácido. En este estado, estas proteínas pierden su carga neta, lo que las hace más insolubles. El proceso de acidificación se realiza a 4°C para mantener la solubilidad del polímero y prevenir su degradación proteolítica.

Tras la separación de las fases, la fase líquida se somete a un calentamiento a 42°C determinando la agregación y precipitación del ELP, seguido de una nueva centrifugación. Posteriormente, a la fase sólida se le añade Tris a pH 8.8, y se mantiene en agitación constante durante 16 horas a 4°C, a esta temperatura el ELP se vuelve nuevamente soluble. Finalmente, se realiza una centrifugación para separar las fases y se toman muestras de ambas para controlar el proceso de purificación.

2) Segunda etapa de purificación: precipitación con NaCl.

Se realiza un segundo ciclo de precipitación con la temperatura del polímero. Para ello, se añadió cloruro sódico (NaCl) como agente salino hasta alcanzar una concentración final de 1M a la solución resultante de la solubilización en Tris-base (pH 8). Posteriormente, la mezcla se sometió a calentamiento a 42°C durante 2 horas obteniendo un precipitado que se disuelve como se ha descrito anteriormente. El proceso de purificación se analiza mediante electroforesis de proteínas. Se debe de repetir este proceso hasta que el polímero esté puro como se puede observar en la electroforesis de la *Figura 13*.

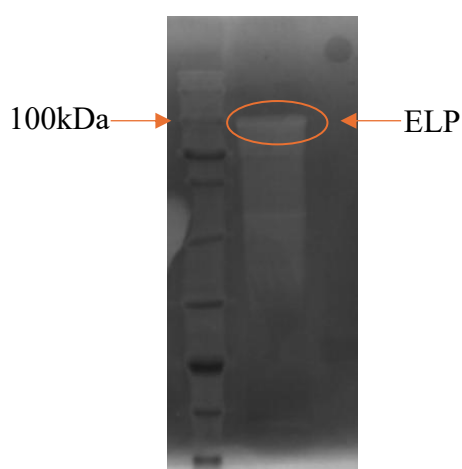


Figura 13. SDS-PAGE tras la última etapa de purificación del ELP.

El polímero se sometió a un proceso de diálisis a 4°C después de la purificación para eliminar las sales acumuladas durante las etapas de purificación. Posteriormente, el polímero fue liofilizado, obteniendo el material seco, lo que permitió determinar el rendimiento del producto final (*Tabla 5*).

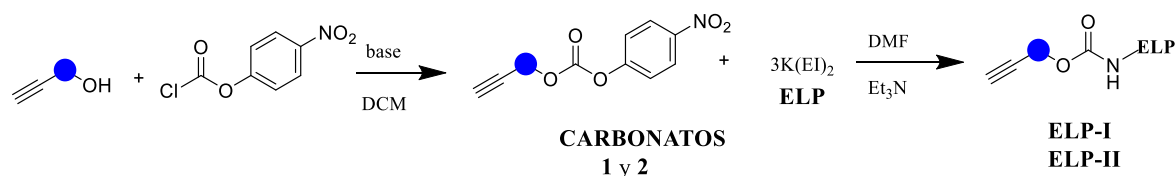
Tabla 5. Rendimientos de la producción del ELP

	PRODUCCION 1	PRODUCCION 2
MASA	0.021g	0.238g
RENDIMIENTO	2.8 mg/L	31.71 mg/L

El rendimiento obtenido en la segunda producción fue 10 veces mayor en comparación con la primera, debido a una mejor familiarización con las condiciones de trabajo.

5.3 Modificación de las lisinas terminales de ELP para incluir grupos alquino.

La modificación del polímero $3K(EI)_2$ se llevó a cabo con dos alquinos terminales diferentes a través de los grupos NH_2 de las lisinas del polímero. El primero de ellos, ELP-I, con un derivado de ciclooctino y el otro, ELP-II, con un alquino de cadena lineal. El esquema general de la funcionalización se representa en el *Esquema 3*:

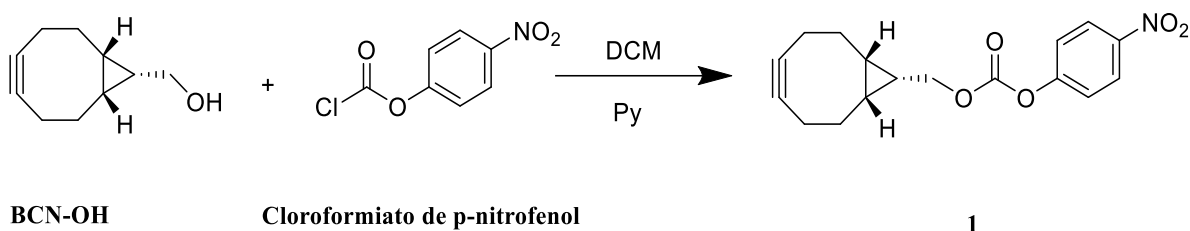


Esquema 3. Funcionalización del ELP con alquinos terminales a través de las lisinas.

La modificación del polímero se llevó a cabo en DMF, debido a que el polímero en este medio no presenta transición inversa y es completamente soluble.

5.3.1 Modificación de las lisinas terminales del ELP con grupos ciclooctino.

Para preparar un intermedio capaz de reaccionar con los grupos amino de las lisinas del polímero se llevó a cabo la síntesis de carbonatos. El derivado BCN-OH utilizado en este trabajo es muy frecuente en trabajos biológicos dado que permite llevar a cabo la química click sin cobre en condiciones fisiológicas. La reacción está descrita en la literatura según el *Esquema 4*.

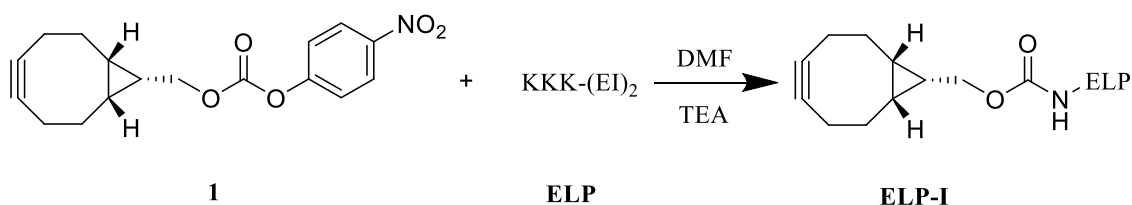


Esquema 4. Obtención del carbonato 1 a partir del derivado de ciclooctino BCN-OH.

En esta reacción, se observó que la variación en la cantidad de equivalentes del cloroformiato empleado tuvo un impacto significativo en los resultados obtenidos. Se optimizaron sus equivalentes y se observó una mejoría de los rendimientos de la reacción, pasando de un rendimiento del 42 % al 74 %.

5.3.1.1 Funcionalización del ELP con el derivado de ciclooctino.

Para llevar a cabo la reacción del ELP con el derivado de carbonato se utilizó DMF como disolvente y una base (TEA) a temperatura ambiente según el *Esquema 5*.



Esquema 5. Funcionalización de las lisinas del ELP con compuesto 1.

Para calcular la cantidad de compuesto **1** que se necesita para modificar únicamente 2 de las 3 lisinas del polímero 3K(EI)₂ se llevaron a cabo los cálculos según la siguiente ecuación:

$$50\text{mg de ELP} \times \left(\frac{1 \text{ mmol } 3K(EI)_2}{93175 \text{ mg}} \right) \times \left(\frac{3 \text{ mmol } NH_2}{1 \text{ mmol } 3K(EI)_2} \right) = 1.6 \times 10^{-3} \text{ mmol } NH_2$$

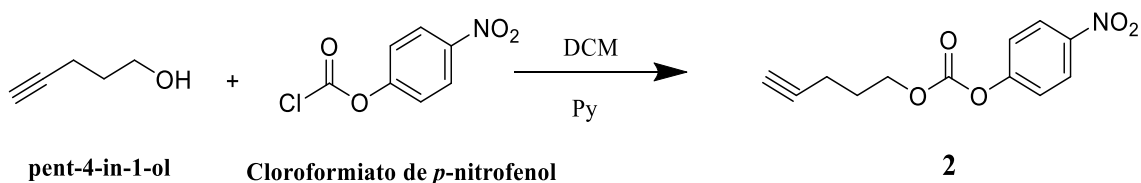
$$1.6 \times 10^{-3} \text{ mmol } NH_2 \times \frac{2 \text{ equiv } \mathbf{1}}{3 \text{ equiv } NH_2} = 1.1 \times 10^{-3} \text{ mmol de } \mathbf{1}$$

$$m(\mathbf{1}) = 1.1 \times 10^{-3} \text{ mmol} \times 310 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}} = 0.33 \text{ mg}$$

Para activar las lisinas del polímero se disolvió el ELP en DMF durante 15 minutos con TEA seguido de la adición del compuesto **1** disuelto previamente en DMF dejándose reaccionar durante 48 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se adicionó éter dietílico para purificar el polímero por precipitación aprovechando que es insoluble en éter y acetona. Se llevó a cabo un proceso de lavado y centrifugación repetido tres veces con éter dietílico y con acetona. Finalmente, el residuo se disolvió en agua ultrapura a 4 °C y se dializó y liofilizó para obtener el **ELP-I** modificado con el derivado de ciclooctino con 64 % de rendimiento.

5.3.2 Modificación de las lisinas terminales del polímero con alquino de cadena lineal.

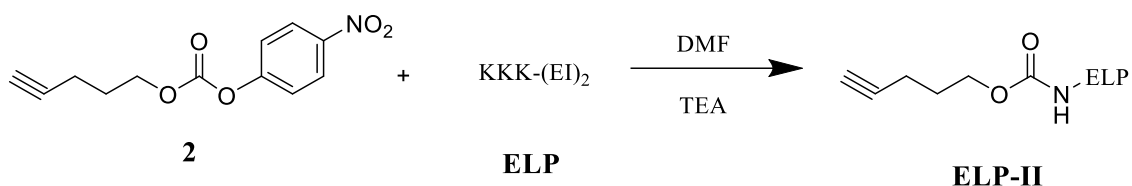
Para preparar el otro intermedio capaz de reaccionar con los grupos amino de las lisinas del polímero se llevó a cabo en paralelo la síntesis del carbonato derivado de un alquino de cadena lineal. Se utilizó este derivado para preparar otro material que pudiera presentar mejor afinidad con las cadenas del ELP y poder comparar posteriormente su funcionalidad en la formación de nanopartículas. La reacción está descrita en la literatura y se ha reproducido para obtener un rendimiento del 60% según el *Esquema 6*.



Esquema 6. Obtención del carbonato (compuesto 1) a partir de pentinol.

5.3.2.1 Funcionalización del ELP con alquino de cadena lineal

Para llevar a cabo la reacción del ELP con el derivado de carbonato **2** se utilizó como se ha definido previamente DMF como disolvente y una base (TEA) a temperatura ambiente según el *Esquema 7*.



Esquema 7. Funcionalización de las lisinas del ELP con un alquino de cadena lineal.

En esta reacción se ha calculado la cantidad del compuesto **2** de la misma manera que para ELP-I para modificar 2 de 3 lisinas en 50 mg de ELP:

$$50 \text{ mg de ELP} \times \left(\frac{1 \text{ mmol } 3K(\text{EI})_2}{93175 \text{ mg}} \right) \times \left(\frac{3 \text{ mmol } \text{NH}_2}{1 \text{ mmol } 3K(\text{EI})_2} \right) = 1.6 \times 10^{-3} \text{ mmol } \text{NH}_2$$

$$1.6 \times 10^{-3} \text{ mmol } \text{NH}_2 \times \frac{2 \text{ equiv } \textbf{2}}{3 \text{ equiv } \text{NH}_2} = 1.1 \times 10^{-3} \text{ mmol de } \textbf{2}$$

$$m(\textbf{2}) = 1.1 \times 10^{-3} \text{ mmol} \times 249 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}} = 0.27 \text{ mg}$$

La reacción se ha llevado a cabo en las mismas condiciones que la de ELP-I y se ha obtenido en este caso un rendimiento del 74 % en la preparación de **ELP-II** después de su purificación y liofilización.

5.4 Caracterización físico-química de los ELPs

Se lleva a cabo la caracterización del polímero para determinar el peso molecular mediante MALDI-TOF y su composición química por RMN e IR.

5.4.1 MALDI-TOF

El espectro de masas obtenido por MALDI-TOF (*Figura 14*) muestra un pico mayoritario a 92205 Da, que corresponde al ión molecular del polímero $3K(EI)_2$. Al comparar con el peso molecular teórico, 93175 Da, se obtiene un error del 1%. Además, se observan picos adicionales correspondientes a: 46181 Da (segunda ionización), 36259 Da (tercera ionización) y 25217 Da (cuarta ionización). Otros picos presentes en el espectro podrían atribuirse a una posible degradación del polímero.

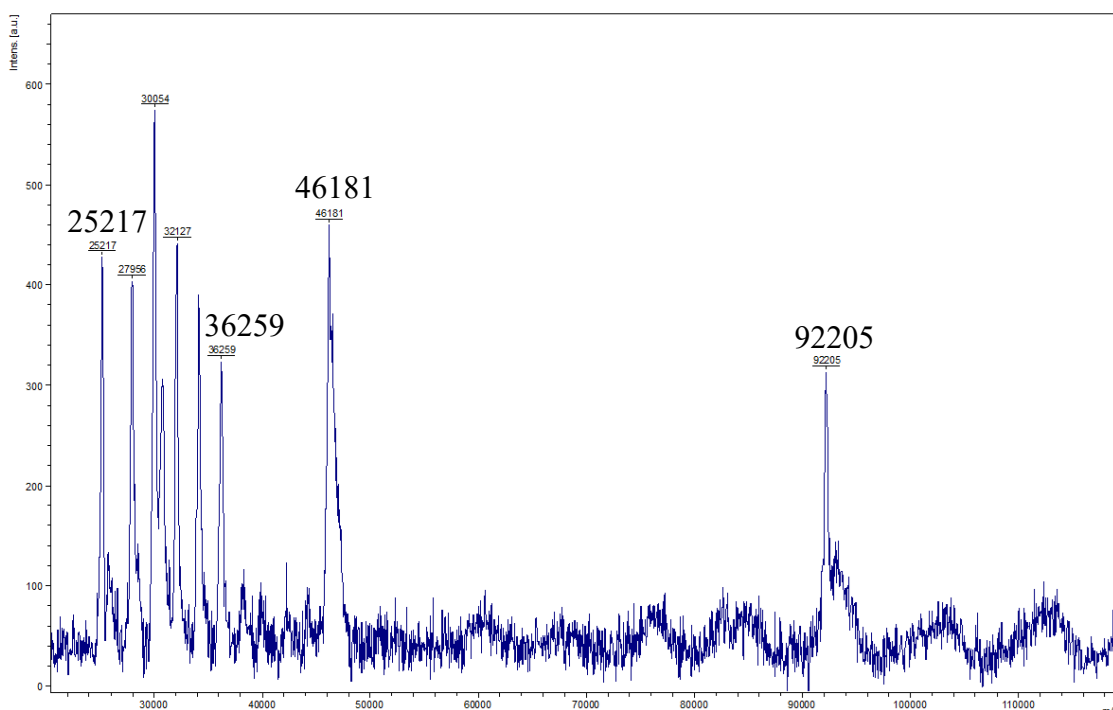


Figura 14. Espectro de Masas del ELP $3K(EI)_2$ obtenido con MALDI-TOF en agua desionizada a 4°C.

5.4.2 RMN

Con el fin de analizar la composición química del polímero y detectar posibles impurezas, se llevó a cabo un análisis por resonancia magnética nuclear de protón en DMSO- d^6 (1H -RMN). Se ha utilizado DMSO deuterado (0.75 mL) porque es un disolvente polar que permite solubilizar el polímero (5 mg), y en el cual no presenta comportamiento termosensible (Figura 15).

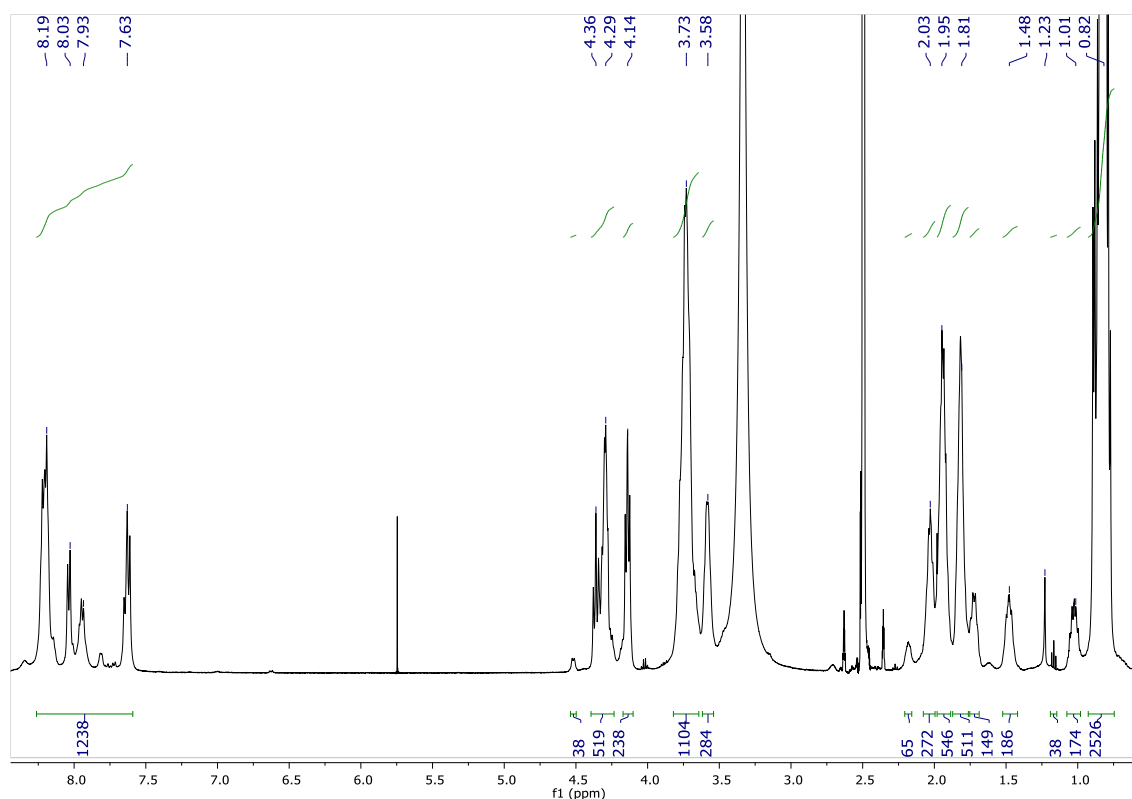


Figura 15. 1H -RMN en DMSO- d^6 del ELP 3K(EI) $_2$.

La integral en un espectro de RMN representa una medida proporcional al número de átomos de hidrógeno de cada señal observada y se pueden identificar cuatro regiones relevantes:

1. **Hidrógenos del grupo CH_3 :** Estos originan señales características a desplazamientos inferiores a 1 ppm.

2. **Hidrógenos del grupo CH₂:** Estas señales aparecen en un rango que va entre 1.0-5.0 ppm dependiendo de si están unidos a un carbono o a un heteroátomo.
3. **Hidrógenos del grupo CH:** Suelen aparecer en un intervalo de entre 3.0-5.0 ppm.
4. **N-H peptídicos:** aparecen entre 7.5-8.5 ppm.

Para realizar la asignación de las señales, se ha analizado la composición de aminoácidos del polímero para distinguir los distintos tipos de protones y verificar su desplazamiento atendiendo a tablas de referencia habituales de elucidación estructural. En la *Tabla 6* se pueden observar el número de ¹H teóricos y la comparación con los experimentales del espectro de la *Figura 16* así como su desviación.

Tabla 6. Asignación de tipos de protones y comparación entre valores teóricos y experimentales de las integrales de ¹H-RMN para el polímero 3K(EI)₂.

ABREVIATURA	CANTIDAD	CH ₃	CCH ₂ C	CCH ₂ Cα	CH ₂ α	CHα	CH	H peptidic	NH ₂
G	441	0	0	0	441	0	0	441	0
E	20	0	0	40	0	20	0	20	0
I	120	240	120	0	0	120	120	120	0
K	3	0	3	6	0	3	0	3	3
P	221	0	0	442	221	221	0	0	0
V	301	602	0	0	0	301	301	301	0
M	1	0	1	0	0	1	0	0	0
TOTAL	1107	842	124	488	662	666	421	885	3
		x3	x2	x2	x2	x1	x1	x1	x2
INTEGRALES		2526	248	976	1324	666	421	885	6

TIPOS DE PROTONES	EXPERIMENTALES	TEÓRICOS	DESVIACIÓN / %
CH₃	2526	2526	0
CH₂ y CH	4113	3635	12%
N-H peptídicos	1238	885	28%

Figura 16. Comparación de los ¹H teóricos con los experimentales.

Sin embargo, al comparar el RMN del ELP con los de sus modificaciones (ELP-I y ELP-II), tal y como se refleja en la *Figura 17*, no se observan diferencias significativas. Esto es porque en el polímero sólo se ha pretendido modificar dos lisinas y está dentro del error de la técnica.

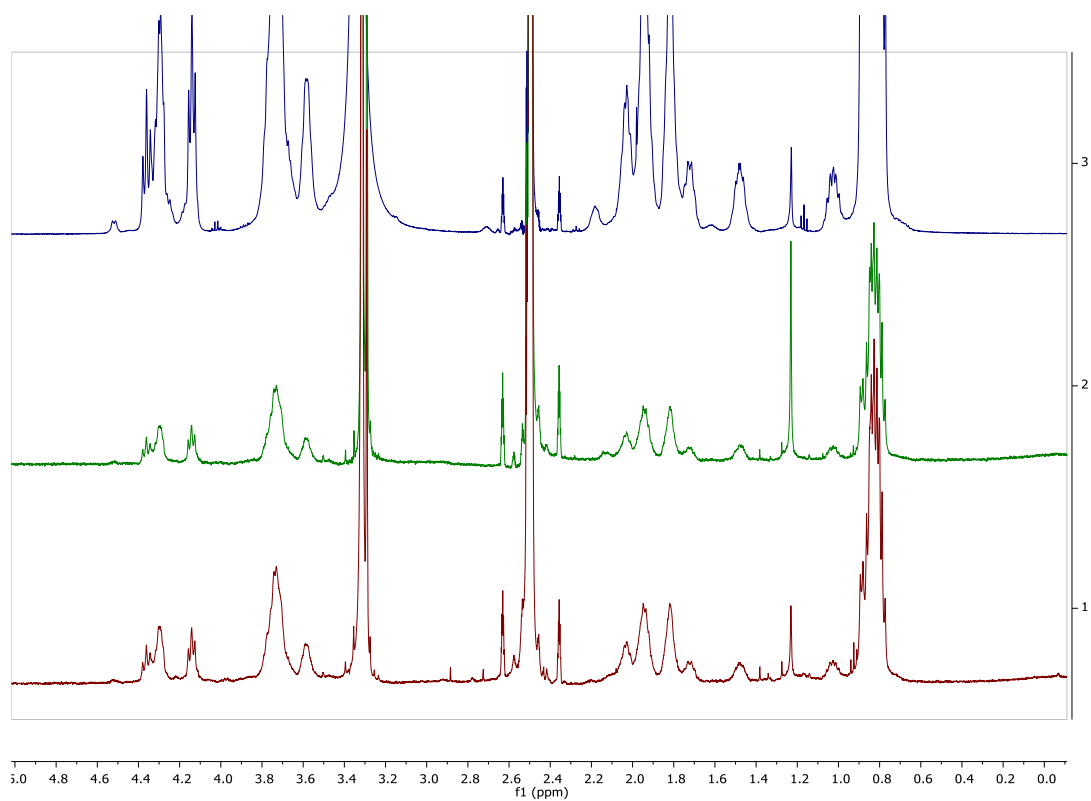


Figura 17. Comparación de ^1H -RMN en $\text{DMSO}-d^6$: Azul) ELP, verde) ELP-I, rojo) ELP-II.

5.4.3 IR

En la Figura 18 se muestra el espectro de IR del polímero sin modificar (ELP), señalando las bandas más características.

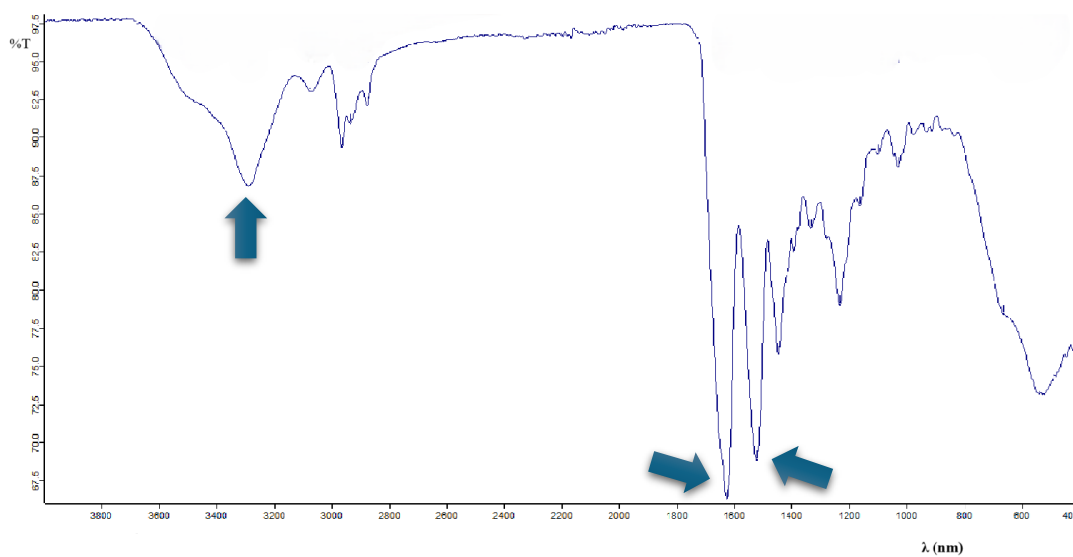


Figura 18. Espectro IR del ELP $3\text{K}(\text{EI})_2$.

La señal a 3400cm^{-1} corresponde con la banda de tensión (stretching) del enlace N-H de los grupos amino presentes en el polímero. A 1600cm^{-1} se observa una banda intensa de vibración del enlace C=O.

También se llevó a cabo el espectro de IR de ELP-I y ELP-II y tampoco se observaron diferencias significativas como cabía esperar (*Figura 19*).



Figura 19. Comparación de espectros de IR del ELP, ELP-I y ELP-II.

5.4.4 Dispersión de luz dinámica (DLS, *DYNAMIC LIGHT SCATTERING*)

La DLS se utilizará en este trabajo para estudiar el autoensamblado del polímero en su respuesta con la temperatura. Con esta caracterización se mide el tamaño y la carga superficial (potencial Z) de las partículas a diferentes temperaturas y estados de agregación. Debido a su naturaleza anfifílica, estos polímeros tienen la capacidad de formar nanopartículas. Este fenómeno ocurre cuando el bloque hidrofóbico de isoleucina evita el contacto con el agua, mientras que el bloque hidrofílico rodea el núcleo formando una corona que interacciona con el medio acuoso.

Para estudiar la formación de nanopartículas y evaluar el tamaño y la carga superficial, se realizaron mediciones a distintas temperaturas para determinar a su vez la temperatura

de transición del polímero. Esto permitió analizar el autoensamblado desde moléculas individuales hasta la formación de agregados.

La disolución se preparó disolviendo el polímero ELP en agua ultrapura a una concentración de 2 mg/mL durante 24 h a 4 °C. Posteriormente, esta disolución fue filtrada mediante un filtro de 0.45 µm para eliminar partículas no deseadas para medir el tamaño de partícula. El primer experimento se llevó a cabo con una rampa de temperatura para estudiar el comportamiento del polímero entre 4°C y 37°C para determinar la T_t (Figura 20). Una vez alcanzada la temperatura se estabiliza durante un minuto antes de realizar la medida. Estas medidas se hicieron por duplicado. Las gráficas de las distribuciones medidas a distintas temperaturas se encuentran recogidas en el **Anexo 1**.

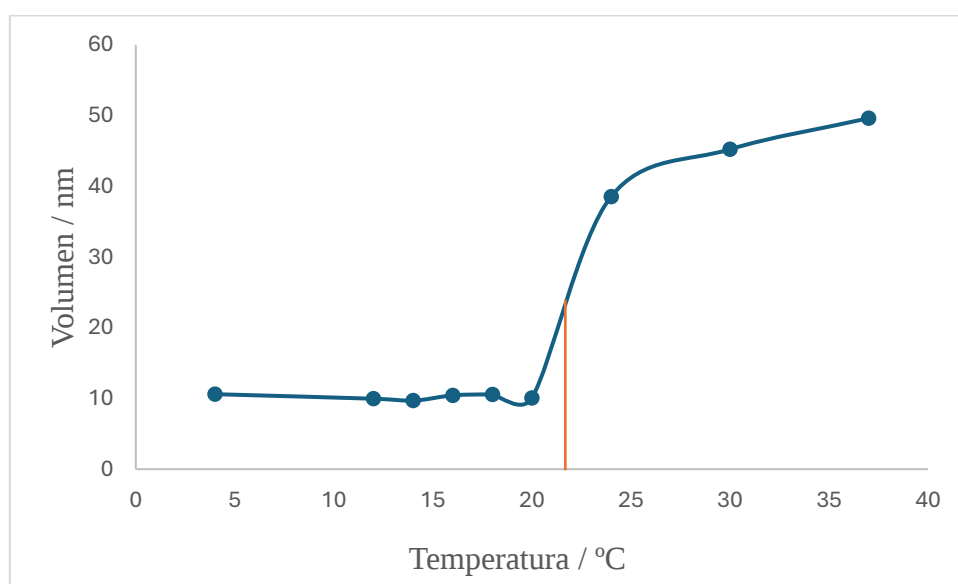


Figura 20. Distribución por volumen del ELP, 3K(EI)₂, en función de la temperatura.

En naranja se destaca la temperatura de transición del polímero.

Se han recogido los datos de la distribución en volumen para realizar la rampa de temperaturas ya que esta medida demuestra el porcentaje real de las moléculas en la muestra. Siempre es muy mayoritario el pico de la medida de diámetros hidrodinámicos en torno a 10 nm a temperaturas por debajo de la T_t (22 °C). A temperaturas por encima

de la T_i aparecen nanopartículas monodispersas con tamaños que se estabilizan en torno a 50 nm.

En la siguiente *Figura 21* se representan las medidas recogidas a dos temperaturas estabilizadas previamente durante 24 h para comprobar el tamaño de las partículas cuando se forman a 37 °C de forma súbita.

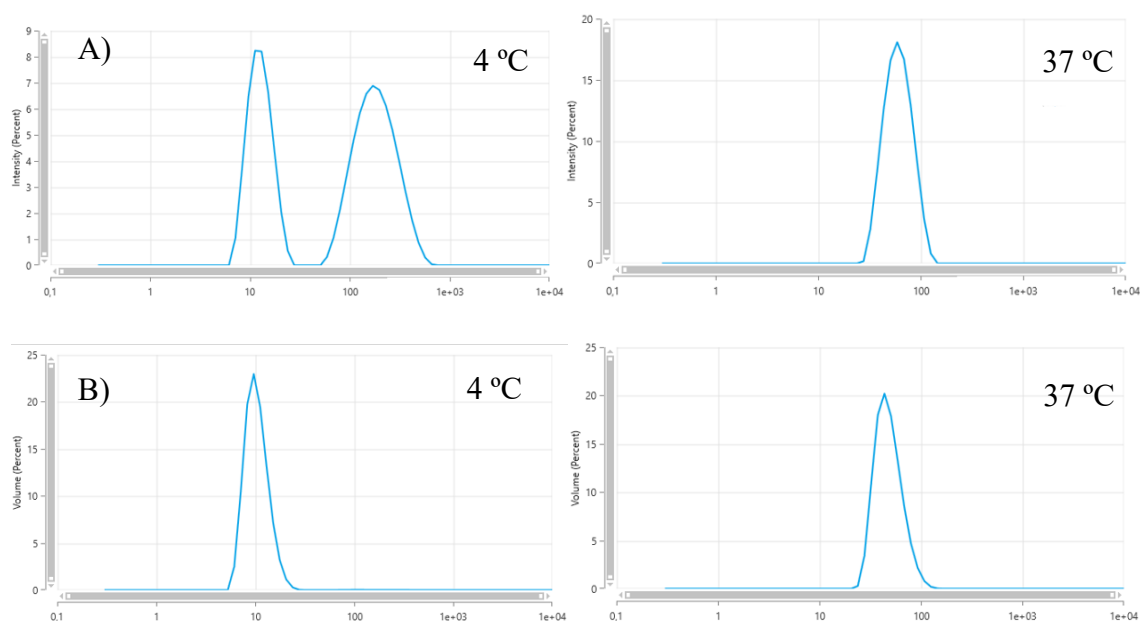


Figura 21. A) Gráficas de distribución por intensidad del ELP. B) Gráficas de distribución por volumen del ELP.

A 4 °C se observa la presencia de dos picos en la gráfica de la izquierda (A): el pico de la izquierda corresponde con tamaños de 13 nm. El pico de la derecha corresponde a partículas de mayor peso molecular, pero en baja proporción (3.9 %) como puede observarse en la gráfica de distribución a 4 °C por volumen (B). A 37 °C, en cambio, se presenta sólo un pico con un diámetro hidrodinámico de 50 nm que representa el 99 % en la disolución con un PDI de 0.05.

En las mediciones del tamaño de las partículas, se obtuvo también el índice de polidispersidad (PDI). Un PDI cercano a 0 indica que las partículas son principalmente monodispersas, con una distribución de tamaño uniforme. Por el contrario, un PDI cercano a 1 sugiere la presencia de otros agregados en la disolución.

El potencial Z se utilizó para medir la carga superficial de las partículas, lo que constituye un indicador de la estabilidad de la dispersión y de la vida media de las partículas. En este contexto, un mayor valor absoluto del potencial Z, positivo o negativo, está asociado con una mayor estabilidad de las partículas. Por otro lado, para medir el potencial Zeta, después de medir el tamaño, se ajustó la concentración de salinidad de la solución de ELP (2 mg/mL) a 10 mM de NaCl antes de llevarla a 37 °C. Este paso fue necesario debido a que la presencia de iones en solución influye directamente en la estabilidad electrostática del sistema y permite obtener mediciones confiables del potencial Zeta.

Se llevó a cabo la medida del tamaño de todos los polímeros (ELP, ELP-I y ELP-II) y del potencial Z a 4°C y 37 °C.

La formación de nanopartículas a 37 °C se repite en el ELP-I y en ELP-II. Ejemplo de ello son la *Figura 22* y *Figura 23*.

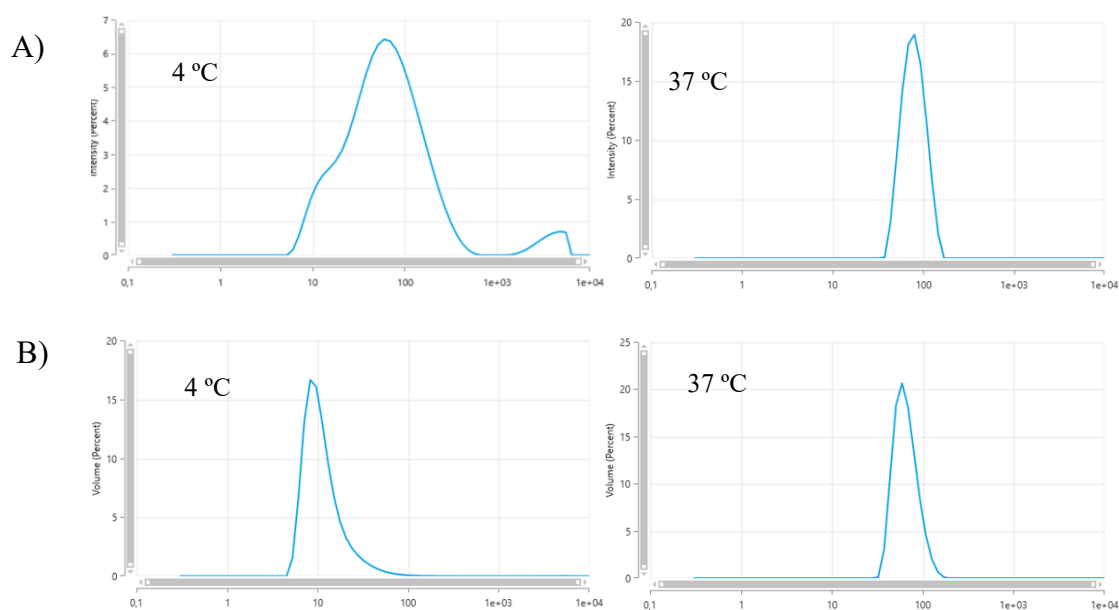


Figura 22. ELP-I: A) Gráficas de distribución por intensidad B) Gráfica de distribución por volumen.

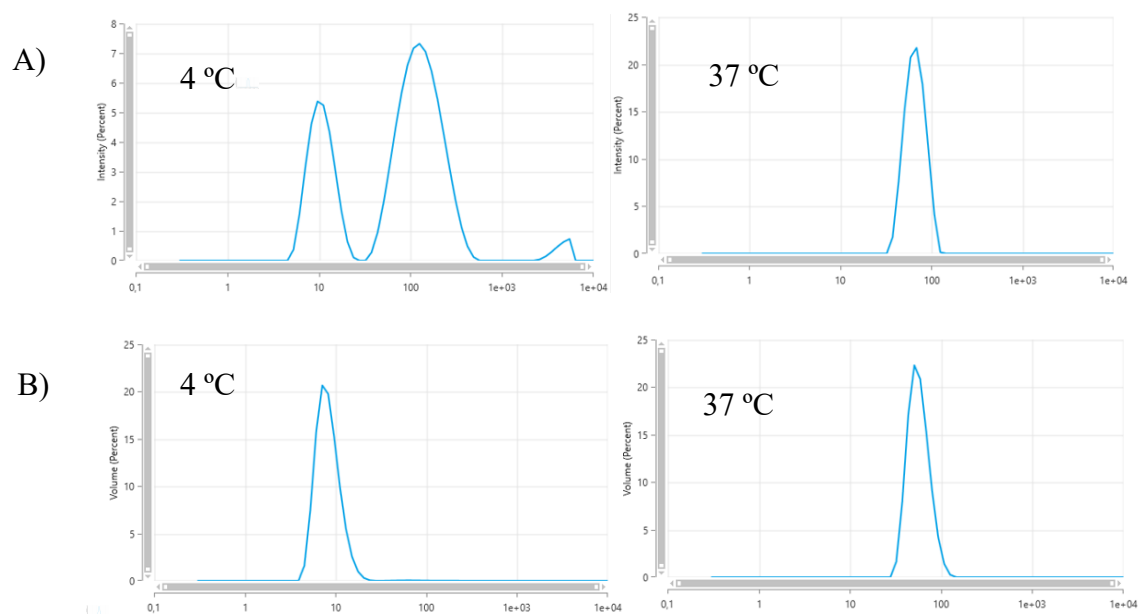


Figura 23. ELP-II: A) Gráficas de distribución por intensidad B) Gráficas de distribución por volumen.

Los resultados a 37 °C se han resumido en la siguiente *Tabla 7*:

Tabla 7. Mediciones a 37°C del ELP, ELP-I y ELP-II.

	ELP	ELP-I	ELP-II
Tamaño / nm	47	66	58
PDI	0.05	0.07	0.03
Potencial Z / mV	-17	-20	-29

De los resultados de la tabla se puede resumir que hay un ligero aumento de tamaño cuando se modifica la superficie de la partícula a través de las lisinas. El PDI indica que la distribución de tamaño de las nanopartículas es muy homogénea y el potencial Z del ELP-I y ELP-II se ve aumentado confirmando que las lisinas han sido modificadas.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha llevado a cabo la bioproducción del ELP, 3K(EI)₂, mejorando el rendimiento, de 2.8 mg/L en la primera producción a 31.7 mg/L en la segunda. Lo que indica que finalmente se adquirió la destreza esperada durante mi aprendizaje en el proceso de bioproducción.
2. El polímero fue purificado utilizando ciclos de transición inversa. Este método demostró ser eficiente, rápido y sencillo, permitiendo la purificación de este tipo de polímeros en función de su temperatura de transición (T_t).
3. Se realizó la caracterización del ELP biosintetizado mediante SDS-PAGE, MALDI-TOF, ¹H-RMN e IR. Los resultados de la caracterización mostraron que el producto obtenido era conforme al esperado.
4. Se ha funcionalizado el ELP para obtener dos polímeros modificados ELP-I y ELP-II mediante la inclusión de dos grupos alquinos terminales a través de las lisinas del polímero que posibiliten la reacción click en el futuro.
5. Los tres polímeros han demostrado su capacidad de formar nanopartículas a 37 °C en medio acuoso con tamaños en torno a 50 nm, de carácter monodisperso con PDI de 0.05 y cargas superficiales en torno a -22 mV.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Hudecki, A.; Kiryczyński, G.; Łos, M. J. *Biomaterials, Definition, Overview*. In *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*; Łos, M. J.; Hudecki, A.; Wiecheć, E., Eds.; Academic Press: Cambridge, 2019; Chapter 7, pp 85–98. DOI: [10.1016/B978-0-12-812258-7.00007-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00007-1)
- [2] Mateu-Sanz, M.; Fuenteslópez, C. V.; Uribe-Gómez, J.; Haugen, H. J.; Pandit, A.; Ginebra, M.; Hakimi, O.; Krallinger, M.; Samara, A. *Redefining Biomaterials Biocompatibility: Challenges for Artificial Intelligence and Text Mining*. Trends Biotechnol., 2024, 42, (4), 402–417. DOI: [10.1016/j.tibtech.2023.09.015](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.09.015).
- [3] Ratner, B. D.; Bryant, S. J. *Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going*. Annu. Rev. Biomed. Eng., 2004, 6, 41–75. DOI: [10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027](https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027).
- [4] Wang, M.; Hong, Y.; Fu, X.; Sun, X. *Advances and Applications of Biomimetic Biomaterials for Endogenous Skin Regeneration*. Bioact. Mater., 2024, 39, 492–520. DOI: [10.1016/j.bioactmat.2024.04.011](https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2024.04.011).
- [5] ScienceDirect. *Biomimetic Material*. <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/biomimetic-material> (10/01/2025).
- [6] Cacopardo, L. *Biomaterials and Biocompatibility*. In *Human Orthopaedic Biomechanics*; Innocenti, B., Galbusera, F., Eds.; Academic Press: Cambridge, 2022; Chapter 18, pp 341–359. DOI: [10.1016/B978-0-12-824481-4.00038-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824481-4.00038-X).
- [7] Gomes, C. P. *Dispositivos Médicos y Medicina Personalizada*. Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, 2019. Supervisora: Professora Doutora Ana Francisca Bettencourt. Disponível em: <https://repositorio.ul.pt/>
- [8] Girotti, A., González-Valdivieso, J., Alonso-Sampedro, I., Escalera-Anzola, S., Ramos-Díez, S., & Arias, F. J. (2022). *Elastin-like Polymers as Nanovaccines: Protein Engineering of Self-Assembled, Epitope-Exposing Nanoparticles*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2465, 41–72. DOI: [10.1007/978-1-0716-2168-4_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2168-4_3).

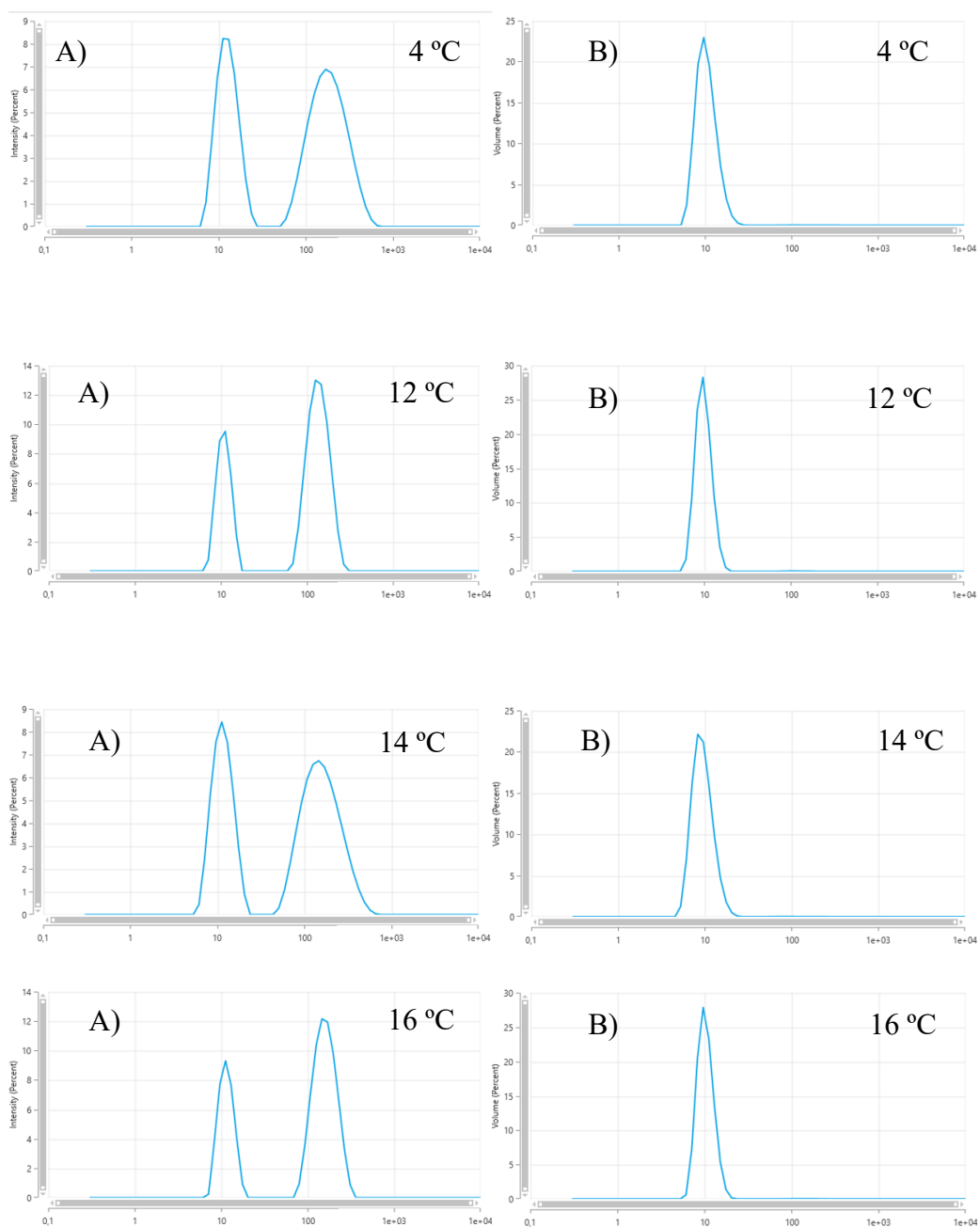
- [9] Gonzalez-Valdivieso, J.; Girotti, A.; Muñoz, R.; Rodriguez-Cabello, J. C.; Arias, F. J. *Self-Assembling ELR-Based Nanoparticles as Smart Drug-Delivery Systems Modulating Cellular Growth via Akt*. *Biomacromolecules*, 2019, 20, (5), 1996–2007. DOI: [10.1021/acs.biomac.9b00206](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00206).
- [10] 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. DOI: [10.1021/acs.biomac.2c01405](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01405).
- [11] Kowalczyk, T., Hnatuszko-Konka, K., Gerszberg, A., & Kononowicz, A. K. (2014). *Elastin-like polypeptides as a promising family of genetically-engineered protein based polymers*. *World journal of microbiology & biotechnology*, 30(8), 2141–2152. DOI: [10.1007/s11274-014-1649-5](https://doi.org/10.1007/s11274-014-1649-5).
- [12] Urry, D. W. *Entropic Elastic Processes in Protein Mechanisms. II. Simple (Passive) and Coupled (Active) Development of Elastic Forces*. *J. Protein Chem.*, 1988, 7, (2), 81–114. DOI: [10.1007/BF01025240](https://doi.org/10.1007/BF01025240).
- [13] García-Arévalo, C.; Bermejo-Martin, J. F.; Rico, L.; Iglesias, V.; Martin, L.; RodriguezCabello, J. C.; Arias, F. J. *Immunomodulatory nanoparticles from elastin-like recombinamers: single-molecules for tuberculosis vaccine development*. *Mol. Pharmaceutics*, 2013, 10, 586–597. <https://doi.org/10.1021/mp300325v>.
- [14] 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>.
- [15] Van Strien, J.; Escalona-Rayó, 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. DOI: [10.1016/j.jconrel.2022.12.033](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.12.033).
- [16] Le, D. H. T.; Sugawara-Narutaki, A. *Elastin-Like Polypeptides as Building Motifs toward Designing Functional Nanobiomaterials*. *Mol. Syst. Des. Eng.*, 2019, 4, (3), 545–565. DOI: [10.1039/C9ME00002J](https://doi.org/10.1039/C9ME00002J).
- [17] Roberts, S.; Dzuricky, M.; Chilkoti, A. *Elastin-Like Polypeptides as Models of Intrinsically Disordered Proteins*. *FEBS Lett.*, 2015, 589, (19PartA), 2477–2486. DOI: [10.1016/j.febslet.2015.08.029](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.029).

- [18] Wright, E. R.; Conticello, V. P. *Self-Assembly of Block Copolymers Derived from Elastin-Mimetic Polypeptide Sequences*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, **54**, (8), 1057–1073. DOI: [10.1016/S0169-409X\(02\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00059-5).
- [19] Tatode, A.; Agrawal, P. R.; Taksande, J.; Qutub, M.; Premchandani, T.; Umekar, M.; Danao, K. *Role of Folate Receptor and CD44 in Targeting of Docetaxel and Paclitaxel Fabricated Conjugates for Efficient Cancer Therapy*. *J. Med. Surg. Public Health* 2025, 5 , 100163. <https://doi.org/10.1016/j.glmedi.2024.100163>.
- [20] Gonzalez-Valdivieso, J.; Vallejo, R.; Rodriguez-Rojo, S.; Santos, M.; Schneider, J.; Arias, F. J.; Girotti, A. *CD44-Targeted Nanoparticles for Co-Delivery of Docetaxel and an Akt Inhibitor against Colorectal Cancer*. *Biomater. Adv.*, 2023, **154**, 213595. DOI: [10.1016/j.bioadv.2023.213595](https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213595).
- [21] Oprea, I.; Smith, T. K. *Click Chemistry Methodology: The Novel Paintbrush of Drug Design*. *ACS Chem. Biol.*, 2025, **20**, (1), 19–32. DOI: [10.1021/acschembio.4c00608](https://doi.org/10.1021/acschembio.4c00608).
- [22] Suárez, A. *Reacciones de Cicloadición 1,3-Dipolares a Alquinos Catalizadas por Cobre*. *An. Quím.*, 2012, **108**, (4), 306–313.
- [23] Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126** , (46), 15046–15047. DOI: [10.1021/ja044996f](https://doi.org/10.1021/ja044996f).
- [24] Dommerholt, J., Schmidt, S., Temming, R., Hendriks, L.J.A., Rutjes, F.P.J.T., van Hest, J.C.M., Lefeber, D.J., Friedl, P. and van Delft, F.L. (2010), *Readily Accessible Bicyclononynes for Bioorthogonal Labeling and Three-Dimensional Imaging of Living Cells[‡]*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49: 9422–9425. <https://doi.org/10.1002/anie.201003761>
- [25] Chen, W.; Guo, C.; Ding, H.; Yang, X.; Zhang, K. *Controlled Ring-Opening Polymerization of Macrocyclic Monomers Based on Ring-Opening/Ring-Closing Cascade Reaction*. *J. Am. Chem. Soc.* 2023, **145** (45), 25022–25030. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c10765>.
- [26] Johnston, C.; Martin, B.; Fichant, G.; Polard, P.; Claverys, J.-P. *Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control*. *Nature Rev. Microbiol.* 2014, **12** (3), 181–196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>.

8. ANEXOS

ANEXO 1- DLS:

Medidas de la distribución de tamaño del ELP con rampa de temperatura



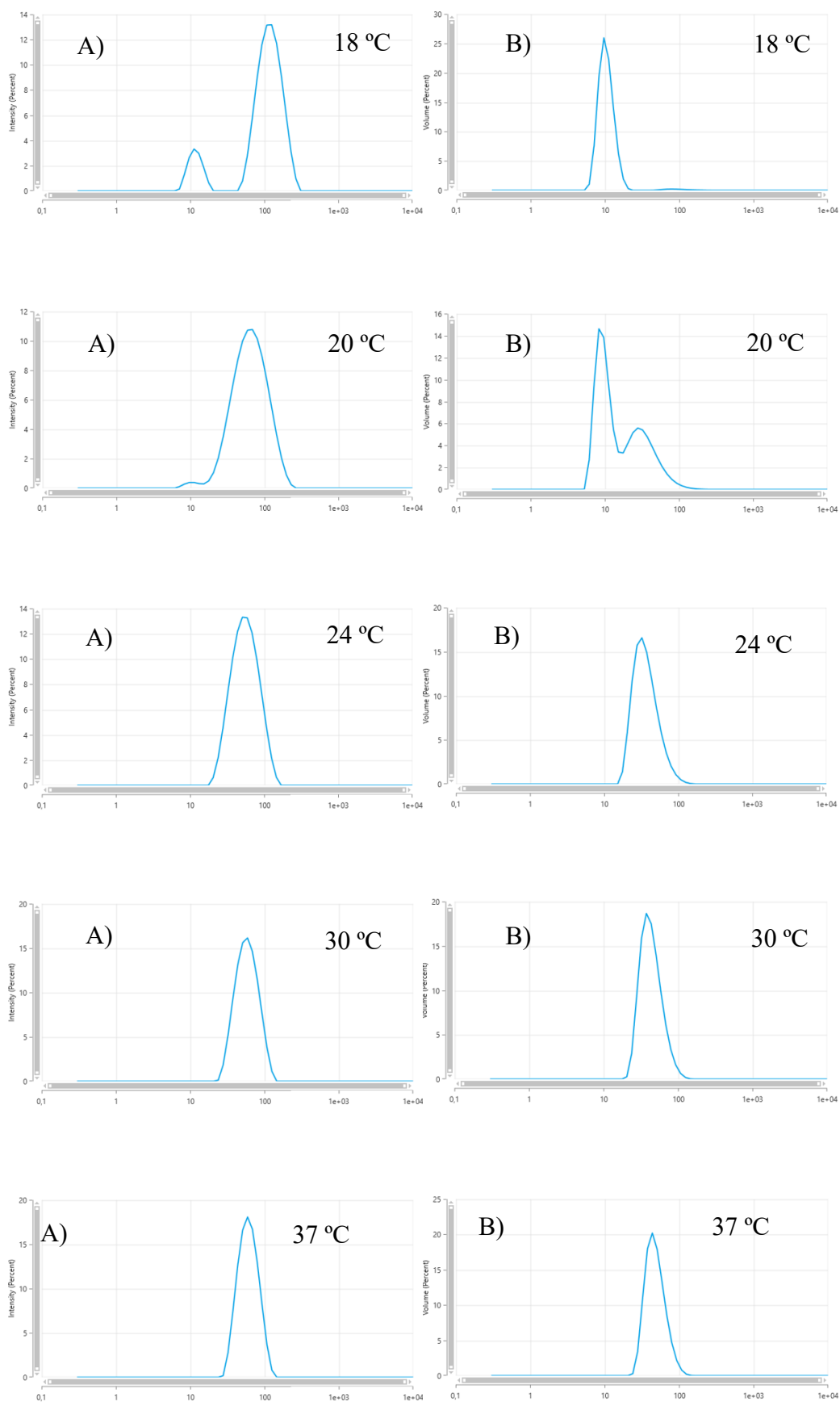


Figura 24. DLS. A) Gráfica de distribución del tamaño por intensidad. B) Gráfica de distribución del tamaño en volumen.

ANEXO II: ^1H -RMN de los compuestos 1 y 2

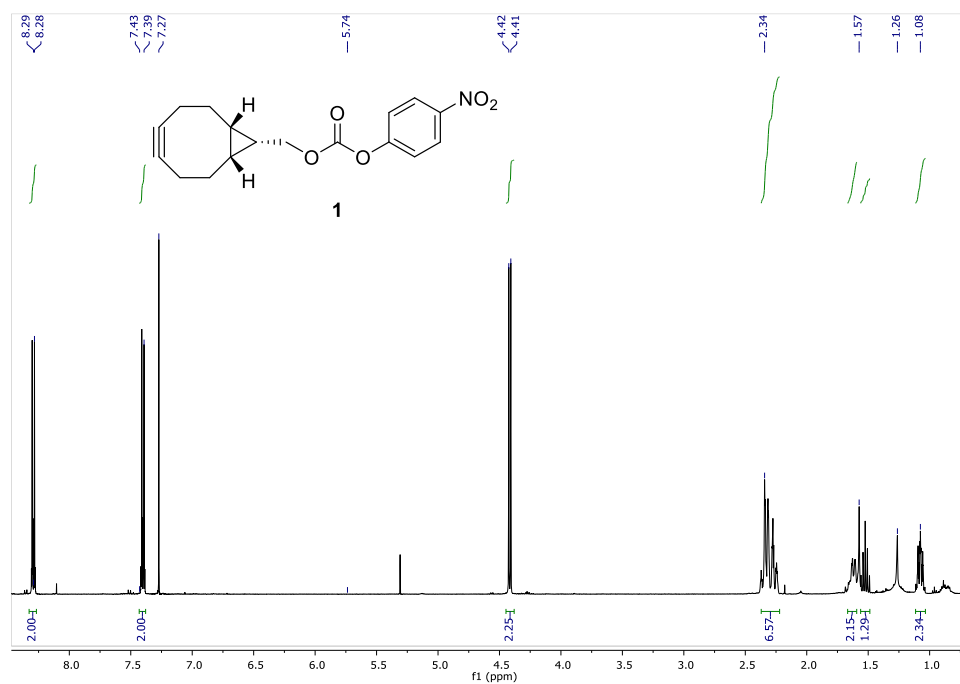


Figura 25. ^1H -RMN en CDCl₃ del compuesto 1.

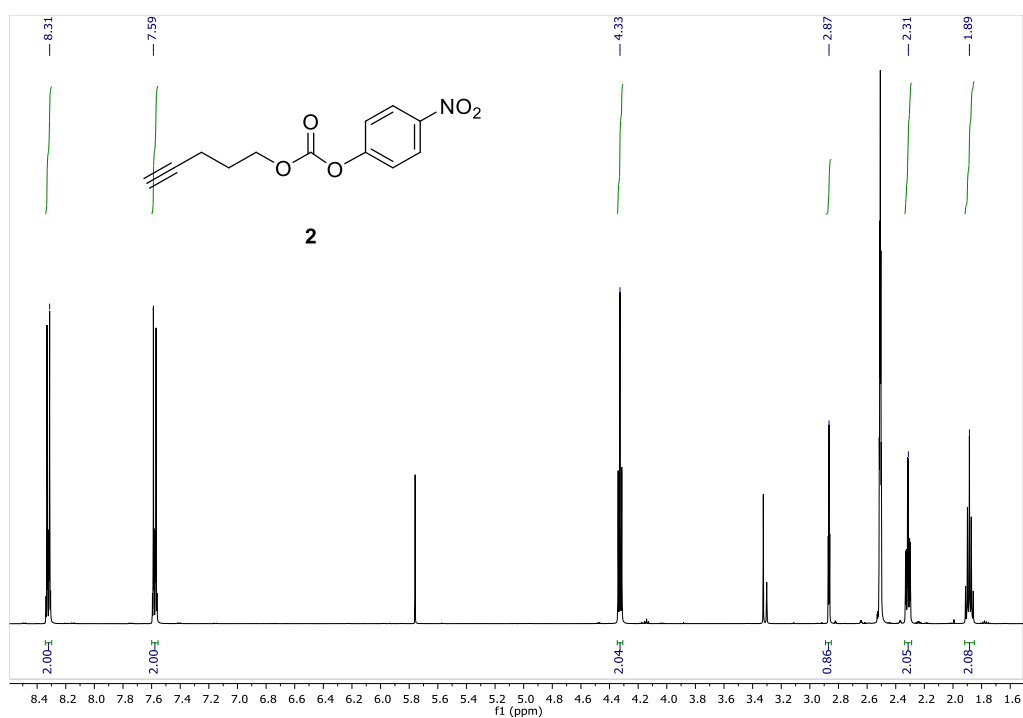


Figura 26. ^1H -RMN en CDCl₃ del compuesto 2.

ANEXO III: ^1H -RMN del ELP-I y ELP-II.

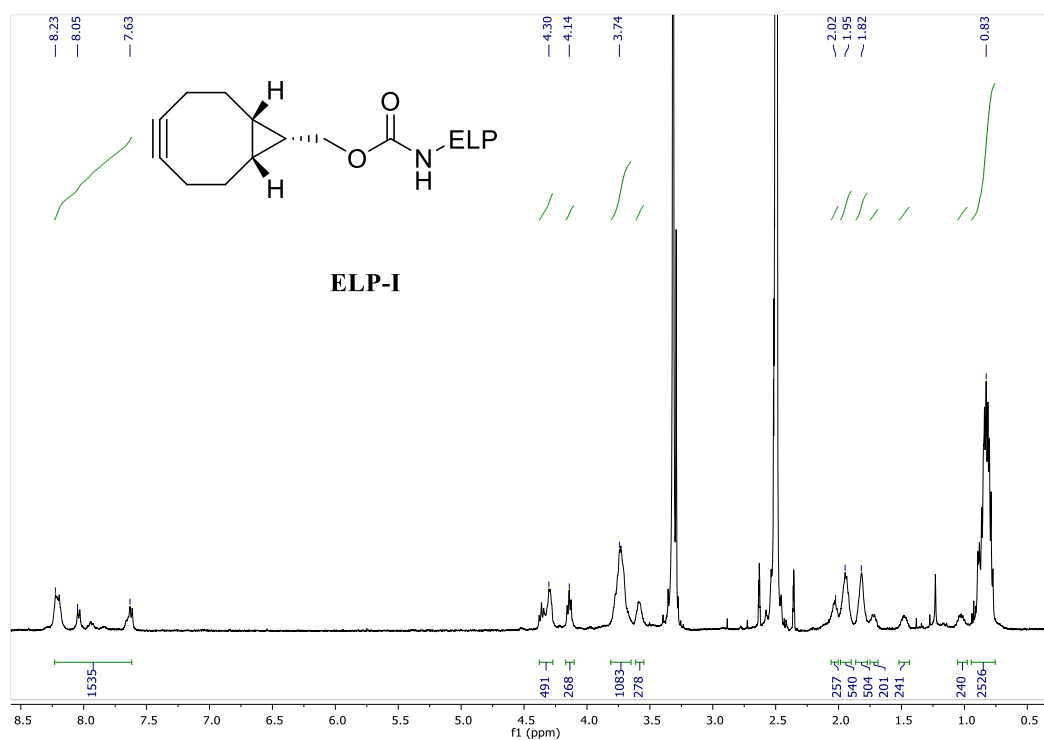


Figura 27. ^1H -RMN en $\text{DMSO}-d^6$ del ELP-I.

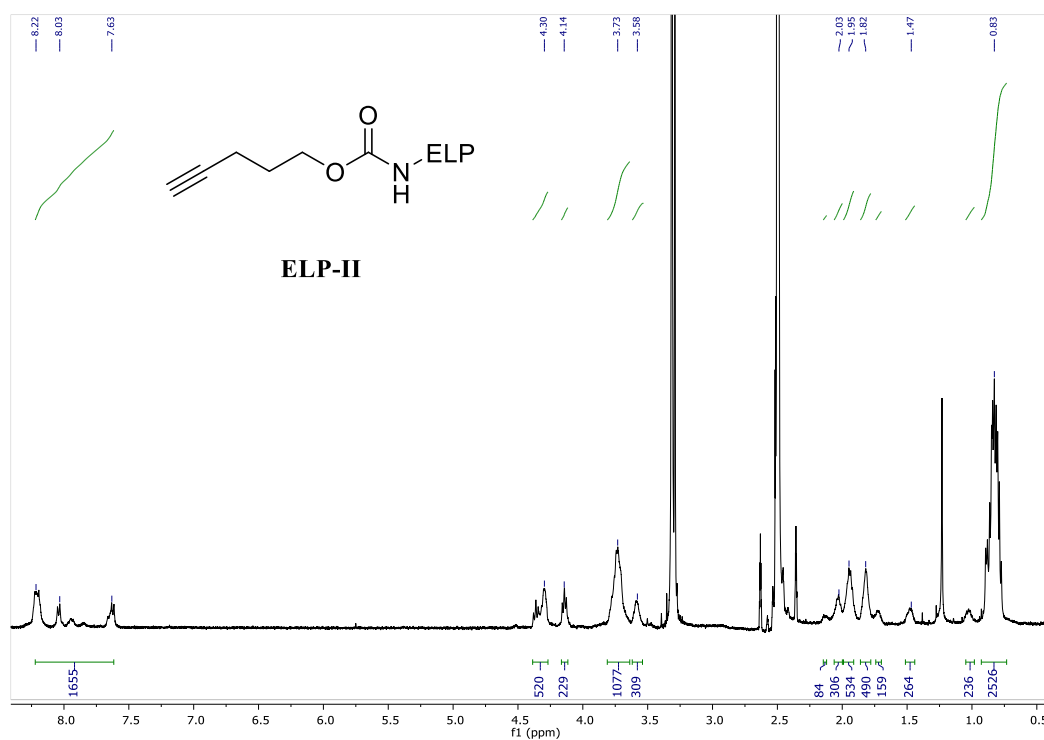


Figura 28. ^1H -RMN en $\text{DMSO}-d^6$ del ELP-II.