

Biomecánica, Vol.19, 2011, pp 8-16

Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas

A. FERNÁNDEZ-COLINO, A. GIROTTI, M.I. LÓPEZ, F.J. ARIAS, J.C. RODRÍGUEZ-CABELLO
G.I.R. BIOFORGE. Universidad de Valladolid, Centro de I+D.

Resumen

Actualmente, una de las técnicas más ampliamente utilizadas en la purificación de proteínas recombinantes es la cromatografía de afinidad. Sin embargo, esta técnica es costosa, requiere de equipo especializado y es difícil de escalar. Por tanto, es deseable el desarrollo de métodos más económicos y técnicamente más sencillos. Uno de estos métodos está basado en aprovechar las características termosensibles y el comportamiento inteligente de los polímeros tipo elastina (ELP) para purificar una proteína de interés. El bajo coste que esta metodología requiere permitiría disminuir el precio de diversas proteínas de interés biomédico en el mercado, con las consiguientes repercusiones que ello conlleva a la hora de su aplicación en clínica.

Por tanto, el presente artículo pretende indagar en la utilización de los ELP como tags para la purificación proteica, gracias al diseño y la producción de construcciones de fusión compuestas por la proteína diana de interés unida al tag elastomérico. Además se resaltarán otros efectos colaterales positivos que la presencia del ELP puede aportar a la proteína quimérica.

Palabras clave: Polímeros tipo elastina, transición inversa con la temperatura, construcciones de fusión, purificación proteica.

Abstract

Currently, chromatography is one of the most commonly used techniques to achieve protein purification. Nevertheless, such technique requires specialized equipment and is difficult to scale-up. Therefore, the development of new, simpler and broadly applicable purification methods to circumvent these problems is desirable. One such approach takes advantages of the thermo-sensitive and smart behavior of the elastin like polymers (ELP) to purify the target protein. The low-cost of carrying out such methodology may permit us to decrease the price of diverse biomedical useful proteins, with the consistent impact that such fact entails when applying in clinic.

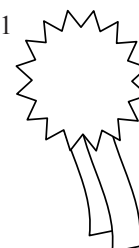
Therefore, the aim of this article is to clarify some aspects related to the use of the ELP as protein purification tags. For such use, it is necessary to design and produce fusion constructs between the target protein and the elastomeric tag. Moreover, apart from protein purification, further effects of the presence of the ELP in the fusion construct would be described.

Keywords: Elastin like polymers, inverse transition with temperature, fusion constructs, protein purification.

Correspondencia:

J. Carlos Rodríguez-Cabello
G.I.R. BIOFORGE. Universidad de Valladolid. Centro de I+D
Paseo de Belén nº 11. Valladolid, 47011. Spain
Teléfono: (+34) 983 184 686
Fax: (+34) 983 184 698
E-mail: cabello@bioforge.uva.es

Primer Premio en el XXXIV
Congreso de la SIBB Córdoba
4-5 noviembre de 2011



Introducción

Los materiales biológicos gozan de unas propiedades extraordinarias que son fruto de miles de años de evolución, durante los cuales, la selección natural ha permitido que solo los mejores diseños perduren. De ahí que resulte muy interesante crear materiales artificiales que mimeticen a los naturales. Además, el propósito de la ciencia de materiales no debería ser tan solo copiar los diseños naturales, sino mejorarlos, creando compuestos bio-inspirados con propiedades más avanzadas que no están presentes en la naturaleza. Para llevar a cabo este propósito, la biotecnología nos proporciona una serie de herramientas que nos permiten imitar y mejorar los diseños biológicos, para la creación así de nuevos dispositivos que satisfagan completamente nuestras necesidades. Un ejemplo muy significativo de esta relación entre material biológico y material bio-inspirado lo constituyen la elastina y los polímeros tipo elastina respectivamente.

La elastina y los polímeros tipo elastina

La proteína elastina es uno de los constituyentes más importantes de la matriz extracelular. Su papel principal es aportar elasticidad a los tejidos [1, 2], aunque su función biológica no está limitada exclusivamente a esta tarea, sino que la elastina juega un papel activo en modular el comportamiento celular y en promover la reparación tisular [3].

La secuencia aminoacídica de la elastina tiene regiones gobernadas por la presencia de motivos repetidos como VPGG, VPGVG, APGVG y VGVAPG. Estos motivos adquieren una estructura tal que permiten que la elastina sufra grandes deformaciones sin ruptura y que, una vez que el estrés desaparece, ésta recupere su conformación original [4]. Este proceso tiene la peculiaridad de ocurrir sin pérdida energética, puesto que la energía requerida para estirar la proteína es recuperada una vez ésta vuelve a su estado original, debido a que este último paso es pasivo. Este comportamiento energético de la elastina se asemeja al funcionamiento de un utensilio muy cotidiano: un muelle, lo que ejemplifica la extrapolación de los diseños biológicos a la construcción de máquinas artificiales. Pero a diferencia de un muelle, la elastina, cuando se encuentra en disolución acuosa, presenta la capacidad de sufrir el cambio de un estado enrollado (ordenado) a un estado estirado (desordenado) como consecuencia de un aumento en la temperatura. Esta característica tan peculiar

ha sido la principal responsable de que la elastina haya despertado un gran interés en la comunidad científica. Dicho interés ha dado como resultado el desarrollo de un amplio abanico de polímeros tipo elastina.

Los polímeros tipo elastina (ELP, “Elastin Like Polymers”) son polipéptidos artificiales cuya secuencia mimetiza los motivos repetidos presentes en la elastina natural. Los polímeros tipo elastina más comúnmente utilizados consisten en repeticiones del motivo $(VPGXG)_n$, donde el residuo invitado “X” puede ser cualquier aminoácido excepto prolina, y donde “n” representa el número de repeticiones del pentapéptido. El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido la construcción de genes sintéticos, diseñados específicamente para una aplicación. La introducción de un determinado gen en un microorganismo nos permite obtener el polímero proteico recombinante “a la carta” [5] y con un control absoluto de su secuencia. Así, los ELP producidos biosintéticamente se les está comenzando a denominar ELR (“Elastin Like Recombinamers”) [6]. Con este nombre se pretende evocar tres características identificativas: 1) su similitud con la proteína natural elastina; 2) su obtención recombinante; 3) su carácter polimérico.

Además de las propiedades específicas proporcionadas por un diseño particular, los ELR mantienen las propiedades inherentes de la elastina. En otras palabras, la similitud a nivel de secuencia entre la elastina y los ELR se traduce en una similitud en otra serie de propiedades, como las propiedades mecánicas [7], la biocompatibilidad [8-11], la naturaleza termosensible y el comportamiento autoensamblable [12], siendo quizás estas dos últimas las más llamativas.

La naturaleza termosensible y el comportamiento autoensamblable de los ELR

Como se anticipó anteriormente, la elastina y, consecuentemente, los ELR, sufren una transición molecular reversible entre dos estados conformacionales en respuesta a cambios en la temperatura [13]. Así, en una solución acuosa, por debajo de cierta temperatura (a la que llamamos temperatura de transición, T_t), el polímero permanece disuelto e hidratado mediante hidratación hidrófoba. Esta hidratación se caracteriza por la existencia de estructuras tipo clatrato rodeando los residuos apolares del polímero (figura 1.B). Sin embargo, por encima de la T_t , las moléculas de agua colocadas alrededor de los restos apolares pierden este orden por la agitación térmica: el estado estructurado del

agua formando los clatratos deja de ser posible y la cadena polipeptídica se pliega hidrofóbicamente formando una fase separada, en la que el polímero adopta una estructura regular llamada espiral β (figura 1.A) [14], constituida básicamente por una sucesión de horquillas β (figura 1.C).

Es un hecho destacable que los ELR sean capaces de alcanzar estructuras más ordenadas cuando se aumenta la temperatura, pues en la mayoría de las proteínas, un aumento de la temperatura provoca desplegamiento y desnaturalización. Para entender este proceso desde el punto de vista termodinámico, hay que tener en cuenta el sistema en su globalidad. Durante el calentamiento, el polímero se pliega hidrofóbicamente, lo que va a provocar un aumento del orden local. Sin embargo, la magnitud de este orden va a ser altamente superada por el desorden originado por la ruptura de las estructuras de clatrato, ruptura originada como consecuencia de la agitación térmica. Por tanto, este aumento de la entropía es la que actúa como fuerza motora del plegamiento, facilitando que $\Delta G < 0$.

La cantidad de energía térmica requerida para desencadenar el proceso de transición inversa depende de la relación entre el agua y la cadena polimérica. Numerosos parámetros, como la concentración polimérica [15], la longitud del ELR, la composición aminoacídica [16], el pH [17] o

la fuerza iónica [18], son capaces de modular esta relación, determinando la formación de clatratos de diferente grado de perfección. Por tanto, estas variables han de ser consideradas cuando se define una determinada temperatura de transición.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente descrito, este proceso de contracción inducido por estímulos ambientales lo podemos considerar como la conversión de energía térmica o química en trabajo mecánico útil. Además, el plegamiento es completamente reversible bajando la temperatura de la muestra por debajo de la T_t . Por todo ello, los ELR pueden ser considerados como “máquinas moleculares gobernadas ambientalmente” [7, 19]. En relación con esto, los ELR han sido calificados como polímeros inteligentes [20], pues son capaces de percibir el microambiente, y de sufrir cambios en respuesta a él.

El grado de conocimiento alcanzado en relación a la estructura y función de estos materiales, su biocompatibilidad, sus propiedades mecánicas y su naturaleza inteligente han convertido a los ELR en unos compuestos muy atractivos para la investigación biomédica y biotecnológica [5, 6, 21-25]. La primera área en la que estos polímeros encontraron su nicho fue en la ingeniería de tejidos. No obstante, un amplio rango de nuevas aplicaciones, entre las que se encuentra la purificación proteica, está siendo desarrollado.

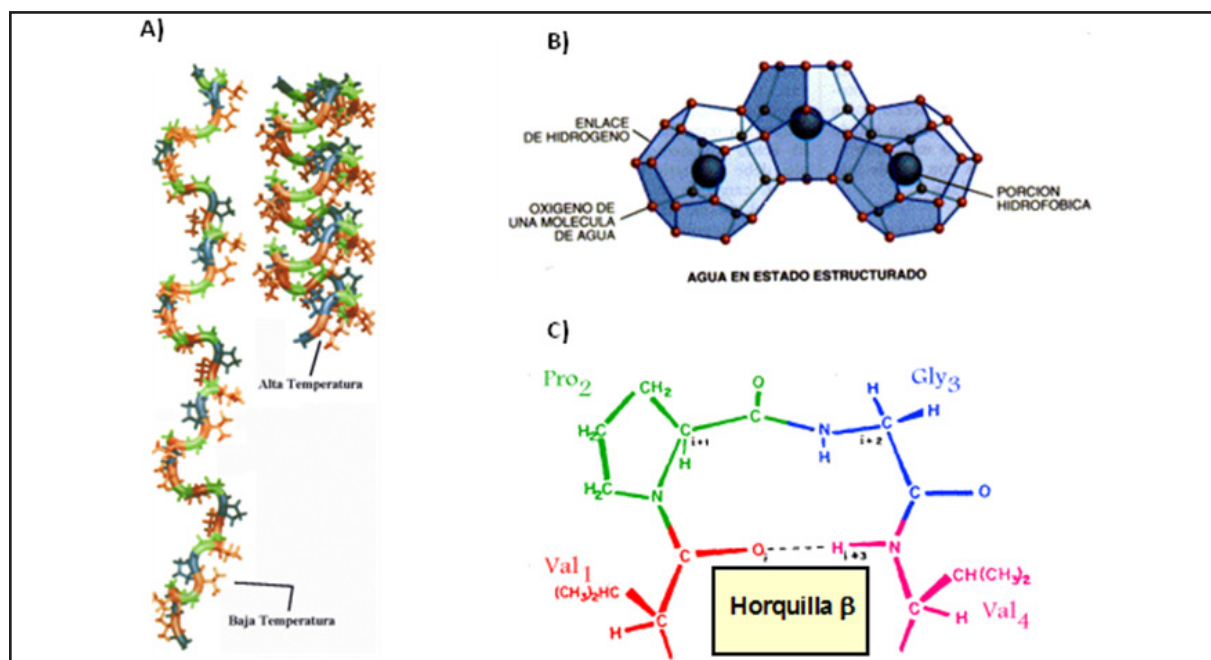


Figura 1. A: Representación de las cadenas extendida y plegada de los polímeros tipo elastina. B: Representación de la estructura tipo clatrato que forma el agua alrededor de restos apolares. C: Esquema con la posición de los principales átomos que participan en la conformación en Horquilla β de los polímeros tipo elastina.

Purificación de proteínas recombinantes gracias a la utilización de ELR como tags

Un hecho destacable y que constituye la idea basal de la purificación de proteínas recombinantes gracias a la utilización de ELR como tags es que el comportamiento inteligente de los ELR se mantiene cuando dicho polímero es incorporado en una construcción de fusión [26]. Por tanto, la capacidad de responder a estímulos ambientales aportada por el ELR se hace extensible a las proteínas de fusión con ELR. Esta propiedad ha permitido el desarrollo de un procedimiento de purificación proteica basada en ciclos de calentamiento (o en su caso adición de sales o cambios de pH), enfriamiento y centrifugación conocido como ITC “Inverse Transition Cycling” o ciclos de transición inversa [26, 27] (figura 2). El método ITC es barato pues para llevarlo a cabo sólo se necesitan reactivos poco costosos, como el cloruro de sodio para desencadenar la transición de fase y aparatos disponibles en cualquier laboratorio estándar, como baños térmicos y centrífugas para separar la proteína de fusión del resto de los contaminantes celulares.

Finalmente, y de un modo similar a otro tipo de tags, el ELR puede ser escindido de su proteína diana gracias a la introducción en la proteína de fusión de una secuencia polipeptídica de reco-

nocimiento por alguna proteasa específica. Una vez producida la ruptura entre ambas partes, se realizaría un nuevo ciclo de transición inversa, a fin de separar la proteína diana del ELR libre. No obstante, la separación de nuestra proteína diana de la proteasa utilizada para la escisión implicaría la necesidad de utilizar cromatografía (figura 3). Para evitar este problema, se han desarrollado construcciones tripartitas en las que el eslabón de unión entre el ELR y la proteína diana es la secuencia inteína [28]. Esta secuencia se caracteriza por su capacidad de auto-cortarse bajo determinadas condiciones (temperatura ambiente, y pH neutro).

El ELR [V5A2G3-90], constituido por 90 pentapéptidos, donde valina, alanina, y glicina están presentes como residuos invitados en un ratio 5:2:3, se ha descrito en la bibliografía como un tag útil para la purificación de un amplio rango de proteínas [29]. No obstante, es aconsejable optimizar tanto el diseño de la proteína de fusión como las condiciones del protocolo de ITC para conseguir una maximización del rendimiento. Por tanto, para conseguir una purificación exitosa de una proteína dada, han de tenerse en cuenta una serie de parámetros, como: longitud del ELR, composición de los residuos invitados, características físico-químicas de la proteína diana y la ubicación amino o carboxiterminal del ELR en la construcción de fusión.

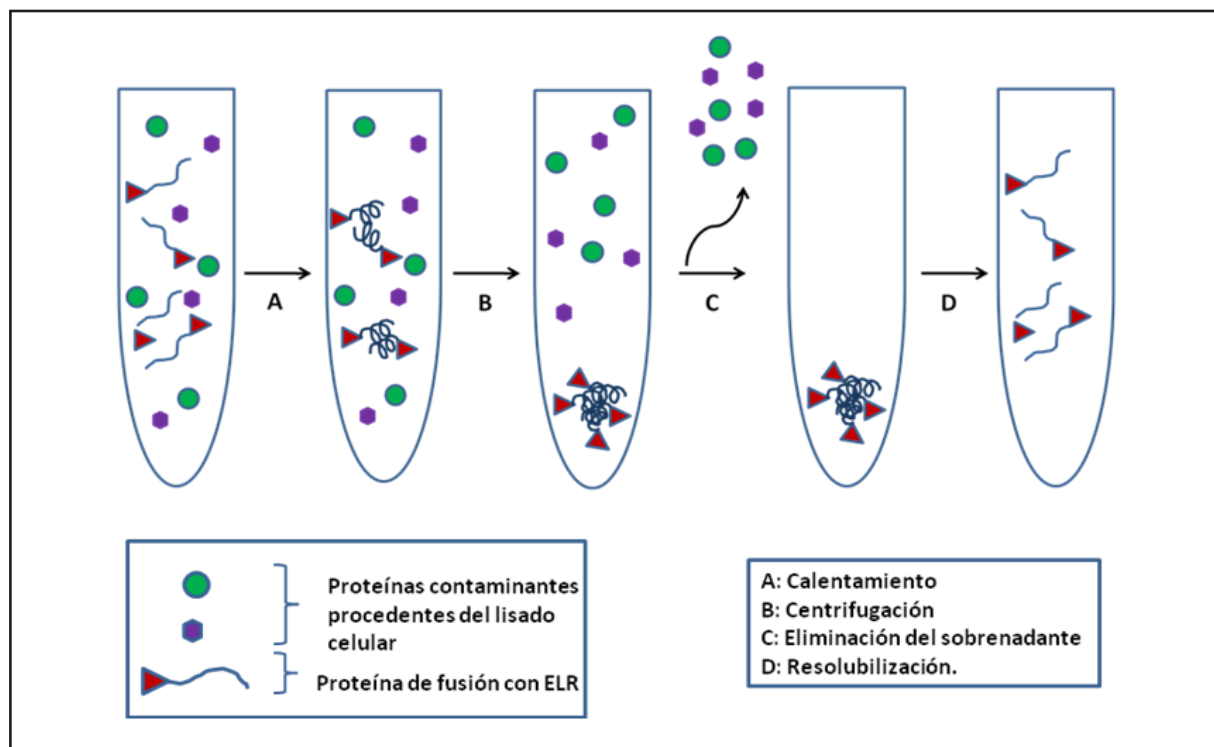


Figura 2. Esquema simplificado de la purificación de proteínas de fusión con ELR mediante ITC.

Longitud del ELR y composición de los aminoácidos invitados

Se ha descrito en la bibliografía que el rendimiento de la proteína de fusión disminuye conforme la longitud del ELR utilizado aumenta [30, 31]. Para determinar qué longitud del ELR es la más idónea para purificar una proteína diana concreta es necesario probar empíricamente diferentes ELR. Hay que tener en cuenta que la reducción del tamaño del ELR utilizado como tag no solo implica un incremento en el rendimiento, sino también un comportamiento de transición considerablemente más complejo [30]. Por tanto debe encontrarse un punto de equilibrio entre la minimización del ELR aconsejable para mejorar el rendimiento, y la maximización necesaria para facilitar la purificación y evitar la formación de micelas y nanopartículas que no pueden ser recuperadas por centrifugación. Como se indicó anteriormente, uno de los factores que afectan a la Tt es la longitud del ELR, y por tanto, la utilización de tags más pequeños requiere de la incorporación de residuos invitados más hidrofóbicos para conseguir así mantener una Tt suficientemente baja. Este punto es de importancia crítica, ya que altas temperaturas durante el protocolo de ITC pueden causar la desnaturalización de la proteína diana.

Por otra parte, las características físico-químicas de los aminoácidos invitados también tienen fuertes

implicaciones en la sensibilidad del ELR a la sal. Se ha descrito en la bibliografía que los residuos invitados alifáticos hacen que el ELR sea sensible a la concentración de sal solo de una forma modesta. La incorporación de residuos ionizables en la secuencia del ELR provoca un aumento en la sensibilidad a la sal del ELR, y por tanto, la cantidad de sal requerida para inducir la transición de fase es menor [32]. No obstante, el efecto que los aminoácidos cargados tienen en la Tt debe ser compensado con la introducción de residuos hidrofóbicos.

Características físico-químicas de la proteína diana

Debido a la proximidad molecular entre el ELR y la proteína diana, ésta última puede modificar las propiedades físico-químicas del ambiente que rodea al ELR, y en consecuencia, puede modificar la Tt del ELR fusionado con respecto al ELR libre. Esta variación en la Tt producida como consecuencia de la fusión de la proteína diana al ELR se designa como parámetro ΔTt . El signo del parámetro ΔTt va a depender del tipo de interacciones experimentadas entre ambas partes de la proteína de fusión. Por tanto sería deseable diseñar un ELR de forma que sus interacciones con la proteína diana ayudaran a la formación de grandes agregados durante la purificación, mejorando de esta forma la eficiencia del proceso [33].

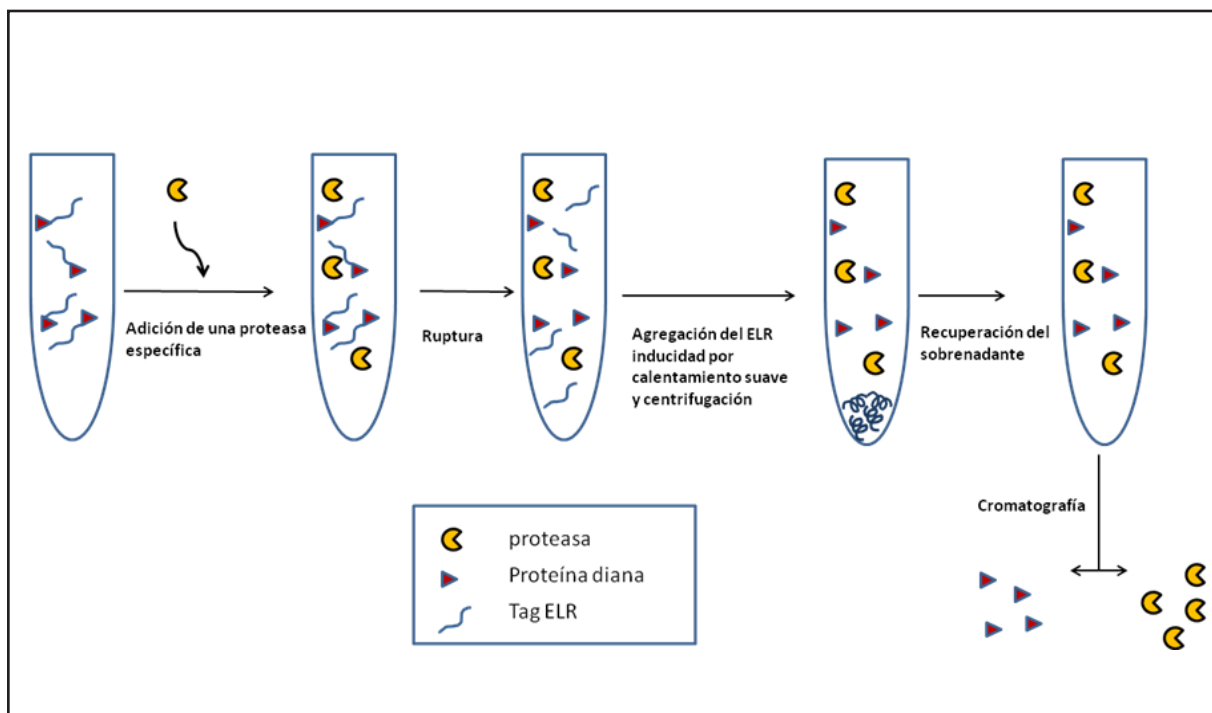


Figura 3. Separación del tag elastomérico de la proteína diana mediante el tratamiento con una proteasa específica.

Ubicación amino o carboxiterminal del ELR en la construcción de fusión

La posición relativa de la proteína diana con respecto al tag ELR en la construcción de fusión es otra variable importante en el control del nivel de expresión y actividad específica de las proteínas de fusión. No hay una regla clara que nos permita determinar *a priori* qué ubicación es la más adecuada. En principio, si la proteína diana libre se expresa a altos niveles, es preferible optar por una ubicación carboxi-terminal del tag elastomérico. Esta colocación implica que el ELR se traduce después de que la síntesis de la proteína diana se haya completado, lo que minimiza el riesgo de que el ELR pueda interferir con el proceso de plegamiento de la misma. Por otra parte, se han descrito casos en los que la posición amino-terminal del ELR ha permitido incrementar la expresión y la solubilidad de una proteína diana, cuya forma libre se caracteriza por los bajos niveles de expresión. Eso puede ser explicado en base a que el ELR puede prevenir estéricamente la agregación intermolecular de las cadenas de proteína diana nacientes. En definitiva, la expresión proteica es un proceso complejo y por tanto, si es posible, es recomendable estudiar ambas variantes de la proteína de fusión [31, 34].

Esta aproximación consistente en la purificación de proteínas recombinantes gracias a la utilización de tags elastoméricos ha sido, en algunos casos, modificada ligeramente con el fin de adecuarla a su objetivo de purificación de proteínas cuando éstas se expresan a muy bajas concentraciones o cuando dichas proteínas son anticuerpos. En el primer caso, la novedad con respecto a la técnica genérica consiste en la adición de ELR libre en exceso, de forma que, gracias al efecto de cooperatividad positivo que muestran estos polímeros, se favorezca la transición, la formación de grandes agregados, y la consiguiente separación de la proteína de fusión del resto de los componentes celulares [35, 36]. En el caso de la purificación de anticuerpos, se ha desarrollado recientemente una nueva estrategia de purificación, conocida como EMAC (ELP-Mediated Affinity Capture) y que consiste en la combinación de la capacidad de responder a estímulos ambientales aportada por el ELR con la especificidad y alta afinidad existente entre los anticuerpos y sus proteínas de unión [37]. En esta aproximación, la proteína diana es un dominio de unión a anticuerpos (como por ejemplo la proteína G). Una vez que haya tenido lugar la interacción de la proteína G con el anticuerpo, se

proporciona el estímulo ambiental que ocasione la transición del ELR. El paso final implica la incubación con un tampón de elución a fin de separar la construcción de fusión del anticuerpo.

Funciones adicionales del ELR en la construcción de fusión

Las construcciones quiméricas, compuestas por un ELR fusionado con una proteína de interés (denominadas en ocasiones con el término anglosajón castellanizado de “proteínas ELRyladas”), nacieron como una estrategia para conseguir una purificación proteica exitosa. No obstante, el papel del ELR en la construcción proteica no está limitado a esta función, sino que la presencia del tag elastomérico puede tener efectos beneficiosos adicionales.

Protección estérica frente a la agregación y frente al ataque por proteasas

Se cree que los tags ELR pueden ayudar al plegamiento correcto de la proteína diana gracias a la prevención estérica de la agregación entre intermediarios del plegamiento. Además, estos efectos estéricos también pueden ser útiles para evitar la degradación de dicha proteína diana por parte de proteasas. En este caso, el ELR actuaría como una especie de escudo protector (figura 4). En relación a estos efectos estéricos, la siguiente pregunta a responder sería determinar si la presencia del ELR puede enmascarar e interferir con la actividad biológica o con las modificaciones postraduccionales necesarias de algunas proteínas. No obstante, se han descrito numerosos ejemplos de proteínas ELRyladas activas y correctamente glicosiladas [38, 39].

Transportadores de proteínas farmacéuticas activas

Uno de los principales problemas de los compuestos farmacéuticos es que tienen un tiempo de vida medio en suero muy corto. No obstante, se ha descrito que este parámetro puede ser alargado mediante la ELRylación. Es lógico pensar que el incremento en tamaño, causado por la presencia del ELR hace que la proteína diana sea menos susceptible a ser filtrada en los glomérulos, y por tanto la construcción quimérica permanezca durante más tiempo en el organismo. Un ejemplo ilustrativo de este efecto lo constituye la ELRylación de un dominio del anticuerpo monoclonal que reconoce TNF, y conocido por las siglas TNF-VhH. La construcción de fusión TNF-VhH-ELR, descrita en [40] presenta un tiempo de vida medio 24 veces mayor que la proteína TNF-VhH libre.

Direccionamiento específico de la proteína diana

En el tratamiento del cáncer, una aproximación usada comúnmente consiste en direccionar transportadores macromoleculares al tumor de forma pasiva. Esta aproximación se basa en que los vasos sanguíneos del tejido tumoral presentan una mayor permeabilidad que los presentes en el tejido sano. Como consecuencia, los transportadores macromoleculares se extravasan y se acumulan preferencialmente en el tejido tumoral, y no en el tejido sano. Pero en el caso concreto de la utilización de ELR como transportadores, hay que señalar una ventaja adicional: su capacidad de responder a estímulos térmicos, lo cual supone un beneficio extra a la hora de conseguir la localización específica. En este sentido, se ha diseñado una proteína ELRylada, caracterizada por permanecer disuelta a la temperatura fisiológica (37 °C), mientras que a 41.5 se agrega. De esta forma, la construcción circula libremente a temperatura corporal, pero se agrega y localiza en un punto concreto como consecuencia de la aplicación de calor externo sobre

dicho punto. El estado agregado es el responsable de incrementar la concentración de la misma en el punto diana [41].

Construcción de matrices biomiméticas

La creación de construcciones quiméricas compuestas por un ELR junto con un factor de crecimiento pueden tener un gran potencial en el campo de la medicina regenerativa. La idea consiste básicamente en realizar una proteína tripartita, compuesta por un ELR la secuencia de reconocimiento por una proteasa específica de tejido, y el factor específico. El ELR tendría la función de dotar al material del comportamiento mecánico y de la biocompatibilidad requeridas, mientras que la secuencia de reconocimiento por la proteasa específica actuaría de eslabón de unión entre el ELR y el factor. Ante la presencia de una proteasa específica de tejido, dicho eslabón sería escindido, quedando el factor libre para ejercer su acción estimuladora sobre sus células diana, promoviendo efectos específicos relacionados con la reparación y la remodelación.

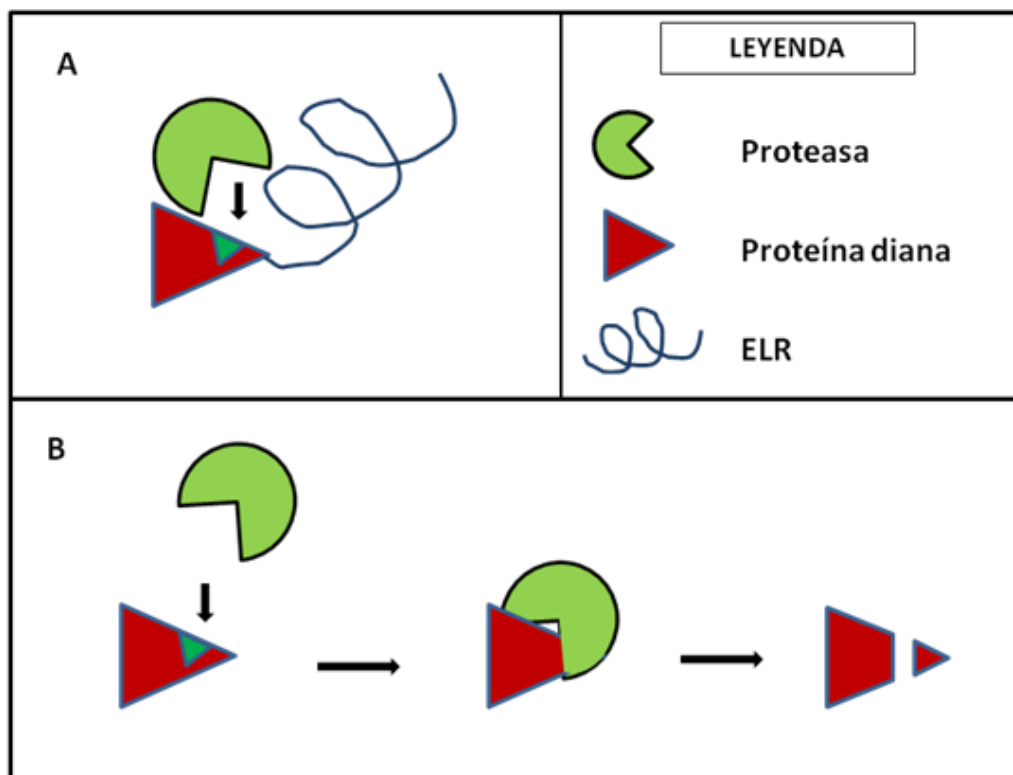


Figura 4. Esquema representativo de la protección que un tag elastomérico puede ejercer ante la degradación proteolítica de la proteína diana como consecuencia de efectos estéricos que impiden la accesibilidad de la proteasa a su secuencia sustrato: (A) El ELR ejerce un papel de escudo protector; (B) En ausencia del tag elastomérico, la proteasa alcanzaría su secuencia sustrato, con la consiguiente degradación de la proteína diana.

Conclusión

El comportamiento mecánico-elástico, la biocompatibilidad y el comportamiento termosensible han convertido a los ELR en el punto de mira de muchas investigaciones científicas, y fruto de ello es la aparición de un número, cada vez más amplio de aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. De entre ellas, este artículo ha pretendido esclarecer las bases y el fundamento de la utilización de los ELR como tags para la purificación proteica. Además, también se ha ejemplificado cómo la presencia del tag elastomérico en la construcción de fusión no solo nos permite llevar a cabo una correcta purificación de la proteína diana, sino que proporciona beneficios adicionales.

Agradecimientos

Agradecemos la financiación aportada por el Ministerio de Ciencia e innovación (MAT2010-15310 y ACI2009-0890), a la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo, y al CIBER-BBN.

Referencias

1. **Mithieux SM, Weiss AS.** Elastin. *Advances in Protein Chemistry* 2005; 70:437-461.
Bochicchio B, Pepe A, Tamburro AM. Investigating by CD the molecular mechanism of elasticity of elastomeric proteins. *Chirality* 2008; 20:985-994.
2. **Rodgers UR, Weiss AS.** Cellular interactions with elastin. *Pathologie Biologie* 2005; 53:390-398.
3. **Miao M, Bellingham CM, Stahl RJ, Sitarz EE et al.** Sequence and structure determinants for the self-aggregation of recombinant polypeptides modeled after human elastin. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:48553-48562.
4. **Arias FJ, Reboto V, Martín S, Lopez I, Rodríguez-Cabello JC.** Tailored recombinant elastin-like polymers for advanced biomedical and nano(bio)technological applications. *Biotechnol Lett* 2006; 28:687-695.
5. **Rodríguez-Cabello JC, Martín L, Alonso M, Arias FJ, Testera AM.** "Recombinamers" as advanced materials for the post-oil age. *Polymer* 2009; 50:5159-5169.
6. **Urry DW.** What sustains life? Consilient mechanisms for protein-based machines and materials, Springer-Verlag, New York 2006.
7. **Urry DW, Parker TM, Reid MC, Gowda DC,** Biocompatibility of the Bioelastic Materials, Poly(GVGVP) and Its Gamma-Irradiation Cross-Linked Matrix - Summary of Generic Biological Test-Results. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 1991; 6:263-282.
8. **Betre H, Liu W, Zalutsky MR, Chilkoti A et al.** A thermally responsive biopolymer for intra-articular drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2006; 115:175-182.
9. **Mithieux SM, Rasko JE, Weiss AS.** Synthetic elastin hydrogels derived from massive elastic assemblies of self-organized human protein monomers. *Biomaterials* 2004; 25:4921-4927.
10. **Sallach RE, Cui W, Balderrama F, Martínez AW et al.** Long-term biostability of self-assembling protein polymers in the absence of covalent crosslinking. *Biomaterials* 2010; 31:779-791.
11. **Keeley FW, Bellingham CM, Woodhouse KA.** Elastin as a self-organizing biomaterial: use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 2002; 357:185-189.
12. **Urry DW, Trapani TL, Prasad KU.** Phase-structure transitions of the elastin polypeptide-water system within the framework of composition-temperature studies. *Biopolymers* 1985; 24:2345-2356.
13. **San Biagio PL, Madonia F, Trapani TL, Urry DW.** The Overlap of Elastomeric Polypeptide Coils in Solution Required for Single-Phase Initiation of Elastogenesis. *Chemical Physics Letters* 1988; 145:571-574.
14. **Martín L, Arias FJ, Alonso M, García-Arevalo C, Rodríguez-Cabello JC.** Rapid micropatterning by temperature-triggered reversible gelation of a recombinant smart elastin-like tetrablock-copolymer. *Soft Matter* 2010; 6:1121-1124.
15. **Ribeiro A, Arias FJ, Reguera J, Alonso M, Rodríguez-Cabello JC.** Influence of the amino-acid sequence on the inverse temperature transition of elastin-like polymers. *Biophys J* 2009; 97:312-320.
16. **Reguera J, Fahmi A, Moriarty P, Girotti A, Rodríguez-Cabello JC.** Nanopore formation by self-assembly of the model genetically engineered elastin-like polymer [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]₁₅. *Journal of the American Chemical Society* 2004; 126:13212-13213.
17. **Reguera J, Urry DW, Parker TM, McPherson DT, Rodríguez-Cabello JC.** Effect of NaCl on the Exothermic and Endothermic Components of the Inverse Temperature Transition of a Model Elastin-like Polymer. *Biomacromolecules* 2007; 8:354-358.
18. **Urry DW.** Molecular Machines - How Motion and Other Functions of Living Organisms Can Result from Reversible Chemical-Changes. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 1993; 32:819-841.
19. **Rodríguez-Cabello JC.** Smart elastin-like poly-

- mers. *Adv Exp Med Biol* 2004; 553:45-57.
20. **Girotti A, Fernandez-Colino A, Lopez IM, Rodriguez-Cabello JC, Arias FJ.** Elastin-like recombinamers: biosynthetic strategies and biotechnological applications. *Biotechnol* 2011; 6:1174-1186.
 21. **Rodriguez-Cabello JC, Martin L, Girotti A, Garcia-Arevalo C, et al.** Emerging applications of multifunctional elastin-like recombinamers. *Nanomedicine* 2011; 6:111-122.
 22. **Macewan SR, Chilkoti A.** Elastin-like polypeptides: Biomedical applications of tunable biopolymers. *Biopolymers* 2010; 94:60-77.
 23. **Rodriguez-Cabello JC, Pierna M, Fernandez-Colino A, Garcia-Arevalo C, Arias FJ.** Recombinamers: Combining Molecular Complexity with Diverse Bioactivities for Advanced Biomedical and Biotechnological Applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2011; 125:145-179.
 24. **Altunbas A, Pochan DJ.** Peptide-Based and Polypeptide-Based Hydrogels for Drug Delivery and Tissue Engineering. *Top Curr Chem* 2011; 1-33, DOI: 10.1007/128_2011_206.
 25. **Meyer DE, Chilkoti A.** Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nature Biotechnology* 1999; 17:1112-1115.
 26. **Meyer DE, Chilkoti A.** Protein Purification by Inverse Transition Cycling. *Protein Interactions*, Golemis E, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2002, NY, pp.329-343.
 27. **Fong BA, Wu WY, Wood DW.** Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution. *Protein Expr Purif* 2009; 66:198-202.
 28. **Meyer DE, Chilkoti A.** Protein Purification by Inverse Transition Cycling. *Protein Interactions*, Golemis E, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2002, NY, pp.329-343.
 29. **Meyer DE, Trabbic-Carlson K, Chilkoti A.** Protein purification by fusion with an environmentally responsive elastin-like polypeptide: Effect of polypeptide length on the purification of thioredoxin. *Biotechnology Progress* 2001; 17:720-728.
 30. **Conley AJ, Joensuu J J, Jevnikar AM, Menassa R, Brandle JE.** Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants. *Biotechnol Bioeng* 2009; 103:562-573.
 31. **Dong C, Filipeanu CM, Duvernay MT, Wu G.** Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768:853-870.
 32. **Trabbic-Carlson K, Meyer DE, Liu L, Piervincenzi R, et al.** Effect of protein fusion on the transition temperature of an environmentally responsive elastin-like polypeptide: a role for surface hydrophobicity? *Protein Engineering Design & Selection* 2004; 17:57-66.
 33. **Christensen T, Amiram M, Dagher S, Trabbic-Carlson K et al.** Fusion order controls expression level and activity of elastin-like polypeptide fusion proteins. *Protein Sci* 2009; 18:1377-1387.
 34. **Christensen T, Trabbic-Carlson K, Liu W, Chilkoti A.** Purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* at low expression levels by inverse transition cycling. *Anal Biochem* 2007; 360:166-168.
 35. **Ge X, Filipe CD.** Simultaneous phase transition of ELP tagged molecules and free ELP: an efficient and reversible capture system. *Biomacromolecules* 2006; 7:2475-2478.
 36. **Kim JY, Mulchandani A, Chen W.** Temperature-triggered purification of antibodies. *Biotechnology and Bioengineering* 2005; 90:373-379.
 37. **Floss DM, Schallau K, Rose-John S, Conrad U, Scheller J.** Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends in Biotechnology* 2010; 28:37-45.
 38. **Hassouneh W, Christensen T, Chilkoti A.** Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins. *Curr Protoc Protein Sci* 2010; Chapter 6, Unit 6.11; DOI 10.1002/0471140864.ps0611s61.
 39. **Conrad U, Plagmann I, Malchow S, Sack M et al.** ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. *Plant Biotechnol J* 2011; 9:22-31.
 40. **Dreher MR, Liu W, Michelich CR, Dewhirst MW, Chilkoti A.** Thermal cycling enhances the accumulation of a temperature-sensitive biopolymer in solid tumors. *Cancer Res* 2007; 67:4418-4424.