



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**Biocatálisis aplicada a la síntesis de radioisótopos:
Síntesis de S-adenosil metionina por metodologías biocatalíticas**

Diego Umpierrez Puchalvert

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Magíster en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química Universidad de la
República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Marzo de 2023

**Biocatálisis aplicada a la síntesis de radiofármacos:
Síntesis de S-adenosil metionina por metodologías biocatalíticas**

Tribunal:

Dra. Andrea Villarino

Dra. Paula González Pombo

Dr. Williams Porcal

Sonia Rodríguez Giordano, Directora

Gabriela Irazoqui Duñach, Directora

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo a mis tutoras Sonia y Gabi. A Sonia por darme la primera oportunidad de pisar un laboratorio de investigación, por el constante estímulo académico y personal y por siempre estar dispuesta a escuchar ideas locas. A Gabi por enseñarme un montón de cosas durante esta tesis y por integrarme al grupo de BQ, donde además de investigar tengo la chance de hacer docencia junto con tremendo equipo del que aprendo día a día. En resumen, gracias a ambas por siempre estar ahí para trabajar en este proyecto como un equipo, por su profesionalismo, por valorar mis opiniones y propuestas, por haber sido dos grandes compañeras cuando la pandemia nos dejó a todos recalculando y por su enorme, enorme calidad humana.

Gracias a la gente de CUDIM y en particular a Florencia, Eduardo y Manuela quienes fueron fundamentales en el desarrollo de este trabajo y estuvieron siempre dispuestos a pensar como equipo cuando la fusión de las disciplinas se complicaba.

Gracias a toda la gente que integra el Área Bioquímica, Lari, Ceci P, Agus, Stefi, Pablo, Euge, Nati, Ema, Vale, Cintia, Lore, Miriam, Paula, Ceci G, Karen, Bea y Laura por siempre estar dispuestos a ayudar, a discutir resultados (cafecito mediante) y siempre dar para adelante. También por integrarme al grupo docente y tomarse el tiempo para enseñar a enseñar. En particular quiero agradecerle a Agustín porque (aunque sea un peleador) es tremendo compañero y se tomó el tiempo para enseñarme muchas de las técnicas que se usaron en esta tesis (spoiler alert: incluida la inmovilización) (spoiler alert: ya van a ver que es importante).

Gracias a la banda del LBB Agus, Choni, Emi, Facu, Paulita, Wilson, David, Pao, Mariela, Nacho, Carlos, Flor C, Flor T, Franco, Agus C y a la reina máxima directora vitalicia del LBB, la querida Pili. A todxs gracias por las mil y una oportunidades en estos casi 8 años juntos y por hacerme sentir inmensamente valorado. Gracias a Nacho y Agustina por haber confiado en mi en la etapa previa a esta maestría y por todo lo que me enseñaron.

Gracias al grupete de Micro Molecular, “el 12”, mi primer hogar en la FQ y espacio de consulta permanente, a “las jefas” y a “los peones” de antes y de ahora María Julia, María Inés, Gianna, Mari, Vir, Vale, MIL, Gabi, Feli, Stefi, Flor A, Sofi Z, Sofi F, Lu, Nicky y Roberto por siempre estar ahí para sumar y ser un gran equipo (en el lab y en los festejos). Gracias a los “Sonios” Ari y Gonza y a Cesitar por sus infinitas ideas y por ser gran amigo afuera del lab.

Gracias a mis compas del MSP, mi vida profesional paralela, que siempre me bancan y se alegran cuando les cuento que estoy por terminar la tesis (bueno, esta vez parece que fue verdad jaja) Gracias Anabela y Faus por estar siempre para sumar, por la constante buena onda y por la paciencia cuando se me cruzan los cables del Q.F. y el investigador.

Gracias a la AUPP por ser un espacio que me permitió trabajar en equipo para mejorar las cosas que no están buenas de la vida de los jóvenes investigadores. Juntxs podemos todo y un poquito más.

Gracias a mis amigos y amigas. A Faus y Delfi, por haber compartido la vida entera (desde la escuela hasta el laburo) y seguir eligiéndonos. A Gonza por ser el mejor compa para hablar de música, la vida y el laburo en cualquier orden y a cualquier hora. A Romi V, a Carlos y Paulita por los momentos de desenchufe, las cervezas y la comunidad del Macro. A mis amigos de Minas Flor, Nico, Joaco, Bruno, Maxi, Gastón, Gonzalo y Eli. A la vieja guardia del 12, a los LBBjr y a la Jazz Team Bieber.

Gracias a mi hermosa familia, mi hermana, primos, tíos y abuelos porque siempre están cerquita, por siempre querernos y encontrar un motivo más para festejar. Y por último, GRACIAS INFINITAS a mis padres, por el apoyo constante e incondicional, por bancarme en todas y por ser el real pilar que me permitió meterme en este mundo de la ciencia y la investigación. Gracias por la libertad, por su confianza y por el amor de siempre.

**Biocatálisis aplicada a la síntesis de radiotrazadores:
Síntesis de S-adenosil metionina por metodologías biocatalíticas**

Diego Umpierrez Puchalvert, Mag.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química Universidad de la
República

2022

DIRECTORAS: Sonia Rodríguez Giordano, Gabriela Irazoqui Duñach

Facultad de Química, Universidad de la República

En la naturaleza, la mayoría de las biomoléculas y productos naturales contienen algún centro quiral, siendo este fundamental en relación con su actividad biológica. Esta situación se repite a la hora del diseño de fármacos, existiendo un interés creciente en desarrollar procesos capaces de producir fármacos ópticamente puros, dado que la administración de una mezcla de isómeros puede acarrear problemas sanitarios y/o pérdidas económicas.

Este trabajo busca ofrecer una alternativa enzimática para la síntesis del radiotrazador $[^{11}\text{C}](S,S)$ -S-adenosilmetionina ($[^{11}\text{C}]\text{SAM}$), de potencial aplicación en el seguimiento mediante PET-CT de tumores de próstata particularmente agresivos.

La principal ventaja de la estrategia biocatalítica planteada radica en que permitiría obtener el producto al menos en forma diastereoméricamente pura, lo cual, además de mejorar los rendimientos de la síntesis significa mejor sensibilidad para el diagnóstico y mayor seguridad clínica al administrarlo al paciente. Además, si se emplea un derivado enzimático inmovilizado, se simplifican las etapas de purificación del producto en un

proceso donde el tiempo es una variable fundamental, agregando la posibilidad de reutilización del catalizador.

En trabajos previos se han abordado de forma independiente tanto la expresión heteróloga de la enzima responsable de la síntesis de SAM, denominada Metionina Adenosiltransferasa (MAT), como la radiosíntesis enzimática de [^{14}C]SAM; esto último utilizando un extracto crudo de hígado de rata que contiene a MAT, no existiendo hasta el momento una síntesis biocatalítica de [^{14}C]SAM con enzima aislada. Estos antecedentes sumados a los avances actuales en cuanto a la expresión heteróloga de enzimas, el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados y la existencia de módulos automatizados para radiosíntesis (GE Tracerlab – General Electric), que este grupo consideró potencialmente adaptables a la síntesis enzimática, permitieron postular que la radiosíntesis en un módulo automatizado de [^{14}C]SAM a partir de [^{14}C]L-Metionina y ATP, utilizando la enzima aislada, en forma soluble o inmovilizada en fase sólida, era viable.

En el marco de esta tesis se logró desarrollar biocatalizadores adecuados para la aplicación propuesta. En primer término, se clonó y expresó en *E. coli* una mutante de la metionina adenosiltransferasa (MAT), MATI303V, con mayor actividad en la síntesis de SAM. Esta enzima fue sometida a un proceso de purificación que resultó exitoso, obteniendo un rendimiento de 155 mg de proteína soluble por litro de cultivo. El desarrollo de un ensayo de actividad permitió comprobar que la enzima expresada era activa para la síntesis de SAM y evaluar parámetros cinéticos y de estabilidad. Posteriormente, se desarrolló un derivado inmovilizado de la enzima mediante una química de unión covalente irreversible (enlace tipo isourea), utilizando como soporte agarosa, obteniendo un rendimiento de inmovilización en proteínas del 71% y un 100% de actividad expresada en el derivado, lo que indica que toda la enzima fue inmovilizada en su conformación activa.

Ambos biocatalizadores, enzima soluble e inmovilizada, fueron utilizados para sintetizar

[¹¹C]SAM en un módulo automatizado, a partir de [¹¹C]L-Metionina. La metionina marcada fue sintetizada *in situ* a partir de [¹¹C]CH₃I y L-homocisteina tiolactona, mediante un proceso previamente estandarizado en CUDIM.

La [¹¹C]SAM fue obtenida en tiempos cortos (5 a 10 minutos), con un exceso diastereomérico y enantiomérico > 99% y altos rendimientos (~80%), tanto para el biocatalizador soluble como para el derivado inmovilizado. Además, se verificó que el derivado enzimático inmovilizado puede ser utilizado en varios ciclos de reuso sin perder actividad y manteniendo los rendimientos de radiosíntesis en valores aceptables para la aplicación buscada, aportando a la economía del proceso.

**Biocatalysis applied to the synthesis of radiotracers:
Synthesis of S-adenosyl methionine by biocatalytic methodologies**

Diego Umpierrez Puchalvert, Mag.

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química Universidad de la República

2023

DIRECTORS: Sonia Rodriguez Giordano, Gabriela Irazoqui Duñach

Facultad de Química, Universidad de la República

In nature, most biomolecules and natural products contain some chiral center, this being fundamental in relation to their biological activity. This situation is commonly encountered when designing drugs, with a growing interest in developing processes capable of producing optically pure drugs, given that the administration of a mixture of isomers can lead to health problems and / or economic losses.

This work seeks to offer an enzymatic alternative for the synthesis of radiotracer [^{11}C](S,S)-S-adenosylmethionine ([^{11}C]SAM), which have shown potential application in the follow-up by PET-CT of particularly aggressive prostate tumors.

The main advantage of the proposed biocatalytic strategy is that it would allow the product to be obtained at least in a diastereomerically pure form, which, in addition to improving the synthesis yields, means better sensitivity for diagnosis and greater clinical safety when administered to the patient. Moreover, if an immobilized enzyme derivative is used, the purification steps of the product are simplified in a process where time is a critical variable, adding the possibility of reuse of the catalyst.

Previous work has independently addressed both the heterologous expression of the

enzyme responsible for the synthesis of SAM, called Methionine Adenosyltransferase (MAT), and the enzymatic radiosynthesis of [^{11}C]SAM using a crude extract of rat liver containing MAT. So far, there is no biocatalytic synthesis of [^{11}C]SAM with isolated enzyme. These antecedents added to the current advances in terms of heterologous expression of enzymes, the development of immobilized biocatalysts and the existence of automated modules for radiosynthesis (GE Tracerlab – General Electric), which this group considered potentially adaptable to enzymatic synthesis, allowed to postulate that radiosynthesis of [^{11}C]SAM from [^{11}C]L-Methionine and ATP, using isolated enzyme, either in soluble or immobilized form in an automated module, was viable.

Within the framework of this thesis, it was possible to develop biocatalysts suitable for the proposed application. First, a mutant of methionine adenosyltransferase (MAT), MATI303V, with greater activity in the synthesis of SAM, was cloned and expressed in *E. coli*. This enzyme was successfully purified, obtaining a yield of 155 mg of soluble protein per liter of culture. The development of an activity test allowed to verify that the enzyme expressed was active for the synthesis of SAM, and to evaluate kinetic and stability parameters. Subsequently, an immobilized derivative of the enzyme was developed by means of an irreversible covalent binding chemistry (isourea bonding type), using agarose as support, obtaining a protein immobilization performance of 71% and 100% activity expressed in the derivative, which indicates that all the enzyme that was immobilized did it in its active conformation.

Both biocatalysts, soluble and immobilized enzyme, were used to synthesize [^{11}C]SAM from [^{11}C]L-Methionine and ATP in an automated module. Labeled methionine was synthesized *in situ* from [^{11}C]CH₃I and L-homocysteine thiolactone, by a process previously standardized in CUDIM.

The [^{11}C]SAM was obtained in short times (5 to 10 minutes), with an enantiomeric and

diastereomeric excess > 99% and high yields (~80%), both for the soluble biocatalyst and for the immobilized derivative. In addition, it was verified that the immobilized enzymatic derivative can be used in several cycles of reuse without losing activity and maintaining the radiosynthesis yields at acceptable values for the application sought, contributing to the economy of the process.

Tabla de contenido

1	Introducción y antecedentes	1
1.1	La biocatálisis y su rol en la síntesis de compuestos quirales y radiotrazadores....	1
1.1.1	Generalidades	1
1.1.2	La importancia de la síntesis estereoselectiva.....	2
1.1.3	Estrategias sintéticas en biocatálisis	4
1.1.4	Aplicaciones de la biocatálisis en la síntesis de radiotrazadores	10
1.1.5	Tomografía PET y la química del ¹¹ C.....	11
1.1.6	Rol en procesos biológicos y aplicaciones biotecnológicas de la S-adenosil metionina (SAM)	13
1.1.7	La SAM y su potencial como marcador en cáncer de próstata.....	16
1.1.8	Radiosíntesis de SAM: antecedentes globales y la experiencia en Uruguay..	19
1.1.9	Estrategia sintética propuesta para la radiosíntesis de SAM.....	22
2	Objetivos	25
2.1.1	Objetivo general.....	25
2.1.2	Objetivos específicos	25
3	CAPITULO I: Desarrollo de un derivado inmovilizado de la metionina adenosil transferasa de <i>E. coli</i>	27
3.1	Introducción	27
3.1.1	Características de la MAT y antecedentes de su producción recombinante ..	27
3.1.2	Estrategia de inmovilización elegida: Inmovilización covalente en agarosa	

utilizando CDAP	31
3.2 Materiales y métodos	35
3.2.1 Vectores y cepas utilizados	35
3.2.2 Medios de cultivo y enzimas utilizadas	36
3.2.3 Clonado de I303V MAT	37
3.2.4 Producción de células electrocompetentes y transformación por electroporación	37
3.2.5 Producción y purificación de I303V MAT	38
3.2.6 Determinación de concentración de proteínas por método de Bradford.....	41
3.2.7 Ensayo de actividad para I303V MAT soluble.....	42
3.2.8 Ensayo de estabilidad de I303V MAT soluble con el pH	44
3.2.9 Ensayos de determinación de parámetros cinéticos K_m y V_{max} de I303V MAT soluble	44
3.2.10 Inmovilización de I303V MAT en CDAP-Agarosa.....	45
3.2.11 Ensayo de actividad para el derivado I303V MAT-CDAP-Agarosa.....	46
3.3 Resultados y discusión.....	47
3.3.1 Clonado y expresión de I303V MAT	47
3.3.2 Producción y purificación de I303V MAT	48
3.3.3 Caracterización bioquímica de I303V MAT soluble.....	60
3.3.4 Diseño del biocatalizador inmovilizado I303V MAT-CDAP-agarosa.....	68
3.3.5 Inmovilización de I303V MAT en agarosa activada con CDAP	70

3.4	Conclusiones y perspectivas	73
4	CAPITULO II: Síntesis de (S,S)SAM y radiosíntesis de [¹¹ C](S,S)SAM.....	75
4.1	Introducción	75
4.1.1	Antecedentes de la síntesis de SAM	75
4.1.2	Antecedentes de la radiosíntesis de [¹¹ C](S,S)SAM.....	79
4.2	Materiales y métodos	80
4.2.1	Síntesis de S-SAM a partir de L-metionina con enzima soluble.....	80
4.2.2	Producción de [¹¹ C]CH ₃ I.....	80
4.2.3	Radiosíntesis de [¹¹ C]S-SAM a partir de [¹¹ C]L-metionina con enzima soluble 81	
4.2.4	Síntesis de S-SAM a partir de L-metionina utilizando el derivado I303V MAT- CDAP-Agarosa	84
4.2.5	Radiosíntesis de [¹¹ C]S-SAM a partir de [¹¹ C]L-metionina utilizando el derivado I303V MAT-CDAP-Agarosa empaquetado en columna	84
4.2.6	Radiosíntesis de [¹¹ C]S-SAM a partir de [¹¹ C]L-metionina utilizando el derivado I303V MAT-CDAP-Agarosa en suspensión	87
4.3	Resultados y discusión.....	90
4.3.1	Síntesis de S-SAM a partir de L-metionina con enzima soluble y estudios de enantioselectividad	90
4.3.2	Radiosíntesis de [¹¹ C]S-SAM a partir de [¹¹ C]L-metionina con enzima soluble 94	
4.3.3	Radiosíntesis de [¹¹ C]S-SAM a partir de [¹¹ C]L-metionina utilizando el	

derivado I303V MAT-CDAP-Agarosa	96
4.4 Conclusiones y perspectivas	108
5 Conclusiones generales y perspectivas	110
6 Referencias Bibliográficas	112
7 Anexos.....	123
7.1 Curva de calibración para cuantificación de proteínas por el método de Bradford 123	
7.2 Curva de calibración para ensayo de actividad por HPLC.....	124
7.3 Secuencia de pET28a_I303VMAT.....	124

Índice de tablas

Tabla 1. Estrategias de inmovilización. Resumen de características.	8
Tabla 2. Genotipos de las cepas de <i>E. coli</i> utilizadas	35
Tabla 3. Condiciones de crecimiento e inducción de la expresión de I303V MAT.....	49
Tabla 4. Variaciones ensayadas para la lisis química/enzimática	51
Tabla 5. Cuadro de purificación de I303V MAT mediante IMAC	59
Tabla 6. Actividad y concentración de proteína para tres lotes de I303V MAT producidos según los métodos propuestos.	59
Tabla 7. Valores de Km y Vmax obtenidos para ATP.....	62
Tabla 8. Valores de Km y Vmax obtenidos para L-Metionina.....	65
Tabla 9. Inmovilización de I303V MAT en CDAP-agarosa.....	72
Tabla 10. Ensayos dirigidos a optimizar la relación de sustratos y el agregado de cofactores para favorecer la síntesis de SAM (extraída de Chen et al. 2016).....	78
Tabla 11. Tabla comparativa de síntesis enzimática de [¹⁴ C](S,S)SAM	103
Tabla 12. Pruebas de reusos del derivado inmovilizado	107

Índice de Figuras

Figura 1. Principales compuestos secundarios generados a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ y $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ (extraída del <i>Handbook of Radiopharmaceuticals: Methodology and Applications</i>).....	13
Figura 2. (S,S)-S-Adenosil metionina	14
Figura 3. Principales reacciones donde se utiliza SAM como fuente de grupos químicos (Extraído de Fontecave <i>et al.</i> , 2004).....	15
Figura 4. Acumulación de (S,S)SAM en cáncer de próstata	19
Figura 5. Síntesis de $[^{11}\text{C}]\text{S}$ -adenosil metionina actualmente realizada en CUDIM.....	21
Figura 6. Propuesta de radiosíntesis enzimática de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$	24
Figura 7. A) MAT según estructura cristalina 1rg9 coloreada por subunidad en representación de estructuras secundarias B) idem A rotada 90° C) MAT según estructura cristalina 1rg9 coloreada por subunidad representación de superficie D) idem C rotada 90°.	28
Figura 8. A) Sitio activo de MAT interaccionando con SAM. B) Posición del residuo aminoácido Isoleucina 303 con relación al sitio activo de MAT.....	29
Figura 9. Estructura de la agarosa (figura extraída de Zucca, 2016).....	31
Figura 10. Formación de grupos cianatoéster en agarosa con CNBr	32
Figura 11. Tetrafluoro borato de 1-ciano-4-(dimetilamino)piridinio (CDAP).....	33
Figura 12. activación de lechos de agarosa con CDAP	33
Figura 13. formación de derivados unidos por enlaces isourea	34
Figura 14. Mapa de la construcción pET28a_I303VMAT, incluyendo la mutación necesaria para obtener la enzima I303V MAT.....	48
Figura 15. SDS-PAGE. Fracciones solubles: carril 1: condición 1, t _r ; carril 2: condición 2, t ₀ ; carril 3: condición 2, t _r ; carril 4: condición 3, t ₀ ; carril 5: condición 3, t _r . Fracciones insolubles:	

carril 1': condición 1, t_f ; carril 2': condición 2, t_0 ; carril 3': condición 2, t_f ; carril 4': condición 3, t_0 ; carril 5': condición 3, t_f . t_0 : tiempo cero de inducción t_f : tiempo final.....	50
Figura 16. PAGE-SDS de las etapas de purificación de I303V MAT mediante IMAC.....	52
Figura 17. Primera curva de calibración fosfato para verde de malaquita-molibdato	54
Figura 18. Resultados obtenidos al querer replicar la curva de calibración para verde de malaquita-molibdato.....	55
Figura 19. Gráfico de velocidades iniciales para el ensayo de actividad de MAT	56
Figura 20. Visualización de los residuos de His (azul) superficiales en MAT.	57
Figura 21. Gráfico de linealización de Lineweaver-Burk para determinar K_m^{ATP} y V_{max}^{ATP}	61
Figura 22. Gráfico para determinación de K_m^{ATP} y V_{max}^{ATP} por método directo	61
Figura 23. Velocidad de formación de SAM en función de la concentración de sustrato. .	62
Figura 24. Gráfico de linealización de Lineweaver-Burk para determinar K_m^{L-Met} y V_{max}^{L-Met}	63
Figura 25. Gráfico para determinación de determinar K_m^{L-Met} y V_{max}^{L-Met} por método directo.....	64
Figura 26. Velocidad de formación de SAM en función de la concentración de sustrato. .	64
Figura 27. Ensayos de estabilidad de I303V MAT con el pH.....	67
Figura 28. Visualización de los residuos aminoacídicos de la superficie de I303V MAT....	69
Figura 29. Gráfico de Velocidades iniciales para el derivado I303VMAT_CDAPagarosa .	71
Figura 30. Mecanismo de síntesis de SAM catalizada por MAT (figura extraída de Komoto, 2004).....	76
Figura 31. Configuración del módulo para radiosíntesis de $[^{11}C]$ SAM utilizando I303VMAT soluble. 1 – Trampa de Ioduro de metilo: final de la síntesis en fase gaseosa; 2 – Cartucho C18: síntesis de $[^{11}C]$ L-metionina; 3 – Vial 6: contiene buffer para eluir $[^{11}C]$ L-metionina; 4 –	

Vial de dos bocas: síntesis enzimática de [¹¹ C]SAM; 5 – Vial final.....	83
Figura 32. Configuración del módulo para radiosíntesis de [¹¹ C]SAM utilizando I303VMAT inmovilizada empaquetada en columna. 1 – Trampa de Ioduro de metilo: final de la síntesis en fase gaseosa; 2 – Cartucho C18: síntesis de [¹¹ C]L-metionina; 3 – Vial 6: contiene buffer para eluir [¹¹ C]L-metionina; 4 – Columna con enzima inmovilizada: síntesis enzimática de [¹¹ C]SAM; 5 – Vial final.....	86
Figura 33. Configuración del módulo para radiosíntesis de [¹¹ C]SAM utilizando I303VMAT inmovilizada en suspensión. 1 – Trampa de Ioduro de metilo: final de la síntesis en fase gaseosa; 2 – Cartucho C18: síntesis de [¹¹ C]L-metionina; 3 – Vial 2: contiene buffer para eluir [¹¹ C]L-metionina; 4 – Balón de reacción: síntesis enzimática de [¹¹ C]SAM con derivado inmovilizado en suspensión. Agitación magnética; 5 – filtro para retener derivado inmovilizado; 6 – Vial final.	89
Figura 34. Cromatograma HPLC. Negro: síntesis de SAM con enzima soluble (0.7 UE/mL I303VMAT, 10 mM ATP, 10mM L-Met, 20 minutos de reacción). Verde: Estándar comercial de SAM.....	91
Figura 35. Cromatograma HPLC. Negro: síntesis de SAM con enzima soluble (7 UE/mL I303VMAT, 0.134 mM ATP, 0.134 mM L-Met, 20 minutos de reacción). Verde: Estándar comercial de SAM.	92
Figura 36. Formación de SAM a partir de L-Met vs D-Met. Confirmación de condición de velocidades iniciales.....	93
Figura 37. Cromatogramas HPLC radiosíntesis de [¹¹ C]SAM con enzima soluble. Negro: detector UV $\lambda = 254$ nm (señal amplificada). Naranja: detector Gamma.....	95
Figura 38. Adaptación para utilizar el derivado inmovilizado en columna. a) adaptador confeccionado por impresión 3D que se coloca en la parte superior de la PD-2, b) ajuste del adaptador a la salida del cartucho C18 c) 1- sistema completo dentro del módulo 2-	

Ampliación de modificaciones.	97
Figura 39. Cromatograma HPLC radiosíntesis de [¹¹ C]SAM con derivado inmovilizado I303V MAT-CDAP-Agarosa en columna. Negro: detector Gamma; Verde: detector UV; Azul: Estándar de SAM, detector UV	99
Figura 40. Adaptación para uso del derivado inmovilizado en suspensión con agitación magnética.....	101
Figura 41. Cromatograma HPLC de radio síntesis de (S,S)[¹¹ C]SAM con derivado enzimático inmovilizado en batch con agitación. Naranja: crudo de reacción, detector gamma; Verde: crudo de reacción, detector UV; Azul: Estándar de SAM, detector UV..	102
Figura 42. % de Rendimiento de marcación (MeI, ndc) de [¹¹ C]SAM obtenidos a tiempo de síntesis 5 minutos. A: Enzima soluble; B: 1.0 g de derivado; C: 0.3 g de derivado; D: Síntesis clásica	105

Índice de abreviaturas

[¹¹C]SAM: S-Adenosil metionina marcada

MAT: Metionin-adenosiltransferasa

CUDIM: Centro Uruguayo de Imagenología Molecular

e.e.: exceso enantiomérico

d.e.: exceso diasteromérico

SPECT: Tomografía computarizada por emisión de fotón único

PET: Tomografía por emisión de positrones

CT: Tomografía computarizada

PSMA: antígeno de membrana específico de la próstata

FDG-PET: Tomografía por Emisión de Positrones con ¹⁸F-**fluorodeoxiglucosa**

GNMT: glicina N-metiltransferasa

CDAP: tetrafluoro borato de 1-ciano-4-(dimetilamino)piridinio

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

LB: Medio Luria-Bertani

AIM: Medio de autoinducción

IMAC: Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados

1 Introducción y antecedentes

1.1 La biocatálisis y su rol en la síntesis de compuestos quirales y radiotrazadores

1.1.1 Generalidades

Hace más de un siglo, Rosenthaler sintetizó (*R*)-mandelo-nitrilo a partir de benzaldehído y cianuro de hidrógeno utilizando un extracto vegetal que contenía una hidroxinitrilo liasa (Rosenthaler, 1908; Yi et al., 2021), abriendo la puerta a un campo de investigación completamente nuevo: la biocatálisis. Durante los siguientes cien años, esta área se desarrolló rápidamente, avanzando desde el uso de extractos crudos a enzimas purificadas y luego a sistemas de enzimas recombinantes (Yi et al., 2021). La biocatálisis cumple un importante rol en la síntesis orgánica moderna, tanto en el mundo académico como en las industrias química y farmacéutica. Durante los últimos 20 años, los procesos sintéticos que incorporan pasos enzimáticos han permitido la síntesis total de varios compuestos. En la actualidad, una amplia gama de reacciones químicas (por ejemplo, reacciones redox, de sustitución, de adición, de eliminación, reordenamientos y reacciones pericíclicas) pueden llevarse a cabo mediante biocatálisis. La ampliación de este abanico de reacciones se debe a la disponibilidad de herramientas modernas para el descubrimiento de enzimas, junto con el desarrollo de técnicas para la optimización de los biocatalizadores. Revisiones bibliográficas recientes ponen en evidencia la vasta gama de enzimas que han sido descubiertas, incluyendo, oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas, generando así un abanico de opciones disponibles para síntesis orgánica (Bell et al., 2021; Patel, 2008, 2018; Sheldon & Woodley, 2017; Yi et al., 2021).

En la actualidad es posible diseñar un biocatalizador a medida, por medio de

estrategias de mutagénesis racional, semi-racional o de evolución dirigida. Asimismo, la disponibilidad creciente de secuencias genómicas, así como proteicas, abre un enorme potencial en el área de la biocatálisis. Para ordenar la enorme cantidad de información sobre enzimas y sus potenciales aplicaciones, en la actualidad existen bases de datos de secuencias de ADN y proteínas, por ejemplo, la mantenida por la National Center for Biotechnology Information (NCBI), que además integra herramientas de búsqueda como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que permite optimizar parámetros de búsqueda. Existen, además, otras bases de datos que ofrecen un análisis más profundo de las secuencias, estructuras o familias, como UniProt e InterPro o Pfam (Altschul, 1997; Bateman et al., 2023; Bell et al., 2021; Mistry et al., 2021; Paysan-Lafosse et al., 2023; Sayers et al., 2022). Adicionalmente, desde el punto de vista de la catálisis, son útiles bases de datos como Reaxys y SciFinder, que integran información relacionada a las condiciones de reacción, rango de sustratos, porcentaje de conversiones e información analítica, entre otros factores a considerar cuando se está desarrollando una estrategia sintética; mientras tanto bases de datos como BRENDA y KEGG contienen información sobre la especificidad natural de sustrato, parámetros cinéticos y secuencias proteicas (Bell et al., 2021).

1.1.2 La importancia de la síntesis estereoselectiva

La quiralidad de un compuesto es de fundamental importancia en relación con su actividad biológica dado que los sistemas biológicos interactúan en forma muy distinta con los diferentes estereoisómeros. Los antecedentes en la síntesis de fármacos racémicos con un enantiómero nocivo para el ser humano son varios (Smith, 2009), y existe un interés creciente en desarrollar procesos capaces de producir fármacos ópticamente puros. Además de los problemas relacionados con

la salud del paciente, la producción de un isómero inactivo o con baja actividad genera pérdidas económicas. Algunos organismos reguladores como la Food and Drug Administration (FDA, EE.UU.), recomiendan que todas las nuevas drogas quirales sean vendidas como un solo enantiómero, planteando mayores controles para los fármacos racémicos. Por estos motivos, resulta de gran importancia contar con técnicas que permitan sintetizar selectivamente un único isómero óptico entre los posibles de un compuesto quiral (Patel, 2008).

Los compuestos ópticamente puros pueden ser producidos tanto por métodos químicos como enzimáticos. Los biocatalizadores en general ofrecen varias ventajas sobre la síntesis química: i) las enzimas presentan una quimio y regioselectividad muy destacada y elevado poder catalítico; ii) han evolucionado para actuar bajo condiciones fisiológicas (temperaturas cercanas a la ambiente y presión atmosférica); iii) son catalizadores quirales muy sofisticados que en la mayoría de los casos generan productos ópticamente puros. Por lo tanto, estas propiedades de las enzimas permiten sintetizar compuestos a través de biosíntesis rápidas y selectivas, que no requieren de pasos de protección y desprotección de grupos funcionales, además de minimizar la formación de productos no deseados por descomposición, isomerización, racemización, epimerización o rearrreglos; previniendo la formación de mezclas racémicas. Además, estos procesos son de muy bajo impacto ambiental. La biocatálisis proporciona una tecnología que es ambientalmente más segura y reduce efectivamente el nivel de desechos e incluso en algunos casos elimina la generación de los mismos, en lugar de la remediación y eliminación al final del proceso (Patel, 2008, 2018). Estos parámetros se alinean con varios principios de la Química Verde, en particular destacan los principios de prevención, economía atómica, síntesis menos peligrosas, diseño de compuestos más seguros, solventes y auxiliares más seguros y catálisis (Anastas & Eghbali, 2009).

1.1.3 Estrategias sintéticas en biocatálisis

Como se mencionó anteriormente, debido a sus excelentes propiedades funcionales (actividad, selectividad, especificidad), las enzimas son capaces de catalizar, en condiciones muy suaves de reacción, modificaciones muy rápidas y específicas. Por lo tanto, las enzimas pueden ser excelentes catalizadores en muchas áreas de la industria química (Guisan, 2013).

Existen varias estrategias para realizar una síntesis mediante biocatálisis, la elección de cuál es la más adecuada va a depender fundamentalmente de la aplicación y de las características particulares de la enzima a utilizar. Pueden emplearse células enteras, extractos enzimáticos crudos o enzimas purificadas solubles o inmovilizadas (Bell et al., 2021).

1.1.3.1 Biocatálisis con célula entera

Los estudios con células enteras son generalmente el primer paso en la búsqueda de nuevas enzimas con aplicaciones biocatalíticas. En comparación con las otras estrategias, en muchos casos la biocatálisis con célula entera ha demostrado ser un método más simple e igualmente efectivo para obtener altos rendimientos y excesos enantioméricos (*e.e.*) en la síntesis de compuestos bioactivos (Lin & Tao, 2017). Se pueden utilizar células que expresen la enzima de interés de forma nativa, o células recombinantes, donde previamente se introdujo la información genética necesaria para expresar la o las enzimas de interés de forma heteróloga (Faber, 2018).

En términos generales, los procesos que tienen lugar mediante el empleo de células enteras como biocatalizadores se pueden diferenciar en dos tipos: aquellos donde la síntesis del producto de interés tiene lugar en forma concomitante al crecimiento celular, como las fermentaciones, y aquellos donde se realiza primero una etapa de

crecimiento celular, dando lugar a la expresión de las enzimas necesarias para la catálisis, y posteriormente se utilizan estas células en estado de reposo para realizar la biotransformación del sustrato de interés (Lin & Tao, 2017).

Las principales ventajas de la biocatálisis con célula entera son la capacidad de utilizar materias primas baratas y abundantes, evitando los costos asociados al aislamiento de la enzima y en algunos casos al agregado de cofactores, los que son reciclados por la maquinaria celular. Asimismo, existe la posibilidad de realizar transformaciones sucesivas con un mismo microorganismo que expresa más de una actividad enzimática. Además, la presencia y naturaleza de la envoltura celular ayuda a estabilizar las enzimas y puede permitir su uso en condiciones de reacción adversas. La proximidad de los reactivos y los catalizadores, así como la presencia intrínseca de cofactores y sus sistemas de regeneración, mejora en gran medida la eficiencia del biocatalizador (Lin & Tao, 2017).

Como desventajas de esta estrategia pueden mencionarse la inhibición por parte de sustratos o productos, la ocurrencia de reacciones no deseadas catalizadas por otras enzimas, la presencia en el crudo de reacción de subproductos metabólicos y la membrana celular que puede dificultar la extracción de los productos, afectando el rendimiento. Además, el escalado de los procesos suele ser dificultoso y es necesario contar con experiencia en microbiología e instalaciones adecuadas para trabajar de forma aséptica (Garzón-Posse et al., 2018; Lin & Tao, 2017).

1.1.3.2 Biocatálisis con enzimas purificadas solubles e inmovilizadas

El uso de extractos enzimáticos purificados está ampliamente extendido en los laboratorios de investigación, dado que permite caracterizar enzimas de forma directa, sin la potencial presencia de inhibidores o interferencias en el medio de

reacción. Sin embargo, muchas veces la aplicación industrial de enzimas solubles no puede llevarse a cabo, dado que la solubilidad de las enzimas en medios acuosos hace difícil y costosa su recuperación del medio de reacción, impidiendo su reutilización y contaminando el producto final. Si bien existen herramientas (como la ultrafiltración) que podrían facilitar la separación de la enzima, suelen ser métodos complejos y costosos (Lin & Tao, 2017; Sheldon & Pereira, 2017).

Para superar este inconveniente, una alternativa que se ha implementado es la inmovilización de enzimas, que se define como el confinamiento o localización de una enzima en una región definida del espacio con retención de su actividad catalítica. La inmovilización genera un catalizador heterogéneo, que permite su recuperación del medio de reacción y posterior reutilización, simplificando el proceso, obteniendo un producto de mayor calidad en cuanto a su pureza, en muchos casos con mejores rendimientos, generando una menor huella ambiental y reduciendo sustancialmente los costos. Además, en algunos casos, el biocatalizador generado presenta una mejora en sus propiedades, en comparación con su contraparte soluble (Brena et al., 2013; Federsel et al., 2021; Guisan, 2013; Rodrigues et al., 2021).

La inmovilización de enzimas también presenta potenciales riesgos o desventajas que deberán ser tenidos en cuenta a la hora del desarrollo y aplicación de un nuevo derivado inmovilizado. Por ejemplo, el proceso puede provocar una pérdida de actividad de la enzima, por modificación de la conformación nativa de la proteína a raíz de la interacción con el soporte. Además, el proceso de inmovilización y el tipo de soporte utilizados incrementan el costo del catalizador, por lo que se deberán ponderar estos costos en función de los beneficios que aporte el uso del derivado inmovilizado. Otro factor por considerar es la posible existencia de problemas difusionales que dificulten el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima, fruto

de la disposición espacial de la misma sobre el soporte y también de la porosidad de este último (Brena et al., 2013; Castilla Arboleya et al., 2022).

En general, las estrategias de inmovilización de enzimas se pueden clasificar en tres tipos: entrecruzamiento (unión de las moléculas de enzimas empleando un reactivo bifuncional), entrapamiento o encapsulación (confinamiento físico de la enzima en una red polimérica usando matrices poliméricas orgánicas o inorgánicas) y unión de la enzima a un soporte sólido. Cada una presenta ventajas y desventajas, sin embargo, es difícil hacer comparaciones directas, dado que las características propias de la enzima, la estrategia de inmovilización y la configuración del reactor influyen significativamente en el rendimiento del proceso. En la Tabla 1 se resumen algunas características de las principales estrategias de inmovilización (Brena et al., 2013; Homaei et al., 2013; Thompson et al., 2019).

En particular, la inmovilización por unión a soportes sólidos es ampliamente utilizada; las estrategias para llevar a cabo este tipo de inmovilización se pueden clasificar, según la naturaleza de la unión generada, en no covalentes y covalentes. En el caso de las primeras, la unión puede ser por adsorción física, por ejemplo, a través de interacciones hidrofóbicas, iónicas o de Van Der Waals y resultan de gran utilidad en procesos donde interesa eventualmente poder desorber a la enzima de la matriz (Brena et al., 2013).

Tabla 1. Estrategias de inmovilización. Resumen de características.

TIPO DE INMOVILIZACIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS	APLICACIONES
Inmovilización covalente irreversible	<ul style="list-style-type: none"> - Alta fuerza de unión al soporte. - Obtención de productos libres de enzima. - Si es multipuntual, aporta estabilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> - No es posible regenerar el soporte. - Puede existir cierta pérdida de actividad enzimática, fruto de la interacción con el soporte. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ampliamente utilizado en la inmovilización de anticuerpos y enzimas de varias clases. - Procesos sintéticos donde interesa obtener un producto libre de enzima.
Inmovilización covalente reversible (formación de enlaces disulfuro)	<ul style="list-style-type: none"> - Posibilita la regeneración del soporte. - Usualmente, alto rendimiento de inmovilización 	<ul style="list-style-type: none"> - Restringido a la presencia de grupos tiol reactivos en la superficie, no involucrados en la actividad de la enzima. 	<ul style="list-style-type: none"> - Inmovilización de enzimas lábiles.
Adsorción a soportes (interacción no covalente)	<ul style="list-style-type: none"> - Posibilita la regeneración del soporte. - Posibilita la inmovilización <i>in situ</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Relativamente baja selectividad. - Fácil desorción de la enzima durante el uso (<i>leakage</i>). 	<ul style="list-style-type: none"> - Inmovilización de enzimas lábiles. - Purificación de proteínas utilizando columnas cromatográficas (ej. IMAC, intercambio iónico).
Entrecruzamiento	<ul style="list-style-type: none"> - No requiere soporte. - Simple. 	<ul style="list-style-type: none"> - Derivados gelatinosos. Dificil uso. - Difusión de sustrato a la enzima restringida 	<ul style="list-style-type: none"> - Se utiliza en combinación con otros métodos (entrapamiento, adsorción) para reducir la perdida de enzima.
Entrapamiento	<ul style="list-style-type: none"> - No se altera la superficie de la enzima. - Aporta estabilidad térmica y mecánica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Difusión del sustrato a la enzima restringida 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicable a la mayoría de las enzimas y anticuerpos. Desarrollo de biosensores.

A los efectos de esta tesis, resulta interesante ahondar en el estudio de metodologías de inmovilización que aseguren la estabilidad de la unión entre la enzima y el soporte, por lo que se abordará con mayor detalle estrategias que involucren uniones estables y fuertes, como lo son los enlaces covalentes, que por su naturaleza disminuyen la posibilidad de liberación de enzima al medio de reacción, lo que resulta de gran interés cuando se busca obtener un producto final libre de enzima (Brena et al., 2013; Reis et al., 2019).

Inmovilizar covalentemente una enzima implica la reacción entre los grupos funcionales presentes en un soporte (ya sea de forma natural o generados mediante modificación química), con grupos funcionales de los residuos aminoacídicos de la enzima, por ejemplo, las cadenas laterales de los aminoácidos lisina (grupo ϵ -amino), cisteína (grupo tiol) y ácidos aspártico y glutámico (grupo carboxilo) o a través de grupos funcionales agregados químicamente a la superficie de la enzima, por ejemplo, por tiolación, reducción de enlaces disulfuro u oxidación de azúcares en glicoproteínas, entre otros. Por lo anterior, la elección de la química de unión entre la enzima y el soporte va a estar condicionada por las características de la superficie de la enzima (Brena et al., 2013). Las estrategias más comunes implican químicas basadas en la generación de enlaces del tipo isourea o bases de Schiff reducidas para uniones del tipo covalente irreversible y formación de enlaces disulfuro para uniones covalentes reversibles (Brena et al., 2013; Reis et al., 2019).

Como se dijo anteriormente la inmovilización de una enzima puede generar mejoras en sus propiedades, por ejemplo, en cuanto a la estabilidad o a su performance en presencia de inhibidores, entre otros (Guisan, 2013). En cuanto a la inmovilización covalente, es destacable que una unión multipuntual entre la matriz y la enzima, puede generar estabilización de la proteína, principalmente estabilización térmica (Reis et al., 2019; Rodrigues et al., 2021).

1.1.4 Aplicaciones de la biocatálisis en la síntesis de radiotrazadores

La biocatálisis tiene un gran potencial para la radiosíntesis de moléculas biológicamente activas, marcadas con emisores de positrones de vida media corta, para su uso en tomografía por emisión de positrones.

Además de las ventajas ya mencionadas de la síntesis enzimática sobre la síntesis tradicional, las enzimas están diseñadas para trabajar en condiciones fisiológicas, donde la concentración de los metabolitos está estrechamente regulada y rara vez se encuentra en exceso. Este escenario se asemeja a las condiciones de la radiosíntesis, donde la concentración de los precursores radiactivos es extremadamente baja (da Silva et al., 2018). Los radiotrazadores son administrados por vía parenteral y por lo tanto deben estar libres de pirógenos. Varias estrategias biosintéticas se han realizado con enzimas solubles, que pueden convertirse en una fuente potencial de proteínas pirógenas; en consecuencia, la presencia de dichos contaminantes requiere un proceso de purificación que insume mucho tiempo. Como fuera mencionado anteriormente, este problema se puede solucionar inmovilizando las enzimas sobre soportes sólidos a través de enlaces covalentes e irreversibles que evitan la liberación de proteínas al medio y permiten la integración de enzimas en reacciones de flujo continuo (da Silva et al., 2018; Kilbourn & Scott, 2021).

Si bien existen reportes del uso de enzimas en radiosíntesis, a la fecha es un campo que ha sido poco explorado. Un ejemplo es la síntesis enzimática de una batería de aminoácidos marcados con nitrógeno-13 que fueron generados utilizando amoníaco ($[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$) como precursor radiactivo. Para esto se emplearon diferentes estrategias enzimáticas: (i) utilizando aminoácido deshidrogenasas, (ii) empleando aminoácido sintetetasas o (iii) realizando una reacción multienzimática que involucra una aminoácido deshidrogenasa y posteriormente una aminotransferasa (Kilbourn & Scott, 2021).

Por otro lado, durante las últimas dos décadas del siglo XX, la biocatálisis ha sido relevante en el desarrollo de la radioquímica del ^{11}C . En este caso se han utilizado precursores marcados, obtenidos a partir de la derivatización química de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ y de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$, por ejemplo $[^{11}\text{C}]$ cianuro de hidrógeno, $[^{11}\text{C}]$ acetato, $[^{11}\text{C}]$ metanol, $[^{11}\text{C}]$ ioduro de metilo, $[^{11}\text{C}]$ propionato y $[^{11}\text{C}]$ carbonato. A través de la biocatálisis y utilizando los precursores antes citados, ha sido posible incorporar ^{11}C en más de 50 blancos biológicos (da Silva et al., 2018; Kilbourn & Scott, 2021). Entre estos precursores, resulta relevante para este trabajo el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ que, si bien no puede ser utilizado directamente por enzimas, puede ser incorporado fácilmente a $[^{11}\text{C}]\text{D,L-Alanina}$ y $[^{11}\text{C}]\text{L-Metionina}$ por métodos químicos; y estos ser enzimáticamente transformados en otros compuestos de interés como otros aminoácidos y biomoléculas, que se han aplicado en clínica para evaluar su biodistribución (da Silva et al., 2018).

1.2 Tomografía PET y la química del ^{11}C

La tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica de imagenología molecular no invasiva que se utiliza para estudiar y visualizar la fisiología humana mediante la detección de sondas marcadas con radionucleidos emisores de positrones. En la actualidad, se ha convertido en una herramienta invaluable para el diagnóstico y pronóstico de patologías relevantes en nuestra sociedad. Además de su aplicación en el área clínica, la PET tiene un rol preponderante en la evaluación farmacocinética de nuevos fármacos y agentes terapéuticos, así como en la investigación de los mecanismos moleculares subyacentes a diferentes patologías (da Silva et al., 2018).

Dado que algunos de los radionucleidos emisores de positrones utilizados en PET son elementos que comúnmente se encuentran en las biomoléculas (como C, O o N) o elementos de baja masa atómica como el F, es posible marcar directamente las moléculas de interés

sin interferir con su actividad biológica. Esta capacidad diferencia al PET de otras técnicas, como la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), que utilizan radionucleidos de alta masa atómica, que al ser integrados a biomoléculas pueden modificar su actividad biológica. En función de sus semividas de desintegración, los elementos más utilizados son el ^{18}F y el ^{11}C ; que presentan semividas de desintegración relativamente largas (109,8 min y 20,4 min respectivamente) en comparación con las de otros emisores de positrones como el ^{15}O y ^{13}N (2.04 y 9.97 min respectivamente) (Kilbourn & Scott, 2021).

A los efectos de esta tesis resulta interesante profundizar el estudio de la química del ^{11}C . El ^{11}C es un radionucleido emisor de positrones importante para marcar moléculas de interés biológico debido a que presenta una química versátil, permitiendo obtener de forma relativamente fácil diferentes precursores que amplían las posibilidades de síntesis; además, como fuera mencionado anteriormente, el C tiene la ventaja de ser parte integral de las biomoléculas y los fármacos. El ^{11}C actualmente se obtiene por irradiación de protones sobre átomos de ^{14}N , que emiten una partícula α para dar ^{11}C , según la reacción nuclear $^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)^{11}\text{C}$, en un ciclotrón. Los dos principales precursores de ^{11}C utilizados en la síntesis son $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ y $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$. En la Figura 1, extraída del *Handbook of Radiopharmaceuticals: Methodology and Applications*, se muestran los principales compuestos generados a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ y $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$, siendo de particular interés para esta tesis el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ (Boschi & Lodi, 2016; Kilbourn & Scott, 2021).

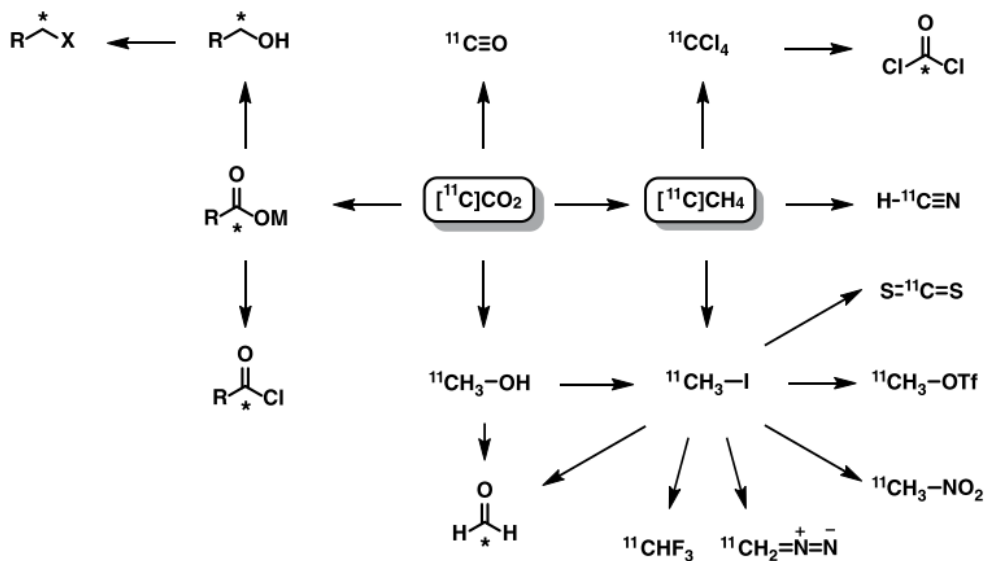


Figura 1. Principales compuestos secundarios generados a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ y $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ (extraída del *Handbook of Radiopharmaceuticals: Methodology and Applications*. En las moléculas donde figura *, este señala el carbono marcado)

1.3 Rol en procesos biológicos y aplicaciones biotecnológicas de la S-adenosil metionina (SAM)

La S-adenosil metionina (Figura 2) es un importante intermediario metabólico, que existe en casi todos los organismos vivos y desempeña funciones fundamentales en varias reacciones biológicas. La síntesis de SAM ocurre a partir de metionina y adenosina trifosfato (ATP), especialmente en hígado de mamíferos, catalizada por la metionina adenosiltransferasa (MAT).

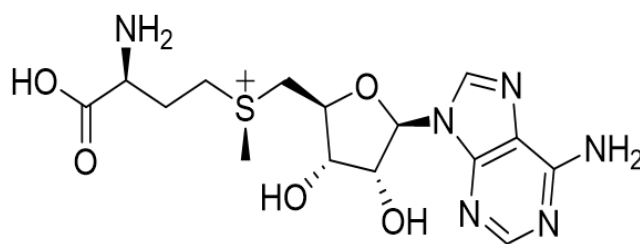


Figura 2. (*S,S*)-S-Adenosil metionina

Luego del ATP, la SAM es el sustrato más ampliamente utilizado por enzimas ya que es el donador de metilos por excelencia en la gran mayoría de las reacciones de metilación que tienen lugar en los organismos vivos. También participa en reacciones donde actúa como dador de grupos metileno, amino, ribosilos y amino-alquilos (en la síntesis de poliaminas), entre otros. (Chen et al., 2016; Fontecave et al., 2004; Grillo & Colombatto, 2007; Yu & Zhu, 2017) Aunque las reacciones mencionadas presentan alta diversidad química, en general el rol de la SAM puede atribuirse al fuerte carácter electrofílico de los carbonos adyacentes al ion sulfonio (Fontecave et al., 2004).

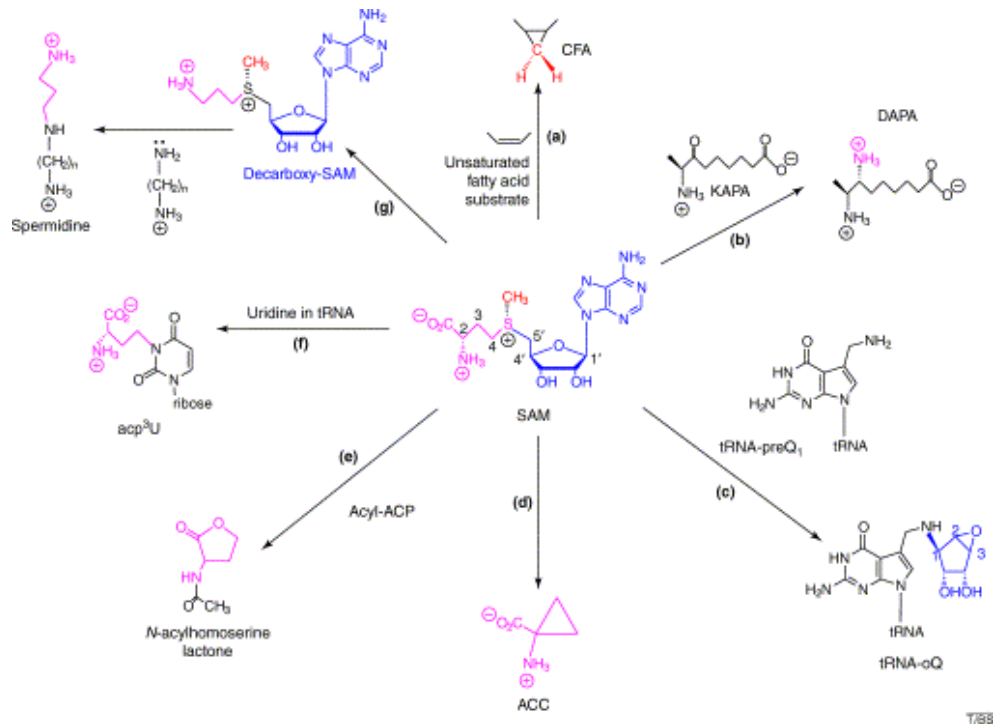


Figura 3. Principales reacciones donde se utiliza SAM como fuente de grupos químicos. Las enzimas correspondientes son: (a) ácido graso ciclopropano (CFA) sintasa, la molécula olefínica representa un sustrato de ácidos grasos insaturados; b) ácido 7,8-diaminopelargónico (DAPA) sintasa; c) SAM-ARNt ribosiltransferasa-isomerasa (QueA); d) ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) sintasa; e) Acilhomoserina lactona sintasa; proteína transportadora de acilo (ACP); f) 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina (Acp3U) sintasa; g) SAM descarboxilasa; espermidina sintasa. (Extraído de Fontecave *et al.*, 2004).

La Figura 3, extraída de Fontecave *et al.*, 2004, resume las reacciones donde se utiliza SAM como cosustrato (Chen *et al.*, 2016; Fontecave *et al.*, 2004).

En particular, la metilación juega un papel fundamental en la regulación de procesos a nivel celular, son ejemplos de esto la regulación de la expresión génica y la regulación de la actividad de hormonas, neurotransmisores y sistemas de transducción de señal. La desregulación del metabolismo de SAM se ha evidenciado en pacientes con patologías neurológicas y hepáticas (Fontecave *et al.*, 2004; Yu & Zhu, 2017).

La SAM presenta propiedades farmacológicas interesantes y se ha estudiado su uso en el

tratamiento de la fibromialgia, osteoartritis, depresión y el mal de Alzheimer. (Yu & Zhu, 2017) Esto ha promovido la investigación de metodologías de producción de SAM a gran escala, pudiendo realizarse mediante síntesis química o catálisis enzimática, ya sea utilizando enzima soluble, inmovilizada o célula entera en fermentador (Cao et al., 2012; Chen et al., 2016; Choi et al., 2009; P. R. Deshpande et al., 2005; Detchanamurthy et al., 2010; Hu et al., 2009; Niu et al., 2017; Senthilkumar et al., 2006; Yin et al., 2017; Yu & Shen, 2012; Yu & Zhu, 2017). La síntesis química ha sido abandonada porque implica condiciones de reacción drásticas, tiene bajo rendimiento, es nociva para el medio ambiente y presenta problemas para la purificación del compuesto de interés. Por otro lado, la síntesis enzimática resulta una alternativa que soluciona casi todas las desventajas de la síntesis clásica (genera productos de alta pureza, relativamente fáciles de purificar y con bajo impacto ambiental); a su vez, si se utilizan estrategias de inmovilización de la enzima o ingeniería enzimática, mejora la estabilidad y el reciclaje de la enzima (Chen et al., 2016; Chu et al., 2013). La mayor desventaja de la metodología enzimática es el uso de ATP como sustrato, dado que es un compuesto de alto costo (Chen et al., 2016).

1.4 La SAM y su potencial como marcador en cáncer de próstata

El cáncer de próstata es una enfermedad que afecta a millones de hombres a nivel mundial, predominantemente en países desarrollados o en vías de desarrollo. En nuestro país esta situación se replica. De acuerdo con la información difundida por el Ministerio de Salud Pública, las muertes por cáncer constituyen un cuarto (25%) del total de las defunciones registradas anualmente y el cáncer de próstata es uno de los más frecuentes. En particular, el cáncer de próstata es el cáncer con mayor incidencia en hombres (58.85 casos cada 100000 habitantes). Los pacientes que cursan la enfermedad localizada, con un riesgo de recurrencia bajo o intermedio, presentan una supervivencia del 99% durante 10 años, si la

enfermedad se detecta y trata en una etapa temprana. Por lo antedicho, uno de los principales objetivos de las investigaciones actuales en materia de cáncer de próstata es el mejorar las herramientas de detección (Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, 2021; Rebello et al., 2021).

A pesar de los numerosos avances realizados en los últimos 15 años en la detección de cáncer de próstata primario y metastásico, actualmente la imagenología no se recomienda de forma rutinaria para la detección y estadificación del cáncer de próstata. Se ha encontrado que las técnicas de imagenología tradicionales, como la tomografía computarizada (CT) y la tomografía por emisión de positrones con fluorodesoxiglucosa (FDG-PET), tienen una eficacia limitada para detectar y estadificar cáncer de próstata. A raíz de esto, se han desarrollado nuevos radiotrazadores específicos para cáncer de próstata, por ejemplo, ^{11}C -colina, ^{18}F -fluciclovina y ligandos radiomarcados de la molécula pequeña de antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), por ejemplo, ^{68}Ga -PSMA-11. Si bien existen estudios prometedores con respecto al uso de ^{11}C -colina y ^{18}F -fluciclovina, con frecuencia el PSMA ha demostrado ser superior, en especial en la detección de tumores extraprostáticos (Niaz et al., 2021).

En 2020 la FDA aprobó el primer radiotrazador basado en PSMA, el ^{68}Ga -PSMA-11 y a la fecha existen dos radiotrazadores basados en este compuesto (*FDA Approves First PSMA-Targeted PET Imaging Drug for Men with Prostate Cancer* | FDA, 2020).

Sin embargo, el cáncer de próstata se caracteriza por ser un cáncer con características heterogéneas en diferentes pacientes; existen estudios donde se reporta que la presencia del PSMA en células tumorales de un mismo paciente o entre pacientes es muy variable, lo que supondría una limitación al uso de radiotrazadores basados en este compuesto (Paschalis et al., 2019). Por lo antedicho, no existe un radiotrazador universal para la detección del cáncer de próstata, lo que justifica la necesidad de continuar explorando

posibles compuestos que puedan ser utilizados como radiotrazadores. Es importante conocer cuáles son las características metabólicas que se alteran en el contexto de un tumor de próstata. En este sentido, se ha reportado que existen múltiples vías metabólicas que se ven afectadas, por ejemplo, el metabolismo de ácidos grasos, del colesterol, de los compuestos de un solo carbono, de aminoácidos y de la glucosa, además de la generación de cambios epigenéticos en las células (Giunchi et al., 2019).

El isómero (*S,S*) de la SAM se encuentra relacionado a varias alteraciones fisiopatológicas presentes en cáncer de próstata. Por ejemplo, esta reportado que el nivel de sarcosina, intermediario y subproducto en la síntesis y degradación de la glicina (Figura 4), se encuentra elevado en el contexto de cánceres de próstata agresivos; este aumento, que se asocia con una mayor proliferación de células tumorales *in vitro*, puede estar relacionado con el aumento en los niveles de la enzima glicina N-metiltransferasa (GNMT), involucrada en su síntesis. La concentración de GNMT está elevada en tumores con una puntuación de Gleason¹ alta y se asocia con una mayor agresividad (Giunchi et al., 2019; Khan et al., 2013; Florencia Zoppolo, 2018).

Considerando el rol de la GNMT y de la sarcosina en la progresión y agresividad del cáncer de próstata, Zoppolo *et al.* postularon que la identificación de potenciales ligandos de la GNMT así como de intermediarios metabólicos relacionados con la sarcosina, para su posterior marcación con radionucleidos PET, constituiría una nueva herramienta para el diagnóstico de esta patología por imagenología molecular PET. En particular se interesaron en el isómero (*S,S*) de la SAM, dado que es el cofactor natural de la GNMT, y por lo tanto,

¹ El sistema de puntuación de Gleason se refiere a cómo se ven las células cancerosas de próstata y qué tan probable es que el cáncer avance y se disemine. Un puntaje de Gleason más bajo significa que el cáncer es de crecimiento lento y no agresivo.

tendría el potencial para ser un buen indicador de un desbalance en el nivel de expresión o actividad de la enzima (Florencia Zoppolo, 2018).

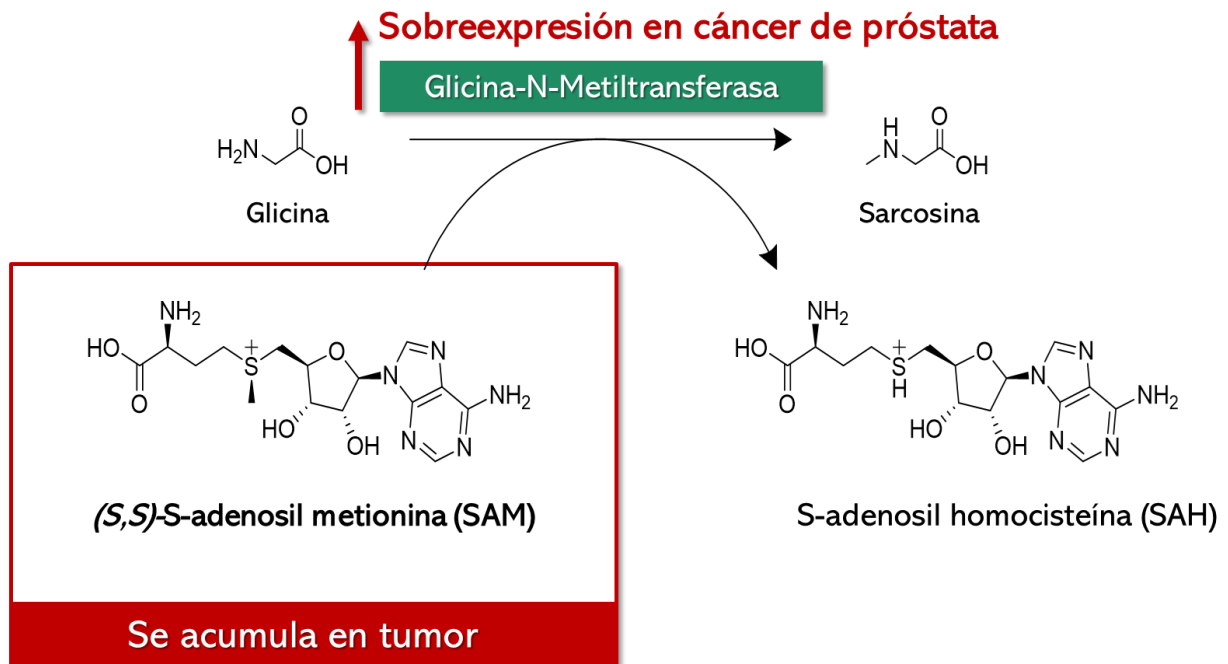


Figura 4. Acumulación de (S,S)SAM en cáncer de próstata

1.5 Radiosíntesis de SAM: antecedentes globales y la experiencia en Uruguay

1.5.1 Producción de radiofármacos quirales en Uruguay

La industria farmacéutica nacional no sintetiza principios activos, sino que los importa, especializándose en formulación y control de calidad para la producción de los diferentes medicamentos que se comercializan en el país. Una realidad totalmente distinta es la vinculada a la síntesis de radiofármacos. El Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM) ha enfrentado el desafío de desarrollar procesos de marcado de radiotrazadores

(con ^{11}C o ^{18}F) que sean eficientes y cumplan con los estándares de calidad requeridos según especificaciones establecidas en Monografías de la USP o EP. Asimismo, ha desarrollado procesos sintéticos propios para las diferentes moléculas utilizadas, ya que se debe contar con el precursor adecuado, que tenga un centro reactivo sobre el que se produzca la sustitución o adición del radionucleido emisor de positrones en forma selectiva. La disponibilidad del precursor y la calidad de éste, resulta esencial para el posterior marcado de la molécula a inyectar al paciente o al animal de experimentación. Al inicio de esta tesis, se desarrollaban en CUDIM tres radiotrazadores quirales sintetizados por su equipo de investigación. Estos son la $[^{11}\text{C}](S,S)\text{SAM}$, el $[^{11}\text{C}]\text{L-deuterodeprenil}$ y el $[^{11}\text{C}]\text{D-deuterodeprenil}$.

1.5.2 Radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ en Uruguay

En el caso de la SAM, el equipo de investigación del CUDIM ha puesto a punto un proceso automatizado de síntesis, que genera el radiofármaco de interés en una mezcla escalémica (relación 53:47 isómero (*R,S*) : isómero (*S,S*)) (Figura 5) (F Zoppolo et al., 2017).

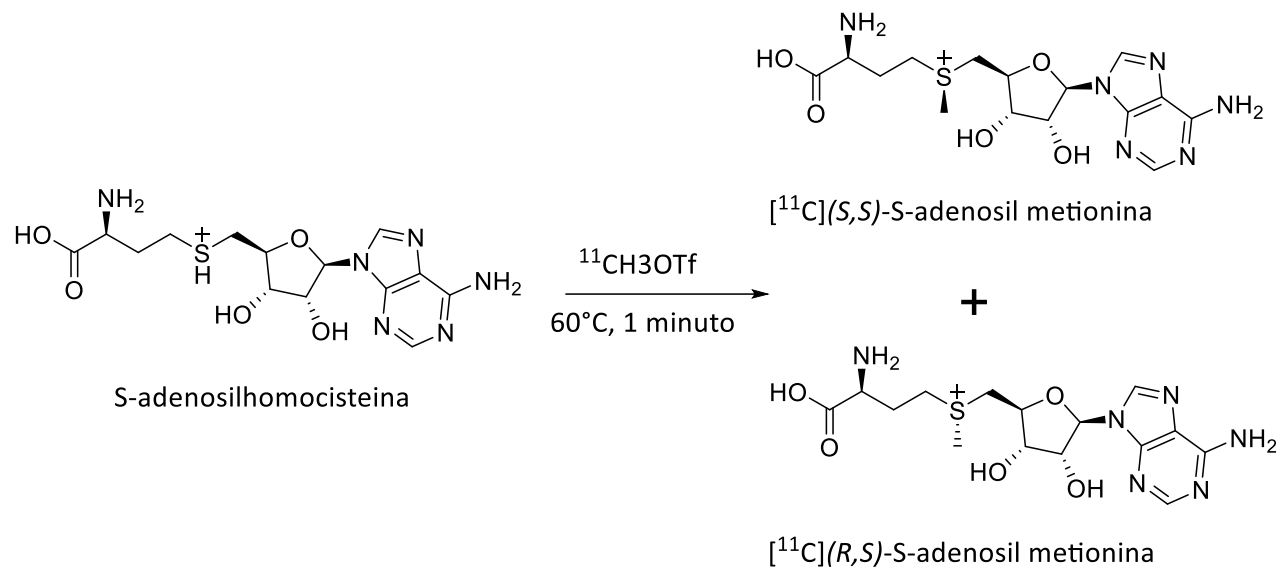


Figura 5. Síntesis de $[^{11}\text{C}]$ S-adenosil metionina actualmente realizada en CUDIM

Mediante este proceso de síntesis, se está obteniendo un 53% de producto marcado que no tiene la actividad buscada. Si bien las mínimas cantidades que serían inyectadas hacen pensar que no existe un alto riesgo de efectos adversos, es probable que la calidad de las imágenes obtenidas pueda verse alterada por la presencia de una molécula marcada que no interactuará con el tumor. Si los ensayos en fase clínica de este radiotrazador confirman la utilidad que se ha visto en los ensayos en estudios preclínicos, el tener una síntesis estereoselectiva permitiría aumentar la sensibilidad de la técnica a nivel de diagnóstico, y mejorar el manejo posterior del paciente y la toma de decisiones oportunas. Si bien ha sido recientemente aprobado por el correspondiente Comité de Ética el ensayo de una mezcla escalémica en paciente con tumores muy avanzados y poca esperanza de supervivencia, la aplicación de este compuesto en estudios generalizados quedaría supeditada a la disponibilidad del fármaco en su forma ópticamente pura. Considerando lo antedicho y sumando el requerimiento de las agencias reguladoras en cuanto al desarrollo de fármacos enantioméricamente puros, es que se justifica explorar una metodología

alternativa para la síntesis de SAM. En este sentido, la estrategia biocatalítica resulta prometedora.

1.5.3 Antecedentes de radiosíntesis de [¹¹C]SAM por estrategias biocatalíticas

Existen pocos antecedentes de la radiosíntesis biocatalítica de [¹¹C]S-adenosil-L-metionina. Los antecedentes se resumen al trabajo del grupo de Ishiwata *et al.* siendo el primer reporte publicado en 1986. Allí se abordó la radiosíntesis enzimática de SAM partir de [¹¹C]L-metionina y ATP utilizando un extracto crudo de hígado de rata, que expresaba naturalmente MAT, obteniéndose [¹¹C]SAM (Ishiwata et al., 1986). Si bien esta síntesis fue realizada en condiciones de laboratorio, y por lo ya expuesto, el empleo de un extracto enzimático estaría contraindicado desde el punto de vista de la pureza del producto final, este antecedente es por demás interesante, dado que es una prueba de concepto de que la radiosíntesis de [¹¹C]SAM es posible.

1.6 Estrategia sintética propuesta para la radiosíntesis de SAM

Con las tecnologías actualmente disponibles, es posible la producción de la enzima MAT de forma recombinante. Si bien los antecedentes de la producción de MAT se abordarán con mayor detalle en la sección 3.1.1, cabe destacar que se han desarrollado varios sistemas de expresión para esta enzima obteniéndose en forma soluble y activa en la mayoría de los casos (Chen et al., 2016; Choi et al., 2009; Chu et al., 2013; Park et al., 1996; Yu & Zhu, 2017). Resulta particularmente interesante a los efectos de la presente tesis, lo reportado por Niu *et al.* en cuanto al clonado y expresión de mutante I303V de la enzima, con un rendimiento de 150 mg/L de proteína purificada, lo cual es un valor muy alto, aún para *E. coli*, además

permitió el desarrollo de un derivado inmovilizado de este mutante de la enzima (Niu et al., 2017).

Por todo lo fundamentado anteriormente, se considera que existe una necesidad de explorar nuevas alternativas para la radiosíntesis de SAM y que se cuenta con suficiente evidencia como para afirmar que una aproximación enzimática no solo es factible, sino que además presentaría grandes beneficios desde el punto de vista de la pureza óptica del producto final. En este sentido se propone desarrollar un biocatalizador inmovilizado de del mutante I303V de la MAT de *E. coli*, y realizar la radiosíntesis de [¹¹C]SAM en el módulo automatizado de síntesis de CUDIM (TracerLab FXC-Pro, GE), partiendo de [¹¹C]L-Metionina y ATP, en un tiempo de reacción menor a 20 minutos (Figura 6).

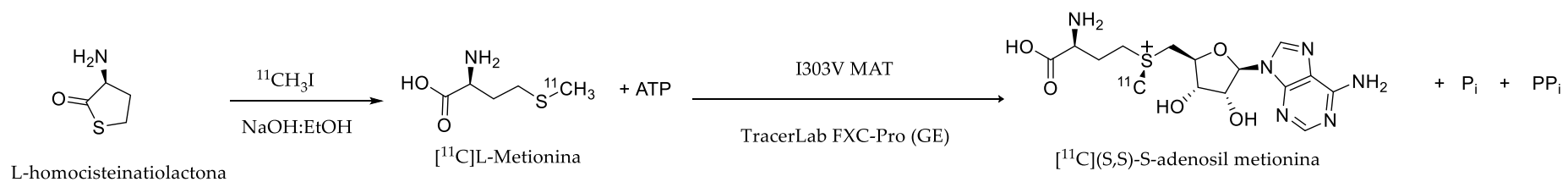


Figura 6. Propuesta de radiosíntesis enzimática de [¹¹C]SAM. Pi: fosfato; PPi: pirofosfato

2 Objetivos

2.1.1 Objetivo general

Desarrollar un sistema biocatalítico optimizado para la síntesis automatizada de [¹¹C](*S,S*)-S-adenosil metionina.

2.1.2 Objetivos específicos

1. Clonar y expresar el mutante I303V de la enzima metionina adenosiltransferasa (I303V MAT) de *E. coli* en *E. coli* BL21(DE3).
2. Producir y purificar I303V MAT recombinante a partir un sistema que la exprese.
3. Optimizar los parámetros de la reacción de síntesis de SAM utilizando I303V MAT.
4. Desarrollar un biocatalizador de I303V MAT inmovilizado en una matriz sólida que presente alta actividad y estabilidad.
5. Comparar la producción de (*S,S*)-S-adenosil metionina utilizando el biocatalizador soluble e inmovilizado.
6. Ensayar a nivel de CUDIM la síntesis de [¹¹C](*S,S*)SAM a partir de [¹¹C]L-Metionina utilizando el sistema biocatalítico optimizado previamente.

3 CAPITULO I: Desarrollo de un derivado inmovilizado de la metionina adenosil transferasa de *E. coli*

3.1 Introducción

3.1.1 Características de la MAT y antecedentes de su producción recombinante

La MAT de *E. coli* es una enzima homotetramérica, constituida por cuatro subunidades de 43000 Da. Las cuatro subunidades idénticas se acoplan primero en dos dímeros que luego conforman un tetrámero asimétrico. La enzima presenta cuatro sitios activos (dos por cada dímerno) que quedan conformados por las superficies de interacción entre los monómeros de cada dímerno (Komoto et al., 2004; Takusagawa et al., 1996). La Figura 7 muestra la estructura cristalina de la enzima desde diferentes ángulos y representaciones y en la Figura 8 A) se puede apreciar uno de los sitios activos, donde se representan las interacciones con el producto de los diferentes residuos aminoacídicos (a una distancia de 5Å), visualizando que se trata de residuos de dos monómeros diferentes (Komoto et al., 2004). En la Figura 8 B) se muestra la posición del residuo aminoacídico Ile 303, que cumple un rol importante en la inhibición por producto de la enzima nativa, como puede apreciarse, este residuo se encuentra próximo al metilo unido al azufre de la SAM (Niu et al., 2017).

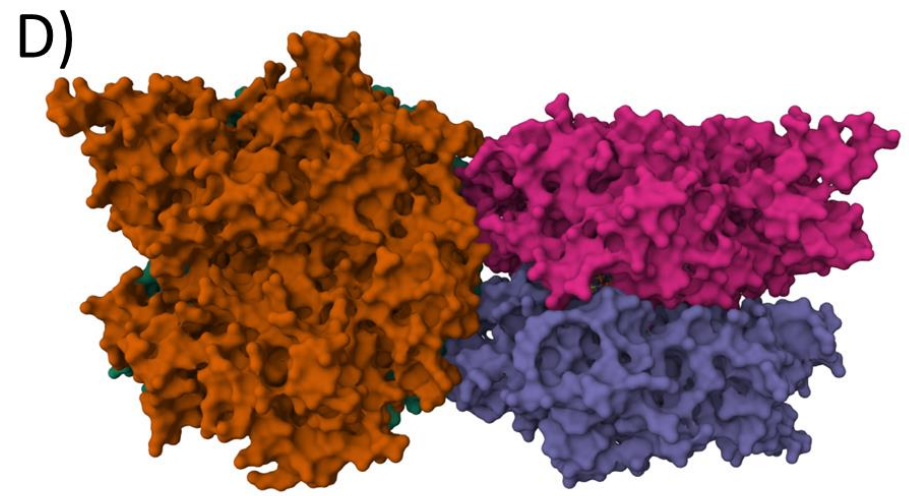
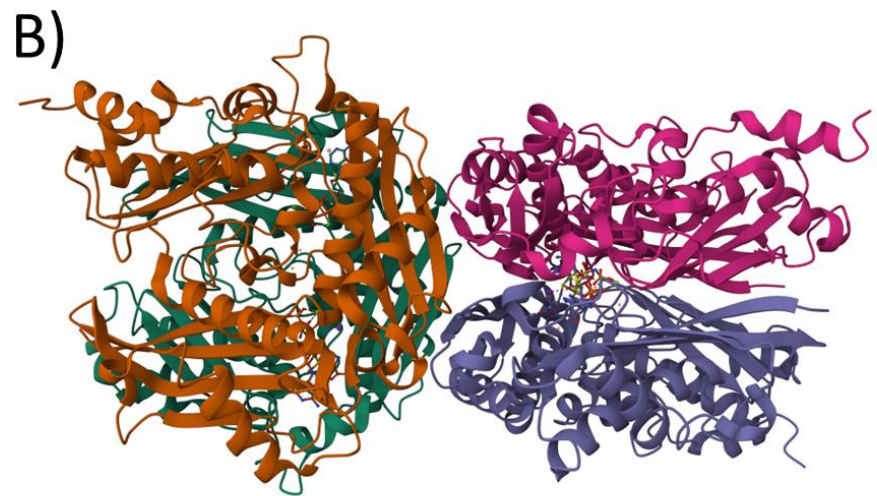
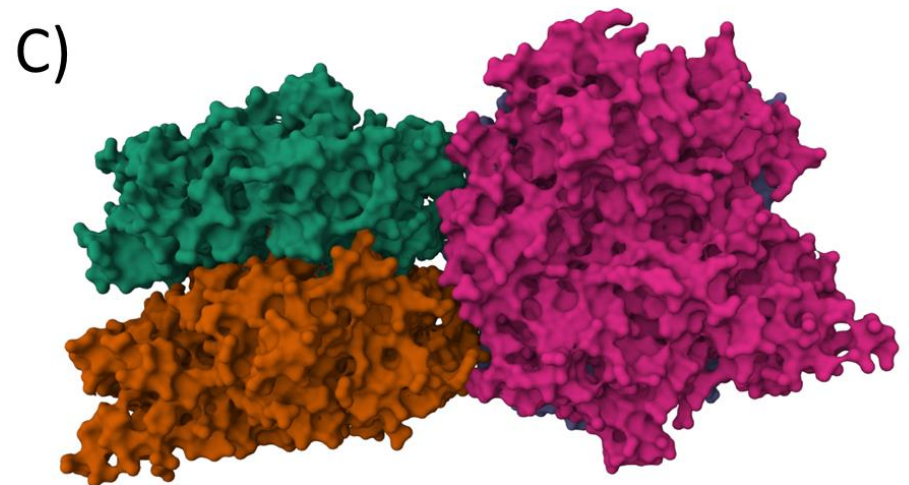
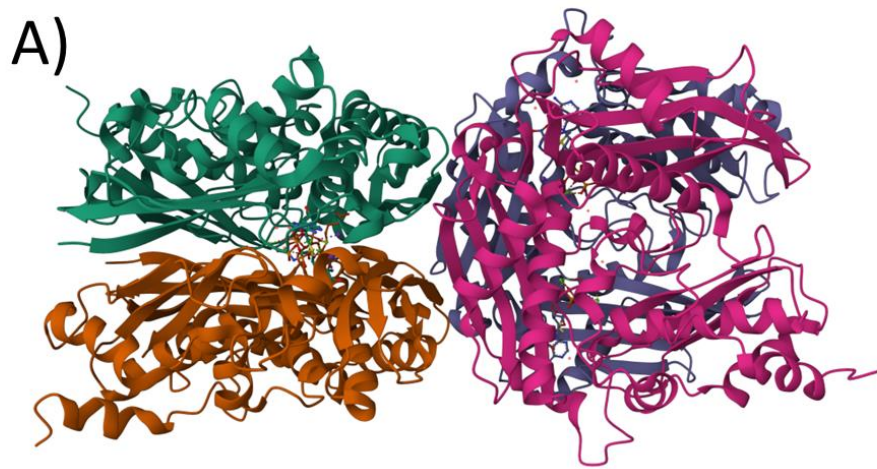


Figura 7. A) MAT según estructura cristalina 1rg9 coloreada por subunidad en representación de cintas B) idem A rotada 90° C) MAT según estructura cristalina 1rg9 coloreada por subunidad representación de superficie D) idem C rotada 90°.

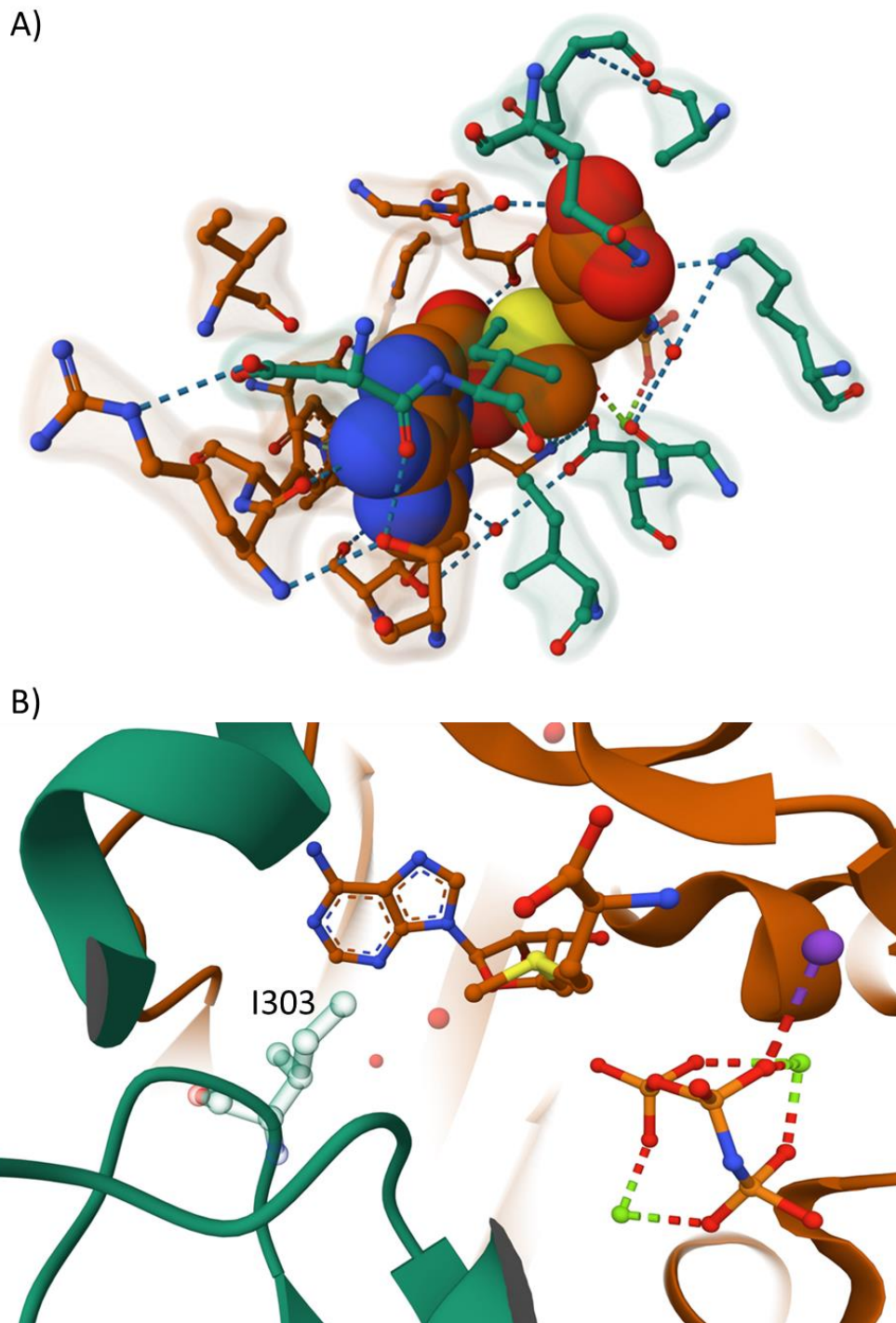


Figura 8. **A)** Sitio activo de MAT interaccionando con SAM. La molécula de SAM se representa con diagrama de esferas mientras que los residuos del sitio activo se representan con diagrama de bolas y varillas. **B)** Posición del residuo aminoacídico Isoleucina 303 con relación al sitio activo de MAT.

Como se mencionó anteriormente, existen múltiples secuencias de metionina-adenosil transferasas depositadas y muchas de ellas han sido clonadas y expresadas utilizando distintos sistemas de expresión (*S. cerevisiae*, múltiples cepas de *E. coli*, *Picchia pastoris*, entre otras) (Chen et al., 2016; Choi et al., 2009; Chu et al., 2013; Driskell et al., 2005; Niu et al., 2017; Yang et al., 2002; Yao et al., 2014; Yin et al., 2017).

Al momento de seleccionar cual utilizar, se decidió trabajar con la MAT de *E. coli*, en particular con la variante I303V, que ha sido clonada y expresada, utilizando como sistema de expresión al vector pET 28a(+), en la cepa hospedero *E. coli* BL-21(DE3) (Niu et al., 2017). Niu *et al.* lograron un sistema de expresión y purificación exitoso para la MAT de *E. coli*, obteniendo una enzima soluble con buena actividad específica. Los autores fundamentaron la elección de la MAT de *E. coli* sobre la de otros organismos en que esta enzima ha presentado alta actividad específica y eficiencia de conversión, bajo Km y altos niveles de expresión en cepas recombinantes de *E. coli*. Además, buscando disminuir la inhibición por producto que se observa en la enzima nativa, los autores utilizaron la variante I303V de la MAT, postulando que un cambio en esta posición, que es la más cercana al metilo de la SAM formada y podría estar involucrada en el proceso de inhibición por producto mediante interacciones hidrofóbicas e impedimento estérico, podría disminuir la inhibición, hecho que fue corroborado experimentalmente, habiendo obtenido un mutante con una actividad específica cuatro veces superior a la enzima nativa (Niu et al., 2017). Todos estos factores se consideraron muy favorables para la aplicación de interés en esta tesis.

3.1.2 Estrategia de inmovilización elegida: Inmovilización covalente en agarosa utilizando CDAP

La estrategia seleccionada para llevar a cabo la inmovilización de la enzima objeto de esta tesis, fue la inmovilización covalente a través de enlaces tipo isourea, utilizando como soporte agarosa.

La agarosa es un polisacárido natural, compuesto por β -D-galactosa y 3,6-anhidro- α -L-galactosa, unidos por enlaces β -1,4 y α -1,3 alternadamente, como puede apreciarse en la Figura 9 (Zucca et al., 2016). Las perlas de agarosa son muy porosas, mecánicamente resistentes, química y físicamente inertes y marcadamente hidrofílicas. Estas características la vuelven un soporte interesante para la inmovilización y se han desarrollado una amplia gama de métodos de derivatización, generando modificaciones químicas en una fracción de los grupos hidroxilos presentes en su estructura (Zucca et al., 2016). En este sentido, su funcionalización ha sido ampliamente estudiada por nuestro grupo de investigación y utilizada para la inmovilización de enzimas en múltiples ejemplos de aplicación en procesos biocatalíticos (Carlsson et al., 1998; Castilla Arboleya et al., 2022; Fernández Lucas et al., 2020; Giacomini et al., 1998; Kohn & Wilchek, 1984; Morellon-Sterling et al., 2021; Rodrigues et al., 2021; Zucca et al., 2016).

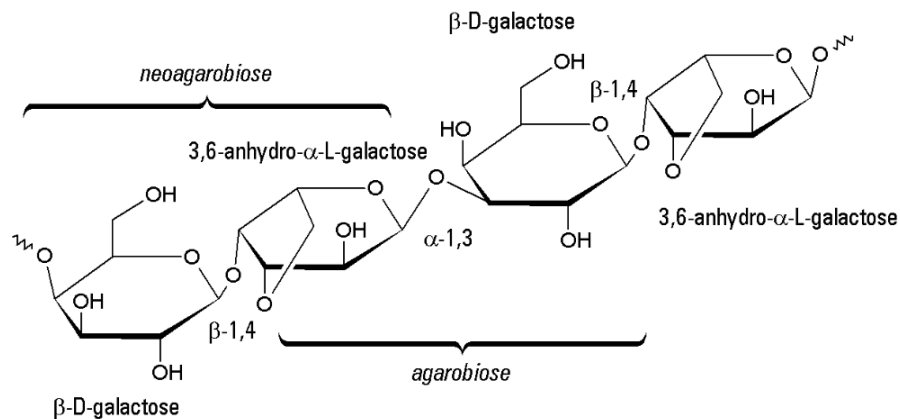


Figura 9. Estructura de la agarosa (figura extraída de Zucca, 2016)

Una estrategia para activar la agarosa para que reaccione con los grupos amino ubicados en la superficie de la enzima es generar grupos cianato-éster en su estructura (Figura 10), para lo cual pueden utilizarse agentes cianilantes. Originalmente se desarrollaron métodos que utilizaban CNBr, sin embargo, el uso de este compuesto tiene grandes desventajas debido a su toxicidad y a los bajos rendimientos de la reacción de activación obtenidos.

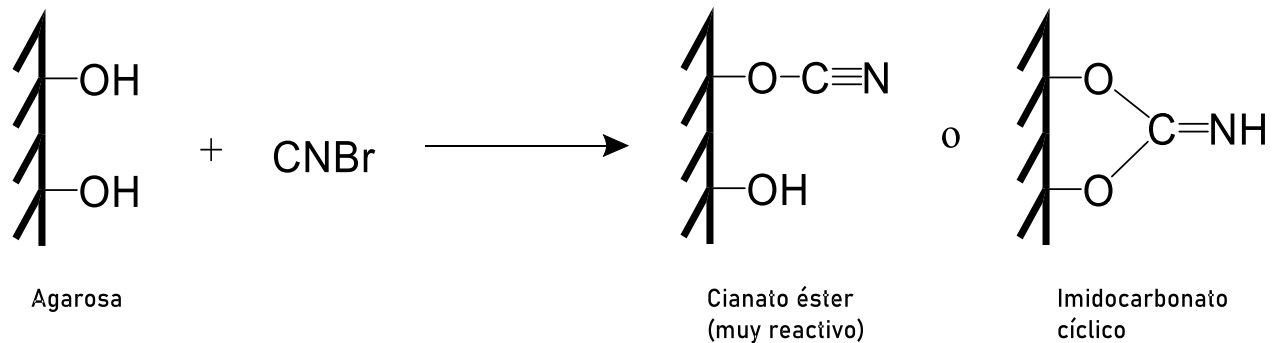


Figura 10. Formación de grupos cianatoéster en agarosa con CNBr

La activación de la agarosa con CNBr necesita de pH extremadamente básicos (11-12) en los cuales se produce la hidrólisis de la mayor parte del CNBr adicionado (más del 90% del inicial), además de que los grupos cianatoéster formados son inestables, tendiendo a formar imidocarbamatos muy poco reactivos y carbamatos completamente inertes (Kohn & Wilchek, 1984).

Debido a esto, se desarrollaron compuestos más reactivos que permitieran mayores rendimientos de activación, siendo además más seguros para el operario. Los mismos se denominan “agentes ciano-transfer” y son complejos de CNBr y una base como trietilamina (TEA) o dietilaminopiridinio (DAP). Particularmente interesante es el caso del tetrafluoro borato de 1-ciano-4-(dimetilamino)piridinio (CDAP) (Figura 11), que es un complejo N-ciano aromático muy estable, debido a la dislocación por resonancia de la carga positiva sobre todo el anillo aromático. Estos complejos son mucho más electrofílicos y reactivos

que el CNBr y por lo tanto capaces de reaccionar a un pH mucho menor (neutro) (Figura 12) evitando la hidrólisis, así como la descomposición de los grupos cianato-éster, con un aumento dramático del rendimiento de la reacción de activación (20 a 80%, dependiendo de las condiciones). Además, el CDAP es un sólido no volátil y muy estable, lo que lo vuelve mucho más seguro para el operario (Carlsson et al., 1998; Giacomini et al., 1998; Kohn & Wilchek, 1984).

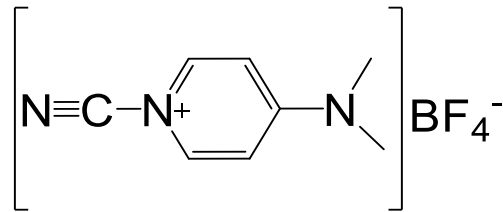


Figura 11. Tetrafluoro borato de 1-ciano-4-(dimetilamino)piridinio (CDAP)

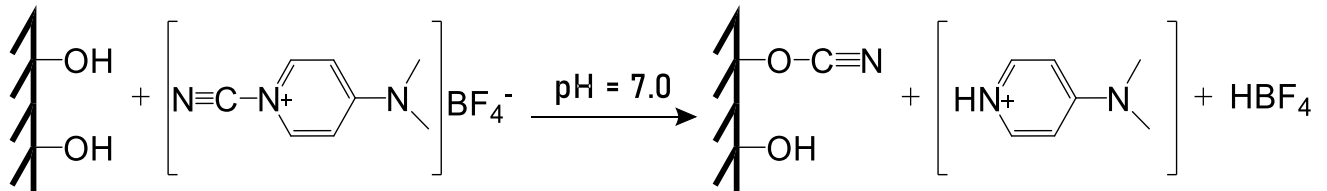


Figura 12. activación de lechos de agarosa con CDAP

Luego de activada la matriz, la inmovilización tiene lugar en condiciones de reacción suaves (solución acuosa, temperatura ambiente, pH cercano al fisiológico y, en general, tiempos cortos); los grupos amino que reaccionan con los grupos cianato-éster son principalmente el amino terminal y los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina superficiales de la proteína. (Figura 13). Además, los grupos reactivos de la matriz que no forman enlaces con la enzima se inactivan espontáneamente, no siendo necesario un tratamiento posterior de bloqueo de grupos reactivos remanentes (Carlsson et al., 1998; Giacomini et al., 1998; Kohn & Wilchek, 1984).

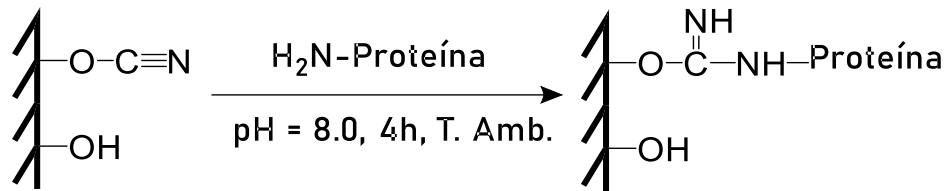


Figura 13. formación de derivados unidos por enlaces isourea

De la revisión bibliográfica surgen pocos antecedentes de inmovilización de la MAT. Niu *et al.* lograron una exitosa inmovilización covalente en una resina amino mediante el uso de un espaciador de glutaraldehído, donde se obtuvo un rendimiento de inmovilización en actividad del 70% (Niu et al., 2017). Otros grupos han abordado la inmovilización por afinidad con metales, como níquel, mediante el agregado de colas de histidina (His₆), con rendimientos menores (40% de actividad ligada al soporte) (Luo et al., 2008) y también se ha reportado esta misma estrategia, pero inmovilizando sobre nanopartículas metálicas magnéticas, donde además se suman otros componentes que favorecerían la inmovilización (atracción electrostática, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas); en este caso con altos rendimientos en términos de actividad ligada al soporte (95%) y mejorada termoestabilidad. (He et al., 2019). Por último, se ha reportado la inmovilización de células de *E. coli* que sobrepresan la variante I303V de MAT, mediante entrapamiento en goma gellan, en conjunto con nanopartículas magnéticas, obteniendo derivados con alta actividad específica y rendimientos de actividad ligada del 78.2% (Yin et al., 2017). Como se comentó anteriormente, la desventaja de las estrategias de inmovilización no covalentes es que aumentan los riesgos de perder enzima hacia la fase líquida, por lo que su uso en la aplicación objeto de esta tesis estaría contraindicado.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Vectores y cepas utilizados

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron *E. coli* TOP10 obtenida de Invitrogen y *E. coli* BL21(DE3) obtenida de NE Biolabs. El vector utilizado fue pET28a(+)(+) de Novagen y el pET28a(+)-MAT (Genscript). En la Tabla 2 se resumen las cepas de *Escherichia coli* utilizadas, así como su genotipo.

Tabla 2. Genotipos de las cepas de *E. coli* utilizadas

Cepa	Genotipo
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F</i> ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>endA1</i> λ ⁻
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> <i>str.</i> <i>B</i> <i>F</i> ⁻ <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lon</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S)

Se utilizaron técnicas estándar de microbiología para el manejo de todas las cepas. Para su mantenimiento a largo plazo, fueron conservadas en freezer a -70 °C en glicerol 15 %, partiéndose para cualquier trabajo del primer repique de las mismas. En el corto plazo fueron mantenidas a 4 °C en placas de medio de cultivo sólido, selladas con Parafilm.

El plásmido construido se mantiene en una cepa de clonado, pudiendo ser purificado utilizando kits comerciales de Mini- o Midi-prep de Thermo-Fischer (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo establecido por el proveedor.

3.2.2 Medios de cultivo y enzimas utilizadas

Triptona, extracto de levadura y agar para la preparación de medios de cultivo fueron adquiridos de Difco. La kanamicina, IPTG, sales, glucosa, lactosa y otros componentes de los medios de cultivo se adquirieron de Sigma-Aldrich y Droguería Industrial Uruguaya. Todas las enzimas fueron obtenidas de Thermo Scientific™ o New England Biolabs: RNAsa, lisozima y ADNasa, al igual que los marcadores de peso molecular de proteínas.

Medio Luria Bertani (LB): triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L. Agregar agar (15 g/L) para la preparación de medio sólido y suplementar con antibiótico cuando sea necesario.

Medio L-broth para preparación de células competentes: triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L y agua destilada c.s.p. 1 L.

Medio SOB: triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0.5 g/L y agua destilada c.s.p. 1 L.

Medio SOC: Suplementar el SOB con MgSO₄ y MgCl₂ ambos en una concentración final de 10 mM.

Medio de Autoinducción (AIM): Triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3.3 g/L, KH₂PO₄ 6.5 g/L, Na₂HPO₄ 7.1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.18 g/L. antes de utilizar agregar 1 mL/L de solución de metales traza 1000x y 20 mL/L de solución de glucosa 2.5% + lactosa 10.5%.

Solución de metales traza (1000x): FeCl₃·6H₂O 380 mg/100mL, HCl c.s.p 0.05 M, MnCl₂·4H₂O 8.87 mg/100mL, ZnSO₄·H₂O 13 mg/100mL, H₃BO₃ 2 mg/100mL, CoSO₄·7H₂O 1.1 mg/100mL, CuSO₄·5H₂O 14 mg/100mL, NiSO₄·6H₂O 10 mg/100mL, Na₂MoO₄ 190.3 mg/100mL

3.2.3 Clonado de I303V MAT

La síntesis del vector de expresión fue encomendada a la empresa GenScript. Posteriormente se realizó el clonado utilizando células electrocompetentes de *E. coli* TOP10 y *E. coli* BL21(DE3) preparadas en el laboratorio.

3.2.4 Producción de células electrocompetentes y transformación por electroporación

Para la producción de células electrocompetentes y su transformación, se siguió el protocolo aportado por Bio-Rad con algunas modificaciones.

1. Tomar un inóculo de la cepa correspondiente a partir de su stock conservado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y realizar un aislamiento por estrías en placa de LB-agar. Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight.
2. Inocular un tubo con 5 mL de LB con una sola colonia del aislamiento obtenido. Incubar *overnight* a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación.
3. Inocular 150 mL de L-broth con 1/100 volúmenes de cultivo fresco crecido de acuerdo con el paso anterior.
4. Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta OD_{600} entre 0.3 y 0.5.
5. Colocar el cultivo en hielo durante aproximadamente 20 minutos; de aquí en más mantener las células frías en baño de hielo, al igual que todos los recipientes y soluciones a utilizar. Transferir el cultivo a un tubo de centrifuga frío y centrifugar a 4000 g durante 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
6. Descartar todo el sobrenadante.
7. Resuspender el *pellet* en 150 mL de glicerol 10 %. Centrifugar a 4000 g durante 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descartar sobrenadante.

8. Resuspender el pellet en 75 mL de glicerol 10 %. Centrifugar a 4000 g durante 15 minutos a 4 °C y descartar sobrenadante.
9. Resuspender el pellet en 10 mL de glicerol 10 % y pasar a tubos de centrifuga de 30 mL. Centrifugar a 4000 g durante 15 minutos a 4 °C y descartar sobrenadante.
10. Resuspender el pellet en 200 µL de glicerol 10 %. Alicuotar de a 40-60 µL y usar en el día.
11. Agregar a cada eppendorf el ADN que se quiere insertar en la célula.
12. Aplicar pulso de 2.5 V e inmediatamente agregar 1 mL de SOC.
13. Incubar a 37 °C durante 1 hora.
14. Sembrar en superficie 200 µL en placas de LB-Antibiótico y cultivar 24 horas a 37 °C.

3.2.5 Producción y purificación de I303V MAT

La producción de la enzima I303V MAT se realizó a partir de la cepa *E. coli* BL21(DE3) pET28a_I303VMAT aplicando un protocolo clásico de crecimiento de la cepa, posterior lisis celular y purificación por cromatografía por afinidad. Se emplearon técnicas estándar de métodos moleculares descritos por Sambrook *et. al.* con algunas modificaciones. (Sambrook, 2001)

1. Crecer la cepa en una placa de LB-Kan (25 µL/5 mL) 37 °C, *overnight*.
2. Inocular con una colonia aislada 5 mL de LB-Kan e incubar *overnight*, 37 °C.
3. Inocular con 1 mL del cultivo del paso 2, 100 mL de medio de autoinducción e incubar a 37 °C, 150 rpm hasta OD₆₀₀ = 0.5 (2 h 30 aprox.), luego incubar a 28 °C 150 rpm *overnight*.
4. Centrifugar el cultivo anterior a 4000 rpm 10 minutos y 4 °C. Resuspender en buffer fosfato 20 mM, pH = 7.6, 500 mM NaCl.
5. Agregar Lisozima (2 mg/mL) e incubar 30 minutos a 28° C, con agitación suave.

6. Agregar Tritón X-100 (conc. final 1 %) ADNasa 5 µg/mL y ARNasa 5 µg/mL e incubar 30 minutos a 28 °C, con agitación suave.
7. Centrifugar a 10000 rpm por 30 minutos a 4 °C.
8. Separar el sobrenadante.
9. Aplicar el sobrenadante en una columna de IMAC (HiTrap Chelating HP, 5 mL) previamente acondicionada*.
10. Lavar con dos volúmenes de columna (10 mL) de buffer fosfato 20 mM, pH 7.6, 500 mM NaCl, 50 mM imidazol.
11. Eluir con tres volúmenes de columna (15 mL) de buffer fosfato 20 mM, pH 7.6, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol.
12. Lavar con buffer fosfato 20 mM, pH 7.6, (2 volúmenes).
13. Lavar con H₂O (5 volúmenes).
14. Lavar con etanol 20 % (2 volúmenes).
15. Dializar el eluido del punto 11 usando una membrana de diálisis (corte 12 KDa) contra un litro de buffer Tris-Cl 100 mM pH 8.0. Mantener *overnight* a 4 °C, con agitación constante.
16. Conservar la solución dializada a 4°C.

*Acondicionamiento columna IMAC (HiTrap Chelating HP)

- a) Lavar con H₂O mQ (4 volúmenes de columna).
- b) Cargar con NiSO₄ 100mM (3 volúmenes de columna).
- c) Lavar con H₂O mQ (2 volúmenes de columna).
- d) Equilibrar la columna con buffer fosfato 20 mM, pH 7.6, 500 mM NaCl (3 volúmenes de columna).

3.2.6 Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

PREPARACION DE GELES DE POLIACRILAMIDA

1. Cantidades necesarias para preparar dos placas de 10 cm x 8 cm x 1 mm (10 mL) de gel de concentración 12,5%

Componente	Solución para gel 12.5%	Solución para stacking gel 5%
H2O destilada	7,75 mL	3,26 mL
Tris-HCl 1,5M	6,0 mL	624 µL
SDS 20%	120 µL	24 µL
Solución AB	9,98 mL	816 µL
Temed	6 µL	4,8 µL
Persulfato de amonio 10%	240 µL	48 µL

2. Transferir la solución para el gel 12.5% con pipeta a los contenedores armados para moldear el gel y cubrir con isopropanol. Esperar al menos una hora para que polimerice. Descartar el isopropanol invirtiendo el soporte.
3. Preparar la solución Stacking y transferirla por la parte superior de los contenedores armados previamente.
4. Colocar los peines para formar los pocillos. Esperar por lo menos 1 hora para que polimerice.

PREPARACION DE LA MUESTRA

5. En campana y con guantes: mezclar en un tubo Eppendorf 2 volúmenes de muestra

con 1 volumen de buffer de muestra. Perforar con aguja la tapa del tubo, colocar en baño de agua a ebullición durante 5 minutos.

CORRIDA ELECTROFORETICA

6. Se utilizó una cuba de electroforesis modelo “Mini-PROTEAN Tetra cell, BioRad”.
7. Colocar las placas en el soporte y ajustarlas.
8. Colocar el soporte en la cuba de corrida.
9. Llenar el compartimiento de electrodos ubicado entre las placas con buffer de corrida cubriendo totalmente la zona de los pocillos de siembra. Controlar que el buffer no se filtre hacia el compartimiento inferior.
10. Llenar el compartimiento de electrodo inferior con buffer de corrida.
11. Remover los peines.
12. Sembrar las muestras en los pocillos (20 μ L por pocillo). Anotar el patrón de siembra.
13. Tapar la cuba y conectar el equipo a la fuente de poder. Encender la fuente de poder y realizar la corrida a 120 volts.
14. Desconectar la fuente de poder cuando el frente de corrida llegue a aproximadamente 1 cm del borde inferior de la placa.
15. Desmoldar los geles marcando la esquina inferior derecha de cada uno.
16. Sumergir los geles en la solución colorante durante 3 horas mínimo.
17. Agregar solución decolorante repetidas veces hasta que se observen las bandas proteicas azules en un fondo transparente.

3.2.7 Determinación de concentración de proteínas por método de Bradford

Se siguió el procedimiento desarrollado por Bradford *et al.* (Bradford, 1976)

3.2.8 Ensayo de actividad para I303V MAT soluble

3.2.8.1 Cuantificación directa de SAM por HPLC

18. Preparar la siguiente mezcla: 148 μL de Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8.0 suplementado con 50 mM K_2SO_4 y 20 mM MgSO_4 (**Buffer de actividad**)(Niu et al., 2017); 7 μL de ATP 300 mM (concentración final en el ensayo 10 mM), 10 μL de L-Metionina 200 mM (concentración final en el ensayo 10 mM).
19. Termostatar la mezcla a 37°C.
20. Agregar 35 μL de enzima soluble purificada según protocolo descrito en 3.2.5.
21. Luego de 5 minutos, detener la reacción por agregado de 100 μL de HCl 1N.
22. Determinar la cantidad de producto (S,S)SAM obtenido mediante HPLC (Columna Nucleodur ec C18, Fase móvil: Buffer acetato de amonio 50 mM 1% TFA pH 5.4, flujo 1 mL/min). La SAM producida se cuantificó comparando con una curva de calibración, construida a partir de un estándar comercial de SAM (Sigma-Aldrich A7007).

La unidad de enzima se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de S-SAM por minuto, en las condiciones anteriormente detalladas.

Todos los ensayos de actividad se realizan por triplicado.

3.2.8.2 Cuantificación indirecta de SAM mediante detección de fosfatos liberados

1. Preparar la siguiente mezcla: 148 μL de Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8.0 suplementado con 50 mM K_2SO_4 y 20 mM MgSO_4 (**buffer de actividad**)(Niu et al., 2017); 7 μL de ATP 300 mM (concentración final en el ensayo 10 mM), 10 μL de L-Metionina 200 mM (concentración final en el ensayo 10 mM).
2. Termostatar la mezcla a 37°C.
3. Agregar 35 μL de enzima soluble purificada según protocolo descrito en 3.2.5.
4. Luego de 5 minutos, detener la reacción por agregado de 200 μL de HCl 1N.
5. Determinar los fosfatos liberados durante la reacción mediante un ensayo de desarrollo de color con verde de malaquita según lo indicado en el manual del kit "Malachite Green Phosphate Assay Kit" (Sigma-Aldrich)
 - a. Diluir la muestra con agua mQ de forma seriada, hasta un factor de dilución de 400.
 - b. Transferir 80 μL de cada muestra diluida a otro pocillo de la placa.
 - c. Agregar 20 mL de reactivo de trabajo a cada pocillo. Mezclar suavemente golpeando la placa.
 - d. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente para que se desarrolle el color.
 - e. Medir la absorbancia a 660 nm en un lector de placas.
6. Realizar el ensayo de determinación de fosfatos liberados,
7. Los fosfatos liberados se cuantificaron mediante la comparación con una curva de calibración construida con estándar de fosfato. Según la estequiometría de la reacción, cada dos moles de fosfato liberados, se libera un mol de SAM.

Todos los ensayos de actividad se realizan por triplicado.

La unidad de enzima se define igual que para el ensayo 3.2.8.1

3.2.9 Ensayo de estabilidad de I303V MAT soluble con el pH a temperatura ambiente

1. Determinar la actividad enzimática de un extracto de enzima purificada según 3.2.8.1
2. Cambiar el buffer de la enzima purificada mediante gel filtración utilizando una columna PD-10, eluyendo con Buffer ATB (Ác. acético – Tris – Ác. Bórico 10mM) a diferentes pH (5, 7, 9 y 11)
3. Incubar alícuotas de la enzima a temperatura ambiente.
4. Tomar muestras a distintos tiempos durante 24 horas y determinar para cada una la actividad enzimática.
5. Calcular el porcentaje de actividad remanente considerando como 100% la actividad registrada en el punto 1.

Todos los ensayos se realizan por triplicado.

3.2.10 Ensayos de determinación de parámetros cinéticos K_m y V_{max} de I303V MAT soluble

1. Realizar ensayos de actividad según 3.2.8.1. variando la concentración del sustrato para el cual se quiere determinar los parámetros cinéticos (L-Met o ATP), manteniendo la concentración final del otro sustrato en la mezcla reactiva constante en 10 mM. Rango de concentraciones: 0.5 - 6.0 mM
2. Con los datos de actividad obtenidos determinar los parámetros cinéticos utilizando la linealización de Lineweaver-Burk y método directo.

3.2.11 Inmovilización de I303V MAT en CDAP-Agarosa

1. ACTIVACIÓN DE AGAROSA CON CDAP

1.1. Lavar 3 g de Sepharose 4B hidratada en un filtro de vidrio sinterizado con:

1.1.1. 50mL de agua destilada

1.1.2. 50mL de acetona:agua 3:7 v/v

1.1.3. 50mL de acetona:agua 6:4 v/v.,

Todas las soluciones deben ser previamente enfriadas a 4°C.

1.2. Escurrir el gel a sequedad mediante succión a vacío (*gel suction dried*).

1.3. Transferir 3 gramos de gel *suction dried* a un vaso de precipitados de vidrio de 10 mL y mezclar con 3 mL de acetona:agua 6:4 v/v enfriado a 4 °C. Añadir a la suspensión de gel 75 mg de CDAP disueltos en 2 mL de acetona:agua 6:4 v/v con agitación vigorosa a 4 °C durante 3 minutos.

1.4. Añadir 360 µL de solución de TEA 0,2 M gota a gota en un período de 1 a 2 min.

1.5. Después de 3 minutos, añadir la mezcla de reacción rápidamente a 50 mL de HCl 50 mM enfriado en hielo.

1.6. Después de no más de 2 minutos, transferir el gel rápidamente a un filtro de vidrio sinterizado y lavar con 50 mL de agua helada.

1.7. Equilibrar el gel activado CDAP-agarosa con buffer de actividad

1.8. Usar inmediatamente para inmovilizar la enzima.

2. INMOVILIZACIÓN

2.1. Incubar 1 g de gel activado *suction dried* con una solución de enzima purificada en una relación 1:8 p/v.

2.2. Agitar suavemente la suspensión a temperatura ambiente durante 4 horas.

2.3. Lavar exhaustivamente con buffer de actividad y almacenar a 4 °C hasta su uso.

3.2.12 Ensayo de actividad para el derivado I303V MAT-CDAP-Agarosa

1. Preparar una suspensión estándar con 100 mg del derivado I303V MAT-CDAP-agarosa *suction dried* por mL de buffer de actividad.
2. Preparar la siguiente mezcla: 358 μ L de **Buffer de actividad**; 17 μ L de ATP 300 mM (concentración final en el ensayo: 10 mM), 25 μ L de L-Metionina 200mM (concentración final en el ensayo: 10 mM).
3. Termostatar la mezcla a 37 °C.
4. Agregar 100 μ L de la suspensión estándar del paso 1 y agitar con agitador orbital, a 37°C.
5. Luego de 7 minutos, detener la reacción por agregado de 250 μ L de HCl 1N.
6. Centrifugar las muestras y filtrar el sobrenadante con filtro 0.22 μ m
7. Determinar la cantidad de producto S-SAM obtenido mediante HPLC (Columna Nucleodur ec C18, Fase móvil: Buffer acetato de amonio 50mM 1% TFA pH=5.4, flujo 1mL/min).

todos los ensayos de actividad se realizan por triplicado.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Clonado y expresión de I303V MAT

Por las ventajas expuestas en la introducción del capítulo, se seleccionó el mutante I303V de la enzima MAT de *E. coli* para la construcción del biocatalizador de interés. Se diseñó el vector de expresión incluyendo la secuencia codificante para el mutante de MAT elegido (gen *metK* de *E. coli* con la mutación I303V) y se encargó su síntesis a la empresa GenScript. La Figura 14 muestra el mapa del plásmido sintetizado. Esta construcción aporta resistencia a kanamicina, lo que permitió la posterior selección de los clones que la incorporaron. Por otra parte, se contempló el agregado de una etiqueta de afinidad de poli-histidina (His₆) al extremo N-terminal de la MAT, para facilitar su purificación mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC).

Con el vector adquirido se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* BL-21(DE3) y se obtuvo la cepa de expresión deseada *E. coli* BL21(DE3) (pET28a_I303VMAT). Se seleccionó uno de los clones obtenidos y se ensayó la producción enzimática, como se obtuvieron buenos resultados (ver 3.3.2) no se recurrió a los otros clones.

Para conservar la construcción, también se transformaron células de *E. coli* Top10 que no tiene la capacidad de realizar recombinación homóloga (cepa *RecA* -), siendo capaz de incorporar la construcción y mantenerla inalterada en sucesivas instancias de replicación. Ambas cepas se conservaron en 15 % glicerol, a -70 °C.

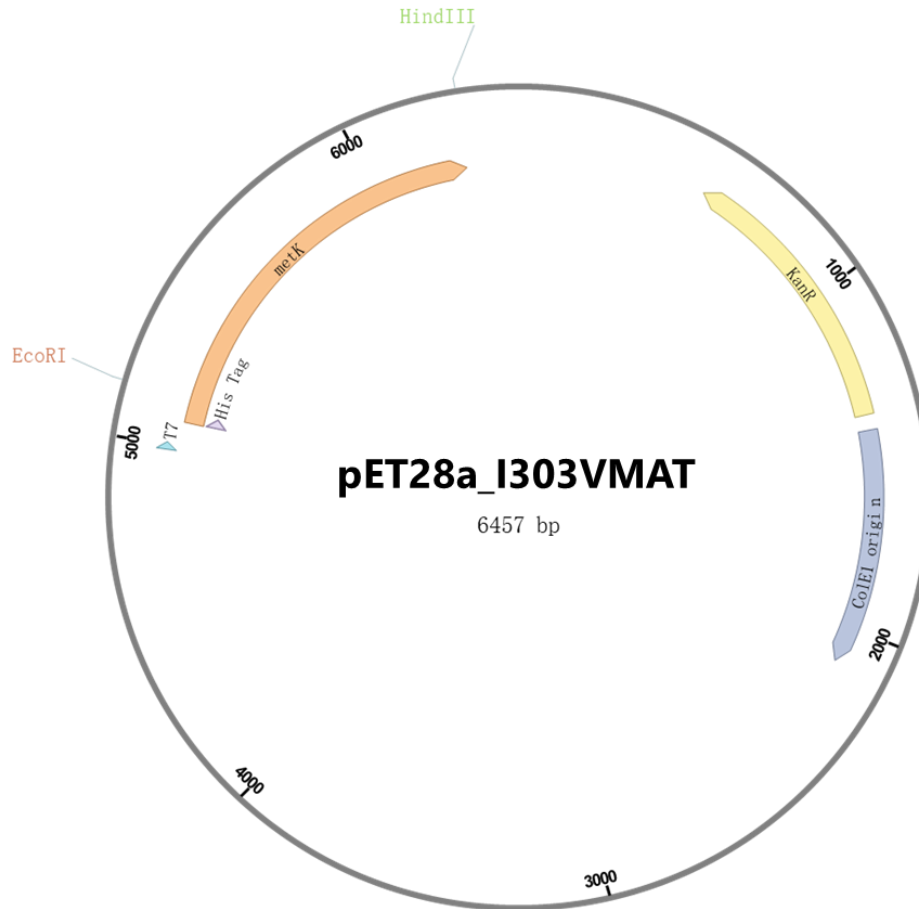


Figura 14. Mapa de la construcción pET28a_I303VMAT, incluyendo la mutación necesaria para obtener la enzima I303V MAT

3.3.2 Producción y purificación de I303V MAT

Para la producción de I303VMAT se ensayaron variaciones en la temperatura de incubación, en el medio de cultivo y en la forma de inducción de la expresión enzimática. Se ensayaron dos condiciones de temperatura: una producción isotérmica a 30°C previamente reportada (Niu et al., 2017), y otra empleando dos temperaturas: primero se incubaron las células a 37°C hasta $OD_{600} = 0.5$ y luego se mantuvieron a 28°C hasta el final del proceso.

En cuanto al medio de cultivo y la forma de inducción se emplearon un medio clásico para el crecimiento de *E. coli* (LB) y un medio de autoinducción (AIM). El sistema de expresión diseñado se basa en la expresión de la T7 ARN polimerasa, que es la responsable de la transcripción de la secuencia de la enzima de interés. Esta enzima se encuentra codificada en el casete DE3, bajo control del promotor *lac*, siendo necesaria su inducción por lactosa o por el inductor no natural isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). En la Tabla 3 se detallan las combinaciones de variables ensayadas; en los tres casos el tiempo de incubación fue de 20 horas.

Tabla 3. Condiciones de crecimiento e inducción de la expresión de I303V MAT

	CONDICIÓN 1	CONDICIÓN 2	CONDICIÓN 3
MEDIO	LB	LB	AIM
CONDICIONES DE INCUBACIÓN	30°C, 150rpm, 20 horas	37°C hasta OD ₆₀₀ = 0.5, luego 28°C, 150rpm, 20 horas	37°C hasta OD ₆₀₀ = 0.5, luego 28°C, 150rpm, 20 horas
INDUCCIÓN	1mM IPTG a OD ₆₀₀ = 0.5	1mM IPTG a OD ₆₀₀ = 0.5	Autoinducción por lactosa del medio

En la Figura 15 se presenta una SDS-PAGE de los perfiles de expresión de I303V MAT en las tres condiciones evaluadas. Si se comparan los resultados a tiempo final (carriles 1, 3 y 5 para las fracciones solubles y carriles 1', 3' y 5' para las fracciones insolubles) para las tres condiciones se observa una importante sobreexpresión proteica, tanto soluble como insoluble. Como la expresión soluble fue muy buena, se eligió abordar la purificación de la

enzima soluble a partir de alguno de estos cultivos, dado que, en general, la purificación de proteínas a partir de los cuerpos de inclusión suele implicar procesos complejos donde se pierde actividad.

En cuanto a las temperaturas ensayadas, no se identifican cambios apreciables entre los perfiles de las condiciones 1 y 2, donde la temperatura es la única variable que cambia. Se optó por continuar el trabajo utilizando la condición de crecimiento a 37°C y expresión a 28°C, dado que es la condición de incubación habitual en nuestro laboratorio.

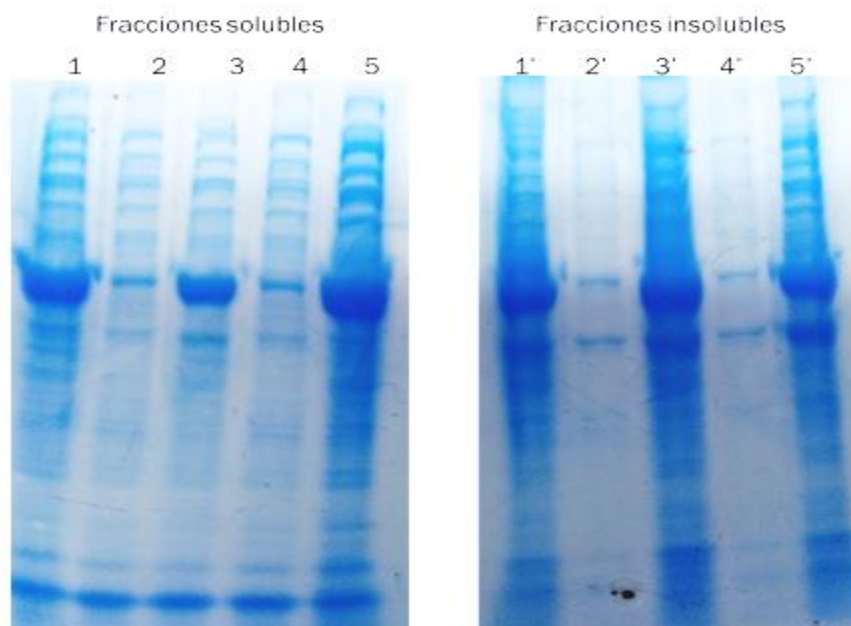


Figura 15. SDS-PAGE. Fracciones solubles: carril 1: condición 1, t_f ; carril 2: condición 2, t_0 ; carril 3: condición 2, t_f ; carril 4: condición 3, t_0 ; carril 5: condición 3, t_f . Fracciones insolubles: carril 1': condición 1, t_f ; carril 2': condición 2, t_0 ; carril 3': condición 2, t_f ; carril 4': condición 3, t_0 ; carril 5': condición 3, t_f . t_0 : tiempo cero de inducción t_f : tiempo final

La condición 3 presenta la ventaja adicional de evitar el agregado del inductor IPTG, lo que la hace una opción más económica. Esto sumado a la buena expresión que presentó, hizo que fuera la condición elegida para continuar el trabajo. Una vez elegida la condición de expresión, se realizó la producción de células y se implementó un protocolo de purificación

para I303V MAT. Este consistió en una lisis química/enzimática de las células, por agregado de cloruro de sodio, tritón y lisozima, seguida de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) utilizando la etiqueta de afinidad (His)₆ agregada a la enzima en el extremo N-terminal. La proteína de interés se obtuvo por elución con imidazol 500 mM que luego fue retirado mediante diálisis (ver 3.2.5).

Se realizaron ensayos para optimizar el protocolo de lisis química/enzimática utilizado; en la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos. Los tiempos y las temperaturas de incubación fueron los factores que tuvieron mayor impacto sobre la cantidad de proteína obtenida.

Tabla 4. Variaciones ensayadas para la lisis química/enzimática

Variante	Etapa 1: Agregado de Lisozima			Etapa 2: agregado de Tritón X-100		Rendimiento de purificación (mg de proteína / L de cultivo)
	Concentración de lisozima (mg/mL)	Condición de incubación	Tiempo de incubación (min)	Condición de incubación	Tiempo de incubación (min)	
1	1.0	En hielo	30	En hielo	15	47
2	1.0	T. Amb., agitación suave	30	En hielo	15	120
3	1.0	T. Amb., agitación suave	30	En hielo	30	123
4	2.0	28°C, agitación suave	45	T. Amb., agitación suave	45	155

El proceso de purificación se analizó por SDS-PAGE, los resultados pueden apreciarse en la Figura 16; en los carriles 1 a 4 se muestran los pasos de purificación diluidos al décimo, en el carril 5 se observa el producto final purificado, sin diluir. De la comparación de los diferentes carriles surge que el proceso de purificación fue muy bueno, ya que, como se observa en el carril 5, las bandas de proteínas contaminantes son despreciables en

comparación con la banda de la proteína mayoritaria, de interés (43KDa).

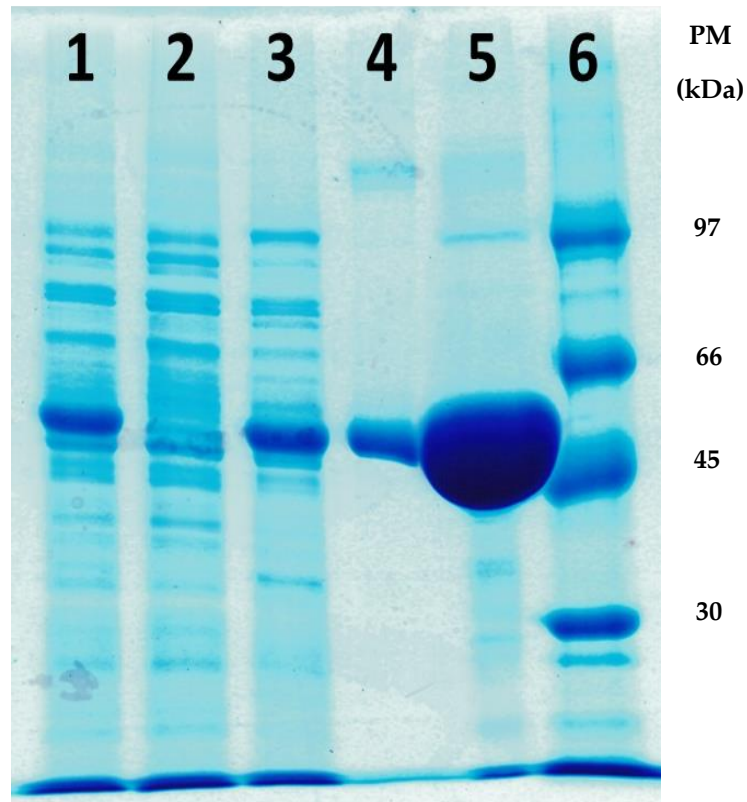


Figura 16. PAGE-SDS de las etapas de purificación de I303V MAT mediante IMAC. carril 1: Aplicado (dilución 1/10); carril 2: Percolado (dilución 1/10); carril 3: Lavado (dilución 1/10); carril 4: Eluido (dilución 1/10); carril 5: Producto purificado dializado (sin diluir); carril 6: Marcador de Peso Molecular Low Molecular Weight Marker GE Healthcare.

Se cuantificó la cantidad de proteína purificada mediante el método de Bradford, (Bradford, 1976) utilizando una curva de calibración construida con estándares de seroalbúmina bovina (ver Anexo 7.1).

El rendimiento final de la purificación fue de 155 mg de proteína por litro de cultivo, resultando superior a lo reportado por Niu *et al.* para I303V MAT (100 mg/L). Si bien se mantuvo la estrategia de clonado y se trata del mismo mutante de MAT, los métodos de expresión y purificación fueron diferentes, lo que podría estar contribuyendo a este mejor

rendimiento. Frente a este resultado no resultó necesario recurrir a estrategias de resolubilización a partir de los cuerpos de inclusión, ya que se contaba con suficiente cantidad de enzima soluble para las etapas posteriores del proceso.

Lograda la producción y purificación de la enzima, el siguiente parámetro por determinar era si ésta estaba siendo obtenida en forma activa, para ello se procedió a establecer un ensayo cuantitativo de actividad.

3.3.2.1 Ensayo de actividad para I303V MAT

Se exploraron dos estrategias para el desarrollo del ensayo de actividad. La primera consistía en la cuantificación de los fosfatos liberados en la síntesis de SAM, mediante un ensayo colorimétrico, donde se empleaba el complejo verde de malaquita molibdato para el desarrollo de color y se realizaba una medida espectrofotométrica en placa de ELISA. Contar con una técnica colorimétrica para la valoración de la actividad enzimática es ventajoso, fundamentalmente por su rapidez y simplicidad, permitiendo el procesamiento de múltiples muestras en cortos tiempos.

Si bien existen múltiples reportes de la aplicación de esta técnica (Niu et al., 2017; Taylor & Markham, 2000; Yin et al., 2017), en nuestro caso no fue posible obtener medidas confiables. En un principio fue posible realizar una curva de calibración para este método que se realizó por triplicado con muy buena reproducibilidad, por lo cual se comenzó a trabajar en el desarrollo del ensayo de actividad. Sin embargo, se presentaron varias dificultades cada vez que se intentó reproducir los resultados. Una de las posibles causas de esta variabilidad es la necesidad de realizar grandes diluciones para obtener lecturas confiables ya que el complejo formado presenta muy baja solubilidad, debiendo diluir las muestras por debajo de 100 μM de fosfato antes de realizar los desarrollos de color. En el mismo sentido, la presencia de cualquier fosfato contaminante podría estar interfiriendo en la

medida. Sumado a esto, cuando se intentó repetir la curva de calibración 6 meses después para corroborar la estabilidad del reactivo, no fue posible; se obtuvieron valores erráticos para las distintas concentraciones de estándar ensayadas. En la Figura 17 y Figura 18 pueden verse la curva de calibración inicialmente utilizada y el perfil obtenido al intentar reproducirla 6 meses después. Frente a estos resultados, se optó por descartar esta opción e implementar un ensayo de actividad basado en la detección del producto de la reacción, SAM, por HPLC.

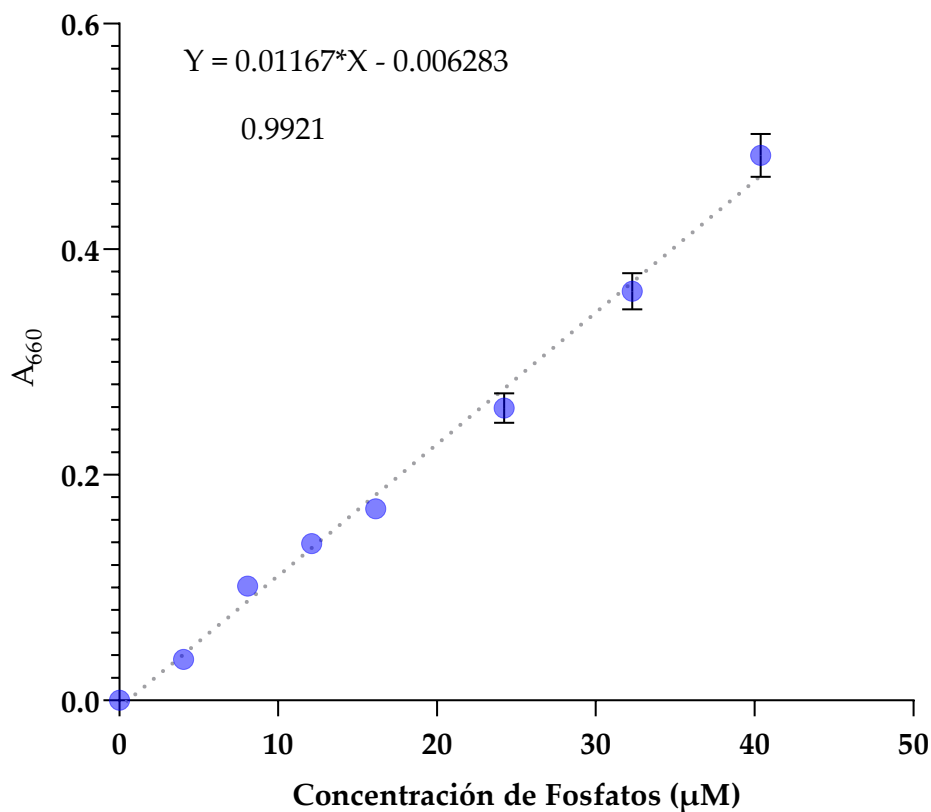


Figura 17. Primera curva de calibración fosfato para verde de malaquita-molibdato

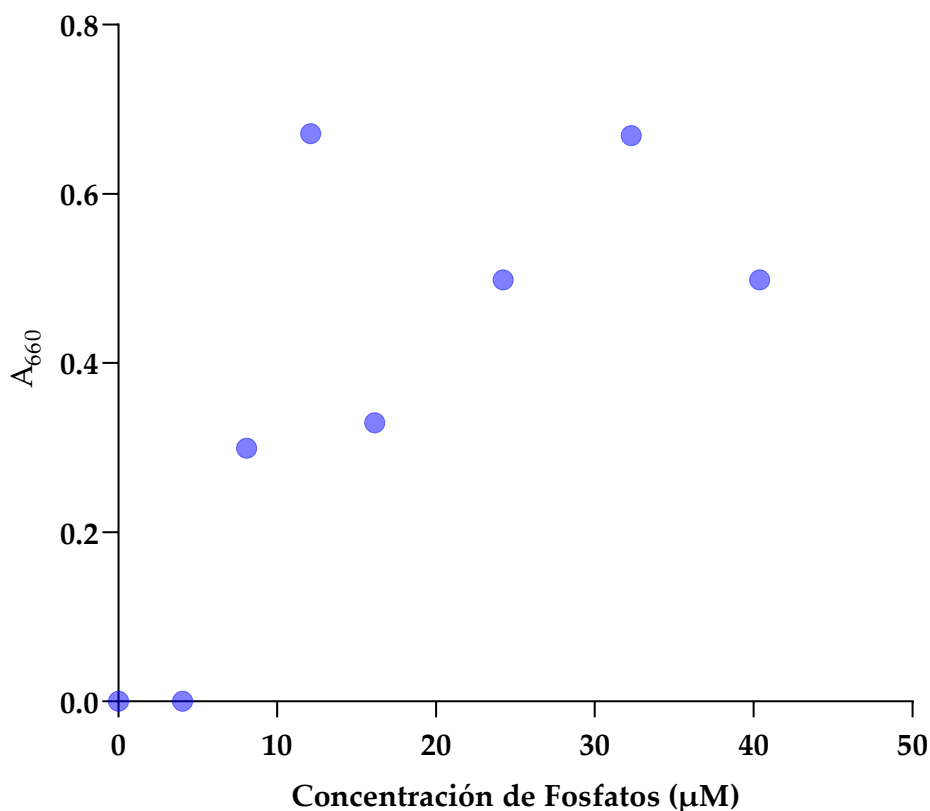


Figura 18. Resultados obtenidos al querer replicar la curva de calibración para verde de malaquita-molibdato

El ensayo de actividad por HPLC se realizó en las condiciones ya reportadas por Niu *et. al.*, a 37 °C en buffer Tris-HCl 100 mM pH 8.0 suplementado con 50 mM K₂SO₄ y 20 mM MgSO₄. La presencia de los cationes Mg²⁺ y K⁺ es necesaria para la actividad, dado que en el sitio activo de la enzima se identifican dos cationes divalentes y uno monovalente (Komoto et al., 2004).

Se optimizó el ensayo de manera de cumplir con la condición de velocidades iniciales; para ello se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción a diferentes tiempos y se detuvo la reacción por agregado de HCl 1 N. Se determinó la concentración de SAM obtenida en cada alícuota mediante HPLC, siguiendo el protocolo descrito en 3.2.7.1.

En la Figura 19 se muestra el gráfico de concentración de SAM vs tiempo, donde se verifica

la relación lineal para los tiempos estudiados, confirmando que en estos tiempos la enzima se encuentra en condición de velocidades iniciales. Se definió 5 minutos como tiempo de trabajo para el ensayo de actividad.

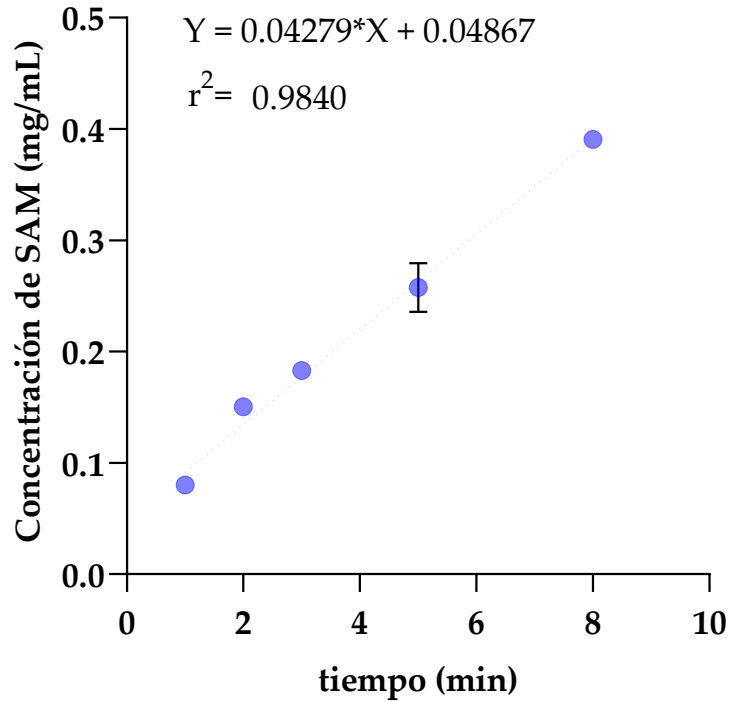


Figura 19. Gráfico de velocidades iniciales para el ensayo de actividad de MAT²

Una vez optimizado el tiempo de reacción, se determinó la actividad y la concentración de proteínas para cada paso del protocolo de purificación, los resultados se resumen en la Tabla 5. Considerando los datos de actividad específica se observa que al final del proceso se obtuvo una enzima 7 veces más pura que la fracción aplicada inicialmente (Factor de purificación = actividad específica eluido / actividad específica inicial). Las proteínas

² Todos los puntos de los gráficos de esta tesis surgen de experimentos donde se realizaron réplicas, en los casos donde no se muestran barras de error es porque las mismas son pequeñas y el programa utilizado para graficar (Graphpad Prism 9) no las muestra.

presentes en el percolado (fracción de proteínas que no es adsorbida en la columna de IMAC) no presentaron actividad, lo que indica que toda la proteína de interés se retuvo en la columna. En el siguiente paso de la cromatografía se realizó un lavado con buffer suplementado con 50 mM de Imidazol con el objetivo de desorber aquellas proteínas que se unieron inespecíficamente y con baja afinidad a la columna. Como en esta fracción de lavado se registró actividad enzimática, seguramente parte de la enzima unida al soporte lo hace con baja afinidad y por eso es posible eluirla con una concentración de 50 mM de imidazol. Este hecho podría deberse a que la proteína presenta histidinas nativas en su superficie que podrían interactuar con el Ni^{+2} inmovilizado, pero con mucho menor afinidad que la cola de histidina; mediante el programa de visualización Pymol se pudo comprobar que en la superficie de la proteína existen residuos de histidina (Figura 20).

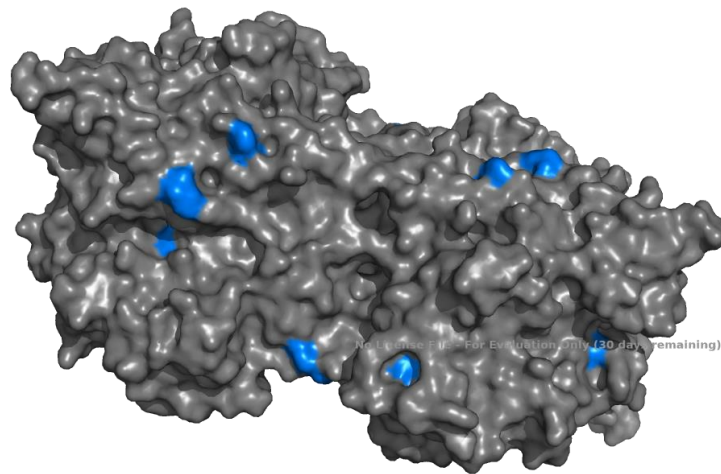


Figura 20. Visualización de los residuos de His (azul) superficiales en MAT.

Lo anterior también se podría deber a una población de enzima cuyo plegamiento no haya sido totalmente correcto, y, por ende, la etiqueta de afinidad no haya quedado completamente expuesta en la superficie de la proteína. Por lo tanto, se consideró que este lavado podría ser optimizado, por ejemplo, reduciendo la concentración de imidazol, siempre que la misma sea suficiente para eluir a las proteínas que se unen

inespecíficamente a la columna, de forma tal que en el paso siguiente de elución de la proteína de interés se obtenga un eluido libre de estas proteínas contaminantes. Por lo antedicho, la reducción de la pérdida de enzima en la etapa de lavado está condicionada a la obtención de un producto puro al final del proceso.

Luego del lavado, el proceso continuó con la elución por agregado de 500 mM de imidazol en la columna, lo que generó la desorción de la enzima por desestabilización de los complejos formados con el níquel; dado que se trata de un reactivo costoso y que se presume en exceso, esta concentración de imidazol podría ser optimizada, siempre que no se comprometa el proceso de elución. Por último, la enzima eluida fue dializada para separarla del imidazol y cambiarla de buffer. Esta diálisis, previamente reportada, tiene la ventaja de realizarse en un solo paso *overnight* (Niu et al., 2017).

Desde el punto de vista del rendimiento de purificación para la actividad enzimática, el proceso fue muy eficiente, recuperándose el 100% de la actividad inicialmente aplicada.

Se realizaron tres réplicas del proceso de purificación, pudiendo determinar que, en promedio, la enzima obtenida siguiendo los métodos antes descritos, tiene una actividad de (4.0 ± 0.2) UE/mL y una actividad específica de $(0,65 \pm 0.07)$ UE/mg de proteína (Tabla 6).

Tabla 5. Cuadro de purificación de I303V MAT mediante IMAC

Fracción	Volumen fracción (mL)	Concentración de proteínas (mg/mL)	Actividad (UE/mL)	Actividad específica (UE/mg)
Aplicado	60	9,1	0,9	0,1
Percolado	60	3,7	0,0	0,0
Lavado	10	5,1	1,0	0,2
Eluido	15	6,5	4,2	0,7
Eluido Dializado	16	6,0	3,9	0,7

Tabla 6. Actividad y concentración de proteína para tres lotes de I303V MAT producidos según los métodos propuestos.

	Actividad (UE/mL)	Concentración de proteínas (mg/mL)	Actividad Específica (UE/mg de proteína)
LOTE 1	4,2	7,23	0,58
LOTE 2	4,0	5,99	0,67
LOTE 3	3,8	5,35	0,71
Promedio	4,0 ± 0.2	6,19 ± 0.96	0,65 ± 0.07

3.3.3 Caracterización bioquímica de I303V MAT soluble

Se realizó una caracterización parcial de la enzima purificada, priorizando los aspectos que interesaba conocer de cara a las etapas posteriores del trabajo. En este sentido, fue de interés conocer los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , que permitieron determinar si las medidas del ensayo de actividad se estaban realizando en condiciones de saturación de ambos sustratos. Por otra parte, se consideró relevante conocer la estabilidad de la enzima soluble frente al pH, dado que es un factor importante a la hora de decidir la estrategia de inmovilización, donde podría requerirse someter a la enzima a determinada condición de pH por periodos más o menos prologados.

3.3.3.1 Determinación de parámetros cinéticos K_m y V_{max}

Para determinar estos parámetros se realizaron ensayos de actividad manteniendo las condiciones según el procedimiento descrito en 3.2.10, pero cambiando la concentración del sustrato para el cual se quiere determinar los parámetros cinéticos, ya que se trata de una enzima bisustrática.

3.3.3.1.1 Determinación de K_m y V_{max} para ATP

Se ensayaron por triplicado concentraciones de ATP entre 0.5 y 6.0 mM, manteniendo la concentración de metionina constante en 10 mM. Los resultados obtenidos fueron procesados mediante el método de linealización de Lineweaver-Burk (Figura 21), el método directo (Eisenthal & Cornish Bowden, 1974) (Figura 22) y una regresión no lineal realizada en el programa Graphpad Prism 9 (Figura 23). Los valores de K_m y V_{max} obtenidos por los dos métodos se muestran en la Tabla 7.

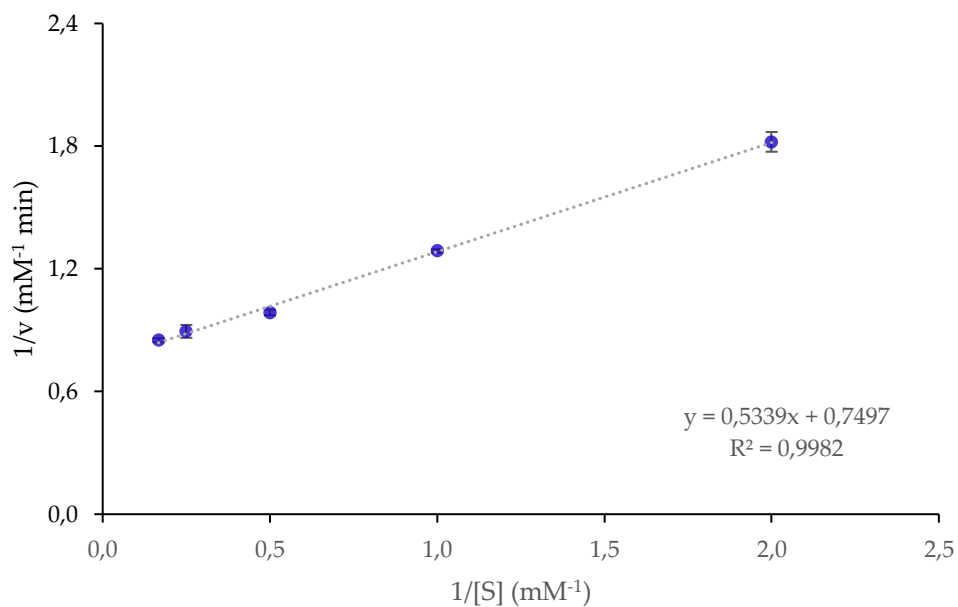


Figura 21. Gráfico de linealización de Lineweaver-Burk para determinar K_{mATP} y V_{maxATP}

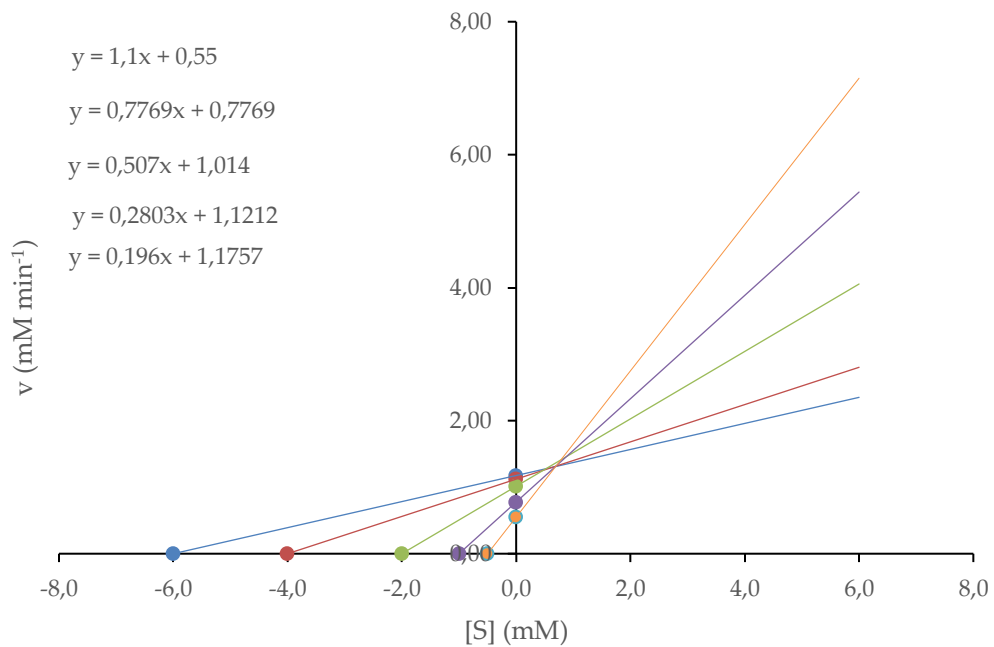


Figura 22. Gráfico para determinación de K_{mATP} y V_{maxATP} por método directo

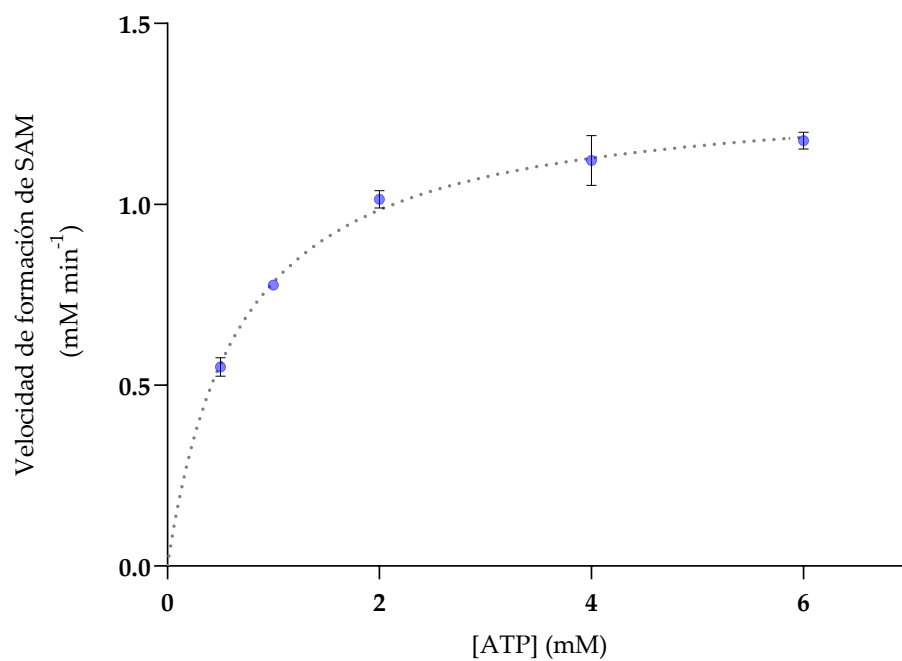


Figura 23. Velocidad de formación de SAM en función de la concentración de sustrato.

Tabla 7. Valores de K_m y V_{max} obtenidos para ATP

Método	K_m^{ATP} (mM)	V_{max}^{ATP} (mM.min ⁻¹)
Lineweaver-Burk	0.71 ± 0.24	1.33 ± 0.02
Directo	0.69 ± 0.09	1.32 ± 0.06
Regresión no lineal	0.68 ± 0.10	1.32 ± 0.08

3.3.3.1.2 Determinación de K_m y V_{max} para L-Metionina

Al igual que para ATP, el rango de concentraciones de L-Met empleado fue de 0.5 a 6.0 mM manteniendo en este caso la concentración final de ATP en 10 mM. En la Figura 24 se muestra el gráfico correspondiente a la linealización de los datos mediante el método de Lineweaver-Burk, en la Figura 25 el gráfico realizado para la determinación por el método directo y en la Figura 26 el gráfico de la regresión no lineal realizada en Graphpad Prism 9. Los valores de K_m y V_{max} obtenidos por los tres métodos se muestran en la Tabla 8.

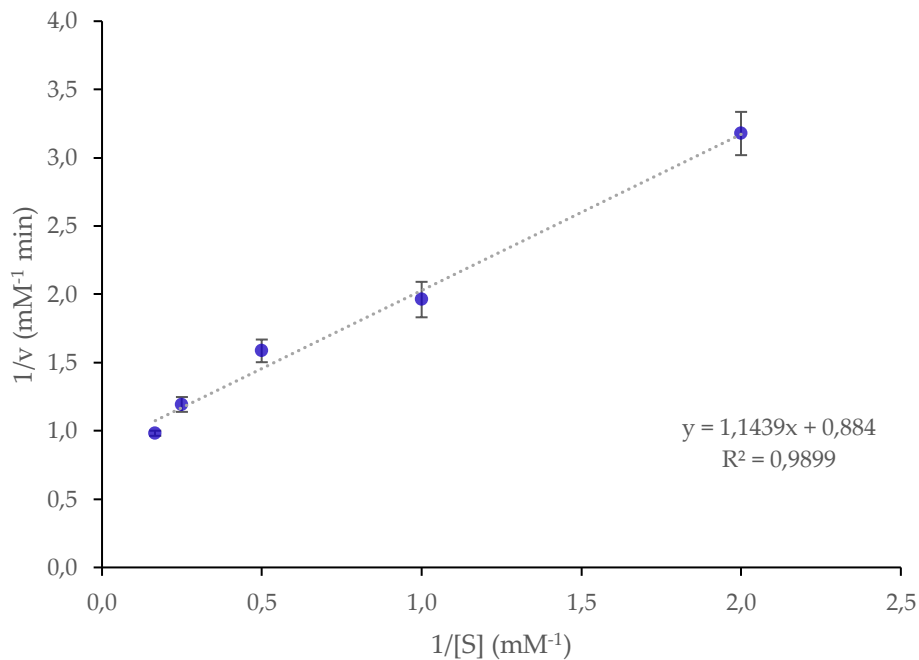


Figura 24. Gráfico de linealización de Lineweaver-Burk para determinar K_m^{L-Met} y V_{max}^{L-Met}

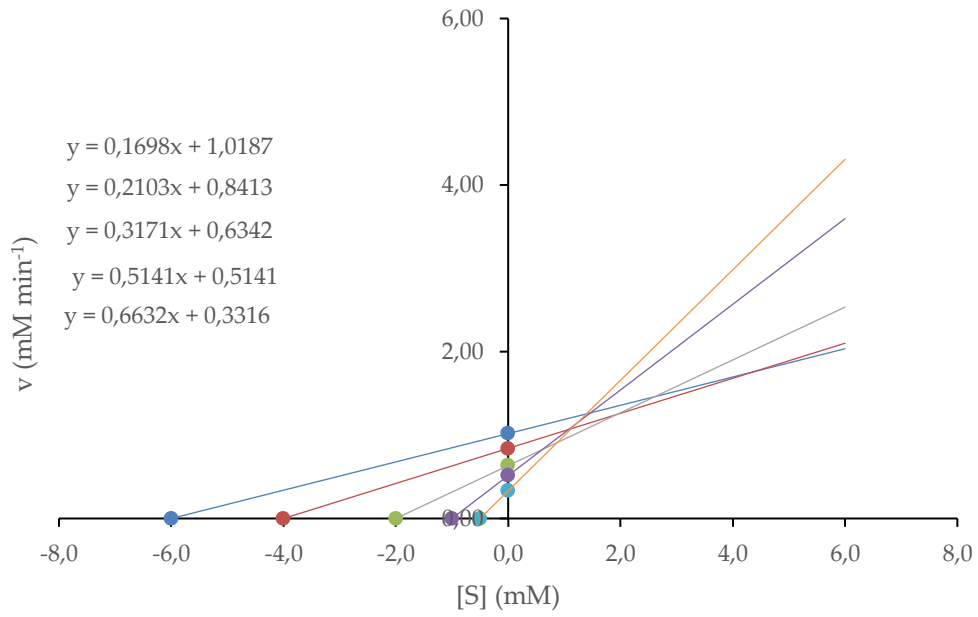


Figura 25. Gráfico para determinación de determinar K_m^{L-Met} y V_{max}^{L-Met} por método directo

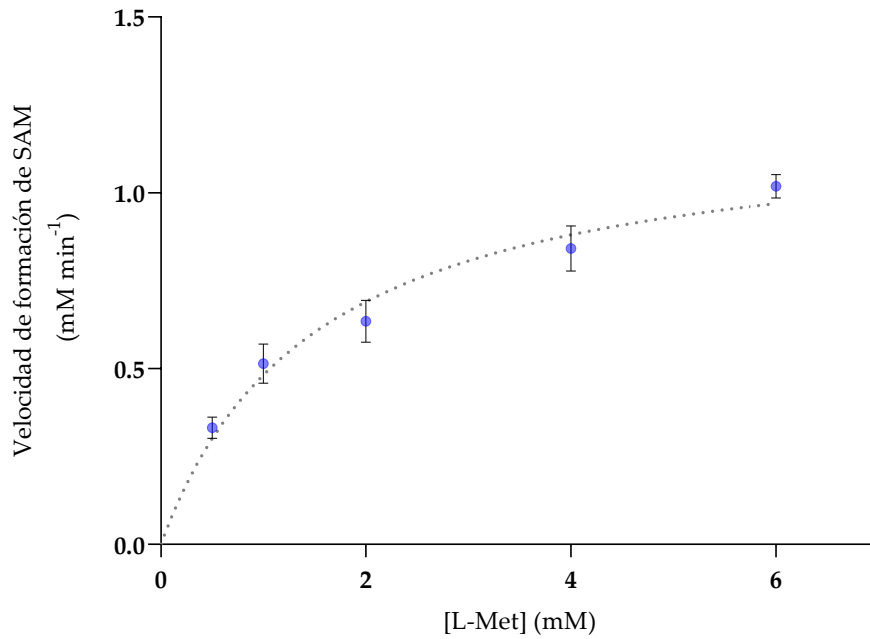


Figura 26. Velocidad de formación de SAM en función de la concentración de sustrato.

Tabla 8. Valores de Km y Vmax obtenidos para L-Metionina

Método	Km^{L-Met} (mM)	Vmax^{L-Met} (mM.min⁻¹)
Lineweaver-Burk	1.29 ± 0.10	1.13 ± 0.08
Directo	1.13 ± 0.41	1.08 ± 0.12
Regresión no lineal	1.52 ± 0.66	1.22 ± 0.18

Se considera que la relación entre la concentración de sustrato en la mezcla de reacción a la Km del mismo sustrato debe ser igual o mayor a 10 veces para asegurar las condiciones de saturación de sustrato. Los resultados obtenidos permitieron afirmar que las condiciones del ensayo de actividad utilizadas son óptimas para el sustrato ATP, observándose que la relación fue de 14. Respecto al sustrato L-Metionina la relación entre la concentración de sustrato en la mezcla de reacción y la Km^{L-Met} se observó que estaba en un rango entre 6.5 y 8.8, aunque la relación no es la óptima, se considera que de todas maneras es adecuada para realizar la medida de actividad.

Las constantes cinéticas de esta enzima fueron determinadas previamente, sin embargo, no es posible comparar los resultados obtenidos con los reportados por otros autores (Niu et al. , Luo et al.) dado que estos dependen de las condiciones en las que fueron determinados y de qué forma fueron calculados, condiciones que no se indican en los trabajos citados.

3.3.3.2 Estabilidad de I303V MAT con el pH

Conocer la estabilidad de la enzima es un insumo imprescindible para elegir correctamente el método de inmovilización, evitando aquellos que comprometan la estabilidad enzimática.

Para realizar el ensayo se incubó la enzima en Buffer ATB (Ác. Acético – Tris – Ác. Bórico 10mM) a diferentes pH y a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas a ciertos tiempos de incubación y se determinó la actividad enzimática. Para cada tiempo se calculó el porcentaje de actividad remanente respecto a la actividad inicial. Se realizaron ensayos a pH 5, 7, 9 y 11.

A pH 5 la enzima mostró 0% de actividad remanente desde el tiempo inicial, indicando que se desnaturaliza completamente a este pH, en las condiciones de incubación. La caída drástica de actividad hacia valores de pH ácidos va en concordancia con la literatura (Niu et al., 2017).

Los resultados de estabilidad para el resto de los valores de pH ensayados se muestran en la Figura 27.

De los estudios realizados, se evidencia que la enzima es estable a pH 7 y pH 9 por un periodo de 24 horas y a temperatura ambiente conservando más del 90% de la actividad inicial. En cuanto al pH 11, si bien hay una pérdida de actividad más marcada a medida que avanza el tiempo de incubación a las 20h aún conserva por encima de un 80% de actividad remanente.

Los resultados obtenidos nos aseguran que la enzima de interés podría ser utilizada en estrategias de inmovilización que requieran incubación a pH neutro y/o moderadamente alcalino sin perjuicio de la actividad enzimática.

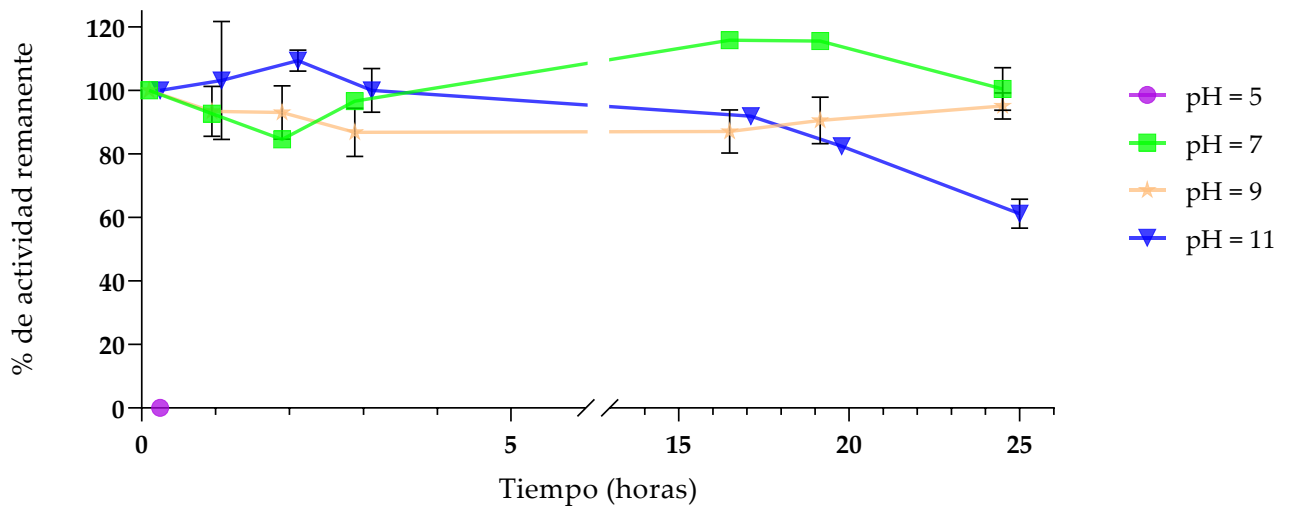


Figura 27. Ensayos de estabilidad de I303V MAT con el pH

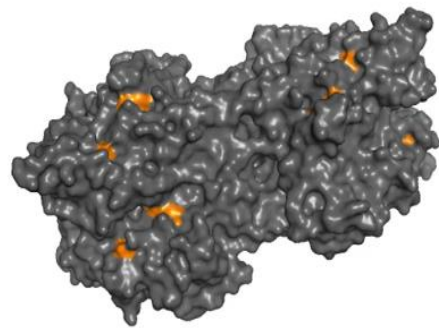
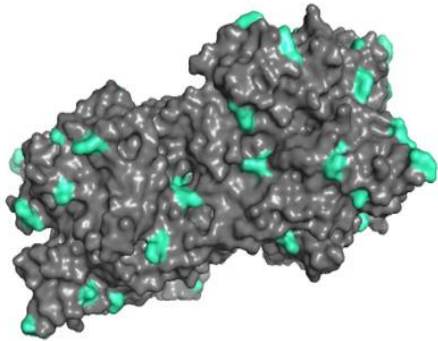
3.3.4 Diseño del biocatalizador inmovilizado I303V MAT-CDAP-agarosa

Al momento de diseñar el biocatalizador inmovilizado, se optó por seguir una estrategia de inmovilización del tipo covalente, considerando que esta estrategia resulta en un derivado donde la proteína queda fuertemente unida al soporte, minimizando una posible pérdida de enzima, que contaminaría el producto de la reacción. Este factor es de gran importancia, dado que el producto final se administrará de forma parenteral. Como fuera previamente mencionado en la sección 3.1.2, para esta tesis se decidió trabajar con agarosa activada con CDAP, un soporte activado con grupos cianato-éster que mediante reacción con los grupos aminos forman enlaces covalentes tipo isourea, en condiciones de reacción muy moderadas.

Para seleccionar la química de unión al soporte, se decidió explorar la superficie de la enzima, utilizando la estructura cristalina previamente reportada (Komoto et al., 2004) y el programa Pymol, buscando identificar entre los residuos aminoacídicos expuestos, aquellos que presentaran potencial para la inmovilización covalente. En la Figura 28 se visualizan los resultados obtenidos. Los residuos aminoacídicos de mayor interés son las lisinas que aportan como grupo reactivo el ϵ -amino, los ácidos aspártico y glutámico que aportan como grupo reactivo el carboxilo, las cisteínas que aportan como grupo reactivo el tiol y las tirosinas que aportan como grupo reactivo el hidroxilo fenólico. Del análisis se aprecia que no hay cisteínas superficiales y existen pocos grupos hidroxilos fenólicos de tirosina expuestos; el número de lisinas y carboxilos se encuentra en el mismo orden.

Lisinas superficiales

Tirosinas superficiales



Aspárticos y glutámicos superficiales

Cisteínas superficiales

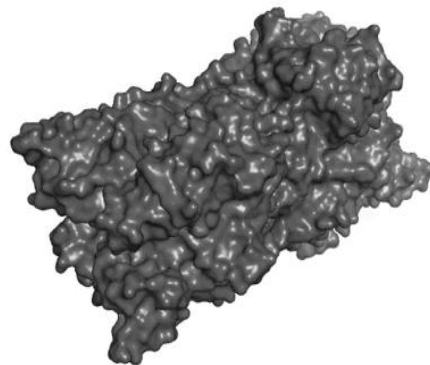
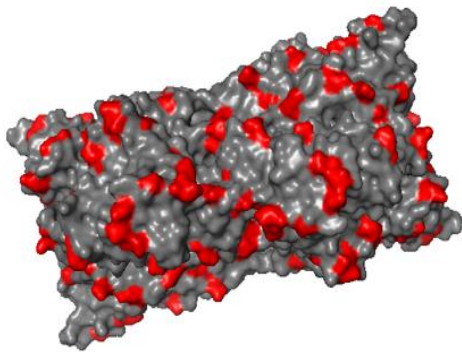


Figura 28. Visualización de los residuos aminoacídicos de la superficie de I303V MAT.

La estrategia de inmovilización que involucra a los grupos aspártico y glutámico implica la formación de un enlace covalente amida con un soporte que presente grupos amino, en presencia de un agente carbodiimida, a pH ácido (4 - 6). Considerando que los estudios de estabilidad indicaron que la enzima no es estable a pH ácido (ver 3.3.3.2), a priori, se descartó esta opción.

Se consideró entonces abordar estrategias que involucraran los grupos ϵ -amino de las lisinas superficiales. En este sentido, se debe considerar que el alto pKa de estos residuos (pKa =10.52) hace que el uso de algunos soportes requiera condiciones de incubación drásticas, como es el caso de los soportes glioxil, que requieren incubación a pH igual o mayores a 10 para poder reaccionar con estos grupos. Si bien la enzima mostró ser estable a pH básico, para minimizar las pérdidas de actividad asociadas al proceso de inmovilización, se optó por explorar estrategias que implicaran incubaciones en condiciones de pH suaves o moderadas. La inmovilización se realizó a pH 8.0 durante 4 h, normalmente el grupo amino más reactivo presente en una proteína a este pH es el amino terminal, y luego en menor medida los ϵ -aminos de los residuos lisina, como ya se dijo debido al alto valor de pKa.

En primera instancia, se optó por realizar la inmovilización sobre agarosa activada por CDAP, que como ya fue mencionado (ver 3.1.2) permite realizar la inmovilización en condiciones suaves y además no requiere etapas de inactivación de los grupos del soporte que no interaccionen con la enzima, dado que naturalmente tienden a formar carbamatos inactivos en las condiciones de trabajo.

3.3.5 Inmovilización de I303V MAT en agarosa activada con CDAP

La inmovilización fue llevada a cabo siguiendo el protocolo descrito en 3.2.11. Para determinar la actividad expresada por el derivado inmovilizado, se adaptó el ensayo de actividad utilizado para la enzima soluble, agregando agitación para mantener al derivado en suspensión (ver 3.2.12). Se realizó un estudio de optimización de las condiciones del ensayo de actividad para la enzima inmovilizada para verificar el cumplimiento de velocidades iniciales. (Figura 29), a partir del mismo se seleccionó 7 minutos como tiempo

de ensayo.

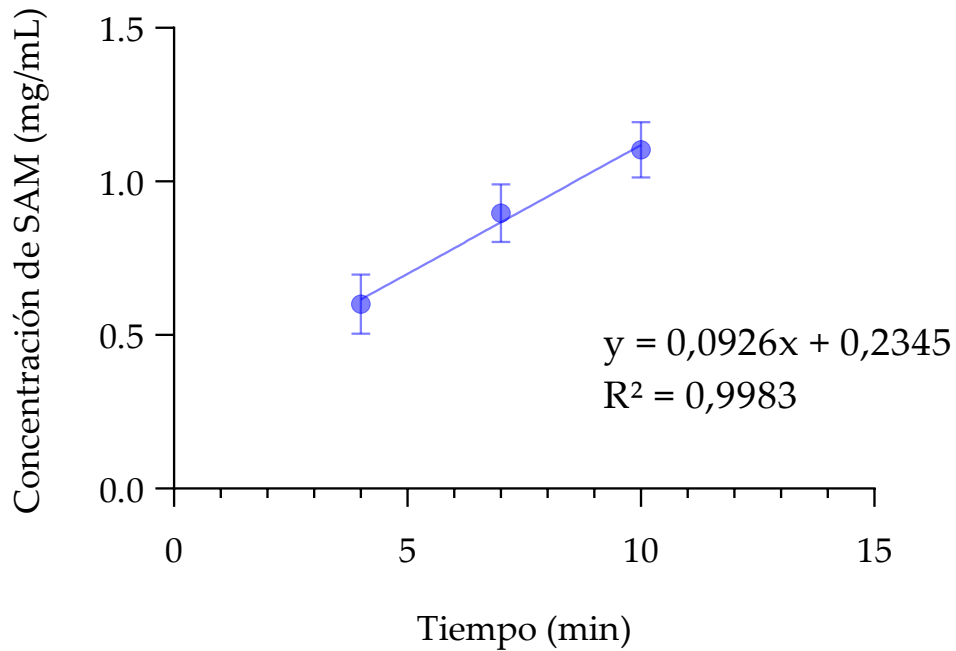


Figura 29. Gráfico de Velocidades iniciales para el derivado I303VMAT_CDAPagarosa

Los resultados del proceso de inmovilización, realizado por triplicado, se resumen en la Tabla 9. Considerando la cantidad de proteína ofrecida y la cantidad de proteína inmovilizada, en promedio el rendimiento del proceso de inmovilización fue de 71%. (%R = mg proteína inmovilizada * 100/mg proteína ofrecida)

Observando las UE inmovilizadas y las UE expresadas, se puede considerar que toda la enzima que se unió al derivado lo hizo de forma activa (las diferencias en los valores numéricos se atribuyen a que el cálculo de las UE expresadas en el gel está sujeto a mayor error, dado que implica pesar el gel *suction dried*, cuyo contenido de líquido es variable).

Tabla 9. Inmovilización de I303V MAT en CDAP-agarosa (los resultados están expresados por gramo de gel *suction dried*)

UE ofrecidas	UE inmovilizadas ¹	UE expresadas	mg de proteína ofrecida	mg de proteína inmovilizada ²
32.5 ± 0.9	12.7 ± 1.5	17.0 ± 1.0	51.2 ± 5.7	36.4 ± 5.8
¹ UE inmovilizadas = UE ofrecida – UE en sobrenadante y lavados				
² mg de proteína inmovilizada = mg proteína ofrecida – mg proteína en sobrenadante y lavados				

Niu *et al.* reportaron la inmovilización de la I303VMAT sobre una resina amino (LX-1000HA) derivatizada con glutaraldehído, de manera que la unión se da por formación de una base de Schiff entre los grupos amino de las lisinas y el aldehído del soporte.

Si se comparan los resultados obtenidos en esta tesis con los de Niu *et al.*, se observa que los procesos son igualmente eficientes tanto en términos de rendimiento de inmovilización en mg de proteína unida al soporte, así como en la actividad expresada por gramo de soporte, en condiciones de trabajo comparables. En ambos casos, cuando se ofrecieron 50 mg de proteína por gramo de soporte, se unió el 70% y toda la enzima unida lo hizo de forma activa (se expresa el 100% de la actividad). Los soportes CDAP-agarosa no cuentan en su estructura con un brazo espaciador entre la matriz y el grupo reactivo lo que podría ser una restricción para la formación de uniones multipuntuales entre la enzima y el soporte (Morellon-Sterling *et al.*, 2021), sin embargo, si la unión se diera a través del extremo amino terminal, la cola de histidinas agregada podría aportar cierta flexibilidad a la estructura. Por otro lado, la química de unión utilizada en este trabajo asegura que el enlace formado entre la enzima y el soporte es covalente e irreversible, mientras que el utilizado por Niu *et al* no lo es, debido a que, a menos que sea reducida, una base de Schiff no forma un enlace covalente estable, lo que podría favorecer la liberación de la enzima del soporte con el uso.

En resumen, se consideró que el derivado generado es muy buen candidato para llevar adelante la aplicación de interés.

3.4 Conclusiones y perspectivas

Se logró poner a punto la producción de la enzima I303VMAT de *E. coli* en *E. coli*, desarrollando un protocolo de purificación que demostró ser efectivo, obteniéndose al final del proceso un rendimiento de 155 mg de proteína por litro de cultivo, con una actividad específica de 0.7 UE/mg. La etapa de producción se realizó utilizando un medio de autoinducción, reduciendo los costos del proceso, dado que no es necesaria la inducción con IPTG, obteniéndose un rendimiento comparable al obtenido en producciones donde se utilizó dicho inductor. Cabe resaltar que este proceso podría ser optimizado en la etapa de producción, evaluando más condiciones de expresión que permitan obtener aún mayores cantidades de enzima soluble, y también en la etapa de lisis químico-enzimática ensayando otras técnicas de lisis como la disrupción celular por ultrasonificación. Además, como se dijo anteriormente, también se podría optimizar el proceso de purificación de la enzima mediante IMAC, para disminuir la pérdida de enzima que se produce en el lavado con imidazol 50 mM, siempre que no se comprometa la pureza del producto final. Además, podrían realizarse estudios para disminuir la cantidad de imidazol utilizada para la elución de la enzima, lo que abarataría los costos globales del proceso.

Además se podría incluir una etapa de cromatografía de exclusión molecular al final del proceso para verificar que la enzima se está expresando con la estructura cuaternaria nativa, es decir, como un tetrámero de peso molecular total 172 KDa , evitando la presencia en el producto final de multímeros que pudieran producirse y que afectarían la eficiencia del proceso de inmovilización, asegurando que la enzima obtenida queda libre de cualquier otro contaminante proteico.

Desde el punto de vista de la inmovilización, a través de la estrategia seleccionada se logró obtener un derivado inmovilizado con 100% de actividad expresada, indicando que le

proceso de inmovilización fue muy bueno, por lo que se consideró que el derivado era apropiado para ser probado en la síntesis de interés. De todas maneras y como se dijo anteriormente, el proceso de inmovilización puede ser mejorado probando variables en los tiempos de incubación, o en la relación de enzima ofrecida por gramos de soporte, entre otras.

La estabilidad del derivado fue evaluada estudiando la performance de la síntesis de interés en las condiciones de operación a través del reuso. Este punto es abordado en el siguiente capítulo.

Como trabajo a futuro, queda pendiente la caracterización completa del derivado, esto incluye la determinación de los parámetros cinéticos del mismo, de manera evaluar por ejemplo si el proceso de inmovilización provoca limitaciones difusionales de los sustratos y los productos. Además, dado que la I303VMAT es una proteína tetramérica, debería evaluarse que las cuatro subunidades estén interactuando de forma covalente con el soporte, de modo de evitar pérdidas de enzima durante el proceso; si se detectara esta situación, podrían evaluarse cambios en la estrategia de inmovilización o el agregado de etapas de post-inmovilización (Betancor et al., 2003; Fernández-Lafuente et al., 1999), por ejemplo por entrecruzamiento químico de las subunidades, para evitarlo.

4 CAPITULO II: Síntesis de (S,S)SAM y radiosíntesis de [¹¹C](S,S)SAM

4.1 Introducción

4.1.1 Antecedentes de la síntesis de SAM

4.1.1.1 Síntesis química

Los antecedentes de la síntesis química de SAM se reducen a tres patentes, donde se describen métodos de producción de SAM con buenos rendimientos en términos de cantidad de producto, pero con la desventaja de generar mezclas de los isómeros (*R,S*) y (*S,S*) y utilizar compuestos contaminantes como los haluros de alquilo y grandes cantidades de ácidos y bases fuertes. La ventaja de estas metodologías es la posibilidad de obtener mayores cantidades de producto, pero con la dificultad de tener que agregar pasos de purificación para separar el isómero de interés. (P. B. Deshpande et al., 2005; Senthilkumar et al., 2006; Sivasankaran & Mohan, 2010)

4.1.1.2 Síntesis enzimática

La síntesis enzimática de SAM ocurre en dos pasos, en primera instancia el azufre de la metionina ataca el enlace fosfoéster del ATP, liberando SAM y tripolifosfato, y, en un segundo paso, este último es escindido liberándose pirofosfato (PPi) y fosfato inorgánico (Pi), como se muestra en la Figura 30. (Komoto et al., 2004)

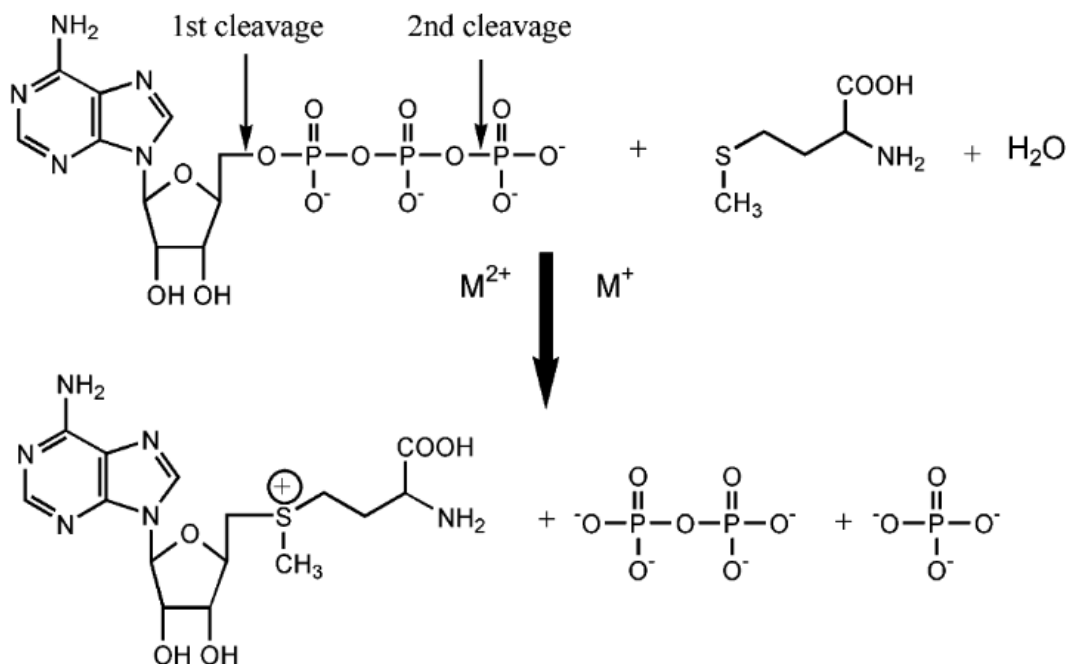


Figura 30. Mecanismo de síntesis de SAM catalizada por MAT (figura extraída de Komoto, 2004)

Como se dijo anteriormente, existen varios antecedentes para la síntesis de SAM de forma enzimática, donde las estrategias desarrolladas apuntan a la producción de SAM a gran escala. Se ha reportado el uso de levaduras genéticamente modificadas para la sobreexpresión de MAT (Cao et al., 2012) con muy buenos rendimientos de producción en fermentador (modo *fed-batch*) de 6.1 g de SAM/L de cultivo en 36 horas. Por otro lado, también se ha reportado la producción de SAM a partir de cepas que producen MAT de forma heteróloga, tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae*, donde se realizó la producción de SAM a escala matraz o fermentador; en el caso de Choi et al. realizaron mutaciones en búsqueda de mejorar la actividad enzimática de la MAT de *S. cerevisiae* y ensayaron la síntesis en escala de laboratorio, obteniendo para una de las variantes 2.8 g de SAM/L. Yu & Zhu et al. reportan una producción de 0.3 g de SAM por litro de cultivo en una producción en fermentador de 5L, 8 h luego de la inducción (Choi et al., 2009; Detchanamurthy et al., 2010; Niu et al., 2017; Yu & Zhu, 2017). Por otro lado, se ha realizado

ingeniería metabólica en *P. pastoris* para la producción de SAM, implementándose técnicas de *knock-in* y *knock-out*, que han demostrado tener un efecto sinérgico en la síntesis de SAM, obteniéndose rendimientos de 4.7 g de SAM por litro de cultivo en fermentador, además se han desarrollado estrategias de producción en fermentador donde el sustrato es agregado en continuo, obteniéndose buenos rendimientos ($34.5 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ en fermentador de 5 L). (Hu et al., 2009; Yu & Shen, 2012) También se han realizado ensayos dirigidos a optimizar la relación de sustratos y el agregado de cofactores para favorecer la síntesis de SAM, la Tabla 10, extraída de Chen et al. muestra los resultados más relevantes en este campo. (Chen et al., 2016)

En cuanto a las estrategias que involucran inmovilización de biocatalizadores, se han reportado síntesis de SAM utilizando tanto enzimas como células inmovilizadas. (Niu et al., 2017; Yin et al., 2017) Como ya fue mencionado, Niu et al. reporta la producción de células de *E. coli* modificadas para la producción heteróloga de un mutante de MAT pero no realiza la síntesis con célula entera, sino que realiza la inmovilización covalente de la enzima en soportes acrílicos (amino y epoxi), obteniendo un derivado activo en el caso de la inmovilización en el soporte amino, que fue empleado en la síntesis de SAM, alcanzando conversiones del 95% en relación al ATP, y pudiendo realizar 10 reusos del biocatalizador cada una con un tiempo de síntesis de 8 horas. (Niu et al., 2017)

Tabla 10. Ensayos dirigidos a optimizar la relación de sustratos y el agregado de cofactores para favorecer la síntesis de SAM (los resultados de rendimientos se expresan en SAM o glutatión (GSH), dado que es un metabolito de la SAM) (extraída de Chen et al. 2016).

Modificación aplicada	Microorganismos utilizados	SAM (GSH) (g/L)
Fermentación por lotes alimentados en dos etapas: para el crecimiento celular, alimentación de glucosa con una concentración de 800 g / L; para mejorar el rendimiento de SAM, alimentando metionina con 1 g por 10 g de DCW	<i>S. cerevisiae</i> ZJUS1	8.77 Bioreactor 10 L
Introducción de un gen MAT recombinante por la mezcla de ADN de genes MAT de <i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. spectabilis</i> ; alimentación continua de 0,2 g/L/h de metionina	<i>P. pastoris</i>	8.46 Bioreactor 30 L
Adición de 6 g/L de metionina a las 0 h y 6 mmol/L de cisteína a las 21 h durante la fermentación	<i>C. utilis</i>	0.368 (rendimiento total SAM y GSH)
Coexpresión de <i>MUP1</i> , <i>ADK1</i> y <i>SAM2</i> junto con la construcción de cultivos de alta densidad celular antes de la inducción y la alimentación con metionina	<i>P. pastoris</i> GS115	9.73 Bioreactor 3-7 L
Sobreexpresión <i>ACS2</i> , eliminación de <i>MLS1</i> e introducción de <i>metK1</i> combinado con la adición de glucosa con 1,2 g/L/h durante 72 h	<i>S. cerevisiae</i> CGMCC 2842	6.06 Bioreactor 10L
Coexpresión de <i>MET6</i> y <i>SAM2</i> combinada con una estrategia de alimentación de 6 g/L de citrato de sodio a las 12 h de incubación	<i>S. cerevisiae</i> CGMCC 2842	1.85 Matraz 250 mL
Adición de 2 g/L de citrato de sodio a las 15 h	<i>C. utilis</i> CCTCC M 209298	0.664 (rendimiento total SAM y GSH)
Regulación de los niveles de ATP en <i>E. coli</i> utilizando pequeños ARN reguladores: <i>proB</i> , <i>glnA</i> y <i>argB</i> involucrados en la síntesis de subproductos dependientes de ATP en la producción de SAM fueron reprimidos, respectivamente	<i>E. coli</i> BL21	1.12 mg/L (cepa anti-argB)
Introducción de <i>SAM2</i> de <i>S. cerevisiae</i> junto con la adición de un 1 % de n-heptano que actúa como vector de oxígeno y un 1,2 % de sorbitol como fuentes de carbono suplementarias	<i>P. pastoris</i>	1.41 Matraz 250 mL
Adición de 0,45 mol/L NH ₄ y corto tiempo de inducción (47h)	<i>P. pastoris</i>	11.63 Bioreactor 3-7 L

4.1.2 Antecedentes de la radiosíntesis de [^{11}C](S,S)SAM

Como ya fue mencionado en la introducción de la tesis (ver sección 1.5) existen dos antecedentes de radiosíntesis de [^{11}C]SAM; uno por síntesis tradicional (F Zoppolo & Savio, 2017) y el otro por síntesis enzimática. (Ishiwata et al., 1986)

El antecedente de mayor relevancia para esta tesis es la síntesis realizada en CUDIM, reportada por Zoppolo *et al.*; esta comienza con la producción de [^{11}C]CO₂ en el ciclotrón, mediante el bombardeo con protones de un isótopo estable de Nitrógeno, en este caso ^{14}N , según la reacción nuclear $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$. Luego, se da el proceso conocido como la fijación del ^{11}C , donde el [^{11}C]CO₂ producido es enviado al módulo de síntesis para ser atrapado y purificado, siendo luego reducido a [^{11}C]CH₄ mediante hidrogenación catalítica. Posteriormente, el [^{11}C]CH₄ se transforma en [^{11}C]CH₃I al reaccionar con I₂(s) en un circuito de recirculación (Buccino et al., 2015), para ser luego liberado hacia una columna que contiene AgOTf, dando [^{11}C]CH₃OTf. Al avanzar en el sistema, el [^{11}C]CH₃OTf actúa como agente metilante sobre S-adenosil homoscisteina para producir [^{11}C]SAM, en 1 minuto. La [^{11}C]SAM producida se separa del resto de los componentes de la mezcla de síntesis mediante HPLC preparativo para su posterior formulación.(F Zoppolo et al., 2017) El producto final es sometido a pruebas de control de calidad, determinando, entre otros parámetros, la pureza radioquímica y la actividad específica, previo a su utilización en estudios de imagenología.

Como ya fue comentado, la mayor desventaja de este proceso es que se genera una mezcla escalémica de isómeros (ver 1.5.2).

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Síntesis de S-SAM a partir de L-metionina con enzima soluble

La síntesis se desarrolló en las mismas condiciones de reacción que para el ensayo de actividad enzimática (Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8.0 suplementado con 50 mM K₂SO₄ y 20 mM MgSO₄, 37°C), las concentraciones de sustrato y enzima fueron variables. Para obtener una mayor cantidad de S-SAM, se realizaron ensayos aumentando el tiempo de síntesis hasta 20 minutos. La determinación de la cantidad de producto S-SAM obtenido, se realizó mediante HPLC (Columna Nucleodur ec C18, Fase móvil: Buffer acetato de amonio 50 mM 1% TFA pH = 5.4, flujo 1.0 mL/min).

4.2.2 Producción de [¹¹C]CH₃I

El precursor radiactivo secundario [¹¹C]CH₃I fue producido de acuerdo con el método descrito por Buccino *et al.* (Buccino et al., 2015)

De forma abreviada, el proceso de síntesis comienza con la producción de [¹¹C]CO₂ en el ciclotrón mediante la reacción nuclear ¹⁴N(p,α)¹¹C. El [¹¹C]CO₂ producido es enviado al módulo de síntesis, donde es atrapado y purificado, para luego ser reducido a [¹¹C]CH₄ mediante hidrogenación catalítica. Posteriormente, el [¹¹C]CH₄ se transforma en [¹¹C]CH₃I al reaccionar con I₂(s) en un circuito de recirculación. (Buccino et al., 2015; F Zoppolo et al., 2017)

4.2.3 Radiosíntesis de [^{11}C]S-SAM a partir de [^{11}C]L-metionina con enzima soluble

En la Figura 31 se visualiza la configuración del módulo con las modificaciones necesarias para realizar la síntesis.

Preparación del módulo: Se pesaron 2 mg de L-Homocisteina tiolactona que fue disuelta en 50 μL de NaOH y luego se agregaron 50 μL de EtOH absoluto. Esta mezcla fue cargada en una columna Sep-Pak C18 Plus Light previamente acondicionada (para el acondicionamiento primero se lavó la columna Sep PaK C18 Plus Light lentamente con 5 mL de etanol absoluto y posteriormente se secó bajo corriente de N_2 por 15 minutos). La columna cargada fue posicionada dentro del módulo automatizado de síntesis TRACERlab® FX C Pro. Se agregaron 2 mL de buffer de actividad, 138 μL de ATP 300 mM (concentración final 0.134 mM) y 24 UE de enzima en el balón de dos bocas; por otra parte se agregó 1 mL de buffer de actividad en el vial 6. Se realizó un test de fugas a la parte gaseosa del módulo, para verificar que el sistema se encuentre en condiciones operativas y se cargó nitrógeno líquido, necesario para la síntesis de [^{11}C]CH $_3\text{I}$. Una vez posicionados todos los componentes el módulo fue cerrado y sellado para poder recibir la radiactividad, en forma de [^{11}C]CO $_2$, desde el ciclotrón.

Radiosíntesis: El proceso comenzó con la síntesis de [^{11}C]CH $_3\text{I}$, según el procedimiento descrito en 4.2.2. Luego, el [^{11}C]CH $_3\text{I}$ generado se hizo pasar por la columna Sep-Pak C18 Plus Light para que reaccionara con la L-homocistein tiolactona, produciéndose [^{11}C]L-metionina. Posteriormente, la [^{11}C]L-metionina generada se eluyó hacia el balón de dos bocas utilizando el mL de buffer de actividad del vial 6. Cuando la [^{11}C]L-metionina llega al balón de dos bocas tiene lugar la reacción enzimática. Para favorecer la interacción entre enzima y sustratos se empleó agitación magnética. Se ensayaron tiempos de síntesis enzimática de 5, 10 y 20 minutos. Una vez transcurrido dicho tiempo, se trasvasó el

contenido del balón de dos bocas hacia el vial final mediante flujo de helio. Para analizar el resultado de la radiosíntesis, el vial final se retiró del módulo automatizado, se midió la radiactividad final de la síntesis con un calibrador de dosis, registrando la hora e inmediatamente se analizaron los productos obtenidos por HPLC (Columna Nucleodur ec C18, Fase móvil: Buffer acetato de amonio 50mM 1% TFA pH=5.4, flujo 1mL/min, detectores UV y Gamma)

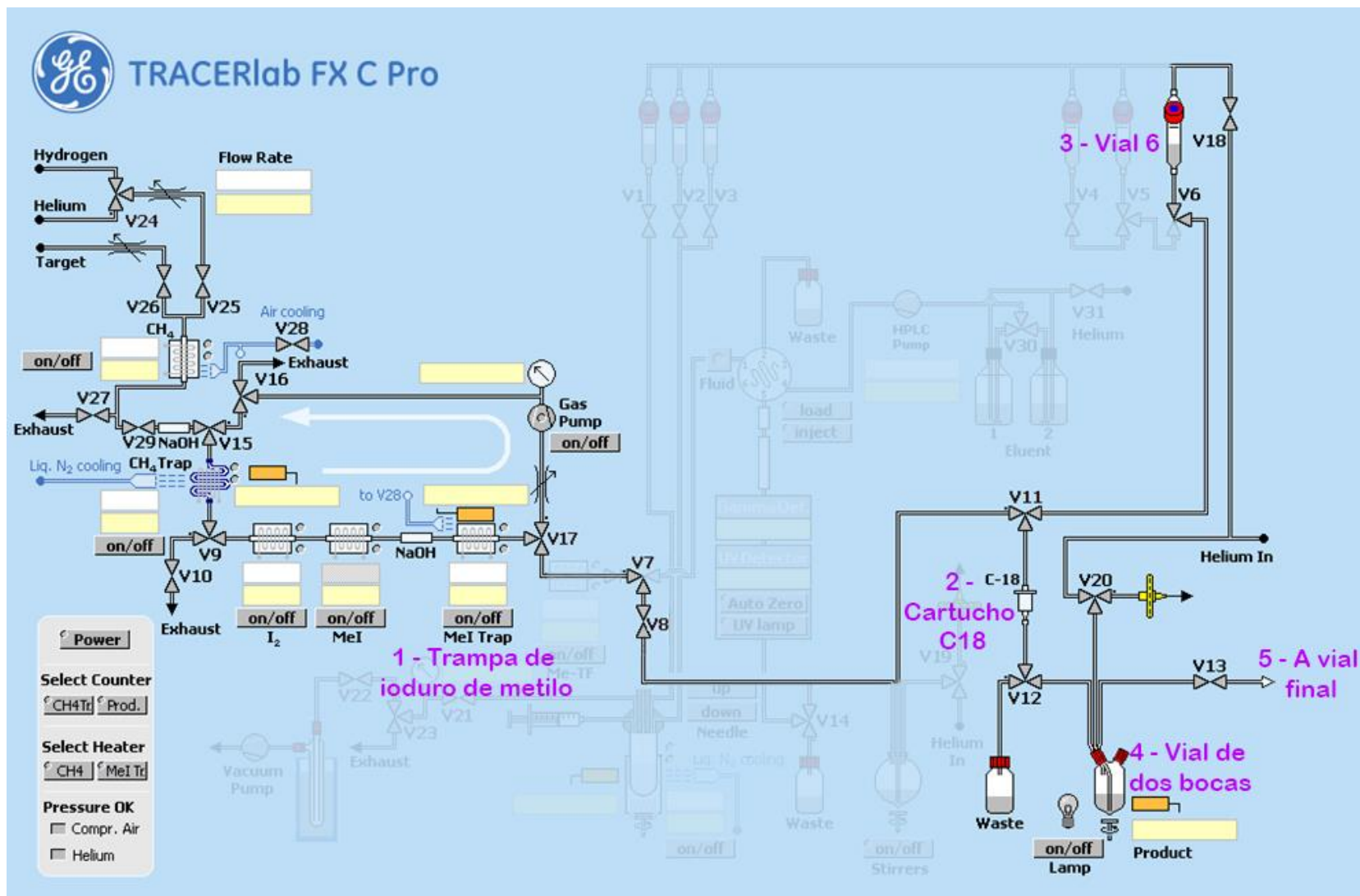


Figura 31. Configuración del módulo para radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ utilizando I303VMAT soluble. 1 – Trampa de Ioduro de metilo: final de la síntesis en fase gaseosa; 2 – Cartucho C18: síntesis de $[^{11}\text{C}]\text{L}$ -metionina; 3 – Vial 6: contiene buffer para eluir $[^{11}\text{C}]\text{L}$ -metionina; 4 – Vial de dos bocas: síntesis enzimática de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$; 5 – Vial final

4.2.4 Síntesis de S-SAM a partir de L-metionina utilizando el derivado I303V MAT-CDAP-Agarosa

El procedimiento es el mismo que le descrito para el ensayo de actividad con derivado inmovilizado en la sección en 3.2.12.

4.2.5 Radiosíntesis de [¹¹C]S-SAM a partir de [¹¹C]L-metionina utilizando el derivado I303V MAT-CDAP-Agarosa empaquetado en columna

En la Figura 32 se visualiza la configuración del módulo con las modificaciones necesarias para realizar la síntesis utilizando la enzima inmovilizada

Preparación del módulo: Se pesaron 2 mg de L-Homocisteina tiolactona que fue disuelta en 50µL de NaOH y luego se agregaron 50µL de EtOH absoluto. Esta mezcla fue cargada en una columna Sep-Pak C18 Plus Light previamente acondicionada (para el acondicionamiento primero se lavó la columna Sep PaK C18 Plus Light lentamente con 5 mL de etanol absoluto y posteriormente se secó bajo corriente de N₂ por 15 minutos). En paralelo se agregó 1g de derivado enzimático *suction dried* en una columna vacía tipo PD2 (nótese que el derivado no fue empaquetado, sino pesado en su estado *suction dried* y agregado a la columna). Tanto la columna Sep PaK C18 Plus Light como la columna cargada con derivado enzimático fueron posicionadas dentro del módulo automatizado de síntesis TRACERlab® FX C Pro, en las posiciones indicadas en la Figura 32. Se agregaron 3 mL de buffer de actividad suplementado con ATP (concentración final 3 mM) en el vial 6. Se realizó un test de fugas a la parte gaseosa del módulo, para verificar que el sistema se encuentre en condiciones operativas y se cargó nitrógeno líquido, necesario para la síntesis de [¹¹C]CH₃I. Una vez posicionados todos los componentes el módulo fue cerrado y sellado

para poder recibir la radiactividad, en forma de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, desde el ciclotrón.

Radiosíntesis: El proceso comenzó con la síntesis de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, según el procedimiento descrito en 4.2.2. Luego, el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ generado se hizo pasar por la columna Sep-Pak C18 Plus Light para que reaccionara con la L-homocisteína tiolactona, produciéndose $[^{11}\text{C}]\text{L}$ -metionina. Posteriormente, la $[^{11}\text{C}]\text{L}$ -metionina generada se eluyó hacia la columna que contenía el derivado enzimático utilizando parte del buffer de actividad suplementado con ATP del vial 6 (cantidad suficiente para ocupar el volumen muerto de la columna, controlado manualmente mediante el sistema de válvulas del módulo). Cuando la $[^{11}\text{C}]\text{L}$ -metionina llega a la columna que contiene el derivado enzimático tiene lugar la reacción enzimática. Se ensayaron tiempos de síntesis enzimática de 5 y 10 minutos. Una vez transcurrido dicho tiempo, se trasvasó el contenido del balón de dos bocas hacia el vial final utilizando la cantidad de buffer de actividad remanente en el vial 6. Para analizar el resultado de la radiosíntesis, el vial final se retiró del módulo automatizado, se midió la radiactividad final de la síntesis con un calibrador de dosis, registrando la hora e inmediatamente se analizaron los productos obtenidos por HPLC (Columna Nucleodur ec C18, Fase móvil: Buffer acetato de amonio 50mM 1% TFA pH=5.4, flujo 1mL/min, detectores UV y Gamma)

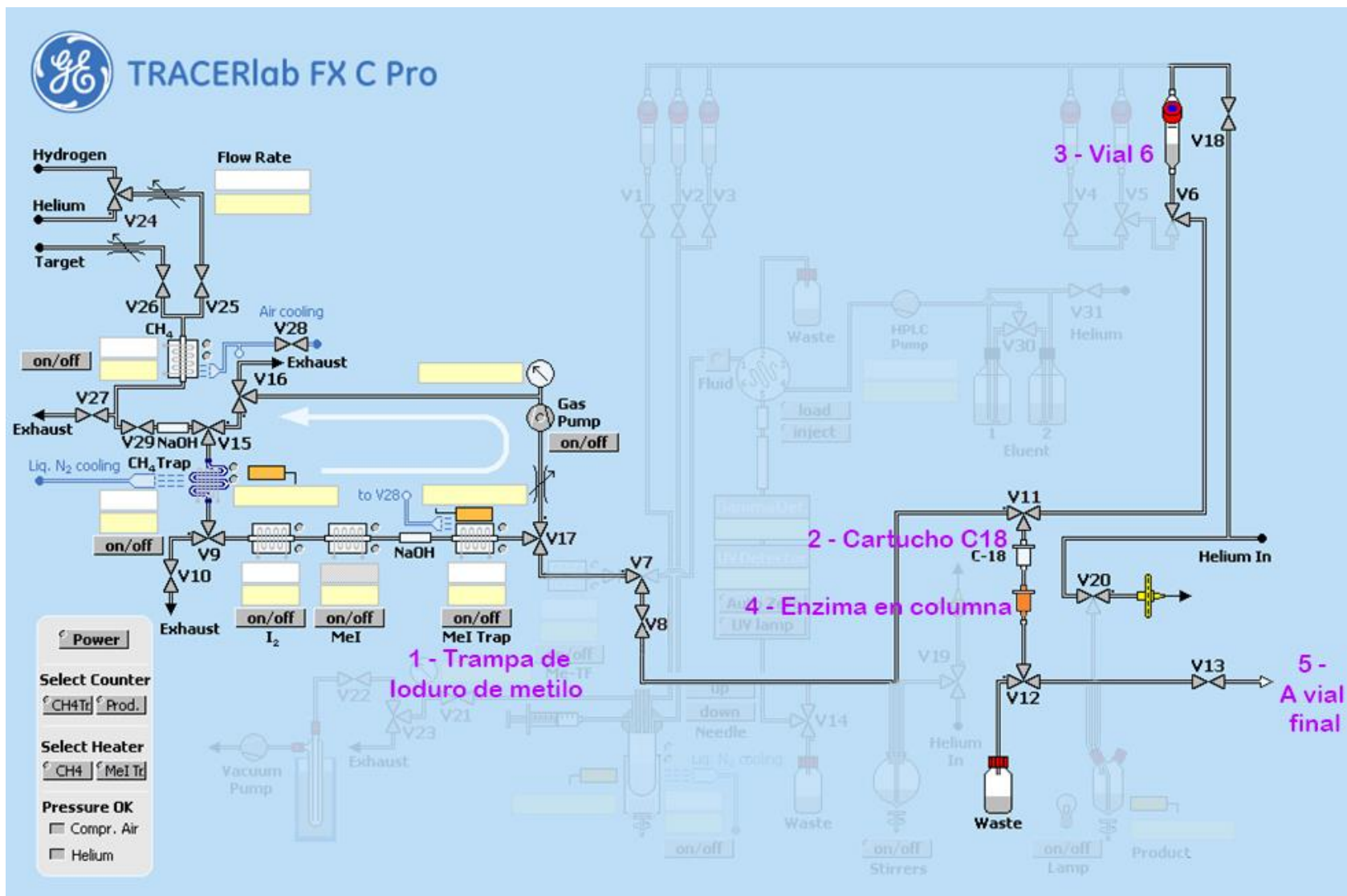


Figura 32. Configuración del módulo para radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ utilizando I303VMAT inmovilizada empaquetada en columna. 1 – Trampa de Ioduro de metilo: final de la síntesis en fase gaseosa; 2 – Cartucho C18: síntesis de $[^{11}\text{C}]\text{L}$ -metionina; 3 – Vial 6: contiene buffer para eluir $[^{11}\text{C}]\text{L}$ -metionina; 4 – Columna con enzima inmovilizada: síntesis enzimática de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$; 5 – Vial final.

4.2.6 Radiosíntesis de [^{11}C]S-SAM a partir de [^{11}C]L-metionina utilizando el derivado I303V MAT-CDAP-Agarosa en suspensión

En la Figura 32 se visualiza la configuración del módulo con las modificaciones necesarias para realizar la síntesis.

Preparación del módulo: Se pesaron 2 mg de L-Homocisteina tiolactona que fue disuelta en 50 μL de NaOH y luego se agregaron 50 μL de EtOH absoluto. Esta mezcla fue cargada en una columna Sep-Pak C18 Plus Light previamente acondicionada (para el acondicionamiento primero se lavó la columna Sep PaK C18 Plus Light lentamente con 5 mL de etanol absoluto y posteriormente se secó bajo corriente de N_2 por 15 minutos). La columna cargada fue posicionada dentro del módulo automatizado de síntesis TRACERlab® FX C Pro. Se agregaron 2 mL de buffer de actividad, 138 μL de ATP 300 mM (concentración final 0.134 mM) y una cantidad definida de derivado enzimático inmovilizado (se empleó 1g, 0.3g y 0.1g, o lo que es equivalente 16UE, 4.8UE o 1.6UE) en el balón colector y, por otra parte, se agregó 1 mL de buffer de actividad en el vial 2. Se realizó un test de fugas a la parte gaseosa del módulo para verificar que el sistema se encuentre en condiciones operativas y se cargó nitrógeno líquido, necesario para la síntesis de [^{11}C]CH₃I. Una vez posicionados todos los componentes el módulo fue cerrado y sellado para poder recibir la radiactividad, en forma de [^{11}C]CO₂, desde el ciclotrón.

Radiosíntesis: El proceso comenzó con la síntesis de [^{11}C]CH₃I, según el procedimiento descrito en 4.2.2. Luego, el [^{11}C]CH₃I generado se hizo pasar por la columna Sep-Pak C18 Plus Light para que reaccionara con la L-homocisteina tiolactona, produciéndose [^{11}C]L-metionina. Posteriormente, la [^{11}C]L-metionina generada se eluyó hacia el balón colector utilizando el mL de buffer de actividad del vial 2. Cuando la [^{11}C]L-metionina llega

al balón colector tiene lugar la reacción enzimática. Para favorecer la interacción entre el derivado enzimático inmovilizado y los sustratos se empleó agitación magnética. Se ensayaron tiempos de síntesis enzimática de 5 y 10 minutos. Una vez transcurrido dicho tiempo, se trasvasó el contenido del balón colector hacia el vial final mediante flujo de helio, haciéndolo pasar por un filtro que contuvo al derivado enzimático, separándolo así del crudo de reacción. Para analizar el resultado de la radiosíntesis, el vial final se retiró del módulo automatizado, se midió la radiactividad final de la síntesis con un calibrador de dosis, registrando la hora e inmediatamente se analizaron los productos obtenidos por HPLC (Columna Nucleodur ec C18, Fase móvil: Buffer acetato de amonio 50mM 1% TFA pH=5.4, flujo 1mL/min, detectores UV y Gamma)

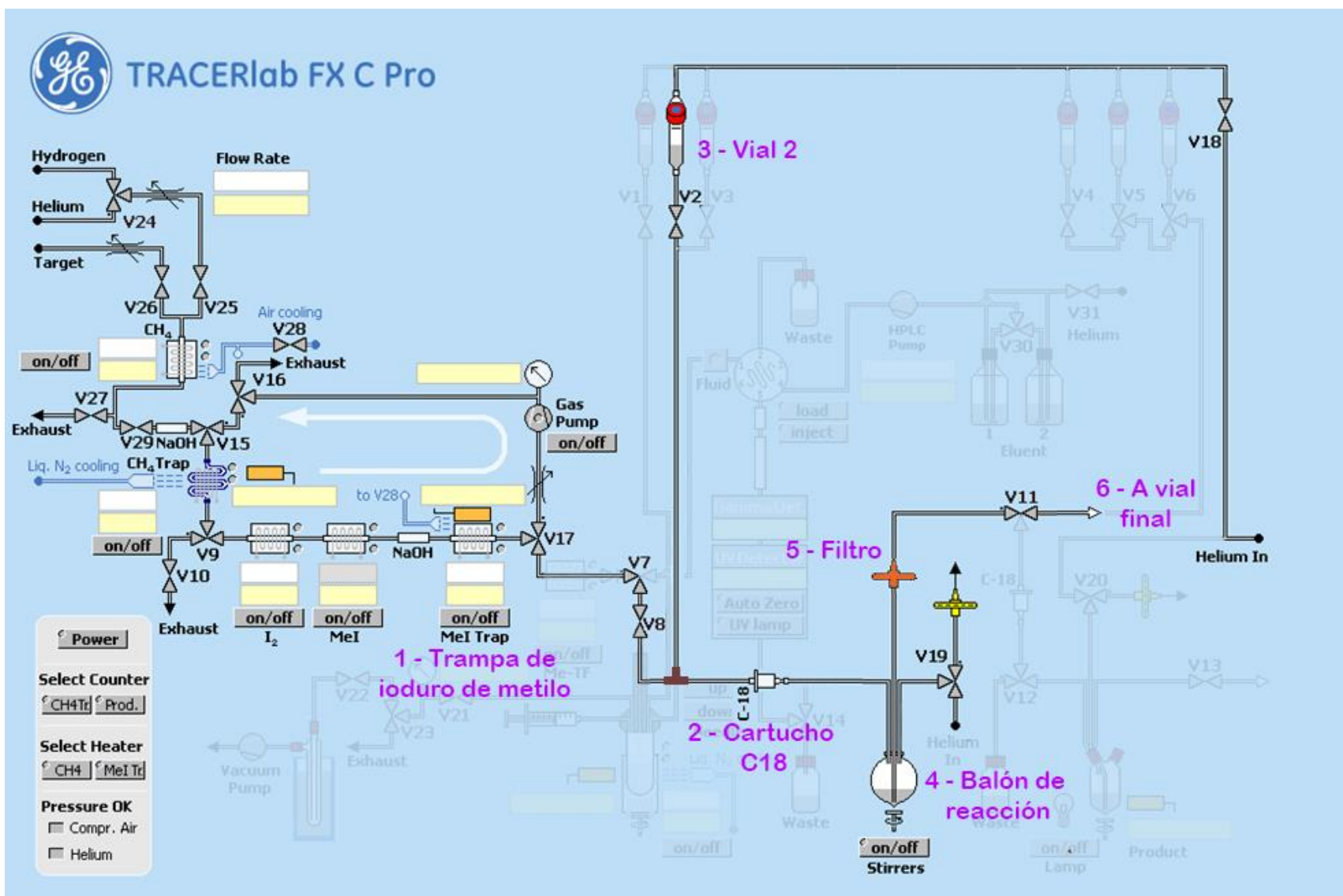


Figura 33. Configuración del módulo para radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ utilizando I303VMAT inmovilizada en suspensión. 1 – Trampa de Ioduro de metilo: final de la síntesis en fase gaseosa; 2 – Cartucho C18: síntesis de $[^{11}\text{C}]\text{L}$ -metionina; 3 – Vial 2: contiene buffer para eluir $[^{11}\text{C}]\text{L}$ -metionina; 4 – Balón de reacción: síntesis enzimática de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ con derivado inmovilizado en suspensión. Agitación magnética; 5 – filtro para retener derivado inmovilizado; 6 – Vial final.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Síntesis de S-SAM a partir de L-metionina con enzima soluble y estudios de enantioselectividad

Como se discutió en el Capítulo 1, el ensayo de actividad realizado para la caracterización de la enzima implicó llevar adelante la síntesis de SAM, siendo la primera confirmación de que la reacción estaba teniendo lugar. En estas condiciones, para obtener una mayor cantidad de SAM, se realizaron ensayos aumentando el tiempo de síntesis hasta 20 minutos. A la hora de analizar los productos obtenidos debe considerarse que a priori la síntesis podría dar lugar a cuatro posibles isómeros de SAM: (S,S) , (S,R) , (R,S) y (R,R) pero como en los ensayos con sustratos no radiactivos se parte de L-Metionina 99% pura las opciones se reducen a dos: (S,S) y (R,S) ; estos dos isómeros de SAM son diasterómeros, lo que posibilita su separación cromatográfica sin la necesidad de emplear un agente derivatizante quirál o columnas quirales. A partir de la comparación con un estándar comercial de SAM (Sigma-Aldrich), estos ensayos permitieron confirmar que la síntesis propuesta produce el enantiómero de interés (S,S) con un exceso diasteromérico mayor al 99%, estando el exceso enantiomérico determinado por la pureza óptica del material de partida. Los resultados pueden apreciarse en la Figura 34.

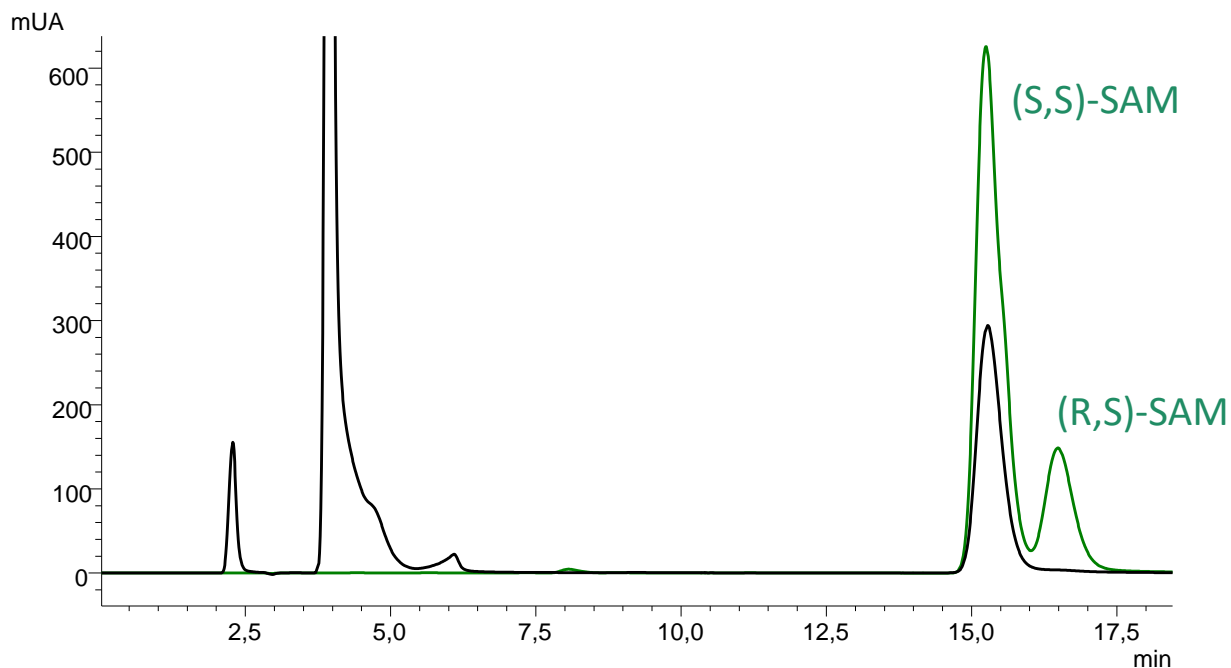


Figura 34. Cromatograma HPLC. Negro: síntesis de SAM con enzima soluble (0.7 UE/mL I303VMAT, 10 mM ATP, 10mM L-Met, 20 minutos de reacción). Verde: Estándar comercial de SAM.

La confirmación de que la reacción enzimática estaba teniendo lugar en las condiciones del ensayo de actividad y que el producto sintetizado era el isómero de interés, sentó las bases para estudiar la síntesis en condiciones más próximas a las que se utilizarían en la radiosíntesis. Considerando las bajas cantidades de producto que se obtienen en la síntesis de $[^{11}\text{C}]$ -L-Metionina (concentraciones en el entorno de 0.137 mM) y el hecho de que el sustrato radiactivo podría tener un efecto negativo sobre la estabilidad de la enzima, se decidió utilizar una concentración de enzima mayor a la empleada en los ensayos previos. El resultado obtenido se muestra en la Figura 35, donde fue posible asignar el pico correspondiente al producto de interés mediante la comparación con un estándar comercial. El resto de los picos que aparecen en el crudo también aparecen en el blanco de reacción; además, se inyectó un estándar de ATP, pudiendo determinar que el pico que aparece a los 5 minutos corresponde a dicho producto. Si bien no fue posible la

cuantificación del producto debido a que la señal obtenida estaba por debajo del límite de cuantificación del método analítico (ver curva de calibración en 7.2), la sensibilidad del método fue suficiente para detectar la presencia de (*S,S*)-SAM, a los 20 minutos de reacción.

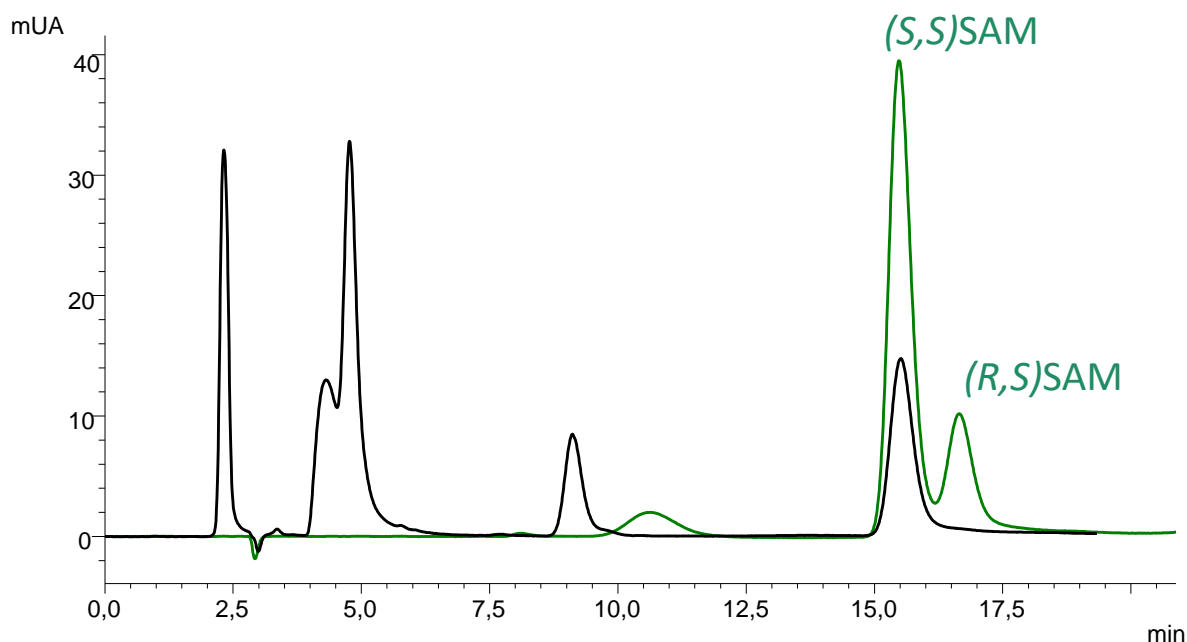


Figura 35. Cromatograma HPLC. Negro: síntesis de SAM con enzima soluble (7 UE/mL I303VMAT, 0.134 mM ATP, 0.134 mM L-Met, 20 minutos de reacción). Verde: Estándar comercial de SAM.

Para la radiosíntesis de [^{11}C]SAM hay que tener otro factor en consideración a la hora de discutir la pureza enantiomérica del producto final. La radiosíntesis de [^{11}C]Metionina da como resultado una mezcla 90:10 L-Metionina : D-Metionina, lo que podría dar lugar a la formación del isómero (*R,R*) si la enzima fuera capaz de reconocer a la D-Metionina como sustrato. Esto no sería detectable mediante la herramienta analítica utilizada, dado que en las condiciones cromatográficas empleadas los isómeros (*R,R*) y (*S,S*) no se separarían, por ser enantiómeros.

Para comprobar si la enzima era capaz de aceptar como sustrato a la D-Metionina se realizaron ensayos análogos al ensayo de síntesis descrito en 4.2.1, empleando D-Metionina (Sigma-Aldrich) en lugar de L-Metionina. En una primera instancia se realizaron ensayos

a 5 y 20 minutos, obteniendo cantidades de SAM por debajo del límite de cuantificación de la metodología analítica empleada, entonces se decidió realizar ensayos a tiempos mayores y determinar la velocidad de formación de SAM a partir de D-Metionina y ATP. Se realizaron experimentos por triplicado a 30, 45, 60, 75 y 90 minutos, confirmando que en el tiempo estudiado la reacción se encuentra en condición de velocidades iniciales (ver Figura 36). Fue posible confirmar que, en los tiempos establecidos para la síntesis (de 5 a 20 minutos), la enzima es 30 veces más veloz en la formación de SAM a partir de L-Metionina que a partir de su isómero, la D-metionina. Por lo tanto, considerando además que en la radiosíntesis se genera [¹¹C]Metionina en una relación 90:10 a favor del isómero L, fue posible afirmar que la producción del isómero (R,R)SAM en las condiciones de radiosíntesis se encuentra cinéticamente desfavorecida y, en consecuencia, se generarían cantidades no significativas de este compuesto.

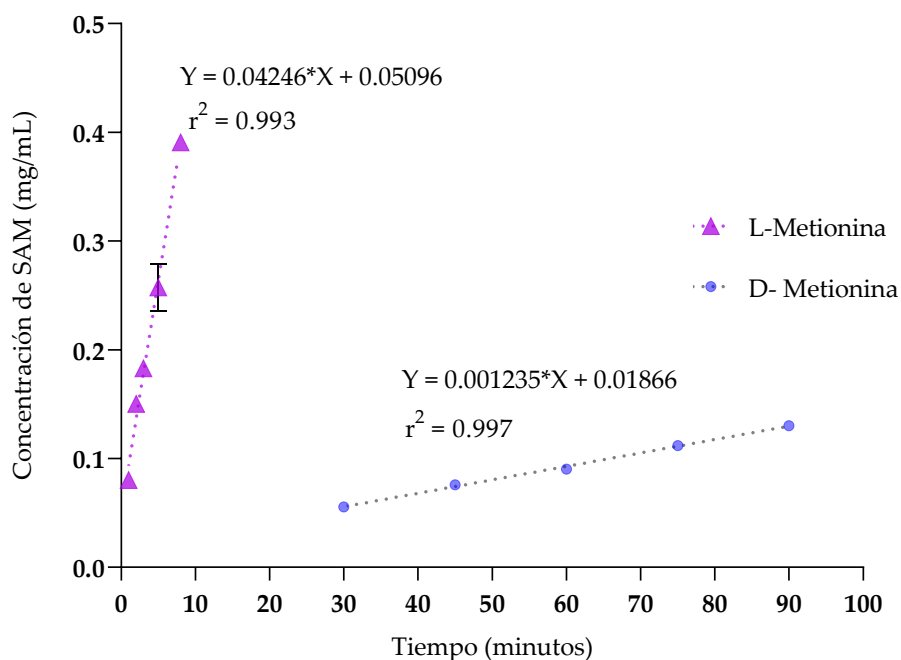


Figura 36. Formación de SAM a partir de L-Met vs D-Met. Confirmación de condición de velocidades iniciales.

4.3.2 Radiosíntesis de [¹¹C]S-SAM a partir de [¹¹C]L-metionina con enzima soluble

Se realizó el ensayo en la plataforma GE Tracer Lab del CUDIM, en las condiciones descritas en 0. Las adaptaciones realizadas al módulo para posibilitar la síntesis enzimática impidieron la termostatación del balón donde se llevó a cabo la reacción, por lo que se realizó la síntesis a temperatura ambiente. A los 10 minutos de reacción se tomó una muestra y se analizaron los productos por HPLC. Los picos fueron asignados por comparación con estándares de SAM en condiciones de separación de los diastereómeros, e inyecciones previas de [¹¹C]L-Metionina. La Figura 37 muestra los cromatogramas UV (negro) y gamma (naranja) superpuestos. Dado que la señal gamma es la misma para cualquier molécula, es posible realizar cálculos de conversión, relacionando el área del pico de SAM y la suma de las áreas de SAM y L-Met, determinándose que a los 10 minutos de radiosíntesis se obtiene una conversión del $(84 \pm 6) \%$ (n=3).

Es importante destacar que en estas condiciones se mantuvo la estereoselectividad de la enzima, obteniéndose al igual que con el sustrato sin marcar, un exceso diastereomérico mayor al 99%, en contraposición a lo reportado para la síntesis clásica (relación de isómeros (R,S):(S,S) 53:47). (F Zoppolo et al., 2017)

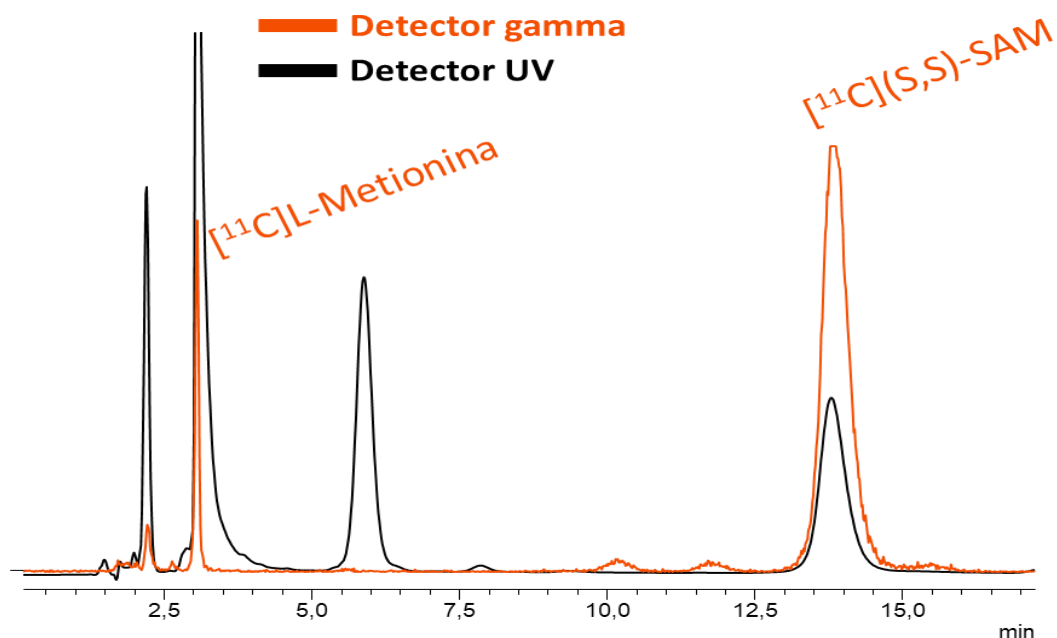


Figura 37. Cromatogramas HPLC radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ con enzima soluble. Negro: detector UV $\lambda = 254$ nm (señal amplificada). Naranja: detector Gamma.

Para evaluar el rendimiento radioquímico global, es decir, cuánto del $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ producido se convirtió en $[^{11}\text{C}](S,S)\text{SAM}$, se consideró la radiactividad de la muestra medida al final de la síntesis y se calculó a partir del cromatograma cuánto de esta correspondía a la $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$. Luego ese valor se comparó con la radiactividad medida al final de la síntesis de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, obteniendo un rendimiento de $(60 \pm 5) \%$ si se corrige la radiactividad de la SAM considerando el decaimiento (%R, dc) y de $(38 \pm 5) \%$ si no se corrige por decaimiento (%R, ndc). Nuevamente, la síntesis enzimática resulta superior a la síntesis clásica, cuyo %R de marcación no corregido por decaimiento es del $(10 \pm 2) \%$. (Florencia Zoppolo, 2018)

Si bien estos resultados son sumamente alentadores, como se dijo anteriormente, el uso de la enzima soluble para la aplicación final no es factible, pues la purificación del fármaco sería muy dificultosa. Debido a esto se pasó a ensayar la síntesis utilizando el derivado inmovilizado de la enzima.

4.3.3 Radiosíntesis de [¹¹C]S-SAM a partir de [¹¹C]L-metionina utilizando el derivado I303V MAT-CDAP-Agarosa

Las ventajas de utilizar el derivado inmovilizado fueron discutidas con anterioridad, no obstante, la implementación de la síntesis heterogénea implicó el desafío de realizar modificaciones al módulo automatizado del CUDIM, en particular una adaptación que permitiera separar al derivado inmovilizado del producto final, una vez concluida la síntesis. En este sentido, la radiosíntesis fue ensayada en dos modalidades: i) utilizando el derivado enzimático inmovilizado confinado en una columna y ii) utilizando el derivado en suspensión, con agitación magnética.

4.3.3.1 Síntesis con el derivado I303V MAT-CDAP-Agarosa en columna

En general cuando se utiliza derivado inmovilizado empaquetado en columna se suele recircular la fase líquida a través de esta, de manera de aumentar el porcentaje de conversión de la reacción; esta configuración tiene como ventaja que no se requiere agitación mecánica del derivado y por lo tanto el mismo no está expuesto a desgaste físico. Sin embargo, debido a la manera en que funciona el módulo automatizado del CUDIM no fue posible adaptar un sistema de recircularización.

Para llevar a cabo estos experimentos se utilizó una columna tipo PD-2 (GE) vacía, para la que se confeccionó un adaptador mediante impresión 3D, para integrarla al módulo automatizado de radiosíntesis. En esta columna se agregó una alícuota del derivado enzimático inmovilizado *suction dried*. Como se observa en el esquema de la Figura 32, la columna fue posicionada de tal forma que fuera posible adicionar la mezcla conteniendo el buffer de actividad y los sustratos necesarios para la síntesis. El volumen de fase líquida

que entra en contacto con el derivado está limitado por el volumen total de la columna, siendo un volumen bastante pequeño y difícil de movilizar desde los controles externos del equipo. La fase líquida se dejó en contacto con el derivado enzimático inmovilizado durante 10 minutos y posteriormente la mezcla fue eluida por desplazamiento con buffer de actividad.

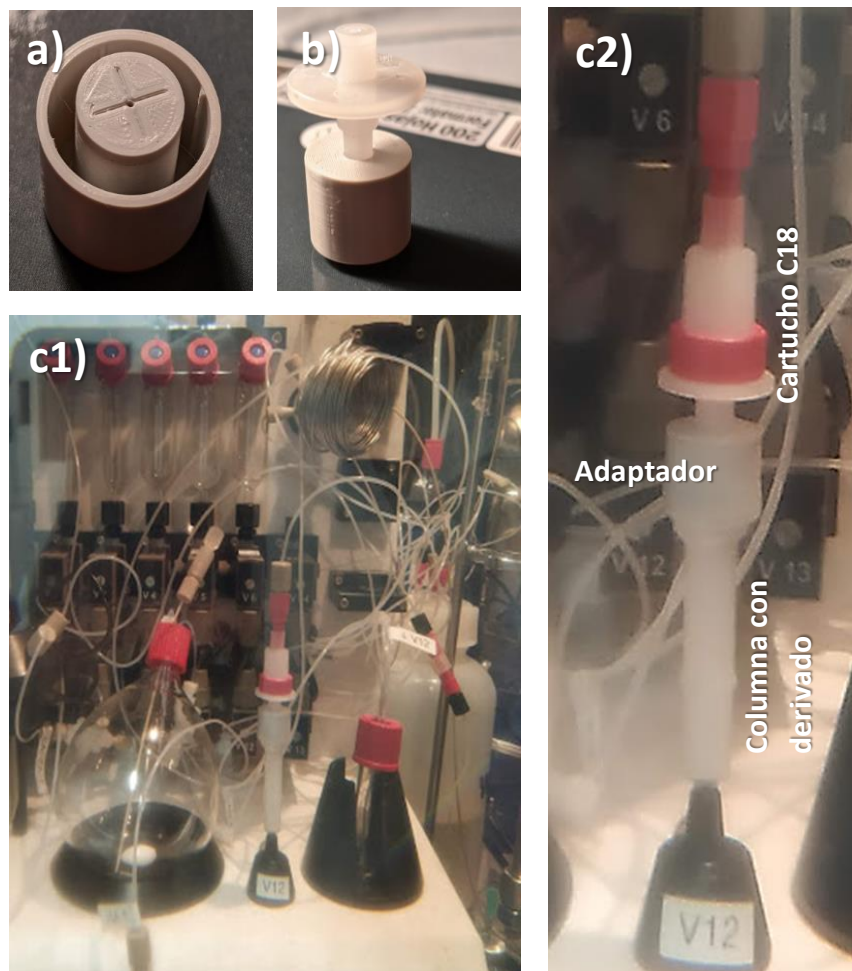


Figura 38. Adaptación para utilizar el derivado inmovilizado en columna. a) adaptador confeccionado por impresión 3D que se coloca en la parte superior de la PD-2, b) ajuste del adaptador a la salida del cartucho C18 c) 1- sistema completo dentro del módulo 2- Ampliación de modificaciones.

En la Figura 38 se aprecia el sistema modificado para esta síntesis y la configuración esquemática se visualiza en la Figura 32. La mayor limitación de este método es que el

volumen con el que se eluye la [^{11}C]L-Met es pequeño, dado que no se pudo adaptar un sistema de recircularización y por lo tanto, el volumen de elución no puede superar al volumen libre de la PD-2 donde se encuentra el derivado, de lo contrario parte de la [^{11}C]L-Met avanzaría por las tuberías del sistema, no entrando en contacto con la enzima. Además, el sistema de control del flujo dentro del módulo se basa en la presión que ejerce una corriente de helio y la apertura y cierre de válvulas por parte del operario, este sistema no está pensado para movilizar una cantidad exacta y tan pequeña de fase líquida. Por lo que la baja robustez del sistema aumenta el riesgo de que se pierda parte de la [^{11}C]L-Met eluida del cartucho simplemente porque el sistema no permita cerrar la válvula a tiempo. Por otro lado, el bajo volumen de elución podría no ser suficiente para eluir la totalidad de la [^{11}C]L-Met sintetizada, quedando parte de esta retenida en el cartucho C18. Por lo tanto, la aplicación de este sistema presenta alto riesgo de que parte del sustrato marcado nunca entre en contacto con la enzima inmovilizada o de que parte del producto marcado quede atrapado en la columna, disminuyendo el rendimiento de conversión de síntesis.

No obstante, a pesar de las limitaciones comentadas la síntesis mostró un porcentaje de conversión del 49% en 10 minutos de reacción, con un rendimiento de marcación de [^{11}C](S,S)SAM respecto al [^{11}C]CH₃I de 15% (no corregido por decaimiento) y 24% (corregido por decaimiento), manteniéndose el exceso diastereomérico mayor al 99%. En la Figura 39 se observan los cromatogramas obtenidos del crudo de reacción (detectores UV y Gamma) y un estándar de SAM, que confirma el exceso diastereomérico obtenido.

Si bien la conversión lograda es sensiblemente inferior que la obtenida para la enzima soluble, considerando las limitaciones de la adaptación del método al módulo previamente discutidas, puede decirse que esta es una buena primera aproximación, que demuestra la capacidad del derivado enzimático inmovilizado para catalizar la radiosíntesis en los

tiempos requeridos y manteniendo el exceso diastereomérico observado para la síntesis con la enzima soluble.

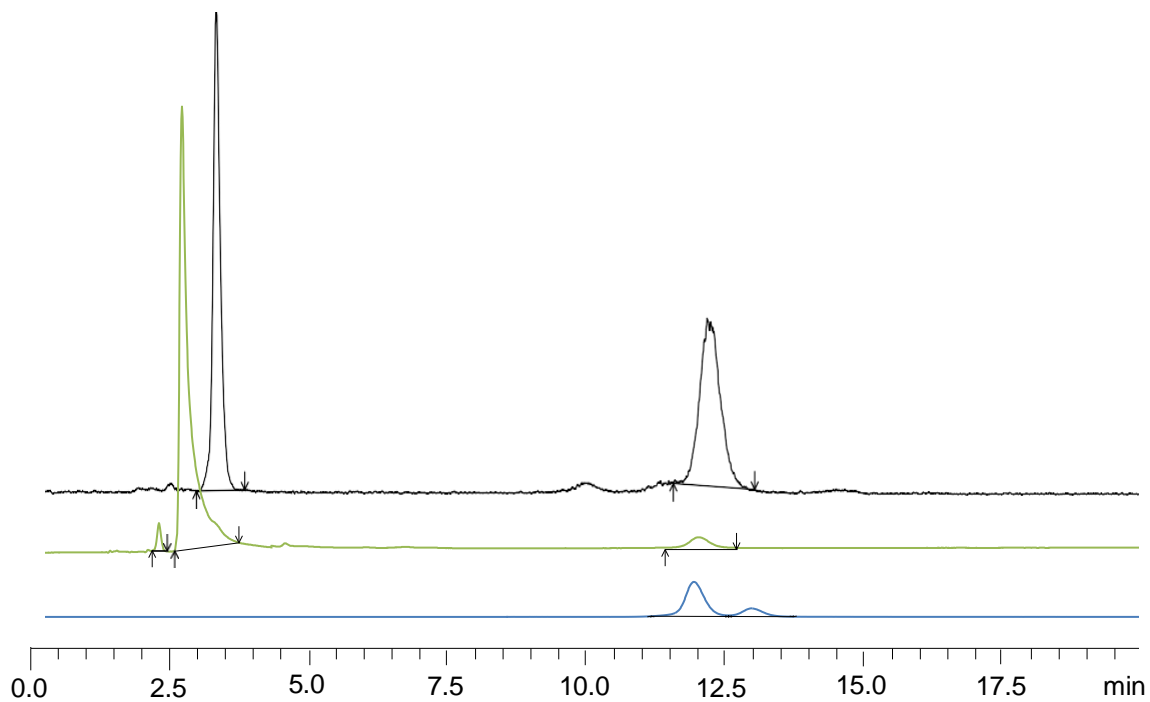


Figura 39. Cromatograma HPLC radiosíntesis de $[^{14}\text{C}]\text{SAM}$ con derivado inmovilizado I303V MAT-CDAP-Agarosa en columna. Negro: detector Gamma; Verde: detector UV; Azul: Estándar de SAM, detector UV

4.3.3.2 Síntesis con el derivado I303V MAT-CDAP-Agarosa en suspensión con agitación magnética

En vista de los resultados obtenidos en la radiosíntesis utilizando el derivado en columna y con el objetivo de favorecer la interacción entre la mezcla reactiva y el derivado inmovilizado, se consideró oportuno ensayar la síntesis empleando el derivado en suspensión y con agitación mecánica (agitador magnético). Se consideró que la resistencia mecánica del soporte sólido (agarosa entrecruzada al 4%) al cual está unida la enzima era suficiente para soportar el desgaste producido por la agitación magnética durante el proceso, puesto que la resistencia de este polímero ha sido reportada (Zucca et al., 2016) y además se trata de un proceso corto (5-10 minutos). De todas formas, la estabilidad mecánica del derivado enzimático inmovilizado debe ser un factor a tener en cuenta a la hora de realizar reusos del biocatalizador.

Para llevar adelante la síntesis, nuevamente fue necesario realizar modificaciones al módulo de radiosíntesis, en este caso se adicionó un filtro que permitió separar el derivado en fase sólida de la mezcla reactiva al final de la síntesis; este fue construido a partir de una columna PD-10 vacía (GE), recortada y sellada. El sistema modificado puede apreciarse en las imágenes de la Figura 40 y en el esquema de la Figura 33.

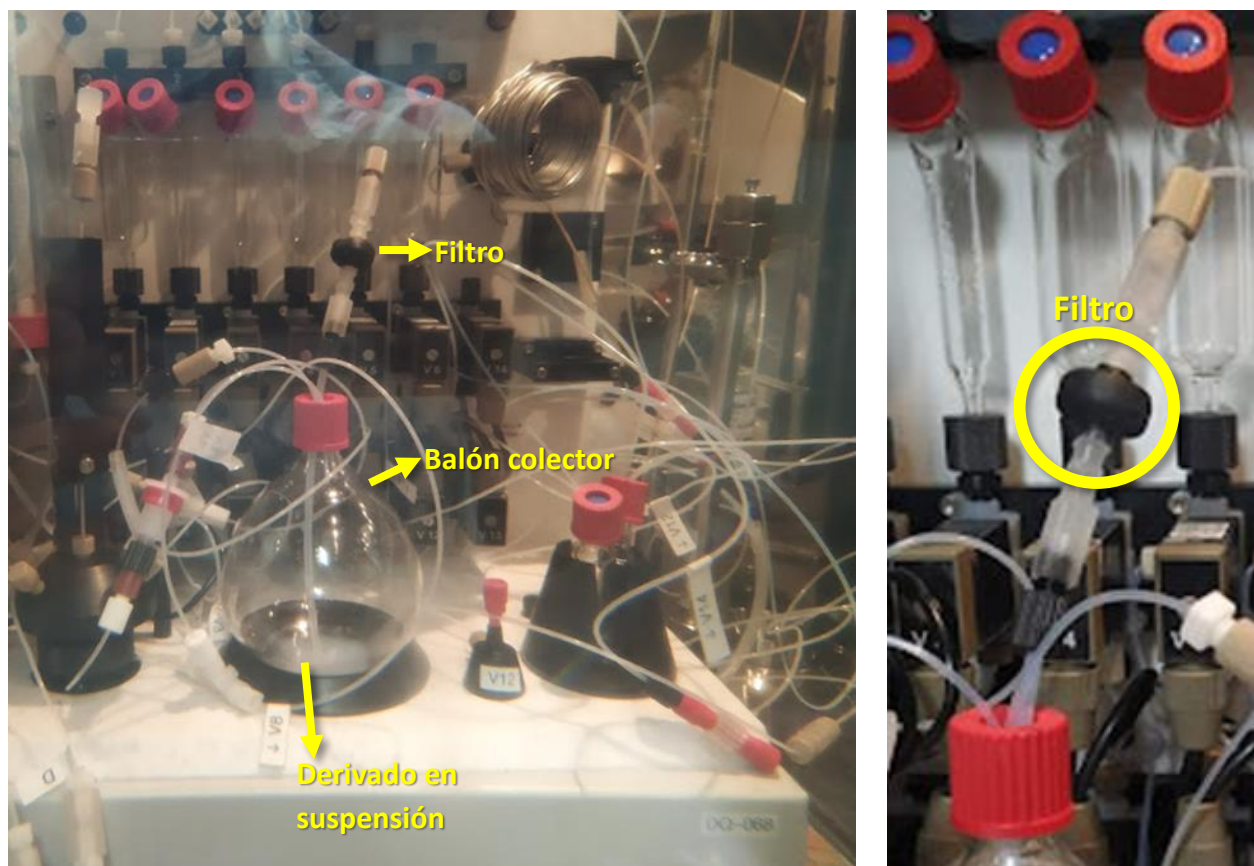


Figura 40. Adaptación para uso del derivado inmovilizado en suspensión con agitación magnética.

Se ensayaron variantes en tiempos de reacción y cantidad de derivado, obteniéndose en todos los casos $[^{11}\text{C}](S,S)\text{SAM}$ con un exceso diastereomérico mayor al 99%. Como ejemplo, en la Figura 41 se muestra un cromatograma del crudo de reacción (detectores UV y gamma) y un estándar de SAM (detector UV); el perfil de picos observado fue el mismo para todas las condiciones ensayadas.

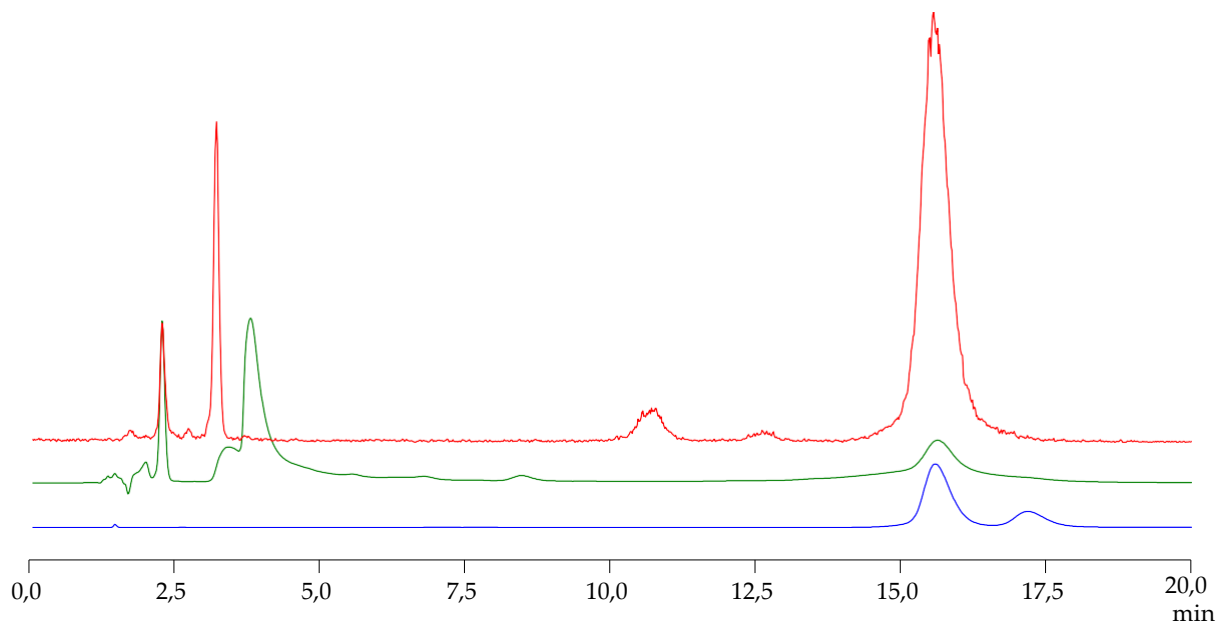


Figura 41. Cromatograma HPLC de radio síntesis de $(S,S)[^{14}C]SAM$ con derivado enzimático inmovilizado en batch con agitación. Naranja: crudo de reacción, detector gamma; Verde: crudo de reacción, detector UV; Azul: Estándar de SAM, detector UV.

En la Tabla 11 se resumen los resultados obtenidos de todas las variables estudiadas. Si se comparan los ensayos con enzima soluble, el derivado en columna y en suspensión para el mismo tiempo de reacción (10 minutos) y cantidad de UE en la mezcla reactiva muy similares, se observa que los porcentajes de conversión en el caso de la enzima soluble y el derivado en suspensión son comparables (del orden de 85%); mientras que para el derivado en columna es sensiblemente inferior (49.3%), probablemente por los problemas difusionales y técnicos que presenta la modalidad de trabajo en columna.

Tabla 11. Tabla comparativa de síntesis enzimática de [¹¹C]SAM

n	Masa total de derivado (g)	Actividad enzimática total en MR (UE totales)	Tiempo de marcación (minutos)	Catalizador	% Conversión [¹¹ C]L-Met: [¹¹ C](S,S)SAM *	R(% ,ndc,MeI) en [¹¹ C](S,S)SAM **	R(% ,dc,MeI) [¹¹ C](S,S)SAM ***	% de (%)
2	N/A	25.0	10	Soluble	84.9 ± 6.5	37.6 ± 5.2	60.4 ± 5.4	> 99
1	N/A	26.0	5	Soluble	72.9	38.1	51.8	> 99
1	1.0	24.0	10	Derivado en columna	49.3	15.0	24.3	> 99
4	1.0	18.2	10	Derivado en suspensión	87.3 ± 1.8	9.1 ± 1.9	15.3 ± 3.8	> 99
1	1.0	16.0	5	Derivado en suspensión	80	16.5	27.6	> 99
3	0.3	4.8	5	Derivado en suspensión	80.2 ± 9.5	11.0 ± 1.2	17.5 ± 0.6	> 99
1	0.1	1.6	5	Derivado en suspensión	57.8	10.7	15.5	> 99

* Relación de picos de [¹¹C]L-Met y [¹¹C](S,S)SAM en cromatograma HPLC (detector gamma)

** Cantidad de [¹¹C](S,S)SAM obtenida en relación a la cantidad inicial de [¹¹C]CH₃I producida

*** Cantidad de [¹¹C](S,S)SAM obtenida en relación a la cantidad inicial de [¹¹C]CH₃I producida, corregida por decaimiento

Habiendo confirmado que la radiosíntesis con el derivado enzimático inmovilizado en suspensión tiene lugar y que presenta buenos porcentajes de conversión, se evaluó el efecto de reducir el tiempo de síntesis de 10 a 5 minutos. Para ello se comparó el porcentaje de conversión obtenido con 1.0 g de derivado en suspensión a 10 y 5 minutos de reacción, donde se observó una leve disminución (de 87.3% a 80%) a tiempos más cortos. Dado que, como se mencionó anteriormente, la semivida de desintegración del ^{11}C es muy corta, se consideró que aunque el porcentaje de conversión obtenido sea algo menor, la reducción del tiempo de síntesis a la mitad es beneficiosa para el rendimiento global del proceso.

Luego se evaluó reducir la cantidad de UE que se utilizan en la reacción, ya que tendría un impacto positivo no solo desde el punto de vista económico, por utilizar una menor cantidad de derivado enzimático inmovilizado, sino también desde el punto de vista práctico, puesto que manejar menores cantidades de derivado sólido facilitaría el filtrado al final de la síntesis, disminuyendo la posibilidad de que se produzcan obstrucciones en el sistema. Además, si se reduce la cantidad de catalizador, el proceso se alinearía aún más a los criterios de la Química Verde.

Para un tiempo de síntesis de 5 minutos, al disminuir la cantidad de derivado enzimático inmovilizado a 0.3 g (4.8 UE), el porcentaje de conversión en la radiosíntesis se mantuvo en los mismos niveles obtenidos tanto con la enzima soluble como con 1.0 g (16 UE) de derivado en suspensión. Sin embargo, cuando se disminuyó la cantidad de UE en la mezcla reactiva al décimo de la inicial (0.1 g de derivado enzimático inmovilizado, 1.6 UE) se observó que el porcentaje de conversión disminuyó al 58%.

Cuando se comparan los rendimientos de marcación obtenidos con el derivado en suspensión (1.0 y 0.3 g) y con la enzima soluble para 5 minutos de reacción, se observa que para esta última es tres veces más alto (Figura 42). Una posible explicación, es el efecto que puedan tener las modificaciones realizadas al sistema cuando se trabaja con el derivado en

suspensión, dado que el agregado de tubuladuras, válvulas y adaptadores aumentan las pérdidas de CH_3I y el rendimiento de marcación se mide en relación a este compuesto gaseoso. Mejorando la estanqueidad del sistema, sería de esperar que los rendimientos de marcación mejoren.

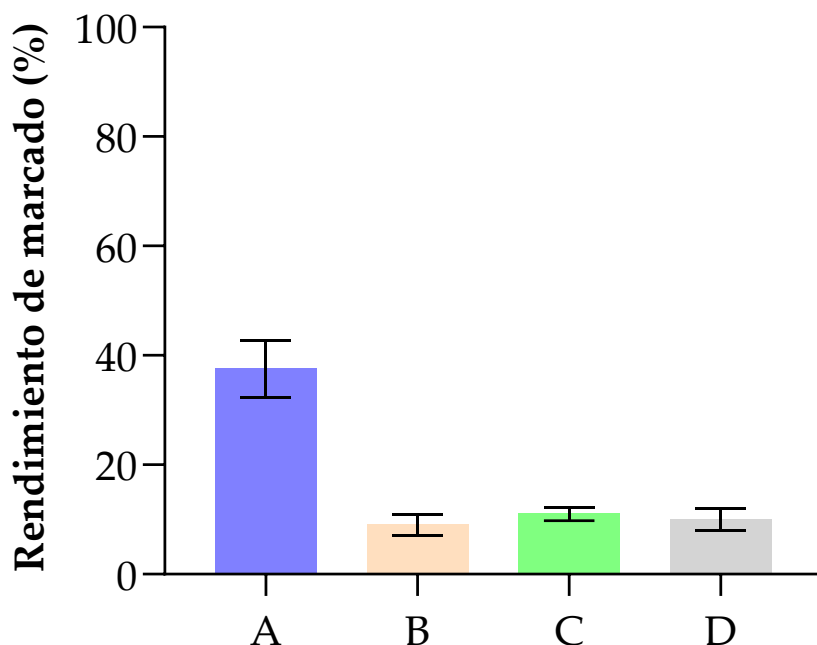


Figura 42. % de Rendimiento de marcación (MeI, ndc) de ^{11}C SAM obtenidos a tiempo de síntesis 5 minutos. A: Enzima soluble; B: 1.0 g de derivado; C: 0.3 g de derivado; D: Síntesis clásica

Cabe aclarar que los rendimientos de marcación se encuentran también sujetos a una alta variabilidad asociada a la cantidad inicial de radioactividad de partida y a que se trata de un rendimiento que abarca más de una reacción química, lo ideal sería contar con una medida de radioactividad de la metionina generada en el sistema al comienzo de la síntesis enzimática, pero esto no es posible debido a limitaciones del módulo.

Por otra parte, vale recordar que como la síntesis enzimática ocurre con un exceso

diastereomérico mayor al 99%, aunque se alcance el mismo rendimiento de marcación, la cantidad de [^{11}C](*S,S*)SAM producida fue mayor a la obtenida en la síntesis química (mezcla de isómeros 53:47 (*R,S*):(*S,S*)).

De todas formas, a los efectos de la aplicación de interés, los rendimientos de marcación resultaron satisfactorios, contando además con la posibilidad de optimizar la cantidad de producto obtenido mediante el aumento de la cantidad inicial de CH_3I producido.

Por lo tanto, en base a los resultados anteriores, se eligieron como las condiciones más adecuadas para la radiosíntesis el uso del derivado inmovilizado en suspensión que represente aproximadamente 4.8 UE de I303VMAT en la mezcla reactiva y un tiempo de reacción de 5 minutos.

Por último, con las condiciones definidas, se iniciaron estudios para determinar la capacidad de reutilizar el biocatalizador inmovilizado. Para esto se realizaron experimentos sucesivos de uso con el mismo derivado enzimático inmovilizado, determinando los porcentajes de conversión y los rendimientos de marcación. Estos resultados pueden observarse en la Tabla 12. Aunque con un alto margen de error, se observa una disminución moderada en el porcentaje de conversión a medida que aumentan los reusos. Se consideró como mínima conversión aceptable 50%, aunque este será un límite por ajustar una vez se conozcan las pérdidas asociadas a la purificación del producto final, en función de asegurar una cantidad de producto suficiente para la administración a pacientes.

En cuanto al rendimiento de marcación, se verifica que se mantiene constante durante los reusos, indicando que el sistema se mantiene robusto, y que la potencial pérdida de actividad enzimática no afecta la eficiencia de la catálisis para la aplicación de interés.

Si bien se necesitan realizar estudios más profundos para determinar a qué se debe la disminución en el porcentaje de conversión, se observan cambios macroscópicos en la

estructura del derivado (partículas de apariencia más fina que podrían sedimentar a una velocidad diferente) y además, la manipulación entre reusos implicó ciertas pérdidas de parte del derivado (por lavados de material, reacondicionamiento del módulo, entre otras), de modo que en el siguiente uso había menos enzima disponible en el balón de reacción. Es destacable que aún se obtiene una cantidad de producto superior o comparable a los obtenidos mediante la síntesis clásica (Florencia Zoppolo, 2018) y que el exceso diastereomérico sigue manteniéndose por encima del 99% luego de 5 reusos.

Tabla 12. Pruebas de reusos del derivado inmovilizado

n	Número de uso	Tiempo de marcación (minutos)	% de conversión de $^{11}\text{CL-Met}^{11}\text{CSAM}$	R(%dc,MeI) en 11CSAM	% de (%)
3	1°	5	80.2 ± 9.5	17.5 ± 0.6	> 99
3	2°	5	71,2 ± 8.1	16,8 ± 2.3	> 99
2	3°	5	67,3 ± 0.5	17,9 ± 2.5	> 99
1	4°	5	61,0	15,9	> 99
1	5°	5	52,5	13,2	> 99

4.4 Conclusiones y perspectivas

La enzima MAT_I303V tanto en la forma de biocatalizador soluble como inmovilizado es capaz de producir (S,S)SAM y [¹¹C](S,S)SAM en 5 minutos y con un exceso diastereomérico mayor al 99%. Si bien lo que se pudo determinar experimentalmente en el producto final obtenido fue el exceso diastereomérico, los estudios cinéticos realizados con L y D metionina permiten afirmar que en las condiciones de trabajo, la producción del isómero (R,R) se encuentra muy desfavorecida y, por lo tanto, el único producto de la síntesis es el isómero de interés. Este punto es quizás el resultado de mayor relevancia del trabajo realizado, dado que la producción de [¹¹C](S,S)SAM ópticamente puro es un requisito para la aprobación de la administración del radiotrazador a pacientes y posibilitará los ensayos clínicos de este radiotrazador en humanos.

Los rendimientos de marcación obtenidos para el derivado inmovilizado indican que la radiosíntesis propuesta es comparable con la síntesis tradicional reportada previamente por Zoppolo *et al.* ((10.0 ± 2.0) % vs (11.0 ± 1.2) % MeI, ndc). Por otra parte, si se compara el rendimiento de marcación obtenido con el derivado enzimático inmovilizado en relación con los resultados obtenidos con el biocatalizador soluble, se verifica que existe una pérdida de rendimiento, probablemente atribuible a fugas de CH₃I provocadas por las modificaciones realizadas al módulo de síntesis. Esta situación puede optimizarse trabajando en mejorar la estanqueidad del sistema o produciendo mayores cantidades de CH₃I, de manera de asegurar la obtención de cantidades suficientes de producto al final de la síntesis para hacer posible su administración a pacientes.

El siguiente paso hacia la obtención del producto de interés sería lograr la purificación del compuesto, obteniendo el radiotrazador separado de cualquier otro compuesto radiactivo presente en la mezcla, en este caso el desafío es separar la [¹¹C](S,S)SAM de la [¹¹C]L-Met.

Para esto, se está trabajando en la puesta a punto de un protocolo de purificación donde se pretende emplear cartuchos de extracción en fase sólida Strata XC-SPE (Phenomenex), logrando retener la [¹¹C](S,S)SAM para luego eluirla de forma pura; luego será necesario optimizar la formulación de la misma de tal manera que cumpla con los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos necesarios para su administración intravenosa, por lo que el diseño de un protocolo de control de calidad es otra de las perspectivas a corto plazo. En este sentido, además de cumplir con los parámetros establecidos en farmacopeas de referencia, como USP, capítulo <823> “Positron emission tomography drugs for compounding, investigational and research uses”, el mayor cambio que presenta el protocolo de control de calidad de la síntesis enzimática con relación a la síntesis química es asegurar que el producto final se encuentra libre de enzima, así como de pirógenos que puedan acompañarla.

5 Conclusiones generales y perspectivas

El desarrollo de esta tesis permitió solucionar una limitación de la síntesis tradicional, demostrando la utilidad de la biocatálisis en la química fina, y permitiendo contar con un nuevo potencial radiotrazador para la detección de cáncer de próstata, que una vez se completen las etapas de purificación final y control de calidad, podrá ser sometido a ensayos de efectividad *in vitro* e *in vivo*, y posteriores ensayos clínicos.

Primeramente, fue posible realizar todos los pasos necesarios para lograr producir la enzima de interés de forma soluble, destacándose las altas cantidades de enzima obtenida y el uso de un medio de crecimiento que no necesita el agregado de inductores químicos para producir la enzima, logrando abaratar costos del proceso.

Se obtuvo un biocatalizador inmovilizado funcional, estable en las condiciones requeridas para la radiosíntesis propuesta y con un amplio margen de posibilidad de mejoras por investigar a futuro, en particular en los procesos de purificación e inmovilización de la enzima.

En cuanto a la radiosíntesis, mediante la exploración de diferentes modalidades, fue posible realizar las adaptaciones necesarias para lograr una primera aproximación a la aplicación de la síntesis enzimática en la producción automatizada del radiotrazador de interés. El resultado es auspicioso, obteniéndose un rendimiento de marcación comparable al de la síntesis tradicional, potencialmente mejorable ajustando parámetros técnicos y una mayor cantidad de producto, dado que se comprobó que la síntesis enzimática es estereoselectiva, obteniéndose un producto con una pureza diastereomérica mayor al 99%, mientras que la síntesis tradicional tiene como productos una mezcla de isómeros 47:53.

Esta tesis logró abrir muchos caminos a explorar, de cara a perfeccionar tanto la producción del biocatalizador como la radiosíntesis. Entre los principales desafíos a enfrentar, es

importante considerar que el producto de interés coeluye de la columna con los sustratos remanentes, entre los cuales se encuentra la [^{11}C]L-metionina. Es imprescindible purificar la [^{11}C](S,S)SAM de la metionina marcada, porque de inyectarse ambas moléculas marcadas a un paciente, la [^{11}C]L-Metionina puede distribuirse en el organismo, afectando la interpretación de las imágenes generadas, esta es la perspectiva más inmediata del trabajo.

Durante el desarrollo de esta tesis fueron abarcados la totalidad de los objetivos planteados, logrando cumplir la gran mayoría y teniendo un alto grado de avance en lo que aún no han finalizado. Desde el punto de vista práctico, esta tesis permitió el aprendizaje de técnicas que no habían sido abarcadas previamente por este estudiante, fundamentalmente en el área de inmovilización de enzimas y en el proceso de adaptación de la síntesis enzimática a la aplicación final. No es frecuente en la investigación del área tener la posibilidad de participar, en un plazo de tiempo relativamente corto, del desarrollo y caracterización de un biocatalizador hasta su aplicación a escala productiva.

Desde el punto de vista del desarrollo como grupo de trabajo, esta tesis permitió consolidar el trabajo en conjunto con el CUDIM, estableciendo una relación de cooperación continua, en constante retroalimentación, logrando llevar adelante la que, hasta nuestro conocimiento, es la primera síntesis enzimática de un radiotrazador con fines clínicos en el Uruguay.

6 Referencias Bibliográficas

- Anastas, P., & Eghbali, N. (2009). Green Chemistry: Principles and Practice. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 301–312. <https://doi.org/10.1039/B918763B>
- Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Cukura, A., Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T. G., Fan, J., Garmiri, P., da Costa Gonzales, L. J., Hatton-Ellis, E., Hussein, A., Ignatchenko, A., ... Zhang, J. (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC1052>
- Bell, E. L., Finnigan, W., France, S. P., Green, A. P., Hayes, M. A., Hepworth, L. J., Lovelock, S. L., Niikura, H., Osuna, S., Romero, E., Ryan, K. S., Turner, N. J., & Flitsch, S. L. (2021). Biocatalysis. *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1), 46. <https://doi.org/10.1038/S43586-021-00044-Z>
- Betancor, L., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., & Guisan, J. M. (2003). Preparation of a stable biocatalyst of bovine liver catalase using immobilization and postimmobilization techniques. *Biotechnology Progress*, 19(3), 763–767. <https://doi.org/10.1021/bp025785m>
- Boschi, S., & Lodi, F. (2016). Chemistry of PET radiopharmaceuticals: Labelling strategies. *Basic Science of PET Imaging*, 79–103. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40070-9_4
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brena, B., González-Pombo, P., & Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: A literature survey. *Methods in Molecular Biology*, 1051, 15–31. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2

- Buccino, P., Kreimerman, I., Zirbesegger, K., Porcal, W., Savio, E., & Engler, H. (2015). *Automated radiosynthesis of [11 C]L-deprenyl-D 2 and [11 C]D-deprenyl using a commercial platform*. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2015.12.051>
- Cao, X., Yang, M., Xia, Y., Dou, J., Chen, K., Wang, H., Xi, T., & Zhou, C. (2012). Strain improvement for enhanced production of S-adenosyl-L-methionine in *Saccharomyces cerevisiae* based on ethionineresistance and SAM synthetase activity. *Annals of Microbiology*, 62(4), 1395–1402. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0389-0>
- Carlsson, J., Janson, J.-C., & Sparrman, M. (1998). *Protein purification*.
- Castilla Arboleya, A., Irazoqui, G., & Rodríguez Giordano, S. (2022). *Producción, caracterización bioquímica e inmovilización de lipasas microbianas y sus aplicaciones*.
- Chang, A., Jeske, L., Ulbrich, S., Hofmann, J., Koblitz, J., Schomburg, I., Neumann-Schaal, M., Jahn, D., & Schomburg, D. (2021). BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: New developments and updates. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D498–D508. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA1025>
- Chen, H., Wang, Z., Cai, H., & Zhou, C. (2016). Progress in the microbial production of S-adenosyl-l-methionine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(9), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2102-8>
- Choi, E. S., Park, B. S., Lee, S. W., & Oh, M. K. (2009). Increased production of S-adenosyl-L-methionine using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* sake K6. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26(1), 156–159. <https://doi.org/10.1007/s11814-009-0025-x>
- Chu, J., Qian, J., Zhuang, Y., Zhang, S., & Li, Y. (2013). Progress in the research of S-adenosyl-l-methionine production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(1), 41–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4536-8>
- Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. (2021). Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer. In *Registro Nacional del Cáncer* (pp. 1–61).

http://www.comisioncancer.org.uy/uc_513_1.html

da Silva, E. S., Gómez-Vallejo, V., López-Gallego, F., & Llop, J. (2018). Biocatalysis in radiochemistry: Enzymatic incorporation of PET radionuclides into molecules of biomedical interest. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 61(4), 332–354. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3592>

Deshpande, P. B., Senthilkumar, U. P., & Padmanabhan, R. (2005). *Chemical Synthesis of S-adenosyl-L- methionine with enrichment for the (S,S) isomer.*

Deshpande, P. R., Senthilkumar, U. P., & Padmanabhan, R. (2005). *CHEMICAL SYNTHESIS OF S-ADENOSYL-L-METHONNE WITH ENRICHMENT OF (S,S)-ISOMER.*

Detchanamurthy, S., Shanmugam, K., Parkunan, S. M. A., Puttananjaiah, S., Somasundaram, B., & Subramanian, K. (2010). Cloning and expression of S-Adenosyl Methionine Synthetase gene in recombinant E. coli strain for large scale production of SAME. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(4). <https://doi.org/10.2225/vol13-issue4-fulltext-2>

Driskell, L. O., Tucker, A. M., Winkler, H. H., & Wood, D. O. (2005). Rickettsial metK- encoded methionine adenosyltransferase expression in an Escherichia coli metK deletion strain. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5719–5722. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5719-5722.2005>

Eisenthal, R., & Cornish Bowden, A. (1974). The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *The Biochemical Journal*, 139(3), 715–720. <https://doi.org/10.1042/BJ1390715>

Faber, K. (2018). Biotransformations in Organic Chemistry. In *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61590-5>

FDA Approves First PSMA-Targeted PET Imaging Drug for Men with Prostate Cancer | FDA.

- (2020). <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-psma-targeted-pet-imaging-drug-men-prostate-cancer>
- Federsel, H.-J., Moody, T. S., Taylor, S. J. C., Puglisi, A., Vitale, P., & Fernandez-Lafuente, R. (2021). *molecules Recent Trends in Enzyme Immobilization-Concepts for Expanding the Biocatalysis Toolbox*. <https://doi.org/10.3390/molecules26092822>
- Fernández-Lafuente, R., Rodríguez, V., Mateo, C., Penzol, G., Hernández-Justiz, O., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejevi, K., Batista, F., & Guisán, J. M. (1999). Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 7(1–4), 181–189. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00028-4)
- Fernández Lucas, J., Cleiton Sousa Dos Santos, J., Liaquat, M., Arana-Peña, S., Rios, N. S., Carballares, D., Mendez-Sanchez, C., Lokha, Y., B Gonçalves, L. R., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). *Effects of Enzyme Loading and Immobilization Conditions on the Catalytic Features of Lipase From Pseudomonas fluorescens Immobilized on Octyl-Agarose Beads*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00036>
- Fontecave, M., Atta, M., & Mulliez, E. (2004). S-adenosylmethionine: Nothing goes to waste. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(5), 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.03.007>
- Garzón-Posse, F., Becerra-Figueroa, L., Hernández-Arias, J., & Gamba-Sánchez, D. (2018). Whole Cells as Biocatalysts in Organic Transformations. *Molecules*, 23(6). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23061265>
- Giacomini, C., Villarino, A., Franco-Fraguas, L., & Batista-Viera, F. (1998). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: Comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 4(5–6), 313–327. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(98\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(98)00071-X)
- Giunchi, F., Fiorentino, M., & Loda, M. (2019). The Metabolic Landscape of Prostate Cancer.

- European Urology Oncology*, 2(1), 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.euo.2018.06.010>
- Grillo, M. A., & Colombatto, S. (2007). S-adenosylmethionine and its products. *Amino Acids* 2007 34:2, 34(2), 187–193. <https://doi.org/10.1007/S00726-007-0500-9>
- Guisan, J. M. (2013). New opportunities for immobilization of enzymes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1051, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_1
- He, J., Sun, S., Zhou, Z., Yuan, Q., Liu, Y., & Liang, H. (2019). Thermostable enzyme-immobilized magnetic responsive Ni-based metal-organic framework nanorods as recyclable biocatalysts for efficient biosynthesis of: S -adenosylmethionine. *Dalton Transactions*, 48(6), 2077–2085. <https://doi.org/10.1039/c8dt04857f>
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: An update. *Journal of Chemical Biology*, 6(4), 185–205. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>
- Hu, H., Qian, J., Chu, J., Wang, Y., Zhuang, Y., & Zhang, S. (2009). Optimization of l-methionine feeding strategy for improving S-adenosyl-l-methionine production by methionine adenosyltransferase overexpressed *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(6), 1105–1114. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1975-y>
- Ishiwata, K., Ido, T., Sato, H., Iwata, R., Kawashima, K., Yanai, K., Watanuki, S., Ohtomo, H., & Kogure, K. (1986). Simplified enzymatic synthesis and biodistribution of ¹¹C-S-adenosyl-l-methionine. *European Journal of Nuclear Medicine*, 11(11), 449–452. <https://doi.org/10.1007/bf00261008>
- Khan, A. P., Rajendiran, T. M., Ateeq, B., Asangani, I. A., Athanikar, J. N., Yocum, A. K., Mehra, R., Siddiqui, J., Palapattu, G., Wei, J. T., Michailidis, G., Sreekumar, A., & Chinnaiyan, A. M. (2013). The role of sarcosine metabolism in prostate cancer progression. *Neoplasia (United States)*, 15(5), 491–501. <https://doi.org/10.1593/neo.13314>
- Kilbourn, M. R., & Scott, P. (2021). *Handbook of Radiopharmaceuticals - Methodology and*

Applications.

- Kohn, J., & Wilchek, M. (1984). The use of cyanogen bromide and other novel cyanylating agents for the activation of polysaccharide resins. In *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 9, Issue 3, pp. 285–305). <https://doi.org/10.1007/BF02798493>
- Komoto, J., Yamada, T., Takata, Y., Markham, G. D., & Takusagawa, F. (2004). Crystal structure of the S-adenosylmethionine synthetase ternary complex: a novel catalytic mechanism of S-adenosylmethionine synthesis from ATP and Met. *Biochemistry*, *43*(7), 1821–1831.
- Lin, B., & Tao, Y. (2017). Whole-cell biocatalysts by design. *Microbial Cell Factories*, *16*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0724-7>
- Luo, Y., Yuan, Z., Luo, G., & Zhao, F. (2008). Expression of secreted His-tagged S-adenosylmethionine synthetase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its characterization, one-step purification, and immobilization. *Biotechnology Progress*, *24*(1), 214–220. <https://doi.org/10.1021/bp0702727>
- Morellon-Sterling, R., Siar, E. H., Braham, S. A., de Andrades, D., Pedroche, J., Millán, M. del C., & Fernandez-Lafuente, R. (2021). Effect of amine length in the interference of the multipoint covalent immobilization of enzymes on glyoxyl agarose beads. *Journal of Biotechnology*, *329*, 128–142. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2021.02.005>
- Niaz, M. J., Sun, M., Skafida, M., Niaz, M. O., Ivanidze, J., Osborne, J. R., & O'Dwyer, E. (2021). Review of commonly used prostate specific PET tracers used in prostate cancer imaging in current clinical practice. *Clinical Imaging*, *79*(March), 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.clinimag.2021.06.006>
- Niu, W., Cao, S., Yang, M., & Xu, L. (2017). Enzymatic Synthesis of S-Adenosylmethionine Using Immobilized Methionine Adenosyltransferase Variants on the 50-mM Scale. *Catalysts*, *7*(8), 238. <https://doi.org/10.3390/catal7080238>

- Park, J., Tai, J., Roessner, C. A., & Scott, A. I. (1996). Enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-methionine on the preparative scale. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 4(12), 2179–2185. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(96\)00228-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(96)00228-3)
- Paschalis, A., Sheehan, B., Riisnaes, R., Rodrigues, D. N., Gurel, B., Bertan, C., Ferreira, A., Lambros, M. B. K., Seed, G., Yuan, W., Dolling, D., Welti, J. C., Neeb, A., Sumanasuriya, S., Rescigno, P., Bianchini, D., Tunariu, N., Carreira, S., Sharp, A., ... de Bono, J. S. (2019). Prostate-specific Membrane Antigen Heterogeneity and DNA Repair Defects in Prostate Cancer. In *European Urology* (Vol. 76, Issue 4, pp. 469–478). <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.06.030>
- Patel, R. N. (2008). Biocatalysis: Synthesis of Chiral Intermediates for Drugs. *Biocatalysis and Bioenergy*, 9(6), 319–353. <https://doi.org/10.1002/9780470385869.ch18>
- Patel, R. N. (2018). Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(7), 1252–1274. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.023>
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillessen, S., Van der Kwast, T., & Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- Reis, C. L. B., de Sousa, E. Y. A., de França Serpa, J., Oliveira, R. C., & Dos Santos, J. C. S. (2019). Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. *Química Nova*, 42(7), 768–783. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170381>
- Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á., Carballares, D., Morellon-Sterling, R., & Fernandez-Lafuente, R. (2021). Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. *Biotechnology Advances*, 52. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107821>
- Rosenthaler, L. (1908). Durch Enzyme bewirte asymmetrische Synthesen. *Biochem. Z.*, 14, 238–253.

- Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, [2001] ©2001. <https://search.library.wisc.edu/catalog/999897924602121>
- Senthilkumar, U. P., Padmanabhan, R., Sivasankaran, V., & Mohan, S. (2006). *Improved process for the chemical synthesis of S-Adenosyl-L-Methionine with enrichment of (S,S)-Isomer*.
- Sheldon, R. A., & Pereira, P. C. (2017). Biocatalysis engineering: The big picture. *Chemical Society Reviews*, 46(10), 2678–2691. <https://doi.org/10.1039/c6cs00854b>
- Sheldon, R. A., & Woodley, J. M. (2017). Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chemical Reviews*, 118(2), 801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>
- Sivasankaran, V., & Mohan, S. (2010). (12) *United States Patent Senthilkumar et a J. Assignee :*
- Smith, S. W. (2009). Chiral Toxicology: It's the Same Thing...Only Different. *Toxicological Sciences*, 110(1), 4–30. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFP097>
- Takusagawa, F., Kamitori, S., Misaki, S., & Markham, G. D. (1996). Crystal structure of S-adenosylmethionine synthetase . *J Biol Chem*, 271(1), 136–147.
- Taylor, J. C., & Markham, G. D. (2000). The Bifunctional Active Site of S - Adenosylmethionine Synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 4060–4065. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32909>
- Thompson, M. P., Peñafiel, I., Cosgrove, S. C., & Turner, N. J. (2019). Biocatalysis Using Immobilized Enzymes in Continuous Flow for the Synthesis of Fine Chemicals. In *Organic Process Research and Development* (Vol. 23, Issue 1, pp. 9–18). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00305>
- Yang, J., Wang, M., Sun, J., Wei, P. H., & Tang, W. G. (2002). Cloning of S-adenosyl-L-methionine synthetase gene from *Saccharomyces cerevisiae* and its expression in *E. coli*. *Journal of China Pharmaceutical University*, 33(3), 253–255.

<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-29744451968&partnerID=40&md5=73bc237a877b7a7db11b14da53da43ac>

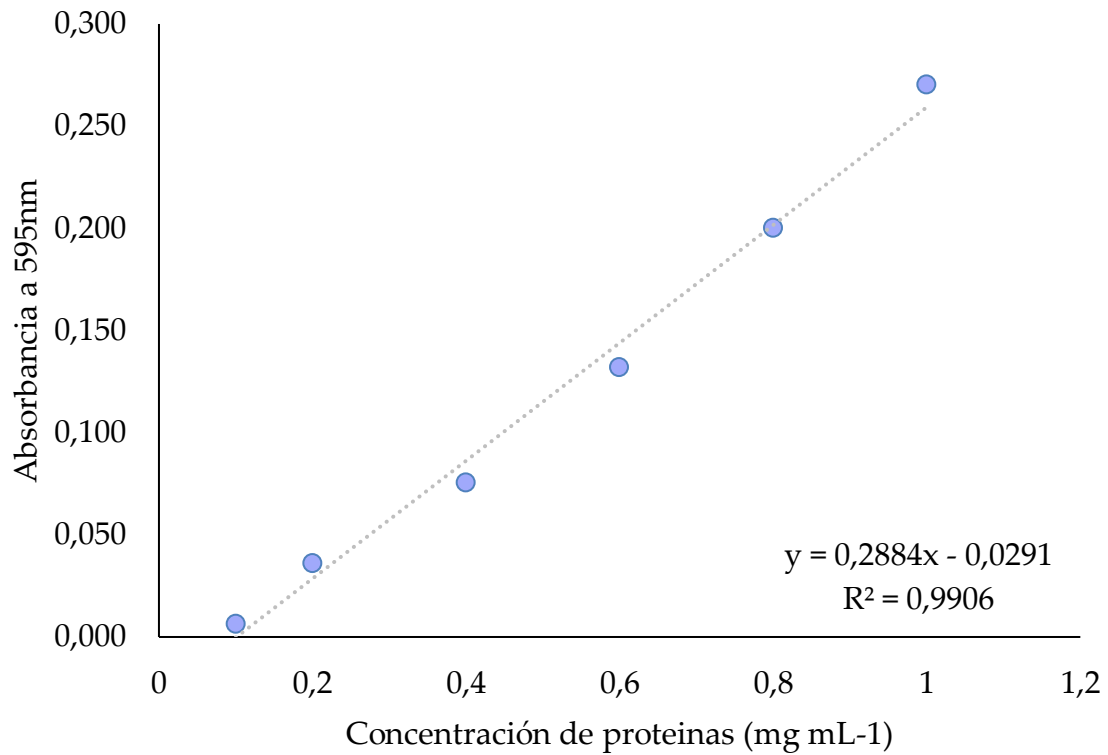
- Yao, G., Qin, X., Chu, J., Wu, X., & Qian, J. (2014). Expression, purification, and characterization of a recombinant methionine adenosyltransferase pDS16 in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(3), 1241–1253. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0594-3>
- Yi, D., Bayer, T., Badenhorst, C. P. S., Wu, S., Doerr, M., Hö, M., & Bornscheuer, U. T. (2021). Recent trends in biocatalysis. *Chem. Soc. Rev*, 50, 8003. <https://doi.org/10.1039/d0cs01575j>
- Yin, C., Zheng, T., & Chang, X. (2017). Biosynthesis of S-adenosylmethionine by magnetically immobilized *Escherichia coli* cells highly expressing a methionine adenosyltransferase variant. *Molecules*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/molecules22081365>
- Yu, P., & Shen, X. (2012). Enhancing the production of S-adenosyl-L-methionine in *Pichia pastoris* GS115 by metabolic engineering. *AMB Express*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-57/FIGURES/6>
- Yu, P., & Zhu, P. (2017). Improving the production of S-adenosyl-L-methionine in *Escherichia coli* by overexpressing metK. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(9), 867–873. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1350976>
- Zoppolo, F, Porcal, W., Oliver, P., Savio, E., & Engler, H. (2017). Automated One-pot Radiosynthesis of [11C]S-adenosyl Methionine. *Current Radiopharmaceuticals*, 10(3), 203–211. <https://doi.org/10.2174/1874471010666170718171441>
- Zoppolo, F, & Savio, E. (2017). Automated one-pot radiosynthesis of [11C]S-adenosyl methionine (11C-SAM). *Manuscrito En Preparación*.
- Zoppolo, Florencia. (2018). “ *Desarrollo y evaluación de radiotrazadores para el diagnóstico de*

cáncer de próstata y evaluación de su agresividad y progresión mediante tomografía por emisión de positrones .”

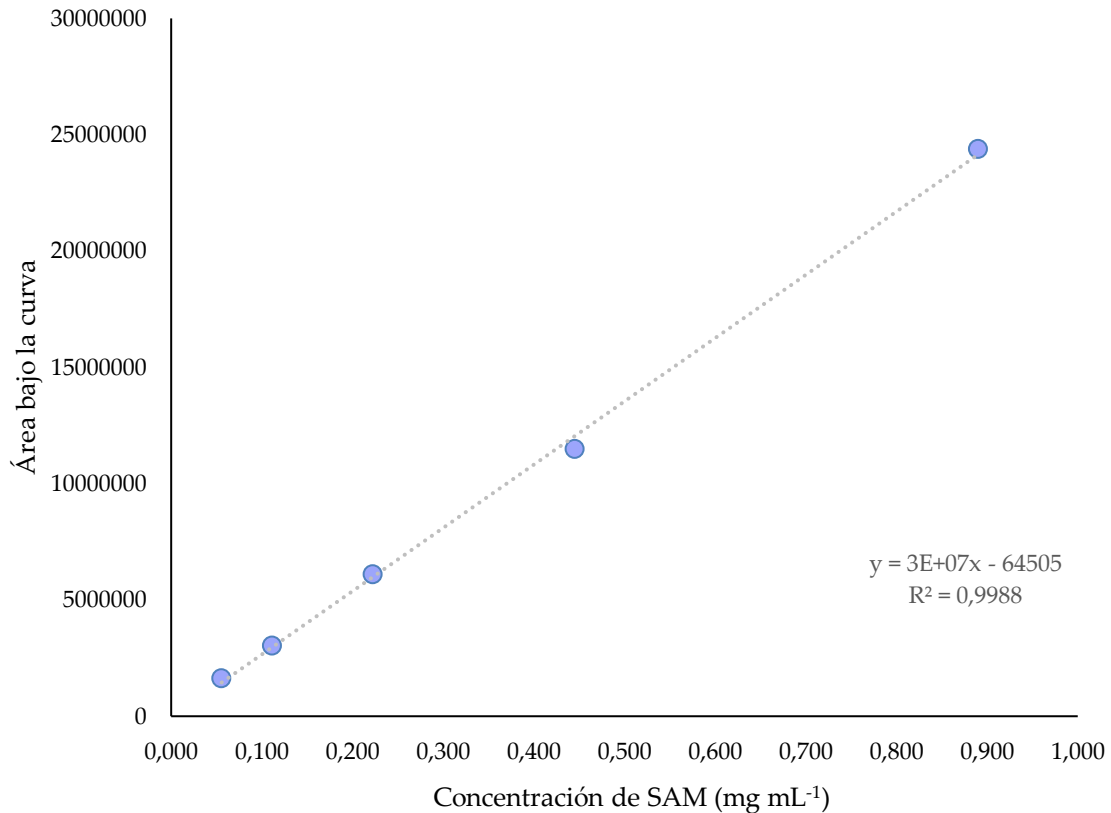
Zucca, P., Fernandez-Lafuente, R., & Sanjust, E. (2016). *molecules Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization*. <https://doi.org/10.3390/molecules21111577>

7 Anexos

7.1 Curva de calibración para cuantificación de proteínas por el método de Bradford



7.2 Curva de calibración para ensayo de actividad por HPLC



7.3 Secuencia de pET28a_I303VMAT

Versión anotada disponible en el siguiente link: [Secuencia vector pET28a_I303VMAT.pdf](#)

```
5'tggcgaatgggacgcgcctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacactgcc  
agcgccttagcgcggcctctttcgctttctcccttctttctcgccacgttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctcc  
cttaggggtccgattagtgtttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggttacgtagtgggcatcgcct
```


atagacggttttcgcccttgacgtggagtcacgttcttaatagtgactcttgttccaaactggaacaacactcaacccatct
ggctattctttgattataagggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaattaacgcgaattt
aacaaaatattaacgtttacaatttcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctattgtttatcttaatacattca
aatatgtatccgctcatgaattaattcttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaatacc
atattttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatcctgggatcggctg
cgattccgactcgtccaacatcaatacaacctattaatttcccctcgtcaaaaaataaggttatcaagtgagaaatcacatgagtgac
gactgaatccggtgagaatggcaaaagttatgcatttcttcagactgttcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaaatca
ctcgcatacaaccaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatacgcgatcgtgttaaaaggacaattacaac
aggaatcgaatgcaaccggcgaggaacactgccagcgcatacaaatatttcacctgaatcaggatattcttctaataacctgga
atgctgtttcccggggatcgcagtggtgagtaacctgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatggtcgggaagaggcat
aaattccgtcagccagtttagctgacctctcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgttcagaaacaactctggcg
catcgggcttccatacaatcgatagattgtcgcacctgattgcccgacattatcgcgagccatttatacccatataaatcagcatcc
atgttgaatfaatcgcggcctagagcaagacgtttcccgttgaatatggctcataacacccctgtattactgtttatgtaagcaga
cagttttattgttcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatctct
tgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgcttcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccgatcaagagc
taccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagttagccgtagttaggccacca
cttcaagaactctgtagcaccgctacatactcgtctgctaactctgttaccagtggtgctgctgccagtggcgataagtcgtgtctta
ccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggtcgtgcacacagcccagcttg
gagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcgg
acaggtatccggttaagcggcagggctcggaaacaggagagcgcacgaggagcttccagggggaaacgcctggatctttatag
tctgtcgggtttccaccctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcaggggggcgagcctatggaaaaacgccagca
acgcggccttttacggttctggccttttctggccttttctcacatgttcttctcgttatcccctgattctgttgataaccgtatta
ccgctttgagtgagctgataccgctcggcagccgaacgaccgagcgcagcagctcagtgagcaggaagcgggaagagcgc
cctgatgcggatattttctcttacgcatctgtgcggatttcacaccgcatatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccga
tagttaagccagtatacactccgctatcgtactgactgggtcatggctgcgccccgacaccgccaacaccgctgacgcgccc

tgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttaccgtca
tcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggctgtgaagcgattcacagatgtctgctgttcatccgcgt
ccagctcgttgagtttccagaagcgtaatgtctggcttctgataaagcgggccaatgtaaggcggtttttctgtttgtcact
gatgcctccgtgtaagggggatttctgttcatgggggtaatgataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactg
atgatgaacatgcccggttactggaacgttgtagggtaaacactggcggatggatgcggcgggaccagagaaaaatcact
cagggtaatgccagcgttcgtaatacagatgtaggtgtccacagggtagccagcagcatcctgcgatgcagatccggaaca
taatggtgcagggcgctgacttccgcgttccagactttacgaaacacggaaccgaagaccattcatgttgttctcaggtcgca
gacgtttgcagcagcagctcgttcacgttcgctcgcgtatcggatcattctgctaaccagtaaggcaaccccgccagcctagc
cgggtcctcaacgacaggagcacgatcatgcgcacccgtggggccgccaatgccggcgataatggcctgcttctgccgaaacgt
ttggtggcgggaccagtgacgaaggcttgagcagggcgctgcaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgc
gctccagcgaagcggctcctgccgaaatgaccagagcgtgcggcacctgtcctacgagttgcatgataaagaagacagt
cataagtgcggcgacgatagtcattgccccgcgccaccggaaggagctgactgggtgaaggcttcaaggccatcggtcgag
atcccgtgcctaagagtgagctaactacattaattgcgttcgctcactgcccgcttccagtcgggaaacctgtcgtgccagct
gcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggttgcgtattggggcggcagggtgggttttctttcaccagtgagacggg
caacagctgattgcccttaccgctgcccctgagagagttgcagcaagcggctccacgctggtttccccagcaggcgaaaatcc
tgttgatgggtggttaacggcgggatataacatgagctgtctcggatcgtcgtatcccactaccgagatatccgaccaacgcgc
agccccgactcggtaatggcgcgcattgcgcccagcgcctctgatcgttggcaaccagcatgcagtgggaaacgatgccctcat
tcagcattgcatggtttgttgaaccggacatggcactccagtcgcttcccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgag
atatttatgccagccagccagacgcagacgcgagacagaacttaatgggcccgctaacagcgcgattgtctggtgaccaat
gagaccagatgctccacgcccagtcgctaccgtcttcatgggagaaaataactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaa
gaaataacccggaacattagtgcaggcagcttccacagcaatggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccact
gacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgcttccagcgttcgacgcgcttcttaccatcgacaccaccagctggcac
ccagttgatcggcgcgagatttaatcgcgcgacaattgcgacggcgcgtgcagggccagactggagggtggcaacgccaatc
agcaacgactgtttgcccgagttgttgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgcatcgcgcttccacttttcccgcgt
tttcgagaaacgtggctggcctggttaccacgcgggaaacggctctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgataac

gttactggttcacattcaccacctgaattgactctctccgggcgctatcatgccataccgcgaaaggtttgcgccattcgatggt
gtccgggatctcgacgctctcccttatgcgactctgcattaggaagcagcccagtagggtgaggccggtgagcaccgccgc
gcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtccccggccacggggcctgccacatacccacgccgaaacaag
cgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatctcccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgc
cggatgatccggccacgatgctccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactataggggaattg
tgagcggataacaattcccctctagaataatgtttaaacttaagaaggagatataccatgggcagcagccatcatcatcat
cacagcagcggcctggtgccgcggcagccatatggctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgcggatccgaattcgc
aaaacaccttttacgtccgagtcctctgaaggcatcctgacaaaattgctgacaaaattctgatgccgttttagacgcgatcc
tcgaacaggatccgaaagcacgcggtgcttgcgaaacctacgtaaaaaccggcatggttttagttggcggcgaaatcaccaccag
cgctgggtagacatcgaagagatcacccgtaacaccgttcgcgaaattggctatgtgattccgacatgggctttgacgtaact
cctgtgcggttctgagcgtatcggcaaacagtctcctgacatcaaccaggggcgtgaccgtgccgatccgctggaacaggggcgc
gggtgaccagggtctgatgttggctacgcaactaatgaaaccgacgtgctgatccagcacctatcacctatgcacaccgtctgg
tacagcgtcaggctgaagtgcgtaaaaaccgactctgccgtggctgcgcccggacgcgaaaagccaggtgactttcagtatg
acgacggcaaatcgttggatcgatgctgctgcttccactcagcactctgaagagatcgaccagaaatcgctgcaagaagc
ggtaatggaagagatcatcaagccaattctgccgctgaatggctgacttctccacaaattctcatcaaccgaccggctgcttc
gttatcgggtggccaatgggtgactgcggtctgactggctgtaaaattatcgttgatactacggcggcatggcgcgtcacgggtgg
cggatgattctctggtaaagatccatcaaaagtggaccgtccgcagcctacgcagcacgttatgtcgcgaaaaacatcgttctg
ctggcctggccgatcgttgtgaaattcaggtttctacgcagtgggcgtggctgaaccgacctccatcatggtagaaactttcggt
ctgagaaagtgccttctgaacaactgacctgctggtagctgagttcttcgacctgcgccatacggctctgattcagatgctggatct
gctgcacccgatctacaaagaaaccgcagcatacggctacttggctgtaacatttcccgtgggaaaaaccgacaaagcgca
gctgctgcgcgatgctgccggtctgaagtaaaagcttgcggccgactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgct
aacaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataacccttggggcctctaaacgggtct
tgaggggtttttgctgaaaggaggaactatatccggat-3'
