

AVANCES EN EL DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE UN INSUMO CLAVE EN LA INDUSTRIA BIOTECNOLÓGICA

C. Touloumdjian¹, M. Catone², E. Elhalem¹, M. Córdoba¹, L. Pozo³, V. Cesa⁴, M.J. Comin¹, M. Blasco², L. Gandolfi Donadio¹
Programa de Fortalecimiento de la Cadena de Valor de la Industria Farmacéutica y Farmoquímica
 (1) INTI Química, (2) INTI Biotecnología, (3) INTI-Gerencia de Desarrollo, (4) INTI-Economía Industrial
gandolfi@inti.gov.ar

Introducción

La expresión de proteínas específicas mediante el uso de microorganismos modificados genéticamente es el pilar fundamental de la biotecnología moderna, caracterizada por conjunción de la biología molecular con la microbiología.

La bacteria *Escherichia coli*, es el microorganismo más utilizado en la producción de proteínas recombinantes en bacterias. Entre las herramientas disponibles en este microorganismo, se destaca el promotor del operón Lac, un sistema de control de la expresión de proteínas que es regulado por la presencia de lactosa y el estado metabólico de las células. Éste promotor, activa la expresión de las proteínas codificadas río-abajo en presencia de lactosa o compuestos capaces de mimetizar el rol de la lactosa, como por ejemplo análogos de la alolactosa (galactosa- β -(1,6)-glucosa), responsable de la activación del promotor Lac. En particular resultan de utilidad en esta activación los análogos que son capaces de inducir la expresión sin ser metabolizados por las galactosidasas celulares lo que les permite actuar en forma sostenida. Entre los análogos, el **isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG, 1)** es el **más difundido en la industria biotecnológica y en I+D.**

El mercado local para este producto se estima de 30 a 60 kg por año, mientras que el precio medio de mercado en volúmenes industriales es de alrededor de 12000 US\$/kg.

En Argentina este insumo no es producido localmente y todo el abastecimiento se da a través de las importaciones.

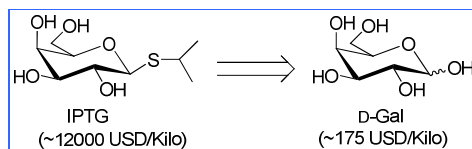


Figura 1: Retrosíntesis de IPTG. D-Gal= D-galactosa

El IPTG se obtiene por síntesis química a partir de D-galactosa (Schmidt et al, 1983; Thiem et al, 1993) (D-Gal, Fig. 1). La síntesis química de

hidratos de carbono es una herramienta poderosa que permite obtener oligosacáridos puros. El desafío consiste en primer lugar, en obtener los monómeros de construcción con los hidroxilos protegidos regioselectivamente. Posteriormente, a través de un método de glicosidación conveniente se construyen los enlaces glicosídico estéreo(α o β)- y regioselectivamente de manera de ir ensamblando el oligosacárido (Boons, G J, 2002).

Este trabajo fue planteado de manera interdisciplinaria entre el Laboratorio de Síntesis Orgánica (INTI-Química) y el Centro de Biotecnología como parte del Programa de Fortalecimiento de la Cadena de Valor de la Industria Farmacéutica y Farmoquímica. Se describen los avances obtenidos en la síntesis del IPTG a escala laboratorio y los ensayos de desempeño realizados al producto obtenido comparado con el IPTG comercial.

Objetivo

Desarrollar un método de producción de IPTG escalable. Se pretende generar una tecnología de síntesis transferible para producir IPTG en el país y abastecer el consumo, en principio, local.

Descripción

Síntesis de IPTG

El Laboratorio de Síntesis Orgánica de INTI-Química estuvo a cargo del diseño de la ruta de síntesis y obtención de IPTG. A partir de una búsqueda bibliográfica que permitió conocer el estado del arte con respecto a las vías de obtención de IPTG, (Schmidt et al, 1983; Thiem et al, 1993) se diseñó una ruta alternativa e innovadora a partir de D-galactosa. La estrategia de síntesis tuvo en cuenta la utilización de materias primas, solventes y reactivos asequibles comercialmente, seguros y que no generaran gran cantidad de residuos. Asimismo, las operaciones para la obtención, aislamiento y purificación de todos los

intermediarios de síntesis y producto final debían ser sencillas de manera de alcanzar una ruta de laboratorio fácilmente escalable. La ruta propuesta se ensayó en el laboratorio a escala de miligramos. Todos los intermediarios de reacción y producto final fueron caracterizados por RMN (resonancia magnética nuclear) y EM (espectrometría de masa).

Evaluación de IPTG

El IPTG sintetizado en INTI (IPTG-INTI) se comparó con un producto comercial de eficacia probada (IPTG-Comercial) mediante la inducción de la expresión de proteína verde fluorescente (GFP) en una cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pET23(b):GFP para la expresión de proteína verde fluorescente bajo control del promotor lactosa (*E. coli*-GFP). La determinación de la GFP se analizó mediante fluorimetría de los sobrenadantes de extractos celulares (λ_{EX} 490 nm; λ_{EM} 509 nm) obtenidos a partir de células cultivadas aeróbicamente en medio rico (LB), inducidas con 0,1 mM (nominal) de los IPTGs a diferentes tiempos (1, 2, 3 hs).

Resultados

Síntesis de IPTG

El paso clave de la síntesis consistió en la glicosidación estereoselectiva de un análogo de D-galactosa convenientemente protegido con isopropiltiol de manera de obtener el enlace glicosídico β presente en IPTG. Se realizaron varios ensayos de glicosidación utilizando distintos solventes y catalizadores de manera de optimizar la estereoselectividad de la reacción a favor del glicósido β . Cada uno de los intermediarios de síntesis y producto final se aisló y purificó por cristalización.

Se obtuvo IPTG a escala de miligramos con una pureza >99 % (RMN, Fig. 2). Los datos espectroscópicos obtenidos (RMN y EM) para IPTG concordaron con los descriptos en bibliografía. (Schmidt et al, 1983; Thiem et al, 1993)

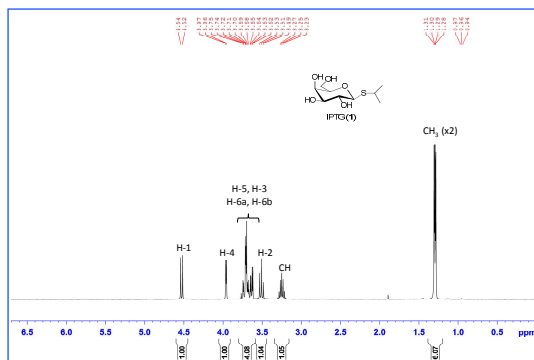


Figura 2: Espectro RMN ^1H (400 MHz, D_2O) de IPTG-INTI.

Evaluación del IPTG

Los IPTGs analizados indujeron la fluorescencia debida a GFP en la *E. coli*-GFP en ensayos de evaluación en paralelo (Fig. 3). Los valores de fluorescencia resultaron indistinguibles entre el producto comercial y el producto sintetizado.

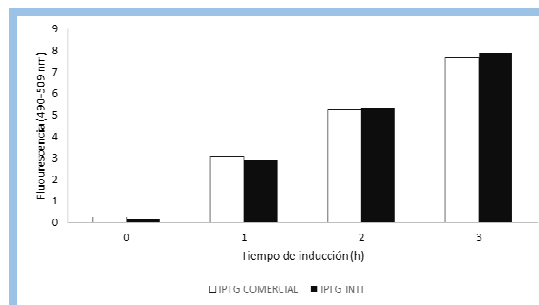


Figura 3: Evaluación de IPTGs mediante la inducción de la expresión de GFP en *E. coli* a diferentes tiempos de inducción (columnas blancas IPTG comercial, columnas negras IPTG-INTI).

Conclusiones

Se desarrolló un proceso sintético innovador, escalable y efectivo para la producción de IPTG de alta calidad (escala miligramo).

El IPTG obtenido no presenta diferencias significativas en una comparación de inducción *in vivo* de la GFP, respecto producto comercial de alta calidad generalmente utilizado en la industria biotecnológica. El proceso desarrollado, la calidad del producto obtenido y la efectividad probada del mismo sugieren la posibilidad de efectuar un proceso de transferencia de dicha tecnología para cubrir la demanda regional de este producto tanto para aplicaciones en investigación como industriales.

Bibliografía

- Boons, G J, K. J. (2002). Oligosaccharide Synthesis. In *Organic Synthesis with Carbohydrates* (pp. 103–154). Sheffield Academic Press Ltd. doi:10.1002/9780470760321.ch4
- Schmidt, R. R., & Stumpp, M. (1983). Synthese von 1-Thioglycosiden. *Liebigs Ann. Chem.*, (1), 1249–1256.
- Thiem, J., & Wiesner, M. (1993). Preparations and reactions of acylated and partially acylated glycosyl fluorides. *Carbohydrate Research*, 249, 197–205.

Agradecimientos

Se agradece a la Dra. Diana Wetzler la gentileza de proveernos el equipamiento para realizar las determinaciones de fluorescencia en la FCEN, UBA.