

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias
en Física de Materiales**

**Diseño de nanopartículas con actividad citocromo P450
inmunológicamente inertes**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Karla Paulina Alejo González

Ensenada, Baja California, México

2017

Tesis defendida por
Karla Paulina Alejo González

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Ivone Giffard Mena

Dr. Alejandro Huerta Saquero

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores



Dr. Sergio Fuentes Moyado

Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez

Directora de Estudios de Posgrado

Karla Paulina Alejo González © 2017

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis

Resumen de la tesis que presenta **Karla Paulina Alejo González** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Física de Materiales.

Diseño de nanopartículas con actividad citocromo P450 inmunológicamente inertes.

Resumen aprobado por:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Director de tesis

Con el fin de contar con un tratamiento enzimático para el envenenamiento por pesticidas se modificó químicamente, en dos pasos, a la mutante de la enzima citocromo P450 de *Bacillus megaterium* CYP_{BM3}F87A obtenida por Cirino y Arnold en 2003. El primer paso consistió en incrementar los sitios disponibles para la unión de moléculas de PEG, a través de la adición de etilendiamina. Con esta modificación a la superficie de la enzima se observó un incremento en su capacidad de transformar 2,6-dimetoxifenol (DMF). El aumento en la actividad específica con DMF puede ser consecuencia de incremento en las interacciones catión π entre los grupos aminos libres y el sustrato aromático. En el segundo paso de la modificación química, el PEG 5000 se unió de manera covalente a residuos de aminoácidos con aminos primarios, como las lisina, y a los derivados de ácidos glutámicos y aspárticos previamente modificados con etilendiamina. El biocatalizador obtenido, CYP_{BM3}F87A-PEG, no sólo conservó la capacidad de transformar DMF, diclorofeno, paratión, linurón, pentaclorofenol, clorpirifós, dinoterb, sino que mostró mayor velocidad de transformación de los pesticidas, siendo de 3 a 17 veces mayor la capacidad de transformación de los sustratos. La CYP_{BM3}F87A-PEG mostró mayor incremento en la velocidad de transformación del pesticida organoclorado clorpirifós, siendo 17 veces el incremento en la actividad con respecto a la CYP_{BM3}F87A no modificada, seguido del diclorofeno y el paratión, ambos fueron transformados 9 veces más por la enzima modificada que por la no modificada. El incremento en la actividad específica de la enzima con los sustratos empleados se podría explicar, además, por el cambio en el microambiente, en el cual se incrementó la hidrofobicidad de la CYP_{BM3}F87A y en los ligeros cambios en la estructura secundaria de la misma. La CYP_{BM3}F87A-PEG fue capaz de catalizar la transformación del DMF en un intervalo más amplio de pH que la enzima no modificada. Mientras que el pico máximo de actividad específica de la CYP_{BM3}F87A fue a pH 8, el intervalo en el que la CYP_{BM3}F87A-PEG transformó el DMF, por encima del 80%, fue de 8 a 11. Por otro lado el PEG permitió que la CYP_{BM3}F87A transformara DMF después de ser incubada a temperaturas superiores a los 40°C sólo en los primeros minutos de incubación. La CYP_{BM3}F87A-PEG transformó el pesticida organofosforado paratión en suero sanguíneo a temperatura ambiente con una eficiencia catalítica 2 veces mayor que en solución amortiguadora. Esto resulta en una ventaja si se proyecta como una alternativa de uso terapéutico contra la intoxicación con este tipo de agentes en humanos. Finalmente, y en ese mismo sentido, la CYP_{BM3}F87A-PEG no genera la activación de la producción de citosinas intermediarias en el proceso inflamatorio controlado por los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 de macrófagos, de manera que se eliminaron patrones de reconocimiento bacterianos de las muestras y se protegieron los posibles epítopes de la enzima que podrían generar respuesta del sistema inmunitario al estar en contacto con la CYP_{BM3}F87A-PEG. El potencial uso del biocatalizador para contender contra las intoxicaciones por pesticidas es discutida en este trabajo.

Palabras clave: Citocromo P450; CYP; Transformación de pesticidas; polietilenglicol; PEG.

Abstract of the thesis presented by **Karla Paulina Alejo González** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Physics of Materials.

Abstract approved by:

PhD. Rafael Vázquez Duhalt

Thesis Director

With the aim to find an enzymatic treatment for pesticide poisoning, the mutant F87A of cytochrome P450 CYP_{BM3} from *Bacillus megaterium*, obtained by Cirino and Arnold in 2003, was modified by two chemical steps. In the first one, the carboxylic superficial residues were aminated by the addition of ethilendiamine in order to increase the number free amino groups for the PEG modification. The catalytic activity of the aminated CYP_{BM3}F87A was enhanced showing higher transformation rate of 2,6-dimethoxyphenol (DMP), may be due to the augmentation in the cation- π interactions between amino and aromatic groups of the substrate. In the second step, the aminated enzyme was chemically modified with PEG 5000 molecules that were covalently bind to amino free moieties of lysine, and glutamic and aspartic acid previously modified by ethilendiamine. The obtained CYP_{BM3}F87A-PEG not only conserved catalytic activity using DMP, dichlorophen, parathion, linuron, pentachlorophenol, chlorpyrifos and dinoterb as substrate, but it actually showed elevated catalytic activity compared to unmodified CYP_{BM3}F87A. The transformation of these substrates increased from 3 to 17 folds; whereas the specific activity was 17 times higher for organochlorine chlorpyrifos and 9 times higher for parathion and dichlorophen. This catalytic enhancement of modified CYP_{BM3}F87A with PEG could be explained by the higher hydrophobicity and the slight modification of its secondary structure. CYP_{BM3}F87A-PEG was able to catalyze DMP transformation in a wider pH range (8 to 11) than the unmodified enzyme, maintaining more than 80% of its specific activity, while CYP_{BM3}F87A showed the optimum activity at pH 8, possibly because PEG covered ionizable amino groups of the CYP_{BM3}F87A. On the other hand, PEGylated CYP_{BM3}F87A transformed DMP after incubation at more than 40°C only in the first few minutes. Nevertheless, the temperature profile remained similar for both enzymes. Moreover, CYP_{BM3}F87A-PEG was able to transform parathion in blood serum with higher catalytic efficiency than in buffer MES, which represents an advantage for its use in therapeutic alternatives regarding pesticide intoxication in humans. Additionally, CYP_{BM3}F87A-PEG was not recognized by macrophage-derived cells, indicating that the PEGylation avoided an immune response. The potential use of this biocatalytic preparation as treatment for pesticide poisoning is discussed.

Keywords: Cytochrome P450; CYP; Pesticide transformation; Polyethylene glycol; PEG

Dedicatoria

A Javier

Por ser mi amigo más querido, por no soltarme, no juzgarme, quererme y aceptarme como soy sin dejar de ser tú.

A Jaime

Por ser una gran amigo. Chino, eres una cereza en mi camino junto al río.

A Alex Tapia

Por marcar en mi vida un antes y un después.

A Margarita

Por haber estado para escucharme y abrazarme.

A mis padres Aurora y Gerardo, y a mis hermanas Mónica y Miriam

Por su apoyo y amor infinitos.

A Salvador

Por ser mi gentil guía.

Agradecimientos

Al CICESE por ser mi casa de estudios. Al CNYN/UNAM por la formación académica y el espacio otorgados para realizar este trabajo.

Al CONACyT por sustentar mi formación y por la beca otorgada número 221719.

Al Dr. Rafael Vázquez por ser un extraordinario director de tesis y comprender cada situación que viví a lo largo del desarrollo de la tesis.

Al Dr. Alejandro Huerta, a la Dra. Ivone Giffard y al Dr. Gustavo Hirata por su contribución para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Katrin Quester, por su labor como técnico académico y por compartirme mucho de lo que sabe, además de apoyarme arduamente en la producción de la enzima.

A la M. en C. Dolores Sarracino, la C.P Rebeca Pineda, Citlali Romero, la L. C. E. Norma Fuentes, al Dr. Álvaro Armenta, Ruth Eaton, Anita Patrón, la M. Citlali Sánchez, la Psic. Laura Rosales, el L.I. Juan Peralta, la Dra. Laura Viana y al Soc. Efraín Mendoza porque con su excelente desempeño nos benefician a todos los estudiantes del CICESE y del CNYN.

A la Dra. Yvonne Rosenstein, al Dr. Ismael Secundino, a la Dra. Gloria Saab y al est. Victor Villalba por el procesamiento de las muestras.

A la Dra. Lorena Sánchez y al Lic. Omar Silva por su apoyo en la producción de la enzima. A la Dra. Karla Juárez, a la Dra. Lorena Hernández y al M. en C. Martín Castillo por su apoyo en el uso del HPLC.

A mis amigos Sergio, Ernesto, Carmen, Ignacio, Raúl, Puebla y Belman por ser las personas por las que valió la pena vivir en Ensenada.

Al Ballet Folklórico de Ensenada y a los Vodka jr's por permitirme compartir estas deliciosas actividades, que son una necesidad para mí.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xi
 Capítulo 1. Introducción	
1.1. Antecedentes.....	5
1.1.1 Descripción de las enzimas citocromo P450.....	5
1.1.2 PEG.....	8
1.2. Hipótesis	11
1.3. Objetivos.....	11
1.3.1 Objetivo general	11
1.3.2 Objetivos específico.....	11
 Capítulo 2. Metodología	
2.1 Expresión y purificación de CYP _{BM3} F87A.....	12
2.1.1 Expresión y purificación de la CYP _{BM3} F87A.....	12
2.1.2 Purificación de la CYP _{BM3} F87A.....	13
2.1.3 Pureza y cuantificación de la CYP _{BM3} F87A.....	14
2.1.4 Cuantificación de la CYP _{BM3} F87A.....	14
2.2 Modificación química de la CYP _{BM3} F87A.....	15
2.2.1 Aminación de la CYP _{BM3} F87A.....	15
2.2.2 Cuantificación de los grupos amino.....	16
2.2.2.1 Ninhidrina.....	16
2.2.2.1 Acido trinitrobencensulfónico (TNBS).....	17
2.2.3 PEGilación.....	17
2.3 Obtención de las constantes catalíticas de la CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG.....	18
2.4 Perfiles de pH, temperatura y termoestabilidad de la CYP _{BM3} F87A-PEG.....	18
2.4.1 Perfil de pH de la CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG.....	18
2.4.2 Perfil de temperatura de la CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG.....	19

2.4.3 Estabilidad de la CYPBM3F87A y la CYPBM3F87A-PEGa diferentes temperaturas de incubación.....	19
2.5 Actividad catalítica en suero sanguíneo.....	19
2.6 Transformación enzimática de pesticidas con la CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG.....	20
2.7 Evaluación de la actividad catalítica de la CYP _{BM3} F87A-PEG en suero sanguíneo con paratión como sustrato.....	21
2.8 Evaluación de la actividad catalítica de la CYP _{BM3} F87A-PEG en solución amortiguadora MES con diclorofeno como sustrato.....	21
2.9 Cambios en la estructura secundaria.....	22
2.10 Evaluación de la inmunogenicidad de la CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG.....	23
2.10.1 Eliminación de lipopolisacáridos.....	24
2.10.2 Expresión de la fosfatasa alcalina.....	24
Capítulo 3. Resultados	
3.1 Producción y caracterización de la CYP _{BM3} F87A.....	25
3.2 Modificación química de la CYP _{BM3} F87A.....	25
3.2.1 Aminación, residuos modificados y constantes catalíticas.....	27
3.2.2 PEGilación, número de moléculas adicionadas y constantes catalíticas.....	28
3.3 Perfiles de pH, temperatura y termo estabilidad de la CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG ..	29
3.3.1 Perfil de temperatura.....	29
3.3.2 Perfil de pH de la CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG.....	39
3.3.3 Estabilidad de la CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG a diferentes temperaturas.....	30
3.4 Pesticidas como sustrato de la CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG	31
3.5 Determinación de constantes catalíticas del CYP _{BM3} F87A-PEG en la transformación del paratión y del diclorofeno.....	33
3.6 Efecto de la PEGilación sobre la estructura secundaria... ..	35
3.7 Evaluación de la inmunogenicidad de las CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG.....	35
Capítulo 4. Discusiones	
4.1 Alteración de las propiedades catalíticas de la CYP _{BM3} F87A.....	37
4.2 Estabilidad de la CYP _{BM3} F87A-PEG.....	41
4.3 Actividad catalítica en suero sanguíneo.....	41
4.4 Inmunogenicidad de la CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG.....	43
Capítulo 5. Conclusiones.....	45
Literatura citada.....	46
Anexos.....	54

Artículo: PEGylation of cytochrome P450 enhances its biocatalytic performance for pesticide transformation

Artículo: Cytochrome P450 Bioconjugate as a Nanovehicle for Improved Chemotherapy Treatment

Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura tridimensional del dominio hemo de una CYP de <i>Bacillus megaterium</i>	1
2	Esquema del ciclo catalítico de las CYP y las peroxidasas, combinadas con la vía de derivación del peróxido.....	7
3	Esquema del método para la producción de monóxido de carbono en la cuantificación de la CYP _{BM3} F87A activa.....	14
4	Aminación de la CYP _{BM3} F87A.....	15
5	PEGilación de la CYP _{BM3} F87A.....	17
6	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomasie de la CYP _{BM3} F87A purificada mediante cromatografía de afinidad a níquel.....	25
7	Perfil de temperatura, porcentaje de la actividad específica de la CYP _{BM3} F87A y de la CYP _{BM3} F87A-PEG a diferentes temperaturas.....	29
8	Perfil de pH, porcentaje de la actividad específica de la CYP _{BM3} F87A y de la CYP _{BM3} F87A-PEG a diferentes pH.....	30
9	Termoestabilidad. Actividad residual en porcentaje de la CYP _{BM3} F87A y de la CYP _{BM3} F87A-PEG a diferentes temperaturas de incubación.....	31
10	Espectros de DC en UV lejano (de 190 a 250 nm).....	34
11	Figura 11. Histograma de la cantidad de fosfatasa alcalina excretada por las células “RAW-Blue” en contacto con la CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG.....	35
12	Estructura de la superficie de una CYP de <i>Bacillus megaterium</i>	38
13	Esquema de la superficie de la CYP _{BM3} F87A con los residuos K69, A87, E435 y A330, que tienen contacto con el DMF.....	39

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Condiciones para los programas utilizados en la cromatografía líquida de alta presión para la detección de los pesticidas transformados por la CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG.....	21
2	Constantes catalíticas de la CYP _{BM3} F87A.....	26
3	Constantes catalíticas de la CYP _{BM3} F87A aminada.....	27
4	Constantes catalíticas de la CYP _{BM3} F87A-PEG.....	28
5	Actividad específica de la CYP _{BM3} F87A y la CYP _{BM3} F87A-PEG para la transformación de diferentes pesticidas.....	32
6	Constantes catalíticas para la transformación del paratión y el diclorofeno con la PEG-CYP _{BM3} F87A en suero sanguíneo y solución amortiguadora MES.....	33
7	Fracciones aproximadas de cada tipo de estructura secundaria de la CYP _{BM3} F87A-PEG y la CYP _{BM3} F87A.....	35
8	Proteínas de uso terapéutico modificadas con PEG aprobadas por la FDA.....	44

Capítulo 1. Introducción

Las enzimas citocromo P450 (P450 o CYP) son una súper familia de hemoproteínas producidas por organismos de los tres dominios de la vida: eucariotas, archaeas y bacterias. Las CYP catalizan una gran variedad de reacciones anabólicas y catabólicas (Guengerich e Isin 2008; Lewis y Sheridan 2001). Algunas CYP están involucradas en la biosíntesis de sustancias endógenas como la de algunos principios activos, ácidos grasos, esteroides, prostanoides, vitamina D, ácidos biliares, alcaloides, terpenos, eicosanoides, fitoalexinas (Guengerich 1993; Hrycay y Bandiera 2015).

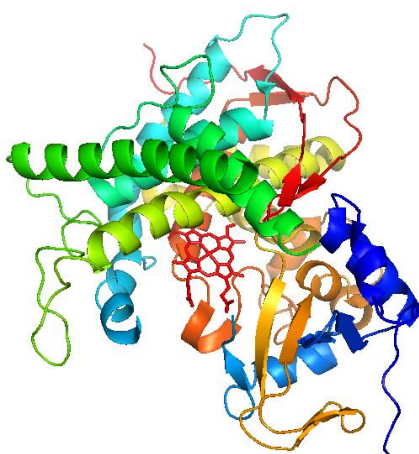


Figura 1. Estructura tridimensional del dominio hemo de una CYP de *Bacillus megaterium*. El dominio hemo está compuesto por los primeros 469 residuos de aminoácidos y la etiqueta de seis histidinas. El sitio activo está constituido por el grupo hemo. La imagen de la enzima se generó en Pymol (Schrödinger, Cambridge, MA)

Por otro lado existen CYP que forman parte importante del mecanismo de defensa adaptativo que le permite a los eucariotas superiores la eliminación de sustancias exógenas de estructura química poco común o inexistente en la naturaleza conocidas como xenobióticos. Tres cuartas partes del total de las enzimas encargadas del catabolismo de xenobióticos lo constituyen las CYP (Williams et al. 2004). Existen varios ejemplos de xenobióticos que son sustrato de las CYP, como el benzo[a]pireno y otros residuos del humo del tabaco, bifenilos policlorados (PBC), dioxinas producto de la combustión, solventes orgánicos, los principios activos utilizados en los fármacos, cosméticos, anestésicos, procarcinógenos, pesticidas, entre otros.

La eliminación de los xenobióticos se facilita cuando las CYP catalizan el primer paso de su conversión (Lewis 2001), una monooxigenación, que para la mayoría de los sustratos orgánicos produce componentes más solubles (Lewis 2001). De manera general, en el interior de la célula, la CYP cataliza la reacción de monooxigenación, incorporando un oxígeno del dioxígeno al grupo hemo, el cual es posteriormente incorporado al sustrato (Lewis y Sheridan 2001).

Las mayoría de las reacciones catalizadas por las CYP son oxidaciones, sin embargo pueden llevar a cabo reducciones, desaturaciones, escisiones de enlaces éster, expansiones y formaciones de anillos, escisión de aldehídos, deshidrataciones, sustitución nucleófila aromática por adición eliminación (ipso), oxidación de un electrón, reacciones de acoplamiento, reordenación de hidroperóxidos de ácidos grasos y prostaglandinas, pueden tener actividad fosfolipasa (Guengerich 2001; Nelson 2004; Zanger et al. 2008). Estas reacciones se llevan a cabo sobre una diversidad de sustratos que representa miles, de manera que son consideradas enzimas promiscuas (Guengerich 1999). La habilidad de las CYP de catalizar reacciones quimio, estereo y regio-específicas sobre un gran número de sustratos refleja sus roles biológicos y su distribución ubicua (Urlacher y Girhard 2012).

En general en eucariotas se han detectado CYP prácticamente en todas las membranas subcelulares, (Williams et al. 2000), siendo la mitocondria y el retículo endoplásmico las fuentes más importantes (Scott 1999; Williams et al. 2000). Por el contrario, en bacterias las CYP son enzimas solubles lo que las convierte en un blanco fácil de estudio (Munro y Lindsay 1996). La mayoría de las CYP en humanos son producidas por células que conforman el hígado, sin embargo se pueden encontrar ancladas al retículo endoplásmico de diversos tejidos como el del riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos, placenta y otros (Di Nardo y Gilardi 2012).

A pesar de que la distribución de las CYP en los organismos es diferente todas comparten ciertas similitudes estructurales. El grupo prostético hemo está embebido en la proteína en una cavidad hidrofóbica, y su configuración incluye un anillo de protoporfirina y hierro, del cual su función principal es la de transportar átomos de oxígeno (Guengerich 2001; Lewis 2001; Lewis y Sheridan 2001).

Hasta el 2012 se conocían 14 000 secuencias de genes que codifican para CYP en diferentes organismos (Hrycay y Bandiera 2015), en el humano se han encontrado 58 genes y más de 57 pseudogenes divididos en 18 familias y 43 subfamilias que codifican para CYP (Nelson et al. 2004; Nelson 2004). Los genes que codifican para las CYP son altamente polimórficos (Hosea et al. 2000) y las isoformas generadas presentan perfiles, características fisicoquímicas y propiedades catalíticas diferentes (Lewis y Sheridan 2001), además

de la capacidad de transformar diferentes sustratos. Existen isoformas de CYP que actúan sobre algunos xenobióticos específicos, como los pesticidas, y por lo tanto los daños a la salud generados por la exposición a estos agentes están relacionados, entre otros factores, con la capacidad baja o nula de metabolizarlos (Gilden et al. 2010; Kumar et al. 2010; Lynch y Price 2007; Povey 2010; Rose et al. 2005). Las CYP: CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 y CYP3A7 son isoformas de CYP humanos que se han identificado en la biotransformación de pesticidas (Abass et al. 2012).

Por definición pesticida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanos y de animales, como aves, mamíferos, insectos, moluscos o también plantas. Los pesticidas son empleados para combatir especies no deseadas de animales o plantas que causan perjuicio o interfieren con la producción, el procesamiento, almacenamiento, transporte o comercialización de productos agrícolas, y de la madera y sus derivados. Además existen sustancias que pueden ser administradas a animales para combatir insectos, ácaros y otras plagas que los ataquen (FAO 1990, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Los pesticidas pueden ser de origen biológico o químico. Estos últimos se pueden clasificar de acuerdo a la estructura química en arsenicales, triazinas, organometálicos, organoclorados y organofosforados.

A lo largo de la historia del hombre se han desarrollado técnicas de protección de plagas, sin embargo es hasta el siglo XIX que surge el concepto de pesticida. Durante esa época se desarrollaron sustancias tóxicas para ciertos organismos considerados como plagas. Los pesticidas han sido utilizados en todo el mundo a partir de los años 40. Durante la segunda guerra mundial se generaron muchos pesticidas, y algunos aún se siguen usando. Algunos insecticidas y herbicidas como el 2,4-D se crearon para erradicar cultivos de arroz japonés y después para formar parte del “Agente Naranja” empleado para defoliar áreas de jungla durante la guerra de Vietnam (Sanborn et al. 2012). Durante los siguientes años se incrementó el desarrollo de sustancias organofosforadas con propiedades de pesticidas y se empezó a utilizar el Dimefox en 1949 y el Malatión en 1950, además se desarrollan dos carbamatos, el Carbaryl en 1956 y el Aldicar en 1965 (Ferrer 2003). Estos agentes fueron empleados de manera indiscriminada ignorando los efectos sobre la salud del propio humano y su impacto ambiental (Albert 1996; Gilden et al. 2010; Mostafalou y Abdollahi 2013). El uso de los pesticidas en México inició después de la segunda guerra mundial, cuando se introdujo el uso de Diclorodifeniltricloroetano (DDT) importado. El DDT y otros pesticidas organoclorados, como el Toxafeno y Hexaclorobenceno, se utilizaron en la producción de productos agrícolas durante la década de 1950 y principios de 1960. Posteriormente se dejaron de importar los

pesticidas y fueron producidos a nivel local, lo que tuvo como consecuencia el incremento en su uso y por lo tanto su dispersión en el ambiente (Albert 1996).

En 1962 epidemiólogos en Estados Unidos notaron un incremento en la incidencia de linfoma no Hodking en áreas agrícolas de manera que lo relacionaron con el uso de algunos pesticidas. Desde ese momento se desarrollaron investigaciones con el objetivo de determinar la relación entre el uso de pesticidas y alteraciones en la salud de los humanos (Albert 1996; Mostafalou y Abdollahi 2013; Sanborn et al. 2004).

En los años 70 la agencia americana de alimentos y fármacos ("Food and Drug Agency" por su siglas en inglés FDA) advierte sobre la presencia de un exceso de pesticidas organoclorados en algunos productos agrícolas importados por productores mexicanos. La advertencia generó que los productores que exportaban productos agrícolas cambiaran el uso de organoclorados por agentes organofosforados, además de otros pesticidas menos persistentes pero más tóxicos para el hombre, como el Paratión, Azinfos metil, Metamidofos, o Carbofuran. Sin embargo el sector de agricultores que no exportaban sus productos continuó utilizando pesticidas organoclorados. El marco legal para la regulación del uso de pesticidas persistentes en México sigue siendo obsoleto, lo que permite que se continúe usando gran cantidad de organoclorados bajo condiciones poco reguladas y con potencial de contaminar el ambiente y provocar intoxicación a los trabajadores encargado de la aplicación de los pesticidas (Albert 1996).

Los pesticidas han sido empleados no solo para la agricultura, sino también en usos domésticos para la eliminación de plagas en vecindarios, en casas habitación y jardines, de manera que podemos encontrar éstos agentes en muchos ambientes como lugares de trabajo, escuelas, mantos freáticos, en el suelo, en el aire y en la comida (Gilden et al. 2010). Se estima que sólo el 5% de los pesticidas usados llegan a su objetivo, mientras que el resto se dispersa en el ambiente (Davila-Vazquez et al. 2005). Los pesticidas tienden a incorporarse en el suelo y, debido a que no pueden ser fácilmente degradados, se van agregando a la cadena alimentaria convirtiéndose en compuestos peligrosos para la salud pública (Atterby et al. 2002)

La exposición a pesticidas puede ocurrir a través de las vías respiratorias, el sistema digestivo, la piel y la placenta. Dicha exposición está asociada con diversos daños a la salud como la depresión, trastornos de la memoria, problemas respiratorios, padecimientos de la piel, déficit neurológico, puede provocar abortos espontáneos, malformaciones congénitas, y cáncer (McCauley et al. 2006).

Los tratamientos para las intoxicaciones agudas causadas por pesticidas están limitados, en el caso de organoclorados se hace una evacuación gástrica y se tratan el resto de los síntomas, sin embargo no existe

antídoto y los tratamientos de eliminación son ineficaces. Por otro lado, sólo están aprobados por la FDA tres tratamientos quimioterapéuticos para mitigar los efectos de una intoxicación con agentes organofosforados, se utiliza el tratamiento vagolítico con Atropina como antídoto y la regeneración de la colinesterasa mediante el suministro de Oximas, además de las Bensodiazepinas como sedantes. A pesar de que existen este tipo de tratamientos tratamiento para la intoxicación se reporta una mortalidad, en las intoxicaciones graves, entre el 10 y el 25% en proporción a la dosis ingerida (Ferrer 2003).

Se han propuesto sistemas enzimáticos para la eliminación de pesticidas en humanos (Cohen y Warringa 1957; Kirby et al. 2013), el esfuerzo por incluir tratamientos basados en sistemas proteicos representa algunos inconvenientes como la degradación y excreción rápida del organismo, de manera que el tratamiento requiere de suministro continuo de la proteína. Un incremento en la cantidad de proteína suministrada, además de hacer costoso el tratamiento, eleva la posibilidad de la respuesta por parte del sistema inmune (Dozier y Distefano 2015).

Por otro lado la nanobiotecnología combina las sofisticadas propiedades de los sistemas biológicos con la propiedades únicas de los materiales a nanoescala para crear nuevos dispositivos y sistemas integrados de la nano escala (Roco 2003). La bionanotecnología, sin duda, está revolucionando muchos campos incluyendo la medicina. La posibilidad de usar la bionanotecnología para crear nuevas terapias contra el envenenamiento por pesticidas es explorada en el presente trabajo.

1.1 Antecedentes

1.1 .1 Descripción de las enzimas citocromo P450

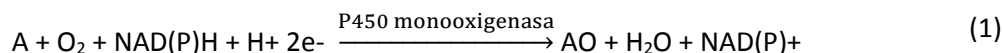
En 1958, Klingenberg describió el espectro de un “citocromo inusual”, aislado de las mitocondrias del hígado, unido con dióxido de carbono. En 1962, Sato y Omura detallaron más propiedades de aquella inusual enzima y le dieron el nombre de citocromo P450 (CYP), designación que deriva de “pigmento 450”, ya que la enzima unida a monóxido de carbono se presenta como un cromóforo con un máximo de absorbancia a 450 nm, similar a la de los citocromos mitocondriales (Lewis 2001).

A diferencia de los citocromos las CYP son biocatalizadores versátiles que efectúan reacciones de oxidación, regio, quimio y estéreo específica, de hidrocarburos (Urlacher y Girhard 2012) mediante el

hierro de su grupo hemo produciendo, con frecuencias, productos más solubles en agua ya sea añadiendo o desenmascarando grupos polares. Las CYP de mamíferos pueden oxidar tanto compuesto endógenos como xenobióticos; en plantas las CYP están implicadas en la biosíntesis de compuestos como hormonas, compuestos de defensa y conjugados de ácidos grasos; en bacterias las CYP forman parte de diversos procesos metabólicos y de biosíntesis (Mcdowall 2006).

Aquellas CYP producidas por bacterias son más fáciles de purificar y manipular en los laboratorios que las CYP provenientes de plantas y animales, ya que son solubles en medios acuosos por no estar asociadas a membrana, además exhiben alta estabilidad (Munro y Lindsay 1996). La CYP bacteriana mejor caracterizada es la P450cam aislada de *Pseudomona putida* (Sibbesen et al. 1996), sin embargo un gran número de CYP de origen bacteriano han sido identificadas, aisladas, clonadas, caracterizadas y sobre expresadas (Cryle et al. 2003; Gustafsson et al. 2004; Urlacher and Girhard; 2012 Yun et al. 2007) como la P450 BM3 de *Bacillus megaterium* que ha sido adoptada como paradigma para el entendimiento de la estructura y mecanismos de reacción de las enzimas citocromo P450 (Yun et al. 2007) además se ha demostrado que tiene la capacidad de metabolizar los mismos sustratos de algunas CYP humanas, por ejemplo mediante hidroxilaciones de ácidos grasos (Gustafsson et al. 2004; Yun et al. 2007) de cadena larga y alquenos, alcanos y amidas (Cirino y Arnold 2003 ; Tsotsou et al. 2013) epoxidaciones y desmetilaciones (Urlacher y Girhard 2012) desulfuración, desarilación y rompimiento de enlaces C-N de compuestos organofosforados, así como la oxidación de organoclorados (Sanchez-Sanchez et al. 2012).

Para muchas de las reacciones de oxidación típicas, las CYP utilizan O₂ y dos electrones que son suministrados por dinucleótido de nicotinamida y adenina NAD(P)H para catalizar la monooxigenación de una gran número de sustratos (Guengerich e Isin 2008; Hrycay y Bandiera 2015; Lewis y Sheridan 2001). La ecuación 1 representa la reacción general de monooxigenación, en la que un oxígeno molecular, activado por electrones provistos por el NAD(P)H, es integrado al sustrato mientras que el otro es reducido en agua.



Donde A representa al sustrato y AO al producto de la monooxigenación.

El NAD(P)H es un cofactor producido por las células y su función principal es el intercambio de electrones de hidrogeniones (Nelson 2004). Son moléculas muy inestables y difíciles de purificar por lo que son también muy costosas (Cirino y Arnold 2002).

Las CYP son enzimas muy versátiles que pueden actuar sobre un gran número de sustratos, pero también se ha demostrado que son capaces de emplear diferentes donadores de oxígeno como las monooxigenasas en presencia de NAD(P)H, las peroxigenasas que emplean hidroxiperóxidos, perácidos y otros compuestos peróxido como donadores sustitutos para promover la oxigenación en ausencia de NAD(P)H (Hrycay y Bandiera 2015), las peroxidasas que utilizan al H_2O_2 como donador de oxígeno y como aceptor final de electrones (Cirino y Arnold 2003; Mansuy y Battioni 1994; Ortiz de Montellano 2004; Urlacher et al. 2002). Existen dos ejemplos de CYP que son naturalmente capaces de actuar como peroxigenasas usando H_2O_2 ; el CYP52A1 de *Bacillus subtilis* y el CYP15B1 de *Sphingomonas paucimobilis* (Vidal-Limón et al. 2013). El ciclo de activación del dióxido se muestra en la figura 2.

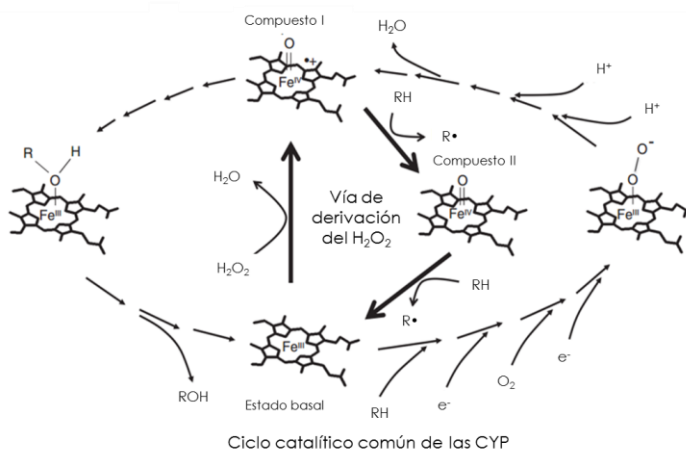


Figura 2. Esquema del ciclo catalítico de las CYP y las peroxidasas, combinadas con la vía de derivación del peróxido (de “peroxide shunt pathway” en inglés). Imagen modificada de Vidal –Limón et al 2013.

Con la finalidad de emplear un aceptor de electrones diferente al NAD(P)H, Cirino y Arnold (2003) generaron, mediante evolución dirigida, una CYP capaz de catalizar con mayor eficiencia reacciones de peroxidasa. La mutante CYP_{BM3}F87A, que corresponde a los primeros 469 residuos de aminoácidos que

constituyen el dominio hemo, fue obtenida de *Bacillus megaterium* (CYP_{BM3} "21BM3") y fue capaz de actuar como peroxigenasa utilizando peróxido en lugar del dominio reductasa, el cofactor y oxígeno.

En 2012 la CYP_{BM3}F87A fue probada por Sanchez-Sanchez y colaboradores (2012) como biocatalizador para la transformación de pesticidas organoclorados y organofosforados. Ambos grupos de pesticidas fueron transformados mediante una reacción catalizada por la CYP_{BM3}F87A, y los productos de la reacción tuvieron características químicas específicas que permiten su biodegradación y resultaron menos tóxicos que sus precursores (Sanchez-Sanchez et al 2012).

1.1.2 PEG

El polietilenglicol (PEG) o polioxietileno es un poliéter compuesto por subunidades de óxido de etileno. Es un polímero anfipático cuya estructura básica es $\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$. Es una molécula neutra, no inmunogénica que puede ser sintetizada de diferentes longitudes. Además ha sido aprobada por la FDA para su uso en cosméticos, alimentos y medicamentos ya que resulta inerte en los humanos y, debido a que no se metaboliza, no es tóxico (Bailon y Berthold 1998; Ikeda y Nagasaki 2012; Roberts et al. 2002). Hasta 2014 se podían encontrar 17 productos farmacéuticos pegilados en el mercado, 11 de los cuales son bioconjugados derivados de proteínas unidas a PEG (Pfister y Morbidelli 2014).

En 1977 se demostró que al unir moléculas de PEG a proteínas se disminuye la inmunogenicidad de las últimas. Se modificaron albúmina y catalasa de hígado bovino con PEG, posteriormente fueron suministradas a conejos y se observó una menor producción de anticuerpos con la enzima modificada comparada con la enzima no modificada. Esta disminución se debió a que el PEG cubrió los epítopos de los antígenos evitando la unión antígeno-anticuerpo. Esta investigación abrió la posibilidad de generar bioconjugados a partir de una diversidad de biomoléculas unidas a PEG sin causar respuesta inmunitaria (Abuchowski et al. 1977a; Abuchowski et al. 1977b). A partir de esa fecha se han desarrollado investigaciones exhaustivas sobre la obtención de bioconjugados con PEG y sus características. Durante la primer década se investigó sobre la respuesta inmunitaria y toxicidad, durante los años ochenta se desarrollaron materiales y métodos para la conjugación sitio específica, durante los noventa salen los primeros productos farmacéuticos al mercado y hasta la fecha se han generado conocimientos con miras en la obtención de bioconjugados con aplicaciones terapéuticas, entre otras (Veronese y Mero 2009).

En general las ventajas de la utilización de PEG para la obtención de bioconjugados pueden resumirse de la siguiente manera (Bailon y Berthold 1998; Pasut y Veronese 2012; Pfister y Morbidelli 2014; Veronese 2001) :

- a) Incrementa el volumen hidrodinámico de la molécula de manera que la excreción por la vía renal se disminuye y la vida media *in vivo* se incrementa.
- b) Con la adición de moléculas de PEG a proteínas se protegen secuencias de aminoácidos susceptibles a la degradación por enzimas metabólicas y se evita el reconocimiento mediado por anticuerpos.
- c) Se pueden obtener bioconjugados solubles en disolventes orgánicos, lo que le confiere ventajas a los biocatalizadores.
- d) Facilita la solubilidad de los bioconjugados en medio fisiológico.
- e) Incrementa la biocompatibilidad al evitar la opsonización de los bioconjugados.
- f) Reduce la agregación de proteínas.

El PEG se ha utilizado en biocatalizadores con la finalidad de alterar su estabilidad y capacidades catalíticas. Se ha demostrado que la capacidad catalítica de algunas enzimas modificadas con PEG disminuye en comparación con las no modificadas (Gaertner y Puigserver 1992; Pasut et al. 2014; Rodríguez-Martínez et al. 2009) , y en otras incrementa (García-Arellano et al. 2004; Quintanilla-Guerrero et al. 2008; Tinoco y Vazquez-Duhalt 1998; Vazquez-Duhalt et al. 1992). Las propiedades catalíticas del citocromo C de corazón de caballo se aumentaron al modificarlo de manera química con trimetilsilano (TMS) y PEG. Como consecuencia de la modificación se alteró el microambiente del sitio catalítico de la enzima y el biocatalizador oxidó 9 compuestos aromáticos más que el citocromo no modificado (Tinoco y Vazquez-Duhalt 1998). La presencia de PEG modificó el sitio activo de la proteína perdiendo una sexta coordinación lo que aumentó su actividad catalítica (Busi et al. 2000). Por otro lado, la actividad enzimática de la peroxidasa de rábano con tolueno como sustrato se incrementó 16 veces al modificarse con PEG. El incremento en la actividad en solventes no miscibles en agua se correlacionó con el incremento en la hidrofobicidad de la enzima, de manera que la modificación con PEG es una herramienta para la obtención de biocatalizadores para sistemas hidrofóbicos (Vazquez-Duhalt et al. 1992).

La modificación con PEG de las enzimas induce un incremento en la estabilidad térmica, en la estabilidad en diferentes pH, en la capacidad de catalizar reacciones en medios no acuosos, además de una disminución en la susceptibilidad a la degradación por proteasas (Wieder et al. 1979). La modificación del Cyt se efectuó con la finalidad de ampliar el intervalo de temperatura en la que cataliza reacciones. El Cyt

modificado químicamente (Cyt-PEG) catalizó reacciones a temperaturas superiores a 100°C, es decir fue termoestable. La termoestabilidad fue consecuencia de que el PEG protegió el sitio catalítico de la enzima evitando que se deformara con los incrementos de temperatura. Esta protección no fue termodinámica sino cinética (García-Arellano et al. 2002). Finalmente, un incremento en el intervalo de pH en el que la enzima fenilalaninaamonioliasa catalizó reacciones y un incremento en su termoestabilidad fue observada cuando se modificó con PEG (Wieder et al. 1979) .

Basados en la premisa de que existen enzimas que actúan sobre pesticidas como sustratos se han desarrollado investigaciones en las que se proponen enzimas como una alternativa para mitigar los efectos causados por la intoxicación en humanos. Por ejemplo, se han estudiado las fosfotriesterasas (Masson et al. 1998; Pei et al. 1994; Tuovinen et al. 1994; Tuovinen et al. 1996; Trovaslet-Leroy et al. 2011) y las paraoxonasas (Kirby et al. 2013; Masson et al. 1998; Rochu, et al. 2007) como sistemas de limpieza en torrente sanguíneo (Masson et al. 1998). Además se ha investigado la encapsulación de fosfodiesterasa en eritrocitos de roedores (Pei et al. 1994) y en liposomas (Petrikovics et al. 1999). Otro ejemplo lo constituye el uso de butilcolinesterasa que es producida por los humanos pero en cantidades muy bajas al igual que la paraoxonasa (Ashani y Pistinner 2004; Kovarik et al. 2010; Mumford and Troyer 2011).

Por otro lado existen dos enzimas que han sido modificadas con PEG para funcionar como sistemas de limpieza como son la hidrolasa de organosforados (OPH) y la butirilcolinesterasa (huBuChE). De ambas se han estudiado las propiedades catalíticas e inmunogénicas, la huBuChE con PEG (con nombre comercial de Protexia®) posee el estatus de nuevo fármaco en investigación (IND por las siglas en inglés “investigational new drug”) en Estados Unidos como una droga potencial para el pretratamiento contra el envenenamiento de humanos con agentes organofosforados (Novikov et al. 2010; Mumford y Troyer 2011). Todos los cerdos tratados con Protexia® después de su exposición a O-etildiisopropilaminoetilmetilfosfonotiolato (VX) sobrevivieron, de manera que este bioconjugado podría ser empleado como un sistema de limpieza, tanto para civiles como para personal militar ante una exposición a agentes organofosforados (Mumford y Troyer 2011). Por otro lado, la OPH bacteriana unida a PEG se estudió como agente de limpieza. Se comprobó que OPH-PEG tiene características farmacocinéticas e inmunogénicas favorables al compararse con la no modificada, además de que conservó su capacidad catalítica y estabilidad térmica. Por lo anterior es considerada como un potencial agente para la desintoxicación de compuestos organofosforados (Novikov et al. 2010). Finalmente, considerando que se ha demostrado la capacidad de las CYP de convertir de organofosforados y organoclorados en compuestos menos tóxicos (Sanchez-Sanchez et al. 2012), en este trabajo se plantea la modificación de la CYP con PEG para la obtención de un bioconjugado que conserve sus capacidades

catalíticas con pesticidas y sea un potencial agente de tratamiento para mitigar los efectos del envenenamiento causado por pesticidas.

1.2 Hipótesis

La CYP_{BM3}F87A-PEG conservará una eficiente actividad catalítica sobre pesticidas, reduciendo su toxicidad y será inmunológicamente inerte.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Diseñar el biocatalizador CYP_{BM3}F87A-PEG inmunológicamente inerte y determinar su capacidad catalítica en la transformación de pesticidas.

1.3.2 Objetivos particulares

- Diseñar y sintetizar CYP-PEG
- Estudiar el efecto de la aminación de la superficie de la CYP_{BM3}F87A en la PEGilación
- Caracterizar la CYP_{BM3}F87A -PEG.
- Estudiar la transformación de pesticidas con la CYP_{BM3}F87A -PEG
- Determinar la respuesta inmune de las CYP_{BM3}F87A -PEG en células del sistema inmunitario.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Expresión y purificación de CYP_{BM3}F87A

La CYP_{BM3} 21B3 F87A (CYP_{BM3}F87A) consiste sólo en el dominio hemo, carente del dominio NAD(P)H reductasa. La CYP_{BM3}F87A fue obtenida mediante evolución dirigida por Cirino y Arnold en 2003. Esta enzima es capaz de utilizar el peróxido de hidrógeno para catalizar hidroxilaciones y epoxidaciones (Cirino y Arnold 2002), además cataliza la transformación de algunos pesticidas organoclorados y organofosforados disminuyendo su toxicidad (Sanchez-Sanchez et al. 2012). Debido a que las macromoléculas de origen proteico que son sobre expresadas en sistemas bacterianos requieren un promotor fuerte y un sitio de unión al ribosoma eficiente ubicado a la distancia adecuada del codón de inicio (Urlacher y Schmid 2004), la CYP_{BM3}F87A fue sobre expresada en *Escherichia coli* DH5 α en el vector de expresión inducible con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) pCWori siguiendo la metodología que se describe a continuación.

2.1.1 Expresión y purificación de CYP_{BM3}F87A

La cepa transformada con el plásmido correspondiente fue utilizada para generar un pre inóculo en medio de cultivo Luria-Bertani con 200 μ g/mL de ampicilina (LB).

A partir del pre inóculo se obtuvo una alícuota de 0.5 mL y se adicionó a 50 mL de medio TB (del inglés “Terrific Broth”). El medio TB se colocó en un matraz ocupando sólo el 20 % del espacio total disponible. Cada litro de medio TB se preparó con 12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura, 4 mL de glicerol y 100 mL de una solución amortiguadora de fosfatos de potasio, 0.17 M de KH₂PO₄ y 0.72 M DE K₂HPO₄ con un pH de 7.4.

El medio TB fue suplementado con 0.5 mM de tiamina y de elementos traza.

La solución de elementos traza se preparó de acuerdo a los reportado en Joo et al., (1999). En 10 mL de una solución de HCl 90% v/v de agua destilada, se disolvieron los siguientes compuestos: 0.011 g MgCl₂ 2H₂O, 0.3 g de FeCl₂ 6H₂O, 0.0065 g de ZnCl₂ 4H₂O, 0.002 g CoCl₂ 6H₂O, 0.01 g de Na₂MoO₄ 2H₂O, 0.0038 g CaCl₂, 0.0126 g CuCl₂ 2H₂O y 0.002 g H₂BO₃.

Una vez que se inoculó la *E. coli*. en medio TB, los matraces se colocaron en el agitador orbital a 100 rpm con una temperatura de 25°C durante 44 horas. Una vez transcurridas las 44 horas se adicionaron 0.5 mM IPTG y 1 mM ácido aminolevulínico y se mantuvo a la misma temperatura y agitación durante 44 horas más. Las bacterias se recuperaron mediante centrifugación a 3500 rpm durante 45 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se recuperó el precipitado bacteriano. El precipitado bacteriano fue reservado a -80°C hasta que se continuó con el proceso de purificación de la enzima.

2.1.2 Purificación de la CYP_{BM3}F87A

Por cada gramo de precipitado bacteriano se adicionaron 10 mL de solución amortiguadora de lisis, la cual contenía 10 mM de imidazol, 50 mM de NaH₂PO₄ y 300 mM de NaCl con un pH de 8. La suspensión fue sometida a un proceso de sonicado en baño de hielo para producir la lisis celular. Cada ciclo de sonicado consistió en 9.9 s de pulso por cada 9.9 s de descanso durante 2 min, se utilizó la macro punta del sonicador con una potencia de 36%. El ciclo se repitió de 5 a 6 veces. El homogenizado, producto de la lisis, fue centrifugado durante 15 min a 12 000 rpm a 4°C. El sobrenadante o extracto se recuperó y se filtró a través de una membrana de 0.22 µm. El extracto se concentró mediante ultrafiltración con AMICON a través de una membrana de 10 kDa hasta reducir el volumen a 1/5 del volumen inicial.

Las CYP_{BM3}F87A contienen una etiqueta de 6 histidinas. La etiqueta permite la purificación en un solo paso mediante cromatografía de afinidad a níquel, en éste caso se empleó una columna HisTrap™ FF de 5 mL precargada con níquel (GE Healthcare). Se procedió a la purificación mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC del inglés “Fast Protein Liquid Chromatography”). Se siguió el programa de purificación para proteínas con etiqueta de histidinas preestablecido en equipo ÄTKA prime plus Protein Purification System (ÄKTA prime plus, GE Healthcare). El programa, de manera general, consiste en un gradiente de concentración de imidazol de 20 a 500 mM, que inicia con una solución amortiguadora con 20 mM imidazol, 50 mM de NaH₂PO₄ y 300 mM de NaCl con un pH de 8 hasta 500 mM de mM imidazol, 50 mM de NaH₂PO₄ y 300 mM de NaCl con un pH de 8. El flujo empleado fue de 5 mL/min. Las fracciones coloreadas fueron recuperadas.

Las fracciones coloreadas que contuvieron la CYP_{BM3}F87A fueron sometidas a un cambio de solución amortiguadora mediante una diálisis contra 50 mM de MES pH 8, 10% glicerol durante una noche.

Posteriormente se concentró la solución mediante ultrafiltración a través de una membrana de 30 kDa. Las alícuotas fueron conservadas a -20 °C hasta que fueron utilizadas.

2.1.3 Pureza y cuantificación de la CYP_{BM3}F87A

Se analizó la pureza de la CYP_{BM3}F87A mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida y densitometría utilizando como herramienta el programa imageJ.

2.1.4 Cuantificación de la CYP_{BM3}F87A activa

La cuantificación de CYP_{BM3}F87A catalíticamente activa se efectuó siguiendo la metodología propuesta por Sato y Omura en 1964 con algunas modificaciones. El método permite detectar el grupo hemo de la enzima mediante un cambio en la absorbancia debido a la coordinación del mismo con CO. Para producir el monóxido de carbono se adicionó el ácido fórmico a un volumen de ácido sulfúrico con una relación 2:1 en un sistema esquematizado en la figura 3. El ácido sulfúrico deshidrata al ácido fórmico teniendo como un producto de la reacción el CO. El CO producido se burbujea dentro de la muestra con la CYP_{BM3}F87A, posteriormente se adicionó hidrosulfito de sodio. Se monitoreó la aparición de un máximo de absorbancia a 450 nm mediante espectrofotometría en un Perkin-Elmer series 836 ET. La concentración de enzima se calculó con la ecuación 1.

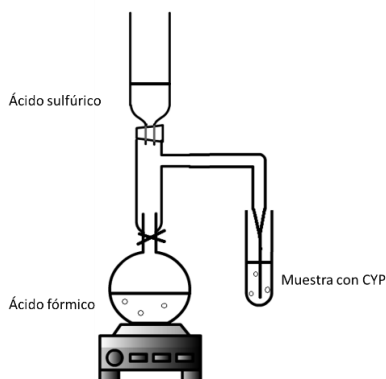


Figura 3. Esquema del método para la producción de monóxido de carbono en la cuantificación de la CYP_{BM3}F87A activa.

$$CYP \mu M = \frac{\Delta abs \ 450 - \Delta abs \ 490}{0.091} * \text{dilución}$$

Ecuación 1. Para calcular la concentración micro molar de CYP_{BM3}F87A

2.2 Modificación química de la CYP_{BM3}F87A

2.2.1 Aminación de la CYP_{BM3}F87A

Con la finalidad de incrementar el número de sitios de unión a PEG a la CYP_{BM3}F87A se le adicionaron moléculas de clorhidrato de etilendiamina (etilendiamina) para intercambiar residuos carboxílicos por aminos en la superficie de la enzima.

Mediante el programa Pymol (Schrödinger, Cambridge, MA) se cuantificaron los residuos de aminoácidos capaces de reaccionar con etilendiamina (derivados de ácidos glutámicos y aspárticos). Una vez cuantificado el número de residuos susceptibles a la modificación, se calcularon el número de moléculas, de etilendiamina y carbodiimida, necesarias para la modificación química.

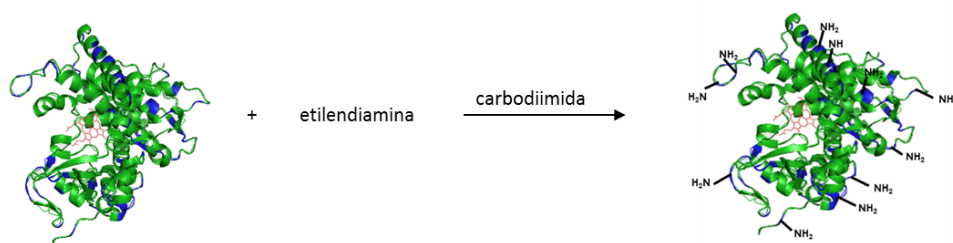


Figura 4. Aminación de la CYP_{BM3}F87A. En color azul los residuos de aminoácido derivados de ácidos glutámicos y ácidos aspárticos. La imagen de la enzima se generó en Pymol (Schrödinger, Cambridge, MA)

Previo a la modificación, se efectuó un intercambio de la solución amortiguadora mediante diálisis contra MES 0.05 M con 10% de glicerol. Se adicionó la N-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-N'carbodiimida (carbodiimida) el y la etilendiamina con un exceso de 5 veces, con base molar, a los carboxilos superficiales de la enzima. La reacción se llevó a cabo durante 1 h en agitación suave a temperatura ambiente no controlada. Finalmente se realizó una diálisis contra MES 0.05 M, pH 8, 10% glicerol con la finalidad de eliminar el exceso de etilendiamina y de carbodiimida.

2.2.2 Metodología para la cuantificación de grupos amino

2.2.2.1 Ninhidrina

Se cuantificó el porcentaje de aminos libres en una muestra de CYP_{BM3}F87A y de CYP_{BM3}F87A aminada con la finalidad de calcular la cantidad necesaria de PEG 5000 para el segundo paso de la modificación química. Para ello se siguió el método propuesto por Sun y colaboradores (2006) con algunas modificaciones.

Se preparó la solución de ninhidrina de la manera siguiente: bajo atmosfera de nitrógeno se adicionaron 2 g de ninhidrina por cada 75 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 25 mL de solución amortiguadora de acetatos 4 M, el reactivo preparado se reservó en atmósfera de nitrógeno a 4°C.

También bajo atmósfera de nitrógeno a 1 mL de solución de la CYP_{BM3}F87A se le agregó 1 mL de la solución de ninhidrina, la mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos en atmósfera de nitrógeno a baño maría a 40°C, posteriormente se adicionaron 0.5 mL de etanol al 50% y se tomó la lectura en el espectrofotómetro Perkin-Elmer series 836 ET a 570 nm. El porcentaje de modificación se relacionó de manera directa con el incremento en la lectura a 570 nm en comparación la CYP_{BM3}F87A sin tratamiento. Una vez que se PEGiló la CYP_{BM3}F87A se cuantificó el porcentaje de aminos libres, dato que fue utilizado para calcular el número de moléculas de PEG añadidas a cada CYP_{BM3}F87A.

2.2.2.1 Ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS)

También se analizaron las CYP_{BM3}F87A modificadas mediante otro método colorimétrico: TNBS (ácido picrilsulfónico o ácido trinitrobenzenosulfónico) cuya metodología se describe a continuación. A 0.15 mg de proteína en agua se adicionaron 250 μ L de NaCO_3 y 250 μ L de TNBS al 5%. La mezcla se dejó en baño de agua a 40°C y en oscuridad durante 2 horas. Finalmente se adicionaron 250 μ L de SDS al 10% y 125 μ L de HCl 1M y se homogenizó. Las diferencias de absorbancia producto de la modificación se detectaron a 335 nm en el espectrofotómetro Perkin-Elmer series 836 ET. El porcentaje de modificación también se relacionó de manera directa con la lectura a 335 nm de la CYP_{BM3}F87A sin modificaciones (Habeeb 1966).

2.2.3 PEGilación

Una vez cuantificados los aminos libres de la CYP_{BM3}F87A aminada, es decir los ácidos carboxílicos modificados y las lisinas, se procedió a su modificación con el metoxi PEG succinimidilcarboximetiléster 5000 (PEG). En la figura 5 se representa la CYP_{BM3}F87A aminada y después de reaccionar con el PEG.

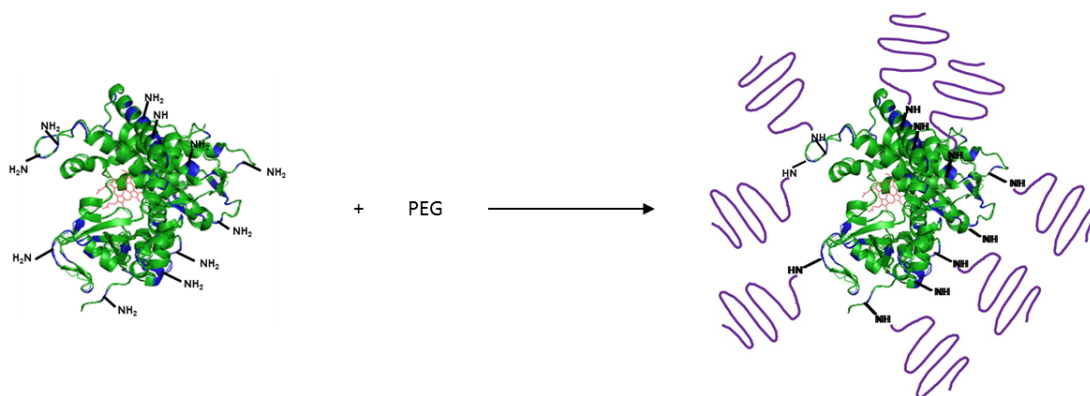


Figura 5 .PEGilación de la CYP_{BM3}F87A. En color azul los residuos de aminoácido derivados de ácidos glutámicos y aspárticos, en color morado las moléculas de PEG. La imagen de la enzima se generó en Pymol (Schrödinger, Cambridge, MA)

Se adicionó la cantidad necesaria de PEG para la modificación más un exceso de 50 veces con base molar a los aminos libres de la enzima, la reacción se efectuó durante 2 h en agitación suave a temperatura ambiente no controlada, posteriormente se realizó una diálisis contra MES 0.05 M con 10% glicerol,

durante una noche, con la finalidad de eliminar el exceso de PEG. La CYP_{BM3}F87A PEGilada (CYP_{BM3}F87A-PEG) fue reservada a 4°C hasta que fue utilizada.

2.3 Obtención de las constantes catalíticas de la CYP_{BM3}F87A, CYP_{BM3}F87A aminada y CYP_{BM3}F87A-PEG

Las constantes catalíticas, K_M y k_{cat} de la CYP_{BM3}F87A, CYP_{BM3}F87A aminada y CYP_{BM3}F87A-PEG, fueron obtenidas variando la cantidad de sustrato, 2,6-dimetoxifenol (DMF), de 0 a 4000 μM . 1 mL de mezcla de reacción contenía 5.44×10^{-11} moles de CYP_{BM3}F87A, o 9.3×10^{-12} moles de CYP_{BM3}F87A aminada o 5.4×10^{-12} moles de CYP_{BM3}F87A-PEG, además de 3 mM de H_2O_2 y el DMF, la temperatura de reacción fue la misma del ambiente en ese momento. La obtención del producto de la reacción fue monitoreada a 468 nm en el espectrofotómetro Perkin-Elmer series 836 ET. Las constantes catalíticas fueron calculadas en el programa MMFit siguiendo el modelo de Michaelis Menten.

2.4 Perfiles de pH, temperatura y termoestabilidad de la CYP_{BM3}F87A-PEG

Con el objetivo de comparar el comportamiento catalítico de las enzimas se determinó la actividad específica a diferentes condiciones de pH y de temperatura. Además se midió la termoestabilidad incubando la enzima a diferentes temperaturas respecto al tiempo y posteriormente se estimó la actividad residual.

2.4.1 Perfil de pH de la CYP_{BM3}F87A y de la CYP_{BM3}F87A-PEG

Para las mezclas de reacción se utilizaron diferentes soluciones amortiguadoras, de fosfatos 50 mM para los pH 5 y 6, MES 50 mM para los pH 7, 8 y 9, y para los pH de 10, 11, 12 y 13 boratos 50 mM. Cada mililitro de mezcla de reacción contenía 5.44×10^{-11} moles de CYP_{BM3}F87A o 2.7×10^{-11} moles de CYP_{BM3}F87A-PEG, 500 μM de DMF como sustrato y 3 mM H_2O_2 , la reacción se efectuó a temperatura ambiente. El producto de las reacciones se monitoreó como se ha descrito previamente.

2.4.2 Perfil de temperatura de la CYP_{BM3}F87A y de la CYP_{BM3}F87A-PEG

La mezcla de reacción utilizada contenía 5.44×10^{-11} moles de CYP_{BM3}F87A o 2.7×10^{-11} moles de CYP_{BM3}F87A-PEG, 500 μ M de DMF como sustrato y 3 mM de H₂O₂ en una solución amortiguadora MES 50 mM a pH 8. La aparición del producto dimérico debida a la oxidación del sustrato se monitoreó en el espectrofotómetro Perkin-Elmer series 836 ET acoplado a un baño tipo *Peltier* que permitió el control de temperatura. Se midió la actividad específica a 35, 40, 55, 60, 80 y 90°C.

2.4.3 Estabilidad de la CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG a diferentes temperaturas de incubación

Se verificó la estabilidad de las enzimas CYP_{BM3}F87A y CYP_{BM3}F87A-PEG después de ser incubadas de 0 a 30 min a diferentes temperaturas. Se incubaron a 40, 50 y 60°C. 5.44×10^{-11} moles de CYP_{BM3}F87A o 2.7×10^{-11} moles de CYP_{BM3}F87A-PEG fueron colocados en la mezcla de reacción, después de incubarse, junto con 500 μ M de DMF y 3 mM de H₂O₂ en una solución amortiguadora MES 50 mM a pH 8. La aparición del producto dimérico debida a la oxidación del sustrato se monitoreó en el espectrofotómetro Perkin-Elmer series 836 ET acoplado a un baño tipo *Peltier* que permitió el mantenimiento de la temperatura.

2.5 Actividad en suero fisiológico y suero

Se midió la actividad específica de la CYP_{BM3}F87A-PEG con 500 μ M de DMF, 3 mM de H₂O₂ en solución amortiguadora fisiológica con una temperatura controlada mediante el baño tipo *Peltier* a 37° centígrados. Se emplearon 5.44×10^{-11} moles de CYP_{BM3}F87A o 2.7×10^{-11} moles de CYP_{BM3}F87A-PEG en un mililitro de la mezcla de reacción. La mezcla de reacción consistió en solución amortiguadora MES 50 mM pH 8 o solución amortiguadora fisiológica “Dulbecco’s modified eagle’s medium”, 500 μ M de DMF como sustrato y 3 mM de H₂O₂. La aparición del producto dimérico debida a la oxidación del sustrato se monitoreó en el espectrofotómetro Perkin-Elmer series 836 ET acoplado a un baño tipo *Peltier* que permitió el control de temperatura. Se midió la actividad específica a 35, 37 y 40°C.

2.6 Transformación enzimática de pesticidas con la CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG

La capacidad de la CYP_{BM3}F87A de transformar algunos pesticidas organoclorados y organofosforados fue demostrada por Sánchez-Sánchez en 2012, con la finalidad de evaluar la influencia en el desempeño catalítico de la CYP_{BM3}F87A al ser PEGilada se hicieron ensayos con pesticidas como sustratos. La degradación de pesticidas mediante la CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG fue evaluada a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC del inglés “High Pressure Liquid Chromatography”). Un mL de la mezcla de reacción que contenía 2.18×10^{-11} a 1.92×10^{-10} moles de CYP_{BM3}F87A, o 1.38×10^{-11} del CYP_{BM3}F87A-PEG, 200 μ M de pesticida y 0.3 mM H₂O₂ en una solución amortiguadora MES 0.05 M con 10% de acetonitrilo (ACN). La reacción se incubó durante 10 min a temperatura ambiente no controlada. Una vez transcurridos los 10 minutos, la reacción se detuvo añadiendo 1 mL de ACN y la mezcla se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos, después se analizó en HPLC, en un equipo Agilent serie 1100 mediante fase inversa con columna C18, Kinetex C18, 5 μ m, 150 x 4,6 mm (Phenomenex, CA).

El consumo de cada pesticida como sustrato: diclorofeno, paratión, linurón, pentaclorofenol, clorpirifós, dinoterb, picloran y propanil se determinó mediante la disminución del área de cada pico obtenido mediante la cromatografía. El programa de elución isocrático contenía acetonitrilo y agua con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA), el flujo de elución fue de 0.5 mL/min. Los valores de las constantes catalíticas se obtuvieron utilizando el software MMFit siguiendo un modelo de Michaelis-Menten.

A continuación se muestra una tabla con las concentraciones de los eluyentes y la longitud de onda de detección de cada pesticida empleado como sustrato de la CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG.

Tabla 1. Condiciones para los programas utilizados en la cromatografía líquida de alta presión para la detección de los pesticidas transformados por la CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG.

Pesticida	Longitud de onda (nm)	Volumen de agua 0.1% TFA	Volumen de ACN 0.1% TFA
Diclorofeno	200	50	50
Paratión	280	50	50
Dinoterb	215	30	70
Linurón	280	50	50
Clorpirifós	208	30	70
Pentaclorofenol	215	40	60
Picloran	223	50	50
Propanil	210	50	50

2.7 Evaluación de la actividad catalítica de la CYP_{BM3}F87A-PEG en suero sanguíneo con paratión como sustrato

Se efectuaron reacciones a concentraciones ascendentes de paratión en solución amortiguadora y MES 0.5 M con la finalidad de obtener la K_M y la k_{cat} . La obtención de *p*-nitrophenol como producto de la transformación del paratión por la CYP_{BM3}F87A-PEG fue evaluada mediante espectrofotometría a 400 nm ($\epsilon = 18510 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Un mL de la mezcla de reacción contenía 7.36 nmol PEG-CYP_{BM3}F87A, de 50 μM a 170 μM de paratión, y 3 mM de H_2O_2 . Después de 10 min la reacción se detuvo adicionando 1 mL de ACN y fue centrifugada a 14000 rpm durante 15 min. El *p*-nitrophenol se detectó en el espectrofotómetro Perkin-Elmer series 836 ET. Las constantes fueron calculadas en MMfit siguiendo el modelo de Michaelis-Menten.

2.8 Evaluación de la actividad catalítica de la CYP_{BM3}F87A-PEG en solución amortiguadora MES con diclorofeno como sustrato

Las reacciones se efectuaron en 1 mL de solución amortiguadora MES 0.5 M, con 7.36 nmol PEG-CYP_{BM3}F87A, de 100 μ M a 700 μ M de diclorofeno, y 3 mM de H₂O₂. Después de 10 min la reacción se detuvo adicionando 1 mL de ACN y fue centrifugada a 14 000 rpm durante 5 min. El consumo del sustrato fue monitoreado en HPLC Agilent serie 1100 mediante fase inversa C18, Kinetex C18, 5 μ m, 150 x 4,6 mm (Phenomenex, CA) a 200 nm. El programa de elución isocrático contenía 50% acetonitrilo y 50% agua con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA), el flujo de elución fue de 0.5 mL/min Las constantes fueron calculadas en MMfit siguiendo el modelo de Michaelis-Menten.

2.9 Cambios en la estructura secundaria

A través del método de dicroísmo circular (CD del inglés “circular dichroism”) se puede evaluar la estructura secundaria de una proteína al incidirle luz polarizada y estudiar la diferencia entre la absorción de la luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda de la misma (Greenfield 2006). Mediante CD se evaluó el efecto de la PEGilación en la estructura secundaria de la CYP_{BM3} cuya metodología se describe a continuación.

Los espectros se obtuvieron en un espectropolarímetro JASCO modelo J-715 equipado con un controlador de temperatura tipo *Peltier* de 190 a 260 nm a 25°C. La concentración final de la CYP_{BM3}F87A y CYP_{BM3}F87A-PEG fue de 5.5 μ M en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM con un pH 7.6. Se colectaron ocho espectros de cada muestra para mejorar la relación señal/ruido, de 190 a 260 nm a 25°C en una celda con una longitud de 0.01 cm. La predicción de la estructura secundaria de la CYP_{BM3}F87A y CYP_{BM3}F87A-PEG se realizó utilizando el algoritmo CDSSTR.

2.10 Evaluación de la inmunogenicidad de la CYP_{BM3}F87A y CYP_{BM3}F87A-PEG

Uno de los principales desafíos para los sistemas de origen proteico que son posibles agentes para uso terapéutico es evitar el reconocimiento de los mismos por el sistema inmunitario. El PEG protege segmentos de la CYP_{BM3}F87A que puedan ser reconocidos por inmunoglobulinas y por lo tanto activar la respuesta del sistema inmunitario. Si las moléculas son opsonizadas por alguna inmunoglobulina y son fagocitadas entonces se limita su tiempo de acción o bien puede activar la liberación de células y citosinas del sistema inmunitario y provocar inflamación de tejidos y generar daño en células sanas.

Por otro lado al expresar proteínas en sistemas bacterianos es importante considerar que los productos purificados contienen moléculas propias de las bacterias que son reconocidas también por el sistema inmunitario. En el caso de *E. coli* las moléculas que son reconocidas son los lipopolisacáridos (LPS) que forman parte de la membrana externa y su liberación ocurre cuando una bacteria Gram negativa es lisada. Los LPS son patrones de reconocimiento de receptores (PRRs) conocidos como receptores tipo toll (del inglés "Toll Like Receptor") que son reconocidos por células presentadoras de antígenos como los macrófagos y células dendríticas. El reconocimiento de PRRs genera la respuesta inflamatoria, seguida de la fagocitosis, procesamiento de antígeno y la subsecuente presentación de antígenos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) I y II (Areschoug y Gordon 2008; Mezhitov y Janeway 2000).

Durante el proceso inflamatorio se producen citosinas y quimosinas que facilitan el reclutamiento de células en las áreas afectadas. Las células T, componentes del sistema inmunitario adaptativo, son importantes mediadores del proceso inflamatorio que incluye la expresión y secreción de citosinas y quimosinas mediada por los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (Khalaf et al. 2010). Para evaluar la inmunogenicidad de CYP_{BM3}F87A-PEG fue necesario eliminar los LPS mediante cromatografía y cuantificar el nivel de expresión de un gen reportero bajo el control de los promotores NF- κ B y AP-1 asociados a la respuesta inflamatoria.

2.10.1 Eliminación de lipopolisacáridos (LPS)

La eliminación de LPS se realizó mediante una cromatografía de afinidad a través de una resina de alta capacidad conformada por celulosa y poli ξ -lisinas para unir endotoxinas de manera selectiva. La metodología de la cromatografía se describe a continuación.

Se adicionaron 3 mL de resina (Pierce high capacity endotoxin removal resin) a una jeringa estéril con un papel filtro en el fondo para formar la columna para la cromatografía. Una vez empacada la columna se procedió a equilibrarla con 5 volúmenes de una solución de NaOH 0.2 M en 95% etanol durante una noche. Una vez transcurrido el tiempo se adicionaron 5 volúmenes de una solución de NaCl 2 M y después 5 volúmenes de agua libre de pirógenos. Posteriormente se equilibró con 5 volúmenes de una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.05 M pH 7.4. Se cargó la muestra, la CYP o la CYP_{BM3}F87A-PEG y se eluyó con la solución amortiguadora de fosfatos, la fracción coloreada libre de LPS fue recuperada.

2.10.2 Expresión de la fosfatasa alcalina

La respuesta inmunitaria que generan la CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG se midió a través de la expresión de la fusión transcripcional de los promotores de los genes NF- κ B y AP-1 al gen codificante de la fosfatasa alcalina expresados en las células RAW-Blue (Invivogen, San Diego, CA) derivadas de la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7. Las células RAW-Blue contienen el gen que permite la excreción de la fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP) controlada a través de los promotores NF- κ B y AP-1 (Xie, et al. 2011). Se incubaron 25 μ g/mL de CYP_{BM3}F87A o de CYP_{BM3}F87A-PEG en un cultivo de 1×10^5 macrófagos en medio de cultivo DMEM (del inglés "Dulbecco's Modified Eagle's médium") con 10% de suero fetal bovino. Los macrófagos se incubaron durante 12 h a 37°C en presencia de 5% CO₂. Previo a la incubación de los macrófagos, las muestras de CYP_{BM3}F87A y CYP_{BM3}F87A-PEG fueron tratadas con 33 μ g/ml de polimixina con la finalidad de eliminar restos de lipopolisacáridos de origen bacteriano (LPS), durante 1 h a 37°C. El sobrenadante se colectó para evaluar el producto de la actividad de la fosfatasa alcalina a 655 nm.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Producción y caracterización de la CYP_{BM3}F87A

En el sistema de cultivo utilizado se produjeron 106 mg de CYP_{BM3}F87A, de manera heteróloga en *E. coli*, por cada litro de medio TB utilizado. Después de la purificación por medio de la cromatografía de afinidad se evaluó el porcentaje de pureza de las fracciones recuperadas y se determinó que del total de proteína purificada aproximadamente el 96 % correspondió a la CYP_{BM3}F87A. En la figura 6 se muestra el gel de electroforesis en acrilamida al 12%, en el primer carril, de izquierda a derecha, se observa el marcador de peso molecular y en el segundo la CYP_{BM3}F87A purificada. La banda más pronunciada, cercana a la del marcador de 50 kDa corresponde a la CYP_{BM3}F87A.

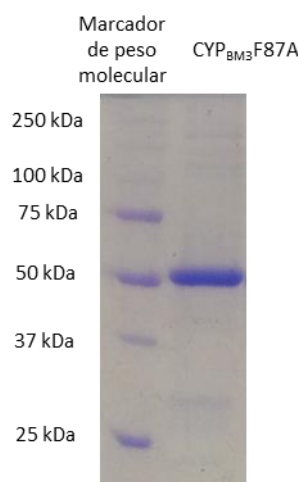


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomasie de la CYP_{BM3}F87A purificada mediante cromatografía de afinidad a níquel.

Posterior a la purificación se evaluó también la CYP_{BM3}F87A activa mediante el método de unión a CO, del total de la enzima purificada y cuantificada previamente mediante la medición de la banda solet, el 64% se unión a CO y por lo tanto se consideró catalíticamente activa.

Las constantes catalíticas, k_{cat} y K_M , para la CYP_{BM3}F87A con 2,6 dimetoxifenol (DMF) en presencia de 3 mM de H₂O₂ se muestran en la tabla 2. El producto de la oxidación de este fenol es un fenoxilo que al unirse con otro fenoxilo producen un dímero que puede ser detectado fácilmente mediante espectrofotometría a 468 nm (Schwaneberg et al. 1999) la ecuación 2 muestra la reacción de oxidación del DMF que realiza la CYP_{BM3}F87A.

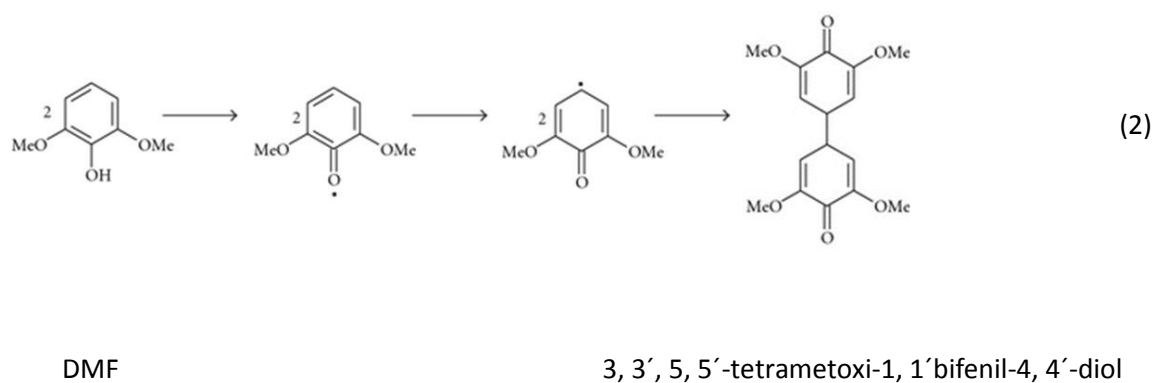


Tabla 2. Constantes catalíticas de la CYP_{BM3}F87A

Enzima	k_{cat} (min ⁻¹)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (min ⁻¹ mM)
CYP _{BM3} F87A	11.1 (±0.7)	172 (±47)	64.5

3.2 Modificación química de la CYP_{BM3}F87A

3.2.1 Aminación, residuos modificados y constantes catalíticas

Con el fin de lograr una mayor PEGilación del CYP_{BM3}F87A se incrementaron los grupos aminos libres en la superficie de la proteína mediante la adición covalente de moléculas de etilendiamina a los carboxilos libres, la metodología se describe a continuación.

Se analizó la estructura de la CYP_{BM3}F87A mediante el programa Pymol y se cuantificaron 62 residuos de aminoácidos con grupos carboxilo libre (ácidos glutámicos y ácidos aspárticos) en la superficie de la enzima. Con base en el número de carboxilos libres se seleccionó el exceso molar de etilendiamina necesario para la aminación. Una vez modificada la CYP_{BM3}F87A, con etilendiamina y carbodiimida, se determinó la cantidad total de aminos libres mediante TNBS. En éste método colorimétrico la unión del reactivo y los aminos libres generan un incremento de absorbancia de manera directa con la concentración. Lograron adicionarse 46 ± 18 moléculas de etilendiamina a cada molécula de CYP_{BM3}F87A, es decir se incrementó a 108 el número de aminos libres, se modificaron de alrededor del 74 % de los residuos de ácidos glutámicos y aspárticos quedando disponibles para la adición de PEG.

Con la finalidad de evaluar los efectos de la modificación química en la enzima se caracterizó la CYP_{BM3}F87A aminada mediante una curva de saturación con DMF, igual que se obtuvieron las constantes de la enzima sin modificar. La k_{cat} , K_M y la eficiencia catalítica k_{cat}/K_M son las de la tabla 3.

Tabla 3. Constantes catalíticas de la CYP_{BM3}F87A aminada.

Enzima	k_{cat} (min ⁻¹)	K_M (μ M)	k_{cat}/K_M (min ⁻¹ mM)
CYP _{BM3} F87A aminada	6.20 ± 0.63	63 ± 11	984.1

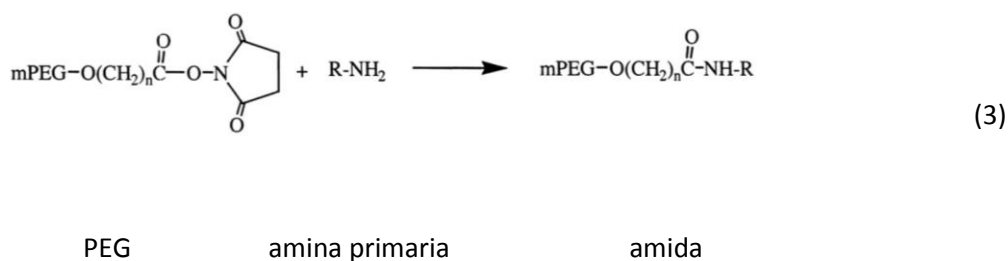
3.2.2 PEGilación, número de moléculas adicionadas y constantes catalíticas

La enzima animada se modificó con polietilenglicol bajo las condiciones descritas en la sección de métodos. Se lograron adicionar 14 moléculas, en promedio (14 ± 5), de PEG por cada molécula de CYP_{BM3}F87A. La importancia de la PEGilación es reducir al mínimo o eliminar por completo la respuesta inmune provocada por la enzima. A ésta preparación se le determinaron, también las constantes catalíticas con 2,6-dimetoxifenol como sustrato.

Tabla 4. Constantes catalíticas de la CYP_{BM3}F87A-PEG.

Enzima	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1} \text{mM}$)
CYP _{BM3} F87A-PEG	8.76 ± 0.90	169 ± 54	518.3

La reacción general entre las aminas primarias y el PEG se muestra en la reacción 3. El PEG Metoxi PEG ("succinimidyl carboxymethyl PEG 5000") posee un extremo de éster activo de ácido carboxílico, dicho éster activo es un agente acilante muy utilizado para la modificación de proteínas ya que reacciona con las aminas primarias formando amidas estables, como se muestra en la reacción 3 (Roberts et al. 2012). En este caso los aminos primarios fueron provistos por las lisinas y los ácido glutámicos y aspárticos modificados químicamente en el paso anterior, CYP_{BM3}F87A aminada.



3.3 Perfiles de temperatura, pH y termoestabilidad CYP_{BM3}F87A y de la CYP_{BM3}F87A-PEG

3.3.1 Perfil de temperatura.

Se determinó el efecto de la temperatura en la actividad catalítica de las preparaciones modificada (CYP_{BM3}F87A-PEG) y no modificada (CYP_{BM3}F87A). El perfil de actividad específica expresado en porcentaje se muestra en la figura 7. El máximo de actividad específica con DMF se obtuvo cuando la reacción se llevó a cabo a 80°C en ambos casos, la CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG. A 60°C con ambas enzimas se obtuvieron valores cercanos al 90% de la actividad específica máxima. Mientras que el mínimo de actividad registrado para la CYP_{BM3}F87A-PEG fue a 35°C con un valor cercano al 18%, para la CYP_{BM3}F87A fue a 90°C, temperatura a la que sólo trabajó al 17 %. A 90°C se obtuvieron actividades específicas bajas para la CYP_{BM3}F87A, pero la CYP_{BM3}F87A-PEG mostró 54% de la actividad máxima lo que le confiere una ventaja sobre la CYP_{BM3}F87A no modificada.

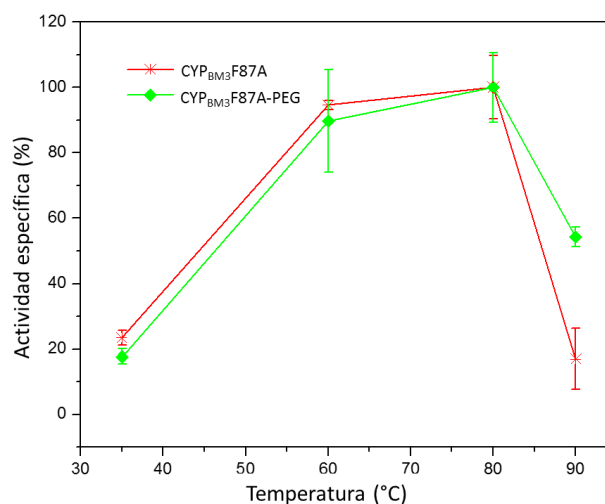


Figura 7. Perfil de temperatura, porcentaje de la actividad específica de la CYP_{BM3}F87A y de la CYP_{BM3}F87A-PEG a diferentes temperaturas. Las reacciones se efectuaron en presencia de H₂O₂ 3 mM y 500 µM de DMF.

3.3.2 Perfil de pH de la CYP_{BM3}F87A y de la CYP_{BM3}F87A-PEG

Se determinó el efecto del pH en la actividad de las diferentes preparaciones. La CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG mostraron diferentes perfiles de pH. El máximo de actividad específica se obtuvo a diferentes pH, para la CYP_{BM3}F87A fue a pH 8, mientras que para la CYP_{BM3}F87A-PEG a pH 10. Para la CYP_{BM3}F87A se observaron actividades específicas por debajo del 30% en pH 5, 6, 10 y 11, mientras que la CYP_{BM3}F87A-PEG reaccionó por encima del 50% de la actividad en todos los valores de pH ensayados (figura 8).

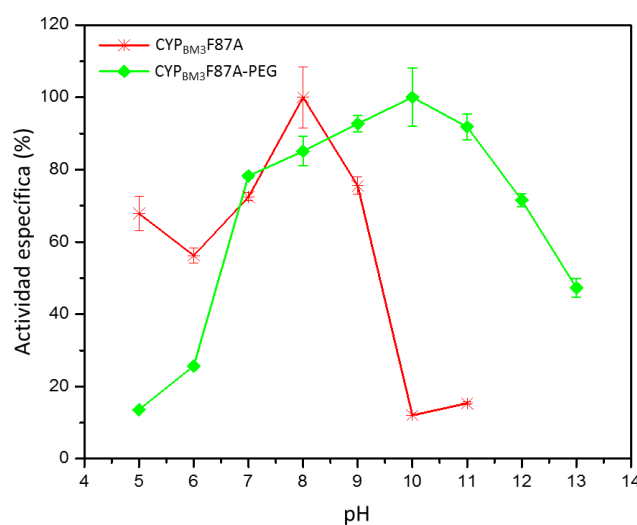


Figura 8. Perfil de pH, porcentaje de la actividad específica de la CYP_{BM3}F87A y de la CYP_{BM3}F87A-PEG a diferentes pH. Las reacciones se efectuaron en presencia de H₂O₂ 3 mM y 500 μ M de DMF a temperatura ambiente no controlada.

3.3.3 Estabilidad de la CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG a diferentes temperaturas

El efecto de la modificación química sobre la termoestabilidad se determinó incubando las preparaciones a diferentes temperaturas y monitoreando la pérdida de actividad con respecto al tiempo usando DMF como sustrato (figura 9). La CYP_{BM3}F87A conservó su capacidad catalítica después de ser incubada a 40°C y 50°C hasta por 30 minutos, mientras que después de 10 minutos de incubación a 60°C sólo perdió el 40% de su actividad catalítica. Por otro lado, la CYP_{BM3}F87A-PEG conservó por completo su capacidad catalítica

al ser incubada a 40°C, sin embargo al ser incubada a temperaturas más altas su capacidad decayó hasta el 20%. A 40°C durante los primeros 5 min perdió el 30% de su capacidad y a los 10 min casi el 50%, finalmente a los 30 minutos sólo es capaz de catalizar la oxidación del DMP al 25%. Su capacidad catalítica decayó al mínimo de 20%, después de incubarse a 60°C durante los primeros 5 minutos.

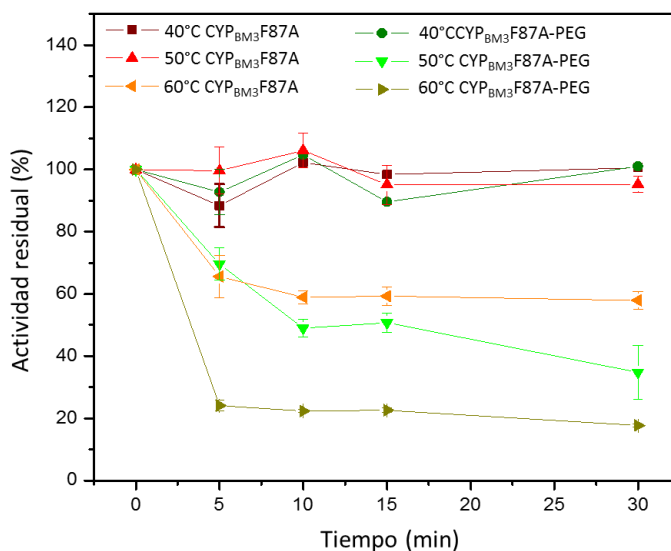


Figura 9. Termoestabilidad. Actividad residual en porcentaje de la CYP_{BM3}F87A y de la CYP_{BM3}F87A-PEG a diferentes temperaturas de incubación. Las reacciones se efectuaron en presencia de H₂O₂ 3 mM y 500 µM de DMF.

3.4 Pesticidas como sustrato de la CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG

La capacidad de transformación de diferentes pesticidas fue estudiada para la CYP modificada y se compararon con las transformaciones obtenidas con la CYP sin modificar. La actividad específica de la CYP_{BM3}F87A-PEG con 6 pesticidas como sustratos mostró una actividad catalítica entre 6 y 13 veces mayor que las obtenidas con la CYP_{BM3}F87A. En la tabla 5 se muestran las actividades específicas con ambas enzimas con los diferentes pesticidas. El diclorofeno fue el pesticida más rápidamente transformado por la CYP_{BM3}F87A-PEG y su actividad específica fue 12 veces mayor que la obtenida con la CYP_{BM3}F87A. El linurón, un pesticida organoclorado, también fue transformado 13 veces más rápido por la CYP_{BM3}F87A-PEG que por la CYP_{BM3}F87A, aunque en ambos casos con éste pesticida la actividad específica fue hasta 2 órdenes de magnitud menor las velocidades de transformación del diclorofeno. La actividad específica de

la CYP_{BM3}F87A-PEG con el paratión, un organofosforado, fue 9 veces mayor que con la CYP_{BM3}F87A. Para el clorpirifós y el pentaclorofenol el incremento de la actividad específica fue en ambos casos de 6 en comparación con la CYP_{BM3}F87A.

Tabla 5. Actividad específica de la CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG para la transformación de diferentes pesticidas.

Pesticida	Concentración inicial del pesticida (μM)	Actividad específica de la CYP _{BM3} F87A (min ⁻¹)	Actividad específica de la CYP _{BM3} F87A-PEG (min ⁻¹)	Incremento de la actividad (CYP _{BM3} F87A-PEG/CYP _{BM3} F87A)
Clorpirifós	200	0.86 (±0.46)	14.75 (±1.35)	17
Diclorofeno	200	34.46 (±0.511)	296.33 (±22.55)	9
Paratión	100	4.63 (±0.70)	39.40 (±2.48)	9
Dinoterb	200	3.13 (±0.48)	14.58 (±1.78)	5
Pentaclorofenol	200	0.79 (±0.14)	3.39 (±0.69)	4
Linurón	200	2.06 (±0.41)	7.02 (±2.97)	3
Picloran	200	rnd	rnd	--
Propanil	200	rnd	rnd	--

rnd. Reacción no detectada. La actividad específica está expresada en unidades μmol de pesticida transformado por minuto por mol de enzima.

3.5 Determinación de constantes catalíticas del CYP_{BM3}F87A-PEG en la transformación del paratión y del diclorofeno

Con la finalidad de obtener las constantes catalíticas de la CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG con el paratión y el diclorofeno, se hicieron las curvas de saturación por sustrato para ambos. La reacción con diclorofeno se efectuó en solución amortiguadora, mientras que la de paratión en suero sanguíneo también. La afinidad por el paratión se modificó obteniéndose una K_M menor en suero sanguíneo, la cantidad de moles de sustrato procesados fue mayor en la solución amortiguadora MES, sin embargo la eficiencia catalítica fue más del doble en suero sanguíneo.

La eficiencia catalítica en solución amortiguadora MES es 14.8 veces mayor para el diclorofeno que para el paratión.

Tabla 6. Constantes catalíticas para la transformación del paratión y el diclorofeno con la PEG-CYP_{BM3}F87A en suero sanguíneo y solución amortiguadora MES.

	Medio de reacción	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
Paratión	Suero sanguíneo	9.0 (± 0.2)	109 (± 6)	82
Paratión	MES	12.3 (± 0.6)	131 (± 30)	94
Diclorofeno	MES	555 (± 18)	398 (± 58)	1394

3.6 Efecto de la PEGilación sobre la estructura secundaria

Se realizaron mediciones de dicroísmo circular (DC) con la finalidad de conocer los cambios conformacionales de la CYP_{BM3}F87A después de la modificación química. La información obtenida indica que la PEGilación indujo ligeros cambios en la estructura secundaria de CYP_{BM3}F87A. La fracción

aproximada del tipo de estructura corresponde a α -hélices en la CYP_{BM3}F87A-PEG incrementó a un 40.2% en comparación con la CYP_{BM3}F87A de 35.2%, mientras que el contenido de hojas β plegadas (antiparalelo y paralelo) se mantuvo en un valor alrededor de 31%. En la figura 10 se observan los espectro de DC en UV lejano (de 190 a 250 nm) asociadas a las estructuras secundarias α -hélices y hojas β plegadas de la enzima sin modificar y modificada.

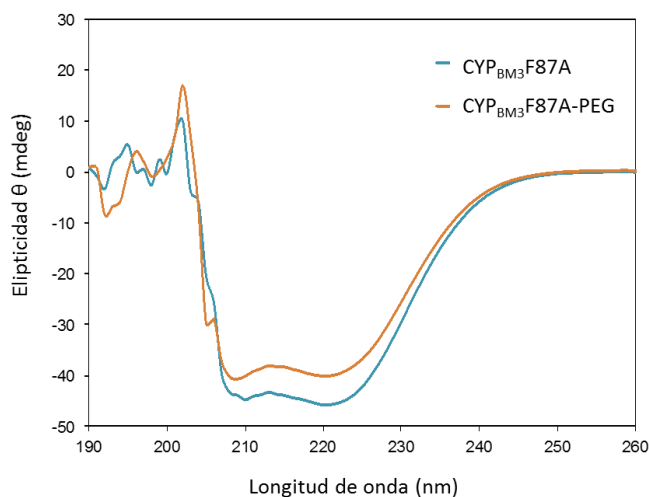


Figura 10. Espectros de DC en UV lejano (de 190 a 250 nm) asociados a las estructuras secundarias α -hélices y hojas β plegadas de la enzima sin modificar y modificada.

En la tabla 7 se muestran los porcentajes de cada tipo de estructura secundaria perteneciente a la CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG, un cambio en este porcentaje refleja el ligero cambio de la estructura secundaria general de la enzima al ser modificada químicamente.

Tabla 7. Fracciones aproximadas de cada tipo de estructura secundaria de a CYP_{BM3}F87A-PEG y la CYP_{BM3}F87A.

Enzima	Hélice (%)	Antiparalelo (%)	Paralelo (%)	Giro (%)	Otros (%)	RMSD	NRMSD
CYP _{BM3} F87A	35.2	27.8	4.0	7.3	25.7	0.4421	0.06860
CYP _{BM3} F87A-PEG	40.2	30.8	0.1	10.0	18.9	0.4460	0.06698

3.7 Evaluación de la inmunogenicidad de las CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG

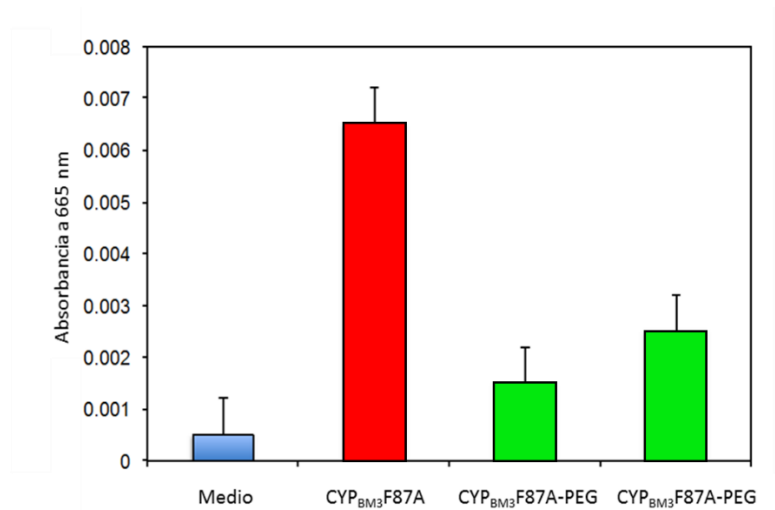


Figura 11. Histograma de la cantidad de fosfatasa alcalina excretada por las células “RAW-Blue” en contacto con la CYP_{BM3}F87A y la CYP_{BM3}F87A-PEG.

La inmunogenicidad de las CYP_{BM3}F87A-PEG fue evaluada a través de la activación células derivadas de macrófagos murinos, células RAW-Blue (Invivogen, San Diego, CA). La cantidad de fosfatasa alcalina embrionaria producida por la fusión transcripcional bajo el control de los promotores NF- κ B y AP-1. Estos factores transcripcionales juegan un papel central en los procesos de inflamación e inmunológicos. Todas

las muestras fueron tratadas con 33 µg/ml polimixina B por 1 h a 37°C antes del ensayo. Una vez tratadas se procedió a la incubación en el medio con las células RAW-Blue y se cuantificó la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y se asoció de manera directa con la activación de la respuesta inflamatoria a través de los promotores mencionados.

Capítulo 4. Discusiones

4.1 Alteración de las propiedades catalíticas de la CYP_{BM3}F87A

La estructura de la CYP_{BM3}F87A contiene un total de 99 residuos de aminoácidos con grupos carboxilos libres en su cadena lateral, 33 de ácidos aspárticos y 36 de ácidos glutámicos. Del total de éstos residuos sólo 62 se consideraron disponibles para ser modificados por formar parte de la superficie de la CYP_{BM3}F87A. Mediante el método de TNBS, descrito previamente, se determinó que se modificaron 46 (± 18) residuos lo que implicó 46 aminos adicionales a los ya existentes en la superficie de la proteína. Por ende, la modificación incrementó el número de aminos primarios disponibles para unirse al PEG.

En éste paso intermedio de la modificación al adicionar grupos aminos libres en sustitución de los carboxilos libres, se observó un incremento inesperado en la actividad específica (k_{cat}) y en la eficiencia específica (k_{cat}/K_M) con DMF y una disminución en la constante de afinidad (K_M), los resultados se muestran en la tabla 1

Por otro lado, considerando el paso intermedio de la modificación química de la CYP_{BM3}F87A, la adición de grupos amino primarios cerca del sitio activo de la enzima podría generar interacciones nuevas con los sustratos de origen aromático, como el DMF y los pesticidas. La interacción entre estos aminoácidos y sistemas aromáticos ricos en electrones como los fenoles, es catión π y se ha descrito su importancia para el reconocimiento biológico (Brocchieri y Karlin 1994; Dougherty y Stauffer 2017) por ejemplo en la acetilcolinesterasa y sus sustratos (Dougherty y Stauffer 2017; Gallivan y Dougherty 1999). Además se ha demostrado de manera teórica que las interacciones catión π pueden ser fuertes en sistemas acuosos (Dougherty 2014).

La estructura de unión a sustratos, en el caso de ácidos grasos, de la CYP_{BM3}F87 está conformada por los siguientes grupos aminoácidos: P25, F42, R47, Y51, A82, F87, L181, M185, L188, T260, A328, M354, L437, (Munro et al. 2002; Yun et al. 2007) ninguno de estos residuos pueden formar una amida, en la figura 12 se observan estos residuos. En cambio, hay residuos cercanos al sitio activo de la CYP_{BM3}F87A como el D23, D182, E183, y el E267 que están localizadas muy cerca del grupo prostético hemo que pudieron ser modificados con la adición de un amino mediante una amidación y por lo tanto incrementar la interacción catión π con los sustratos aromáticos. Este tipo de interacción puede estar relacionada con la unión efectiva del sustrato en el sitio catalítico y al haber un número mayor de uniones efectivas se incrementa la eficiencia catalítica (Sideri et al 2013).

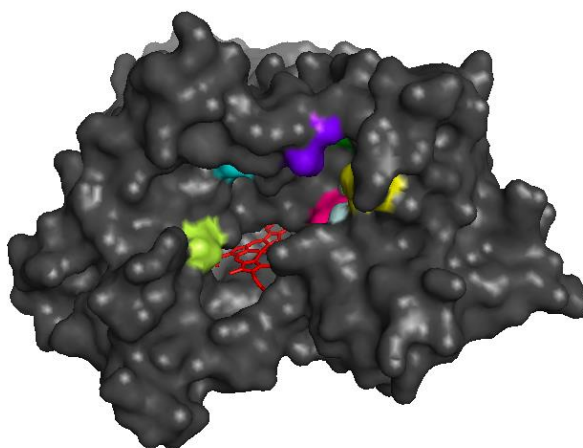


Figura 12. Estructura de la superficie CYP de *Bacillus megaterium*. El grupo hemo aparece en rojo dentro de la cavidad hidrofóbica. P25 en color verde, F42 en azul, R47 en amarillo, Y51 en magenta, L181 en cian, M185 en naranja, L188 en lila, T260 en verde limón, A328 en rosa, M354 en azul aqua y L437 en morado. La imagen de la enzima se generó en Pymol (Schrödinger, Cambridge, MA)

Con la adición de moléculas de PEG, de carácter anfifílico, se produce un aumento en la hidrofobicidad de la enzima, en este caso dicho incremento generó un cambio en el comportamiento catalítico de la CYP_{BM3}F87A. Sin embargo al permanecer inalterada la K_M se puede considerar que los residuos que intervienen en la fijación del sustrato no sufrieron cambio, es decir la suma de las fuerzas necesarias para fijar el DMP y por lo tanto alcanzar el estado de transición permaneció constante. En cambio la PEGilación de la CYP_{BM3}F87A generó un incremento en la velocidad de transformación y la eficiencia catalítica. La enzima modificada transformó 8 veces más moles de DMF por mol de enzima por minuto. Lo anterior indica que, si bien no se modificó la afinidad de la enzima por el sustrato se pudo alterar la capacidad de evacuar el producto de la oxidación, o bien se incrementó la posibilidad de generar más uniones efectivas del sustrato. Se ha reportado que el PEG permite alterar el radio hidrodinámico de las moléculas a las que se une, coordinando la presencia de moléculas de agua entre su estructura (Fee y van Alstine 2004; Liu y Parsons 1969). Es probable que la modificación química permitiera la coordinación de moléculas de agua entre las moléculas de PEG, incrementando la flexibilidad de la enzima y así alterando la velocidad de reacción que está relacionada con dicha flexibilidad, induciendo una tasa de recambio mayor comparada con la proteína no modificada. El mismo comportamiento catalítico se observó al utilizar pesticidas como sustratos, el incremento en la actividad catalítica específica fue de 3 a 17 veces más con la CYP_{BM3}F87A-PEG que con la CYP_{BM3}F87A, esto al incrementar la flexibilidad de la enzima y por lo tanto al tener mayor libertad para la fijación de sustrato.

De acuerdo con el análisis de DC parece que la modificación química de la enzima no generó cambios importantes en su estructura secundaria, lo que ha sido demostrado anteriormente con otros sistemas de origen proteico (Caliceti et al. 2003; da Silva et al 2010; Malzert et al. 2003). Considerando éstos resultados, una modificación en la estructura secundaria causada por la PEGilación, no puede usarse como el origen de los cambios en la especificidad de la CYP_{BM3}F87A.

La alteración en las propiedades catalíticas de diferentes enzimas al ser modificadas mediante la adición de PEG ha sido investigada (Gaertner and Puigserver 1992b; Hernáiz et al. 1999; Pasut y Veronese 2009; Perezgasga et al. 2012; Quintanilla-Guerrero, et al. 2008; Soares et al. 2002; Rodríguez-Martínez et al. 2009; Tinoco y Vazquez-Duhalt 1998; Vandertol-Vanier et al. 2002). En su mayoría se ha reportado disminución en la actividad catalítica e incremento en la constante de afinidad. Lo anterior se ha relacionado con el incremento en la rigidez de la enzima o pérdida de la dinámica, por problemas de transferencia de masa, o bien a que la modificación se realizó en aminoácidos importantes para la reacción catalítica (Gaertner y Puigserver 1992; Rodríguez-Martínez et al. 2009) . Existen estudios que incluso relacionan la longitud de la molécula de PEG con la actividad de la enzima (Chiu et al. 2010; Plesner et al. 2011; Treetharnmathurot et al. 2008).

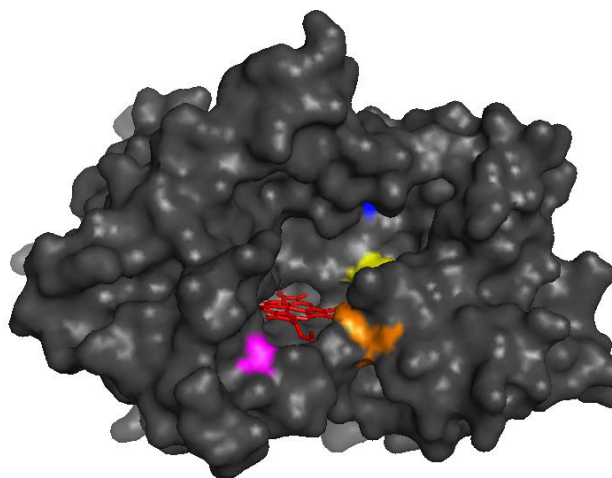


Figura 13. Esquema de la superficie de la CYP_{BM3}F87A con los residuos K69 en color naranja, la A87 en magenta, el E435 en azul y el A330 en amarillo, que tienen contacto con el DMF. La imagen de la enzima se generó en Pymol (Schrödinger, Cambridge, MA)

La estructura de la CYP_{BM3}F87A empleada en este trabajo tiene algunos aminoácidos relacionados con la fijación del DMF como la K69, A87, E435 y la A330 que se muestran en la figura 13. De dichos residuos sólo la lisina es capaz de reaccionar con el PEG, sin embargo la cadena del residuo no está expuesta, de manera que se abre la posibilidad de que dicho residuo no se modificara o bien que no es importante en la fijación de los sustratos, si dicha lisina se hubiese modificado el efecto sería como una compuerta que entorpecería el acceso de sustratos a la cavidad del hemo.

Otro factor que permitió el incremento de la actividad específica pudo ser el cambio en el microambiente enzimático, al que teóricamente se le incremento la hidrofobicidad, lo que se comprobó al utilizar sustratos hidrofóbicos como ya ha sido demostrado previamente con el DMF (Quintanilla-Guerrero et al. 2008; Tinoco y Vazquez-Duhalt 1998). Los sustratos utilizados son de carácter hidrofóbico como la mayoría de los xenobióticos que requieren la acción de las enzimas CYP para incrementar su solubilidad o disminuir su hidrofobicidad y promover su movilización. Considerando que los pesticidas y el DMF empleados tienen estructuras aromáticas poco solubles en agua y que la CYP_{BM3}F87A fue generada para catalizar hidroxilaciones de algunos ácidos grasos, se esperó un acceso de dichos sustratos al sitio activo. Al adicionar PEG que contiene en su estructura segmentos hidrocarbonados se conserva el ambiente propicio para la entrada de los sustratos. Por otro lado las moléculas de agua que están coordinadas con el PEG pudieron facilitar la evacuación de los sustratos transformados.

Se evaluó la actividad específica de la CYP_{BM3}F87A y de la CYP_{BM3}F87A-PEG en diferentes potenciales de hidrógeno. Se observó que la CYP_{BM3}F87A-PEG tiene la capacidad de reaccionar en un intervalo más amplio de pH ya que algunos residuos ionizables fueron modificados. Las fuerzas no enlazantes que se generaron mediante la modificación de la enzima permitieron que la CYP_{BM3}F87A-PEG mantuviera la estructura catalíticamente activa y sólo perdiera cerca del 50% de la capacidad catalítica. Como se mencionó anteriormente la posibilidad de que se modificaran residuos involucrados con la fijación de los sustratos es baja, sin embargo la modificación de los residuos externos generó fuerzas no enlazantes que conservaron el sitio catalítico activo de la enzima y que además conservaron su estructura aún a diferentes concentración de iones de hidrógenos en el medio de reacción. Pudieron haber permanecido sin alteraciones la introducción, evacuación, y generación de uniones efectivas con el DMF en el sitio activo. Las uniones intramoleculares y enlaces de hidrógeno generan a un sitio catalítico robusto, si en este caso dichas uniones permanecieron casi inalteradas una vez que la enzima fue modificada y se observó la permanencia de la capacidad catalítica, así mismo se conservaron a diferentes pH.

Por otro lado la capacidad de la CYP_{BM3}F87A-PEG de catalizar reacciones a diferentes temperaturas se conservó en comparación con la CYP_{BM3}F87A. Sólo a 90 °C la CYP_{BM3}F87A perdió 40% más de actividad que la enzima PEGilada. En este caso la adición de moléculas de PEG no le ofreció ventajas al sistema cuando cataliza la transformación de DMF por debajo de 90 °C, ya que solamente se observó el incremento de la actividad esperado a raíz de la introducción de energía al mismo. Sin embargo a 90 °C ésta energía no logró desestabilizar por completo al sistema.

La capacidad de la CYP_{BM3}F87A de utilizar algunos pesticidas como sustratos y por lo tanto transfórmalos ha sido demostrada por Sanchez-Sanchez y colaboradores en 2012. En este trabajo se demostró que al PEGilar la CYP_{BM3}F87A no sólo conserva su capacidad de catálisis si no que transforma mayor número de moléculas de sustrato por minuto. Todos los pesticidas empleados fueron transformados de 3 a 17 veces más con la CYP_{BM3}F87A-PEG. El incremento de la actividad se explica también a través del cambio en la hidrofobicidad de la enzima, dicha condición permite la movilización de los productos a través de la cavidad donde está embebido el grupo hemo, como ha sido reportado previamente (Vazquez-Duhalt, et al., 1992). Y como se ha mencionado anteriormente el incremento en la flexibilidad el sistema permite el incremento de uniones efectivas entre enzima y sustrato.

La alteración de estas constantes catalíticas podría explicarse a través de los ligeros cambios que la estructura secundaria de CYP_{BM3}F87A sufrió al ser modificada. Dichos cambios ocurrieron en las fracciones que corresponden a cada tipo de estructura como las α -hélices y las hojas β plegadas (figura 10 y tabla 7). Además cambios en la estructura enzimática puede generar modificaciones estructurales que permitan acercar más los sustratos al sitio catalítico y así generar productos, o bien permitir o impedir el acceso y evacuación de los mismos. Como sea mencionado el incremento de la flexibilidad y el cambio en la estructura secundaria de la enzima pudo generar tal conformación de la enzima que permitió un mayor número de uniones que derivaron en productos, sin alteración a la afinidad por los mismos.

4.2 Estabilidad de CYP_{BM3}F87A-PEG

De manera inesperada se observó una disminución de la actividad específica de la CYP_{BM3}F87A-PEG al ser incubada a diferentes temperaturas de reacción. Era esperado que las moléculas de PEG adicionadas a la CYP_{BM3}F87A le aportaran rigidez, como se ha reportado con otras enzimas (Gaertner y Puigserver 1992b; Longo y Combes 1999; Rodríguez-Martínez et al. 2009).

Por otro lado se ha planteado la hipótesis de que la PEGilación de proteínas genera bioconjugados capaces de mantener una estructura compuesta por moléculas de agua unidas mediante puentes de hidrógeno alrededor de la misma (Gaertner y Puigserver 1992; Treetharnmathurot et al. 2008) por lo que en sistemas acuosos las moléculas de PEG solvatadas posiblemente reducen los movimientos que generan la desnaturalización de las proteínas (Baillargeon y Sonnet 1988) y pérdida de actividad catalítica en el caso de enzimas.

La pérdida de actividad de la CYP_{BM3}F87A-PEG se observó desde los 5 minutos de incubación a 50 y 60°C lo que significa que el PEG ofrece protección a la enzima al inicio pero no a largo plazo de exposición a temperatura. Al haber una disminución de la actividad específica de la CYP_{BM3}F87A-PEG cuando es mantenida en temperaturas superiores a los 40°C es posible que la cantidad de moléculas de PEG adicionadas a la enzima no fueron suficientes como para que la región hidrofílica del PEG mantuviera solvatada la estructura y a la vez le aportara suficiente rigidez a través de las interacciones hidrofóbicas PEG-enzima. El conjunto de ambas interacciones podrían producir estructuras parecidas a una coraza en la que la enzima está protegida de las interacciones con el agua y por lo tanto conserva su estructura (Perezgasga et al. 2012). Una vez que el sistema se expuso a temperatura superior a los 40 °C durante más de cinco minutos se observó la pérdida de actividad catalítica, debido a que la energía aplicada al mismo logra desestabilizar las interacciones que mantiene a la enzima en su conformación activa. Si la CYP_{BM3}F87A-PEG fue capaz de coordinar moléculas de agua en su estructura se vio afectada con el movimiento de las mismas al incrementar su temperatura.

4.3 Actividad catalítica en suero sanguíneo

Importante información aportó la obtención de las constantes catalíticas obtenidas con diclorofeno como sustrato en solución amortiguadora, además de las del paratión en suero sanguíneo y en solución amortiguadora. A pesar de la complejidad del sistema de reacción en suero sanguíneo, la CYP_{BM3}F87A-PEG fue capaz de catalizar reacciones, la constante afinidad, K_M , disminuyó casi en un tercio en comparación con la obtenida en MES y la constante catalítica, k_{cat} , disminuyó 1.4 veces, sin embargo con la CYP_{BM3}F87A-PEG se obtuvo una eficiencia catalítica del doble en suero sanguíneo que en MES.

Lo anterior resulta una ventaja para el sistema catalítico ya que se requiere menor cantidad de paratión para poder ocupar la mitad de los sitios activos de la enzima, la dosis letal reportada está entre 0.02 y 0.1

g (Oneto et al. 1995) aunque se han detectado niveles de p-nitrofenol en sangre de 0.47 a 15 mmol que corresponde a 0.12 a 4.4 g de paratión en sangre de pacientes severamente intoxicados (Eyer et al. 2003) considerando que la concentración de paratión necesaria para intoxicación está entre 69 y 343 μM y que la K_M de la $\text{CYP}_{\text{BM3}}\text{F87A-PEG}$ fue de 109 μM el sistema sería funcional en un intervalo promedio de los niveles de intoxicación.

4.4 Inmunogenicidad de la $\text{CYP}_{\text{BM3}}\text{F87A}$ y la $\text{CYP}_{\text{BM3}}\text{F87A-PEG}$

Además de modificar las características catalíticas de las enzimas, se ha comprobado que el PEG protege a las mismas de ser reconocidas por componentes del sistema inmunitario (Matoušek et al. 2002; Novikov et al. 2010; Quester et al. 2016; Walsh et al. 2003; Yang et al. 2004) . Se ha comprobado que las moléculas de PEG suelen proteger estructuras que forman parte de las enzimas y que son Receptores de Patrones de Reconocimiento (RPR). Los RPR son detectados por las células del sistema inmunitario, incluidos los macrófagos, y dicha detección desencadena una serie de cascadas de señalización controladas mediante NF- κB . En este trabajo se observó una disminución en la respuesta de los macrófagos RAW-Blue en la enzima modificada comparativamente con la no modificada. La adición de moléculas de PEG generó un incremento al radio hidrodinámico de la enzima lo que se vio reflejado en el enmascaramiento de aquellos sitios que son posible blanco de moléculas y células del sistema inmunitario. El PEG 5000 es una de las moléculas que ya han sido empleadas en sistemas terapéuticos.

Existen actualmente varios productos de origen proteico en el mercado que contiene PEG en su composición, incluidos algunos medicamentos que son suministrados vía intravenosa (Dozier y Distefano 2015) ya que el uso de este polímero ha sido aprobado por la FDA en productos dirigidos a humanos. Algunos ejemplos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Proteínas de uso terapéutico modificadas con PEG aprobadas por la FDA. Modificado de Dozier and Distefano 2015 (Dozier y Distefano 2015)

Medicamento	Proteína	Uso
Adagen®	Adenosindesaminasa	Inmunodeficiencia combinada grave
Oncaspar®	Asparaginasa	Leucemia
PegIntron®	Interferon- α -2b	Hepatitis C
Pegasys®	Interferon- α -2a	Hepatitis C
Neulasta®	Factor estimulante de colonias de granulocitos	Neutropenia
Somavert®	Hormona del crecimiento humana	Acromegalia
Micera®	Eritropoyetina	Anemia
Cimzia®	Factor de necrosis antitumoral	Artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica.
Krystexxa	Urato oxidasa	Gota
Omontys	Péptido dimérico sintético (agente estimulante de la eritropoyesis)	Anemia en la enfermedad renal crónica

Capítulo 5. Conclusiones

La modificación química, en dos pasos, de la CYP_{BM3}F87A con PEG (CYP_{BM3}F87A-PEG) genera un biocatalizador de capacidades catalíticas superiores a la enzima no modificada. La sustitución de ácidos carboxílicos por aminos incrementa la actividad específica y la eficiencia catalítica con 2,6 dimetoxifenol (DMF), lo que está relacionado con la alteración de las áreas de interacción enzima-sustrato.

En el paso final de la modificación, la PEGilación, se generó un biocatalizador de capacidades catalíticas incrementadas, tanto para el DMF como para los pesticidas empleados como sustrato. La alteración en la actividad específica y la eficiencia catalítica se debe a ligeros cambios en la estructura secundaria de la CYP_{BM3}F87A; además a la adición de aminos cerca del sitio catalítico que favorecen la interacción enzima sustrato. Se modificó además el microambiente de la enzima incrementando la capacidad de evacuación de los productos de reacción sin alterar la afinidad mientras que el número de moléculas de DMF transformadas por mol de CYP_{BM3}F87A-PEG por minuto se incrementó. Las moléculas de PEG a la enzima provocaron una alteración en la flexibilidad, incrementando a su vez la unión efectiva de sustratos.

La CYP_{BM3}F87A-PEG es capaz de reaccionar en un intervalo más amplio de pH que la CYP_{BM3}F87A, debido a que algunos de los residuos de aminoácido modificados dejaron de ser ionizables.

La modificación con PEG genera una ventaja al sistema cuando la reacción se efectúa a altas temperaturas. La CYP_{BM3}F87A-PEG no es estable a la exposición a temperaturas superiores a los 40°C a partir de los 5 minutos de exposición.

La CYP_{BM3}F87A-PEG es capaz de catalizar la transformación del paratión en suero sanguíneo a una concentración dentro del intervalo reportado que genera intoxicación en humanos.

Al PEGilar la CYP_{BM3}F87A se reduce su inmunogenicidad. La respuesta de los macrófagos al ser expuestos a la CYP_{BM3}F87A-PEG se ve disminuida en comparación con la enzima no modificada. Se logró enmascarar las estructuras proteicas que son epítomos y además se logró eliminar la presencia de lipopolisacáridos, de origen bacteriano, de la preparación CYP_{BM3}F87A-PEG.

Literatura citada

- Abass, K., Miia T., and Arja R. 2012. Metabolism of Pesticides by Human Cytochrome P450 Enzymes in Vitro—a Survey, Insecticides - Advances in Integrated Pest Management, Dr. Farzana Perveen (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/28088.
- Abuchowski, A., McCoy J. R., Palczuk, N. C., van Es,T., and Davis F. F. 1977. Effect of Covalent Attachment of Polyethylene Glycol on Immunogenicity and Circulating Life of Bovine Liver Catalase. *Journal of Biological Chemistry* 252 (11): 3582–86.
- Abuchowski, A., van Es T., Palczuk, N. C., van Es,T., and Davis F. F. 1977. Alteration of Immunological Properties of Bovine Serum Albumin by Covalent Attachment of Polyethylene Glycol. *The Journal* 252 (11): 3578–81.
- Albert, L. A. (1996). Persistent pesticides in Mexico. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 147(1-44).
- Areschoug, T. and Gordon S. 2008. Pattern Recognition Receptors and Their Role in Innate Immunity: Focus on Microbial Protein Ligands. *Trends in Innate Immunity* 15: 45–60. doi:10.1159/000135685.
- Ashani, Y. and Pistinner, S. 2004. Estimation of the Upper Limit of Human Butyrylcholinesterase Dose Required for Protection against Organophosphates Toxicity: A Mathematically Based Toxicokinetic Model. *Toxicological Sciences* 77 (2): 358–67. doi:10.1093/toxsci/kfh012.
- Atterby, H., Smith, N., Chaudhry,Q., and Stead, D. 2002. Exploiting Microbes and Plants to Clean up Pesticide Contaminated Environments. *Pesticide Outlook* 13 (1): 9–13. doi:10.1039/b200937b.
- Baillargeon, M. W., and Sonne, P. L. 1988. Polyethylene Glycol Modification of *Candida Rugosa* Lipase. 65 *JAOCS* (11): 1812–15.
- Bailon, P., and Berthold, W. 1998. Polyethylene Glycol-Conjugated Pharmaceutical Proteins. *Pharmaceutical Science and Technology Today* 1 (8): 352–56. doi:10.1016/S1461-5347(98)00086-8.
- Busi, E., Howes B.D., Pogni, R., Basosi, R., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R. 2000. Modified cytochrome c/H₂O₂ system: Spectroscopic EPR investigation of the biocatalytic behaviour. *J Mol Catal B: Enzymatic* 9:39–48.
- Brocchieri, L., and Karlin, S. 1994. Geometry of Interplanar Residue Contacts in Protein Structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (20): 9297–9301. doi:10.1073/pnas.91.20.9297.
- Caliceti, P., and Veronese, F. M. 2003. Pharmacokinetic and Biodistribution Properties of Poly(ethylene Glycol)-Protein Conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (10): 1261–77. doi:10.1016/S0169-409X(03)00108-X.
- Chiu, K., Agoubi,L. L., Lee, I., Limpar, M. T., Lowe, J. W., and Goh, S. L. 2010. Effects of Polymer Molecular Weight on the Size, Activity, and Stability of PEG-Functionalized Trypsin. *Biomacromolecules* 11 (12): 3688–92. doi:10.1021/bm1006954.
- Cirino, P. C., and Arnold, F. H. 2002. Regioselectivity and Activity of Cytochrome P450 BM-3 and Mutant F87A in Reactions Driven by Hydrogen Peroxide. *Advanced Synthesis and Catalysis* 344 (9): 932–37.

doi:10.1002/1615-4169(200210)344:9<932::AID-ADSC932>3.0.CO;2-M.

- Cirino, P. C., and Arnold, F. H. 2003. A Self-Sufficient Peroxide-Driven Hydroxylation Biocatalyst *Angewandte Chemie - International Edition* 42 (28): 3299–3301. doi:10.1002/anie.200351434.
- Cryle, M. J., Stok, J. E., and De Voss, J.J. 2003. Reactions Catalyzed by Bacterial Cytochromes P 450. *Aust. J. Chem. FIELD Full Journal Title: Australian Journal of Chemistry* 56 (8): 749–62. doi:10.1071/CH03040.
- da Silva, F. D., Jack, P., Camargo, R., and Abrahão-neto, J. 2010. Biochemical and Biopharmaceutical Properties of PEGylated Uricase 387: 215–22. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.11.034
- Davila-Vazquez, G., Tinoco, R., Pickard, M. A., and Vazquez-Duhalt, R. 2005. Transformation of Halogenated Pesticides by Versatile Peroxidase from *Bjerkandera Adusta*. *Enzyme and Microbial Technology* 36 (2–3): 223–31. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.07.015.
- Di Nardo, G., and Gilardi, G. 2012. Optimization of the Bacterial Cytochrome P450 BM3 System for the Production of Human Drug Metabolites. *International Journal of Molecular Sciences* 13 (12): 15901–24. doi:10.3390/ijms131215901.
- Dougherty, D. A. 2014. The cation- π interaction. *NIH Public Access* 46 (4): 885–93. doi:10.1021/ar300265y.The.
- Dougherty, D. A., and Stauffer, D. 2017. Acetylcholine Binding by a Synthetic Receptor : Implications for Biological Recognition. *American Association for the Advancement of Science* 250 (4987): 1558–60.
- Dozier, J., and Distefano, M. 2015. Site-Specific PEGylation of Therapeutic Proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (11): 25831–64. doi:10.3390/ijms161025831.
- Eyer, F., Meischner, V., Kiderlen, D., Thiermann, H., Worek, F., Haberkorn, M., Felgenhauer, N., Zilker, T., and Eyer, P. 2003. Human Parathion Poisoning. *Toxicological Reviews* 22 (3): 143–63. doi:10.2165/00139709-200322030-00003.
- Fee, C. J., and Van Alstine, J. M. 2004. Prediction of the Viscosity Radius and the Size Exclusion Chromatography Behavior of PEGylated Proteins. *Bioconjugate Chemistry* 15 (6): 1304–13. doi:10.1021/bc049843w.
- Ferrer, a. 2003. Intoxicación Por Plaguicidas Pesticide Poisoning Se Clasifican En : Insecticidas , Fungicidas Pesticidas Biológicos. *ANALES Sis San Navarra* 26 (ext 3900): 155–71.
- Gaertner, H. F., and Puigserver, A. J. 1992. Increased Activity and Stability of Poly(ethylene Glyco)-Modified Trypsin. *Enzyme and Microbial Technology* 14: 150–55.
- Gallivan, J. P., and D. A. Dougherty. 1999. Cation- π Interactions in Structural Biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (17): 9459–64. doi:10.1073/pnas.96.17.9459.
- García-Arellano, Humberto, Eduardo Buenrostro-Gonzalez, and Rafael Vazquez-Duhalt. 2004. Biocatalytic Transformation of Petroporphyrins by Chemical Modified Cytochrome C. *Biotechnology and Bioengineering* 85 (7): 790–98. doi:10.1002/bit.20023.
- Gilden, R. C., Huffling, K. and Sattler, B. 2010. Pesticides and Health Risks. *JOGNN - Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing* 39 (1): 103–10. doi:10.1111/j.1552-6909.2009.01092.x.

- Greenfield, N. J. 2006. Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure. *Nature Protocols* 1 (6): 2876–90. doi:10.1038/nprot.2006.202.
- Guengerich, F. P., and Isin, E. M. 2008. Mechanisms of Cytochrome P450 Reactions. *Acta Chimica Slovenica* 55 (1): 7–19.
- Guengerich, F.P. 2001. Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chemical Research in Toxicology* 14 (6): 611–50. doi:10.1021/tx0002583.
- Guengerich, F.P. 1993. Cytochrome P450 enzymes. *American Scientist*. 81 (5): 440–47
- Gustafsson, M. C. U., Roitel, O., Marshall, K. R., Noble, M. A., Chapman, S. K., Pessegueiro, A., Fulco, A. J., Cheesman, M. R., Von Wachenfeldt, C., and Munro, A. W. 2004. Expression, Purification, and Characterization of *Bacillus Subtilis* Cytochromes P450 CYP102A2 and CYP102A3: Flavocytochrome Homologues of P450 BM3 from *Bacillus Megaterium*. *Biochemistry* 43 (18): 5474–87. doi:10.1021/bi035904m.
- Habeeb, A.F.S.A. 1966. Determination of Free Amino Groups in Proteins by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Analytical Biochemistry* 14 (3): 328–36. doi:10.1016/0003-2697(66)90275-2.
- Hosea, N. A., Miller, G. P., and Guengerich, F. P. 2000. Elucidation of Distinct Ligand Binding Sites for Cytochrome P450 3A4. *Biochemistry* 39 (6): 5929. doi:10.1021/bi992765t [pii].
- Hryciak, E. G., and Bandiera, S. M. 2015. Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Reaction Mechanisms of Cytochrome P450 Enzymes. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 851 (2). Elsevier Inc.: 1–61. doi:10.1007/978-3-319-16009-2_1.
- Ikeda, Y., and Nagasaki, Y. (2012) PEGylation Technology in Nanomedicine, in *Polymers in Nanomedicine* Ed: Kunugi, S., and Yamaoka, T., (Eds.) pp 115-140, Springer Berlin Heidelberg.
- Joo, H., Arisawa, A., Lin, Z., and Arnold, F. H. A High-Throughput Digital Imaging Screen for the Discovery of Cytochrome P450 Inhibitors. *Chem Biol.* 1999 Oct;6(10):699-706.
- Khalaf, H., Jass, J., and Olsson, P. 2010. Differential Cytokine Regulation by NF- κ B and AP-1 in Jurkat T-Cells. *BMC Immunology* 11 (1): 26. doi:10.1186/1471-2172-11-26.
- Kirby, S. D., Norris, J. R., Smith, J. R., Bahnson, B. J., and Cerasoli, D. M. 2013. Human Paraoxonase Double Mutants Hydrolyze v and G Class Organophosphorus Nerve Agents. *Chemico-Biological Interactions* 203 (1). Elsevier Ireland Ltd: 181–85. doi:10.1016/j.cbi.2012.10.023.
- Kovarik, Z., Katalinić, M., Šinko, G., Binder, J., Holas, O., Jung, Y.S., Musilova, L., Jun, D., and Kuča, K. 2010. Pseudo-Catalytic Scavenging: Searching for a Suitable Reactivator of Phosphorylated Butyrylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions* 187 (1–3): 167–71. doi:10.1016/j.cbi.2010.02.023.
- Kumar, V., Yadav, C. S., Singh, S., Goel, S., Ahmed, R. S., Gupta, S., Grover, R. K., and Banerjee, B. D. 2010. CYP 1A1 Polymorphism and Organochlorine Pesticides Levels in the Etiology of Prostate Cancer. *Chemosphere* 81 (4). Elsevier Ltd: 464–68. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.067.
- Lewis, David F.V., and Sheridan, G. 2001. Cytochromes P450, Oxygen, and Evolution. *The Scientific World JOURNAL* 1: 151–67. doi:10.1100/tsw.2001.22.

- Longo, M.A., and Combes, D. 1999. Thermostability of Modified Enzymes : A Detailed Study 32 (June 1998): 25–32.
- Lynch, T., and Price, A. 2007. The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects. *American Family Physician* 76 (3): 391–96.
- Malzert, A., Boury, F., Renard, D., Robert, P., Lavenant, L., Benoit, J.P., Proust, J.E., 2003. Spectroscopic studies on poly(ethylene glycol)–lysozyme interactions. *Int. J. Pharm.* 260, 175–186
- Mansuy and P. Battioni. 1994. Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations . En: Sheldon, R.A., Marcel Dekker, (Eds). New-York, p. 99.
- Masson, P., Josse, D., Lockridge, O., Viguié, N., Taupin, C., and Buhler, C. 1998. Enzymes Hydrolyzing Organophosphates as Potential Catalytic Scavengers against Organophosphate Poisoning. *Journal of Physiology Paris* 92 (5–6): 357–62. doi:10.1016/S0928-4257(99)80005-9.
- Matoušek, J., Poučková, p., Souček, j., and Škvor, J. 2002. PEG Chains Increase Aspermatogenic and Antitumor Activity of RNase A and BS-RNase Enzymes. *Journal of Controlled Release* 82 (1): 29–37. doi:10.1016/S0168-3659(02)00082-2.
- McCauley, L.A., Anger, W. K., Keifer, M., Langley, R., Robson, M. G., and Rohlman, D. 2006. Studying Health Outcomes in Farmworker Populations Exposed to Pesticides. *Environmental Health Perspectives* 114 (6): 953–60. doi:10.1289/ehp.8526.
- Mcdowall, J. 2006. Protein of the Month Cytochrome P450, no. October: 9–11.
- Mezhitov, R., and Janeway, C. 2000. Immune Recognition. *The New England Journal of Medicine* 343 (5): 338–44.
- Mostafalou, S., and Abdollahi, M. 2013. Pesticides and Human Chronic Diseases: Evidences, Mechanisms, and Perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology* 268 (2). Elsevier Inc.: 157–77. doi:10.1016/j.taap.2013.01.025.
- Mumford, H., and Troyer, J. K. 2011. Post-Exposure Therapy with Recombinant Human BuChE Following Percutaneous VX Challenge in Guinea-Pigs. *Toxicology Letters* 206 (1). Elsevier Ireland Ltd: 29–34. doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.1016.
- Munro, A. W., Leys, D.G., McLean, K. J., Marshall, K. R., Ost, T. W. B., Daff, S., Miles, C. S. et al. 2002. P450 BM3: The Very Model of a Modern Flavocytochrome. *Trends in Biochemical Sciences* 27 (5): 250–57. doi:10.1016/S0968-0004(02)02086-8.
- Munro, Andrew W, and J Gordon Lindsay. 1996. MicroReview Bacterial Cytochromes P-450 20.
- Nelson, D R. 2004. Cytochrome P450 Nomenclature, 2004. *Methods in Molecular Biology* 320: 1–10. doi:10.1385/1-59259-998-2:1.
- Nelson, D. R, Zeldin, D. C., Hoffman, S. M. G., Maltais, L. J., Wain, H. M., and Nebert, D. W. 2004. Comparison of Cytochrome P450 (CYP) Genes from the Mouse and Human Genomes, Including Nomenclature Recommendations for Genes, Pseudogenes and Alternative-Splice Variants. *Pharmacogenetics* 14 (1): 1–18. doi:10.1097/01.fpc.0000054151.92680.31.
- Novikov, B.N., Grimsley, J. K., Kern, R. J., Wild, J. R., and Wales, M. E. 2010. Improved Pharmacokinetics

- and Immunogenicity Profile of Organophosphorus Hydrolase by Chemical Modification with Polyethylene Glycol. *Journal of Controlled Release* 146 (3). Elsevier B.V.: 318–25. doi:10.1016/j.jconrel.2010.06.003.
- Ortiz de Montellano, P.R. (2005), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, 3rd edn., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
- Omura, T.; Sato, R.. 1964. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* 239 (7): 2370–78.
- Oneto, M. L., Basack, S. B., and Kesten, E. M. 1995. Total and Conjugated Urinary Paranitrophenol after an Acute Parathion Ingestion. *Sci Justice* 35 (3): 207–11. doi:10.1016/S1355-0306(95)72663-6
- Pasut, G. 2014. Polymers for Protein Conjugation. *Polymers* 6 (1): 160–78. doi:10.3390/polym6010160
- Pasut, G., and Veronese, F. M. 2012. State of the Art in PEGylation: The Great Versatility Achieved after Forty Years of Research. *Journal of Controlled Release* 161 (2). Elsevier B.V.: 461–72. doi:10.1016/j.jconrel.2011.10.037.
- Pei, L., Omburo, G., McGuinn, W. D., Petrikovics, K. D., Raushel, F. M., Wild, J. R., Deloach, J. R., and Way J. L. 1994. Encapsulation of Phosphotriesterase within Murine Erythrocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*.
- Perezgasga, L., Sánchez-Sánchez, L., Aguila, S., and Vazquez-Duhalt, R. 2012. Substitution of the Catalytic Metal and Protein PEGylation Enhances Activity and Stability of Bacterial Phosphotriesterase, 1236–47. doi:10.1007/s12010-011-9510-x.
- Petrikovics, I., Hong, K., Omburo, G., Hu, Q. Z., Pei, L., McGuinn, W. D., Sylvester, D., et al. 1999. Antagonism of Paraoxon Intoxication by Recombinant Phosphotriesterase Encapsulated within Sterically Stabilized Liposomes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 156 (1): 56–63. doi:10.1006/taap.1998.8620.
- Pfister, D., and Morbidelli, M. 2014. Process for Protein PEGylation. *Journal of Controlled Release* 180. Elsevier B.V.: 134–49. doi:10.1016/j.jconrel.2014.02.002.
- Plesner, B., Fee, C. J., Westh, P., and Nielsen, A. D. 2011. Effects of PEG Size on Structure, Function and Stability of PEGylated BSA. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79 (2). Elsevier B.V.: 399–405. doi:10.1016/j.ejpb.2011.05.003.
- Povey, A.C. 2010. Gene-Environmental Interactions and Organophosphate Toxicity. *Toxicology* 278 (3): 294–304. doi:10.1016/j.tox.2010.02.007.
- Quester, K., Juarez-Moreno, K., Secundino, I., Roseinstein, Y., Alejo, K. P., Huerta-Saquero, A., and Vazquez-Duhalt, R. 2016. Cytochrome P450 Bioconjugate as a Nanovehicle for Improved Chemotherapy Treatment. *Macromolecular Bioscience*, 1–9. doi:10.1002/mabi.201600374.
- Quintanilla-Guerrero, F., Duarte-Vázquez, M. A., García-Almendarez, B. E., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., and Regalado, C. 2008. Polyethylene Glycol Improves Phenol Removal by Immobilized Turnip Peroxidase. *Bioresource Technology* 99 (18): 8605–11. doi:10.1016/j.biortech.2008.04.031.
- Quintanilla-Guerrero, F., Duarte-Vázquez, M. A., Tinoco, R., Gómez-Suárez, M., García-Almendárez, B. E.,

- Vazquez-Duhalt, R., and Regalado, C. 2008. Chemical Modification of Turnip Peroxidase with Methoxypolyethylene Glycol Enhances Activity and Stability for Phenol Removal Using the Immobilized Enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (17): 8058–65. doi:10.1021/jf801400h.
- Roberts, M.J., Bentley, M.D., and Harris, J.M. 2012. Chemistry for Peptide and Protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64. Elsevier B.V.: 116–27. doi:10.1016/j.addr.2012.09.025.
- Roberts, M. J., Bentley, M. D., and Harris, J. M. 2002. Chemistry for Peptide and Protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (4): 459–76. doi:10.1016/S0169-409X(02)00022-4.
- Rochu, D., Chabrière, E., and Masson, P. 2007. Human Paraoxonase: A Promising Approach for Pre-Treatment and Therapy of Organophosphorus Poisoning. *Toxicology* 233 (1–3): 47–59. doi:10.1016/j.tox.2006.08.037.
- Roco, M. C. 2003. Nanotechnology: Convergence with Modern Biology and Medicine. *Current Opinion in Biotechnology* 14 (3): 337–46. doi:10.1016/S0958-1669(03)00068-5.
- Rodríguez-Martínez, J.A., Rivera-Rivera, I., Solá, R. J., and Griebenow, K. 2009. Enzymatic Activity and Thermal Stability of PEG- α -Chymotrypsin Conjugates. *Biotechnology Letters* 31 (6): 883–87. doi:10.1007/s10529-009-9947-y.
- Rose, R.L., Tang, J., Choi, J., Cao, Y., Usmani, A., Cherrington, N., and Hodgson, E. 2005. Pesticide Metabolism in Humans, Including Polymorphisms. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* 31 (SUPPL. 1): 156–63.
- Sanborn, M., Bassil, K., Vakil, C., Kerr, K., and Ragan, K. 2012. 2012 Systematic Review of Pesticide Health Effect. 1–112.
- Sanbornn, M., Colee, D., Kerr, K., and Vakill, C. 2004. Pesticides Literature Review, no. C: 1–179.
- Sanchez-Sanchez, L., Roman, R., and Vazquez-Duhalt, R. 2012. Pesticide Transformation by a Variant of CYPBM3 with Improved Peroxygenase Activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 102 (2): 169–74. doi:10.1016/j.pestbp.2011.12.010.
- Schwaneberg, U., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J., and Schmid, R. D. 1999. A Continuous Spectrophotometric Assay for P450 BM-3, a Fatty Acid Hydroxylating Enzyme, and Its Mutant F87A. *Analytical Biochemistry* 269 (2): 359–66. doi:10.1006/abio.1999.4047.
- Scott, Jeffrey G. 1999. Cytochromes P450 and Insecticide Resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29 (9): 757–77. doi:10.1016/S0965-1748(99)00038-7.
- Sibbesen, O. De Voss, J. J., Ortiz de Montellano, P. R. 1996. Putidaredoxin Reductase-Putidaredoxin-Cytochrome P450 Cam Triple." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (37): 22462–69.
- Sideri, A., Goyal, A., Di Nardo, G., Tsotsou, G. E., and Gilardi, G. 2013. Hydroxylation of Non-Substituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Cytochrome P450 BM3 Engineered by Directed Evolution. *Journal of Inorganic Biochemistry* 120. Elsevier Inc.: 1–7. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.11.007
- Soares, A. I., Guimara, G. M., Polakiewicz, B., Nogueira, R., and Pitombo, D. M. 2002. Effects of Polyethylene Glycol Attachment on Physicochemical and Biological Stability of E. Coli L -Asparaginase 237: 163–70

- Sun, S. W., Lin, I. C., Weng, Y. M., and Chen, M. J. 2006. Efficiency Improvements on Ninhydrin Method for Amino Acid Quantification. *Journal of Food Composition and Analysis* 19 (2–3): 112–17. doi:10.1016/j.jfca.2005.04.006.
- Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. 1998. Chemical Modification of Cytochrome C Improves Their Catalytic Properties in Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Enzyme and Microbial Technology* 22 (1): 8–12. Doi 22 (1): 8–12. doi:10.1016/S0141-0229(97)00073-2.
- Treetharnmathurot, B., Ovartharnporn, C., Wungsintaweekul, J., Duncan, R., and Wiwattanapatapee, R. 2008. Effect of PEG Molecular Weight and Linking Chemistry on the Biological Activity and Thermal Stability of PEGylated Trypsin. *International Journal of Pharmaceutics* 357 (1–2): 252–59. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.01.016.
- Trovaslet-Leroy, M., Musilova, L., Renault, f., Brazzolotto, X., Misik, J., Novotny, L., Froment, M. T., et al. 2011. Organophosphate Hydrolases as Catalytic Bioscavengers of Organophosphorus Nerve Agents. *Toxicology Letters* 206 (1). Elsevier Ireland Ltd: 14–23. doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.1041.
- Tsotsou, G. E., Sideri, A., Goyal, A., Di Nardo, G., Gilardi, G. (2012). Identification of mutant Asp251Gly Gln307His of cytochrome P450 BM3 for the generation of metabolites of diclofenac, ibuprofen and tolbutamide. *Chemistry* 18, 3582–3588. 10.1002/chem.201102470
- Tuovinen, K. A. I., Kaliste-Korhonen, E., Raushel, F.M., and Hanninen, O. 1996. Protection of Organophosphate-Inactivated Esterases with Phosphotriesterase 7 (0): 210–17.
- Tuovinen, K., Kaliste-Korhonen, E., Raushel, F. M., and Hänninen, O. 1994. Phosphotriesterase-a Promising Candidate for Use in Detoxification of Organophosphates. *Toxicological Sciences*. doi:10.1093/toxsci/23.4.578.
- Urlacher, Vlada B., and Marco Girhard. 2012. “Cytochrome P450 Monooxygenases: An Update on Perspectives for Synthetic Application.” *Trends in Biotechnology* 30 (1). Elsevier Ltd: 26–36. doi:10.1016/j.tibtech.2011.06.012.
- Urlacher, V. D., and Schmid, R. D. 2004. Protein Engineering of the Cytochrome P450 Monooxygenase from *Bacillus Megaterium*. *Methods in Enzymology* 388 (2002): 208–24. doi:10.1016/S0076-6879(04)88019-4.
- Vandertol-Vanier, H. A., Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., and Pickard, M. A. 2002. Enhanced Activity by Poly(ethylene Glycol) Modification of *Coriopsis Gallica* Laccase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29 (5): 214–20. doi:DOI 10.1038/sj.jim.7000308.
- Vazquez-Duhalt, R.I., Fedorak, P. M., and Westlake Donald, W. S. 1992. Role of Enzyme Hydrophobicity in Biocatalysis in Organic Solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 14 (10): 837–41. doi:10.1016/0141-0229(92)90101-S.
- Veronese, F. M. 2001. Peptide and Protein PEGylation: A Review of Problems and Solutions. *Biomaterials* 22 (5): 405–17. doi:10.1016/S0142-9612(00)00193-9.
- Veronese, F. M., and Mero, A. 2009. Protein PEGylation, Basic Science and Biological Applications BT - PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications. *PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications*, 11–31.
- Vidal-Limón, A., Águila, S., Ayala, M., Batista, C. V., and Vazquez-Duhalt, R. 2013. Peroxidase Activity

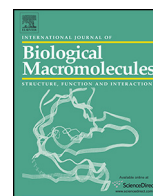
- Stabilization of Cytochrome P450BM3 by Rational Analysis of Intramolecular Electron Transfer. *Journal of Inorganic Biochemistry* 122. Elsevier Inc.: 18–26. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.01.009.
- Walsh, S., Shah, A., and Mond, J. 2003. Improved Pharmacokinetics and Reduced Antibody Reactivity of Lysostaphin Conjugated to Polyethylene Glycol 47 (2): 554–58. doi:10.1128/AAC.47.2.554
- Wieder, J., Palczuk, C., and Van Es. 1979. Some Properties Adducts * of Polyethylene Glycol : Phenylalanine Ammonia-Lyase. *The journal of Biological Chemistry*. 254 (24) 12579- 12587.
- Williams, J. A., Hyland, R., Jones, B. C., Smith, D. A., Hurst, S., Goosen, T. C., Peterkin, V., Koup, J. R., and Ball, S. E. 2004. Minireview 32 (11): 1201–8. doi:10.1124/dmd.104.000794.for.
- Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., and McRee, D. E. 2000. Mammalian Microsomal Cytochrome P450 Monooxygenase: Structural Adaptations for Membrane Binding and Functional Diversity. *Molecular Cell* 5 (1): 121–31. doi:10.1016/S1097-2765(00)80408-6.
- Xie, C., Ng, H., and Nagarajan, S. 2011. OxLDL or TLR2-Induced Cytokine Response Is Enhanced by oxLDL-Independent Novel Domain on Mouse CD36 α . *Immunology Letters* 137 (1–2). Elsevier B.V.: 15–27. doi:10.1016/j.imlet.2011.01.015.
- Yang, C., Lu, D., and Liu, Z. 2011. How PEGylation Enhances the Stability and Potency of Insulin: A Molecular Dynamics Simulation. *Biochemistry* 50 (13): 2585–93. doi:10.1021/bi101926u.
- Yun, C. H., Kim, K. H., Kim, D. H., Jung, H. C., and Pan, J. G. 2007. The Bacterial P450 BM3: A Prototype for a Biocatalyst with Human P450 Activities. *Trends in Biotechnology* 25 (7): 289–98. doi:10.1016/j.tibtech.2007.05.003.
- Zanger, U. M., Turpeinen, M., Klein, K., and Schwab, M. 2008. Functional Pharmacogenetics/genomics of Human Cytochromes P450 Involved in Drug Biotransformation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392 (6): 1093–1108. doi:10.1007/s00216-008-2291-6.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac



PEGylation of cytochrome P450 enhances its biocatalytic performance for pesticide transformation

Karla Alejo-González^{a,d}, Katrin Quester^a, Erik Hanson^b, Ismael Secundino^c, Yvonne Rosenstein^c, Alejandro Huerta-Saquero^a, Rafael Vazquez-Duhalt^{a,*}

^a Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Km 107 carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, Baja California, 22860, Mexico

^b Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Mexico

^c Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^d Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 April 2017

Received in revised form 8 June 2017

Accepted 3 July 2017

Available online xxx

Keywords:

Cytochrome P450

CYP

Pesticide transformation

Polyethylene glycol

PEG

ABSTRACT

Pesticide intoxication is a major public health concern, and unfortunately there is not an effective treatment for severe organophosphorus pesticide intoxication. In this work, a non-immunogenic enzymatic bioconjugate based on cytochrome P450 was assayed for organophosphorus pesticide transformation. Enzyme therapy is an alternative approach to inactivate pesticides in the bloodstream, transforming them into less toxic metabolites. A variant of cytochrome P450 (CYP_{BM3} F87A) from *Bacillus megaterium* was chemically modified with polyethylene glycol. The PEGylated enzyme showed enhanced pesticide transformation activity when compared with the unmodified protein. The transformation rates were higher than those obtained with the unmodified enzyme for all six pesticides transformed. The specific activity of PEGylated preparation for parathion and dichlorophen was up to 9-times higher than those obtained with the unmodified enzyme. In addition, the modified CYP (CYP-PEG) remained active at extremely high pHs, maintaining 90% of its maximal activity at pH 11, as opposed to the unmodified CYP that retained less than 20% of its maximal activity at that pH. In addition, the bioconjugate showed good catalytic activity in blood serum and innocuousness on immune cells. The potential use of PEGylated CYP as a detoxification strategy for pesticide poisoning is demonstrated and discussed.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pesticides are toxic chemicals introduced directly into the environment. More than 1000 active compounds are available on the market as insecticides, herbicides, and fungicides [1]. Globally 4.6 million tons of chemical pesticides are annually dispersed into the environment [2]. The use of pesticides has benefited humans by increasing the amount of agricultural products, reducing human infectious diseases, and protecting all kind of raw materials. Nevertheless, their extensive use has harmed human health due to occupational or environmental exposures. It is estimated that only 5% of the total amount of pesticides applied actually reach the target pest while the remaining are dispersed throughout the environment [3]. Due to the inability of the human body to metabolize these compounds, exposure to these dispersed pesticides can lead

to health related disorders such as depression, skin diseases, memory disorders, neurological deficit, spontaneous abortions, birth defects and cancer [4]. Although there are no reliable estimates of the people suffering from pesticide-related health effects three decades ago the World Health Organization [5] estimated that three million cases of severe pesticide poisoning resulting in 220,000 deaths, occurred each year. In addition, it is estimated that pesticide self-poisoning accounts for about one-third of the world's suicides, plausibly accounting for 234,000 to 326,000 yearly deaths originated from pesticide self-poisoning worldwide [6].

An effective treatment for severe organophosphorus pesticide (OPP) intoxications does not exist. Currently, there are three FDA (US Food and Drug Administration) approved chemotherapeutic agents for OPP intoxications: Atropine, Oximes, and Benzodiazepines. Atropine does not act as an antidote, it is a parasympatholytic and competitive antagonist of acetylcholine on muscarinic receptors. However, it is not thought to have significant effect on nicotinic receptors, is not able to neutralize fasciculation, weakness flaccid paralysis and respiratory arrest, but it is very

* Corresponding author.

E-mail address: rvd@cnyunam.mx (R. Vazquez-Duhalt).

effective in reversing bradycardia [7,8]. Thus, even when given sufficient doses of atropine, patients may need artificial ventilation, sometimes for weeks. Treatment with oximes (pralidoxime) is currently used for OPP intoxications [9,10]. The response to oxime is dependent of the chemical nature of OPP. OPPs with two methoxy groups (melathion, methyl-paraoxon, dimethoate) are considered to be more resistant to oxime therapy [11]. However, oximes are associated with multiple side effects from dizziness and blurred vision to liver function abnormalities [12]. Diazepam, the third FDA approved chemotherapeutic agent, is also important in treatment or prophylaxis for seizures, and central nervous system protection.

Enzyme therapy is an alternative approach to inactivate pesticides in the bloodstream or metabolize them into less toxic metabolites. The organophosphorus pesticides, that are acetylcholinesterase inhibitors, could be biocatalytically transformed before they can reach acetylcholinesterase at the physiological sites. The use of enzymes as treatment for pesticide intoxication has been first proposed by Cohen and Warringa [13]. Enzymes such butyrylcholinesterase [14–16] and engineered cholinesterase [8,17] are able to bind pesticides giving prophylactic protection; paraoxonase [18], regucalcin [19,20] and phosphotriesterases [21–23] are capable of hydrolyze several pesticides; versatile peroxidase [3] catalyzes an oxidative dehalogenation, and cytochromes P450 [24–28] are able to cleave several organochlorine and organophosphorus pesticides which makes them less toxic. Nevertheless, no enzymatic treatment for pesticide poisoning is currently available.

Cytochrome P450 (CYP) enzymes form a large family of heme-proteins monooxygenases catalyzing different types of oxidation and reduction reactions of endogenous and exogenous substrates. A number of CYP have the potential to mediate the metabolism of various pesticides [26,29–31]. In fact, polymorphism in members of this enzyme family has been shown to influence the susceptibility to pesticide toxicity [24]. In this work, a PEGylated bioconjugate of CYP was prepared and assayed for pesticide transformation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS), hydrogen peroxide (30%), 2,6-dimethoxyphenol (DMP), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), ethylene diamine dihydrochloride, acetonitrile, methanol, N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-methylcarbodiimide hydrochloride, and the pesticides dichlorophen, parathion, linuron, pentachlorophenol, chlorpyrifos, dichlorophen, dinoterb, picloran and propanil were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Methoxy PEG succinimidyl carboxymethyl ester (M-PEG-SCM 500) was purchased from JenKem Technology (Plano, TX). Glycerol was obtained from Fermont (Monterrey, Mexico).

2.2. CYP expression and purification

His-tagged CYP was expressed in *E. coli* DH5 α using the β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible pCWori vector as described by Cirino and Arnold [32] with some modifications [28]. The modifications only included the expression strain, the culture conditions, and induction times. Briefly, bacteria were grown in TB medium for 44 h at 25 °C and 100 rpm until stationary phase (OD of 0.78 for 1/10 dilution). Then CYP expression was induced by adding 0.5 mM IPTG. The cellular pellet was recovered 44 h after induction by centrifugation at 3500 rpm for 35 min. CYP was purified from crude extract by Ni-affinity chromatography using a Fast Protein Liquid Chromatograph (FPLC) (ÅKTA prime plus, GE Healthcare)

equipped with a 5 mL Ni-pre-charged HisTrap™ FF column (GE Healthcare). Fractions containing CYP were collected, pooled and concentrated via ultrafiltration (10 kDa cutoff), dialyzed against 0.05 M MES (pH 8) with 10% glycerol and stored at –20 °C until use. The protein purity was estimated by SDS-PAGE electrophoresis and quantified by densitometry with ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>). The purity of the final CYP preparation was 90.5%.

2.3. Chemical modification of CYP

The CYP was modified in two steps (Fig. 1). First, the number of free amino groups on the enzyme surface was increased, and then these free amino groups were utilized for PEGylation. CYP molecule displays 31 aspartic acids and 31 glutamic acids on the protein surface. The free carboxylic groups on the protein surface were aminated with ethylene diamine in the presence of carbodiimide to form NH₂-CYP. The amount of diamine and carbodiimide represented 5 molar excess to the free carboxylic groups on the protein surface. The reaction was incubated for 1.3 h under gentle agitation at 20 °C. Excess reagent was eliminated by dialysis in MES buffer (pH 8) with 10% glycerol. Then, an amount of methoxy PEG succinimidyl carboxymethyl ester (M-PEG SCM 5000 Da), equivalent to 2 molar excess to the new total amino groups was added and the reaction was kept for 1.6 h under gentle agitation, at room temperature. The unreacted PEG was eliminated by dialysis (10,000 Da cutoff) with 0.05 M MES (pH 8) containing 10% glycerol and the PEGylated CYP was stored at –20 °C until use. The extent of the chemical modifications was estimated by quantification of free amino groups with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) [33].

2.4. Protein quantification

The protein content of CYP, NH₂-PEG and CYP-PEG preparations was estimated by CYP-CO complex formation using an extinction coefficient of 91,000 M⁻¹ cm⁻¹ at 415 nm [34].

2.5. Secondary structure changes

CD spectra for unmodified- and modified-CYP were recorded with a JASCO model J-715 spectropolarimeter equipped with a Peltier temperature control supplied by Jasco. Spectra were collected from 260 to 190 nm. Buffer conditions were 50 mM potassium phosphate at pH 7.6 and 25 °C. Eight replicate spectra were collected from each sample to improve signal-to-noise ratio. The final protein concentration was 5.5 μ M, and spectra were collected in a 0.01-cm path-length cell. The secondary-structure prediction was performed using the CDSSTR algorithm.

2.6. Enzymatic activity, thermostability, and pH and temperature profiles

Enzymatic activity was determined by the transformation of 2,6-dimethoxyphenol (DMP) in the presence of 3 mM hydrogen peroxide. All reactions were performed using 54.4 pmol CYP or with 27.0 pmol CYP-PEG, in 1 mL of reaction mixture. The oxidized DMP was monitored in a spectrophotometer (Perkin-Elmer series 836 ET) at 468 nm (ϵ = 49,600 M⁻¹ cm⁻¹) for 1 min at 20 °C [35]. The pH activity profile was determined in 50 mM phosphate buffer for pH 5 and pH 6, 50 mM MES for pH ranging from 7 to 9, and 50 mM borates buffer for high pH values, from 10 to 13. To determine the effect of the temperature on the enzymatic activity of both enzyme preparations, the spectrophotometer was coupled with a Peltier system. CYP reactions were performed from 20 °C up to 90 °C. Thermostability of enzyme preparations was determined by incubating the

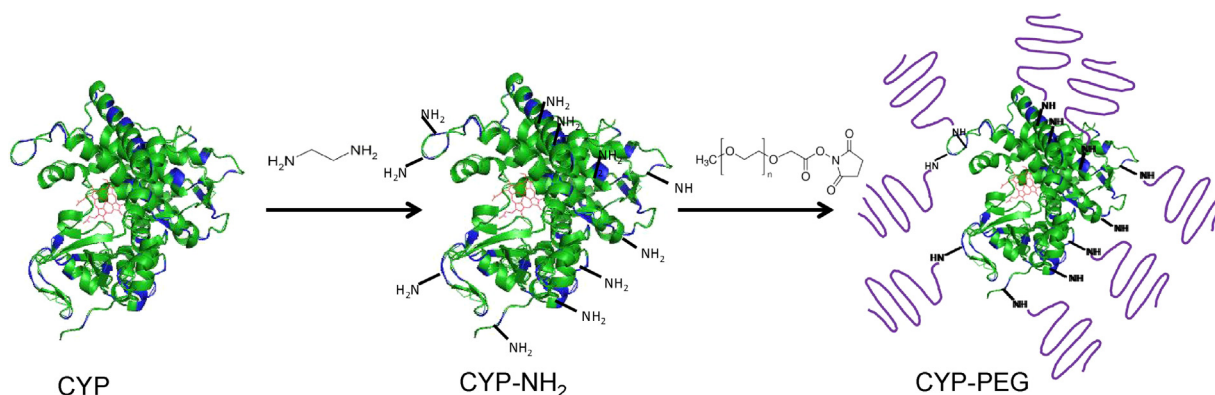


Fig. 1. Schematic representation of preparation of CYP-PEG bioconjugate. First, an amination of the free carboxylic groups on the protein surface followed by a PEGylation.

enzyme at different temperatures from 40 °C to 60 °C, and aliquots were assayed for remaining activity at 20 °C.

2.7. Pesticide transformation

The pesticide transformation was assayed in 1 mL of the reaction mixture containing from 21.8 to 192 pmol of CYP or 13.8 pmol of CYP-PEG and 200 μ M pesticide in 50 mM MES buffer containing 10% of acetonitrile. The reaction was started by adding 3 mM H_2O_2 and incubated for 10 min at 20 °C. The reaction was stopped by adding 1 mL of acetonitrile and centrifuged at 14,000 rpm for 5 min and then analyzed in a HPLC (Agilent serie 1100) equipped with a C18 reverse phase column (Kinetex C18, 5 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm, Phenomenex, CA). The elution (0.5 mL/min) was performed with a solvent gradient from water to methanol both containing 0.01% trifluoroacetic acid. All experiments were carried out in three independent replicates, and the catalytic constants were obtained using CurveExpert Pro software (D. Hyams, Madison, AL) following a Michaelis-Menten model.

2.8. Pesticide transformation in blood serum

Kinetic constants were obtained for parathion and dichlorophen transformation in blood serum. *p*-Nitrophenol formation from parathion transformation was spectrophotometrically determined in a spectrophotometer (Perkin-Elmer series 836 ET) at 400 nm ($\epsilon = 18,510 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The reaction mixture (1 mL) contained 7.36 nmol CYP-PEG, 50 μ M to 170 μ M parathion, and 3 mM of hydrogen peroxide in 1 mL of human blood serum or 50 mM MES buffer, pH 8. After 10 min, the reaction was stopped by adding 1 mL of acetonitrile and then samples were centrifuged at 14000 rpm for 15 min. Dichlorophen transformation was quantified by HPLC as described above using pesticide concentrations ranging from 100 to 700 μ M. The catalytic constants were obtained using CurveExpert Pro software (D. Hyams, Madison, AL) following a Michaelis-Menten model.

2.9. Potential impact on immune response: RAW-Blue cells activation

RAW-Blue cells (Invivogen, San Diego, CA) are derived from murine macrophage cell line RAW 264.7. These cells express a Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase (SEAP) reporter gene under the control of NF- κ B and AP-1 promoters, two transcription factors that play a central role in inflammation and immunity [36]. RAW-Blue cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS). 1×10^5 cells were incubated with 25 μ g/mL of CYP preparation for 12 h at 37 °C and 5% CO_2 . Traces of lipopolysaccharides (LPS) in the

Table 1

Catalytic constants of the unmodified and PEGylated CYP for the oxidation of DMP. The reactions were carried out in 50 mM MES pH 8.0 with 3 mM of H_2O_2 .

Preparation	k_{cat} (min^{-1}) ^a	K_M (μ M)	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)
CYP	11.1 (± 0.6)	172 (± 47)	64.5
CYP-aminated	62.0 (± 6.3)	63 (± 11)	984.1
CYP-PEG	87.6 (± 9.0)	169 (± 54)	518.3

^a The specific activity is expressed in μ mol of pesticide transformed per min per μ mol of CYP.

cytochrome preparations were neutralized by pre-incubating proteins with 33 μ g/mL polymyxin B for 1 h at 37 °C before assay. Supernatants were collected and SEAP production was evaluated by a colorimetric assay based on the activity of alkaline phosphatase (AP) at 655 nm.

3. Results

3.1. Enzyme modification and catalytic constants

In order to increase the PEGylation sites on the CYP surface, an amination of the free carboxylic groups was performed with ethylenediamine in the presence of carbodiimide, following which the aminated CYP (NH_2 -CYP) was chemically modified with polyethylene glycol (PEG) in order to obtain the CYP-PEG bioconjugate (Fig. 1). Seventy-four percent of the free carboxylic groups of the protein surface were modified, increasing to 108 free amino groups per enzyme molecule. The effect of the chemical modification on the catalytic performance was evaluated on the oxidation of 2,6-dimethoxyphenol (Table 1). Unexpectedly, the catalytic activity (k_{cat}) of the NH_2 -CYP increased 5.6 times to a value of k_{cat} of 62 min^{-1} when compared with 11.1 min^{-1} of unmodified CYP. The affinity for the substrate also increased after CYP amination reducing by two-thirds the value of K_M . These changes in the catalytic constants induced a 15-times increase of the catalytic efficiency (k_{cat}/K_M).

The CYP-PEG bioconjugate showed also an increased catalytic activity when compared with both, unmodified CYP and CYP- NH_2 . Even if the substrate affinity constant was similar than that of the unmodified enzyme, the catalytic efficiency still was 8-times higher than that of the unmodified CYP (Table 1). In order to know the conformational changes of the enzyme after chemical modification, circular dichroism measurements were performed (Supplementary information). The PEGylation induces slight changes in the secondary structure of CYP. The α -helix increased to 40.2% compared with 35.2% of the unmodified CYP, while the content of β -sheet (antiparallel and parallel) remained almost unchanged around 31%.

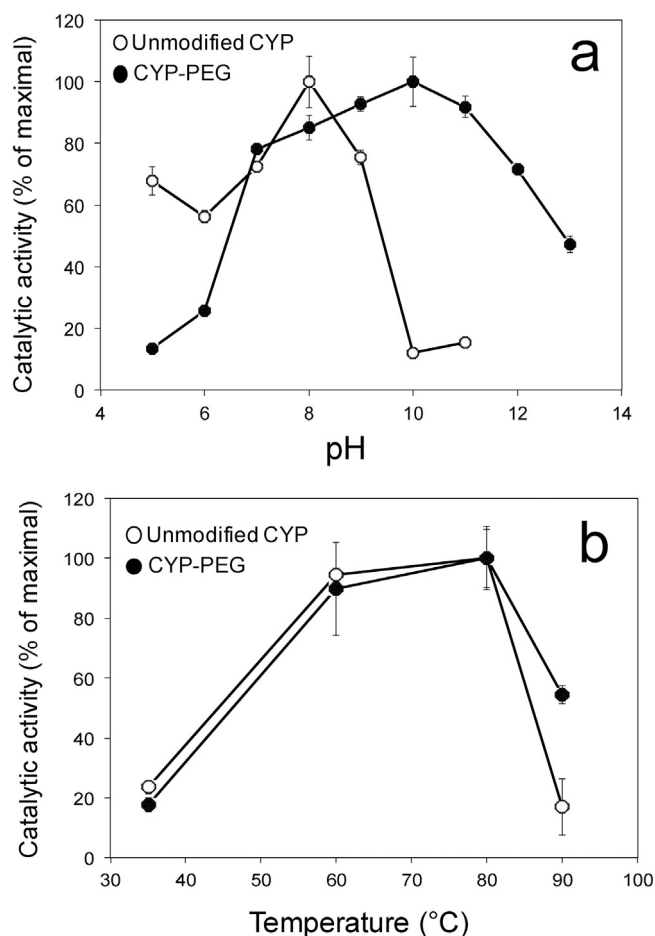


Fig. 2. Temperature and pH activity profiles of unmodified and PEGylated CYP. The reactions were carried out with 2,6-dimethoxyphenol as substrate.

3.2. Thermostability and pH and temperatures profiles

The effect of PEGylation on the pH and temperature activity profiles was determined (Fig. 2). The unmodified enzyme showed a maximal activity at pH 8.0 and very low activities at pHs of 6 and 10. In contrast, the CYP-PEG bioconjugate remained active within a broader range of pH, with 60% of the maximal activity at pH 5 and pH 12 and with a maximal activity found at pH 10 (Fig. 2a). Thus, PEGylation effectively protected the CYP enzymatic activity under extreme pH.

In terms of temperature profile of activity, both preparations behaved similarly, except that CYP-PEG exhibited a slightly better stability at 90 °C (Fig. 2b). However, thermostability of both preparations at different temperatures was different as PEGylation reduced the enzyme thermostability as compared to the unmodified enzyme (Fig. 3). Both preparations were fully stable during 30 min at 40 °C, yet after a 30 min incubation at 50 °C, the CYP-PEG preparation retained only 30% of its initial activity, while 100% of the initial activity of the unmodified CYP was preserved. At 60 °C, both preparations were inactivated after 10 min incubation.

3.3. Pesticide transformation

The pesticide transformation capacity of CYP and CYP-PEG was determined for eight pesticides (Table 2). Six out of eight tested pesticides (dichlorophen, parathion, linuron, pentachlorophenol, chlorpyrifos and dinoterb) were transformed by both, the modified and the unmodified enzyme, while picloran and propanil were not transformed. The pesticides transformed by CYP were

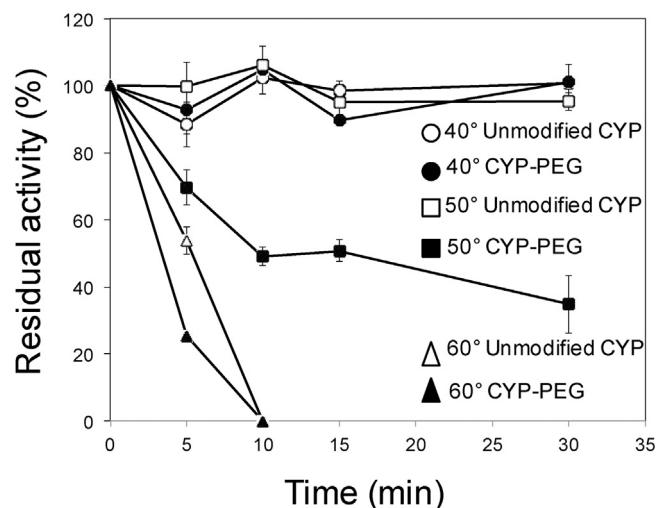


Fig. 3. Thermostability of the unmodified and PEGylated CYP. The reactions were carried out with 2,6-dimethoxyphenol as substrate.

three organochlorines (dichlorophen, linuron and pentachlorophenol), one nitro aromatic (dinoterb) and two organophosphorus compounds (parathion and chlorpyrifos) (Fig. 4). The pesticides transformation was faster in all the cases with the CYP-PEG as compared to unmodified CYP. The specific activity of CYP-PEG was from 4- to 17-times higher than that of unmodified CYP catalyzed reactions (Table 2), particularly for the chlorinated pesticide chlorpyrifos and dichlorophen, in which the transformation rate was 17- and 9-times higher, respectively, in PEGylated preparation than that of the unmodified enzyme. Parathion, an organophosphorus pesticide, was transformed by CYP and CYP-PEG, with CYP-PEG being more efficient, as the specific activity increased 8-times. The products from the pesticide transformation by CYP-PEG are the same than those obtained with unmodified CYP, which were previously reported [28]. The cleavage of linuron molecule to form 3,4-dichlorophenyl isocyanate, N-(3,4-dichlorophenyl) formamide and N,N-bis (2,3-dichlorophenyl) was 3-times faster for CYP-PEG as compared to unmodified CYP (Table 1).

3.4. Catalytic constants in blood serum

The catalytic activity of CYP-PEG bioconjugate was assayed in blood serum (Table 3). The catalytic rate (k_{cat}) for parathion transformation was 9.0 min^{-1} or $\mu\text{mol pesticide min}^{-1}$ per $\mu\text{mol CYP}$. This value is 26% lower than that measured in MES buffer (12.3 min^{-1}). Interestingly, the affinity constant (K_M) for parathion ($109 \mu\text{M}$) was slightly lower in serum than in MES buffer ($131 \mu\text{M}$). It is important to point out that these catalytic constants were evaluated for the full parathion inactivation determined by the *p*-nitrophenol production. The CYP transformation of parathion produces paraoxon and, in a sequential reaction, the molecule is hydrolyzed to form *p*-nitrophenol [28]. On the other hand, the catalytic constants for dichlorophen transformation are also shown in Table 3.

3.5. Immune response of biocatalytic preparations

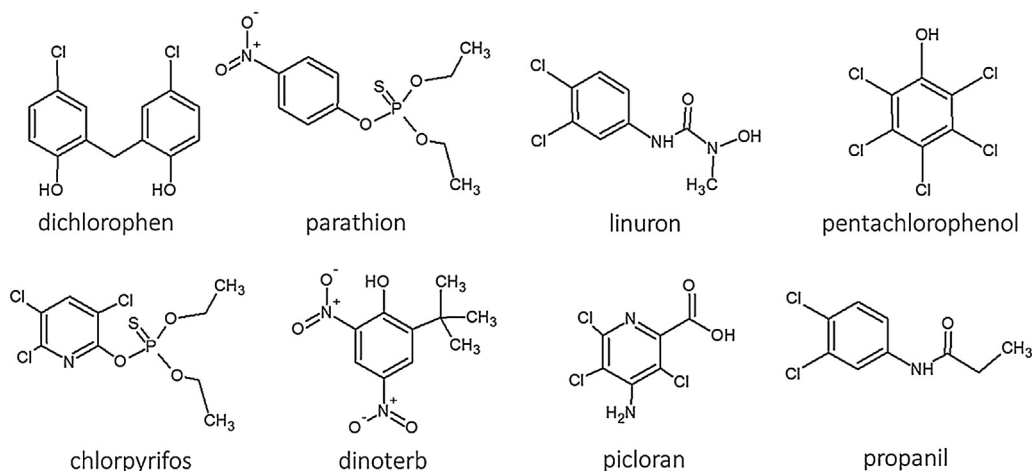
In order to evaluate the innocuousness of CYP-PEG on immune cells, and hence the safety of the bioconjugate, Raw-Blue cells were exposed to unmodified CYP and CYP-PEG in the presence or absence of polymyxin B and the amount of Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase (SEAP) secreted was measured. Once they were free of LPS, neither CYP nor CYP-PEG induced the release of SEAP to the supernatant, indicating that the NF κ B and AP-1 reporter gene

Table 2

Specific activity of CYP and CYP-PEG for transformation of different pesticides.

Pesticide	Initial pesticide concentration (μM)	CYP specific activity (min^{-1}) ^a	CYP-PEG specific activity (min^{-1}) ^a	Activity increase (CYP-PEG/CYP)
Dichlorophen	200	34.5 (± 0.5)	296.3 (± 22.5)	9
Parathion	100	4.6 (± 0.7)	39.4 (± 2.5)	8
Dinoterb	200	3.1 (± 0.5)	14.6 (± 1.8)	5
Linuron	200	2.1 (± 0.4)	7.0 (± 2.9)	3
Chlorpyrifos	200	0.9 (± 0.1)	14.8 (± 1.3)	17
Pentachlorophenol	200	0.8 (± 0.1)	3.4 (± 0.7)	4
Picloran	200	nrd	nrd	–
Propanil	200	nrd	nrd	–

nrd: No reaction detected.

^a The specific activity is expressed in μmol of pesticide transformed per min per μmol of CYP.**Fig. 4.** Chemical structure of the pesticides studied in this work.**Table 3**

Catalytic constants for parathion and dichlorophen transformation by CYP-PEG in blood serum and MES buffer.

	Reaction medium	k_{cat} (min^{-1}) ^a	K_{M} (μM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
Parathion ^b	Blood serum	9.0 (± 0.2)	109 (± 6)	82
Parathion	MES buffer	12.3 (± 0.6)	131 (± 30)	94
Dichlorophen	MES buffer	555 (± 18)	398 (± 58)	1394

^a The catalytic rate (k_{cat}) is expressed in μmol of pesticide transformed per min per μmol of CYP.^b Full parathion transformation was determined by the *p*-nitrophenol production.

was not activated when macrophages were exposed to CYP-PEG or CYP. The SEAP released when samples were not pre-incubated with polymyxin B, reflects the recognition of LPS by pathogen recognition receptors such as TLR-2 and TLR-4 expressed by the Raw-Blue cells (Fig. 5).

4. Discussion

In order to increase the number of PEG moieties bond to the protein surface, the amination of free carboxylic groups on the protein surface was performed (Fig. 1). An unexpected increase of the catalytic activity (k_{cat}) and the catalytic efficiency ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) was found (Table 1). Slight changes in the 3D structure of the protein could be the origin of this activity increase (see Supplementary Information). On the other hand, the presence of additional amino groups close to the active site could establish new interactions with the aromatic substrates, pesticides and 2,6-dimethoxyphenol. It is well known the cation- π interactions between amino groups and phenols and their importance in biological recognition [37,38]. Theoretical and

experimental studies have shown that cation- π interactions can be quite strong in aqueous media [37]. This kind of interaction is important for the substrate binding to the acetylcholine esterase [39]. The substrate-binding site of CYP_{BM3} F87A, in the case fatty acids, is formed by F42, R47, Y51, F87, L181, M185, T260 and M354 [40], all these residues unable to be modified by the amination. However, the presence of carboxylic free groups close to the active site, such as D23, D182 and E183 in the site edge, and especially E267 placed very close to the heme prosthetic group could have been aminated and thus change the interaction with the aromatic substrates.

The main goal of the protein PEGylation is to mitigate immune responses or adverse immunologically related responses associated with therapeutic use of proteins that affect their safety and efficacy [41,42]. Protein PEGylated bioconjugates were first synthesized by Abuchowski et al. [43]. PEG is an approved polymer by the US-FDA for pharmaceutical use in humans [44]. So far, it is considered the leading polymer for protein conjugation due to its properties such as low toxicity and immunogenicity in humans, and high solubility

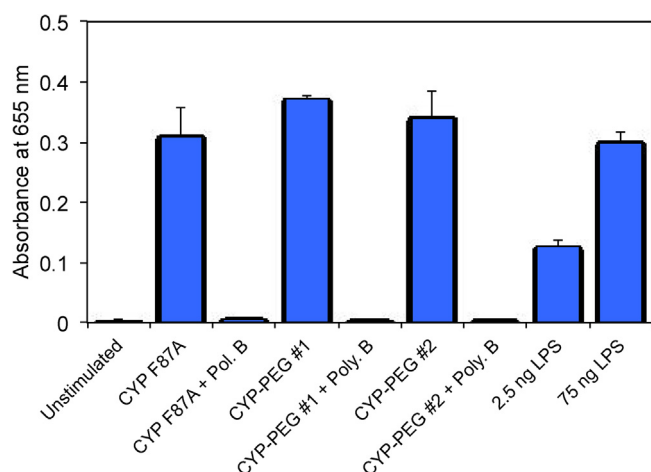


Fig. 5. Activation of immune cells by cytochrome P450 was evaluated in RAW-Blue cells. RAW-Blue cells (1×10^5 /well) were stimulated for 12 h with medium, unmodified cytochrome P450 (CYP), or two independent preparations of cytochrome P450 modified with polyethylene glycol (CYP-PEG 1 and CYP-PEG 2). In all cases, cytochrome was used at a concentration of 25 μ g/ml. To neutralize the effect of LPS, samples were pre-treated with 33 μ g/ml polymyxin B for 1 h before the assay. Cells were activated with 2.5 ng/ml of lipopolysaccharide (LPS) as a positive control. Activation of the NF κ B and AP-1 transcription factors was evaluated by the presence of Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase (SEAP) by colorimetric assay $\pm$ SEM at 655 nm.

in both water and organic solvents, that have promoted its current use in pharmacological applications [45]. PEGylation has been mainly performed to extend proteins stability and to reduce their immunogenicity but, in the future, the control of protein activity could be envisaged [46].

CYP-PEG showed enhanced specific activity in the oxidation of DMP, maintaining the substrate-affinity (Table 1). Protein PEGylation is usually accompanied by change in the catalytic behavior of the enzymes that are being modified [47]. Sometimes, this chemical modification can reduce the enzyme dynamics, inducing a loss of catalytic capacity, mainly due to the presence of PEG molecules linked to amino acid in the active site vicinity [48–50]. While a few reports show no change in the catalytic properties of PEGylated enzymes when compared with the native ones [50,51], other publications show that PEGylated enzymes have higher specific activities than their unmodified counterparts [48,52–56]. From CD analyses it seems that the chemical modification of the protein surface with PEG does not induce significant changes in the secondary structure. These results are consistent with several previous reports [57–59]. Thus, PEGylation cannot be used as an explanation for the substrate specificity changes. The alteration of the specific activity could reflect a variation in the micro-environment of the enzyme, specifically an increase of the hydrophobicity. This seems to be especially true for hydrophobic substrates as DMP [52,54]. The increased hydrolysis activity of the PEG-trypsin was attributed to an enhancement in the rate constant of the rate-determining step and, suggested by a study with inhibitors, that this activity enhancement could not be attributable to modification near to the active center [48].

The importance of site of PEGylation has been demonstrated with site-directed variants of cytochrome c [60], in which the PEGylation of amino acid residues placed close to active site affected also the enzyme thermostability. Our data shows that PEGylation of CYP did not affect the substrate affinity for DMP (Table 1), suggesting that no important amino acids for catalysis were modified in the catalytic site, allowing the substrate to reach the active site of the enzyme without delay.

Regarding the temperature profile, differences in terms of specific activity between CYP and CYP-PEG were observed only at

90 °C, with CYP-PEG showing a better stability (Fig. 2b). Nevertheless and unexpectedly, a loss of specific activity of CYP-PEG was found after incubation at different temperatures, indicating that PEG confers some initial protection to the enzyme, but not a long-term thermostabilization (Fig. 3). There are many reports on enzyme thermostabilization by PEG modification [23,61,62], in which the extent of thermostabilization has been correlated with the extent of PEGylation [50,63]. However, it was demonstrated in cytochrome c, that PEGylation does not confer a thermodynamic stabilization in terms of ΔG , but a kinetic stabilization [60]. Thus, in agreement with our results, PEGylation makes the value of ΔG less positive indicating a less stable enzyme but significantly reduces the protein-unfolding rate.

On the other hand, PEGylation protected catalytic activity at extreme pHs (Fig. 2a), consistent with the protective effect of PEGylation against extreme pHs [64,65]. As mentioned above, in the first modification-step, the free carboxylic groups on the CYP surface were amined, and then, in a second step, all surface amino groups were reacted with PEG. Thus, this protective effect could be attributed to the decrease of ionizable residues on the protein surface after chemical modification.

Biotransformation of organophosphorus and organochlorine pesticides by unmodified CYP has been previously demonstrated [28]. Here, we show that this capability is not only conserved after chemical modification of the CYP with PEG, but enhanced by 4- to 17-times (Table 2). The chemical nature of products from the pesticide transformation is similar to those obtained with the unmodified enzyme and previously reported [28]. The increased hydrophobicity of CYP-PEG could be at the origin of this enhanced activity, allowing better mobilization of hydrophobic molecules through the active site pocket [66].

Some enzymes have been reported to mitigate the effects of pesticides in humans, for example phosphodiesterase encapsulated within erythrocytes [67] or recombinant phosphotriesterase encapsulated within sterically stabilized liposomes [7], phosphodiesterase and paraoxonase, using them as pesticide scavengers supplied directly into the blood [68]. Although they have not specifically tested for pesticides, there are other enzymes able to bind other structurally similar compounds [69,70]. Nevertheless, no intravenous administration of an unmodified protein could be envisaged due to the potential immune response. One of the most important benefits of PEGylation is the reduction of the immune responses or adverse immunologically related responses. Enzyme conjugation with polyethylene glycol improved pharmacokinetics, with an extended half-life, and reduces immunogenicity in animal models [71,72]. Recently, it has been demonstrated that a PEGylated CYP did not induce the expression of the activation marker CD69 in T lymphocytes [73]. Data shown here indicate that once the contaminating LPS was neutralized by the polymyxin B, the surface modification of CYP with PEG did not result in activation of NF κ B and AP-1, two transcription factors very important for the onset of inflammation and for immune response in general, suggesting that PEGylation of CYP is not detected by antigen presenting cells such as macrophages. (Fig. 5).

Also, with the aim of using bioconjugates for nerve agent poisoning treatment, PEGylation of bacterial phosphotriesterase (PTE) improved its mean residence time in the rat blood stream 24-fold and its bioavailability 120-fold [20]. In addition to the reduction of toxicity and immunogenicity, the use of polyethylene glycol (PEG) for protein-polymer bonding generates bioconjugates with high solubility in water and in organic solvents [41,44,46,74]. Furthermore, the use of PEG has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for human use. Thus, this protein modification allows the use of therapeutic enzymes or enzymatic treatment against pesticide poisoning.

5. Conclusions

The chemical modification of the CYP surface, first by amination of free carboxylic acids and then by PEGylation, significantly increases the catalytic activity in the pesticide transformation. Due to the reduced immunological response and high pesticide transformation rate, this enzymatic preparation is proposed as potential catalytic system for relieving the toxic effects caused by pesticide exposure.

Acknowledgements

This work has been funded by the National Council of Science and Technology of Mexico(CONACYT) (grants IFC 2015-1 and SEP-CONACYT- 251241 to RVD, and grant SEP-CONACYT 22090 to YR). We thank Victor Manuel Villalba Montano for help with the Raw-Blue assays, and Dr. Gloria Saab (IBT-UNAM) for CD experiments.

References

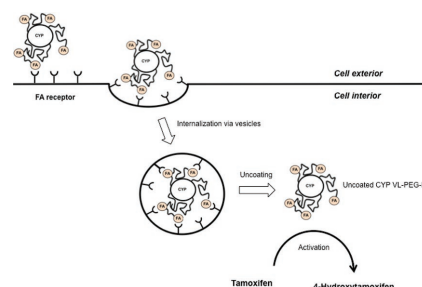
- [1] S. Mostafalou, M. Abdollahi, Pesticides and human chronic diseases: evidences mechanisms, and perspectives, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268 (2013) 157–177.
- [2] W. Zhang, F. Jiang, J. Ou, Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus, *Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.* 1 (2011) 125–144.
- [3] G. Davila-Vazquez, R. Tinoco, M.A. Pickard, R. Vazquez-Duhalt, Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*, *Enzyme Microb. Technol.* 36 (2005) 223–231.
- [4] L.A. McCauley, W.K. Anger, M. Keifer, R. Langley, M.G. Robson, D. Rohlman, Studying health outcomes in farmworker populations exposed to pesticides, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 953–960.
- [5] Public Health Impact of Pesticides Used Inagriculture, World Health Organization (WHO), 1990 (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/39772/1/9241561394.pdf>).
- [6] D. Gunnell, M. Eddleston, M.R. Phillips, F. Konradsen, The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review, *BMC Public Health* 7 (2007) 357.
- [7] J.B. Leikin, R.G. Thomas, F.G. Walter, R. Klein, H.W. Meislin, A review of nerve agent exposure for the critical care physician, *Crit. Care Med.* 30 (2001) 2346–2354.
- [8] M. Moshiri, E. Darchini-Maragheh, M. Balali-Mood, Advances in toxicology and medical treatment of chemical warfare nerve agents, *DARU J. Pharm. Sci.* 20 (2012) 81.
- [9] M. Eddleston, L. Szinicz, P. Eyer, N. Buckley, Oximes in acute organophosphate pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials, *QJM* 95 (2006) 275–283.
- [10] K.S. Pawar, R.R. Bhoite, C.P. Pillay, S.C. Chavan, D.S. Malshikare, S.G. Garad, Continuous pralidoxime infusion versus repeated bolus injection to treat organophosphorus pesticide poisoning: a randomised controlled trial, *Lancet* 368 (2006) 2136–2141.
- [11] J. Kassa, Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 40 (2002) 803–816.
- [12] P. Taylor, Anticholinesterase agents, in: A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall, F. Murad (Eds.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Macmillan, New York, 1985, pp. 1010–1129.
- [13] J.M. Cohen, M.G. Warringa, Purification and properties of dialkyl-fluorophosphatase, *Biochim. Biophys. Acta* 26 (1957) 29–39.
- [14] Y. Ashani, S. Pistinner, Estimation of the upper limit of human butyrylcholinesterase dose a mathematically based toxicokinetic model, *Toxicol. Sci.* 367 (2004) 358–367.
- [15] A. Saxena, W. Sun, J.M. Fedorko, I. Koplovitz, B.P. Doctor, Prophylaxis with human serum butyrylcholinesterase protects guinea-pigs exposed to multiple lethal doses of soman or VX, *Biochem. Pharmacol.* 81 (2011) 164–169.
- [16] H. Mumford, J.K. Troyer, Post-exposure therapy with recombinant human BuChE following percutaneous VX challenge in guinea-pigs, *Toxicol. Lett.* 206 (2011) 29–34.
- [17] M. Trovaslet-Leroy, L. Musilova, F. Renault, X. Brazzolotto, J. Misik, L. Novotny, M.-T. Froment, E. Gillon, M. Loidice, L. Verdier, P. Masson, D. Rochu, D. Jun, F. Nachon, Organophosphate hydrolases as catalytic bioscavengers of organophosphorus nerve agents, *Toxicol. Lett.* 206 (2011) 14–23.
- [18] S.D. Kirby, J.R. Norris, J.R. Smith, B.J. Bahnson, D.M. Cerasoli, Human paraoxonase double mutants hydrolyze V and G class organophosphorus nerve agents, *Chem. Biol. Interact.* 203 (2013) 181–185.
- [19] C.M. Theriot, A.M. Grunden, Hydrolysis of organophosphorus compounds by microbial enzymes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (2011) 35–43.
- [20] T. Belinskaya, N. Pattabiraman, R. Ditargiani, M. Choi, A. Saxena, Differences in amino acid residues in the binding pockets dictate substrate specificities of mouse senescence marker protein-30 human paraoxonase1, and squid diisopropylfluorophosphatase, *Biochim. Biophys. Acta: Prot. Proteom.* 1824 (2012) 701–710.
- [21] K. Tuovinen, E. Kaliste-Korhonen, F.M. Raushel, O. Hänninen, Phosphotriesterase—a promising candidate for use in detoxification of organophosphates, *Toxicol. Sci.* 23 (1994) 578–584.
- [22] C.M. Theriot, R.L. Semcer, S.S. Shah, A.M. Grunden, Improving the catalytic activity of hyperthermophilic *Pyrococcus horikoshii* prolidase for detoxification of organophosphorus nerve agents over a broad range of temperatures, *Archaea* 2011 (2011) 1–9.
- [23] L. Perezgasga, L. Sanchez-Sanchez, S. Aguila, R. Vazquez-Duhalt, Substitution of the catalytic metal and protein pegylation enhances activity and stability of bacterial phosphotriesterase, *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2012) 1236–1247.
- [24] D.L. Eaton, Biotransformation enzyme polymorphism and pesticide susceptibility, *Neurotoxicology* 21 (2000) 101–111.
- [25] J. Jauregui, B. Valderrama, A. Albores, R. Vazquez-Duhalt, Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi, *Biodegradation* 14 (2003) 397–406.
- [26] E. Hodgson, R.L. Rose, The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals, *Pharmacol. Ther.* 113 (2007) 420–428.
- [27] E. Hodgson, R.L. Rose, Metabolic interactions of agrochemicals in humans, *Pest Manag. Sci.* 64 (2008) 617–621.
- [28] L. Sanchez-Sanchez, R. Roman, R. Vazquez-Duhalt, Pesticide transformation by a variant of CYPBM3 with improved peroxxygenase activity, *Pestic. Biochem. Physiol.* 102 (2012) 169–174.
- [29] R.J. Foxenberg, B.P. McGarrigle, J.B. Knaak, P.J. Kostyniak, J.R. Olson, Human hepatic cytochrome P450-specific metabolism of parathion and chlorpyrifos, *Drug Metab. Dispos.* 35 (2007) 189–193.
- [30] M. Chauzat, J. Faucon, Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France, *Pest Manag. Sci.* 63 (2007) 1100–1106.
- [31] R.L. Rose, J. Tang, J. Choi, Y. Cao, A. Usmani, N. Cherrington, E. Hodgson, Pesticide metabolism in humans: including polymorphisms, *Scand. J. Work Environ. Health* 31 (2005) 156–163.
- [32] P.C. Cirino, F.H. Arnold, Regioselectivity and activity of cytochrome P450 BM-3 and mutant F87A in reactions driven by hydrogen peroxide, *Adv. Synth. Catal.* 344 (2002) 932–937.
- [33] A.F.S.A. Habeeb, Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid, *Anal. Biochem.* 14 (1966) 328–336.
- [34] F.P. Guengerich, M.V. Martin, C.D. Sohl, Q. Cheng, Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 1245–1251.
- [35] H. Wariishi, M.H. Gold, Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biol. Chem.* 267 (1999) 23688–23695.
- [36] C. Xie, H. Ng, S. Nagarajan, OxLDL or TLR2-induced cytokine response is enhanced by oxLDL-independent novel domain on mouse CD36, *Immunol. Lett.* 137 (2011) 15–27.
- [37] J.P. Gallivan, D.A. Dougherty, Cation- π interactions in structural biology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 9459–9464.
- [38] D.A. Dougherty, The cation- π interactions, *Acc. Chem. Res.* 46 (1999) 885–893.
- [39] D.A. Dougherty, D.A. Stauffer, Acetylcholine binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition, *Science* 250 (1990) 1558–1560.
- [40] A.W. Munro, D.G. Leys, K.J. McLean, K.R. Marshall, T.W.B. Ost, S. Daff, C.S. Miles, S.K. Chapman, D.A. Lysek, C.C. Moser, C.C. Page, P.L. Dutton, P450 BM3: the very model of a modern flavocytochrome, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 250–257.
- [41] P. Caliceti, F.M. Veronese, Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 1261–1277.
- [42] F.M. Veronese, G. Pasut, PEGylation: successful approach to drug delivery, *Drug Discov. Today* 10 (2005) 1451–1458.
- [43] A. Abuchowski, T. van Es, N.C. Palczuk, F.F. Davis, Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 3578–3581.
- [44] F.M. Veronese, A. Mero, G. Pasut, Protein PEGylation, Basic Science and Biological Applications, Birkhäuser-Verlag, Switzerland, 2009.
- [45] G. Pasut, Polymers for protein conjugation, *Polymers* 6 (2014) 160–178.
- [46] G. Pasut, F.M. Veronese, State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research, *J. Cont. Release* 161 (2012) 461–472.
- [47] G. Pasut, F.M. Veronese, Pegylation for improving the effectiveness of therapeutic biomolecules, *Drugs Today* 45 (2009) 687–695.
- [48] H.F. Gaertner, A.J. Puigserver, Increased activity and stability of poly(ethylene glyco)-modified trypsin, *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1992) 150–155.
- [49] B. Treetharnmathurota, C. Ovartharnporn, J. Wungsintaweekul, R. Duncan, R. Wiwattanapatape, Effect of PEG molecular weight and linking chemistry on the biological activity and thermal stability of PEGylated trypsin, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 252–259.
- [50] J.A. Rodríguez-Martínez, I. Rivera-Rivera, R.J. Solá, K. Griebenow, Enzymatic activity and thermal stability of PEG- α -chymotrypsin conjugates, *Biotechnol. Lett.* 31 (2009) 883–887.
- [51] A.A. Belaidi, J. Roper, S. Arjune, S. Krizowski, A. Trifunovic, G. Schwarz, Oxygen reactivity of mammalian sulfite oxidase provides a concept for the treatment of sulfite oxidase deficiency, *Biochem. J.* 469 (2015) 211–221.
- [52] R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, Chemical modification of cytochrome C improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Enzyme Microb. Technol.* 22 (1998) 8–12.

- [53] H.A. Vandertol-Vanier, R. Vazquez-Duhalt, R. Tinoco, M.A. Pickard, Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Coriopsis gallica* laccase, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29 (2002) 214–220.
- [54] F. Quintanilla-Guerrero, M.A. Duarte-Vázquez, R. Tinoco, M. Gómez-Suárez, B.E. García-Almendárez, R. Vazquez-Duhalt, C. Regalado, Chemical modification of turnip peroxidase with methoxypolyethylene glycol enhances activity and stability for phenol removal using the immobilized enzyme, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 8058–8065.
- [55] S. Sekiguchi, K. Yasukawa, K. Inouye, Effects of polyethylene glycol on bovine intestine alkaline phosphatase activity and stability, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75 (2011) 2132–2137.
- [56] K.V. Sukhovkov, E.V. Kudryashova, PEG-chitosan and glycol-chitosan for improvement of biopharmaceutical properties of recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*, *Biochemistry (Mosc.)* 80 (2015) 113–119.
- [57] P. Caliceti, O. Schiavon, F.M. Veronese, Immunological properties of uricase conjugated to neutral soluble polymers, *Bioconjug. Chem.* 12 (2001) 515–522.
- [58] A. Malzert, F. Boury, D. Renard, P. Robert, L. Lavenant, J.P. Benoit, J.E. Proust, Spectroscopic studies on poly(ethylene glycol)-lysozyme interactions, *Int. J. Pharm.* 260 (2003) 175–186.
- [59] D. da Silva Freitas, P.J. Spencer, R. Camargo Vassão, J. Abrahão-Neto, Biochemical and biopharmaceutical properties of PEGylated uricase, *Int. J. Pharm.* 387 (2010) 215–222.
- [60] H. García-Arellano, B. Valderrama, G. Saab-Rincón, R. Vazquez-Duhalt, High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome C, *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 1336–1344.
- [61] C. Li, W. Li, T.P. Holler, Z. Gu, Z. Li, Polyethylene glycols enhance the thermostability of α -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*, *Food Chem.* 164 (2014) 17–22.
- [62] H. Parikh, P. Bajaj, R.K. Tripathy, A.H. Pande, Improving properties of recombinant SsoPox by site-specific pegylation, *Prot. Pept. Lett.* 22 (2015) 1098–1103.
- [63] M.A. Longo, D. Combes, Thermostability of modified enzymes: a detailed study, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74 (1999) 25–32.
- [64] P. Christakopoulos, E. Kourantzi, D.G. Hatzinikolaou, Enhancement of pH-stability of a low molecular mass endoglucanase from *Fusarium oxysporum* by protein pegylation, *Carbohydr. Res.* 314 (1998) 95–99.
- [65] A.L. Soares, G.M. Guimara, B. Polakiewicz, R. Nogueira, D.M. Pitombo, Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase, *Int. J. Pharm.* 237 (2002) 163–170.
- [66] R. Vazquez-Duhalt, P.M. Fedorak, D.W.S. Westlake, Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1992) 837–841.
- [67] L. Pei, G. Omburo, W.D. McGuinn, I. Petrikovics, K. Dave, F.M. Rauschel, J.R. Wild, J.R. Deloach, J.L. Way, Encapsulation of phosphotriesterase within murine erythrocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 124 (1994) 296–301.
- [68] P. Masson, D. Josse, O. Lockridge, N. Viguié, C. Taupin, C. Buhler, Enzymes hydrolyzing organophosphates as potential catalytic scavengers against organophosphate poisoning, *J. Physiol. (Paris)* 92 (1998) 357–362.
- [69] A. Amini, M. Liu, Z. Ahmad, Understanding the link between antimicrobial properties of dietary olive phenolics and bacterial ATP synthase, *Int. J. Biol. Macromol.* 101 (2017) 153–164.
- [70] M. Liu, A. Amini, Z. Ahmad, Safranal and its analogs inhibit *Escherichia coli* ATP synthase and cell growth, *Int. J. Biol. Macromol.* 95 (2017) 145–152.
- [71] S. Walsh, A. Shah, J. Mond, Improved pharmacokinetics and reduced antibody reactivity of lysostaphin conjugated to polyethylene glycol, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 554–558.
- [72] Z. Yang, J. Wang, Q. Lu, J. Xu, Y. Kobayashi, T. Takakura, A. Takimoto, T. Yoshioka, C. Lian, C. Chen, D. Zhang, Y. Zhang, S. Li, X. Sun, Y. Tan, S. Yagi, E.P. Frenkel, R.M. Hoffman, PEGylation confers greatly extended half-life and attenuated immunogenicity to recombinant methioninase in primates, *Cancer Res.* (2004) 6673–6678.
- [73] K. Quester, K. Juarez-Moreno, I. Secundino, Y. Rosenstein, K.P. Alejo, A. Huerta-Saquerio, R. Vazquez-Duhalt, Cytochrome P450 bioconjugate as a nanovehicle for improved chemotherapy treatment, *Macromol. Biosci.* 17 (2017) 1600374.
- [74] S. Zalipsky, Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16 (1995) 157–182.

Cytochrome P450 Bioconjugate as a Nanovehicle for Improved Chemotherapy Treatment

Katrin Quester, Karla Juarez-Moreno, Isamel Secundino, Yvonne Roseinstein, Karla P. Alejo, Alejandro Huerta-Saquero, Rafael Vazquez-Duhalt*

Cancer is still a growing public health problem, especially breast cancer that is one of the most important cancers in women. Chemotherapy, even though a successful treatment, is accompanied by severe side effects. Moreover, most of the drugs used for chemotherapy are administered as prodrugs and need to be transformed to the active form by cytochromes P450 (CYPs). In addition, increasing numbers of cancer tissues show lower CYP activity than the surrounding healthy tissues in which prodrugs are preferentially activated causing cytotoxicity. Here, the design of a functionalized cytochrome P450 bioconjugate is reported as nanovehicle for the enzyme direct delivery to the tumor tissue in order to improve the local drug activation. MCF-7 breast cancer cells are treated with CYP-polyethylene glycol bioconjugate functionalized folic acid, where it activates the prodrug tamoxifen and significantly reduces the dose of tamoxifen needed to kill the tumor cells. The CYP bioconjugate covered with polyethylene glycol shows no immunogenic activity. The advantages of increasing the site-specific CYP activity in tumor tissues are discussed.



Dr. K. Quester, Dr. K. Juarez-Moreno, K. P. Alejo,
Dr. A. Huerta-Saquero, Prof. R. Vazquez-Duhalt
Centro de Nanociencias y Nanotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México
Km 107 carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada
Baja California 22760, Mexico
E-mail: rvd@cryn.unam.mx
Dr. K. Juarez-Moreno
CONACYT Research Fellow at Centro de
Nanociencias y Nanotecnología
UNAM
Ensenada, Baja California 22760, Mexico
Dr. I. Secundino, Prof. Y. Roseinstein
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México
Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

1. Introduction

Cancer is primarily originated by genetic alterations that induce the deregulation of the gene networks producing an abnormal, out of control, cell growth. Most tumors arise as a result of the interaction of somatic and germline mutations with various environmental factors.^[1] Conceptual progress in the last years allowed the identification of several hallmarks of cancer that includes; sustain of proliferative signaling, evasion of growth suppressors, resistance to cell death, permit replicative immortality, induction of angiogenesis, invasion activation and metastasis, energy metabolism redirection, and circumvention of immune destruction.^[2] Cancer development as well as its treatment are still unresolved medical problems,^[3] and

the impact of cancer on public health will continue to grow as population ages and some cancer incidence rates rise.^[4]

A main challenge for cancer treatments is the diversity of cancerous cells with different physiology within a single tumor.^[5] Chemotherapy is the preferred strategy to fight cancer^[6] and even though it is very successful, it is associated with severe side effects. Most drugs used for chemotherapy are administered as prodrugs and they need to be transformed to their active form by the cytochromes P450 (CYPs) family of enzymes, as is the case of tamoxifen.^[7] This activation of a drug to its cytotoxic form can occur in nontargeted and healthy tissues, inducing cell damage and thus, drastic side effects. This is especially important in cancer tumors showing low CYP activity such as breast cancer, one of the most common kinds of cancer among women.^[8]

An alternative to increase the local concentration of an active drug on tumor cells, is prodrug activation therapy via enzymes. Enzymatic therapy may enhance treatment efficiency and, at the same time, reduce the unspecific toxicity of the drug.^[9] Two therapies have been proposed to target enzymes to the tumors: gene-directed enzyme prodrug therapy using virus-mediated transfection^[10] and antibody-directed enzyme prodrug therapy, in which antibodies that recognize the tumor cells can be used as carriers of the enzyme of interest to tumor cells.^[11] However, no further advances have been reported for these two proposed therapies.

The cytochrome P450 enzymes form a large family of heme-containing microsomal proteins that catalyze several types of oxidation and reduction reactions of endogenous and exogenous substrates. They are also involved in the activation of a number of prodrugs, including tamoxifen.^[7] In this regard, we reported recently the use of virus-like nanoparticles as carriers for CYP activity,^[12,13] showing that these particles had both the capacity to activate prodrugs, and to increase the CYP activity inside treated tumor cells. Tamoxifen is one of the prodrugs most used in breast cancer treatment and it is metabolized into active compounds with antiestrogenic potential by several members of the CYP family.^[14–16] However, its use has been questioned since a significant number of breast-cancer patients have shown a low response to tamoxifen treatment,^[5] presumably correlating with low expression levels of CYP2D6.

The CYP_{BM3} from *Bacillus megaterium* shows high similarity to human CYP3A4,^[17,18] although its heme domain utilizes peroxides in place of dioxygen and NAD(P)H, driving hydroxylation via the peroxide “shunt” pathway.^[19,20] An stable variant of CYP_{BM3}21B3 containing three additional mutations, has shown able to transform tamoxifen into the active anticancer drugs endoxifen and 4-hydroxytamoxifen^[12] among other non-natural substrates^[21,22] and drugs.^[23] A single mutation of Phe87 to the smaller residue alanine (F87A) in the wild-type

CYP_{BM3} has been shown to result in enhanced enzyme activity when act as peroxygenase,^[24] thus this variant seems suitable to be used as a prodrug activator.

Modification of biologically active molecules with polyethylene glycol (PEG) results in increased half-life of the molecules, increased circulation times and reduced nonspecific binding to nontargeted or nondiseased areas. In addition to improved catalytic properties, PEG-modified enzymes have also a reduced immunogenicity.^[25,26] Thus, PEG conjugation is a rapidly evolving strategy for the use of therapeutic proteins and for drug delivery methods.^[26] PEGylation was first described in the 1970s by Abuchowski et al.^[27,28] and it was an important milestone because at that time it was not conceivable to modify an enzyme so extensively and still maintain its activity. The covalent modification of enzymes with this amphiphilic polymer has been employed to solubilize proteins for biocatalysis in organic solvents, where PEGylated enzymes showed increased activity and stability, protection against denaturation by extreme pH and high temperature, or by oxidizing agents.^[29–33] In addition, the barrier properties of PEG can also protect therapeutic proteins from digestive proteolytic enzymes in the body.^[34]

One of the goals of PEG-protein bioconjugates is to mitigate immune responses or adverse immunologically related responses associated with therapeutic protein products that affect their safety and efficacy. Immune responses to therapeutic protein products may pose problems for both patient safety and product efficacy. Immunologically based adverse events of therapeutic protein products, include anaphylaxis, cytokine release syndrome, and cross-reactive neutralization of endogenous proteins mediating critical functions. Unwanted immune responses to therapeutic proteins may also neutralize their biological activities and result in adverse events not only by inhibiting the efficacy of the therapeutic proteins, but also by cross-reacting to an endogenous protein counterpart, leading to loss of its physiological function (e.g., neutralizing antibodies to therapeutic erythropoietin cause pure red cell aplasia by also neutralizing the endogenous protein).^[35–39]

We report herein the superficial modification of the CYP with PEG functionalized with folic acid (FA), resulting into the bioconjugate (CYP-PEG-FA). The bioconjugate internalization into MCF-7 breast cancer cells and the intracellular activation of tamoxifen are demonstrated and discussed.

2. Experimental Section

2.1. Chemicals and Cell Line

Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol), hydrogen peroxide (30%), 2,6-dimethoxyphenol, tamoxifen, 7-benzoyloxy-4-trifluoromethylcoumarin (BFC), 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid

(MES), L-glutamine, sodium bicarbonate and piperonyl butoxide, and the TOX1 in vitro toxicology assay kit were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Hydrochloric acid (37%) and glycerol were purchased from Fermont (Monterrey, Mexico) and folic acid-polyethylene glycol₅₀₀₀-N-Hydroxysuccinimide (NHS-PEG-FA) was purchased from NanoCS (New York, NY). Fetal bovine serum was obtained from Gemini Bio Products (Sacramento, CA). MCF-7 breast adenocarcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC HTB-22).

2.2. CYP_{BM3}F87A Expression and Purification

CYP_{BM3}F87A (CYP) was expressed in *Escherichia coli* DH5α using the β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible vector pCWori.^[12] The location of the mutation has been confirmed by gene sequencing. Bacterial cultures were grown as previously described^[24] with some modifications: Cultures were grown at 25 °C in an orbital shaker (75 rpm) for 22 h before and 44 h after induction. Bacterial cultures were centrifuged at 5000 × g for 20 min. Then the pellet was disrupted by sonication and CYP_{BM3}F87A was purified from the crude extract by using a fast protein liquid chromatograph (AKTA prime plus, GE Healthcare) equipped with a 5 mL Ni-precharged HisTrap FF column (GE Healthcare). Colored fractions were collected and stored at -20 °C in 50 × 10⁻³ M MES pH 8 with 10% glycerol after being concentrated via ultrafiltration (10 kDa cutoff).

2.3. CYP Functionalization

Pure CYP was functionalized with NHS-PEG-FA. A CYP solution (1.5 mL) containing 2.31 mg of protein was reacted with 13.25 mg of NHS-PEG-FA for 2 h at room temperature under rotation. The amount of polymer represented two times, in molar basis, the free amino groups on the CYP surface. After reaction, the unreacted NHS-PEG-FA was removed by three successive dialysis steps (<10 000 Da) in 50 × 10⁻³ M MES buffer, pH 8.

2.4. Protein Quantification

The protein content of CYP and CYP-PEG-FA preparations were estimated by both; CYP-CO complex formation using an extinction coefficient of 91 000 M⁻¹ cm⁻¹ at 415 nm^[40,41] and BioRad protein assay with BSA as standard.

2.5. Enzyme Activity

Catalytic constants (k_{cat} and K_M) were determined using 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) and tamoxifen as substrates. The initial transformation rate of 2,6-DMP was monitored spectrophotometrically^[42] at 468 nm with an extinction coefficient of 49 600 M⁻¹ cm⁻¹ in a Perkin Elmer Lambda 25 UV/vis spectrophotometer. Tamoxifen transformation was monitored by high-performance liquid chromatography (HPLC) as previously reported.^[12] The substrate concentration varied from 50 to 400 × 10⁻⁶ M 2,6-DMP, and from 20 to 300 × 10⁻⁶ M tamoxifen. The reaction mixture contained 225 pmoles CYP or CYP-PEG-FA and 5 × 10⁻³ M H₂O₂ as electron acceptor.^[12,43] Catalytic constants were determined using the software MMfit (J.P.G. Malthouse, Dublin).

2.6. Tumor Cell Culture

Breast adenocarcinoma cells (MCF-7 cells) were cultured according to ATCC specifications. Cells were propagated in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin streptomycin, 1% L-glutamine, 1.5 g L⁻¹ sodium bicarbonate and 10 μg mL⁻¹ of human recombinant insulin, and maintained at 37 °C and 5% CO₂.

2.7. Intracellular CYP and CYP-PEG-FA Activity Determination

CYP and CYP-PEG-FA enzymatic activities were determined in treated and control MCF-7 cells by using the transformation of BFC to the fluorescent product 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin (HFC) according to Arora et al.,^[44] with some modifications. Briefly, cell culture grade Petri dishes coated with poly-D-lysine (MatTek P35GC1.5-10C) were used to seed 400 000 MCF-7 cells in EMEM and incubated overnight at 37 °C and 5% CO₂ prior to exposure to 225 pmol of either CYP or CYP-PEG/FA in EMEM media for 4 h at 37 °C and 5% CO₂. Afterward, cell culture media was discarded and cells were washed with EMEM medium. After adding 15 μL of 20 × 10⁻³ M BFC diluted in 150 μL of complete EMEM media plates were incubated in darkness for 10 min at room temperature. Subsequently, the culture media was replaced with fresh complete EMEM media to reach 1.5 mL in each plate and further incubated for 30 min at 37 °C and 5% CO₂. The CYP enzymatic reaction was started by adding 4.5 μL of 1 M H₂O₂ and incubation for 10 min at 37 °C and 5% CO₂. After incubation, cells were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and harvested with trypsin/EDTA treatment. Pelleted cells were counted and diluted in PBS to obtain 200 000 cells. Fluorescence intensity from treated and nontreated MCF-7 cells was measured in a fluorescence spectrophotometer (Hitachi F-7000), using an excitation source at 254 nm and emission measurement at 510 nm. A standard curve with unmodified CYP in the same reaction conditions showed a linear correlation between fluorescence of HFC and CYP activity.

2.8. Confocal Microscopy Cell Imaging

MCF-7 cell cultures were treated and prepared as previously described.^[13] Briefly, MCF-7 cell cultures were treated with BFC reagent and then fixed formaldehyde. The cell permeabilization was performed with 0.5% Triton X. Nuclear staining was carried out with DAPI and visualized with an inverted laser-scanning microscope (LSM-510, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) with an excitation wavelength at 405 nm and filters for emission of DAPI. The CYP activity was estimated by the transformation of BFC in to the fluorescent product HFC and detected using an excitation at 488 nm and detected at 515–530 nm. Confocal images were captured using the FV-10 ASW software and were analyzed with the FV-10ASW viewer version 4.1 from Olympus.

2.9. Cell Susceptibility to Tamoxifen

Susceptibility of MCF-7 cells to tamoxifen was estimated as follows. Each well of a 96-well plate was seeded with 10 000 cells of MCF-7 cells. Cells were incubated for 24 h in EMEM media at

37 °C and 5% CO₂. Then, cell media was discarded and 225 pmol of either free CYP (control) or CYP-PEG-FA bioconjugate in EMEM media was added to the cells and incubated for 12 h at 37 °C and 5% CO₂. After incubation time, media were discarded, cells washed and then 50 µL of EMEM media containing hydrogen peroxide to reach a final concentration of 3×10^{-3} M were added to each well, and let it stand for 10 min at 37 °C and 5% CO₂. Afterward, twofold serial dilutions of tamoxifen ranging from 0.78 to 6.25×10^{-6} M were added to the wells in a final volume of 100 µL of EMEM media. The cells were incubated for 18 h at 37 °C and 5% CO₂. After incubation time, media was removed; cells were washed out with 300 µL of PBS, and then used for tamoxifen cytotoxicity determination by the MTT (methyl-1,3,4-thiazolyl-tetrazolium) assay. Cell viability was estimated by a colorimetric assay based on the reduction of MTT reagent. MTT was added to the plate following the instructions of the manufacturer. The controls for cell death in the cell viability experiments were obtained by adding dimethyl sulfoxide to the cell cultures, which induces total cell death. Untreated cell viability was measured by incubating MCF-7 cells with EMEM media. Experiments were conducted as three independent experiments with three replicates each. Absorbance measurement of MTT reduction was achieved with a 96-well plate reader (Thermo Scientific) at 570 and 690 nm. Absorbance results from survival positive control (EMEM) was used to establish 100% of cell survival, then direct comparison of experimental groups was done and depicted as survival percentage related with tamoxifen concentration.

2.10. Lymphocyte Purification and Cellular Activation

In order to remove endotoxins (lipopolysaccharides, LPS) all preparations for immunological experiments were previously purified with a high capacity endotoxin removal resin (Pierce, ThermoFisher Scientific). T cells were purified by negative selection from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using a Pan T cell isolation Kit (MACS, MiltenyiBiotec) and arrested for 24 h in RPMI 1640 medium (Hyclone) + 2% fetal calf serum (Invitrogen) before activation. The local Research Bioethics Committee approved this procedure. Purified T cells (1×10^6) were pretreated for 30 min with 25 µg mL⁻¹ of CYP or 25 µg mL⁻¹ CYP-PEG-FA and further stimulated with 1 µg mL⁻¹ of anti-CD3 mAb (OKT3) crosslinked with 1 µg mL⁻¹ of rabbit antimouse IgG (RaMIG). To assess the contribution of contaminating LPS, cells were pretreated with 2.5 ng LPS/mL and stimulated with 1 µg mL⁻¹ of anti-CD3 mAb (OKT3) crosslinked with 1 µg mL⁻¹ of RaMIG. Expression of the activation marker CD69 was evaluated by flow cytometry with a FACSCanto II (BD biosciences) 24 h after stimulation, with a PE-conjugated anti-CD69 mAb (Fisher

Scientific). T cells stimulated with 20 ng mL⁻¹ PMA and 1 µg mL⁻¹ ionomycin were used as positive controls.

2.11. Lipopolysaccharides Quantification

The lipopolysaccharide content of the different Cytochrome P450 preparations was measured by the limulus amoebocyte lysate assay (LAL), following the manufacturer's instructions (Lonza Group Ltd., Basel, Switzerland).

2.12. Statistics

One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test ($P < 0.001$) was used to evaluate data.

3. Results and Discussion

The aim of this work was the design of a nanovehicle for enzyme delivery. The single mutant F87A was selected by its high activity for tamoxifen transformation (Table 1) and having only one mutation when compared with the wild-type protein. The CYP was chemically modified with a folic acid-functionalized PEG. The free amino groups on the protein surface were effectively modified as confirmed by HPLC equipped with a gel permeation column. The final preparation (Figure 1) showed to be active, covered with PEG and with folic acid as ligand for tumor cell receptors. Due to its rapid growth rate, cancer cells often overexpress folate receptors^[45,46] and these receptors for folic acid are highly expressed on various tumors such as ovarian, lung, breast, brain, colon, and kidney cancers.^[47,48]

The catalytic constants of unmodified (CYP) and modified (CYP-PEG-FA) preparations were determined (Table 1). In the case of the phenolic substrate, the activity constant (k_{cat}) increased more than seven times while the catalytic efficiency ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) increased only 1.5 times due to a significant decrease of the substrate affinity. The prodrug tamoxifen, being our target substrate, exhibited a slight increase in catalytic activity, but the catalytic efficiency was lower in the CYP-PEG-FA preparation when compared with the unmodified CYP, also due to a decrease of the substrate affinity. As mentioned above, tamoxifen (as prodrug) should be transformed into the active compound by CYP enzymes.^[14–16] The increase of enzymatic activity after pegylation has been reported for other enzymes.^[33]

■ Table 1. Kinetic constants of CYP and CYP-PEG-FA using 2,6-dimethoxyphenol (DMP) and tamoxifen as substrates.

	DMP			Tamoxifen		
	k_{cat} [min ⁻¹]	K_{M} [$\times 10^{-6}$ M]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ [min ⁻¹ mM ⁻¹]	k_{cat} [min ⁻¹]	K_{M} [$\times 10^{-6}$ M]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ [min ⁻¹ mM ⁻¹]
CYP	19.5 ± 1.5	9.1 ± 1.9	2135	29.7 ± 8.2	97.7 ± 8.3	304
CYP-PEG-FA	143.8 ± 5.8	43.8 ± 7.6	3283	39.8 ± 8.5	166.9 ± 16.4	238

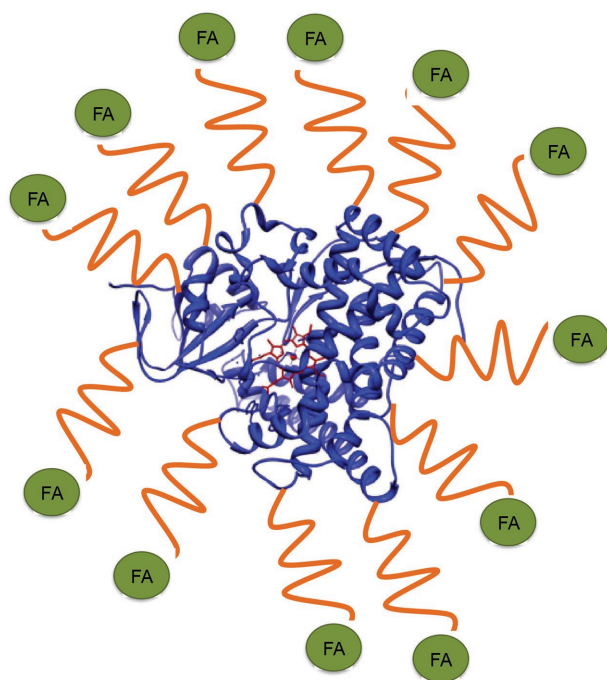


Figure 1. Schematic representation of the biocatalytic conjugates CYP-PEG-FA. The heme domain of CYP (blue) was covalently covered with PEG (orange) with folic acid (green) at the polymer end to be recognized for folic acid receptors in tumor cells.

This activity increase could be attributed to the protein flexibility increase and to a favorable partition of substrate toward the active site, especially with hydrophobic substrates. Thus, even though the catalytic activity is slightly affected by the enzyme modification, the bioconjugate CYP-PEG-FA shows high activity for tamoxifen activation (Table 1).

Recombinant proteins expressed in *E. coli* are often contaminated with traces of LPS that could activate the immune system inducing a proinflammatory response,^[49] and it is thus recommended to evaluate the capacity of such proteins to activate immune cells. LPS are the main component of the outer membrane of Gram-negative bacteria^[50] and is recognized by Toll-like receptor 4 (TLR4).^[51] Although recognition of LPS by TLR4 is essential to activate the immune system, exacerbation of proinflammatory response is lethal to the host.^[52] It is thus important to assess whether the LPS content of recombinant proteins can activate immune cells, and if the interaction of these recombinant PEGylated and folic acid-modified proteins with immune cells elicits a molecular response that may stimulate the immune system, altering the immune capacity of the host. In this work, endotoxins (LPS) were removed from all tested preparations through a column containing high capacity endotoxin removal resin. CD69 is an early activation antigen expressed by lymphoid cells in response to activation signals. Its expression can be

followed by flow cytometry and it can be a measure of T cell activation.^[53]

Prior to test the capacity of the different CYP preparations, their LPS content was determined by LAL (Table 2) with CYP containing 0.081 ng LPS/ μ g and CYP-PEG-FA containing 0.1 ng LPS/ μ g, two quantities considered to be very low that demonstrates the efficiency of our LPS removal procedure. In order to evaluate the effect of CYP on immune cells, purified T lymphocytes were incubated with 25 μ g mL⁻¹ of CYP or CYP-PEG-FA, in the presence or absence of anti-CD3 mAb (OKT3). In the absence of anti-CD3 mAb (Figure 2A and Table 3), CYP was able to induce a modest but significant ($P < 0.001$) expression of the activation marker CD69 in approximately 20% of the T lymphocytes, whereas CYP-PEG-FA did not induce the expression of CD69, suggesting that the PEG-FA modification rendered the CYP molecules less visible to immune cells. When T cells were activated with the anti-CD3 mAb, the addition of CYP-PEG-FA did not result in enhanced expression of CD69 as compared to cells stimulated with the anti-CD3 mAb only (Figure 2B and Table 4), but the addition of CYP with that of anti-CD3 induced higher expression of CD69 as compared with cells stimulated only with anti-CD3 ($P < 0.001$). As protein preparations were estimated to contain 2.5 ng LPS per 25 μ g of protein (Table 2), to evaluate the direct effect of LPS in our assays, 2.5 ng of LPS was used to stimulate T cells in the presence or absence of anti-CD3 mAb. In the absence of anti-CD3 stimulation, LPS did not induce an increase of CD69 expression and when in combination with anti-CD3 pretreatment, the expression levels of CD69 was comparable to that of cells stimulated with anti-CD3 stimulation only (Figure 2 and Tables 3 and 4), further indicating that the protein preparations did not activate T cells. Similar results were obtained with PBMCs, and gating on B cells (data not shown). Thus, these data show that the CYP preparation can induce the expression of an activation marker such as CD69 and that the PEG-FA modification renders it less visible to T cells, and finally that the LPS content of these proteins is within a range that is not a stimulus for T lymphocytes. Thus, overall, the CYP-PEG-FA preparation is less immunogenic than the CYP one, consistent with the fact that PEGylation masks protein

Table 2. Lipopolysaccharide (LPS) content in the CYP preparations.

CYP preparation	Endotoxin units (EU mL ⁻¹)	Concentration of LPS ^{a)} (pg mL ⁻¹)
0.1 μ g CYP	0.081	8.1
0.1 μ g CYP-PEG-FA	0.010	10.0

^{a)}LPS content of CYP and CYP-PEG-FA was determined by the limulus amoebocyte lysate assay (LAL) (Lonza Group Ltd., Basel, Switzerland). Working range = 0.1–1 EU mL⁻¹, 1 EU = 100 pg of LPS.

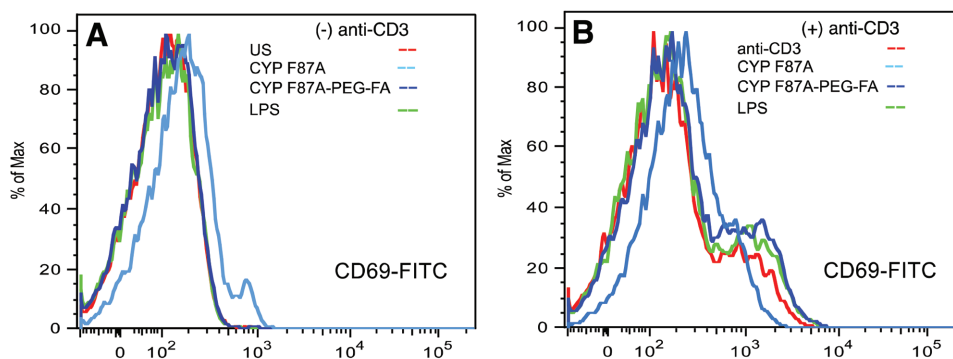


Figure 2. Expression of CD69 in T lymphocytes. Purified T lymphocytes ($1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) were stimulated for 24 h with $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ CYP or $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ CYP-PEG-FA or LPS (2.5 ng mL^{-1}) in A) the absence or B) presence (B) of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of anti-CD3 mAb (OKT3) crosslinked with $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of rabbit antimouse IgG. CD69 expression was measured by flow cytometry. Data show one representative experiment of two independent assays (US = unstimulated cells). Data shown are representative of two independent experiments.

epitopes reducing their immunogenicity and improving their half-life in the organism.^[54]

As mentioned before, PEG modifications of proteins have been used to improve enzyme catalytic properties, however the main interest is to reduce protein immunogenicity.^[25,55,56] PEG-coated proteins as well as other molecules has been generally attributed to suppression of protein adsorption onto their surfaces, which renders them invisible (or stealth) for macrophages. In addition PEG has very low toxicity and because of its simple structure is assumed to be of low immunogenicity itself.^[57] It is important to note however that despite the fact that in long-term medical treatments, the antibodies against PEG adversely affect therapy,^[58,59] several PEGylated products have been approved by the US Food and Drug Administration, European Medicines Agency, and other

Table 3. Expression of CD69 by CYP450 preparations in T lymphocytes. (Purified T cells (1×10^6) were as described in Figure 1. CD69 expression was measured by flow cytometry and results are expressed as the mean fluorescence intensity $\pm$ SD of two independent experiments, after subtracting the mean fluorescence intensity of nonstimulated cells. One way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test ($P < 0.001$) (*) was used to compare unstimulated cells versus CYP or CYP-PEG-FA, LPS + anti-CD3 versus CYP + anti-CD3, CYP-PEG-FA + anti-CD3, LPS + anti-CD3).

Culture condition	CD69 expression mean fluorescence intensity ($\pm$ SEM)
CYP	$70.55 \pm 12.8^*$
CYP-PEG-FA	$8.350 \pm 11.67^{\text{N.S.}}$
2.5 ng LPS	$5 \pm 3.81^{\text{N.S.}}$
α -CD3	$46.55 \pm 45.18^{\text{N.S.}}$
CYP + α -CD3	$132.6 \pm 1.485^*$
CYP-PEG-FA + α -CD3	$63.25 \pm 88.03^{\text{N.S.}}$
2.5 ng LPS + α -CD3	$60.6 \pm 63.5^{\text{N.S.}}$

regulatory authorities and are clinically used with success.

To evaluate whether CYP-PEG-FA was suitable for the intracellular delivery of cytochrome P450 activity, MCF-7 breast cancer cells were treated with the biocatalytic conjugate. It is important to point out, that this work pretends to proof the concept of CYP delivery to cells. The H_2O_2 activation could be replaced by using the complete enzyme including the NAD(P)H subunit, or using a conjugate with glucose oxidase, providing the reducing power necessary for the reaction. For in vivo treatments, tamoxifen can be applied as is currently practiced via the blood stream, but in less doses, or it could

Table 4. Expression of CD69 in T lymphocytes in the presence of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of anti-CD3 mAb (OKT3) crosslinked with $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of rabbit antimouse IgG. (Purified T cells (1×10^6) were stimulated with $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ CYP and $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ CYP-PEG-FA in the absence or presence of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of anti-CD3 mAb (OKT3) crosslinked with $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of RAMIG for 24 h. The percentage of CD69 + T cells was evaluated by flow cytometry. Data from triplicates of two independent experiments represent the mean of CD69 + cells $\pm$ SEM. One way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test; $P < 0.05$ (*) was used to compare unstimulated cells versus CYP, CYP-PEG-FA, LPS and anti-CD3 vs CYP + α -CD3, CYP-PEG-FA + α -CD3, LPS + α -CD3).

Culture condition	CD69 ⁺ T cells [%]
Unstimulated	1.545 ± 0.495
CYP	$18.39 \pm 4.975^*$
CYP-PEG-FA	$2.845 \pm 2.645^{\text{N.S.}}$
LPS	$1.525 \pm 1.025^{\text{N.S.}}$
α -CD3	10.98 ± 6.145
CYP + α -CD3	$36.46 \pm 7.78^*$
CYP-PEG-FA + α -CD3	$13.85 \pm 13.52^{\text{N.S.}}$
LPS + α -CD3	$14.10 \pm 8.905^{\text{N.S.}}$

be included in nanoparticles and specifically directed to cancer cells.

The MCF-7 cell line was selected based on both, its hormone-dependency and the expression of folate receptor- α on the cell membrane, enabling the cells to rapidly internalize the prodrug by endocytosis. The intracellular CYP activity was then evaluated with BFC as a substrate. CYP activity can be effectively estimated with BFC since fluorescence can only be detected following CYP-mediated transformation of BCF into the fluorescent HFC product. DAPI staining was performed for cell nucleus detection (Figure 3A). The fluorescence intensity of cells treated with CYP-PEG-FA was significantly higher when compared to that observed in untreated MCF-7 cells with only

endogenous CYP activity and to that of cells treated with nonfunctionalized CYP (control). BFC processing into the fluorescent HFC product was clearly localized in the cytoplasmic region (Figure 3A).

Intracellular CYP activity was quantitatively determined as fluorescence intensity. As mentioned before, BFC is a specific substrate for CYP and after enzymatic transformation to HFC it produces an intense fluorescence at 510 nm. As expected, the control cells showed a basal endogenous CYP activity (114 ± 20 a.u.) while the CYP-PEG-FA treated cells showed 6.3 times higher CYP activity (726 ± 59 a.u.) (Figure 3B). Control experiments with unmodified CYP showed no cell internalization of the enzyme and thus fluorescence intensity similar than these from untreated cells.

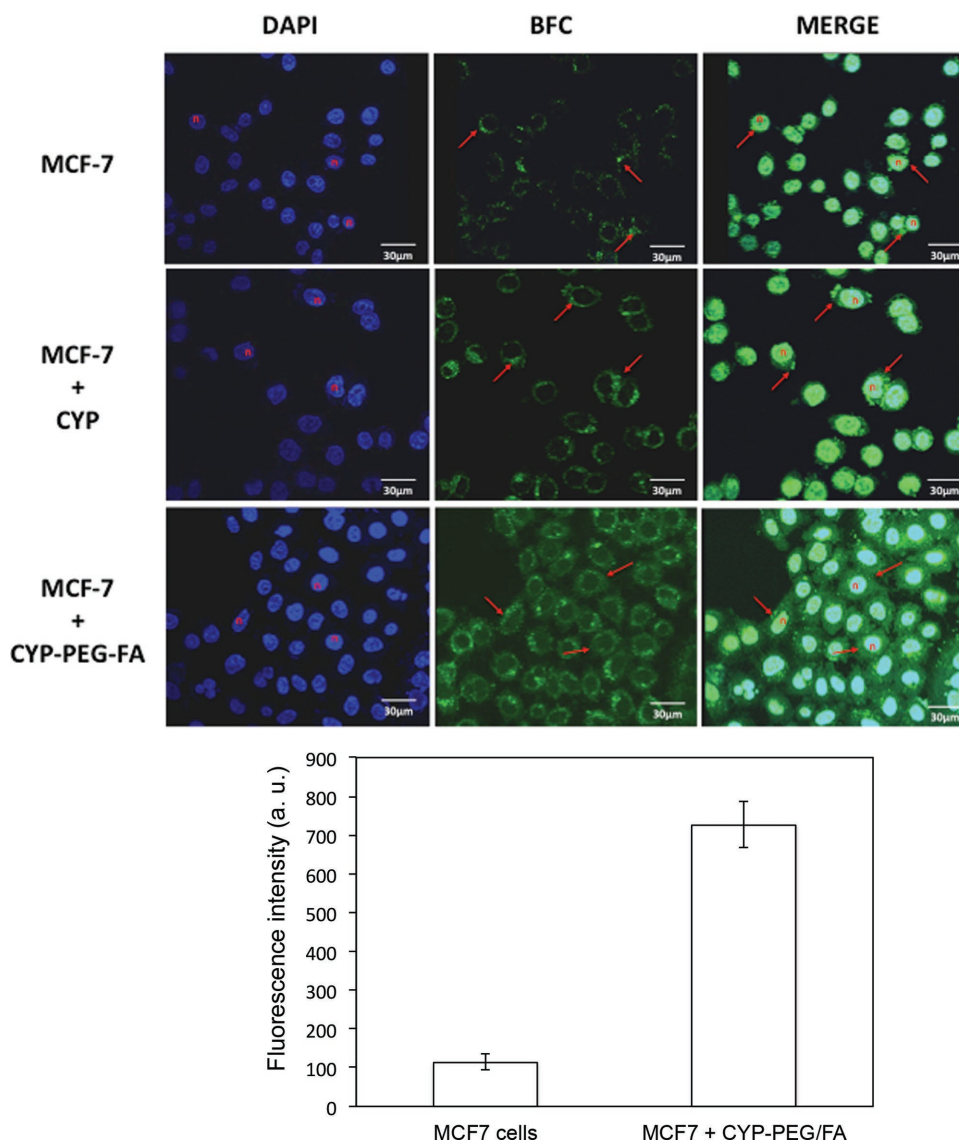


Figure 3. Confocal microscopy images of MCF-7 breast cancer cells. A–C) MCF-7 untreated cells, D–F) treated cells with free CYP, and G–I) treated cells with CYP-PEG-FA bioconjugate. J) Cytochrome P450 activity determined by the transformation rate of BFC to the fluorescent product HFC. Nuclear staining with DAPI is shown as “n.” CYP activity in the cytoplasmic region of MCF-7 cells is shown with red arrows. Merge of DAPI and BCF localize in the cytoplasm of MCF-7 cells. Scale bar represents 30 μm.

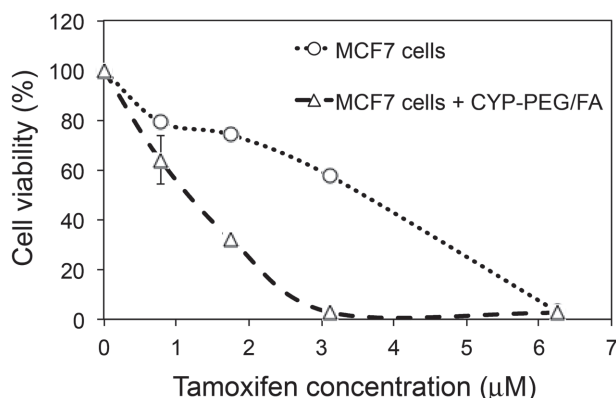


Figure 4. Viability of MCF-7 breast cancer cells and treated MCF-7 cells with CYP-PEG-FA after 12 h incubation with different concentration of tamoxifen.

Altogether, these data demonstrates the capacity of CYP-PEG-FA bioconjugates to deliver enzymatic activity to cells.

In order to verify that the CYP-PEG-FA cell treatment increased the prodrug activation, breast cancer MCF-7 cells, treated with the CYP-PEG-FA bioconjugate (22.5 pmol per well), were incubated for 12 h in the presence of different concentration of tamoxifen (Figure 4). A clear difference in cell susceptibility to tamoxifen was observed between untreated and CYP-PEG-FA-treated cells. At 1.5×10^{-6} M tamoxifen, CYP-PEG-FA-treated cells show a viability of only $\approx 30\%$, while control cell viability was 80%. Furthermore, the tumor cell death in the CYP-PEG-FA-treated cells was achieved with only 3×10^{-6} M tamoxifen, while nontreated cells required up to 6×10^{-6} M tamoxifen to obtain zero viability. Thus, the prodrug tamoxifen, a drug widely used in breast-cancer treatment, was more effective in the CYP-PEG-FA treated cells than in control cells. Tamoxifen is metabolized to endoxifen, which has high affinity for estrogen receptor with the desired chemotherapeutic effect, while norendoxifen shows undesired side effects. On the other hand, $\approx 20\%$ of the population has low CYP2D6 activity that renders tamoxifen less effective. The cellular uptake of tamoxifen by MCF-7 breast cancer cells is known^[60] and because the estrogen receptors are located in the periphery of the nuclear membrane, this bioconjugate could provide increased therapeutic benefit by transforming tamoxifen to the active drug inside cells and binding to estrogen receptors (ER).

4. Conclusions

The aim of this work was the design of a nanovehicle for enzyme delivery. The proof of concept for enzyme delivery has been demonstrated with a functionalized cytochrome P450-polyethylene glycol bioconjugate (CYP-PEG-FA). The

enzymatic nanovehicle contains folic acid at the polymer end as ligand, in order to target the bioconjugate into MCF7 cells, a human breast cancer cell line that overexpresses folic acid receptors on the cell membrane. The cell treatment with the biocatalytic particle increased the intracellular activation of the prodrug tamoxifen and showed no immunogenic activity. With the increase of CYP activity in tumor cells, a better prodrug activation in the target tissue is expected and thus a more effective chemotherapy. This is important because the drug dose could be reduced, minimizing the drastic side effects of the treatment. The CYP functionalized bioconjugates are thus an adjuvant to conventional tamoxifen treatments that can improve the treatment success rate, especially in patients with low basal CYP expression. This concept of enzyme directed delivery could also be applied for a diversity of diseases originated by a lack of enzyme activity.

Acknowledgements: The authors thank Erika Melchy Perez for technical assistance in the immunological and flow cytometry experiments and Dr. R. Mouriño-Perez and Olga A. Callejas for confocal microscopy. This work has been funded by the National Cou (CONACYT) (Grant Nos. IFC 2015-1 and SEP-CONACYT-251241). Dr. K. Juarez-Moreno is member of the International Network in Bionanotechnology (CONACyT), Mexico.

Received: August 28, 2016; Revised: October 20, 2016;
Published online: ; DOI: 10.1002/mabi.201600374

Keywords: chemotherapy; cytochrome P450; functionalized PEG; prodrug activation; tamoxifen

- [1] M. Huarte, *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1253.
- [2] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646.
- [3] R. Beaglehole, R. Bonita, R. Magnusson, *Public Health* **2011**, *125*, 821.
- [4] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. Maxwell Parkin, D. Forman, F. Bray, *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359.
- [5] L. Binkhorst, R. H. J. Mathijssen, A. Jager, T. van Gelder, *Cancer Treat. Rev.* **2015**, *41*, 289.
- [6] B. Al-Lazikani, U. Banerji, P. Workman, *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 679.
- [7] K. M. Huttunen, N. Mähönen, H. Raunio, J. Rautio, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2346.
- [8] Y. Zhao, W. Zhang, Y. Chen, F. Fang, X. Liu, *Maturitas* **2012**, *72*, 139.
- [9] J. E. Hecht, D. J. Waxman, *Methods Mol. Med.* **2000**, *35*, 77.
- [10] G. Xu, H. L. Mcleod, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3314.
- [11] I. Niculescu-Duvaz, C. J. Springer, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *26*, 151.
- [12] L. Sánchez-Sánchez, R. D. Cadena-Nava, L. Palomares, J. Ruiz-Garcia, M. S. T. Koay, J. J. M. T. Cornelissen, R. Vazquez-Duhalt, *Enzyme Microb. Technol.* **2014**, *60*, 24.
- [13] L. Sánchez-Sánchez, A. Tapia-Moreno, K. Juarez-Moreno, D. P. Patterson, R. D. Cadena-Nava, T. Douglas, R. Vazquez-Duhalt, *J. Nanobiotechnol.* **2015**, *13*, 66.

- [14] E. Lien, E. Solheim, O. Lea, S. Lundgren, S. Kvinnsland, P. M. Ueland, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 2175.
- [15] S. Nowell, J. Ahn, J. M. Rae, J. O. Scheys, A. Trovato, C. Sweeney, S. L. MacLeod, F. F. Kadlubar, C. B. Ambrosone, *Breast Cancer Res. Treat.* **2005**, *91*, 249.
- [16] T. E. Mürdter, W. Schroth, L. Bacchus-Gerybadze, S. Winter, G. Heinkele, W. Simon, P. Fasching, T. Fehm, M. Eichelbaum, M. Schwab, H. Brauch, *Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, *89*, 708.
- [17] H. Li, T. L. Poulos, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 140.
- [18] P. Williams, J. Cosme, D. M. Vinkovic, A. Ward, H. C. Angove, P. J. Day, C. Vornrhein, I. J. Tickle, H. Jhoti, *Science* **2004**, *305*, 683.
- [19] H. Joo, A. Arisawa, Z. Lin, F. H. Arnold, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 699.
- [20] P. C. Cirino, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3299.
- [21] B. Carmichael, L. L. Wong, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 3117.
- [22] L. Sanchez-Sanchez, R. Roman, R. Vazquez-Duhalt, *Pestic. Biochem. Physiol.* **2012**, *102*, 169.
- [23] G. Di Nardo, A. Fantuzzi, A. Sideri, P. Panicco, C. Sassone, G. Giunta, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 313.
- [24] P. C. Cirino, F. H. Arnold, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 932.
- [25] R. L. Lundbland, R. A. Bradshaw, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1997**, *26*, 143.
- [26] A. Kolate, D. Baradia, S. Patil, I. Vhora, G. Kore, A. Misra, *J. Controlled Release* **2014**, *192*, 67.
- [27] A. Abuchowski, T. van Es, N. C. Palczuk, F. F. Davis, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3578.
- [28] A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. van Es, F. F. Davis, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3582.
- [29] R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22*, 8.
- [30] H. Garcia-Arellano, B. Valderrama, G. Saab, R. Vazquez-Duhalt, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1336.
- [31] B. Castillo, J. Méndez, W. Al-Azzam, G. Barletta, K. Griebenow, *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *94*, 565.
- [32] K. Juarez-Moreno, M. Ayala, R. Vazquez-Duhalt, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *177*, 1364.
- [33] G. De Santis, J. B. Jones, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 324.
- [34] C. Monfardini, O. Schiavon, P. Caliceti, M. Morpurgo, J. M. Harris, F. M. Veronese, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 62.
- [35] S. Hermeling, D. J. Crommelin, H. Schellekens, W. Jiskoot, *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 897.
- [36] A. S. Rosenberg, A. Worobec, *BioPharm. Int.* **2004**, *17*, 22.
- [37] A. S. Rosenberg, A. Worobec, *BioPharm. Int.* **2005**, *18*, 32.
- [38] E. Korena, H. W. Smith, E. Shores, G. Shankar, D. Finco-Kent, B. Rup, Y.-C. Barrett, V. Devanarayan, B. Gorovits, S. Gupta, T. Parish, V. Quarmby, M. Moxness, S. J. Swanson, G. Taniguchi, L. A. Zuckerman, C. C. Stebbins, A. Mire-Sluis, *J. Immunol. Methods* **2008**, *333*, 1.
- [39] K. Murphy, *Janeway's Immunobiology*, 8th ed., Garland Science Publishing, New York **2011**, pp. 367–408.
- [40] F. P. Guengerich, M. V. Martin, C. D. Sohl, Q. Cheng, *Nat. Proto.* **2009**, *4*, 1245.
- [41] E. Bruchajzer, B. Frydrych, S. Sporny, J. Szymańska, *Hum. Exp. Toxicol.* **2011**, *30*, 363.
- [42] H. Wariishi, K. Valli, M. H. Gold, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 23688.
- [43] A. Vidal-Limón, S. Águila, M. Ayala, C. V. Batista, R. Vazquez-Duhalt, *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *122*, 18.
- [44] V. Arora, M. L. Cate, C. Ghosh, P. L. Iversen, *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 757.
- [45] H. Elnakat, M. Ratnam, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1067.
- [46] C. Chen, J. Ke, X. E. Zhou, W. Yi, J. S. Brunzelle, J. Li, E. L. Yong, H. E. Xu, K. Melcher, *Nature* **2013**, *500*, 486.
- [47] S. D. Weitman, R. H. Lark, L. R. Coney, D. W. Fort, V. Frasca, V. R. Zurawski, B. Kamen, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 3396.
- [48] J. F. Ross, P. K. Chaudhuri, M. Ratnam, *Cancer* **1994**, *73*, 2432.
- [49] S. Liu, R. Tobias, S. McClure, G. Styba, Q. Shi, G. Jackowski, *Clin. Biochem.* **1997**, *30*, 455.
- [50] R. E. W. Hancock, D. N. Karunaratne, *Int. Congr. Ser.* **1990**, *923*, 191.
- [51] A. Poltorak, X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, B. Beutler, *Science* **1998**, *282*, 2085.
- [52] J. Cohen, G. Guyatt, G. R. Bernard, T. Calandra, D. Cook, D. Elbourne, J. Marshall, A. Nunn, S. Opal, *Crit. Care Med.* **2001**, *29*, 880.
- [53] P. E. Simms, T. M. Ellis, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1996**, *3*, 301.
- [54] J. M. Harris, R. B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 214.
- [55] P. Caliceti, F. Veronese, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 1261.
- [56] F. M. Veronese, G. Pasut, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1451.
- [57] H. Schellekens, W. E. Hennink, V. Brinks, *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 1729.
- [58] T. L. Cheng, P. Y. Wu, W. Ming-Fang, J. W. Chen, S. R. Roffler, *Bioconj. Chem.* **1999**, *10*, 520.
- [59] J. K. Armstrong, G. Hempel, S. Koling, L. S. Chan, T. Fisher, H. S. Meiselman, G. Garratty, *Cancer* **2007**, *110*, 103.
- [60] S. Jugminder, J. S. Chawla, M. M. Amiji, *AAPS Pharm. Sci.* **2003**, *5*, E3.