

Síntesis enantioselectivas catalizadas por lipasas microbianas

Dr. Miguel Arroyo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Universidad Complutense de Madrid

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas por la Naturaleza, cuya función es catalizar la hidrólisis reversible de los triacilglicéridos para originar ácidos grasos y glicerol (Figura 1). En concreto,



las lipasas microbianas han recibido una atención especial debido a sus numerosas aplicaciones, las cuales aparecen recogidas en diversos artículos y monografías (1-8). Las razones del enorme potencial biotecnológico de las lipasas son su gran estabilidad en disolventes orgánicos; no requieren cofactores; tienen una amplia especificidad de sustrato; y presentan una elevada enantioselectividad. La Tabla 1 recoge aquellas lipasas comerciales que se emplean con más frecuencia en fines biotecnológicos. Muchas de estas lipasas han sido purificadas y secuenciadas (9), y su estructura tridimensional está disponible en el Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). Estas estructuras, a pesar de que poseen diferentes secuencias de aminoácidos y difieren en tamaño (22-60 KDa), se pliegan de una forma similar y poseen centros activos parecidos. El plegamiento de todas estas lipasas se corresponde al modelo α/β hidrolasa en el que es característico un núcleo de láminas β (en su mayoría dispuestas paralelamente) rodeadas por α -

hélices (10). Este plegamiento incluye la triada catalítica típica de las lipasas (serina, histidina y glutámico o aspártico), así como un hueco donde encaja un oxianión. La acción catalítica de las lipasas se divide en dos etapas (Figura 2). En solución acuosa, un segmento

helicoidal de la cadena proteica denominado "tapadera" cubre el centro activo de la lipasa. En presencia de una interfase o en un medio orgánico la tapadera se abre, exponiendo la entrada al centro activo y favoreciendo la interacción de la enzima con el sustrato (11). El sustrato se sitúa en el centro activo de la lipasa de tal manera que el carbono carbonílico del enlace éster toma contacto con el grupo -OH de la

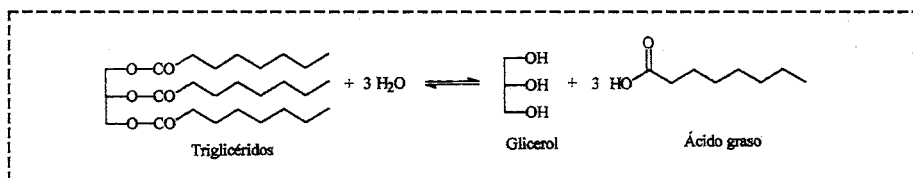


Figura 1. Función biológica de las lipasas: la hidrólisis de triglicéridos.

TABLA I. EJEMPLOS DE ALGUNAS DE LAS LIPASAS MAS UTILIZADAS EN BIOTECNOLOGIA.

Lipasa de...	Peso (kDa)	Código en PDB ^a	Especificidad	Laboratorio suministrador
<i>Rhizomucor miebei</i>	30	3TGL	<i>sn</i> -1,3	Amano, Novo Nordisk
<i>Geotrichum candidum</i>	60	1THG	<i>cis</i> - Δ^9	Sigma, Novo Nordisk
<i>Candida rugosa</i> ^b	60	1CRL	No específica	Sigma, Amano, Fluka
<i>Pseudomonas glumae</i>	33	1TAH	No específica	Amano, Fluka
<i>Humicola lanuginosa</i> ^d	30	1TIB	No específica	Amano, Novo Nordisk
<i>Burkholderia cepacia</i> ^e	33	3LIP	No específica	Amano, Fluka
<i>Candida antarctica</i> (B)	60	1TCA	<i>sn</i> -1,3	Novo Nordisk, Fluka
<i>Rhizopus delemar</i> ^f	41	1TIC	<i>sn</i> -1,3	Sigma, Roche, Fluka

^a Código de la estructura en el Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, Upton, Nueva York.

^b Microorganismo denominado anteriormente como *Candida cylindracea*, capaz de producir al menos 5 isoformas de la enzima.

^c Microorganismo denominado actualmente como *Burkholderia glumae*; la lipasa que produce es idéntica a la lipasa de *Chromobacterium viscosum*.

^d Denominado actualmente como *Thermomyces lanuginosus*.

^e Denominado anteriormente como *Pseudomonas cepacia*.

^f Las lipasas producidas por *R. delemar*, *R. arrizus*, *R. oryzae* y *R. niveus* son estructuralmente idénticas.

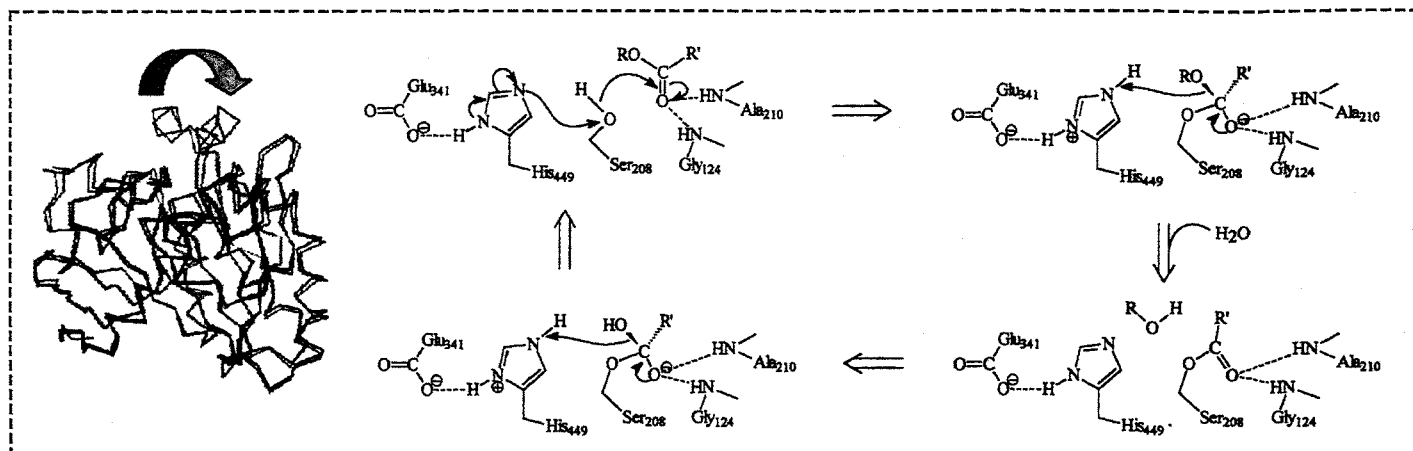


Figura 2. Apertura de la tapadera que descubre el centro activo y mecanismo de acción de las lipasas. La numeración de los aminoácidos corresponde a la lipasa de *Candida rugosa*.

serina. El protón del grupo hidroxilo de la serina se transfiere al Nε de la histidina de la triada catalítica y el Oγ con carga negativa ataca nucleofílicamente al grupo carbonilo del sustrato con lo que se produce un intermedio tetraédrico (Td1). La carga negativa, en un principio situada en el Oγ de la serina, sufre una translocación hacia el oxígeno del grupo carbonilo, originando un oxianión. Este oxianión encaja en un hueco que se forma tras la apertura de la tapadera. El intermedio tetraédrico se rompe cuando el protón cedido a la histidina se transfiere al oxígeno de alcohol. El alcohol se libera y seguidamente se forma el complejo acil-enzima. Se produce un segundo ataque nucleofílico, esta vez de una molécula de agua sobre el carbono carbonílico del complejo acil-enzima. Se forma un nuevo intermedio tetraédrico (Td2) que, a continuación se rompe, liberando un ácido graso y regenerando el -OH de la serina. La función del ácido glutámico o aspártico, presente en la triada catalítica, es la estabilización de la carga positiva generada sobre la histidina en los intermedios tetraédricos.

LAS LIPASAS COMO BIOCATALIZADORES EN SINTESIS ORGANICA

Las lipasas han resultado ser unos biocatalizadores de gran interés en síntesis orgánica por diversas razones. Debido a que poseen unos dominios

proteicos grandes para el reconocimiento de los grupos acilo de los triglicéridos, estas enzimas pueden acomodar muchos sustratos diferentes (son poco específicas) sin que, por ello, pierdan su capacidad de reconocer centros quirales. Por otro lado, las lipasas han desarrollado una estructura estable al efecto desnaturizante que ejercen las interfases donde actúan y, por este motivo son también estables en los disolventes orgánicos.

En un medio acuoso, el intermedio tetraédrico se hidroliza inmediatamente, regenerando la enzima y liberando el ácido (Figura 2). Si el medio está constituido por un disolvente orgánico, otro nucleófilo diferente al agua, puede atacar al intermedio acil-enzima con lo que se produce una reacción de síntesis. De este modo, las lipasas pueden catalizar una gran variedad de reacciones como esterificaciones, transesterificaciones, tiotransesterificaciones, aminolisis, oximolisis, etc. Como ventaja adicional, las lipasas pueden su enantioselectividad (12) en estas condiciones.

ENANTIOSELECTIVIDAD DE LAS LIPASAS

Todas las reacciones enantioselectivas se basan en la formación de un complejo diastereoisomérico entre el reactivo quiral y la enzima, donde la energía del estado de transición del complejo (ΔG^{\ddagger}) con un isómero y otro es diferente. Si los dos enantióme-

ros 1 y 2 compiten por el centro activo de la enzima y se cumplen las exigencias de la teoría del estado estacionario postuladas por Michaelis-Menten, la "relación de enantioselectividad" o "factor bioquímico de estereoselectividad" (E) se puede definir como la relación existente entre las velocidades de reacción de los dos isómeros. Por tanto, también están relacionados con los parámetros v_{\max} y k_m de cada uno de ellos (Ecuación 1).

$$E = \frac{V_1}{V_2} = \frac{(V_{\max} / K_m)_1}{(V_{\max} / K_m)_2} \quad [1]$$

En vez de determinar todos estos parámetros, característicos de las reacciones correspondientes a cada uno de los enantiómeros, es más sencillo acudir a la expresión matemática propuesta por Sih, que relaciona el valor de E con la conversión (c) y el exceso enantiomérico del sustrato (ees) o del producto (eep), parámetros que resultan más fáciles de determinar (13). Estas ecuaciones han sido ampliamente empleadas en reacciones irreversibles (Ecuaciones 2 y 3).

$$E = \frac{\ln [(1-c) (1-ee_s)]}{\ln [(1-c) (1+ee_s)]} \quad [2]$$

$$E = \frac{\ln [1-c (1+ee_p)]}{\ln [1-c (1-ee_p)]} \quad [3]$$

Las lipasas microbianas han demostrado su utilidad en la resolución de mezclas racémicas de ésteres, ácidos carboxílicos y alcoholes (14-16). La hidrólisis enantioselectiva de ésteres y alcoholes acetilados se realiza en medio acuoso (Figura 3) y, en algunos casos, en presencia de una pequeña proporción de disolvente orgánico miscible en agua (5-20%) con el fin de solubilizar aquellos sustratos no solubles en agua. En medios orgánicos anhidros, las lipasas son capaces de catalizar la esterificación o transesterificación enantioselectiva de ésteres a partir de mezclas racémicas (Figura 4). De la misma forma que en la hidrólisis, si la enzima es enantioespecífica, la reacción de síntesis se detiene cuando se alcanza el 50% de conversión, y como resultado se obtienen los isómeros con un 100% de exceso enantiomérico (ee). En este caso el factor de enantioselectividad (E) es superior a 100. Por ejemplo, la lipasa de la levadura *Candida rugosa* es capaz de esterificar enantioselectivamente el isómero (-) del mentol con ácido láurico en heptano, con lo que se obtiene el éster (-) con un 95% de exceso enantiomérico (17). Si la enzima no es enantioespecífica ($E < 10$), el proceso biocatalítico pierde interés. Esta es la razón que ha impulsado a la comunidad científica a mejorar la enantioselectividad de las lipasas al máximo para su posterior aplicación industrial.

Por ejemplo, la determinación de la estructura cristalina de algunas lipasas ha permitido determinar su enantioespecificidad para determinados sustratos. Por ejemplo, una regla para la resolución de alcoholes secundarios se basa en los tamaños de los subsitios del estereocentro, con lo que se puede predecir cual es el enantiómero que reacciona más rápido (18). La aplicación de determinadas técnicas que aumentan la selectividad de las enzimas ha permitido el empleo de lipasas más económicas pero con menor estereoselectividad ($E=10-20$). En muchos casos, la modificación de una o varias condiciones de la reacción ("ingeniería del medio") ha mejorado el resultado de estas resoluciones (19). Finalmente,

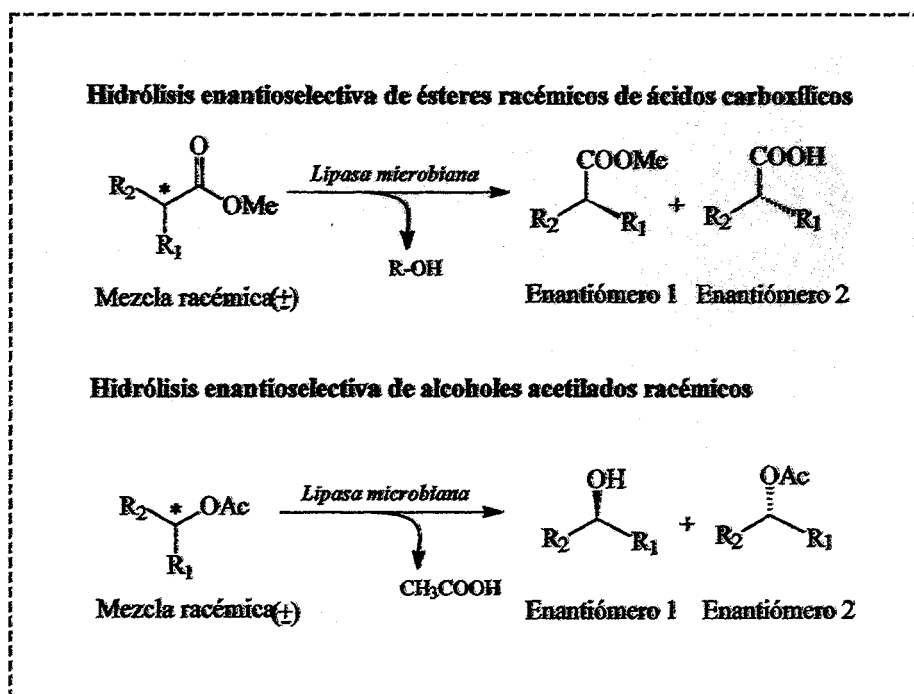


Figura 3. Resolución de racémicos mediante hidrólisis enantioselectiva catalizada por lipasas.

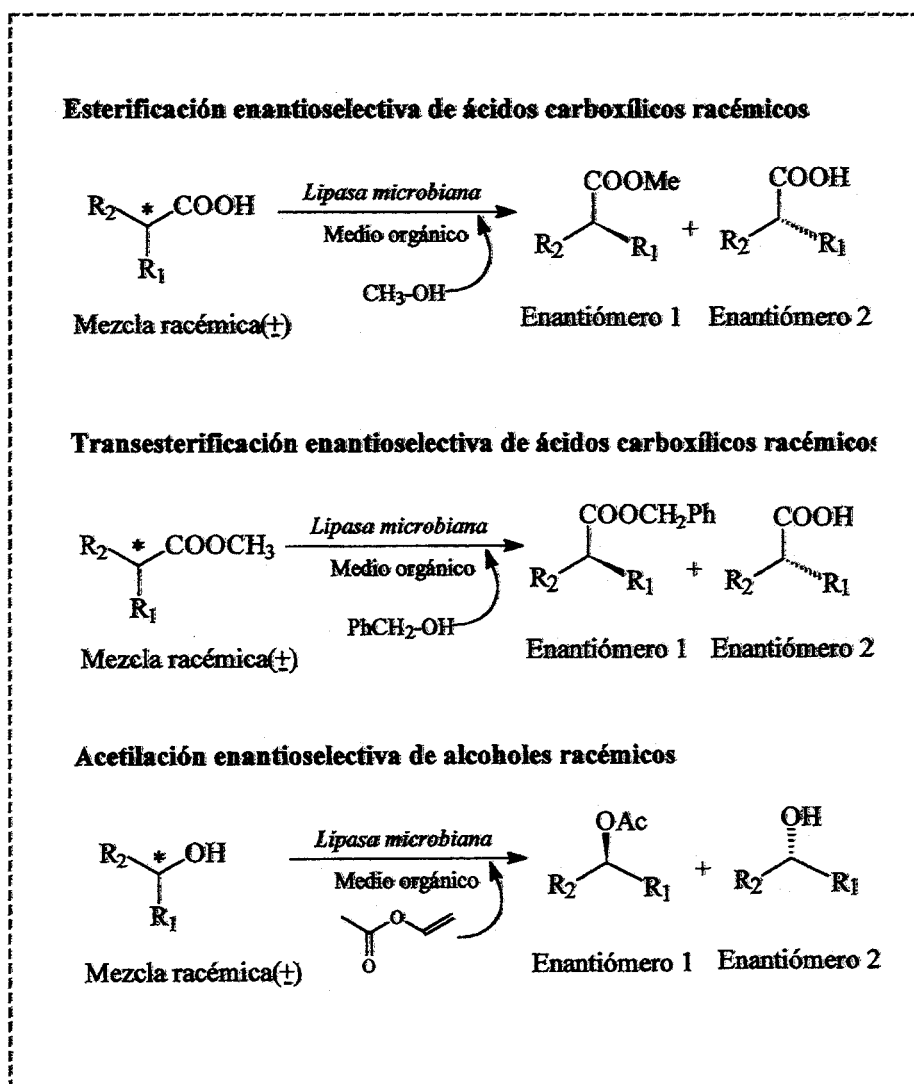


Figura 4. Resolución de racémicos mediante síntesis enantioselectiva catalizada por lipasas.

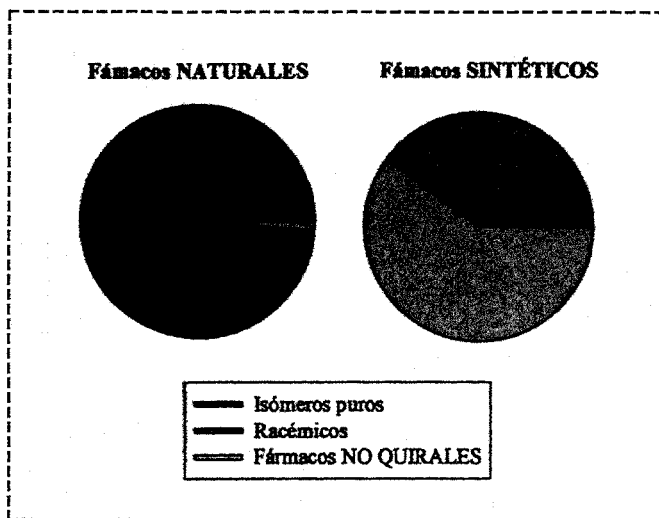


Figura 5. Quiralidad de los fármacos naturales y de síntesis (1985).

el isómero puro que interesa. En el apartado anterior, hemos visto como la enantioselectividad y la actividad de las lipasas se puede optimizar mediante diferentes estrategias. En cuanto al aprovechamiento del 50% del producto de la resolución que no interesa, se puede racemizar y someter a una nueva reacción de resolución en un proceso en continuo,

como agonistas o antagonistas de receptores. El avance en el conocimiento de los mecanismos de acción de los fármacos a nivel molecular han permitido descubrir la importancia que tiene la esteoquímica de estos compuestos en su eficacia terapéutica. En muchos casos, sólo uno de los enantiómeros del fármaco es farmacológicamente activo, mientras que el otro puede ser inactivo o tóxico. No obstante, la mayoría de los fármacos de síntesis se comercializan en la actualidad como mezclas racémicas. En 1985, el porcentaje de fármacos racémicos de síntesis era del 35,2%, mientras que la correspondiente a los fármacos constituidos por enantiómeros puros era del 4,8% (Figura 5). Estas cifras contrastan con la proporción de fármacos naturales que se comercializaban como enantiómeros puros (97%). Sin embargo, esta situación ha ido cambiando durante estos últimos años. En la actualidad se deben hacer ensayos clínicos de los isómeros de un fármaco racémico antes de su comercialización. Este hecho ha forzado a muchas compañías farmacéuticas a sintetizar isómeros puros de nuevos fármacos o, por el contrario, dedicarse a la fabricación de moléculas aquirales. La síntesis asimétrica de compuestos quirales mediante procesos biocatalizados por enzimas ha demostrado ser más interesante y rentable que la catalizada por métodos químicos (27). A continuación, se comentan algunos ejemplos de intermedios quirales que conducen a la síntesis de compuestos de interés farmacéutico (Figura 6). La aplicación de las lipasas no se reduce exclusivamente a la obtención de estos compuestos, ya que cada vez son más los ejemplos de moléculas con actividad terapéutica que se pue-

el método más novedoso para mejorar la enantioselectividad de las lipasas consiste en obtener microorganismos mutantes productores de enzimas más enantioselectivas mediante técnicas de evolución *in vitro* (20).

En la actualidad, la selección de la lipasa más adecuada para la resolución de una determinada mezcla racémica está al alcance de cualquier químico orgánico, y debido a su sencillez permite ahorrar mucho tiempo y dinero. Hay laboratorios que suministran kits con lipasas de diferentes microorganismos y se puede comprobar cual presenta mejores resultados en la resolución de ésteres, alcoholes o ácidos carboxílicos. Como ejemplos tenemos los kits ChiroScreen® de Altus Biologics (<http://www.altus.com>) y Chirazyme® Screening Set de Roche (<http://www.roche.com>).

con lo que se aprovecharía el 100% del sustrato de partida. Por otra parte, el aumento en la estabilidad y reciclado de las lipasas se puede conseguir tras su inmovilización. Los métodos de inmovilización de lipasas que más han mejorado su actividad y estabilidad enzimática en los medios orgánicos son: el atrapamiento en geles de sílice (sol-gel) (24); la formación de cristales reticulados de enzima (CLEC) (25) y el recubrimiento con lípidos (26). Por todos estos motivos, cada vez será mayor el número de procesos industriales de obtención de compuestos enantioméricamente puros que introduzcan lipasas en su ruta de síntesis.

EN LA ACTUALIDAD, LA SELECCION DE LA LIPASA MAS ADECUADA PARA LA RESOLUCION DE UNA DETERMINADA MEZCLA RACÉMICA ESTA AL ALCANCE DE CUALQUIER QUIMICO ORGANICO, Y DEBIDO A SU SENCILLEZ PERMITE AHORRAR MUCHO TIEMPO Y DINERO.

APLICACION INDUSTRIAL DE LAS LIPASAS MICROBIANAS

A pesar del gran número de publicaciones dedicadas al uso de lipasas en la resolución de mezclas racémicas (21-23), los procesos industriales basados en esta tecnología son muy reducidos. Las razones principales de este hecho son la poca actividad y enantioselectividad de las lipasas empleadas, la dificultad que supone su reciclado y el hecho de que el 50% del producto debe ser eliminado una vez obtenido

SINTESIS QUIRAL DE COMPUESTOS DE INTERÉS FARMACÉUTICO CATALIZADA POR LIPASAS

Actualmente, uno de los principales objetivos de la Industria Farmacéutica es la búsqueda de compuestos que actúen como inhibidores enzimáticos muy selectivos, o que se comporten

como agonistas o antagonistas de receptores. El avance en el conocimiento de los mecanismos de acción de los fármacos a nivel molecular han permitido descubrir la importancia que tiene la esteoquímica de estos compuestos en su eficacia terapéutica. En muchos casos, sólo uno de los enantiómeros del fármaco es farmacológicamente activo, mientras que el otro puede ser inactivo o tóxico. No obstante, la mayoría de los fármacos de síntesis se comercializan en la actualidad como mezclas racémicas. En 1985, el porcentaje de fármacos racémicos de síntesis era del 35,2%, mientras que la correspondiente a los fármacos constituidos por enantiómeros puros era del 4,8% (Figura 5). Estas cifras contrastan con la proporción de fármacos naturales que se comercializaban como enantiómeros puros (97%). Sin embargo, esta situación ha ido cambiando durante estos últimos años. En la actualidad se deben hacer ensayos clínicos de los isómeros de un fármaco racémico antes de su comercialización. Este hecho ha forzado a muchas compañías farmacéuticas a sintetizar isómeros puros de nuevos fármacos o, por el contrario, dedicarse a la fabricación de moléculas aquirales. La síntesis asimétrica de compuestos quirales mediante procesos biocatalizados por enzimas ha demostrado ser más interesante y rentable que la catalizada por métodos químicos (27). A continuación, se comentan algunos ejemplos de intermedios quirales que conducen a la síntesis de compuestos de interés farmacéutico (Figura 6). La aplicación de las lipasas no se reduce exclusivamente a la obtención de estos compuestos, ya que cada vez son más los ejemplos de moléculas con actividad terapéutica que se pue-

Actualmente, uno de los principales objetivos de la Industria Farmacéutica es la búsqueda de compuestos que actúen como inhibidores enzimáticos muy selectivos, o que se comporten

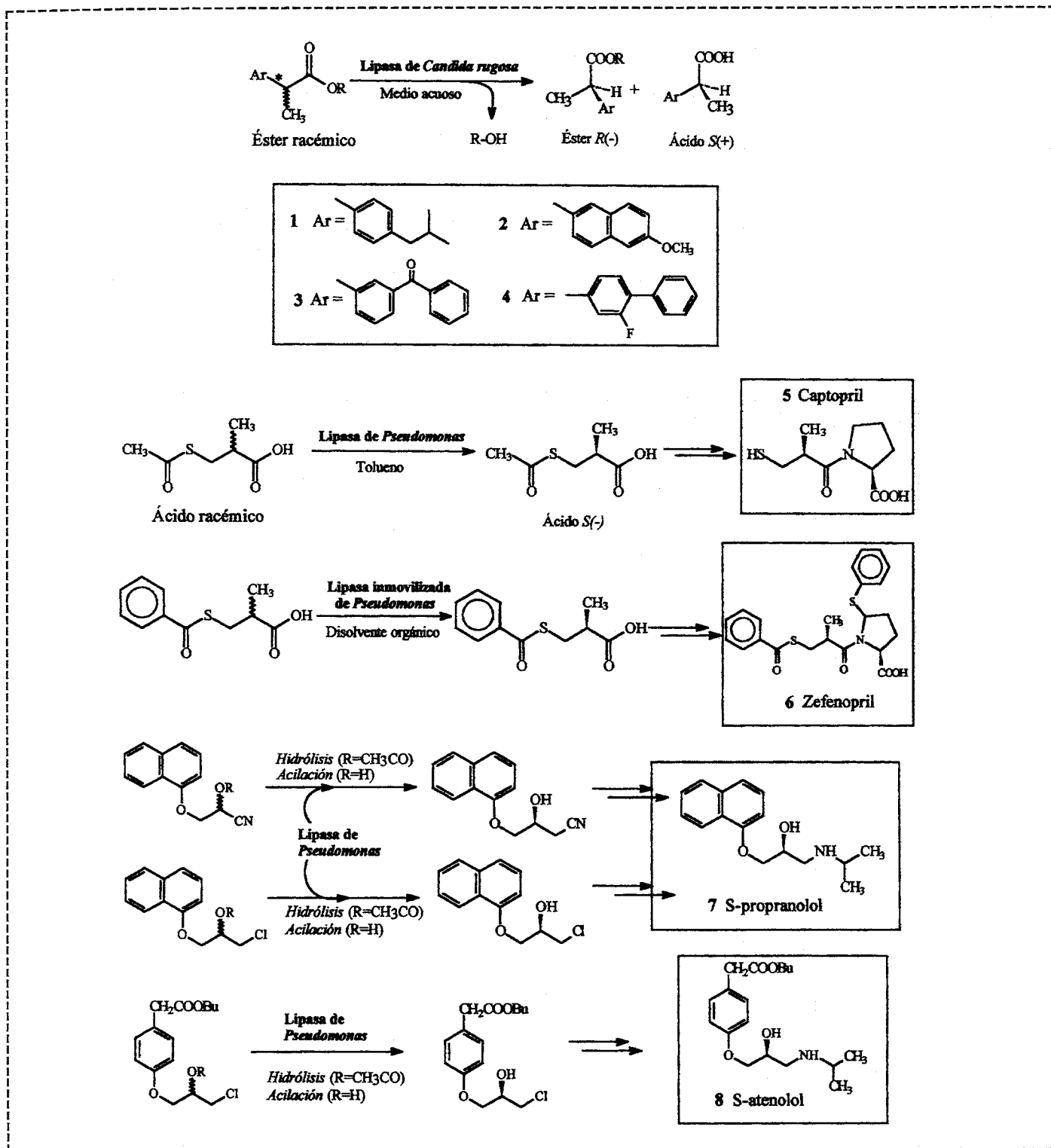


Figura 6. Resolución de compuestos de interés farmacéutico catalizada por lipasas.

den sintetizar con la ayuda de estos biocatalizadores.

1. Obtención de antiinflamatorios no esteroídicos

Los ácidos 2-aryl propiónicos como el ibuprofeno (1), naproxeno (2),

ketoprofeno (3) y el flurbiprofeno (4) son compuestos de uso muy común, cuya actividad antiinflamatoria reside en el isómero S. La resolución enzimática de las mezclas racémicas de estos ácidos se realiza mediante el empleo de lipasas microbianas. Los enantiómeros puros de estos antiinflamatorios no esteroídicos se han sinte-

tizado mediante la hidrólisis enantioselectiva de sus ésteres racémicos en medio acuoso. En la actualidad, se pueden adquirir cristales reticulados de la lipasa de *Candida rugosa* (ChiroCLEC®-CR), que resultan ser unos biocatalizadores muy estables y eficientes en la resolución de estos ésteres racémicos (28).

2. Obtención de antibipertensivos

Los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) son compuestos ampliamente utilizados en el tratamiento de la hipertensión. Un ejemplo de molécula de este tipo es el captopril (**5**), cuya eficacia como inhibidor depende de la configuración estereoquímica de su cadena

lateral, de tal manera que el isómero S es 100 veces más potente que el enantiómero R. Algunas lipasas han resultado ser muy eficaces en la síntesis enantioespecífica de la cadena lateral del captopril y de otros nuevos inhibidores de la ECA como el zefenopril (**6**) (29).

Los antagonistas de los receptores β -adrenérgicos o β -bloqueantes se emplean en el tratamiento de la hiper-

tensión, la angina de pecho y las arritmias cardíacas. Todos estos compuestos tienen una estructura básica de ariloxipropanolamina con un centro quiral, siendo el isómero S el responsable de la actividad terapéutica. En la actualidad, la síntesis del (S)-propranolol (**7**) y el (S)-atenolol (**8**) se basa en la hidrólisis enantioespecífica del éster racémico catalizada por lipasas (30,31).



BIBLIOGRAFÍA

- Rubin, B. y Dennis, E.A., eds. *Methods in Enzymology: Lipases, Part A: Biotecnology*. Vol. 284, Academic Press, 1997.
- Rubin, B. y Dennis, E.A., eds. *Methods in Enzymology: Lipases, Part B: Enzyme Characterization and Utilization*. Vol. 286, Academic Press, 1997.
- Kazlauskas, R.J. y Bornscheuer, U.T. *Biotechnology: Biotransformations with Lipases*. Vol. 8. (Rhem, H.J. et al., eds.). pp. 37-191, VCH, 1998.
- Malcara, F.X., ed. Nato ASI Ser., Ser. E: *Engineering of Lipases*. Vol. 317. Kluwer, 1996.
- Godfrey, T. y West, S., eds. *Industrial Enzymology*. 2ª ed. Macmillan Press, 1996.
- Wooley, P. y Petersen, S.B., eds. *Lipases: Their structure, biochemistry and application*, Cambridge University Press, 1994.
- Schmid, R.D. y Verger, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 1608.
- Jaeger, K.E. y Reetz, M.T. *Trends Biotechnol.* 1998, 16, 396.
- Cygler, M. y Schrag, J.D. *Methods Enzymol.* 1997, 284, 3.
- Ollis, D.L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S.M.; Harel, M.; Remington, S.J.; Silman, I.; Schrag, J.D.; Sussman, J.L.; Verscheuren, K.H.G. y Goldman, A., *Prot. Eng.* 1992, 5, 197.
- Verger, R. *Trends Biotechnol.* 1997, 15, 32.
- Zaks, A. y Klivanov, A.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82, 3192.
- Chen, C.-S., Sih, C.J. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1989, 28, 695.
- Whitesides, G.M. y Wong, C.H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1985, 24, 617.
- Jones, J.B. *Tetrahedron* 1986, 42, 3351.
- Yamada, H. y Shimizu, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1988, 27, 622.
- Lagrand, G.; Baratti, J.; Buono, G.; Triantaphylides, C. *Tetrahedron Lett.* 1986, 27, 29.
- Kazlauskas, R.J. *Trends Biotechnol.* 1994, 12, 464.
- Carrea, G.; Ottolina, G. y Riva, S. *Trends Biotechnol.* 1995, 13, 63.
- Reetz, M.T.; Zonra, A.; Schimossek, K.; Liebeton, K. y Jaeger, K.E. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1997, 36, 2830.
- Drauz, K. y Waldmann, H. (eds.) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, 1995.
- Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3rd ed., Springer, 1997.
- Wong, C.H. y Whitesides, G.M. *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, 1994.
- Jaeger, K.E. *Trends Biotechnol.* 1998, 16, 396.
- Margolin, A.L. *Trends Biotechnol.* 1996, 14, 223.
- Okahata, Y. y Mori, T. *Trends Biotechnol.* 1997, 15, 50.
- Margolin, A.L. *Enzyme Microb. Technol.* 1993, 15, 266.
- Lalonde, J.J.; Govardhan, C.; Khalaf, N.; Martínez, A.G.; Visuri, K. y Margolin, A.L. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 6845.
- Patel, R.N.; McNamee, C.G.; Banerjee, A.; Howell, J.M.; Robinson, R.S. y Szarka, L.J. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1992, 16, 34.
- Bevinakatti, H.S. y Banerji, A.A. *J. Org. Chem.* 1991, 56, 5372.
- Bevinakatti, H.S. y Banerji, A.A. *J. Org. Chem.* 1992, 57, 6003.