



LE CHETOREDUTTASI: BIOCATALIZZATORI EFFICIENTI PER LA SINTESI DI ALCOLI CHIRALI

La biocatalisi rappresenta oggi un approccio sostenibile di notevole interesse industriale per la produzione di intermedi farmaceutici. In questo articolo, analizzando la letteratura scientifica degli ultimi anni, viene descritto l'impiego delle chetoreduttasi nella riduzione enantioselettiva di chetoni prochirali, con un focus particolare sull'uso di questi enzimi in forma immobilizzata.

Introduzione

La chiralità riveste un ruolo fondamentale nell'ambito della produzione di molecole biologicamente attive per applicazioni farmaceutiche. La purezza enantiomerica dei farmaci è, infatti, un fattore critico che può influire sull'efficacia e sulla sicurezza di una terapia. È noto che le molecole chirali possono esistere in forme enantiomeriche che possono interagire in modo diverso con i recettori biologici e questo può avere conseguenze significative sulla loro attività biologica [1]. In alcuni casi, ad esempio, uno dei due enantiomeri di un farmaco può possedere l'attività terapeutica desiderata, mentre l'altro può causare effetti collaterali indesiderati o addirittura essere inattivo. Oggi, più del 50% dei farmaci in commercio è costituito da molecole chirali [2]. Pertanto, la capacità di ottenere enantiomeri puri è diventata di fondamentale importanza per l'industria farmaceutica. Metodi di sintesi selettivi che consentono la produzione di singoli enantiomeri sono diventati essenziali per garantire la sicurezza e l'efficacia dei farmaci. Per soddisfare la crescente richiesta di farmaci enantiomericamente puri, sono stati sviluppati processi sia chemocatalitici che biocatalitici che permettono l'ottenimento di importanti intermedi chirali [1].

Gli alcoli enantiopuri, in quanto sintoni chirali, rivestono un'importanza significativa nel contesto della

sintesi di un grande numero di composti biologicamente attivi tra cui composti naturali, prodotti agrochimici e intermedi farmaceutici. Queste molecole possono essere impiegate come precursori di molecole chirali in quanto possono essere facilmente convertite nei corrispondenti epossidi o in altri intermedi utili per la sintesi di composti della chimica fine. Le chetoreduttasi (KRED), conosciute anche come alcoldeidrogenasi (ADH), si sono dimostrate biocatalizzatori molto efficienti nella riduzione enantioselettiva di chetoni per l'ottenimento di alcoli chirali [3]. Ad oggi, molte chetoreduttasi sono disponibili sul mercato e la loro efficacia è stata dimostrata anche su scala industriale.

Questi enzimi, appartenenti alla classe degli enzimi redox, catalizzano la riduzione di composti carbonilici grazie al trasferimento di un idruro da un cofattore nicotinammidico, come NADH o NADPH, al substrato. Il processo inizia con l'instaurarsi di interazioni elettrostatiche e idrofobiche tra il sito attivo dell'enzima e il substrato. Il gruppo chinolinico del cofattore si lega all'enzima e successivamente un idruro si aggiunge al gruppo carbonilico del chetone con formazione dell'alcol corrispondente. Il prodotto di reazione ed il cofattore vengono quindi rilasciati nell'ambiente di reazione [4]. Nella reazione il cofattore subisce un processo di ossidazione come illustrato nella Fig. 1. A seconda dell'orientamento

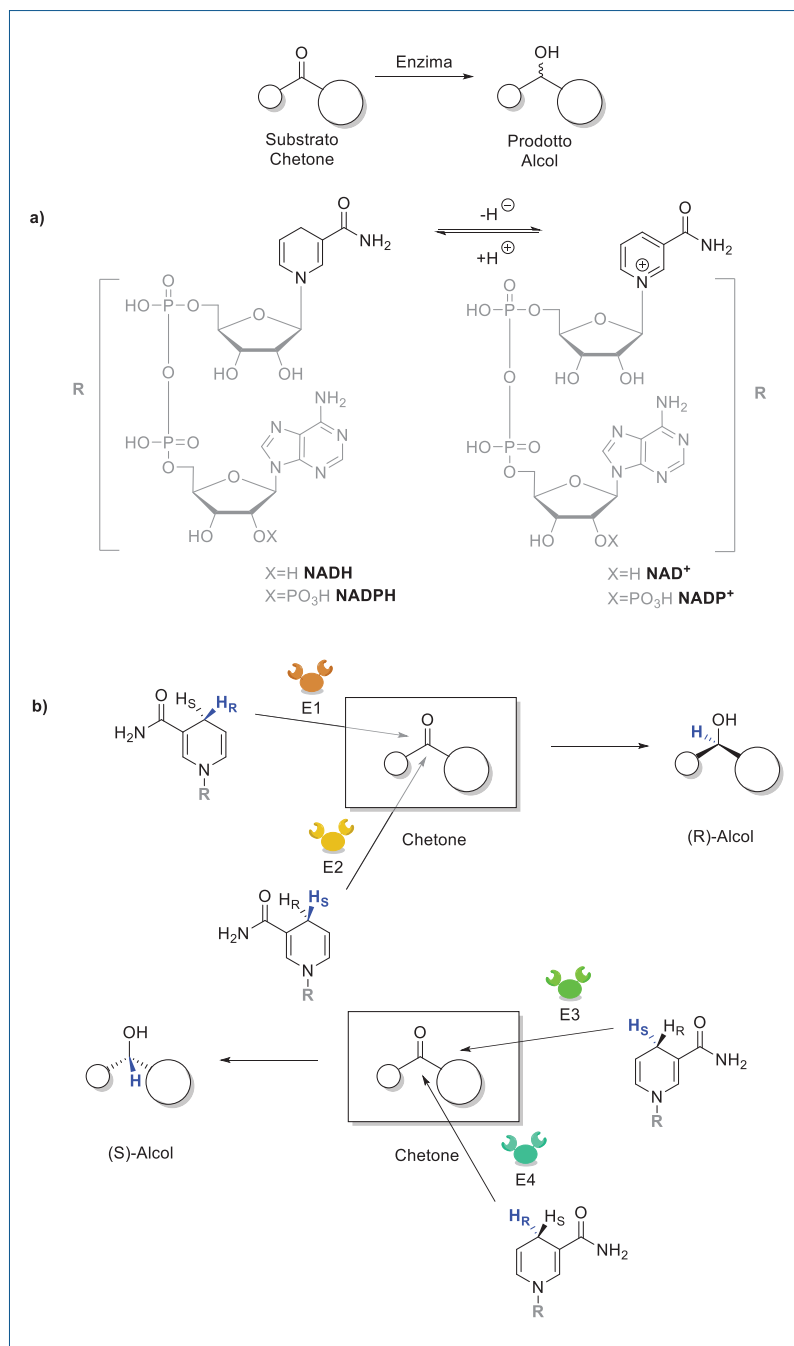


Fig. 1 - Riduzione enantioselettiva di chetoni catalizzata da chetoreduttasi: a) struttura e chimica redox del cofattore NAD(P)H; b) possibile decorso stereochimico del trasferimento di idruo dal cofattore NAD(P)H al chetone

relativo del substrato e dell'enzima, l'idruo può attaccare il gruppo carbonilico sia sulla faccia si che sulla faccia re, generando alcoli con configurazione (R) e (S) rispettivamente [5].

I cofattori nicotinamidici NADH o NADPH sono molecole costose e pertanto non possono essere

usate in quantità stechiometrica per scopi applicativi. Sono stati quindi messi a punto metodi efficienti per la loro rigenerazione *in situ* che ne consentono l'impiego in quantità catalitica. Le strategie che possono essere utilizzate sono due, come evidenziato nella Fig. 2.

La prima strategia coinvolge l'utilizzo di un co-substrato che può essere ossidato dallo stesso enzima impiegato nella reazione di riduzione d'interesse. L'ossidazione del co-substrato è accompagnata dalla riduzione del cofattore che viene quindi rigenerato nella sua forma originaria e reso disponibile per un nuovo ciclo catalitico (Fig. 2a). Se il co-substrato viene utilizzato in eccesso, può favorire lo spostamento dell'equilibrio della reazione nella direzione desiderata. Questo metodo è noto come "approccio del substrato accoppiato" ed è ampiamente adottato nelle riduzioni biocatalitiche [6]. Uno dei co-substrati più comunemente utilizzati è il 2-propanolo (*i*PrOH) che genera come co-prodotto l'acetone, facilmente rimosibile dalla miscela di reazione grazie alla sua volatilità. Un ulteriore vantaggio derivante dall'utilizzo di questo composto è la sua capacità di agire anche da co-solvente, favorendo così la reazione in presenza di substrati poco solubili in ambiente acquoso.

La seconda strategia, conosciuta come "approccio dell'enzima accoppiato", prevede l'impiego di un secondo enzima che permette la rigenerazione del cofattore attraverso l'ossidazione di un substrato specifico per questo enzima (Fig. 2b). La glucosio deidrogenasi (GDH) e la formiato deidrogenasi (FDH) sono due degli enzimi più comunemente utilizzati per tale scopo grazie alla loro capacità di convertire rispettivamente il glucosio in acido gluconico e il formiato in CO₂ in modo irreversibile [3]. Il processo di ossidazione del substrato specifico per l'enzima selezionato è accompagnato dalla riduzione del cofattore che viene quindi rigenerato e reso disponibile per un nuovo ciclo catalitico.

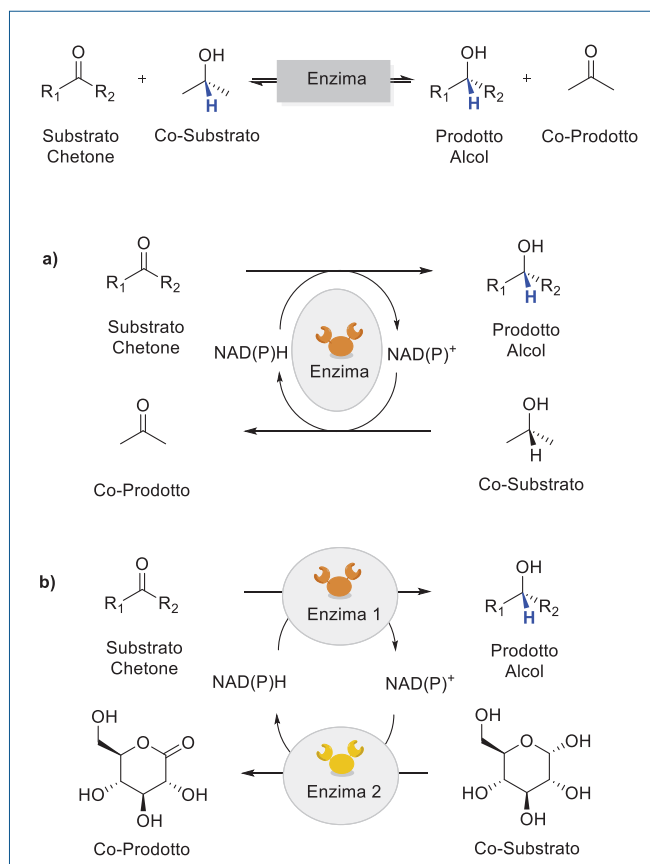


Fig. 2 - Possibili strategie di rigenerazione del cofattore: a) approccio del substrato accoppiato; b) approccio dell'enzima accoppiato

Negli ultimi anni sono apparse in letteratura molte applicazioni della riduzione enantioselettiva catalizzate da chetoreduttasi su diverse classi di composti carbonilici (ad esempio chetoni ciclici, eterociclici, alifatici, aromatici, clorochetoni ecc.) [3]. In particolare, i nuovi metodi di ingegnerizzazione proteica, la bioinformatica e le moderne tecnologie di biologia molecolare hanno consentito lo sviluppo delle biotrasformazioni mediante riduzione catalizzata da chetoreduttasi come strumento importante per la produzione industriale di alcoli chirali [3]. Alcune delle importanti molecole ottenute mediante riduzione biocatalizzata su scala industriale sono riportate in Fig. 3.

Immobilizzazione degli enzimi chetoreduttasi

Nell'ambito della letteratura scientifica riguardante le chetoreduttasi, l'immobilizzazione ha suscitato un ampio interesse. Lo scopo fondamentale di questa tecnica è quello di migliorare la stabilità e l'efficienza catalitica del biocatalizzatore in condizioni non naturali ma spesso riscontrate in processi industriali (es. elevate concentrazioni di substrato, presenza di solvente organico, temperature elevate). Gli enzimi immobilizzati offrono inoltre il vantaggio di poter essere facilmente separati dalle miscele di reazione e riutilizzati per cicli successivi di reazione.

Esistono numerose tecniche di immobilizzazione, che possono essere suddivise principalmente in

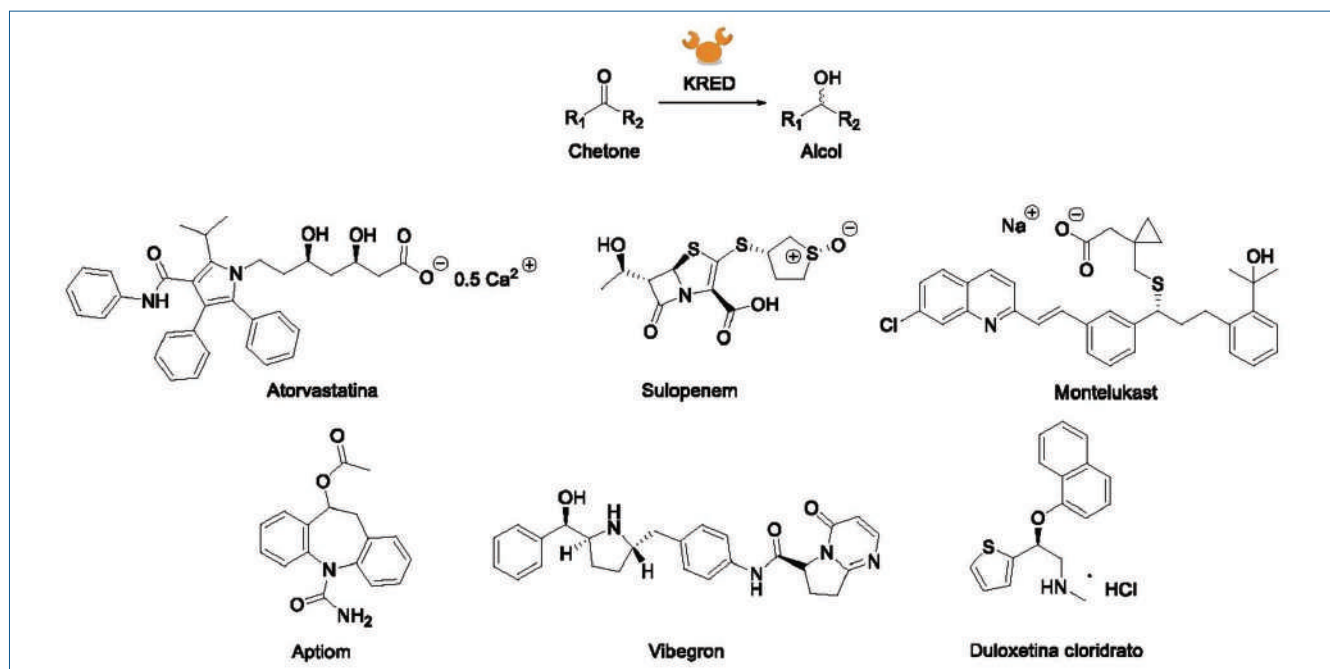


Fig. 3 - Composti farmaceutici sintetizzati a partire da chetoni prochirali mediante chetoreduttasi

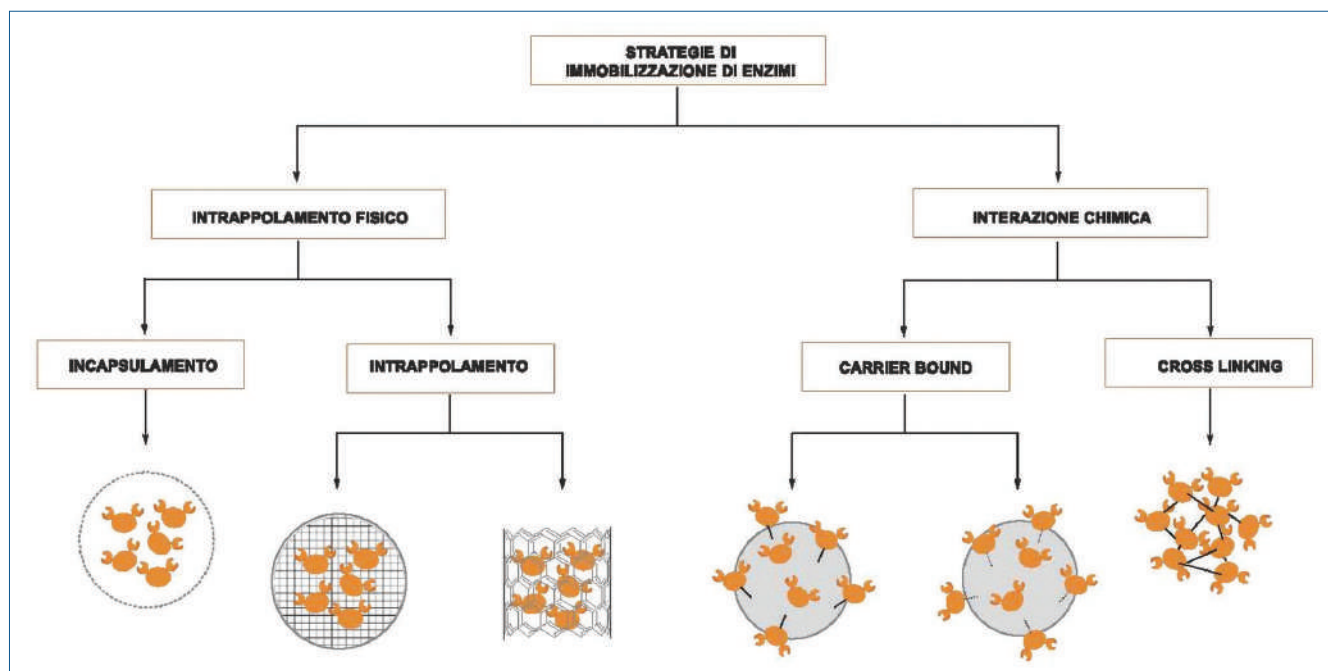


Fig. 4 - Metodi di immobilizzazione di enzimi

metodi basati sull'intrappolamento fisico e metodi basati su interazioni chimiche (Fig. 4) [7]. Per l'immobilizzazione di enzimi isolati i metodi che prevedono interazioni chimiche sono generalmente preferiti [8]. In particolare, il legame covalente dell'enzima con un supporto solido insolubile nell'ambiente di reazione permette la preparazione di biocatalizzatori eterogenei stabili per la reazione di interesse. Questo approccio rende più semplice il recupero dell'enzima ed il suo eventuale riutilizzo in cicli successivi. L'efficienza di tale processo dipende dal tipo di supporto utilizzato e dalle interazioni stabilite fra l'enzima e il supporto. Per assicurare un'elevata attività enzimatica del biocatalizzatore immobilizzato, è fondamentale evitare, nella formazione dei legami con il supporto, il coinvolgimento dei residui di amminoacidi necessari alla catalisi. Ad oggi sono disponibili una vasta gamma di supporti per questo metodo di immobilizzazione e la scelta del supporto più appropriato dipende dalle specifiche proprietà del catalizzatore e dall'applicazione prevista [8].

Le chetoreduccasi sono state ancorate mediante legami covalenti su una vasta gamma di supporti, tra cui agarosio, nanoparticelle magnetiche, nanoparticelle di silice rivestite di polianilina e resine polimeriche organiche [3].

La reticolazione diretta degli enzimi, sia attraverso la formazione di cristalli enzimatici reticolati (*Cross*

Linked Enzyme Crystals, CLECs) che di aggregati enzimatici reticolati (*Cross Linked Enzyme Aggregates*, CLEAs) consente di sviluppare biocatalizzatori eterogenei senza la necessità di utilizzare un supporto prefabbricato, rendendo così il processo di immobilizzazione più economico [7]. Questo approccio implica la formazione di legami covalenti fra le molecole di enzima mediante l'utilizzo di un agente reticolante, spesso costituito da una dialdeide che può reagire con i gruppi $-NH_2$ presenti sull'enzima. Le strutture ottenute risultano insolubili per l'aumento del peso molecolare; esse, inoltre, essendo prive di supporto, presentano un'attività enzimatica molto concentrata. L'impiego di un agente reticolante può essere esteso anche a campioni di enzimi immobilizzati su supporti per bloccarli nella conformazione reattiva e prevenirne il rilascio.

Ad oggi, sono stati riportati vari esempi di immobilizzazione delle KRED mediante formazione di CLEAs [3]. In alternativa, gli enzimi possono essere confinati all'interno di matrici sia polimeriche che inorganiche, sviluppate per permettere il passaggio del substrato e del prodotto attraverso la loro struttura tridimensionale. In questo metodo di immobilizzazione il supporto non è prefabbricato ma è preparato in presenza dell'enzima, permettendo così il suo intrappolamento all'interno della matrice tridimensionale appositamente creata [8].

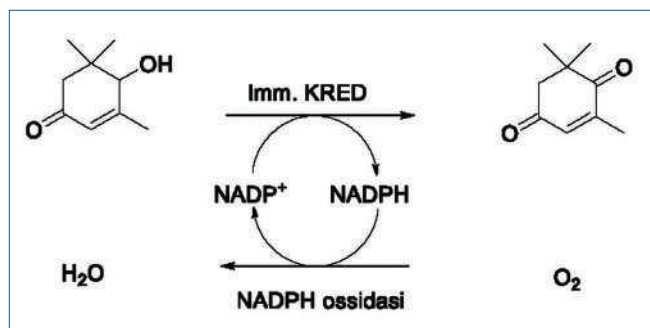


Fig. 5 - Sintesi del 4-oxoisoforone catalizzata da chetoreduttasi immobilizzata su supporti funzionalizzati

Uso di chetoreduttasi immobilizzate per la sintesi di intermedi di APIs

Alcuni contributi della letteratura scientifica degli ultimi anni che documentano l'utilizzo di KRED immobilizzate per la sintesi di intermedi di APIs (*Active Pharmaceutical Ingredients*) sono di seguito illustrati. Recentemente è stato riportato lo studio dell'immobilizzazione di una chetoreduttasi su 17 diversi supporti derivatizzati con vari gruppi funzionali [9]. I migliori risultati in termini di resa di immobilizzazione e recupero di attività sono stati ottenuti con un supporto a base di agarosio funzionalizzato con gruppi epossidici. La KRED immobilizzata su questo supporto è stata impiegata per la preparazione del 4-oxoisoforone, un intermedio chiave per la sintesi di carotenoidi e della vitamina E (Fig. 5).

Il biocatalizzatore è stato efficacemente riutilizzato in 4 cicli di reazione consecutivi (96 ore di funzionamento totali), fornendo una resa elevata di prodotto per grammo di enzima, con un aumento del rendimento di 2,5 volte rispetto a quanto ottenuto con enzimi solubili.

Un intermedio chiave per la produzione del farmaco Atazanavir è stato ottenuto mediante l'impiego di una KRED immobilizzata tramite la formazione di

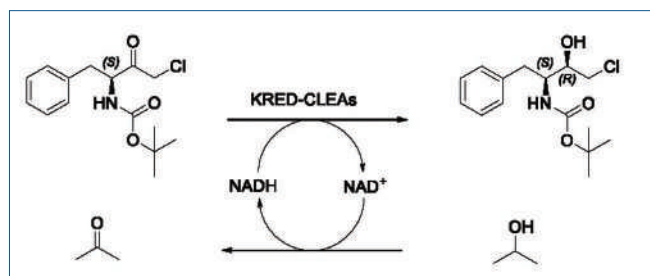


Fig. 6 - Sintesi del (2R,3S)-N-tert-butossicarbonil-3-ammino-1-cloro-2-idrossi-4-fenilbutano catalizzata da chetoreduttasi immobilizzata mediante formazione di CLEAs

CLEAs, utilizzando glutaraldeide come agente reticolante in presenza del tensioattivo non ionico (Fig. 6) [10]. Il biocatalizzatore ottenuto ha dimostrato una resistenza maggiore ai solventi organici, al pH e alla temperatura rispetto all'enzima libero. Nel corso dello studio, è stata ottenuta la completa conversione del substrato in sole otto ore di reazione, operando in un sistema bifasico 50:50 (v/v) tampone (pH=10,0):toluene, a una temperatura di 30 °C. Inoltre, l'enzima immobilizzato è stato riutilizzato in modalità *batch*, mantenendo una conversione del substrato pari a 85,3% dopo 7 cicli di reazione. La resa spazio-temporale del prodotto è risultata 226 g L⁻¹gg⁻¹.

Più recentemente è stata sviluppata la sintesi enantioselettiva del (S)-1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etanol, un importante intermedio per la sintesi di APIs, mediante l'impegno di una KRED commerciale immobilizzata (Fig. 7) [11]. Nello studio, la KRED selezionata è stata immobilizzata mediante legame covalente su cinque resine organiche commerciali derivatizzate con gruppi funzionali di varia natura. I risultati migliori sono stati ottenuti con un supporto funzionalizzato con gruppi amminici. I parametri di reazione, temperatura e solvente, sono stati ottimizzati per la reazione di interesse. La conversione completa del substrato e un elevato eccesso enantiomerico (>99,9%) sono stati ottenuti in un sistema solvente composto da 90:10 (v/v) iPrOH:H₂O alla temperatura di 30 °C: queste condizioni hanno permesso, inoltre, un facile recupero del prodotto mediante semplice evaporazione del solvente. Il biocatalizzatore sviluppato è stato, infine, utilizzato in un sistema in flusso per valutare la riciclabilità del biocatalizzatore. Sono stati quindi effettuati cinque cicli di reazione consecutivi nei quali il prodotto è stato recuperato dopo 24 ore di reazione con con-

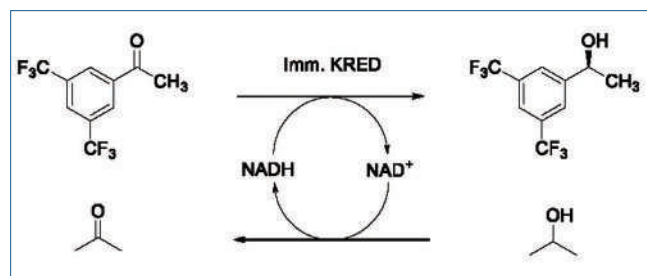


Fig. 7 - Sintesi di (S)-1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etanol catalizzata da chetoreduttasi immobilizzata mediante formazione di legami covalenti su resine funzionalizzate

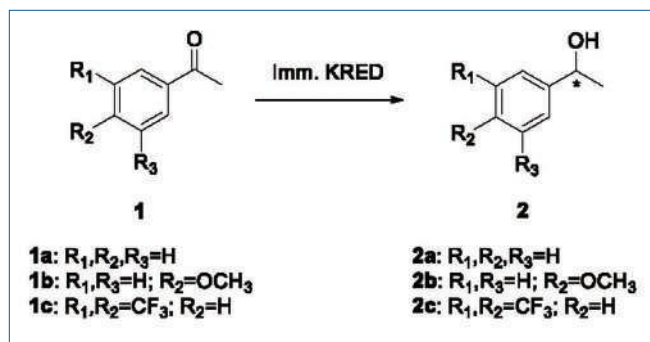


Fig. 8 - Riduzione enantioselettiva di chetoni prochirali aromatici catalizzata da chetoreduktasi immobilizzate su supporti a base di gel di silice

versione completa ed eccesso enantiomerico superiore al 99,9%, senza osservare quindi diminuzioni di attività o enantioselettività.

Con lo scopo di sviluppare un metodo di immobilizzazione efficiente per le KRED, uno studio comparso recentemente riporta l'impiego di supporti a base di gel silice in alternativa alle resine polimeriche funzionalizzate [12]. Questi supporti inorganici, oltre ad essere caratterizzati da un'elevata stabilità meccanica e termica, hanno un costo competitivo rispetto ad altri supporti commerciali e quindi risultano particolarmente adatti per processi di produzione su larga scala. L'immobilizzazione avviene attraverso un processo di adsorbimento fisico dell'enzima al supporto con formazione di interazioni deboli fra i gruppi -OH della silice e l'enzima. Tre enzimi KRED commerciali sono stati immobilizzati ed utilizzati nella bioriduzione di chetoni prochirali aromatici (Fig. 8). Gli alcoli chirali corrispondenti, ottenuti con buone rese ed eccellente enantioselettività, sono importanti *building blocks* per la chimica fine. Il riciclo del biocatalizzatore più performante è stato studiato in un sistema in flusso: nessuna perdita di attività e di enantioselettività è stata osservata dopo cinque reazioni consecutive.

Conclusioni

Gli enzimi chetoreduktasi possono essere considerati ad oggi biocatalizzatori molto efficienti nella sintesi enantioselettiva di alcoli chirali. Le tecniche di ingegnerizzazione e di immobilizzazione hanno permesso di ottenere enzimi più stabili nelle condizioni di conservazione e di reazione e con elevate capacità enantioselettive. Il rapido sviluppo delle chetoreduktasi ed i numerosi esempi riportati in let-

teratura dimostrano che l'utilizzo di questi enzimi può rappresentare un approccio sostenibile per la produzione su scala industriale di importanti intermedi farmaceutici.

BIBLIOGRAFIA

- [1] G. Lin, J. Zhang, O. Shanghai, *Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action*, Wiley, Hoboken (New Jersey), 2011, 1-27.
- [2] J. Ceramella, D. Iacopetta *et al.*, *Applied Sciences*, 2022, **12**, 10909.
- [3] A. de Miranda, C. Milagre, F. Hollmann, *Frontiers in Catalysis*, 2022, **2**, 900554.
- [4] J. An, Y. Nie, Y. Xu, *Critical Review in Biotechnology*, 2019, **39**, 366.
- [5] M. Damian, F. Mutti, *European Journal of Organic Chemistry*, 2023, **26**, 1.
- [6] S. De Wildeman, T. Sonke *et al.*, *Accounts of Chemical Research*, 2007, **40**, 1260.
- [7] R. Sheldon, A. Basso, D. Brady, *Chemical Society Reviews*, 2021, **50**, 5850.
- [8] L. Cao, *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*, John Wiley & Sons, Hoboken (New Jersey), 2006.
- [9] J. Solé, J. Brummund, G. Caminal, M. Schürman, G. Álvaro, M. Guillén, *ChemCatChem*, 2019, **11**, 4862.
- [10] K. Wu, X. Hu, Z. Yang, J. Huang, X. Wang, L. Shao, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2021, **96**, 714.
- [11] D. Armani, O. Piccolo, A. Petri, *ChemCatChem*, 2023, **15**, e202300809.
- [12] D. Armani, O. Piccolo, A. Petri, *Catalysts*, 2024, **14**, 148.

Ketoreductases: Efficient Biocatalysts for the Synthesis of Chiral Alcohols

Biocatalysis is currently a sustainable approach of considerable industrial interest for the production of pharmaceutical intermediates.

In this article, analyzing the scientific literature of recent years, the use of ketoreductases in the enantioselective reduction of prochiral ketones is described, with a particular focus on the use of these enzymes in immobilized form.