

Review

ENZIMSKE I PROTEINSKE METODE U PRIPRAVI ENANTIOMERNO ČISTIH KIRALNIH SPOJEVA I SVOJSTVA NEKIH BIOLOŠKI AKTIVNIH ENANTIOMERA

Goran ŠINKO

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

Primljeno u lipnju 2005.

Enantiomeri nekih kiralnih spojeva mogu pokazivati različita biološka svojstva kao što su farmakološka učinkovitost ili toksičnost. Stoga priprava enantiomerno čistih spojeva sve više dobiva na važnosti, posebice u farmaceutskoj industriji. Laboratorijskom sintezom u pravilu nastaje racemična smjesa nekog kiralnog spoja (enantiomerni par), dok u biološkim sustavima nastaje samo jedan enantiomer, kao kod aminokiselina, šećera ili lipida. U radu su opisani osnovni pojmovi o kiralnosti molekula. Prikazane su metode za pripravu enantiomerno čistih spojeva koje se temelje na kiralnim svojstvima enzima i proteina. Poblize su opisane sinteze enantiomera enzimski kataliziranim reakcijama visoke stereoselektivnosti, i to hidrolitičkim, oksidacijskim i redukcijskim biopretvorbama. Naveden je primjer poboljšanja stereoselektivnosti enzimске reakcije promjenama pojedinih aminokiselina u aktivnom centru lipaze. Opisane su također kromatografske metode, kapilarna elektrokromatografija i tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti, s proteinima kao kiralnim izbornicima kojima se razdvajaju enantiomeri iz racemične smjese. U radu su navedeni primjeri različitog biološkog djelovanja enantiomera nekih kiralnih spojeva.

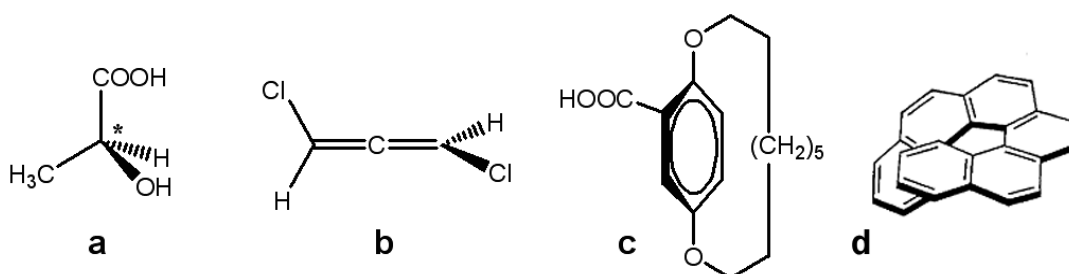
KLJUČNE RIJEČI: *enzimske biotransformacije, kiralni lijekovi, kromatografija, razdvajanje enantiomera, stereoselektivnost*

KIRALNOST I NOMENKLATURA ENANTIOMERA

Kiralnost, vrsta stereoizomerije, jedna je od osnovnih pojava u prirodi i karakteristična je za živi svijet i njegove osnovne građevne jedinice aminokiseline, šećere i lipide. Molekula je kiralna kada se ne može preklapati s vlastitom zrcalnom slikom, poput dlanova ruke (grč. χεῖρ (cheír) - ruka). Enantiomerima se naziva par kiralnih molekula koje se odnose kao predmet i zrcalna slika, a smjesa dvaju enantiomera u molarnom omjeru 1:1 racemičnom smjesom. Stereoizomeri imaju identičnu kemijsku strukturu, tj. atomi su u molekuli povezani na isti način, ali je prostorni raspored atoma drugačiji. Stereoizomeri se dijele na konformacijske i

konfiguracijske, a konfiguracijski opet na geometrijske i optičke. U geometrijske stereoizomere ubrajamo *cis* i *trans*-izomere. Optičke stereoizomere čine enantiomeri i dijastereomeri. Razlika u prostornom rasporedu atoma unutar molekule može uzrokovati razliku u biološkim svojstvima optičkih stereoizomera, odnosno enantiomera i dijastereomera (1-4).

Enantiomeri zakreću ravninu polariziranog svjetla, a to svojstvo prvi je uočio J. B. Biot 1815. god. Na osnovi prostornog, trodimenzionalnog, modela molekula J. H. van't Hoff i J.-A. Le Bell neovisno su 1874. god. postavili teoriju podrijetla optičke aktivnosti. Razlikuju se četiri oblika kiralnosti: središnja, osna, planarna i helikoidalna kiralnost (slika 1a, b, c i d). Kod molekula je najčešća središnja kiralnost. Kiralna molekula (slika 1a) ima asimetrično središte, tj. centar asimetrije



Slika 1. Četiri oblika kiralnosti: središnja (a), osna (b), planarna (c) i helikoidalna (d) (2).

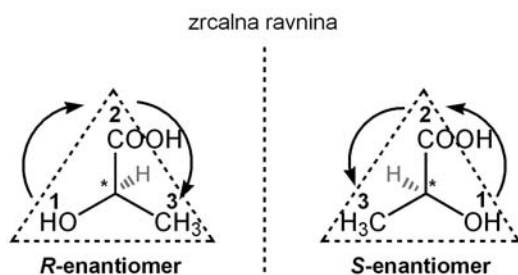
kada su na nekom atomu (ugljik, dušik, fosfor, sumpor i drugi) vezana četiri različita supstituenta usmjerena u vrhove tetraedra. Molekule koje imaju dva, tri ili n kiralnih centara imaju 2^n stereoisomera. Neki od tih stereoisomera su enantiomeri, dok su ostali diastereomeri, tj. ne odnose se kao predmet i zrcalna slika.

Postoje dva sustava nomenklature kiralnih spojeva. Jedan sustav označava kiralne strukture sa d- (desnozakrećući, *dextrorotatory*) i l- (lijevozakrećući, *levorotatory*), odnosno (+) i (-) s obzirom na stranu zakretanja ravnine polariziranog svjetla kada ono prolazi kroz otopinu enantiomerno čistog spoja. Drugi sustav nomenklature, Cahn-Ingold-Prelogova (CIP) nomenklatura (5), označava apsolutne strukture kiralnog centra oznakama konfiguracije *R* (lat. *rectus* - desno) ili *S* (lat. *sinister* - lijevo) s obzirom na raspored prioriteta skupina oko kiralnog, asimetričnog, središta (slika 2). Ova nomenklatura rangira supstituente na kiralnom centru s obzirom na atomski broj atoma vezanog na kiralni atom. Atomi

većeg atomskog broja imaju viši prioritet. Ako dva supstituenta na kiralnom središtu imaju isti prioritet, sljedeći atomi vezani na prvi atom također se rangiraju dok se ne uoči razlika. Višestruke veze se promatraju kao odgovarajući broj jednostrukih veza s atomom istog atomskog broja.

METODE PRIPRAVE ENANTIOMERNO ČISTIH KIRALNIH SPOJEVA

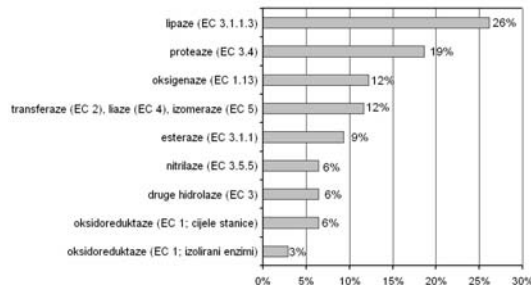
Enantiomerno čisti kiralni spojevi mogu se prirediti separacijskim ili sintetskim metodama. Sve metode razdvajanja enantiomera iz racemične smjese temelje se na činjenici da kiralne molekule u kiralnom okruženju iskazuju različita svojstva. Prema Ogstonovu načelu (6), da bi se postigla stereoselektivnost, moraju postojati najmanje tri komplementarne interakcije između dvije kiralne molekule kao npr. između supstrata i enzima ili između analita i kiralnog nosača. Zbog različitog rasporeda atoma u prostoru jedan od enantiomera, koji razdvajamo, moći će ostvariti te tri interakcije, dok drugi neće. Razdvajanje racemične smjese na komponente može se provesti kokristalizacijom s enantiomerno čistim reagensima (često prirodnog podrijetla) ili kromatografskim metodama s kiralnim nepokretnim fazama (7). Kiralne nepokretne faze sadržavaju enantiomerno čiste kiralne molekule koje na sebe vežu enantiomere iz smjese različitim afinitetima. Enantiomeri se razdvajaju na kromatografskoj koloni zbog različitog vremena zadržavanja na nepokretnoj fazi. Ograničenje navedenih metoda je njihovo iskorištenje, koje u idealnom slučaju iznosi maksimalnih 50%, jer drugih 50% čini drugi enantiomer. Enantiomerna čistoća kiralnog spoja izražava se kao enantiomerni višak (engl. *enantiomeric excess*, ee) i predstavlja omjer razlike i sume molarnih udjela enantiomera u smjesi dvaju enantiomera, jedn. 1.



Slika 2. Primjer određivanja apsolutne konfiguracije enantiomera (mliječna kiselina). Redosljed skupina prema stupnjevima prioriteta je $OH > COOH > CH_3 > H$ odnosno brojčano $1 > 2 > 3 > 4$. Gledanjem u smjeru kiralnog središta i skupine najnižeg stupnja prioriteta (atom vodika) određuje se slijed preostalih skupina. Ako je redosljed preostalih skupina u vrhovima imaginarnog trokuta sukladan smjeru kazaljki na satu, onda se radi o *R*-enantiomeru, a ako je taj redosljed suprotan, radi se o *S*-enantiomeru (5).

$$ee_R (\%) = \frac{R - S}{R + S} \times 100 \text{ ili } ee_S (\%) = \frac{S - R}{R + S} \times 100 \quad [1]$$

Kako bi se izbjeglo neekonomično razdvajanje racemata na enantiomere, u sintezi enantiomerno čistih spojeva primjenjuju se stereoselektivni katalizatori ili enzimski katalizirane reakcije. Sintetski kiralni katalizatori priređuju se za određenu vrstu molekula na kojoj se želi provesti reakcija. Ti katalizatori mogu biti vrlo učinkoviti, ali manje promjene u strukturi reagensa mogu bitno sniziti njihovu djelotvornost. Nasuprot njima enzimi su se pokazali izuzetno pogodni u procesima sintetske kemije zbog velike raznovrsnosti reakcija koje kataliziraju te prirodnih i neprirodnih supstrata koje prihvaćaju i uvjeta samih reakcija. Međunarodna unija za biokemiju i molekularnu biologiju (IUBMB - International Union for Biochemistry and Molecular Biology) dijeli enzime na oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze sukladno reakcijama koje ti enzimi kataliziraju (8). Učestalost ukupne primjene pojedinih skupina enzima u biopretvorbama pokazuje neujednačenost u njihovoj primjeni (2) (slika 3).



Slika 3. Učestalost uporabe raznih skupina enzima u biopretvorbama (2).

Prednosti enzimski kataliziranih reakcija, biopretvorbi, u kemijskoj sintezi jesu: kemoselektivnost, regioselektivnost i stereoselektivnost (9). Kada u reakciju stupa samo jedna vrsta kemijske funkcionalne skupine, govorimo o kemoselektivnosti, npr. u molekuli s esterskom i amidnom skupinom enzim će hidrolizirati samo estersku vezu. Regioselektivna reakcija je ona kada produkt čini samo jedan od mogućih izomera, npr. *cis* ili *trans*-izomer. U enantioselektivnoj reakciji nastaje određen prostorni raspored supstituenata na asimetričnom središtu, tj. *R* ili *S*-enantiomer. Mjera stereoselektivnosti enzimske reakcije izražava se enantiomernim omjerom (E), jedn. 2. Enantiomerni omjer predstavlja selektivnost enzima prema enantiomerima kiralnog supstrata. U jedn. 2.

k_{cat} predstavlja konstantu brzine prevođenja supstrata u produkt, a K_m predstavlja Michaelisovu konstantu. Što je k_{cat} veća, a K_m manja, to je enzim učinkovitiji prema dotičnom supstratu. Učinkovitost kinetičke rezolucije racemata ovisi o enantiomernom omjeru. Veća E-vrijednost znači bolju rezoluciju enantiomera. Prema konvenciji vrijednost E može biti jednaka ili veća od jedan.

$$E = \frac{(k_{cat}/K_m)_{R(ili\ S)}}{(k_{cat}/K_m)_{S(ili\ R)}} \quad [2]$$

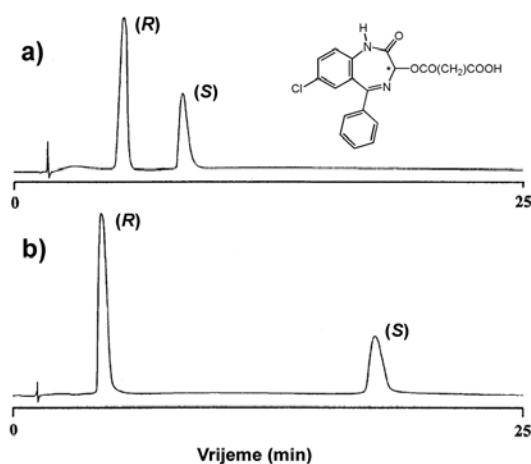
RAZDVAJANJE ENANTIOMERA KROMATOGRAFSKIM METODAMA S KIRALNIM PROTEINSKIM IZBORNICIMA

Kromatografske metode s kiralnim izbornicima male molekularne mase pokazuju manjak univerzalnosti u razdvajanju enantiomera. Stoga se upotreba proteina u kromatografskim metodama pokazala pogodnom za razdvajanje kemijski raznovrsnih enantiomera. Proteini se uspješno primjenjuju u afinitetnoj kromatografiji, afinitetnoj kapilarnoj elektroforezi (ACE), kapilarnoj elektrokromatografiji (CEC) te afinitetnoj gel elektroforezi (AEP) (10). Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) jedna je od prvih analitičkih metoda kod koje su se rabili proteini za uspješno razdvajanje enantiomera. Proteini koji su najviše istraživani kao kiralni izbornici za CEC su α 1-kiselni glikoprotein (AGP) i albumin iz humanog seruma (HSA), što proizlazi iz činjenice da je vezanje tvari (npr. lijekova) dio njihove fiziološke uloge. Ispitivani su i drugi proteini kao na primjer: avidin, β -laktoglobulin, kazein, celobiohidrolaza, konalbumin, transferin iz ljudskog seruma i ovomukoid.

Prvu separaciju enantiomera CEC-om objavili su Li i Lloyd (11) rabeći Chiral AGP-5 Wm HPLC kolonu punjenu AGP-om. Općenito AGP-faza zbog svoje izoelektrične točke ($pI=2,7$) može stereoselektivno vezati kisele, bazične i neutralne analite. Tako su uspješno separirani lijekovi iz skupine β -blokatora i barbiturata te benzoin, ciklofosamid i diizopiramid. Učinkovitost CEC-kolona pokazala se boljom od one HPLC-kolona. Za razdvajanje enantiomera CEC-om osim AGP-a primjenjuju se i drugi proteini, pa se kolona sa HSA rabila za separaciju benzodiazepina i benzoina (12). Imobilizirani proteini (AGP, HSA i dr.) pokazali su se učinkoviti tijekom razdvajanja enantiomera kapilarnom elektrokromatografijom

budući da su u električnom polju sačuvali tercijernu strukturu.

Kako bi se povećala stereoselektivnost proteinskih kromatografskih metoda, pristupilo se promjenama u strukturi proteina kemijskim modifikacijama pojedinih aminokiselina. Povećana je enantioselektivnost kromatografskog razdvajanja oksazepam hemisukcinata aciliranjem albumina iz ljudskog seruma (HSA) *p*-nitrofenil acetatom, slika 4. (13). Oksazepam je lijek koji se rabi u tretiranju anksioznog poremećaja i depresije.



Slika 4. Odjeljivanje enantiomera oksazepam hemisukcinata na koloni s neizmijenjenim albuminom iz ljudskog seruma (HSA) (a) i na koloni s aciliranim HSA s *p*-nitrofenil acetatom (b) (13).

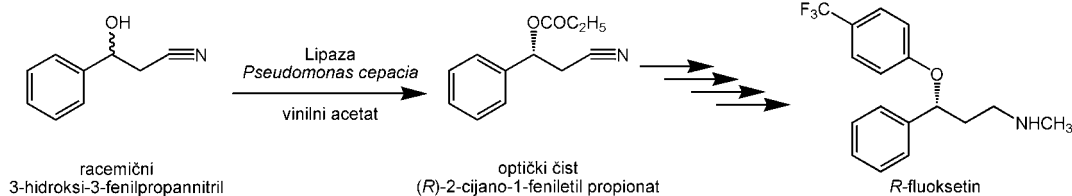
PRIPRAVA ENANTIOMERNO ČISTIH SPOJEVA ENZIMSKIM BIOPRETVOBAMA

Hidrolitičke biopretvorbe

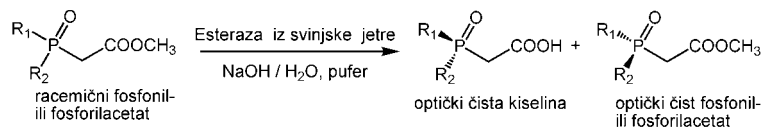
Enzimske hidrolitičke reakcije lako su izvedive jer su enzimi koji ih kataliziraju, proteaze, esteraze i lipaze, lako dostupni i ne zahtijevaju kofaktore. Također je moguće reakcije provoditi u hidrolizi suprotnom smjeru, tj. u smjeru sinteze estera, amida i drugih spojeva. Enzimi iz ove skupine sudjeluju i u stvaranju odnosno cijepanju epoksidnih i nitrilnih veza te u hidrolizi fosfatnih estera. Oko dvije trećine ukupnih istraživanja enzimskih biopretvorbi provedeno je na ovoj skupini hidrolitičkih enzima (slika 3) (2, 14). Glavnu upotrebu hidrolitičkih biotransformacija predstavlja razdvajanje enantiomera. Primjerice, enzimskom reakcijom hidrolize racemičnog estera nastat će optički čisti alkohol, zbog enantioselektivnosti enzimске reakcije, a drugi enantiomer estera iz racemične smjese ostat će nepromijenjen. Odvajanjem produkata i reaktanata dobiva se optički čisti alkohol i optički čisti ester.

Lipaza (EC 3.1.1.3) iz *Pseudomonas cepacia* iskorištena je za rezoluciju enantiomera 3-hidroksi-3-fenilpropionitrila, a dobiveni enantiomeri poslužili su kao kiralni reagensi u sintezi optički čistih antidepresiva fluoksetina, tomoksetina i nizoksetina (slika 5 – shema (a)) (15). Sintaza *S*-enantiomera fluoksetina, tomoksetina i nizoksetina analogna je sintezi *R*-enantiomera tih spojeva. Esteraza iz svinjske jetre (EC 3.1.1.1) pokazala se pogodnom za rezoluciju racemičnih metilnih fosfonil i fosforilacetata (slika 5 – shema (b)) (16). Kod fosfonil i fosforilacetata, odnosno organofosfornih spojeva, atom fosfora je asimetrični, tj. kiralni centar molekule.

Shema (a)



Shema (b)



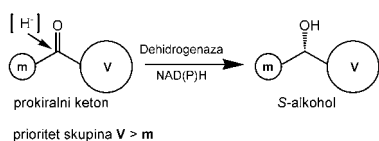
Slika 5. Razdvajanje enantiomera primjenom hidrolitičkih enzima: shema (a) prema (15) i shema (b) prema (16).

Organofosforni spojevi masovno se rabe kao pesticidi u racemičnom obliku, npr. malation ili fonofos, a neki od organofosfornih spojeva čine skupinu živčanih bojnih otrova zbog izrazite toksičnosti, npr. sarin, soman, tabun i VX (17).

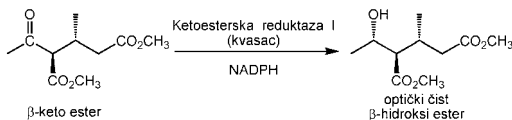
Redukcijske biopretvorbe

U redukcijskim reakcijama rabe se enzimi iz skupine oksidoreduktaza. Ti enzimi za katalizu oksido-redukcijskih reakcija rabe kofaktore, i to najčešće NAD(P)H – nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat), a rjeđe se upotrebljavaju flavini i pirolokinolin kinon. Bitno je naglasiti da se u enzimski kataliziranoj redoks reakciji kofaktor mora reciklirati odnosno vratiti u početno oksidacijsko stanje kako bi enzim zadržao aktivnost. Važnost redukcijskih enzimskih reakcija je mogućnost uvođenja kiralnosti u molekulu izvođenjem reakcija na prokiralnim supstratima. Aldehidi i ketoni su takvi prokiralni supstrati jer vezanjem liganda na ugljikov atom karbonilne skupine karbonilni ugljik može postati asimetrični centar molekule. U većini redukcijskih reakcija stereokemijski tijek reakcije uvjetovan je uglavnom strukturom supstrata te se može zbivati prema Prelogovu pravilu asimetrične redukcije ketona (18). Prema tom pravilu ketoni i aldehidi s malom i velikom skupinom vezanom na karbonilni ugljik reducirat će se u S-alkohole uz uvjet da veća skupina (V) ima viši stupanj prioriteta od manje skupine (m) prema CIP-nomenklaturi (slika 6 - shema (a)).

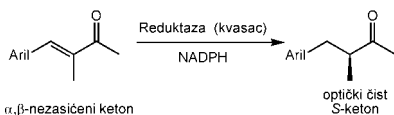
Shema (a)



Shema (b)



Shema (c)



Slika 6. Shematski prikaz Prelogova pravila (shema (a)) (18). Sintaza enantiomerno čistih spojeva primjenom redukcijskih enzima: shema (b) prema (19) i shema (c) prema (20).

Enzimi iz skupine dehidrogenaza prilikom asimetrične redukcije ketona pokazuju razlike u stereoselektivnosti (18). Vidljivo je da neke dehidrogenaze daju produkte sukladno Prelogovu pravilu, dok druge daju alkohole konfiguracije suprotne tom pravilu (tablica 1). Sa stajališta sinteze vrlo je korisna ovakva biološka raznolikost u enantioselektivnosti, odnosno u optičkoj čistoći nastalih produkata.

Tablica 1. Stereoselektivnost dehidrogenaza (DH) kod asimetrične redukcije ketona (17). Enzimska selektivnost sukladna Prelogovu pravilu (+) i suprotna tom pravilu (-). *Thermoan. brockii* ADH reducira male ketone (acetone) suprotno pravilu, a veće ketone sukladno pravilu (*).

Dehidrogenaza	Selektivnost	Kofaktor
ADH iz kvasca	+	NADH
ADH iz konjske jetre	+	NADH
Hidroksisteroidna DH	+	NADH
<i>Candida parapsilosis</i> ADH	+	NADH
<i>Thermoan. brockii</i> ADH	+*	NADPH
<i>Lactobacillus kefir</i> ADH	-	NADPH
<i>Mucor javanicus</i> ADH	-	NADPH
<i>Pseudomonas sp.</i> ADH	-	NADH

ADH-alkohol dehidrogenaza

NAD(P)H-nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)

O NADPH ovisna reduktaza iz pekarskog kvasca koja reducira karbonilne spojeve pokazala se vrlo važnom zbog visokih enantiomernih čistoća nastalih produkata, ee > 98%. Redukcijom β-keto estera sa sekundarnom alkilnom skupinom u α-položaju dobiven je β-hidroksi ester (metil-2-alkil-3-hidroksibutanon) s tri uzastopna kiralna centra uz izvrsnu enantioselektivnost (slika 6 - shema (b)) (19). Klasičnom sintezom molekule s tri kiralna centra nastalo bi osam [2³] stereoisomera, koje bi naknadno bilo vrlo teško međusobno razdvojiti. Zanimljivom se pokazala i reduktaza ugljik-ugljik dvostruke veze iz pekarskog kvasca koja reducira α,β-nezasićene ketone u zasićene S-ketone (slika 6 - shema (c)) (20). Ovaj primjer jako dobro ilustrira enzimsku kemoselektivnost jer bi bilo vrlo teško klasičnim kemijskim postupkom reducirati dvostruku vezu, a da se pritom ne reducira i sam keton.

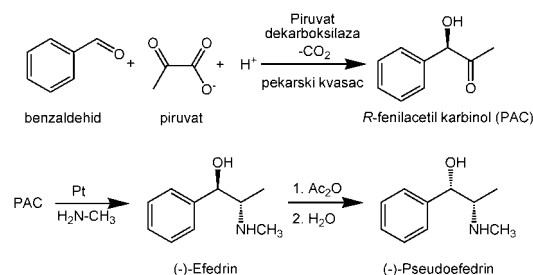
Oksidacijske biopretvorbe

Enzimski katalizirane oksidacije u prednosti su pred klasičnim oksidacijama, i to ne samo zbog stereoselektivnosti nego i zbog blagih reakcijskih uvjeta koje klasična kemija ne može postići. Mane "klasične" kemije su primjena toksičnih metala kao reagensa, nedostatak dovoljne selektivnosti uz pojavu neželjenih

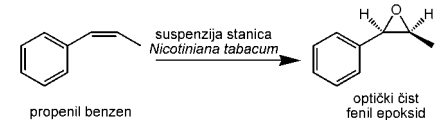
reakcija i nemogućnost uporabe kisika kao najjeftinijeg oksidansa. Neposredno postizanje regioselektivnosti i enantioselektivnosti kod oksidacijskih reakcija važan je problem u organskoj sintezi. Enzimi iz skupina oksigenaza provode oksidaciju ugrađivanjem jednog ili obaju atoma molekularnog kisika u molekulu supstrata ili donorskim procesom prijenosa elektrona s kisika. Oksigenaze djeluju na sljedeće funkcionalne skupine: hidroksilnu, alkilnu, alkenilnu, arilnu, karboksilnu (peroksidacija) i sumporov atom.

Prirodni alkaloid efedrin i njegov diastereomer pseudoefedrin industrijski se sintetiziraju biotransformacijom benzaldehida s pomoću pekarskog kvasca te naknadnom kemijskom katalizom (slika 7 - shema (a)) (21). Biotransformacija je katalizirana usporednom reakcijom piruvat dekarboksilaze (EC 1.2.4.1) koja obavlja prijenos enzimski vezanog "aktiviranog" acetaldehida na benzaldehyd kako bi nastao *R*-fenilacetil karbinol (PAC). PAC se katalitičkim postupkom prevodi u (-)-efedrin iz kojeg se naknadnom sintezom dobiva pseudoefedrin uz inverziju kiralnosti na C-1 atomu. Efedrin je α i β -adrenergični agonist te se rabi u tretmanu nekoliko poremećaja: astme, zatajenja rada srca, rinitisa, urinarne inkontinencije i kao stimulans središnjega živčanog sustava kod narkolepsije i depresije.

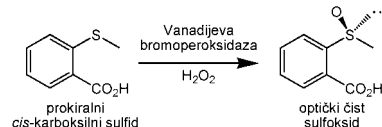
Shema (a)



Shema (b)



Shema (c)



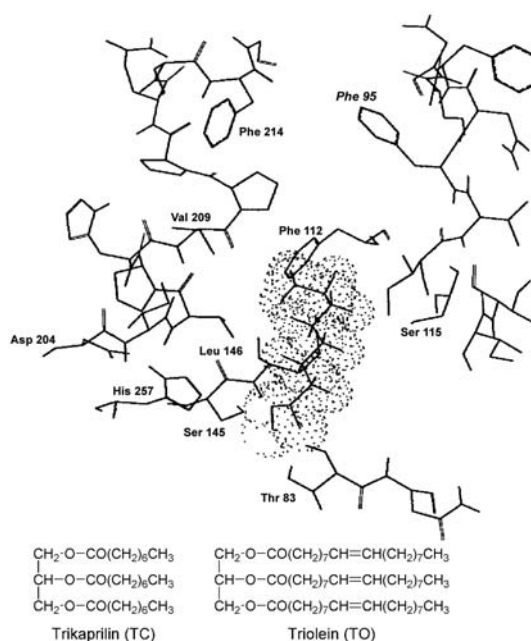
Slika 7. Sinteza enantiomerno čistih spojeva primjenom oksidacijskih enzima: Shema (a) prema (21), shema (b) prema (22) i shema (c) prema (23).

Peroksidazna i epoksidacijska aktivnost enzima iz duhana (*Nicotiana tabacum*) može se iskoristiti na stirenskim supstratima (slika 7 - shema (b)) (22). Nastali produkt, kao i drugi kiralni epoksidi, visokovrijedan je intermedijar u sintezi kiralnih spojeva zbog sposobnosti da reagira s mnoštvom nukleofila. Vanadijeva bromoperoxidaza (EC 1.11.1.10) (*Corallina officinalis*) oksidira prokiralne sulfidne supstrate s *cis*-karboksilnom skupinom u odnosu na atom sumpora. Kao oksidans enzim rabi vodikov peroksid. Prisutnost bromidnih iona uzrokuje nagli gubitak stereoselektivnosti, najvjerojatnije zbog kompeticijske oksidacije bromida (slika 7 - shema (c)) (23). Nastala sulfoksidna funkcionalna skupina olakšava bazi odcjepljenje vodika s udaljene ugljikovodike veze, a odgovarajući anion može se alkilirati ili acilirati uz visoku diastereoselektivnost (24, 25).

POBOLJŠANJE STEREOSELEKTIVNOSTI ENZIMSKIH BIOPRETVO RBI

Promjenama aminokiselina u enzimu, metodama genetičkog inženjerstva, mogu se mijenjati katalitička svojstva enzima. Promjenama aminokiselina želi se postići nekoliko ciljeva: ubrzati enzimsku reakciju, povećati raznovrsnost supstrata s kojima enzim reagira, povećati stereoselektivnost enzimске reakcije ili čak promijeniti samu stereoselektivnost.

Tako su se na primjer genetičkim inženjerstvom lipaze izolirane iz *Rhizopus delemar* (slika 8), uspjele postići promjene u selektivnosti prema različitim supstratima (26). Budući da fenilalanin 95 (Phe95) sterički ometa vezanje masnih kiselina duljih od deset C-atoma (trigliceridi, jednostavni esteri), promjenama Phe95 postigla se bolja aktivnost prema supstratima većima od deset C-atoma. Uspješnost mutacija iskazana je promjenom enzimске aktivnosti prema esteru glicerola trikaprilinu (TC) u odnosu na ester glicerola triolein (TO) (slika 8). Trikaprilin sadržava masne kiseline od osam ugljikovih atoma, a triolein nezasićene masne kiseline od osamnaest ugljikovih atoma. Promjene Phe95 povećale su aktivnosti prema TC u odnosu na TO od dva do šest puta. Promjene Phe112 smanjuju aktivnost enzima prema C-8 i C-18 masnim kiselinama i do osam puta u usporedbi s C-4 masnim kiselinama. Nasuprot Phe112 nalazi se Val209 čije promjene imaju za posljedicu sličan utjecaj na smanjenje aktivnosti lipaze za C-8 i C-18 masne kiseline. Također je uočeno da zamjena Phe112 glutaminom potpuno ukida enzimsku aktivnost.



Slika 8. Model strukture aktivnog mjesta lipaze (*Rhizopus delemar*) te formule supstrata trikaprilina i trioleina. Acilni lanac trikaprilina (TC, točkasta površina) vezan je na Ser145 u aktivnom centru. Katalitičku trijadu lipaze čine Ser145-His257-Asp204. Ala-alanin, Asp-aspartat, Glu-glutaminska kiselina, His-histidin, Leu-leucin, Phe-fenilalanin, Ser-serin, Thr-treonin i Val-valin (25).

Dvostruki mutant Val209Thr i Phe95Asp pokazuje od četiri do šest puta povećanu selektivnost prema TC u odnosu na TO. Enantioselektivnost prema *S/R*-heptil-2-metildekanoatu udvostručila se mutacijom Glu87Ala.

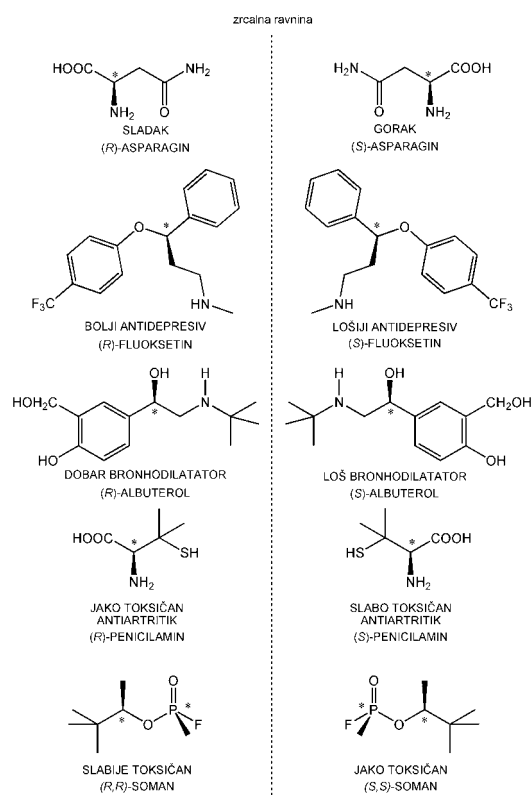
Budući da su enzimi optimirani prema svojim prirodnim supstratima, promjene u veličini aktivnog centra uzrokovane promjenama aminokiselina mogu povećati afinitet enzima prema većim supstratima. Povećanja se uglavnom postižu supstitucijama većih aromatskih s manjima alifatskim aminokiselinama. Ipak samo povećanje aktivnog centra bez uvođenja drugih promjena u enzimskoj strukturi ne dovodi do djelotvornijeg, odnosno enantioselektivnijeg enzima. Ta činjenica pridonosi važnosti metoda molekularnog modeliranja kojima se predviđa utjecaj pojedinih mutacija na strukturu aktivnog centra i navedena enzimska svojstva.

BIOLOŠKA SVOJSTVA KIRALNIH SPOJEVA

Ljudsko je tijelo u osnovi kiralna struktura, koja sadržava mnoštvo kiralnih meta (enzimi, receptori i

ionski kanali) za biološki aktivne tvari, pa enantiomeri tih tvari mogu imati vrlo različita svojstva (1). Na slici 9. navedeno je nekoliko primjera biološki aktivnih enantiomera različitih svojstava. Na primjer *R*-asparagin je sladak i rabi se kao zaslađivač u hrani i pićima, a *S*-enantiomer ima gorak okus. Neki drugi enantiomeri također pokazuju razlike u organoleptičkim svojstvima. Proizvodnja *R*-asparagina odvija se upotrebom enzimskih metoda (2).

Važnu skupinu biološki aktivnih tvari čine lijekovi. Budući da je približno 50% lijekova na tržištu kiralno, a svega 25% u enantiomerno čistom obliku (27), poznavanje farmakoloških svojstava kiralnih lijekova sve je važnije u medicinskoj praksi. To je znanje nužno kliničarima kako bi donosili valjane odluke s obzirom na upotrebu racemičnih ili jednoenantiomernih formulacija lijekova. Razvoj enantiomerno čistih lijekova potaknut je boljim terapijskim svojstvima zbog sniženja doze, smanjenjem varijabilnosti u metabolizmu lijeka, jednostavnijim odnosom doza-odgovor i poboljšanom tolerantnosti. Zakonska legislativa vođena ovim činjenicama preporučuje i



Slika 9. Primjeri nekih kiralnih molekula i njihovih različitih svojstava (1-4). Zujezdicom su označeni kiralni centri.

podupire razvoj novih jednoenantiomernih lijekova, odnosno kiralnu zamjenu postojećih racemata enantiomerno čistim lijekovima.

Velika razlika u farmakološkim svojstvima enantiomera uočena je kod nekih lijekova kao što su β -blokatori (propranolol, timolol) i nesteroidni protuupalni lijekovi (ibuprofen, ketoprofen). U slučaju losartana koji se rabi za tretiranje visokog tlaka i srčanog udara farmakološki je aktivan *R*-enantiomer kao specifični antagonist angiotenzin II receptora (28). Drugi je primjer lijek protiv depresije citalopram, selektivni inhibitor preuzimanja serotonina, *S*-enantiomer inhibira transport serotonina dva puta snažnije od racemata i četrdeset puta od *R*-citaloprama (29). Utvrđeno je za racemični lijek protiv depresije Prozac[®], generičkog imena fluoksetin (slika 9), da *R*-enantiomer ima jače antidepresivno djelovanje od *S*-enantiomera, tj. snažnije inhibira preuzimanje serotonina. Zanimljivo je da *S*-enantiomer fluoksetina bolje djeluje protiv migrene i kao takav se planira uvesti na tržište (3). Enantiomeri fluoksetina mogu se priređivati raznim postupcima a najučinkovitija je katalitička redukcija 3-kloropropiofenona koju su opisali Corey i Reichard (30).

Albuterol, komercijalno poznat kao Ventolin[®], trenutačno je najčešće upotrebljavani β_2 -agonist u tretmanu astme ili kronične opstruktivne plućne bolesti. Ranije se smatralo da je *S*-albuterol minimalno aktivan u usporedbi s *R*-albuterolom te je *S*-albuterol tretiran balastom odnosno punilom (slika 9). Naknadna istraživanja na *S*-albuterolu pokazala su da kod duže upotrebe izaziva paradoksalne napadaje astme jer umanjuje bronhodilatacijsko djelovanje *R*-enantiomera. Farmakodinamičke studije potvrdile su da je aktivacija β_2 -receptora primarno posljedica djelovanja *R*-albuterola (31-33). Kliničke studije pokazale su da *R*-albuterol poboljšava funkciju pluća i pokazuje dugotrajnije djelovanje nego ista količina *R*-enantiomera u racemičnom albuterolu. Sličan učinak na poboljšanje funkcije pluća ima 2.5 mg racemičnog albuterola, kao i 0.625 mg *R*-albuterola (četvrtina doze racemata) uz manju toksičnost čistog enantiomera. *S*-ibuprofen, nesteroidni protuupalni lijek, približno je 160 puta učinkovitiji inhibitor sinteze prostaglandina od *R*-ibuprofena te se *R*-enantiomer smatra izomernim balastom i proljekom jer se *R*-enantiomer metabolizira u organizmu u *S*-enantiomer (4). Naproksen je enantiomerno čisti nesteroidni protuupalni lijek koji se već rabi u praksi u obliku *S*-enantiomera. Optički čist *S*-naproksen sintetizira se enantioselektivnom katalitičkom hidrogenacijom (34).

Penicilamin se intenzivno rabi u tretmanu Wilsonove bolesti i reumatoidnog artritisa (slika 9). *R*-penicilamin je toksičan i djeluje kao inhibitor rasta kod štakora koji u prehrani imaju manjak kolina jer na molekularnoj razini djeluje kao antagonist piridoksina (vitamin B6). *S*-enantiomer je manje toksičan uz istu sposobnost keliranja bakra i nekih teških metala te sudjelovanja u reakcijama izmjene tiola (smanjenje cisteina u urinu). Sukladno tim spoznajama u enantiomerno čistom obliku rabi se *S*-penicilamin (4). *S*-penicilamin komercijalno se priređuje Asingerovim postupkom (35) iz racemičnog penicilamina stvaranjem acetonskog adukta te naknadnom kokristalizacijom *S*-enantiomera s 1*R*,2*S*-norefedrinom.

Kod skupine kiralnih organofosfornih spojeva (OP-spojevi) također je uočena razlika u djelovanju pojedinih enantiomera iako se u praksi ovi spojevi rabe u racemičnom obliku. Kako bi se utvrdila toksičnost pojedinih enantiomera živčanih bojnih otrova sarina, somana (slika 9) i VX-a, oni su priređeni u istraživačke svrhe. Toksično djelovanje OP-spojeva temelji se na inhibiciji acetilkolinesteraze (AChE) čijom se inhibicijom onemogućava hidroliza neurotransmitera acetilkolina i prijenos živčanih impulsa. Toksičnost OP-spojeva izražava se kao doza spoja kod koje ugiba 50% tretiranih životinja (LD_{50}). Soman je spoj sa dva kiralna centra, na fosforu P(\pm) i ugljiku C(\pm), i ima četiri diastereomera. Pokazalo se da P(-) stereoizomeri somana imaju približno 50 puta višu akutnu toksičnost u odnosu na P(+) stereoizomere (36). Stereoizomeri P(-)-soman i (-)-sarina pokazuju sličnu toksičnost na miševima ($LD_{50} \sim 40 \mu\text{g}/\text{kg}$). U slučaju VX-a pokazalo se da je (-)-VX 12 puta toksičniji od (+)-VX-a (cf. 17, 37). Enantiomerno čisti OP-pojevi priređeni su kombiniranjem sintetskih i enzimatskih metoda. C(+) i C(-) enantiomeri somana sintetizirani su iz optički čistih enantiomera pinakolnog alkohola, a P(+) i P(-) enantiomeri somana odvojeni su inkubacijom s α -kimotripsinom koji specifično veže P(-)-soman (cf. 17). Enantiomeri VX-a priređeni su sintetski polazeći od optički čistih preteča (37).

ZAKLJUČAK

Enantiomerno čisti lijekovi, kao i drugi biološki aktivni spojevi (pesticidi, dodatci hrani, zaslađivači i drugi) pokazali su se u svojoj primjeni djelotvorniji u odnosu na racemične smjese te manje štetni za ljude i okoliš. Ova činjenica ima za posljedicu uvođenje

kiralne zamjene, tj. zamjenu racemičnih biološki aktivnih spojeva, posebice lijekova, enantiomerno čistim oblikom. Stoga sve masovnija upotreba kiralnih spojeva u enantiomerno čistom stanju traži razvoj novih i učinkovitijih metoda njihove priprave.

Enzimske biopretvorbe pokazale su se nadmoćnije u pripravi enantiomerno čistih tvari u odnosu na proteinske kromatografske metode. Dodatne prednosti enzimskih biopretvorbi u kemijskoj sintezi su uz svojstvo stereoselektivnosti i svojstva regioselektivnosti i kemoselektivnosti. Neupitna prednost enzima je i mnogobrojnost vrsta reakcija koje kataliziraju. Uvođenjem mutacija, metodama genetičkog inženjerstva, u aktivne centre enzima, postignuto je povećanje afiniteta i učinkovitosti prema neprirodnim supstratima. Značajnom se pokazala i činjenica da se mutacijama može pospješiti i enantioselektivnost enzimske reakcije. Metode molekularnog modeliranja postaju vrijedan alat u dizajnu i predviđanju utjecaja mutacija na aktivnost i stereoselektivnost enzima izmijenjenih mutacijama. Otkrivanjem novih biopretvorbi šire se mogućnosti njihove primjene a samim time pojavljuju se novi i/ili poboljšani sintetski putovi prema enantiomerno čistim biološki aktivnim spojevima.

Zahvala

Zahvaljujem dr. sc. V. Simeon i dr. sc. E. Reiner na potpori i savjetima tijekom izrade ovoga rada, također prof. S. Tomić-Pisarović i dr. sc. V. Vinkoviću. Ovaj rad izrađen je u okviru projekta 0022014 (voditeljica dr. sc. V. Simeon) Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH.

LITERATURA

1. Ariens EJ. Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur J Clin Pharmacol* 1984;26:663-8.
2. Faber K. Biotransformations in organic chemistry: a textbook. 5. izdanje. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2004.
3. Tucker GT. Chiral switches. *Lancet* 2000;355:1085-7.
4. Williams KM, Day RO. Clinical applications of enantiomeric drugs. *Aust Prescr* 1989;12:22-5.
5. Cahn RS, Ingold CK, Prelog V. Specification of molecular chirality. *Angew Chem Int Ed Engl* 1966;5:385-415.
6. Ogston AG. Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements. *Nature* 1948;162:963-4.
7. Šinko G, Novak P, Žiher D, Vinković V, Šunjić V, Simeon-Rudolf V. Separation, conformation in solution and absolute configuration of ethopropazine enantiomers. *Enantiomer* 2002;7:149-56.
8. Webb EC, urednik. Enzyme nomenclature. Recommendations (1992) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NCIUBMB) on the Nomenclature and Classification of Enzymes. New York (NY): Academic Press; 1992.
9. Pine SH. Organska kemija. III. izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 1994.
10. Hage DS. Chromatographic and electrophoretic studies of protein binding to chiral solutes. *J Chromatogr A* 2001;906:459-81.
11. Li S, Lloyd DK. Direct chiral separations by capillary electrophoresis using capillaries packed with an alpha(1)-acid glycoprotein chiral stationary phase. *Anal Chem* 1993;65:3684-90.
12. Lloyd DK, Li S, Ryan P. Protein chiral selectors in free-solution capillary electrophoresis and packed-capillary electrochromatography. *J Chromatogr A* 1995;694:285-96.
13. Noctor TAG, Wainer IW. The in situ acetylation of an immobilized human serum albumin chiral stationary phase for high-performance liquid chromatography in the examination of drug-protein binding phenomena. *Pharm Res* 1992;9:480-4.
14. Bornscheuer UT, Kazlauskas RJ. Hydrolases in organic chemistry. Weinheim: Verlag Chemie; 1999.
15. Kamal A, Ramesh Khanna GB, Ramu R. Chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of fluoxetine, tomoxetine and nisoxetine: lipase-catalyzed resolution of 3-aryl-3-hydroxypropanenitriles. *Tetrahedron: Asymmetry* 2002;13:2039-51.
16. Kielbasiński P, Góralczyk P, Mikołajczyk M, Wieczorek MW, Majzner WR. Enzyme-promoted kinetic resolution of racemic, P-chiral phosphonyl and phosphorylacetates. *Tetrahedron: Asymmetry* 1998;9:2641-50.
17. Benschop HP, DeJong LPA. Toxicokinetics of nerve agents I: Somani SM, Romano JA, urednici. Chemical warfare agents: Toxicity at low levels. Boca Raton (FL): CRC Press LLC; 2001. str. 25-120.
18. Prelog V. Specification of the stereospecificity of some oxidoreductases by diamond lattice sections. *Pure Appl Chem* 1964;9:119-30.
19. Kawai Y, Hida K, Dao DH, Ohno A. Asymmetric synthesis of beta-hydroxy esters having three consecutive chiral centers with a reductase from bakers' yeast. *Tetrahedron Lett* 1998;39:9219-22.
20. Kawai Y, Hayashi M, Inaba Y, Saitou K, Ohno A. Asymmetric reduction of alpha,beta-unsaturated ketones with

- a carbon-carbon double-bond reductase from baker's yeast. *Tetrahedron Lett* 1998;39:5225-8.
21. Rosche B, Sandford V, Leksawasdi N, Chen A, Satiyanegara G, Gunawan C, Breuer M, Hauer B, Rogers P. Bioprocess development for ephedrine production [sažetak]. *Chem Listy* 2003;97:506.
 22. Hirata T, Izumi S, Ogura M, Yawata T. Epoxidation of styrenes with the peroxidase from the cultured cells of *Nicotiana tabacum*. *Tetrahedron* 1998;54:15993-16003.
 23. Andersson MA, Allenmark SG. Asymmetric sulfoxidation catalyzed by a vanadium bromoperoxidase: Substrate requirements of the catalyst. *Tetrahedron* 1998;54:15293-304.
 24. Bravo P, Resnati G, Viani F. Synthesis of optically pure α -methylene- γ -lactones from (+)-R-(4-methylphenyl)-alkylsulphoxides. *Tetrahedron Lett* 1985;26:2913-6.
 25. Solladie G. Asymmetric synthesis using nucleophilic reagents containing a chiral sulfoxide group. *Synthesis* 1981:185-96.
 26. Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, Haas MJ. Customising lipases for biocatalysis. *J Mol Catal B: Enzym* 2000;9:113-48.
 27. Hutt AJ. The development of single-isomer molecules: why and how. *CNS Spectrums* 2002;7 supl 1:14-22.
 28. Almansa C, Gomez LA, Cavalcanti FL, de Arriba AF, Rodriguez R, Carceller E, Garcia-Rafanell J, Forn J. Diphenylpropionic acids as new AT1 selective angiotensin II antagonists. *J Med Chem* 1996;39:2197-2206.
 29. Sanchez C, Bergqvist PB, Brennum LT, Gupta S, Hogg S, Larsen A, Wiborg O. Escitalopram, the S-(+)-enantiomer of citalopram, is a selective serotonin reuptake inhibitor with potent effects in animal models predictive of antidepressant and anxiolytic activities. *Psychopharmacology* 2003;167:353-62.
 30. Corey EJ, Reichard GA. Enantioselective and practical syntheses of R- and S-fluoxetine. *Tetrahedron Lett* 1989;30:5207-10.
 31. Page CP, Morley J. Contrasting properties of albuterol stereoisomers. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:31-41.
 32. Fawcett JP, Boulton DW. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single oral doses of albuterol and its enantiomers in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:138-44.
 33. Gumbhir-Shah K, Kellerman DJ, DeGraw S, Koch P, Jusko WJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics and safety of inhaled albuterol enantiomers in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 1998;38:1096-106.
 34. Ohta T, Takaya H, Noyori R. BINAP-Ruthenium(II) dicarboxylate complexes - New, highly efficient catalysts for asymmetric hydrogenations. *Inorg Chem* 1988;27:566-9.
 35. Asinger F, Offermanns H. Syntheses with ketones, sulfur, and ammonia or amines at room temperature. *Angew Chem Int Ed Engl* 1967;6:907-19.
 36. Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Benschop HP, De Jong LPA, Ariel N, Barak R, Segall Y, Velan B, Shafferman A. Exploring the active center of human acetylcholinesterase with stereoisomers of an organophosphorus inhibitor with two chiral centers. *Biochemistry* 1999;38:3055-66.
 37. Benschop HP, De Jong LPA. Nerve agents stereoisomers: Analysis, isolation and toxicology. *Acc Chem Res* 1988;21:368-74.

Summary

PREPARATIONS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF CHIRAL COMPOUNDS

Enantiomers of chiral compounds may express various biological activities and also different toxicities. Examples of different pharmacological effects of some chiral drugs such as fluoxetine, penicillamine, ibuprofen and albuterol are provided in this paper. Due to possible differences in activity, the chiral drugs are required to be pure enantiomeric compounds in order to be more effective and safer to use. In the laboratory, enantiomers are mainly synthesized as racemates (an equimolar mixture of enantiomers) while in biological pathways only one enantiomeric form is produced, such as amino acids, sugars and lipids. This paper presents the principles of chirality, general information about enantiomers and their biological aspects. It gives an outline of stereoselective methods for chromatographic resolution of enantiomers with stereoselective protein stationary phases, i.e. capillary electrochromatography (CEC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The use of enzyme biotransformations (hydrolysis, oxidation and reduction) in chiral syntheses of carboxyl-, phosphoryl- or β -hydroxy esters, alcohols, epoxides and cis-carboxyl sulphoxide is described. This article also includes an example of lipase stereoselectivity improvement by amino acid mutations within the enzyme active site.

KEY WORDS: *chiral drugs, chromatography, enzyme biotransformations, resolution of enantiomers, stereoselectivity*

REQUESTS FOR REPRINTS:

Goran Šinko, dipl. ing. kem.
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Ksaverska cesta 2, p. p. 291
HR-10 000 Zagreb, Hrvatska
E-mail: gsinko@imi.hr