

# Prólogo

*Fidel Ortega Ortiz de Apodaca*

*Académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia*

El uso de biocatalizadores en síntesis orgánica se ha convertido en una práctica habitual complementaria a los procesos industriales convencionales, introduciendo novedosas utilidades y aplicaciones, especialmente en la obtención de moléculas de alto valor añadido.

A lo largo de esta monografía, que representa la nº 35 de esta Real Academia, los lectores descubrirán un abanico de opciones y posibilidades que introduce el empleo de los biocatalizadores y que inciden de lleno en el ámbito de la biología molecular, la biotecnología y la química sostenible.

Los autores abordan de manera magistral los diferentes campos asociados haciendo especial hincapié en la síntesis selectiva de fármacos como, por ejemplo, la preparación de fármacos homóqu岸ales de importancia fundamental en la eficacia y seguridad de numerosos medicamentos.

En el capítulo 1º el profesor Ballesteros, hace una revisión en la que se presenta una interesante secuencia de la evolución del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, abordando los diferentes temas de investigación desarrollados por él y su equipo desde el año 1969. Comenzando con las enzimas de biosíntesis de Histidina en *Escherichia coli*, consiguiendo obtener y mapear excelentes mutantes

reguladores en el operón y mapear los genes reguladores hisO, hisR, hisS y hisT. En 1973 profundizaron en la investigación con nucleasa de *Staphylococcus aureus* inmovilizada sobre soportes sólidos insolubles para su utilización en catálisis heterogénea, ensayando con soportes de agarosa y diferentes sistemas de inmovilización para aplicaciones prácticas, lo que dio origen a numerosas tesis doctorales, en una línea de investigación que se prolongó hasta el año 1991. En el año 1976, iniciaron otra línea de investigación con hidrogenasas de *C. pasterianum* y de *C. vinosum*, fruto de una estancia del profesor Ballesteros en el laboratorio del profesor Nathan Kaplan en la universidad de California. A medida que progresó la investigación utilizaron hidrogenasas de otras procedencias como el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* o la *Bradyrhizobium japonicum*, profundizando en el complejo sistema de la biofotólisis del agua con fines prácticos. En el año 1987 se inicia la línea de investigación del Instituto con mayor potencial industrial. El uso de las lipasas y las enzimas relacionadas. Se comienza con la presente en *C. rugosa* inmovilizada sobre Sepharosa, consiguiendo importantes avances en la desacilación de derivados de beta-D-galactopiranosas y en la acilación regioselectiva de la sacarosa y en la preparación enzimática de aditivos alimentarios. La incorporación de las nuevas tecnologías de inmovilización sol-gel en el año 1993, abrió las puertas a nuevas alternativas de atrapamiento de biocatalizadores y también al desarrollo de biosensores y de ligandos para biodiagnóstico. Dentro del IV Programa Marco de la Unión Europea se financió un proyecto europeo que les permitió investigaciones sobre enzimas cuyos sustratos fueran glúcidos, como la Ciclodextrina glucosiltransferasa (CGTasa) y la Dextran-sacarasa (DSasa) del que salieron también numerosas tesis doctorales con diferentes aplicaciones de interés, como la

obtención de oligosacáridos prebióticos como los fructooligosacáridos (FOS). En el año 2006, introdujeron una nueva línea de investigación usando enzimas diversas para la modificación química de vitaminas antioxidantes (vitaminas C y E) y de resveratrol, así como en la aplicación de nuevas herramientas moleculares aplicadas en biocatálisis, tales como la mutagenómica y la evolución molecular dirigida. El autor finaliza con unas reflexiones finales sobre los años pasados, con especial énfasis en las posibilidades que, a su juicio, tendrán mayor impacto y relevancia en el futuro. Aporta 130 citas bibliográficas de gran interés.

En el tema 2º se aborda la fermentación industrial para la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico. En el capítulo, los doctores Francesco Molinari y Flavia Marinelli, introducen el tema resaltando su importancia en los últimos 5 años, con un mercado de 50 billones de dólares y resumiendo su interesante evolución histórica desde el siglo XIX, destacando que la mayoría de los antibióticos del mercado hoy en día son modificaciones semisintéticas de los productos microbianos de fermentación. Continúa detallando los procesos productivos, describiendo diferentes síntesis de medicamentos utilizando estrategias avanzadas como la mutagénesis o los programas de mejora de líneas, profundizando en las síntesis de estatinas, de antibióticos antibacterianos, reseñando en estos últimos el problema de las resistencias y los avances con nuevos medicamentos para minimizarlas, los antibióticos antitumorales y de los agentes inmunosupresores. Aporta 51 citas bibliográficas.

En el capítulo 3º, el Dr. José Manuel Guisán describe los diferentes sistemas de enzimas inmovilizados con la finalidad de conseguir su mejora funcional. En primer lugar, describe las estrategias de purificación de éstos a través de las

diferentes variantes cromatográficas y diferenciando las metodologías que se utilizan con las enzimas nativos y los de naturaleza recombinante. Relaciona las diferentes alternativas de inmovilización en función de las características de los soportes y la activación de sus grupos funcionales. Entre las mejoras que el autor refiere con los sistemas de enzimas inmovilizados, indica: Hiperactivación de lipasas, la rigidificación orientada y dirigida, la estabilización frente a codisolventes orgánicos o la reactivación de enzimas con recuperación de la actividad catalítica inicial. Aporta 23 referencias bibliográficas.

En el capítulo 4, el Dr. Josep-Vicent Sinisterra desarrolla diferentes aplicaciones del empleo de células enteras como biocatalizadores en la síntesis de moléculas de alto valor añadido. Aborda distintas reacciones de síntesis orgánica que utilizan procesos bioespecíficos como la reducción bioselectiva de fármacos homoquirales, la oxidación de alcoholes empleando las ADHs intracelulares de *Acetobacter acetii* o *Gluconobacter oxidans*, la oxidación de arenos mediante un complejo multienzimático utilizando un mutante de *Pseudomonas putida*, la hidroxilación asimétrica de alcanos y terpenos utilizando hongos como *Rhizopus nigricans* o la monohidroxilación estereoselectiva de alquilbencenos usando células enteras de *Bacillus megaterium* inmovilizadas en alginato. Describe, también con detalle, la hidroxilación de esteroides por su interés farmacológico, pormenorizando por ejemplo, como la hidroxilación microbiana para dar derivados de cortisona, simplificó la síntesis de corticoides reduciendo el precio de la cortisona de 200 a 2 \$USA/g. Especifica también, la oxidación microbiana de Baeyer-Villiger por su gran interés en la obtención de lactinas a partir de cetonas de manera regioselectiva y el uso de las haloperidasas para la halogenación selectiva de compuestos orgánicos.

Aborda la síntesis de nucleósidos utilizando células enteras debido a su potencial terapéutico como antivíricos y antitumorales, empleando la nucleósido-oxidasa de *Stenotrophomonas maltophilia* o las nucleósido fosforilasas que catalizan la fosforólisis reversible de nucleósidos en su síntesis por transglicosilación. Aporta 52 citas bibliográficas.

En el capítulo 5º el Dr. José María Sánchez Montero, académico correspondiente de la RANF, describe los medios no convencionales en la ingeniería del medio de reacción. El autor, se centra en los procesos biocatalíticos utilizando medios no acuosos. Detalla en primer lugar las ventajas y los inconvenientes del uso de las enzimas en medios orgánicos, continuando con las estrategias utilizadas para trabajar con ellas en estos medios y en particular los cuatro sistemas principales: mezclas miscibles agua cosolvente orgánico en sistemas monofásicos, agua disolvente orgánico inmiscible en sistemas bifásicos, sistemas micelares reversos y medios orgánicos secos. Repasa posteriormente, los efectos del agua y la naturaleza del disolvente sobre la actividad, selectividad y estabilidad de las enzimas. Realiza una importante contribución a los métodos de modelado molecular en el estudio del efecto de los disolventes, terminando con un repaso del empleo de los líquidos iónicos y de los fluidos supercríticos en biocatálisis. Aporta 86 citas bibliográficas.

En el capítulo 6º, la Dra. María J. Hernáiz, aborda el estudio de la Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos a través del uso de enzimas hidrolíticas, cuya utilización representa el 60% de los procesos biocatalíticos. A lo largo del capítulo la autora profundiza en el empleo de las lipasas destacando su versatilidad ante sustratos tanto naturales como no naturales en diferentes condiciones

experimentales y en un amplio número de metodologías sintéticas y en particular la enantioselectiva. Hace especial hincapié en la lipasa procedente de la *Candida rugosa* para la síntesis de antiinflamatorios no esteroídicos (profenos), la lipasa de *Candida antarctica* en la síntesis del antifúngico SCH56592, 14, del antitrombótico Lotrafibrán S-16 y en la de nuevos antibióticos  $\beta$ -lactámicos que presentan una estructura tricíclica; la lipasa de páncreas porcino en la síntesis de ariloxipropanolaminas que constituyen un extenso e importante grupo de fármacos  $\beta$ -bloqueantes utilizados en el tratamiento de la hipertensión y cuya actividad terapéutica sólo aparece en los enantiómeros (S), la lipasa de *Serratia marescens* en la síntesis de Diltiazem y la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* en la síntesis del Carbovir. Profundiza, igualmente, en el empleo de las proteasas, destacando el papel de la tripsina en la síntesis de la insulina con el concurso de células de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas genéticamente, la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* en la síntesis de remikiren y ciprokiren, inhibidores directos de renina. Finaliza el capítulo detallando la utilización de las enzimas Penicilin G acilasas para la síntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incorporando una valiosa tabla descriptiva de los procesos de síntesis abordados. Aporta 88 citas bibliográficas.

En el capítulo 7º, el Dr. Andrés Rafael Alcántara, perteneciente al grupo de Biotransformaciones del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, continúa con el estudio de la Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos, ahora mediante el uso de enzimas redox. El autor, después de una interesante introducción donde clasifica las diferentes enzimas empleadas, aborda en primer lugar las biooxidaciones catalizadas por oxidorreductasas, particularizando el interés de la regioselectividad

de las reacciones catalizadas por deshidrogenasas, la oxidación enantioselectiva mediada por oxidasas, biotransformaciones selectivas con oxigenasas a través de la introducción específica de átomos de oxígeno en el sustrato en condiciones de reacción muy suaves, como la 6 $\beta$ -Monohidroxilación de la simvastatina para producir un metabolito con mayor actividad anticolesterolémica o la biotransformación de la compactina para la obtención de la pravastina. Continúa con las reducciones catalizadas por oxidorreductasas y por su interés, clasifica en 4 superfamilias las enzimas utilizadas para la biorreducción de compuestos carbonílicos, para las que se utiliza el término genérico de Carbonil Reductasas. Destaca su utilización tanto con células enteras como con enzimas aisladas en la química sostenible y el grado de estereoselectividad y productividad que cada una de las opciones conlleva, así como la necesaria utilización de cofactores y los procesos empleados para su regeneración. Detalla en una tabla de gran interés más de 50 reacciones de biorreducción empleadas a escala preparativa o industrial y clasificada según el tipo de sustrato utilizado. Finaliza, comentando algunos ejemplos interesantes como: la síntesis de del (S)-3,5-bistrifluorometilfenil etanol, un intermedio de antagonistas de receptores K-1, puesta a punto a través de la reducción asimétrica de la 3,5-bistrifluorometil acetofenona utilizando como biocatalizador una alcohol deshidrogenasa de *Rhodococcus erythropolis* o la síntesis de Atazanavir, un inhibidor de la proteasa del VIH, a través de la producción un alcohol intermediario mediante la biorreducción del ácido (1S)-[3-cloro-2-oxol-(fenilmetil)propil] carbámico empleando células enteras de *R. erythropolis*. Aporta 139 citas bibliográficas.

En el capítulo 8º, el Dr Miguel Alcalde, del Departamento de Biocatálisis en el Instituto de Catálisis del CSIC en Madrid, aborda los fundamentos de evolución

molecular dirigida de enzimas *in vitro*, como una herramienta de ingeniería de proteínas para la mejora de características determinadas o para crear nuevas funciones enzimáticas no requeridas en ambientes naturales, haciendo hincapié en la evolución molecular dirigida o evolución. En este sentido, profundiza en los pasos necesarios para su desarrollo, tales como la necesaria selección del organismo hospedador para la expresión funcional de la enzima a evolucionar, los métodos de generación de diversidad para abordar el estudio del espacio de secuencia proteica, analizando la mutagénesis aleatoria, los métodos de recombinación del DNA, tanto *in vitro* como *in vivo*, y el diseño de métodos de screening o exploración para mejorar la característica enzimática marcada como objetivo evolutivo. Finaliza, describiendo las nuevas metodologías de exploración del espacio de secuencia proteica mediante estudios “semi-rationales”. Aporta 99 referencias bibliográficas.

En el capítulo 9º, los doctores María-Eugenia Guazzaroni, Lucía Fernández, Nieves López-Cortés y Manuel Ferrer, pertenecientes al Instituto de Catálisis del CSIC, describen la era postgenómica para el desarrollo de nuevos biocatalizadores, analizando las diferentes estrategias para aislar nuevas enzimas y como la aplicación directa de la (meta-) genómica sobre las comunidades microbianas y sus enzimas revierte en una amplia gama de aplicaciones biomédicas, industriales y ambientales. Introducen las características del biocatalizador ideal y abordan las técnicas para el descubrimiento de nuevos biocatalizadores, haciendo particular hincapié en los métodos de tamizado clásico de microorganismos usando una colección establecida de cepas microbianas, los tamizados moleculares empleando herramientas genómicas, proteómicas y metabolómicas, acopladas con análisis bioinformáticos y computacionales, y los métodos de evolución molecular mediante

ingeniería iterativa de proteínas. Finalizan el capítulo abordando los biocatalizadores desarrollados por (meta-) genómica y proporcionan un valioso listado con aquellos con un potencial interés en biotransformaciones desarrollados por estas técnicas en los últimos años. Aportan 200 citas bibliográficas.

En el capítulo 10º y último, los doctores Andrés Rafael Alcántara y José María Sánchez Montero, desarrollan los modelos de predicción y simulación de procesos y su aplicación en el campo de la Biocatálisis, profundizando de manera detallada en los diferentes niveles de intervención de acuerdo con los modelos desarrollados en este campo y que clasifican en cuatro áreas diferentes, según su nivel de aplicación: el **Catalizador**: en el que proponen modelos que describen la catálisis a nivel molecular, posibilitando una predicción de la selectividad de la reacción, la **Reacción**: a través de modelos cinéticos que describan el mecanismo y velocidades intrínsecas, el **Reactor**: desarrollando modelos cinéticos que describan la cinética de la reacción observada en los mismos, incorporando tanto balances de materia como condiciones hidrodinámicas, y el **Proceso**: mediante modelos para el análisis de los resultados globales del mismo, incluyendo las interacciones entre las diferentes unidades y operaciones implicadas en un diagrama de flujo del proceso. Abordan los modernos métodos de modelado molecular como el “docking” que permite interpretar la actividad o inactividad de las moléculas en términos de complementariedad con el receptor o el análisis comparativo de las características estructurales de sustancias conocidas activas o inactivas, mediante las Relaciones Espaciales Cuantitativas Estructura Actividad (QSAR 3D), aplicándolos al reconocimiento enzima-sustrato y selectividad de la enzima, la simulación de

análogos del estado de transición y la predicción de la enantioselectividad, entre otros. Aportan 58 citas bibliográficas.

No cabe duda de que la profundidad, el enfoque y el contenido de los temas tratados en esta monografía confiere a la obra un indudable valor, no sólo por la actualidad de los mismos sino también por el rigor y la profesionalidad con que los diferentes autores los han desarrollado. Considero que la Real Academia Nacional de Farmacia se enriquece una vez más promoviendo este tipo de iniciativas. Por ello, me permito en nombre de esta Corporación agradecer a los autores el esfuerzo realizado, con la seguridad de que su trabajo se verá recompensado con la satisfacción que los lectores obtengan de su lectura.