



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**“EMPLEO DE LIPASAS EN LA PREPARACIÓN DE
MOLECULAS QUIRALES COMO INTERMEDIOS EN
LA SÍNTESIS DE FÁRMACOS I”**

Autor: SILVIA MARTÍN MARTÍN

Tutor: PILAR HOYOS VIDAL

Convocatoria: JUNIO 2017

ÍNDICE

1. Resumen.....	Página 3
2. Introducción y Antecedentes.....	Página 3
3. Objetivos.....	Página 9
4. Metodología.....	Página 9
5. Resultados y Discusión.....	Página 10
6. Conclusiones.....	Página 18
7. Bibliografía.....	Página 19

1. RESUMEN

La preparación de compuestos enantioméricamente puros es uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica, ya que la quiralidad es un factor del que dependen tanto la actividad como la toxicidad de muchos fármacos. Hoy en día, el método más empleado para la obtención de enantiómeros puros es la resolución cinética de mezclas racémicas, destacando en este ámbito la aplicación de estrategias biocatalíticas, así enzimas o células enteras como biocatalizadores en síntesis orgánica.

Diversas características de las enzimas, tales como su elevada regio-, quimio- y estereoselectividad, así como su respeto hacia el medio ambiente (catalizan reacciones bajo condiciones suaves de reacción, cumpliendo diferentes principios de la Química Sostenible), han permitido a la biocatálisis convertirse en una de las estrategias sintéticas más útiles y prometedoras en el desarrollo de fármacos enantioméricamente puros.

En este trabajo, además de describir a grandes rasgos las características de la biocatálisis, se expone el uso de las lipasas en la obtención de intermedios quirales, profundizando en su utilización en la síntesis de profenos y de pregabalina.

Palabras clave: Biocatalizadores; Hidrolasas; Lipasas; Biotransformaciones; Quiralidad; Enantiómeros; Química Sostenible; Fármacos; Profenos; Pregabalina.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Hoy en día existe un creciente interés de las industrias farmacéutica y agroalimentaria en la obtención de compuestos quirales, ya que la actividad biológica de muchas moléculas va a depender de su quiralidad (un gran número de fármacos contienen centros quirales). En muchos casos, uno de los enantiómeros es más eficaz que otro, siendo importante saber cuál es el estereoisómero que tiene la actividad biológica deseada. De esta manera, al administrar el estereoisómero activo se evita el consumo innecesario de la sustancia y se reduce al mínimo los efectos secundarios⁽¹⁾.

Cada uno de los enantiómeros de una mezcla racémica puede presentar distinta farmacocinética, biodisponibilidad y actividad farmacológica, aunque ambos presenten las mismas propiedades fisicoquímicas. La diferencia estructural entre enantiómeros puede ser muy importante con respecto a la acción de fármacos, dado que la mayoría de receptores que se encuentran en el organismo interactúan únicamente con un determinado enantiómero.

Para poder diferenciar un enantiómero de otro, se establecen dos conceptos: eutómero para el más activo y distómero para el de menor actividad. En algunos casos el distómero es inocuo para el organismo, pero en otros muchos puede inhibir el efecto del eutómero, o presentar otra actividad. Se dan casos también en los que el efecto sea producido por uno solo enantiómero, pero no implica que el otro carezca de actividad biológica, al presentar inversión quiral. Este último fenómeno se trata de un proceso generalmente unidireccional, que permite la transformación del enantiómero “inactivo” en la forma enantiomérica “activa” responsable de los efectos terapéuticos. Este fenómeno se puede decir que es un proceso metabólico ampliamente variable y fuertemente dependiente del fármaco, de la especie y del estado fisiológico.

Existen diversas ventajas potenciales asociadas al uso de productos enantioméricos puros, entre las que se incluyen ⁽²⁾:

- Un aumento en la selectividad del perfil farmacológico del fármaco.
- La posibilidad de presentar un índice terapéutico mayor.
- Un perfil farmacocinético menos complejo.
- Una menor capacidad para producir interacciones medicamentosas complejas.
- Una relación concentración plasmática-efecto simplificada.

Por todo ello, la fabricación de la forma activa o enantiómero puro, de muchas sustancias, se ha convertido en uno de los objetivos primordiales de la industria farmacéutica.

En este contexto, la biocatálisis aparece como una herramienta extraordinariamente útil en la preparación de moléculas quirales. Por ello, en los últimos años, se ha apreciado un aumento del uso de procesos biocatalíticos en la industria, en sectores muy diversos tales como la industria farmacéutica, química, alimentaria, cosmética, textil, piensos y papelera. Además, los procesos biocatalíticos colaboran activamente en el desarrollo de procesos más sostenible, lo que, unido a otras ventajas que se comentarán más adelante, aumenta todavía más el interés por su utilización, especialmente en la industria farmacéutica.

La Biocatálisis (o Biotransformaciones) se define como la mediación de reacciones químicas por sistemas biológicos, incluyendo enzimas aislados o células enteras ⁽³⁾.

Las enzimas presentan elevada regioselectividad, quimioselectividad y estereoselectividad, lo que hace que los métodos biocatalíticos se categoricen de mejor elección que los químicos en múltiples procesos. Los avances en la modificación estructural de las enzimas permiten la creación de nuevas moléculas proteicas con actividades catalíticas

hechas a la medida de las necesidades (como la preparación de enzimas termoestables o estables a cierto pH, por medio de la mutagénesis aleatoria o dirigida) ⁽⁴⁾.

Los compuestos enantiopuros son el objetivo mayoritario de las biotransformaciones en síntesis orgánica. Dichas biotransformaciones se realizan evitando condiciones extremas, a temperatura ambiente y presión atmosférica (evitando isomerizaciones, racemizaciones, epimerizaciones o transposiciones). Además, encuentran aplicación en la preparación de algunos compuestos en los que la transformación química es, hasta ahora, imposible.

Las enzimas utilizadas como catalizadores de reacciones orgánicas se pueden dividir en seis grupos: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Existe una relación entre el porcentaje de ventas de enzimas con su empleo, aunque existen variaciones en función del tipo de proceso biocatalítico del que se trate ⁽⁵⁾. Como se puede apreciar en la Figura 1, la mayoría de los procesos biocatalíticos se desarrollan con la utilización de hidrolasas (60%), seguido de oxidorreductasas (25 %); los otros 4 grupos de enzimas constituyen el 15 % restante ⁽³⁾.

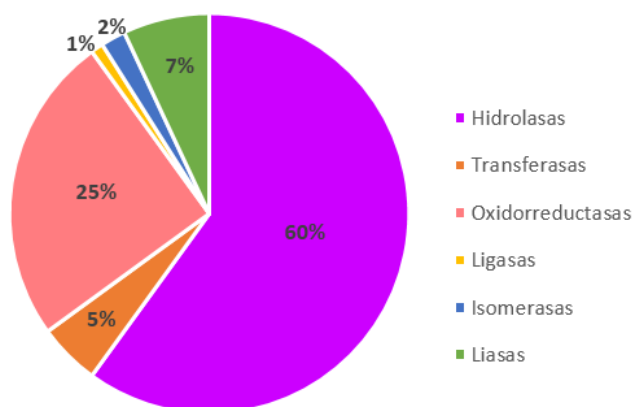


Figura 1.-Tipos de enzimas más utilizadas en biocatálisis

La utilización de biocatalizadores en síntesis presenta una serie de ventajas ⁽³⁾:

- Son catalizadores eficientes, que actúan en intervalos de temperatura moderada (20-40°C) y presión atmosférica, minimizando los problemas de epimerización, racemización e isomerización que puedan ocurrir.
- Presentan una elevada selectividad: regioselectividad, quimioselectividad y enantioselectividad.
- Su actividad no queda restringida a sus sustratos naturales, sino que admiten una gran variedad de sustratos.

- Pueden catalizar un extenso abanico de reacciones, incluso llevar a cabo reacciones que químicamente no se podría, sobre grupos no activados del sustrato.
- Principalmente las hidrolasas, presentan actividad catalítica en medios orgánicos, lo que permite la transformación de sustratos hidrofóbicos.
- Los biocatalizadores pueden ser inmovilizados, lo que aumenta su actividad en determinados casos, y reutilizados en diferentes ciclos ⁽⁶⁾.
- Las reacciones biocatalizadas son altamente compatibles con el medio ambiente, cumpliéndose los principios de la Química Sostenible.
- Contribuyen al desarrollo de procesos ambientalmente benignos para la obtención de productos de alto valor añadido.
- Los biocatalizadores son biodegradables.
- Las enzimas pueden ser sobreexpresadas, haciendo así los procesos biotecnológicos económicamente eficientes. La sostenibilidad de un proceso incluye la energía y materia prima utilizadas, las pérdidas de rendimiento con productos secundarios, la seguridad del proceso y la calidad del producto.

Frente a estas ventajas, la utilización de enzimas o de células enteras también presenta limitaciones:

- Muchas presentan actividad en un rango estrecho de pH y temperatura, pudiendo desactivarse fácilmente fuera de esos límites.
- La gran mayoría son susceptibles de sufrir inhibición por el sustrato o por el producto.
- Su actividad natural se lleva a cabo en medios acuosos, por lo que algunas pueden ser desactivadas en medios orgánicos.
- La necesidad de utilizar un co-sustrato o cofactor, lo que aumenta el coste del proceso.

Sin embargo, estos problemas pueden solucionarse gracias a técnicas como la inmovilización enzimática, sistemas eficientes de regeneración del cofactor y el desarrollo de nuevas enzimas más estables mediante ingeniería genética. Se obtienen grandes ventajas, resaltando el aumento de la estabilidad (térmica y química) de la enzima, la reutilización de los derivados inmovilizados y la obtención de una mayor rigidez. Sin embargo, pueden perder parte de su actividad catalítica y la enantioselectividad del catalizador al comprometer el sitio activo por la unión al soporte ⁽⁷⁾.

En la actualidad, se están desarrollando técnicas tales como procesos de evolución dirigida, que harán que en un futuro se incremente enormemente la implementación de procesos biocatalíticos en la industria. Mediante estas técnicas se puede llevar a cabo el

desarrollo de biocatalizadores más específicos, aumentando su actividad, su resistencia y su enantioselectividad, que incluso puede ser invertida.

Uno de los aspectos de la biocatálisis que se ha mencionado anteriormente es su baja agresividad con el medio ambiente. El interés en el desarrollo de procesos de este tipo en industrias químicas o biotecnológicas ha ido creciendo considerablemente a lo largo de los últimos años, conociéndose como tecnologías sostenibles y siendo definidas como Green Chemistry y White biotechnology (química verde y biotecnología blanca) ⁽⁷⁾.

En 1991 se acuñó el término “Química Verde” para definir el diseño de nuevos productos y procesos químicos que reducen o eliminan el uso y la generación de sustancias peligrosas. Las diferentes aproximaciones al desarrollo de una producción química más sostenible se resumen bien en los 12 principios de la Química Verde propuestos originalmente por Anastas y Warner en 1998 ⁽⁸⁾:

1. Minimizar la generación de residuos
2. Utilizar materias primas renovables
3. Evitar pasos de protección y desprotección innecesarios
4. Emplear productos químicos que sean inocuos para el medio ambiente
5. Diseñar métodos sintéticos con baja o inexistente toxicidad
6. Utilizar catalizadores lo más selectivos posible
7. Utilizar condiciones suaves de reacción
8. Desarrollar métodos analíticos para realizar un seguimiento en tiempo real de las reacciones
9. Minimizar el uso de compuestos auxiliares
10. Economía atómica: diseñar rutas sintéticas que minimicen los residuos
11. Sintetizar productos químicos de baja toxicidad
12. Emplear sustancias que minimicen el riesgo de accidentes

La aplicación de estas estrategias en la implementación de procesos innovadores, contribuirá a la sostenibilidad del Planeta en la sociedad, la economía y el ambiente ⁽⁹⁾.

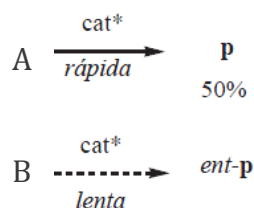
Los métodos clásicos para la producción de compuestos ópticamente activos se agrupan normalmente en tres categorías: a partir de fuentes naturales, síntesis asimétrica y resolución de mezclas racémicas.

En referencia a la primera alternativa, los carbohidratos, los aminoácidos, los terpenos, los hidroxiácidos y los alcaloides son las sustancias de partida más frecuentemente empleadas

para la síntesis de compuestos con amplia diversidad estructural. La existencia en muchos casos de un único enantiómero de las sustancias de partida, es el principal inconveniente ya que el contrario suele ser extremadamente caro o no asequible.

El término síntesis asimétrica se refiere a la formación preferente de un enantiómero cuando se forma un nuevo centro estereogénico en reacciones llevadas a cabo en un ambiente quiral. La propia asimetría de la naturaleza es la última fuente de quiralidad en todas las síntesis asimétricas artificiales, ya que la formación estereoselectiva de un nuevo centro estereogénico en el sustrato requiere la influencia de un grupo quiral, que en última instancia deriva de un compuesto quiral natural ⁽⁸⁾.

Por último, la resolución cinética (KR) se trata de una de las transformaciones más comunes para preparar compuestos enantiopuros, y es en este campo donde la biocatálisis ofrece un gran número de posibilidades en la industria farmacéutica. Esto es debido a que las enzimas son capaces de discriminar entre los dos enantiómeros de una mezcla racémica, de tal forma que uno de los enantiómeros es fácilmente transformado en su respectivo producto, más rápido que el otro.



Esquema 1.- Resolución Cinética catalítica (cat* = catalizador enzimático).

Este proceso tiene lugar de manera que en el estado inicial de la reacción, la enzima ataca preferentemente al enantiómero reactante A (reactante más rápido) y lo transforma en su respectivo producto P, mientras que la concentración del enantiómero B (reactante lento) se encuentra prácticamente inalterado (Esquema 1).

Cuando se establece el equilibrio de dicho enantiómero, la concentración del sustrato lento (enantiómero B) comienza a cambiar, disminuyendo la pureza óptica del sustrato remanente lento y del producto P. Por esta razón, el tiempo óptimo para terminar la resolución es cuando se haya alcanzado el equilibrio del reactante más rápido ^(6,8).

En la mayoría de las resoluciones cinéticas catalizadas por un enzima no se observa este comportamiento ideal, sólo se puede alcanzar un 50 % máximo de rendimiento ⁽¹⁰⁾.

Para superar esta limitación y obtener productos con la misma pureza enantiomérica pero con un rendimiento mejorado, se ha llevado a la evolución de la resolución cinética

clásica hasta la resolución cinética dinámica (DKR), que combina el paso de la resolución cinética con un equilibrio *in situ* o racemización de un sustrato quiral por métodos químicos, biocatalíticos o incluso de manera espontánea. De este modo, todo el material racémico de partida podría convertirse en última instancia en un único enantiómero ⁽⁸⁾.

El grupo de las hidrolasas constituye el grupo enzimático más utilizado como biocatalizadores de procesos de resolución cinética, y más concretamente el grupo de lipasas, que se han convertido probablemente en el conjunto más empleado en la industria farmacéutica en la obtención de intermedios quirales a través de procesos resolutivos, como se mostrará en este trabajo.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta revisión bibliográfica ha sido estudiar el empleo de lipasas en la preparación de moléculas quirales como intermedios en la síntesis de fármacos, en concreto la lipasa de *Candida rugosa* para la obtención de antiinflamatorios no esteroídicos, también conocidos como los profenos (ácidos 2-arilpropiónicos), y por otro lado, la síntesis de la Pregabalina.

4. METODOLOGÍA

El método principal utilizado en este trabajo fue la revisión bibliográfica.

Se utilizaron herramientas como:

- los motores de búsqueda de artículos científicos consultando las bases PubMed, ScienceDirect, Elsevier Journals, SciFinder, UpToDate (combinando palabras clave como biocatalizadores, hidrolasas, lipasas, biotransformaciones, quiral, química verde, fármacos)
- búsqueda en “Google académico” de artículos científicos con los mismos términos anteriores
- monografías por principio activo en Vademécum
- la página web de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

A continuación, se han seleccionado y estudiado los artículos encontrados, basándose en primer lugar en la lectura del “abstract” de cada uno, y, en caso de concordancia con el objeto de estudio, el artículo completo.

A partir de las ideas sustraídas de cada uno de los artículos seleccionados se ha procedido a la redacción atendiendo a la estructura establecida para la realización del Trabajo de Fin de Grado por la Facultad de Farmacia.

Por último, se ha añadido al final del trabajo la bibliografía utilizada, siguiendo la aparición cronológica en el texto.

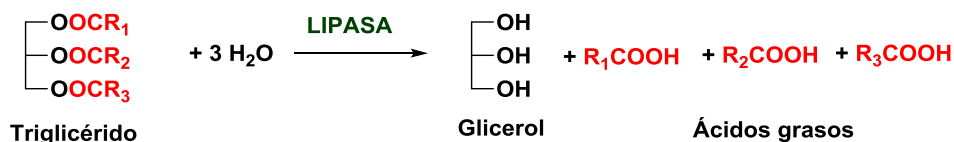
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro del gran grupo de las hidrolasas, las lipasas han sido las enzimas más utilizadas en la industria farmacéutica para la producción de fármacos y sus intermedios. En concreto, su empleo se ha visto incrementado en las últimas décadas, debido a sus características de regioselectividad, quimioselectividad y estereoselectividad en los procesos de resolución de racematos.

En comparación con otros enzimas, presentan una amplia tolerancia al sustrato, conservando su estabilidad y actividad en la presencia de varios disolventes orgánicos. Además, no requieren cofactores, y su empleo implica la obtención del producto sin generar casi subproductos y a un bajo coste ^(1,4).

Su actividad catalítica se ve incrementada cuando se encuentran en una interfase agua/lípido, teniendo lugar un fenómeno que se ha denominado activación interfacial.

Las lipasas son triacilglicerol-hidrolasas, que de manera natural catalizan la hidrólisis reversible de ésteres insolubles en agua como los triacilglicéridos de grasas animales y de aceites vegetales para originar ácidos grasos y glicerol (Esquema 2) ⁽¹¹⁾. Si este tipo de enzimas se utilizan en un entorno orgánico, el nucleófilo natural (agua) que interviene en su mecanismo de acción es reemplazado por otros como alcoholes, peróxidos o amoniaco, lo que ha permitido llevar a cabo con éxito una gran cantidad de transformaciones sintéticas además de la hidrólisis.



Esquema 2.- Función de las lipasas: la hidrólisis de triglicéridos

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas por la Naturaleza y han sido aisladas en microorganismos, plantas y animales. En concreto, las lipasas microbianas han recibido

una atención especial debido a sus aplicaciones industriales y a su gran accesibilidad. Las lipasas de origen microbiano usadas en Biotecnología son en general enzimas extracelulares de bacterias, levaduras y hongos. Muchas de estas lipasas han sido purificadas y secuenciadas.

Existe una gran diversidad en las aplicaciones industriales de las lipasas: son incluidas en los preparados de detergentes y lavavajillas, son utilizadas en procesos de hidrólisis de las grasas de la leche, eliminación de lípidos en cosméticos, eliminación de grasas animales para curtidos, en la obtención del Biodiesel, en preparación de fármacos y otras moléculas de interés biológico.

Existen numerosos ejemplos industriales que han implementado un proceso resolutivo catalizado por una lipasa para obtención de productos quirales de interés farmacéutico. Entre los más relevantes destacan la obtención de antiinflamatorios no esteroídicos, también conocidos como los profenos (ácidos 2-arilpropiónicos), compuestos de gran importancia en el tratamiento de enfermedades reumáticas.

Las enfermedades reumáticas constituyen una de las dolencias que con mayor prevalencia afectan a los seres humanos, a las distintas estructuras del aparato locomotor y que no se han producido como consecuencia de golpes o traumatismos. Los componentes del sistema musculoesquelético que pueden ver afectados con estas enfermedades incluyen los huesos, las articulaciones, los ligamentos, las bolsas sinoviales y los músculos, con sus tendones ⁽¹²⁾.

Se han observado más de 100 enfermedades reumáticas distintas, ejemplos bien conocidos tales como la artrosis, la gota, la artritis reumatoide, la osteoporosis y la fibromialgia. Estas enfermedades no sólo afectan a los ancianos, algunas también a jóvenes e incluso a niños. En España, a principios de los noventa, se calculaba que aproximadamente un 25% de la población comprendida entre cuarenta y seis y sesenta años sufría alguna de estas patologías ⁽¹³⁾.

La Sociedad Española de Reumatología realizó el estudio EPISER con el fin de conocer la frecuencia con que las enfermedades reumáticas afectaban a los españoles. Según los resultados de esta encuesta nacional, el 18% de los españoles mayores de 20 años han padecido algún trastorno reumático. Las enfermedades osteomusculares se relacionaron con el 50% de las discapacidades laborales permanentes ⁽¹²⁾.

Estos procesos inflamatorios han sido tratados con diferentes tipos de fármacos, entre los cuales se encontraron los profenos (ácidos 2-arilpropiónicos, **1**, Figura 2). Fármacos con

propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas, efectos que se atribuyeron a su capacidad para bloquear la biosíntesis de prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina, por inhibición no selectiva de la ciclooxigenasa, responsable de la biotransformación del ácido arquidónico hasta prostaglandinas o tromboxanos.

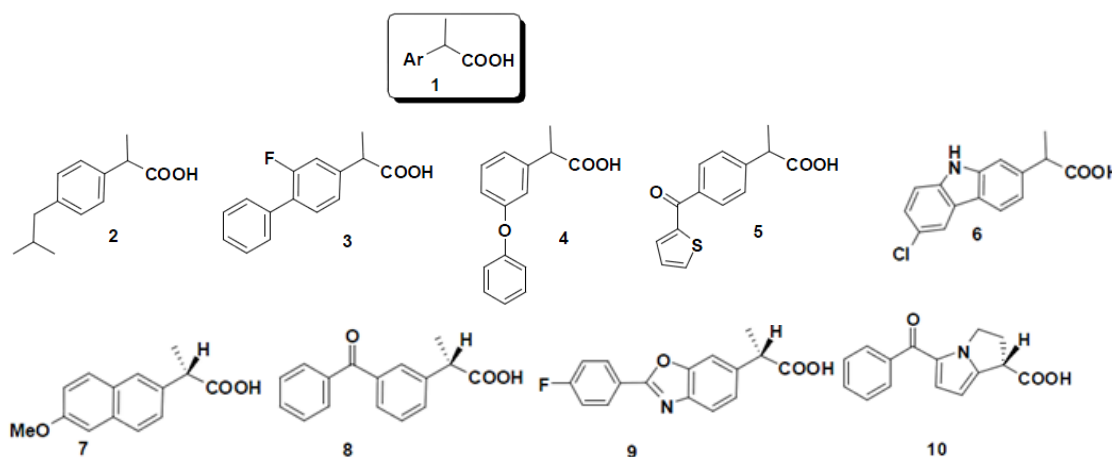


Figura 2.-Estructura de los antiinflamatorios no esteroídicos más utilizados

Los ácidos 2-aryl propiónicos o profenos contienen un carbono asimétrico adyacente a un ácido carboxílico. Este hecho es muy importante para la acción farmacológica, ya que en muchos casos sólo uno de los enantiómeros será responsable de la interacción con ciertos receptores del organismo.

Numerosos estudios farmacológicos acerca de la actividad terapéutica de los dos enantiómeros de estos compuestos han demostrado que el isómero *S*(+) tiene un mayor poder antiinflamatorio (28 veces en el caso del Naproxeno y 160 veces para el *S*(+) Ibuprofeno) frente al su antípoda *R*(-), el cual es esencialmente inactivo como inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, aunque puede tener efecto analgésico por mecanismos diferentes. A su vez, se ha observado que el eutómero *S*(+) alcanza su concentración terapéutica en sangre antes que el racemato.

El primero en utilizarse fue el Ibuprofeno, pero más tarde surgieron un gran número de derivados: Naproxeno, Fenoprofeno, Ketoprofeno, Flurbiprofeno, Suprofeno, etc. El Piketoprofeno (tópico) es un derivado amídico del Ketoprofeno ⁽¹⁴⁾.

No obstante, sólo el Naproxeno (7), Dexketoprofeno (8), Flunoxaprofeno (9) y el Ketorolaco (10) se han comercializado como enantiómeros puros, mientras que el más vendido de todos, el Ibuprofeno (2), se comercializó como racémico ^(3, 13).

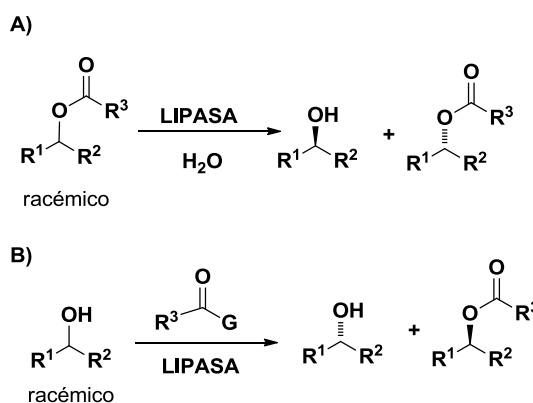
El tratamiento con isómeros puros de los ácidos aril-propiónicos ha sido más ventajoso, por las siguientes razones ⁽¹⁴⁾:

1. Permite una reducción en la dosis administrada al paciente.
2. Disminuye los efectos secundarios debidos a la concentración, en tejido adiposo, del isómero *R*(-) no transformado enzimáticamente.
3. Evita la variabilidad de la respuesta terapéutica, al no producirse la inversión enantiomérica “in vivo”.

Las estrategias para la obtención enantioselectiva del eutómero *S* de estos compuestos 2-aril propiónicos catalizada por las lipasas, son:

1. Hidrólisis enantioselectiva, a partir de un éster racémico en un medio acuoso (Esquema 3, A);

2. Síntesis enantioselectiva del correspondiente éster, a partir de un ácido racémico, mediante una esterificación o una transesterificación (Esquema 3, B).



Esquema 3.- Estrategias para la obtención enantioselectiva del eutómero *S*

De esta forma, se han obtenido ácidos *R*(-) y *S*(+) 2-aril propiónicos con diferente pureza enantiomérica. Sólo han interesado aquellos métodos en los que la estereoespecificidad de la lipasa y la estrategia en la resolución fueron los adecuados para la obtención del ácido *S*(+) puro, con un exceso enantiomérico próximo al 100%. En algunos casos, si la lipasa no era enantioespecífica para este tipo sustratos, se ha logrado mejorar su estereoselectividad variando las condiciones del medio ⁽¹⁴⁾.

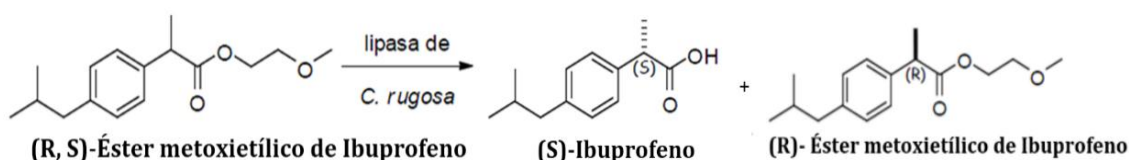
De entre los múltiples ejemplos que están descritos en la bibliografía, se han seleccionado alguno de los más destacados.

El **Ibuprofeno** (ácido (*R,S*)-2-(4-isobutilfenil)propanoico) (Compuesto 2, Figura 2), es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (AINE), usado en el tratamiento de dolor de cabeza, artritis reumatoide, cefalea y tensión muscular. El enantiómero *S* del Ibuprofeno posee el efecto terapéutico deseado, siendo 160 veces más activo que su enantiómero *R*, además este último puede causar efectos secundarios que afectan al tracto gastrointestinal.

La compañía norteamericana Pfizer ha desarrollado un proceso industrial para la obtención del eutómero (*S*)-Ibuprofeno partiendo de una mezcla racémica del correspondiente éster metoxietílico (Esquema 4), catalizado por la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en los poros de un reactor de membrana ⁽¹⁵⁾.

Candida rugosa era una levadura no formadora de esporas, que fue aislada por primera vez de suelos naturales en 1962. Esta se conoció también como *Candida cylindracea*, tratándose una de las más utilizadas en biotransformaciones debido a su elevada estereoselectividad y resistencia a los medios orgánicos una vez liofilizada ⁽¹¹⁾. Recientemente se hablaba indistintamente de lipasa de *C. rugosa* o *C. cylindracea*, aunque el contenido en guanina/citosina de los genes que codifican la síntesis de las lipasas de estas levaduras era bien diferente ⁽¹⁴⁾.

Se encontraron múltiples isoformas de lipasas en los preparados comerciales, importante a la hora de estudiar el comportamiento de la misma, describiéndose siete genes diferentes de *Candida rugosa* (Lipasa 1 a Lipasa 7) que expresan lipasas ⁽¹¹⁾.



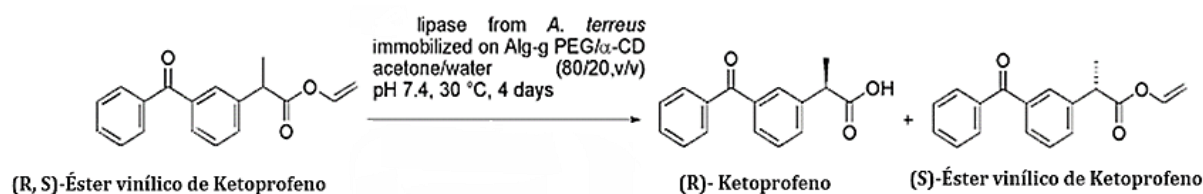
Esquema 4.- Obtención del (*S*)-Ibuprofeno por hidrólisis del éster racémico.

La reacción es llevada a cabo a una temperatura de 20 °C y a pH= 5 en un sistema bifásico agua/disolvente orgánico. Aunque la lipasa mostró actividad en un amplio intervalo de valores de pH, era necesario un medio ácido para que disminuir la solubilidad del Ibuprofeno producto en el medio acuoso, puesto que la enzima se inhibe por exceso de producto. El principal inconveniente del proceso era la baja solubilidad del éster sustrato en medio acuoso (por debajo de 1 mM), lo que implica operar con reactores de gran volumen. Sin embargo, este problema fue solventado mediante la optimización de los reactores utilizados. Así, el rendimiento se aumentó considerablemente trabajando en un reactor de fibra hueca, donde la lipasa estaba atrapada en los poros de una membrana que separa un

produce por síntesis química en grandes cantidades y se comercializa como una mezcla de sus estereoisómeros. Sin embargo, existen aproximaciones biocatalíticas descritas a través de las cuales se ha obtenido el correspondiente eutémero en elevadas conversiones.

La resolución cinética del éster vinílico racémico de Ketoprofeno ha sido llevada a cabo mediante la hidrólisis estereoselectiva catalizada por la lipasa de *Aspergillus terreus* inmovilizada sobre alginato modificado y esferas huecas de ciclodextrina. En condiciones óptimas (la enzima inmovilizada sobre esferas Alg-g-PEG/ α -CD en acetona/agua 80/20, el pH 7.4, en 30 °C), la biotransformación es enantioselectiva, proporcionando (*R*)-Ketoprofeno (el 96 % *ee* en la conversión del 46 %).

La inmovilización de la lipasa *A. terreus* permitió su reutilización hasta en 20 ciclos de reacción sin perder apenas actividad, mientras que la enzima libre no pudo ser reciclada ⁽¹⁾.



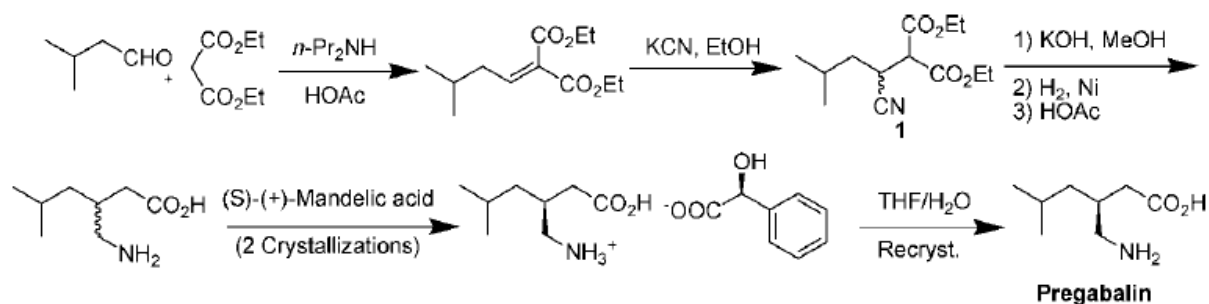
Esquema 6.- Resolución cinética enzimática del éster vinílico de mediante el uso de lipasa inmovilizadas sobre Alg-g-PEG/ α -CD

Por otro lado, la versatilidad de empleo de lipasas en la obtención de intermedios quirales es muy amplia. Prueba de ello es su utilización exponencial en la industria farmacéutica, destacando en los últimos años el proceso descrito por la compañía Pfizer para la obtención de Pregabalina.

La **Pregabalina** (ácido (*S*)-(+)-3-aminometil-5-metilhexanoico **11**, Esquema 8), presenta una estructura similar a la del ácido gamma-aminobutírico (GABA), un neurotransmisor del organismo, pero sus efectos biológicos son muy diferentes. No se conoce exactamente cómo actúa la pregabalina, pero se cree que afecta al modo en que el calcio entra en las células nerviosas, lo que reduce la actividad de algunas de las células nerviosas del cerebro y de la médula espinal, disminuyendo así la liberación de otros neurotransmisores implicados en el dolor neuropático, la epilepsia y la ansiedad ⁽¹⁶⁾.

Tradicionalmente se ha llevado a cabo la síntesis de Pregabalina tal y como se muestra en el Esquema 7, a través de la síntesis de intermedios racémicos en la que se introduce

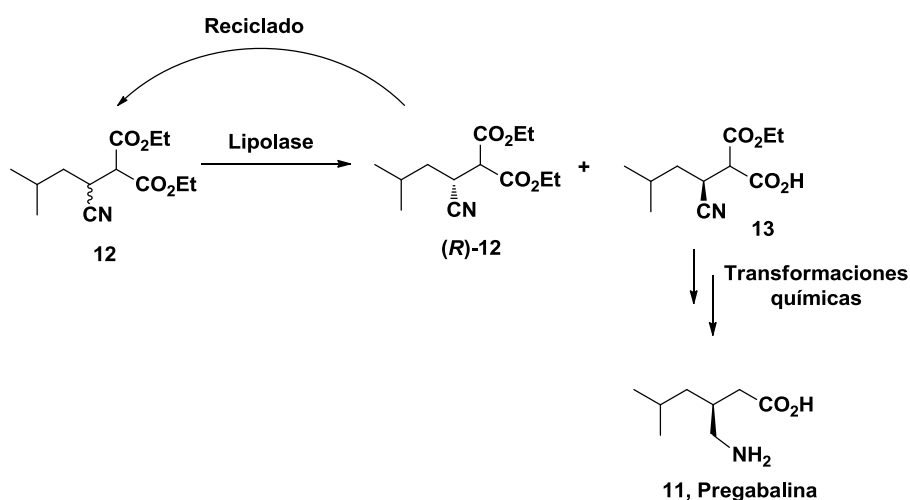
quiralidad mediante procesos consecutivos de cristalización de uno de los intermedios finales en presencia de ácido *S*-(+)-mandélico.



Esquema 7.- Primera generación de síntesis de la Pregabalina

Aunque esta ruta haya sido rentable, se han logrado dos grandes mejoras mediante la utilización de una etapa biocatalítica en la preparación de Pregabalina: introducir la quiralidad en el proceso en una etapa más temprana de síntesis y la introducción del reciclaje del enantiómero no deseado, con el fin de evitar tener que desecharlo. Esta nueva ruta parte de un precursor racémico relativamente barato, que es fácilmente transformado en el compuesto **12** (Esquema 8), que será utilizado como sustrato del proceso enzimático.

El plan inicial incluyó el desarrollo de un procedimiento para reciclar el enantiómero no usado (*R*)-**12**, para formar de nuevo el precursor racémico.



Esquema 8.-Ruta propuesta de desarrollo de Pregabalina

Entre las diferentes lipasas probadas por los investigadores, siete enzimas mostraron una buena enantioselectividad ($E > 35$). La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (Novozymes), disponible comercialmente como Lipolase, fue la que ofreció mejores resultados en términos de enantioselectividad y actividad, por lo que el proceso fue optimizado mediante la utilización de esta lipasa. De esta manera, el precursor quiral de Pregabalina podía ser

obtenido con conversiones cercanas al 50 % y excelentes excesos enantioméricos. La racemización del enantiómero no transformado por la lipasa permitió aumentar considerablemente los rendimientos alcanzados, manteniendo la enantiopureza.

No sólo la etapa biocatalítica se desarrolló en medio acuoso, sino que las transformaciones químicas posteriores de este intermedio quiral también se llevaron a cabo en agua, utilizando mínimamente disolventes orgánicos en la extracción de alguno de los productos. Mediante esta nueva metodología se consiguió aumentar considerablemente la sostenibilidad del proceso, disminuyendo la utilización de disolventes orgánicos y catalizadores metálicos, así como minimizando la generación de productos de desecho, manteniendo siempre la enantiopureza del producto final (99 % e.e).

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas son:

- El empleo de lipasas como biocatalizadores en la obtención de intermedios quirales de la preparación de fármacos se presenta como una estrategia eficaz, ya que permite en muchos casos obtener compuestos enantioméricamente puros con elevadas conversiones y excesos enantioméricos, empleando condiciones suaves de reacción.
- Debido a su elevada regio-, quimio- y estereoselección, las lipasas son los biocatalizadores de elección en procesos de resolución cinética de mezclas racémicas a través de la hidrólisis o síntesis estereoselectiva de ésteres.
- Este hecho queda reflejado en diferentes procesos descritos, tales como el uso de la lipasa de *Candida rugosa* para la obtención de los antiinflamatorios no esteroídicos Ibuprofeno, Naproxeno y Ketoprofeno, o el empleo de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (Novozymes) en la preparación de intermedios quirales de la síntesis de Pregabalina.
- La implementación de estrategias biocatalíticas en el desarrollo de fármacos contribuye directamente en el desarrollo de procesos más sostenibles.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) De Melo Carvalho, A. C. L., de Sousa Fonseca, T., de Mattos, M. C., Ferreira de Oliveira, M. C., Gomes de Lemos, T. L., Molinari, F., Romano, D., Serra, I. (2015). Recent Advances in Lipase-Mediated Preparation of Pharmaceuticals and Their Intermediates.
- (2) Álvarez, C. Á., & Durán, J. J. T. (2002). Influencia del enantioformismo en la solubilidad y velocidad de disolución de distintos fármacos racémicos (Tesis doctoral). Madrid: Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- (3) Hernáiz, M. J. (2012). Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos (I) enzimas hidrolíticas. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- (4) Luna, H. (2004). Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos.
- (5) Del Monte-Martinez, A., González Abradelo, D., González-Bacerio, J., Cao, R. (2013). Application of enzymes on biocatalysis. Perspectives of the use of nanoarrays as biocatalysts.
- (6) Tarazona Sepúlveda, L. C. (2011). Evaluación de la enantioselectividad de derivados modificados de lipasas de *Candida rugosa* y alcaligenes sp. en la resolución cinética de (R/S)-mandelato de metilo. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias Químicas.
- (7) Villar Barro, A. Biocatálisis aplicada a la preparación enantioselectiva de heterociclos funcionalizados y compuestos con centros estereogénicos cuaternarios. (Tesis doctoral). Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Universidad de Oviedo.
- (8) Fernández Fernández, R. La catálisis asimétrica en el marco de la química sostenible del siglo XXI.
- (9) Pájaro Castro, N. P., Olivero Verbel, J. T. (2011). Química verde: un nuevo reto. Ciencia e Ingeniería Neogranadina. Universidad Militar Nueva Granada, Colombia.
- (10) Martín Matute, B. (2006). Resolución cinética dinámica catalizada por enzimas y metales de transición. Real Sociedad Española de Química.
- (11) De la Casa Fernández, R. M. (1999) Obtención y estabilización de lipasas de *Candida rugosa*: utilización en medios orgánicos con a_w controlada. [Tesis doctoral]. Madrid: Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

- ⁽¹²⁾ Ballina García, F. J., Tornero Molina, J., (2011). Enfermedades reumáticas: las preguntas de los pacientes. Sociedad Española de Reumatología.
- ⁽¹³⁾ Alcántara León, A. R., Sánchez Montero, J. M. (2009). Utilización de hidrolasas en la preparación de fármacos e intermedios homoquirales. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- ⁽¹⁴⁾ Arroyo Sánchez, M. (1995) Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas. (Tesis doctoral). Madrid: Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- ⁽¹⁵⁾ Muñoz Solano, D., Hoyos, P., Hernáiz, M.J., Alcántara, A.R., Sánchez-Montero, J.M. (2011) Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- ⁽¹⁶⁾ European Medicines Agency. (2014) Pregabalin Pfizer.