

21. Química

Estrategias biocatalíticas para la síntesis enantioselectiva de aminas quirales

Tijman, Ariel; Iglesias, César; Orientadora: Rodríguez Giordano, Sonia;

ariel.tijman@gmail.com; csariglesias@gmail.com; soniar@fq.edu.uy

Facultad de Química

Universidad de la República

Resumen

Las aminas quirales se encuentran presentes en una vasta cantidad de los fármacos presentes en el mercado y en desarrollo, lo que ha acrecentado el interés industrial en metodologías biocatalíticas de síntesis. En el presente trabajo se desarrollaron dos estrategias mediadas por enzimas para la síntesis de aminas enantioméricamente puras. Para la primera estrategia fueron utilizados como biocatalizadores dos transaminasas, una de *Capronia semiimmersa* y otra de *Pseudomonas putida*; se expresaron en *E. coli* y fueron purificadas por IMAC, evaluando diversos parámetros desde la producción hasta la catálisis. Para la segunda estrategia, se identificaron secuencias candidatas a iminoreductasa en genomas de cepas nativas de *Streptomyces*; estas fueron clonadas en vectores de expresión para *E. coli* para el ensayo de su actividad con sustratos modelo.

Palabras clave: transaminasa, iminoreductasa, amina, fármaco, sustentable.

Introducción

La importancia de las aminas quirales radica en la presencia de este grupo funcional en una vasta cantidad de los fármacos presentes en el mercado y en desarrollo. Se ha puesto gran empeño en el diseño de estrategias de producción de fármacos o precursores enantioméricamente puros, eliminando de esta forma los efectos secundarios asociados a la administración de racematos; las técnicas biocatalíticas no sólo brindan excelentes resultados en este aspecto, sino que además se destacan por ser amigables con el ambiente. En este sentido, en los últimos años ha habi-

do un auge en el trabajo con monoamino oxidasas, amonoliasas, transaminasas e iminoreductasas (Schrittwieser, Velikogne, & Kroutil, 2015).

En particular, las transaminasas (TA) son enzimas PLP-dependientes que permiten obtener ambos enantiómeros de una amina con alto exceso enantiomérico: uno por síntesis directa a partir de la cetona proquiral, y el otro por resolución cinética de la mezcla racémica de la amina. Esta última estrategia ha sido muy utilizada para la síntesis de aminas con configuración *R* empleando *S*-TA, ya que son pocas las *R*-

TA identificadas (Koszelewski, Göritzer, Clay, Seisser, & Kroutil, 2010). Sin embargo, esta metodología acarrea la desventaja de un rendimiento máximo del 50 %; es por tanto de relevancia la identificación y caracterización de nuevas *R*-transaminasas. En este trabajo empleamos una transaminasa aislada de *Capronia semiimmersa* con estereoselectividad *R* (TACap) y otra de *Pseudomonas putida* con estereoselectividad *S* (Pp-SpuC). La TACap fue identificada, clonada, expresada y caracterizada por nuestro grupo (Iglesias, Panizza, & Rodríguez Giordano, 2017), mientras que lo propio fue hecho con la Pp-SpuC por el grupo de Turner (Galman *et al.*, 2017). Un factor determinante para la elección de estas enzimas para el presente trabajo es el donador de amino que aceptan: isopropilamina **1a** para la TACap y cadaverina **1b** para la Pp-SpuC (**Figura 1**). Además de ser reactivos asequibles, el subproducto de reacción presenta la ventaja de lograr un desplazamiento del equilibrio por formación de acetona, cuya evaporación favorece el avance de reacción, en un caso, y un aldehído que cicla espontáneamente desplazando la reacción, en el otro. Para ambas enzimas, expresadas en forma recombinante en *E. coli*, optimizamos los procesos de producción y purificación, así como las condiciones de conservación y de escalado de reacciones.

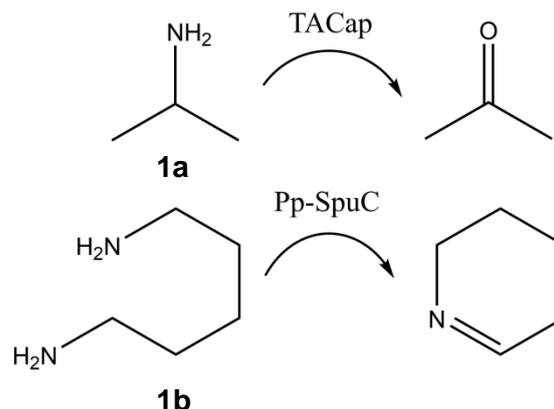


Figura 1. Donores de amino utilizados: isopropilamina **1a** para TACap y cadaverina **1b** para Pp-SpuC.

Las iminorreductasas (IREDs) son oxidorreductasas NADPH-dependientes, y conforman uno de los grupos menos explorados para la síntesis de aminas, ya que se conoce muy poco sobre su rol en la naturaleza y han sido identificadas relativamente pocas enzimas. En el año 2011 el grupo de Nagasawa describe la primera iminorreductasa aislada de *Streptomyces* (Mitsukura *et al.*, 2011), y una segunda IRED con estereoselectividad complementaria fue descrita por el mismo grupo en el año 2013 (Mitsukura *et al.*, 2013). En el año 2015 el grupo de Turner publica la aplicación de la primera en la reducción de aminas cíclicas e iones iminio; desde entonces ha crecido el interés en estas enzimas por su capacidad de sintetizar aminas secundarias, lo que las diferencia de las transaminasas. En nuestro laboratorio, el grupo de la Dra. Ma. Julia Pianzola, cuenta con una amplia colección de cepas de *Streptomyces* que han sido aisladas y caracterizadas como patógenos

de papa (*Solanum tuberosum*). A partir de las secuencias de IRED reportadas por Nagasawa, se identificaron motivos altamente conservados. Los mismos fueron utilizados para analizar la presencia de dichas secuencias en los genomas completos de cinco cepas de nuestra colección; luego de un proceso de selección, construimos sistemas de expresión para dos candidatas a IRED y evaluamos su actividad frente a diferentes sustratos modelo.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo de estrategias biocatalíticas para la síntesis de aminas quirales (**Figura 2**). Más específicamente, buscamos optimizar la producción, purificación y conservación de las transaminasas con que trabajamos y posteriormente las condiciones de reacción frente a sustratos modelo. En cuanto a las iminorreductasas, nuestro objetivo es la identificación *in silico* de al menos dos IREDs estereocomplementarias en cepas nativas de *Streptomyces* para su posterior producción recombinante y caracterización.

Materiales y Métodos

General

Los sustratos para las biotransformaciones, así como los estándares analíticos y otros reactivos de uso frecuente fueron comprados a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Las columnas IMAC para purificación de proteína fueron comprados a GE Healthcare (Chicago, IL, EEUU). Los métodos analíticos como TLC, GC y HPLC fueron desarrollados de acuerdo a procedimientos estándar.

Los reactivos de biología molecular fueron adquiridos de New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU) y Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU). Las técnicas de biología molecular empleadas se corresponden con las usualmente recomendadas (Sambrook & Russell, 2001) o bien con las recomendadas por el fabricante de ciertos reactivos o kits.

Producción de R-TACap y Pp-SpuC

Las cepas recombinantes de *E. coli* BL21(DE3) expresando TACap y Pp-SpuC fueron sembradas en placas de LB con el antibiótico correspondiente (200 µg/mL de ampicilina / 50 µg/mL de kanamicina) a

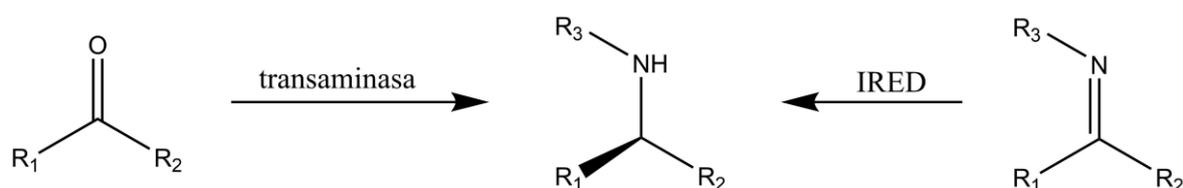


Figura 2. Dos aproximaciones para la síntesis de una amina quiral. Para la transaminación, R₃ = H.

partir de los cultivos conservados en freezer. Una colonia aislada de cada cepa fue luego inoculada en 5 mL de medio LB con el antibiótico apropiado y el mismo fue incubado a 37 °C durante la noche en un agitador orbital a 150 rpm. 1 mL de este cultivo fue utilizado para inocular 125 mL de medio de autoinducción Terrific Broth Base con elementos traza y antibiótico apropiado, el cual fue incubado a 28 °C en un agitador orbital a 150 rpm. Luego de 48 hs de incubación el cultivo fue centrifugado y lavado con buffer HEPES 50 mM pH 8. Las células fueron resuspendidas en buffer 1 (HEPES 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8) y sometidas a lisis por lisozima de huevo y Triton X-100. Luego de un nuevo centrifugado, y haciendo uso de la cola de histidinas agregada a las proteínas en el vector de expresión, el sobrenadante fue cargado en una columna de afinidad HisTrap FF precargada con Ni²⁺, por medio de un equipo ÄKTA pure (GE Healthcare Life Sciences). La columna fue lavada con buffer 2 (HEPES 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM, pH 8) y la proteína eluida con un gradiente creciente de imidazol (elución a aprox. 170 mM). La cantidad de enzima obtenida fue calculada por el método de BCA (Smith *et al.*, 1985) empleando un kit comercial de Sigma Aldrich y un lector de placas Infinite 200 Pro (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza).

Síntesis enzimática de aminas

Para TACap, en eppendorfs de 2 mL, volumen de reacción 1 mL, se mezcló el sustrato (**2a** o **2b**) (**Figura 3**) (5 mM desde solución stock 200 mM) con buffer HEPES 50 mM pH 8, 2 mM PLP, 0.5 M isopropilamina y 3 mg/mL de enzima. Para Pp-SpuC, en eppendorfs de 2 mL, volumen de reacción 1 mL, se mezcló el sustrato (**2a** o **2b**) (5 mM desde solución stock 200 mM) con buffer HEPES 50 mM pH 8, 1 mM PLP, 15 mM cadaverina y 2 mg/mL de enzima. Las reacciones se colocaron en un agitador orbital a 37 °C, 150 rpm, durante 24 hs. Transcurrido el tiempo se adicionó NaOH 10 M (100 µL) y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica fue separada y secada con Na₂SO₄ anhidro, para luego confirmar la reacción por TLC, GC y/o HPLC.

Se escaló la reacción para ambas enzimas a entre 35 y 70 mL, de acuerdo a la cantidad de enzima purificada. Esta reacción se llevó a cabo de igual forma que en pequeña escala para el caso de la Pp-SpuC, aumentando el tiempo a 48 hs. Para la TACap la reacción transcurrió en un balón de tres bocas en baño de agua termostaticado a 35 °C, con corriente de N₂

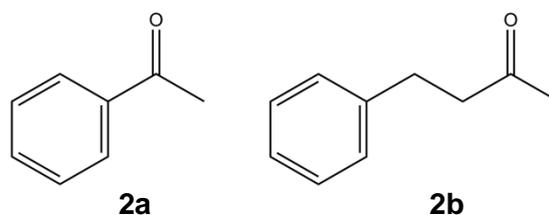


Figura 3. Sustratos utilizados para el ensayo de reacciones.

para arrastrar la acetona generada y desplazar el equilibrio (**Imagen 1**). En ambos casos se realizó una doble extracción, primero a pH 5 y luego a pH 12 (ajustados con HCl y NaOH).

Métodos bioinformáticos

Para la identificación *in silico* de nuevas IREDs se alinearon las secuencias reportadas por Nagasawa mediante BLAST (Altschup, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990), y los motivos conservados fueron buscados en nuestros genomas secuenciados de *Streptomyces* utilizando el programa informático Artemis (Carver, Harris, Berriman, Parkhill, & McQuillan, 2012).

Clonado y expresión de IREDs

El clonado de la R-IRED fue encargado a la empresa GenScript Biotech Corp. (Piscataway, NJ, EEUU); fue sintetizado el gen con optimización de codones para *E. coli* y clonado en pKK223-3 y pET28-b(+). El clonado de la S-IRED fue realizado en nuestro laboratorio mediante restriction-free cloning en el vector pKK223-3-lacZ (Van Den Ent & Löwe, 2006) (Unger, Jacobovitch, Dantes, Bernheim, & Peleg, 2010).

Resultados y Discusión

Transaminasas

Las enzimas fueron purificadas de acuerdo a lo descrito en Metodología, y fueron utilizadas para diferentes ensayos a fin de determinar las mejores condiciones de purificación, conservación y reacción.

Fue duplicado el rendimiento para la purificación de TACap, llegando a 100 mg/L de cultivo, y se obtuvo un excelente rendimiento para Pp-SpuC de 180 mg/mL de cultivo.

Para optimizar las condiciones de conservación de la enzima se utilizó como pará-



Imagen 1. Escalado de la reacción

metro la velocidad inicial de reacción con R-metilbencilamina, de acuerdo al método reportado por Bornscheuer (Schätzle, Höhne, Redestad, Robins, & Bornscheuer, 2009). Fue evaluada la actividad de la enzima conservada a -20 °C en glicerol 30 y 40 %, así como la influencia del imidazol en el medio. Para esto último, una alícuota de la solución fue pasada por una columna de desalting PD10 de forma de comparar los resultados.

Se optimizaron las condiciones de conservación de las enzimas, pudiendo mantener hasta un 50 % de actividad a los tres meses para la Pp-SpuC y a los 40 días para TACap (**Gráfico 1**) conservándolas en glicerol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

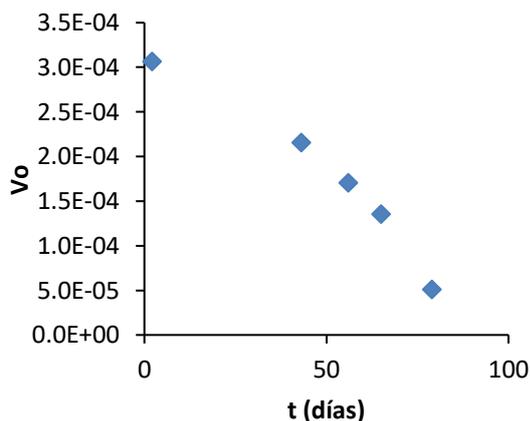


Gráfico 1. Actividad de TACap vs. tiempo

Fue evaluado el efecto del imidazol sobre la actividad de la enzima, encontrando que la afecta significativamente (**Gráfico**

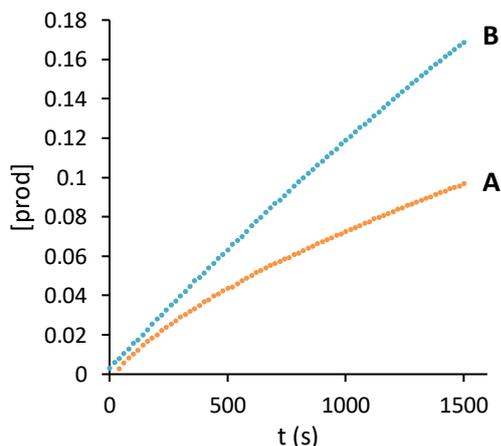


Gráfico 2. Curva A: Actividad en presencia de imidazol luego de la elución. Curva B: Actividad luego de desalting en PD10.

2).

Lograron escalarse las reacciones a volúmenes mayores, obteniéndose conver-

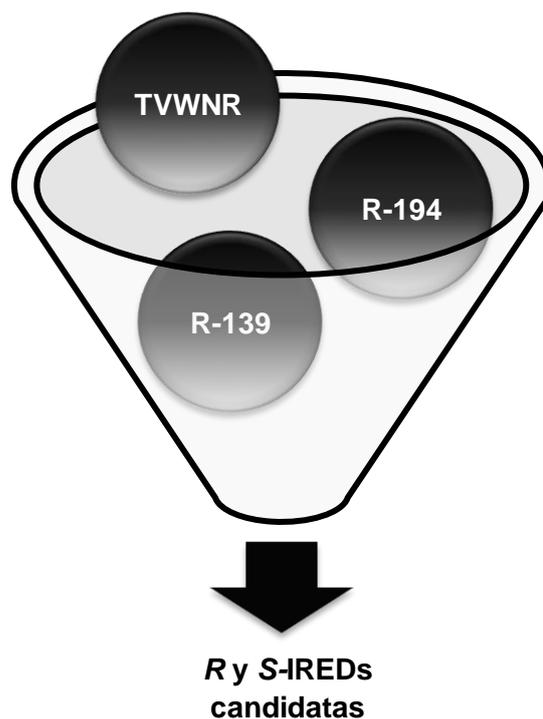


Figura 4. Estrategia para la selección de IREDs a evaluar.

siones similares a las reportadas y excelentes excesos enantioméricos.

Iminoreductasas

Para la identificación de nuevas iminoreductasas se buscaron motivos conservados en las IREDs reportadas por Nagasawa, los cuales fueron sondeados en los genomas secuenciados de cinco cepas nativas de *Streptomyces* mediante el software Artemis. Las proteínas halladas fueron cotejadas por BLAST, determinando nueve enzimas candidatas a IRED. Estas a su vez fueron analizadas de acuerdo al criterio publicado por Pleiss (Fademrecht, Scheller, Nestl, Hauer, & Pleiss, 2016), que permitiría distinguir entre *R* y *S* IREDs (**Figura 4**). La secuencia nucleotídica de una *R*-IRED fue enviada a

GenScript® para la optimización de codones para *E. coli* y su clonado en pKK223-3 y pET28-b(+). El gen de una S-IRED fue clonado por restriction-free cloning (RFC) en pKK223-3-lacZ. Los vectores derivados de pKK223-3 fueron transformados en *E. coli* JM109 y los vectores basados en pET22-b(+) en *E. coli* BL21(DE3). Obtenidas las cepas recombinantes se inocularon caldos de LB-antibiótico y se indujeron con IPTG a un OD₆₀₀ de 0.5: se siguió una técnica estándar de biotransformaciones con célula entera, utilizando distintos sustratos modelo. Alternativamente a la inducción con IPTG, se realizaron cultivos en AIM Terrific Broth Base con elementos traza. Se analizó la expresión de proteínas por gel de poliacrilamida y los productos de las biotransformaciones por TLC, GC y/o HPLC.

Conclusiones

Se lograron optimizar las condiciones de producción, purificación y conservación de las transaminasas. También se logró escalar exitosamente las reacciones, lo que permitiría utilizar a estas enzimas como biocatalizadores en reacciones de química fina.

Por otro lado, fueron identificadas y producidas recombinantemente dos IREDs estereocomplementarias de cepas nativas de *Streptomyces*, lo cual es de relevancia dado el auge actual de este tipo de enzimas.

Este trabajo añade datos a la caracterización de las transaminasas empleadas, así como ofrece nuevas IREDs a ser caracterizadas. En síntesis, se exploran dos herramientas para la síntesis enantioselectiva de aminas quirales que podrían ser de aplicación en la industria farmacéutica.

Bibliografía

- Altschup, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). *Basic Local Alignment Search Tool. J. Mol. Biol* (Vol. 215).
- Carver, T., Harris, S. R., Berriman, M., Parkhill, J., & McQuillan, J. A. (2012). Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>
- Fademrecht, S., Scheller, P. N., Nestl, B. M., Hauer, B., & Pleiss, J. (2016). Identification of imine reductase-specific sequence motifs. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 84(5), 600–610. <https://doi.org/10.1002/prot.25008>
- Galman, J. L., Slabu, I., Weise, N. J., Iglesias, C., Parmeggiani, F., Lloyd, R. C., & Turner, N. J. (2017). Biocatalytic transamination with near-stoichiometric inexpensive amine donors mediated by bifunctional

- mono- and di-amine transaminases. *Green Chemistry*, 19(2), 361–366. <https://doi.org/10.1039/C6GC02102F>
- Iglesias, C., Panizza, P., & Rodriguez Giordano, S. (2017). Identification, expression and characterization of an R - ω - transaminase from *Capronia semiimmersa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(14), 5677–5687. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8309-2>
- Koszelewski, D., Göritzer, M., Clay, D., Seisser, B., & Kroutil, W. (2010). Synthesis of Optically Active Amines Employing Recombinant ω -Transaminases in *E. coli* Cells. *ChemCatChem*, 2(1), 73–77. <https://doi.org/10.1002/cctc.200900220>
- Mitsukura, K., Kuramoto, T., Yoshida, T., Kimoto, N., Yamamoto, H., & Nagasawa, T. (2013). A NADPH-dependent (S)-imine reductase (SIR) from *Streptomyces* sp. GF3546 for asymmetric synthesis of optically active amines: purification, characterization, gene cloning, and expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(18), 8079–8086. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4629-4>
- Mitsukura, K., Suzuki, M., Shinoda, S., Kuramoto, T., Yoshida, T., & Nagasawa, T. (2011). Purification and Characterization of a Novel (R)-Imine Reductase from *Streptomyces* sp. GF3587. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(9), 1778–1782. <https://doi.org/10.1271/bbb.110303>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (Vol. 1,2 e 3).
- Schätzle, S., Höhne, M., Redestad, E., Robins, K., & Bornscheuer, U. T. (2009). Rapid and sensitive kinetic assay for characterization of ω -transaminases. *Analytical Chemistry*, 81(19), 8244–8248. <https://doi.org/10.1021/ac901640q>
- Schrittwiesser, J. H., Velikogne, S., & Kroutil, W. (2015). Biocatalytic Imine Reduction and Reductive Amination of Ketones. *Advanced Synthesis and Catalysis*. <https://doi.org/10.1002/adsc.201500213>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Unger, T., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Bernheim, R., & Peleg, Y. (2010). Applications of the Restriction Free

(RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of Structural Biology*.

<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.016>

Van Den Ent, F., & Löwe, J. (2006). RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*.
<https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.12.008>

Agradecimientos

Prof. Nicholas Turner, University of Manchester, por la donación de *E. coli* (pET28-b(+)-Pp-SpuC). Facultad de Química, Udelar. PEDECIBA Química.

Financiamiento

Los autores agradecen financiamiento de OPCW(L/ICA/ICB/187531/13), CSIC I+D 1515, Udelar, Uruguay, FMV_1_2017_1_136610, ANII, Uruguay.