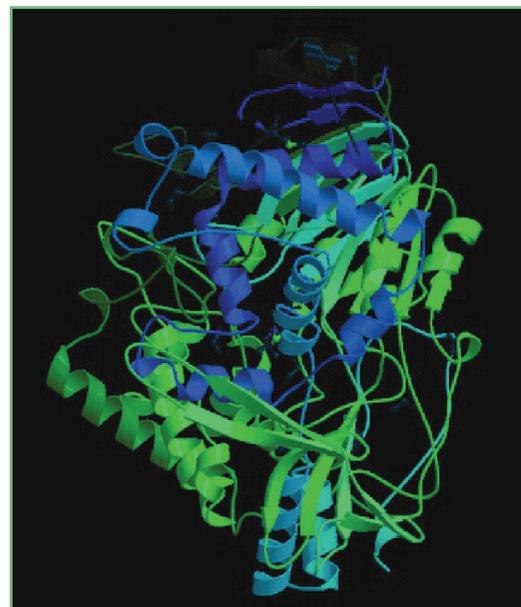


Caterina Temporini, Enrica Calleri,
Gabriella Massolini, Gabriele Caccialanza
Dipartimento di Chimica farmaceutica - Università di Pavia.
caterina.temporini@unipv.it



FASI STAZIONARIE CHIRALI MONOLITICHE

Impiego di penicillina G acilasi come selettore chirale

Come supporto per l'immobilizzazione del selettore chirale penicillina G acilasi è stata impiegata la silice epossidica monolitica.

La fase stazionaria ottenuta è stata utilizzata per separazioni enantiomeriche high-throughput, valutandone stabilità ed efficienza cromatografica rispetto ad un'analogica colonna particellare, e come bioreattore in un sistema cromatografico bidimensionale per lo studio di reazioni enantioselettive.

La penicillina G acilasi (PGA) è un'idrolasi ampiamente utilizzata a livello industriale per la produzione di acido 6-ammino penicillamico, precursore di sintesi delle penicilline semisintetiche. L'ampia disponibilità commerciale, il costo limitato e soprattutto la documentata versatilità del suo sito catalitico nell'idrolisi stereoselettiva di esteri ed ammidi di derivati dell'acido fenilacetico (1, 2) ne hanno suggerito la valutazione come selettore chirale. Per lo sviluppo della PGA-CSP è stato necessario inizialmente ottimizzare la reazione di immobilizzazione.

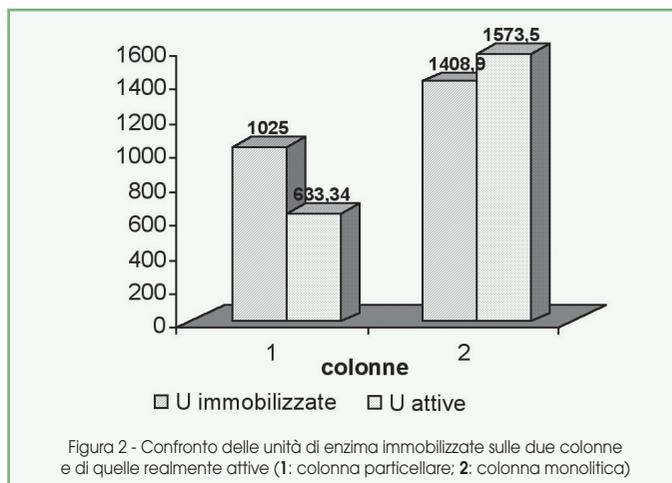
Sono stati adottati due metodi di immobilizzazione, *in batch* e *in situ*, su supporti cromatografici a base di silice particellare derivatizzati con funzioni propilamminiche ed epossidiche (3). I migliori risultati in termini di resa di immobilizzazione e di selettività nei confronti di una miscela racemica test, sono stati ottenuti con l'immobilizzazione *in situ* su gruppi epossidici, pertanto questa fase stazionaria è stata sottoposta a studi di caratterizzazione. Gli studi condotti, oltre a definire il campo di applicabilità della fase stazionaria sviluppata, hanno consentito di chiarire il meccanismo di ricognizione chirale, il coinvolgimento del sito

attivo nella discriminazione enantiomerica e la natura delle interazioni che si instaurano tra analita ed enzima. Mediante studi di spiazzamento è stato possibile dimostrare che il sito attivo dell'enzima è direttamente coinvolto nella ritenzione di entrambi gli enantiomeri, e che il contributo specifico alla ritenzione è più significativo per il secondo enantiomero eluito. Valutando il comportamento cromatografico di una serie di miscele racemiche di acidi 2-arilossipropionici di interesse farmaceutico e di acidi 2-arilossialcanoici strutturalmente correlati è stato possibile definire le relazioni struttura-ritenzione/enantioselettività. Infine si sono variate le condizioni cromatografiche come il pH della fase mobile, la forza ionica del tampone e la presenza di modificatore organico per chiarire la natura delle interazioni che si instaurano tra analita ed enzima (4). L'impiego di materiale cromatografico particellare tradizionale come supporto per l'enzima ha portato tuttavia ad una parziale riduzione dell'attività rispetto alla forma solubile e questo sia per possibili restrizioni conformazionali indotte dalla chimica di legame sia per limitazioni legate al processo di diffusione necessario al substrato per raggiungere il sito attivo dell'enzima.

Poiché la diffusione è normalmente più lenta del processo cinetico, essa costituisce il passaggio che riduce l'attività dell'enzima e pertanto i supporti enzimatici particellari mostrano in genere attività più bassa rispetto a quella dell'enzima in forma solubile. Per poter migliorare le prestazioni cromatografiche della fase stazionaria chirale sviluppata, si è pensato di prendere in considerazione un nuovo tipo di supporto cromatografico, la silice monolitica.

Supporti monolitici

I supporti monolitici rappresentano una nuova generazione di materiali sia per l'analisi cromatografica (5-7) sia come evoluzione delle membrane porose impiegate per l'immobilizzazione degli enzimi (8, 9). Una fase stazionaria monolitica si presenta come una struttura unitaria ottenuta per polimerizzazione *in situ* oppure per consolidamento, all'interno della colonna, del materiale costitutivo (silice o di natura polimerica), oppure sotto forma di dischi. Rispetto al tradizionale materiale poroso particellare, i materiali monolitici sono caratterizzati da brevi cammini diffusivi, che garantiscono un rapido trasferimento di massa, migliorando l'efficienza cromatografica, una maggiore area superficiale, che aumenta la capacità di carico del supporto stesso, ed una peculiare struttura porosa costituita da macro- e mesopori, che consente di lavorare a flussi elevati con un incremento di pressione del sistema trascurabile: la compresenza di questi due fattori rende questi supporti ideali per il connubio tra efficienza e velocità cromatografiche. Da un punto di vista analitico, il grande vantaggio introdotto dalle fasi stazionarie monolitiche è proprio la possibilità di lavorare a flussi elevati senza compromettere risoluzione ed efficienza cromatografiche, come dimostrato dalle numerose pubblicazioni in merito, riducendo così sensibilmente i tempi di analisi. D'altro canto, se impiegate come supporto per l'immobilizzazione di enzimi, garanti-

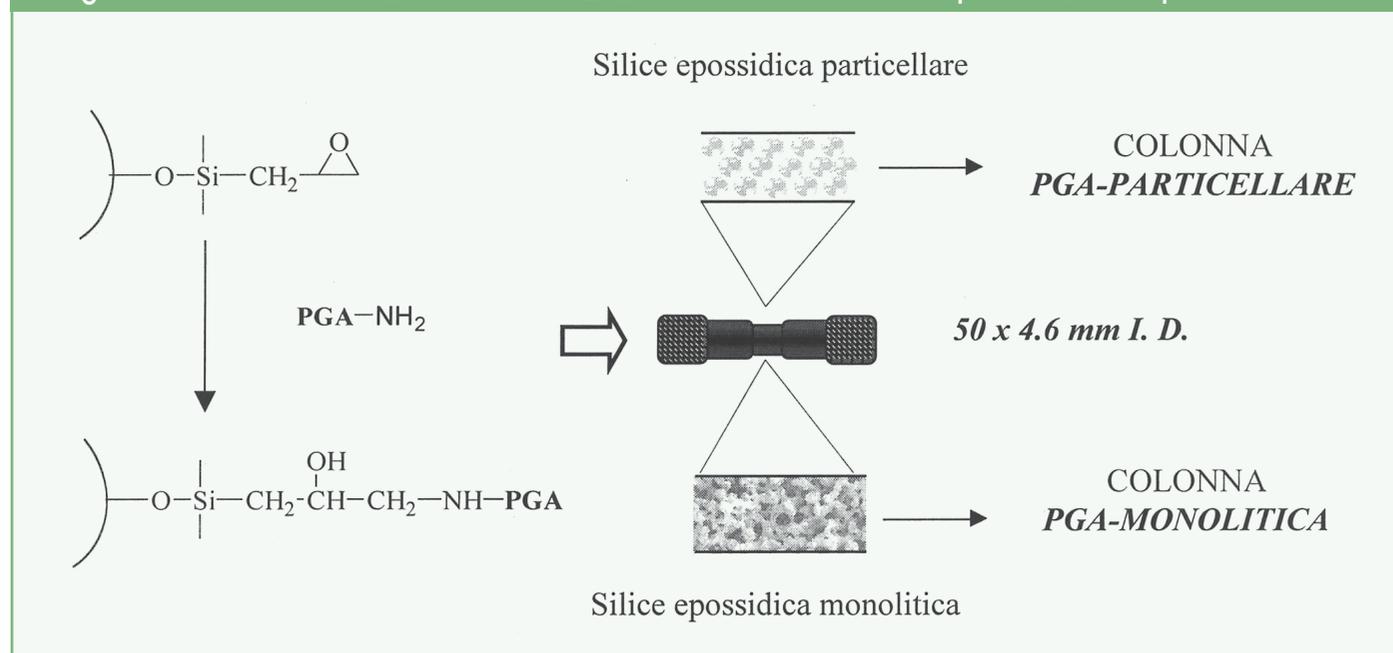


scono una maggiore espressione dell'attività enzimatica, probabilmente grazie alla porosità del sistema e alle condizioni di flusso convettivo che accelerano sia l'interazione enzima-substrato che la sottrazione dei prodotti spingendo le reazioni verso rese maggiori.

Scopo del lavoro

L'obiettivo di questo studio è stato valutare la possibilità di combinare l'osservata e documentata enantioselettività della PGA (4) alle peculiari caratteristiche dei supporti monolitici (5-9). Si è quindi studiato sia il riscontro cromatografico di questo connubio, con l'intento di aumentare l'efficienza cromatografica della PGA-CSP ed estenderne l'applicabilità in analisi *high-throughput*, sia l'influenza della struttura monolitica sulle proprietà cinetiche dell'enzima utilizzando la fase stazionaria come bioreattore per studi di catalisi enantioselettive.

Figura 1 - Schema della reazione di immobilizzazione adottata sulla colonna particellare e su quella monolitica



PGA-CSPs: confronto tra supporto particellare e monolitico

Per questo studio sono state appositamente preparate presso i laboratori Merck di Darmstadt (D) colonne di silice monolitica epossidica (50x4,6 mm I.D.) secondo la metodica descritta in (10). La PGA è stata immobilizzata sul supporto monolitico con la stessa procedura *on-line* adottata per la preparazione della corrispondente colonna particellare utilizzata come confronto (Figura 1) (3, 4). Le rese di immobilizzazione ottenute sui due supporti hanno dimostrato la maggiore capacità di carico del supporto monolitico (99 mg rispetto a 67 mg immobilizzati sulla colonna particellare). Un aspetto importante per verificare il successo di una procedura di immobilizzazione è valutare l'attività dell'enzima immobilizzato rispetto alla forma libera. Non essendo possibile prelevare una porzione di fase stazionaria da sottoporre ai tradizionali saggi di attività *in batch* a causa della struttura unitaria del monolita, è stato necessario sviluppare un metodo *on-column* per il calcolo dei parametri cinetici dell'enzima immobilizzato (V_{max} e K_m), dai quali è stato possibile risalire al numero di unità di enzima realmente espresse nella colonna monolitica. I risultati ottenuti con il metodo sviluppato, descritto in dettaglio in (11), hanno indicato che tutte le unità di enzima immobilizzate sulla colonna monolitica risultano espresse (Figura 2): la riduzione dei cammini diffusivi nei supporti monolitici consente pertanto di superare i problemi di parziale perdita di attività (pari al 37% circa dell'attività iniziale) incontrati con la silice particellare, e garantisce la massima espressione dell'attività enzimatica.

Separazioni chirali high-throughput

Una delle caratteristiche principali dei supporti monolitici è la possibilità di lavorare a flussi elevati senza compromettere l'efficienza cromatografica e la pressione del sistema. Per verificare che anche la PGA immobilizzata sulla colonna monolitica potesse godere delle caratteristiche idro-

dinamiche favorevoli del supporto, sono state condotte prove di separazione di un composto test, il ketoprofene racemo, a diversi flussi operativi (tra 0,4 e 3 ml/min.). Come mostrano i cromatogrammi in Figura 3, all'aumentare del flusso si riducono i tempi di ritenzione e la selettività rimane pressoché inalterata: in soli tre minuti di analisi, ad un flusso operativo di 3 ml/min., si ha la separazione completa degli enantiomeri. All'aumentare del flusso la riduzione dell'efficienza cromatografica risulta contenuta, come indicano le curve di Van Deemter costruite per entrambe gli enantiomeri (Figura 4), e contemporaneamente i valori di pressione (circa 80 bar per un flusso di 3 ml/min.) restano del tutto compatibili con la stabilità dell'enzima.

TABELLA 1

	Riduzione % dopo 50 analisi PGA- particellare	PGA- monolitica
k_1	13,69	3,43
k_2	16,63	11,89

Riduzione percentuale della ritenzione dei due enantiomeri del ketoprofene racemo 0,1 mM. Fase mobile: KH_2PO_4 50 mM, pH 7,0; flusso 0,8 ml/min.

Stabilità

Per valutare la stabilità delle due colonne enzimatiche (PGA particellare e PGA monolitica) è stata eseguita un'analisi test delle capacità enantioselettive della colonna (ketoprofene racemo in condizioni cromatografiche standard) all'inizio e dopo 50 analisi condotte in condizioni di stress per la fase stazionaria. I risultati (Tabella 1) hanno indicato una riduzione dei fattori di capacità, più marcata per il secondo enantiomero eluito: questo risultato è stato da noi attribuito ad una parziale denaturazione. La riduzione di k è tuttavia più significativa per la colonna particellare rispetto alla monolitica. Questo supporto sembra quindi garantire una maggiore stabilità dell'enzima nel tempo.

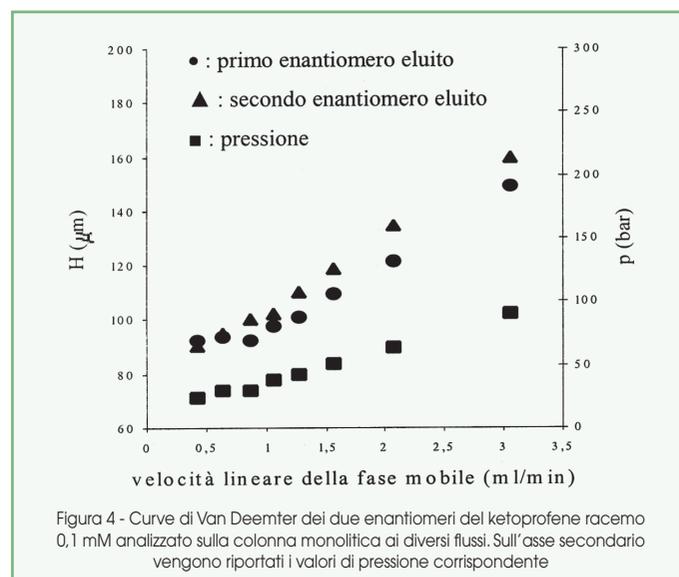
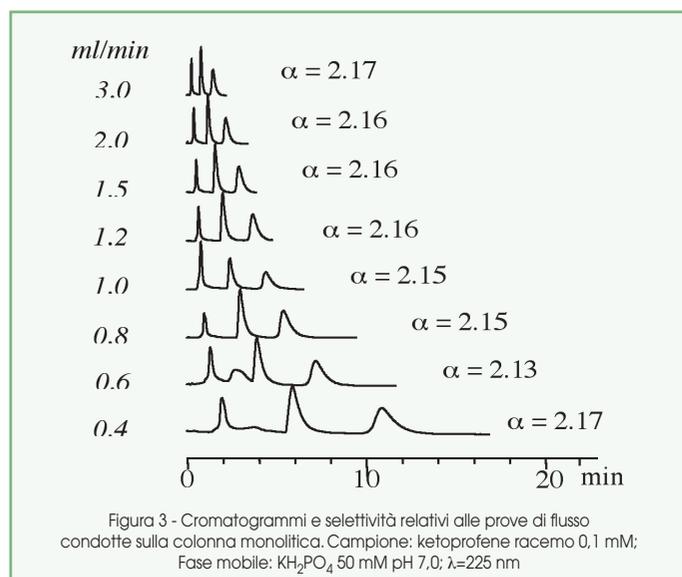
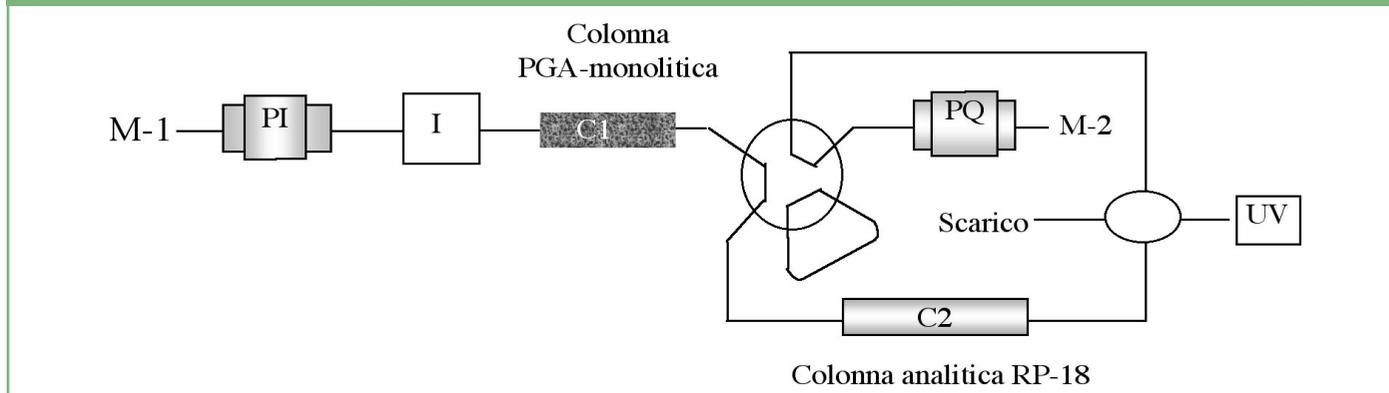


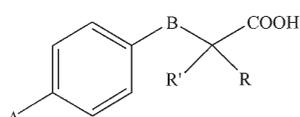
Figura 5 - Set-up cromatografico adottato per gli studi di catalisi enantioselettive. Condizioni cromatografiche e procedura di analisi sono descritte in dettaglio in (11)



Efficienza cromatografica

Un altro aspetto che si è studiato è stata la possibilità di aumentare la capacità risolutiva della fase stazionaria a base di PGA, migliorandone l'efficienza. Per questo è stata analizzata sulla colonna PGA-monolitica una serie di composti acidi strutturalmente correlati (Tabella 2) ed i valori ottenuti di ritenzione (k), selettività (α), risoluzione (R) ed efficienza cromatografica (N) sono stati messi a confronto con quelli ottenuti alle stesse condizioni cromatografiche (fase mobile: KH_2PO_4 50 mM, pH 7,0; flusso 0,8 ml/min.) sulla corrispondente colonna di silice particellare (4, 10). In Tabella 3 sono riportati gli andamenti dei parametri cromatografici considerati. La colonna monolitica presenta valori di risoluzione inferiori rispetto alla particellare, contrariamente a quanto atteso visti i presupposti di efficienza cromatografica legati al supporto monolitico, peraltro confermati dal maggior numero di piatti teorici calcolati per la colonna monolitica.

TABELLA 2



A	Cl; Br; F; CH_3 ; $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$; $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$; $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$
B	O; S; CH_2
R	CH_3 ; C_2H_5 ; C_6H_5
R'	H; C_6H_5

Struttura generale e sostituenti dei composti analizzati

È proprio la riduzione di α a diminuire la risoluzione, a causa di un anomalo andamento dei fattori di ritenzione dei due enantiomeri: mentre il primo enantiomero eluito risulta sensibilmente più trattenuto sulla colonna monolitica, il secondo enantiomero ha un andamento opposto. Per poter comprendere questo fenomeno è necessario precisare che il meccanismo di ricognizione chi-

rale della PGA non è uguale per i due enantiomeri, come precedentemente dimostrato durante la caratterizzazione della fase stazionaria (4). In particolare, mentre la ritenzione del primo enantiomero eluito è governata prevalentemente da interazioni di tipo aspecifico (a livello dell'intera superficie della proteina), per il secondo enantiomero giocano un ruolo predominante le interazioni specifiche (a livello del sito attivo). In teoria, la presenza di una maggiore quantità di enzima dovrebbe favorire in ugual misura le interazioni specifiche e quelle aspecifiche. In realtà l'elevata quantità di enzima favorisce la seconda in modo più significativo rispetto alla prima. È ragionevole pensare che l'aumento di densità dell'enzima nella colonna provochi una sorta di ingombro e riduca in qualche modo l'accessibilità del sito attivo, e questo si riflette maggiormente sulla ritenzione del secondo enantiomero.

Bioreattore

La possibilità di immobilizzare su supporti monolitici quantità di enzima decisamente più elevate rispetto ai supporti particellari tradizionali e le basse pressioni offerte è sembrata sfruttabile nell'ottica di impiegare queste colonne come bioreattori in sistemi cromatografici bidimensionali, per condurre reazioni di idrolisi enantiose-

TABELLA 3

Colonna PGA-monolitica vs PGA-particellare

k_1	>>
k_2	<
α	<
R	<
N_1	>
N_2	>

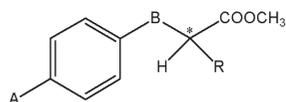
Confronto dei parametri cromatografici ottenuti dall'analisi dei composti (Tabella 2) analizzati sulle due colonne

Monolithic Chiral Stationary Phases. Use of Penicillin G Acylase as Chiral Selector

Epoxy monolithic silica has been used as immobilization support for the chiral selector penicillin G acylase. The developed stationary phase was employed for high-throughput enantioseparations and as bioreactor in a bidimensional chromatographic system for enantioselective catalysis studies. Stability and efficiency were evaluated in comparison to the corresponding microparticulate column.

ABSTRACT

TABELLA 4



A	B	R	C% on line	CV%	ee off line	E
Cl	O	CH ₃	50,6	2,97	81,08% (\$)	23
Cl	O	C ₂ H ₅	5,4	0,46	39,04% (\$)	2,3
Cl	O	C ₆ H ₅	47,9	2,75	99,9% (\$)	>200
Cl	S	CH ₃	19,7	4,8	4,30% (\$)	1,1
Cl	NH	CH ₃	6,7	2,2	66,37% (\$)	5,3
Cl	CH ₂	CH ₃	10,5	0,64	38,20% (\$)	2,3
Br	O	CH ₃	46,7	0,73	82,90% (\$)	23
F	O	CH ₃	28,2	0,42	17,10% (\$)	1,5
CH ₃	O	CH ₃	22,7	0,25	85,30% (\$)	15

C% = resa di idrolisi ee = eccesso enantiomerico E = enantioselettività

Struttura chimica delle 9 miscele racemiche di esteri metilici sottoposti ad idrolisi on-line e risultati ottenuti

lettive, separarne e quantificarne *on-line* i prodotti. Il bioreattore monolitico è stato quindi inserito in un sistema cromatografico connesso con una *switching valve* ad un secondo cromatografo dotato di una colonna analitica a fase inversa sulla quale i prodotti di reazione sono stati trasferiti, opportunamente separati e quantificati ed infine raccolti per la determinazione *off-line* dell'eccesso enantiomerico. In Figura 5 è schematizzato il set-up cromatografico adottato. Le condizioni cromatografiche e la procedura di analisi sono descritte dettagliatamente in (11).

I risultati sperimentali ottenuti con il sistema di idrolisi *on-line* di nove miscele racemiche di esteri metilici strutturalmente correlati (Tabella 4), hanno consentito di studiare gli effetti dei vari sostituenti sull'enantioselettività espressa dalla PGA nella loro idrolisi e di avanzare ipotesi circa i requisiti strutturali necessari per garantire enantioselettività. La presenza di un sostituito metilico al centro chirale garantisce elevate rese di idrolisi e marcata enantioselettività, mentre l'allungamento della catena porta ad una drastica riduzione di entrambe i parametri. Un anello aromatico nella stessa posizione consente di ottenere enantiospecificità di idrolisi. Per quanto riguarda l'eteroatomo in α al centro chirale,



la sostituzione isosterica dell'ossigeno sfavorisce l'affinità sia idrolitica sia enantioselettiva per il sito catalitico; l'aumento di lipofilia del sostituito all'anello aromatico favorisce la resa di idrolisi e garantisce una marcata enantioselettività. L'interazione dei composti analizzati con il sito attivo della PGA è stata inoltre simulata mediante studi di *docking* e *molecular modeling* che hanno supportato i dati sperimentali ottenuti confermando la validità del sistema cromatografico proposto (11).

Conclusioni

La valutazione del supporto monolitico come alternativa alla silice particellare ha consentito di migliorare ed estendere l'applicabilità della PGA-CSP: la nuova fase stazionaria chirale mostra una maggiore stabilità ed un'augmentata efficienza cromatografica. La possibilità di lavorare a flussi elevati, consente di ottenere risoluzioni enantiomeriche rapide visto che l'efficienza cromatografica ma soprattutto la selettività non sono particolarmente influenzate dall'aumento del flusso, inoltre la pressione del sistema risulta compatibile con le condizioni necessarie alla stabilità dell'enzima.

Il sistema cromatografico bidimensionale proposto ha consentito di automatizzare i processi di idrolisi e di separazione dei prodotti di reazione, con il vantaggio della riproducibilità e della precisione offerte dal sistema cromatografico.

I risultati ottenuti negli studi condotti hanno inoltre contribuito ad ampliare le conoscenze sulla struttura del sito attivo della PGA, dati estremamente utili nella predizione dell'affinità del sito attivo nei confronti di nuove molecole di potenziale interesse. Il sito attivo della PGA è direttamente coinvolto nel meccanismo di ricognizione chirale, ed è costituito (Figura 6) da una tasca principale, lipofila, dove si inseriscono composti a struttura riconducibile a quella fenilacetica, presentanti piccoli sostituito a carattere elettronattrattore. Esiste una piccola tasca adiacente a quella principale lipofila, che stabilisce le dimensioni del sostituito al centro chirale, l'interazione con la quale è essenziale per la selettività. È possibile ipotizzare inoltre l'esistenza di secondo sito lipofilo, con il quale interagiscono in modo aspecifico (formando interazioni di tipo π - π) i composti dotati di due anelli aromatici che proprio a causa dell'ingombro sterico male si adattano al sito attivo principale.

Bibliografia

- (1) S.H. Done *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1998, **284**, 463.
- (2) W.B.L. Alkema *et al.*, *Protein Eng.*, 2000, **13**(12), 857.
- (3) G. Massolini *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2001, **921**, 147.
- (4) E. Calleri *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2002, **958**, 131.
- (5) N. Tanaka *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2002, **965**, 35.
- (6) H. Minakuchi *et al.*, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 3498.
- (7) K. Cabrera *et al.*, *J. High Resol. Chromatogr.*, 2000, **23**, 99.
- (8) D. Josic *et al.*, *J. Chromatogr. B*, 2001, **752**, 191.
- (9) D. Josic, A. Buchacher, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2001, **49**, 153.
- (10) E. Calleri *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1031**, 93.
- (11) G. Massolini *et al.*, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 535.