

Silvia Rocchietti
 Innovate Biotechnology Srl
 Tortona (AL)

Marco Terreni, Massimo Pregnotato, Daniela Ubiali
 Laboratorio di Biocatalisi Farmaceutica
 Università di Pavia
 silvia.rocchietti@gmail.com



BIOCATALISI E INNOVAZIONE

Reazioni enzimatiche regio- ed enantioselettive

La biocatalisi rappresenta una fonte di innovazione inserendosi nel programma di sviluppo sostenibile come valida alternativa alla sintesi chimica tradizionale. Il principale vantaggio offerto è la possibilità di operare in ambiente acquoso e in blande condizioni di reazione. In questo contesto, Innovate Biotechnology, attraverso la progettazione dell'opportuna tecnica di immobilizzazione dell'enzima, è in grado di ottenere un catalizzatore attivo, stabile e con ottime caratteristiche di selettività conferendo al processo sviluppato migliori qualità ed economicità.

Nell'ambito della sintesi industriale di farmaci o "fine chemicals", la biocatalisi si sta configurando come alternativa alla sintesi chimica tradizionale essendo in grado di offrire notevoli vantaggi sia in termini di sviluppo sostenibile sia di qualità del prodotto. Infatti, la possibilità di operare in ambiente acquoso e in blande condizioni di reazione, di disporre di sistemi altamente selettivi e di ottenere il prodotto in pochi stadi, conferisce all'intero processo un maggiore grado di qualità ed economicità.

Tuttavia, la messa a punto di un processo biocatalitico richiede l'integrazione di competenze multidisciplinari che comprendono conoscenze in campo microbiologico,

genetico, di ingegneria della proteina e del reattore. Tale fattore ha limitato, fino ad oggi, lo sviluppo industriale di processi biotecnologici determinando altresì l'importanza di potersi avvalere di aziende in grado di sviluppare al proprio interno tale multidisciplinarietà.

In questo contesto, Innovate Biotechnology, è in grado di fornire una vasta gamma di soluzioni per l'ottimizzazione di un biocatalizzatore. Infatti, attraverso la selezione dell'enzima libero e la progettazione dell'opportuna tecnica di immobilizzazione dell'enzima, è possibile ottenere un catalizzatore attivo, stabile e con ottime caratteristiche di selettività. Inoltre, l'opportunità di disporre di un enzima immobi-

lizzato su un supporto solido ne garantisce un facile recupero e riutilizzo per un elevato numero di cicli.

Tale strategia può essere applicata a molecole di diversa natura ed a diverse tipologie di reazione (regio-, stereo- ed enantio-selettive).

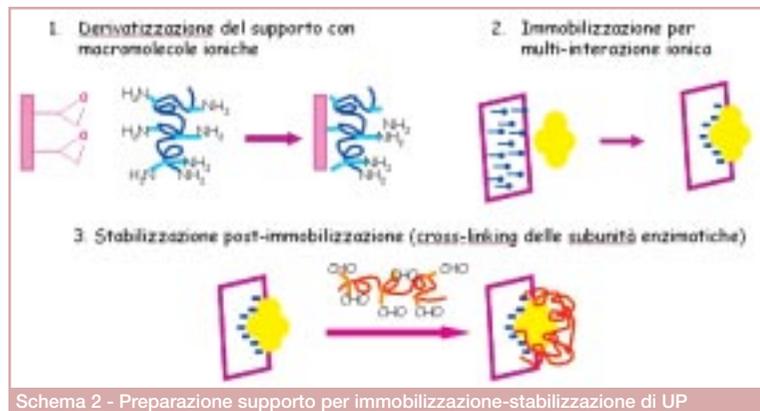
Un chiaro esempio di ciò che può essere fatto con l'ausilio della biotecnologia riguarda la sintesi di nucleosidi modificati alla base o alla porzione glicosidica della molecola, molecole di largo uso in molti campi (farmaceutico, alimentare...).

Nucleosidi ad alto valore aggiunto modificati alla base possono essere ottenuti a partire da un nucleoside di basso costo mediante una reazione di transglicosilazione che

prevede l'utilizzo di nucleoside fosforilasi quali uridina fosforilasi (UP) e purina nucleoside fosforilasi (PNP) (Schema 1a).

Tali enzimi sono caratterizzati da una natura multimerica che li rende particolarmente instabili in drastiche condizioni di reazione in quanto tendono a scindersi nelle loro subunità perdendo l'integrità strutturale e conseguentemente l'attività. In questo senso, la progettazione del supporto e della tecnica di immobilizzazione opportuni ha permesso di ottenere catalizzatori attivi e stabili in una vasta gamma di condizioni sperimentali [1]. La strategia applicata per UP ha previsto l'utilizzo di macromolecole sia in fase di preparazione del supporto (polietilenimina) sia in fase di stabilizzazione post-immobilizzazione (destrano) dando luogo a legami multipuntuali in grado di coinvolgere tutte le subunità (Schema 2) e di non danneggiare la struttura tridimensionale dell'enzima. Allo

superiore al 90%, la sintesi "one-pot" di 2'-desossiguanosina in acqua, reazione che richiede estreme condizioni di reazione (temperatura di 45 °C e pH 10). La stessa sintesi non avviene utilizzando gli enzimi liberi a causa della loro rapida inattivazione. Un vantaggioso processo biocatalitico è stato condotto con successo anche per la sintesi di nucleosidi modificati alla porzione glicosidica della molecola. Utilizzando come substrati nucleosidi peracetilati (Schema 1b), è possibile, selezionando ed immobilizzando opportunamente una lipasi, deproteggere selettivamente la posizione 3' o 5' o entrambe (Schema 1c)



Schema 2 - Preparazione supporto per immobilizzazione-stabilizzazione di UP

mentari nei "baby food", o intermedi per la preparazione di farmaci quali Bucladesina, Doxiluridina, Zidovudina.

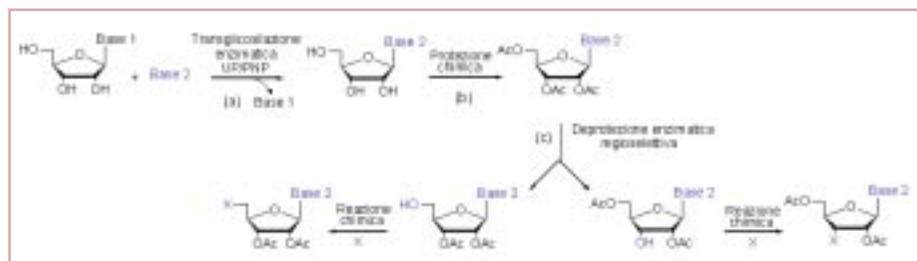
L'innovazione di questa strategia risiede nel basso costo dei materiali di partenza e nella possibilità di ottenere nucleosidi di alto valore aggiunto in pochi passaggi e con

stesso scopo, per PNP, è stata utilizzata una tecnica di immobilizzazione multipuntuale; in questo caso è stato sufficiente utilizzare un supporto attivato con glicidolo. Ciò ha permesso di condurre, con una resa

[2]. Ciò consente di derivatizzare selettivamente un'unica posizione della molecola ottenendo, ad esempio, i nucleosidi 5'-monofosfato, utilizzabili come farmaci (Fludarabina fosfato) o come additivi ali-

alte rese, rispettando i canoni richiesti da uno sviluppo sostenibile.

L'elevata versatilità dell'approccio enzimatico viene vantaggiosamente applicata anche alla risoluzione enzimatica di miscele racemiche, aspetto molto importante nel campo della chimica farmaceutica. La progettazione dell'opportuna tecnica di immobilizzazione e l'ottimizzazione delle condizioni di reazione sono fattori essenziali per ottenere buone caratteristiche di enantioselectività [3, 4]. La panoramica dei vantaggi offerti dalla biocatalisi può permettere di considerare lo sviluppo sostenibile una realtà sempre più vicina e concreta.



Schema 1

Bibliografia

- [1] M. Pregolato *et al.*, *PCT Int. Appl.*, WO 0308619 A1, 2003.
 [2] S. Rocchietti *et al.*, *PCT Int. Appl.*, WO 03057894

- A1, 2003.
 [3] M. Pregolato *et al.*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, **11**, 757.
 [4] S. Rocchietti *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 88.