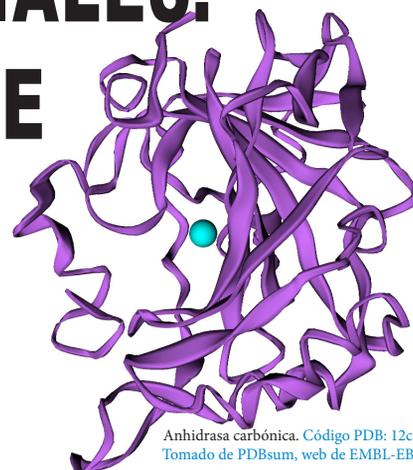


Artificial Metalloenzymes: Types and advantages over classic metalloenzymes

# METALOENZIMAS ARTIFICIALES: TIPOS Y VENTAJAS FRENTE A LAS METALOENZIMAS CONVENCIONALES

Álvaro Castañeda\*



*El desarrollo de catalizadores eficientes, que reporten rendimientos elevados y altas selectividades, ha sido un tema de interés desde el inicio de la era industrial. Los catalizadores han sido fundamentales en la implementación de procesos de síntesis a nivel industrial, pero presentan limitaciones. Recientemente, la modificación de metalloenzimas naturales para ser empleadas como catalizadores industriales ha recibido bastante atención de la comunidad científica. Incluso, debido a los grandes resultados obtenidos en los últimos años, este desarrollo fue reconocido con el Premio Nobel de Química en el año 2018. Mediante distintas modificaciones, hoy en día es posible hacer que las enzimas cambien el sustrato con el que trabajan, la reacción que catalizan e incluso el medio en el que son activas. Estas modificaciones pueden hacerse tanto en la parte globular de la proteína, como solo en el centro metálico, o en ambos. Similarmente, es posible trabajar con metalloenzimas y catalizadores clásicos en conjunto, con la finalidad de mejorar, aún más, los resultados obtenidos.*

**Palabras clave:** metalloenzimas modificadas, evolución dirigida, reacciones quimioenzimáticas.

La catálisis es una rama de la química que ha ido evolucionando rápidamente en los últimos años debido a su gran importancia a nivel industrial. El objetivo fundamental de esta parte de la química es aumentar la velocidad de una reacción mediante el uso de una sustancia denominada catalizador. Estas reacciones aceleradas toman lugar en el sitio activo del catalizador, donde los reactantes (habitualmente denominados como sustratos) se anclan e interaccionan de una manera más eficiente y, por ende, más rápida. Muchas

\*Egresado de la especialidad de Química de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la PUCP. Integrante del Grupo de Investigación de Modificación de Materiales de la PUCP. Actualmente se desempeña en el área de calidad del grupo AGP Perú SAC.

<https://orcid.org/0000-0001-8651-1941>



*The development of high yield and high selectivity catalysts has been a topic of great interest since the beginning of the industrial era, as these catalysts can be greatly helpful in synthesis at either laboratory or industrial stages. Lately, the modification of metalloenzymes has acquired quite a lot of attention due to the achievements of recent years, which led to its recognition with the Nobel Prize in Chemistry in 2018. By making a variety of modifications, it is possible to change the enzyme's substrate as well as the reaction medium in which they are active. These modifications can be made in the amino acid sequence of the protein, in the identity of the active site metal or both. Similarly, it is possible for metalloenzymes and traditional catalysts to work as one, with the objective to vastly improve the catalytic efficiency.*

**Keywords:** artificial metalloenzymes, directed evolution, chemoenzymatic reactions.

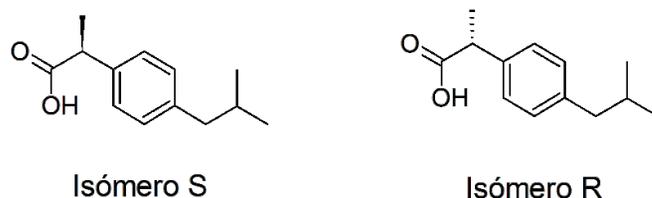
veces el catalizador también hace que la reacción se lleve a cabo por un camino alternativo sin que esto altere el producto. Este camino alternativo es denominado ciclo catalítico y, al final de este, el catalizador se recupera intacto, permitiéndole catalizar la reacción de más de un de sustrato. Los catalizadores son de mucha importancia en la industria, debido a que hacen posible la producción de una variedad de sustancias químicas que, de otra forma, serían muy costosas y complicadas de conseguir. Estas sustancias pueden ir desde medicamentos que consumimos de manera recurrente como el paracetamol hasta sustancias tan importantes como los fertilizantes y los pesticidas.

En catálisis existen varios términos que son utilizados con frecuencia con la finalidad de describir el desempeño de un catalizador. Para que la catálisis sea viable, por

ejemplo, es crucial una buena interacción entre el sitio activo del catalizador y el sustrato, así como una rápida reacción en el sitio activo. Estos requisitos tienen asociadas variables numéricas que facilitan la comparación entre catalizadores.<sup>1</sup> La variable asociada al anclaje del sustrato con el catalizador es la constante de Michaelis ( $K_M$ ). Un bajo valor de  $K_M$  se traduce en un anclaje fuerte del sustrato al sitio activo del catalizador, mientras que un valor elevado de esta variable se traduce en una mala interacción. La velocidad de la reacción en el catalizador se mide utilizando la variable  $k_{cat}$  o frecuencia de recambio (TOF por sus siglas en inglés), la cual se define como el número de ciclos catalíticos que se llevan a cabo en un periodo de tiempo determinado. Es decir, un mayor valor de  $k_{cat}$  se traduce en una mayor cantidad de ciclos catalíticos por unidad de tiempo, en otras palabras, una mayor velocidad de reacción. Muchas veces para medir la eficiencia catalítica se utiliza el cociente  $k_{cat}/K_M$ , el cual refleja tanto la velocidad como la eficiencia del anclaje. Un valor elevado de  $k_{cat}$  (mayor velocidad de reacción) y un valor bajo de  $K_M$  (interacción fuerte entre sustrato y sitio activo) resultarán en un valor elevado del cociente, lo cual indica una alta eficiencia catalítica.

La velocidad no es el único factor importante en la catálisis de una reacción, también es importante el rendimiento de la misma (que debe ser maximizado con el fin de que la gran mayoría de los reactantes se conviertan en el producto deseado), así como las características del producto final (su estereoquímica, por ejemplo). Este último punto es importante porque, en ocasiones, solo es de interés industrial uno de los enantiómeros del producto buscado. Este es el caso del ibuprofeno, cuya estructura se observa en la **figura 1**. El ibuprofeno tiene dos isómeros, el S y el R, sin embargo, el isómero S es más activo frente a ciertos receptores, por lo cual es mucho más efectivo inhibiendo las enzimas COX-1 y COX-2 y, por ende, es mejor aliviando el dolor.<sup>2</sup> Para estos casos particulares existen catalizadores que favorecen la producción de un enantiómero sobre otro, gracias a la posición en la que encajan los reactantes en el sitio activo. Estos catalizadores se caracterizan por protagonizar reacciones cuyos productos tienen un elevado exceso enantiomérico (e.e.). Esta clase de reacciones son muy frecuentes en la naturaleza, tanto así, que las enzimas (proteínas que realizan procesos catalíticos en los seres vivos) son capaces de alcanzar valores de  $k_{cat}$ ,  $K_M$  y e.e. excepcionales, por lo que la eficiencia catalítica de las enzimas es incuestionable.

Un elevado porcentaje de las enzimas con actividades catalíticas presentan un centro metálico que participa en la reacción. Estas macromoléculas son denominadas meta-



**Figura 1.** Estructuras de los enantiómeros del ibuprofeno. El enantiómero S(+)-ibuprofeno es un potente analgésico.

loenzimas y un ejemplo de estas es la familia de citocromos P-450, las cuales son proteínas que se encargan de realizar la difícil tarea de oxigenar moléculas orgánicas a partir de una sustancia tan simple y abundante como es el oxígeno molecular,  $O_2$ . Aunque hoy en día existen métodos para oxidar moléculas orgánicas con agentes oxidantes fuertes tales como el permanganato de potasio, esta enzima logra insertar oxígenos en sustratos orgánicos estables utilizando solamente  $O_2$ . La clave de estas enzimas se encuentra en su sitio activo, el cual permite la activación precisa del  $O_2$  y de la molécula orgánica en cuestión. Existe una amplia variedad de enzimas P-450, que pueden catalizar este tipo de reacciones de manera selectiva sobre una diversidad de sustratos.

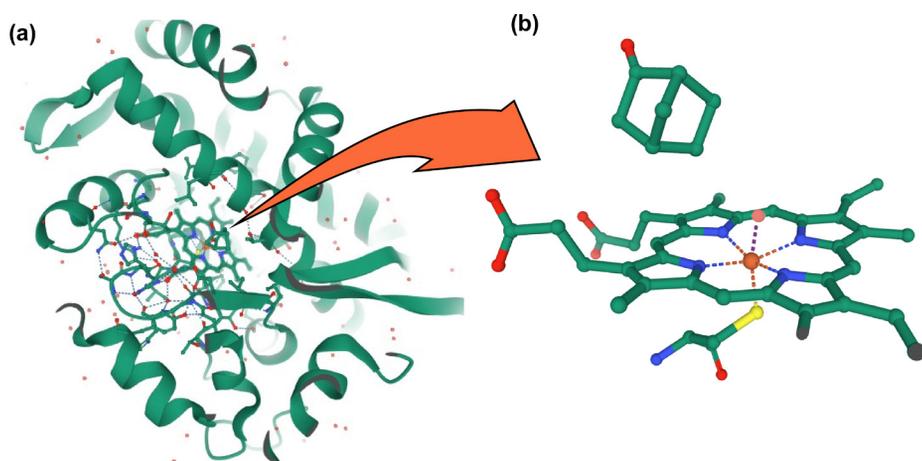
El sitio activo en la enzima citocromo P450 oxidasa se puede observar en la **figura 2**.<sup>3</sup> Este sitio está conformado por un grupo hemo, es decir, un anillo porfirina enlazado a un átomo de hierro. Este último juega un rol crucial en la actividad catalítica de esta metaloenzima: los reactantes interaccionan selectivamente con el átomo de hierro y este, gracias a su tamaño y sus propiedades de óxido reducción, permite que estos interaccionen entre sí con una orientación específica. Además, brinda la activación electrónica necesaria para que la reacción tome una ruta alternativa con una menor energía de activación.<sup>4</sup>

El sitio activo, sin embargo, no es la única parte de la proteína que interviene en la catálisis, cada porción de la proteína juega un rol específico. Por ejemplo, la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína, es decir, la parte globular de la misma, permite el ingreso de solamente ciertos sustratos, a cierta velocidad, así como la liberación de los productos una vez estos son obtenidos. En consecuencia, el secreto de una catálisis eficiente y selectiva proviene de una colaboración entre el sitio activo y la parte globular de la proteína. Es por ello que, desde hace ya varios años, se estudian las metaloenzimas, sus estructuras y sus ciclos catalíticos, con la esperanza de poder entender cómo es que se

1. Rothenberg, G. *The Basics of Catalysis*. in *Catalysis: Concepts and Green Applications*; Wiley, 2008; pp 39–75.
2. Evans, A. M. *Clinical Rheumatology Comparative Pharmacology of S(+)-Ibuprofen and (RS)-Ibuprofen*. *Clin. Rheumatol.* **2001**, *20* (1), 9–14.
3. Kaim, W.; Schwederski, B.; Klein, A. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic*

*Elements in the Chemistry of Life*, Second Edi.; Atwood, D., Crabtree, B., Meyer, G., Woollins, D., Eds.; Wiley, 2013.

4. Kaim, W.; Schwederski, B.; Klein, A. *6 Catalysis through Hemoproteins: Electron Transfer, Oxygen Activation and Metabolism of Inorganic*. In *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*; 2013; pp 99–116.



**Figura 2.** a) Sitio activo del citocromo P450 recubierto por la parte globular no activa de la proteína, b) Sitio activo del citocromo P450 sin la presencia de la parte no activa de la proteína y con la molécula de alcanfor en la parte superior (código de colores: verde= C, azul= N; Amarillo= S, rojo=O. Átomo central anaranjado= Fe. Las esferas rojas sin uniones son moléculas de agua; los hidrógenos están omitidos). Imagen creada a partir del PDB 7CCP de la RCSB,<sup>3</sup> usando Mol\* (D. Sehnal, A.S. Rose, J. Kovca, S.K. Burley, S. Velankar, “Mol\*: Towards a common library and tools for web molecular graphics” MolVA<sup>7</sup>. *EuroVis Proceedings*. 2018, 29-33.).

está dando la catálisis y poder diseñar proteínas que puedan llevar a cabo las reacciones que deseamos.

En este anhelo por diseñar catalizadores que “*hagan posible lo imposible*” es donde surgió el concepto de metaloenzimas artificiales. Estas consisten en proteínas modificadas o nuevas, diseñadas con la finalidad de que se catalice alguna reacción en particular, pero con la misma eficiencia y velocidad que las metaloenzimas nativas. Existe una gran variedad de métodos para diseñar metaloenzimas artificiales y el objetivo de este artículo es mostrar las metaloenzimas obtenidas por estos métodos, que se han clasificado en tres tipos. Las de tipo 1 son aquellas que consisten en modificaciones en la parte globular de la enzima; las de tipo 2 son aquellas que tendrán modificaciones en el centro metálico del sitio activo; y, finalmente, están las de tipo 3 que son aquellas que tienen modificaciones tanto en el centro metálico, como en la parte globular de la proteína. Adicionalmente, se detallará el uso de metaloenzimas en conjunto con catalizadores organometálicos convencionales.

## METALOENZIMAS ARTIFICIALES: MODIFICACIONES EN LA PARTE GLOBULAR

Las metaloenzimas artificiales de tipo 1 son aquellas cuyas modificaciones buscan imitar el trabajo realizado por una proteína ya conocida o estudiada anteriormente. Este tipo de metaloproteínas se pueden separar en dos grupos: aquellas que son preparadas completamente *de novo*, es decir desde cero, y aquellas que surgen de la modificación de algunos aminoácidos (parte globular) de proteínas ya conocidas, con la finalidad de que su estructura y función se asemejen más a la de otra proteína. En este apartado se discutirá brevemente el proceso de creación de estas dos clases de proteínas y su viabilidad.

El diseño de metaloproteínas *de novo* consiste en construir una proteína desde su secuencia de aminoácidos,

es decir, desde su estructura primaria. Esta estructura no debe ser la misma que la de una proteína conocida, aunque puede ser inspirada en ella. Esta secuencia de aminoácidos toma una estructura tridimensional definida dentro de la cual se alojará un ion metálico, que será el centro efectivo para la catálisis.<sup>5</sup> La gran mayoría de estos trabajos se basan en crear cavidades, principalmente compuestas por estructuras alfa hélice, para alojar al ion metálico.<sup>6,7</sup> Por lo general, el diseño de esta clase de metaloproteínas sigue el siguiente orden: (1) armado de una estructura proteica inicial y genérica (como los complejos de alfa hélices) que tenga un tamaño apropiado para albergar al centro metálico de interés; (2) inserción de aminoácidos que tengan la capacidad de ligar con el cofactor de interés (en este sentido, se recomiendan pocos aminoácidos para una manipulación más sencilla, mientras que para los cofactores, estos pueden ser simples iones metálicos o también pueden ser complejos metálicos, como los del Fe(II) con anillos porfirina);<sup>5,8</sup> (3) modificación de la secuencia para facilitar el análisis de la proteína (esto se puede realizar incrementando la variedad de aminoácidos en la cadena) y (4) optimización de otras características importantes, tales como el tamaño de la cavidad donde entra el metal y los aminoácidos que actúan como ligandos, con la finalidad de impedir que entren moléculas no deseadas, como el agua (esto se puede hacer mediante ensayos de iteración).<sup>8</sup>

Esta clase de enfoque ha tenido resultados interesantes y prometedores, pero que no son suficientemente bue-

- Lu, Y.; Yeung, N.; Sieracki, N.; Marshall, N. M. *Design of Functional Metalloproteins*. *Nature* **2009**, *460* (7257), 855–862.
- Zastrow, M. L.; Peacock, A. F. A.; Stuckey, J. A.; Pecoraro, V. L. *Hydrolytic Catalysis and Structural Stabilization in a Designed Metalloprotein*. *Nat. Chem.* **2012**, *4* (2), 118–123.
- Hill, R. B.; Raleigh, D. P.; Lombardi, A.; Degrado, W. F. *De Novo Design of Helical Bundles as Models for Understanding Protein Folding and Function*. *Acc. Chem. Res.* 2000.
- Koder, R. L.; Anderson, J. L. R.; Solomon, L. A.; Reddy, K. S.; Moser, C. C.; Dutton, P. L. *Design and Engineering of an O<sub>2</sub> Transport Protein*. *Nature* **2009**, *458* (7236), 305–309.

nos como para superar la eficiencia y afinidad de las enzimas naturales. Un ejemplo de esto es la metaloenzima sintetizada por Zastrow y colaboradores, la cual tenía como finalidad la hidrólisis de ésteres ( $\rho$ NPA específicamente) y la hidratación del dióxido de carbono.<sup>6</sup> Este polipéptido tenía dos centros metálicos, un ion Hg (II) y otro Zn (II), los cuales cumplían roles catalíticos y estructurales respectivamente. Esta metaloenzima artificial presentó valores excepcionales de  $k_{cat}$  y  $K_m$  para ambos procesos con respecto a otras enzimas sintéticas (en algunos casos valores hasta 550 veces más favorables). A pesar de este avance, estos números eran todavía unas cien veces menores a los de la metaloenzima natural que cataliza la misma reacción, la anhidrasa carbónica II.<sup>6</sup> A pesar de esa diferencia con su contraparte natural, su gran mejora con respecto a modelos anteriores brinda un aire esperanzador a esta área de investigación.

Otra metaloproteína artificial con una historia similar fue la transportadora de  $O_2$  sintetizada por Koder y colaboradores.<sup>8</sup> Esta proteína no destacó por su gran afinidad por el CO ni por el  $O_2$ , ya que esta era bastante inferior a la presentada por otros transportadores de  $O_2$ , sino por ser la primera proteína (con histidina distal y grupo hemo) en tener una mayor afinidad por el  $O_2$  que por el CO.<sup>8</sup> Esto es importante porque la hemoglobina humana tiene un  $K_{aO_2}$  casi 200 veces más grande que el  $K_{aCO}$ , mientras que la proteína artificial presenta una constante de disociación ligeramente mayor para el CO que para el  $O_2$ .<sup>8</sup> Esta ventaja hacia la disociación del  $CO_2$  aún es superada por otras proteínas naturales (como la hemoglobina del parásito *Ascaris lumbricoide*), pero es un resultado que demuestra el gran potencial que este campo de investigación.

El segundo tipo de las proteínas mencionadas en esta categoría se basa en la modificación de algunos aminoácidos de una proteína conocida con la finalidad de mejorar su actividad o alterar su función. Esta tarea también es bastante complicada, ya que es difícil saber qué aminoácido o aminoácidos en particular, de los cientos que conforman una proteína, tienen roles claves en la actividad catalítica. En los últimos años se ha desarrollado una gran variedad de técnicas y/o estrategias para modificar los aminoácidos, y estas modificaciones han sido tanto aleatorias como específicas.<sup>9</sup> El avance en esta rama ha dado resultados sorprendentes y fue reconocida con el Premio Nobel de Química en el año 2018. El método galardonado con este premio es conocido como "evolución dirigida" y fue desarrollado por Frances H. Arnold y colaboradores.<sup>9,10</sup> El objetivo de la evolución dirigida es acelerar el

proceso de adaptación de una proteína a una nueva función o ambiente, y esto se alcanza mediante la introducción de mutaciones aleatorias en los aminoácidos que, se cree, juegan un rol crucial en la actividad de la proteína (**Figura 3**). El método es el siguiente: (1) primero se escoge una enzima de partida la cual debe ser apropiada para la tarea de interés (dependerá de la reacción a catalizar, por ejemplo); (2) luego se realizan una serie de modificaciones aleatorias en posiciones específicas de la cadena que, se creen, tendrán un impacto directo en la función y actividad de la proteína (estas posiciones suelen ser aquellas del sitio activo), esto se muestra en la primera sección de la **figura 3**; (3) se desarrolla un método de análisis para medir la actividad de la proteína en la función de interés; (4) el ADN que codifica la proteína es introducido a bacterias para que estas produzcan las enzimas mutadas (paso 2 en imagen); (5) se analizan las proteínas producidas, seleccionando las mejores para repetir el procedimiento hasta obtener la enzima mutada con resultados satisfactorios.<sup>10</sup>

Después de este proceso de evolución dirigida, una enzima puede ser miles de veces más efectiva que al inicio, tal como han observado diversos grupos de investigación. Una de estas investigaciones consistió en hacer que la proteína subtilisina E pueda trabajar en el solvente DMF, cuando originalmente esta proteína solo presentaba actividad en agua.<sup>11</sup>

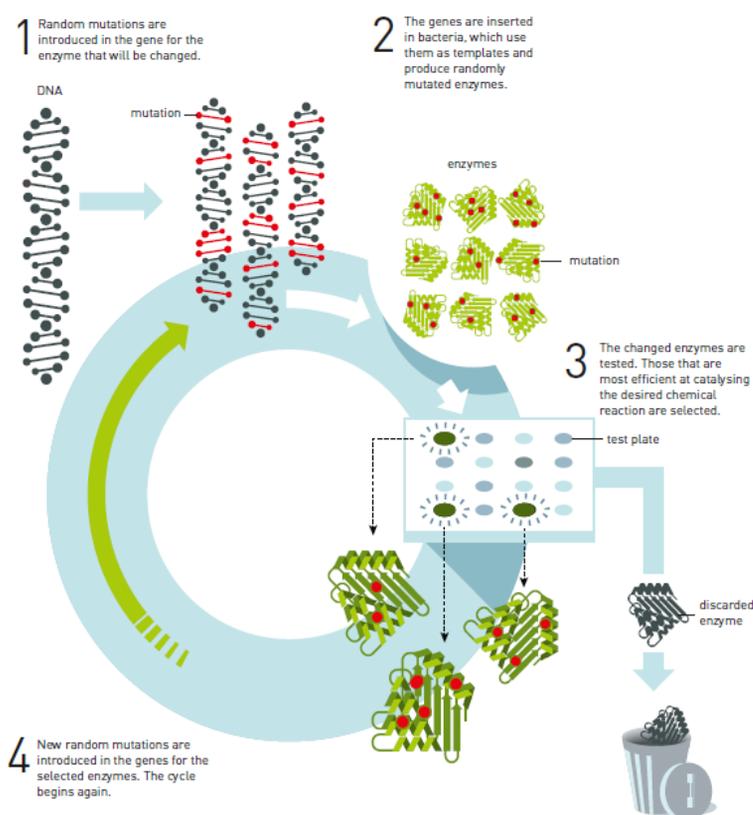
Este método de obtención de metaloproteínas no solo se limita a adaptar enzimas para trabajar en medios distintos, sino que también puede hacer que catalicen otras reacciones, dando lugar a productos con un elevado porcentaje de exceso enantiomérico (%e.e.). El grupo de Arnold realizó esto para el citocromo P450 de la bacteria *Bacillus megaterium* (P450-BM3). Encontraron que esta enzima podía favorecer la formación de ciclopropano a partir del estireno y etil-diazoacetato (EDA). Esta reacción es de mucha importancia industrialmente, ya que es la que permite la síntesis de ciertos antibióticos, así como de algunos pesticidas. Hoy en día la producción de estos involucra catalizadores de rodio y hierro, los cuales, a diferencia de esta alternativa, son caros y tóxicos. Inicialmente, los rendimientos de esta reacción fueron muy bajos (inferiores a 1% en 40 minutos), sin embargo, al realizar algunas variaciones a la estructura (principalmente a los aminoácidos que actuaban como ligandos del centro metálico), equivalentes a un 0.2% de los aminoácidos de la proteína, se lograron obtener enzimas mutantes que catalizaban la reacción, con un rendimiento del 60% en 40 minutos.<sup>12</sup> Con otras modificaciones genéticas posteriores (una vez más,

9. Farwell, C. C.; Zhang, R. K.; McIntosh, J. A.; Hyster, T. K.; Arnold, F. H. Enantioselective Enzyme-Catalyzed Aziridination Enabled by Active-Site Evolution of a Cytochrome P450. *ACS Cent. Sci.* 2015, 1 (2), 89–93.

10. Snogerup Línse, Sara: "Directed evolution of enzymes and binding proteins". Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry. The Royal Swedish Academy of Sciences, 2018.

11. You, L.; Arnold, F. H. Directed Evolution of Subtilisin E in *Bacillus Subtilis* to Enhance Total Activity in Aqueous Dimethylformamide. *Protein Eng.* 1996, 9 (1), 77–83.

12. Wang, Z. J.; Renata, H.; Peck, N. E.; Farwell, C. C.; Coelho, P. S.; Arnold, F. H. Improved Cyclopropanation Activity of Histidine-Ligated Cytochrome P450 Enables the Enantioselective Formal Synthesis of Levomilnacipran. *Angew. Chem - Int. Ed.* 2014, 53 (26), 6810–6813.



**Figura 3.** Metodología de la evolución dirigida en enzimas.<sup>10</sup> 1.) Se introducen mutaciones aleatorias al gen que codifica a la enzima a modificar. 2.) Los genes son insertados en bacterias, las cuales los usarán para producir las enzimas con mutaciones aleatorias. 3.) Las enzimas mutadas son evaluadas. Se seleccionan aquellas que catalizan más eficientemente la reacción de interés. 4.) Se introducen nuevas mutaciones a los genes que produjeron las enzimas seleccionadas. El ciclo comienza nuevamente. ©Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences.

mediante el enfoque de la evolución dirigida), se consiguieron valores de %e.e. cercanos al 100%.<sup>12</sup>

Así como las investigaciones previamente mencionadas, el grupo de Arnold ha trabajado con una gran variedad de metaloenzimas, llegando a modificar y mejorar su actividad e incluso solubilidad, lo cual indica que este método de elaboración de metaloenzimas de tipo 1 es uno de los mejores y más prometedores hasta la fecha.

## METALOENZIMAS ARTIFICIALES: MODIFICACIONES EN EL CENTRO METÁLICO

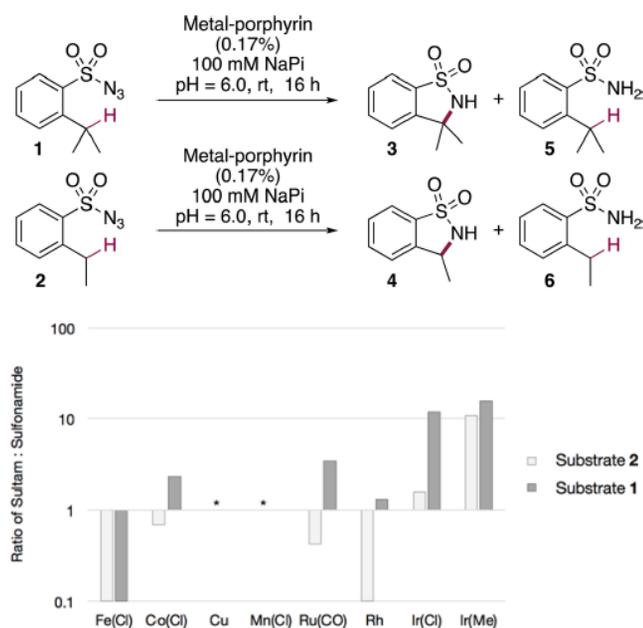
Las metaloenzimas modificadas de tipo 2 consisten en cambiar el ion metálico en el sitio activo de la proteína con la finalidad de alterar su reactividad y su función. A diferencia de las metaloenzimas de tipo 1, este tipo de enzimas trata de cambiar únicamente el ion metálico, lo cual, en ocasiones, presenta dificultades. El procedimiento es el siguiente: primero, se escogen los metales que tengan la posibilidad de

catalizar la reacción de interés. Luego, se sintetizan modelos estructurales con este metal y con la proteína que se desea utilizar como "ligando".<sup>13-15</sup> Estos modelos estructurales brindarán una idea de qué metales son los más prometedores para catalizar la reacción y, por ende, cuáles valdría la pena sustituir en la proteína. Un ejemplo del proceso de preselección se puede observar en la **figura 4**, la cual muestra los resultados de un estudio que utilizó esta clase de modelos.<sup>14</sup> En esa investigación se deseaba favorecer la producción de las sulfamas **3** y **4**, en vez de las sulfamidas **5** y **6**. Se trabajó con dos sustratos distintos (**1** y **2**), con la finalidad de verificar que el catalizador podía producir el mismo grupo de interés partiendo de sustratos similares. La gráfica en la figura muestra la razón molar de sulfamas/sulfamidas en función de los distintos metales estudiados, lo que permitió seleccionar a los complejos con Ir y Fe, pues fueron los únicos en favorecer claramente la producción de sulfamas y sulfamidas, respectivamente.

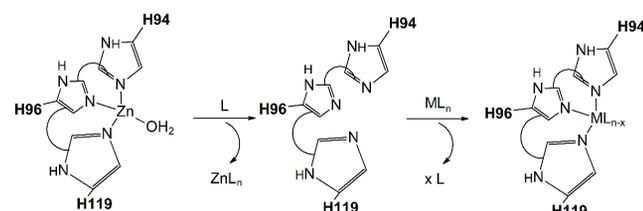
13. Natoli, S. N.; Hartwig, J. F. Noble-Metal Substitution in Hemoproteins: An Emerging Strategy for Abiological Catalysis. *Accounts of Chemical Research*. 2019.

14. Dydio, P.; Key, H. M.; Hayashi, H.; Clark, D. S.; Hartwig, J. F. Chemoselective, Enzymatic C-H Bond Amination Catalyzed by a Cytochrome P450 Containing an Ir(Me)-PIX Cofactor. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (5), 1750–1753.

15. Gu, Y.; Natoli, S. N.; Liu, Z.; Clark, D. S.; Hartwig, J. F. Site-Selective Functionalization of (Sp<sup>3</sup>)C-H Bonds Catalyzed by Artificial Metalloenzymes Containing an Iridium-Porphyrin Cofactor. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2019**.



**Figura 4.** Reacciones de interés, condiciones de reacción y razón de productos obtenida para distintos complejos M-Porfirina, donde M es el metal o complejo metálico utilizado. Los compuestos entre paréntesis son ligandos adicionales. Reproducido con permiso de Dydio, P.; Key, H. M.; Hayashi, H.; Clark, D. S.; Hartwig, J. F. *Chemoselective, Enzymatic C-H Bond Amination Catalyzed by a Cytochrome P450 Containing an Ir(Me)-PIX Cofactor*. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (5), 1750–1753. Copyright © (2017) American Chemical Society.



**Figura 5.** Método para intercambiar centros metálicos de los sitios activos de su respectiva proteína, aplicado al Zn de la anhidrasa carbónica. Adaptado con permiso de Key, H. M.; Clark, D. S.; Hartwig, J. F. *Generation, Characterization, and Tunable Reactivity of Organometallic Fragments Bound to a Protein Ligand*. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (25), 8261–8268. Copyright © (2015) American Chemical Society.

Una vez escogido el metal para modificar la metaloproteína, se procede a sintetizar la proteína con el nuevo metal para probar su reactividad y estudiar a mayor profundidad qué tan óptima es para la reacción y producto de interés. En los últimos años se han desarrollado diferentes metodologías que tienen la finalidad de añadir nuevos centros metálicos a estructuras proteicas. Inicialmente, se sintetizaba la proteína con normalidad y luego se trataba de remover el centro metálico original utilizando una especie de agentes quelantes, es decir se agregaban ligandos que fuesen mucho más afines al metal que los residuos en el centro activo de la proteína, tal como se muestra en la **figura 5**. En este caso, se desea-

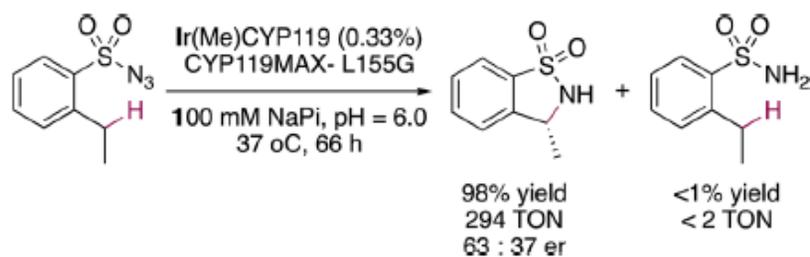
ba remover el Zn dentro de la anhidrasa carbónica, pero el procedimiento es válido para cualquier centro activo de una metaloproteína.<sup>16</sup> Después de que el sitio activo queda libre, se agrega el metal de interés, coordinado por ligandos que sean menos afines al metal que aquellos residuos del centro activo, de modo que el metal introducido pueda ser coordinado favorablemente por la proteína (**Figura 5**).

La gran dificultad de este método fue la separación las metaloenzimas con Zn de aquellas que ya no lo contenían, debido a que sus partes globulares eran idénticas.<sup>16</sup> Como consecuencia, se buscó desarrollar otro método que permitiese generar y purificar estas apo-proteínas (proteínas sin el metal en el centro catalítico) de una manera más sencilla. Recientemente ha surgido un nuevo método aplicable a metaloproteínas con grupos porfirina, el cual consistía en sintetizar la proteína con normalidad, pero en un ambiente con cantidades muy reducidas del metal de interés y de ácido- $\delta$ -aminolevulinico, un compuesto fundamental para la síntesis de porfirinas en medios biológicos.<sup>13</sup> Este método daba lugar directamente a la apo-proteína de interés, facilitando así su purificación. Para poder agregar el centro metálico deseado, era necesario agregar el complejo M-Porfirina (donde M es el metal de interés). Esta etapa también facilitaba la selectividad al momento de la adición del complejo, ya que era mucho más probable que el complejo M-Porfirina se anclase al sitio activo que a otra parte de la proteína (por el efecto estérico), sin embargo, esto aún no se estudia a profundidad.<sup>13</sup>

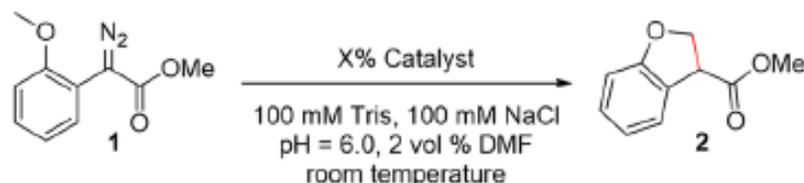
Estas nuevas metaloenzimas muestran resultados (rendimientos) bastante prometedores y muy superiores a los presentados por los complejos M-Porfirina sin la parte globular. Un ejemplo de esto se puede observar en la **figura 6**, donde se muestran los resultados de la misma investigación a la cual se hizo referencia en la **figura 4**. La proteína utilizada como andamio en este caso era un citocromo P450 con una variante en la posición 119, y el centro metálico utilizado fue iridio dentro de un anillo porfirina.<sup>14</sup> Los resultados muestran claramente cómo la alteración del centro metálico de la proteína permitió modificar su función: se logró favorecer la aminación de los enlaces C-H, en lugar de la típica oxidación de estos enlaces generada por los citocromos.<sup>14</sup> Similarmente, se obtuvieron rendimientos bastante elevados (98%) del compuesto de interés, pero una pobre enantioselectividad en el producto final.

Se puede concluir, entonces, que el centro metálico juega un rol importante en los mecanismos de catálisis y que, por ende, su modificación puede resultar beneficiosa si se desea favorecer la obtención de un producto en específico con alto rendimiento.

16. Key, H. M.; Clark, D. S.; Hartwig, J. F. *Generation, Characterization, and Tunable Reactivity of Organometallic Fragments Bound to a Protein Ligand*. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (25), 8261–8268.



**Figura 6. (izquierda arriba)** Reacción catalizada por una metaloproteína modificada con Ir. Reproducido con permiso de Dydio, P.; Key, H. M.; Hayashi, H.; Clark, D. S.; Hartwig, J. F. Chemoselective, Enzymatic C-H Bond Amination Catalyzed by a Cytochrome P450 Containing an Ir(Me)-PIX Cofactor. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (5), 1750–1753. Copyright © (2017) American Chemical Society.



**Figura 7. (izquierda abajo)** Reacción de inserción de carbeno en un enlace C-H, con la finalidad de formar un enlace C-C, el cual se encuentra marcado en rojo. Reproducido con permiso de Natoli, S. N.; Hartwig, J. F. Noble-Metal Substitution in Hemoproteins: An Emerging Strategy for Abiological Catalysis. *Accounts of Chemical Research.* **2019**, *52*(2) 326–335. Copyright © (2019) American Chemical Society.

## METALOENZIMAS ARTIFICIALES: MODIFICACIONES EN EL CENTRO METÁLICO Y EN LA PARTE GLOBULAR

Hasta ahora se han introducido metaloenzimas artificiales generadas por cambios solamente en la parte globular y por cambios solamente en el centro metálico del sitio activo, sin embargo, algunos investigadores emplean ambos cambios para alcanzar resultados aún más impresionantes. Esta clase de metaloenzimas, producto de la combinación de las metaloenzimas de tipo 1 y de tipo 2, se clasifican como tipo 3. El procedimiento es el siguiente: se inicia con la modificación del centro metálico para facilitar que la proteína haga la nueva tarea de interés, y luego se utiliza evolución dirigida para modificar la parte globular de la proteína y optimizarla para la reacción de interés, sea en términos de enantioselectividad o estereoselectividad. Aún hay pocas investigaciones de este tipo, ya que es un tema bastante reciente, pero se espera que aumenten en los próximos años.

Un ejemplo de esta clase de trabajo es el presentado por Sean N. Natoli y John F. Hartwig, en el cual modificaron los centros metálicos en la mioglobina y en el citocromo P450 119 con la finalidad de obtener una metaloproteína capaz de catalizar la inserción de un carbeno en un enlace C-H, con la finalidad de formar enlaces C-C (**Figura 7**).<sup>13</sup>

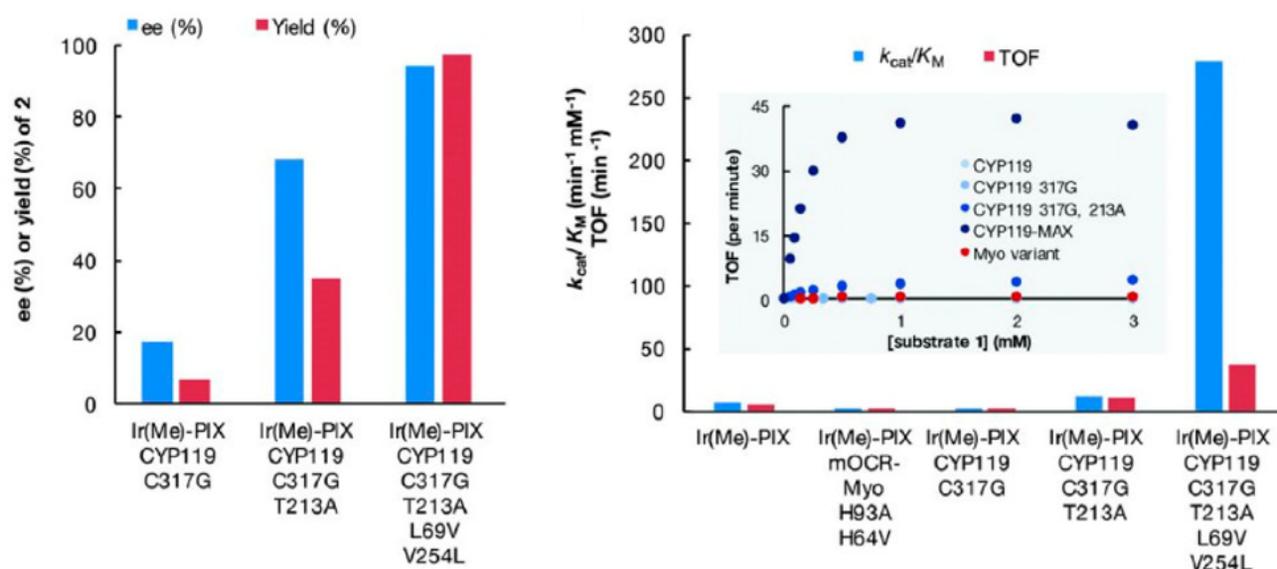
El estudio anterior trabajó con una variedad de centros metálicos unidos a un centro porfirina IX (PIX), siguiendo el procedimiento indicado en el apartado anterior. De los metales, el Ir fue el que presentó una mejor actividad catalítica. Una vez obtenida la metaloproteína con un nuevo centro metálico (sea la mioglobina o P450), se procedió a utilizar evolución dirigida para modificar aminoácidos próximos y distales al sitio activo, con la finalidad de mejorar los valores de e.e., rendimiento,  $k_{\text{cat}}/K_m$  y TOF. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 8**, donde se observan los valores de los parámetros

mencionados para cada metaloenzima artificial.<sup>13</sup> Se puede ver en A que, al someter a la proteína a más procesos de evolución dirigida, tanto el rendimiento como el e.e. mejoraron considerablemente, hasta alcanzar valores cercanos al 100%. Algo muy similar se puede observar en B, pero para los parámetros  $k_{\text{cat}}/K_m$  y TOF, donde se observan tendencias similares. Se puede ver claramente que la proteína que pasó por más etapas de evolución dirigida, denominada CYP119-MAX para abreviar, presenta valores superiores al del resto de proteínas menos modificadas. Los valores de  $k_{\text{cat}}$  y  $K_m$  obtenidos fueron bastante satisfactorios, comparables con los encontrados en metaloenzimas nativas.<sup>13</sup>

En estos estudios se puede observar claramente cómo las modificaciones en el centro metálico y en la parte globular se complementan y permiten que se diseñen proteínas que hagan roles completamente nuevos, con rendimientos y enantioselectividad elevados, lo que permite ampliar el espectro de posibilidades dentro de esta rama de la química bioinorgánica.

A pesar de mostrar altos rendimientos y e.e., es posible que estas proteínas pierdan selectividad hacia sustratos en particular, es decir, que ya no reaccionen priorizando un sustrato por otro, si no que reaccionen con varios sustratos. Esto se muestra en la **figura 9**.<sup>9</sup> En esta imagen se puede observar cómo, en presencia de dos sustratos (**1** y **3**), la metaloenzima previa a la evolución dirigida (**A**), reacciona principalmente con **1** y genera una abundancia mayor del producto **2**. Sin embargo, después del proceso de evolución dirigida (**B**), la reacción de la metaloenzima con los sustratos produce una mezcla de productos **2** y **4**, lo cual indica que la enzima ha perdido selectividad por el sustrato **1**.

Esto no es necesariamente malo. Todo depende del catalizador que se desea diseñar, es decir, si es de amplio espectro o específico. De igual manera, en caso se desee me-



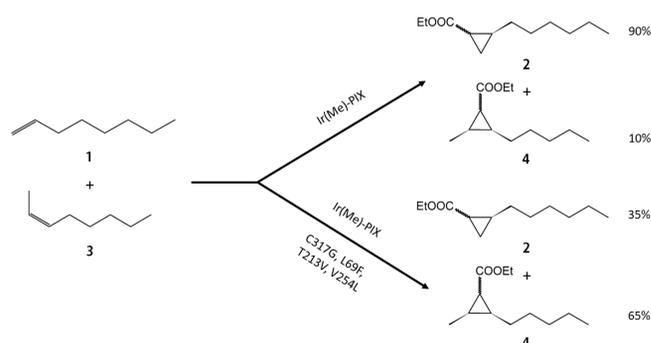
**Figura 8.** (A) Rendimientos y excesos enantioméricos (e.e.) de la P450 CYP119 modificada con Ir(Me) en función de las mutaciones y (B) Valores de  $k_{cat}/K_M$  y TOF para proteínas modificadas con Ir(Me) como centro metálico y mutaciones en la parte globular (Para Ir(Me)-PIX se utiliza la constante cinética de primer orden en lugar del  $k_{cat}/K_M$ ). Los códigos mostrados debajo de cada proteína indican las mutaciones generadas durante la evolución dirigida. La primera letra indica el aminoácido original, los números su posición en la cadena y la última letra el aminoácido por el que fue sustituido. Reproducido de Farwell, C. C.; Zhang, R. K.; McIntosh, J. A.; Hyster, T. K.; Arnold, F. H. *Enantioselective Enzyme-Catalyzed Aziridination Enabled by Active-Site Evolution of a Cytochrome P450*. *ACS Cent. Sci.* **2015**, *1* (2), 89–93.

jorar la selectividad por el sustrato, se podría seguir utilizando la evolución dirigida con este cometido.

Al igual que los otros dos tipos de metaloenzimas, las metaloenzimas de tipo 3 presentan resultados realmente impresionantes, los cuales evidencian que las modificaciones propias de las metaloenzimas de tipo 1 y tipo 2 pueden ser complementarias. El uso de ambos tipos de modificaciones en conjunto podría llevar a la producción de proteínas que hagan prácticamente cualquier trabajo, y que demoren relativamente poco tiempo en diseñarse, ya que la modificación del centro metálico por uno más afín a la catálisis de interés podría reducir el número de modificaciones a realizar en la etapa global, y, por ende, acelerar el proceso de desarrollo de estas nuevas proteínas.

## SISTEMAS CATALÍTICOS ENZIMA-CATALIZADOR

Para mejorar la actividad de las distintas metaloenzimas existen otras alternativas aparte de la modificación de las mismas. Por ejemplo, estas se pueden utilizar en conjunto con otros catalizadores para obtener resultados mejorados. Las reacciones que utilizan tanto enzimas como catalizadores organometálicos clásicos se denominan quimioenzimáticas y están caracterizadas por tener dos etapas, una primera etapa en la cual interacciona el catalizador organometálico con el sustrato y una segunda etapa en la cual la enzima interacciona con el producto de la primera etapa. Estas reacciones se caracterizan por ser de “one pot”, es decir, por realizarse en un mismo envase de reacción sin necesidad de purificar los productos de cada etapa antes de proseguir con la siguiente.

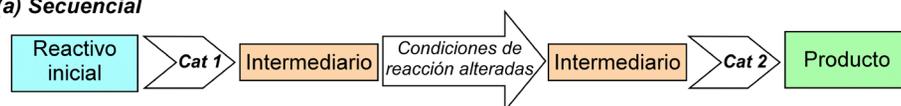


**Figura 9.** Comparación en términos de selectividad del sustrato para la reacción de formación de un ciclopropano a partir de un alqueno, catalizada por un complejo Ir(Me)-PIX y una modificación artificial de esta metaloenzima. Imagen basada en la información de la referencia 9 <https://doi.org/10.1021/acscentsci.5b00056>

Esta clase de reacciones, o conjuntos de reacciones, se pueden separar en dos grupos principales: reacciones secuenciales y reacciones cooperativas (**figura 10**).<sup>17</sup>

En estas reacciones, uno de los catalizadores debe ser una enzima y el otro debe ser un catalizador organometálico; el orden de estos puede variar dependiendo de la reacción, sin embargo, lo más común es que cat1 sea un catalizador organometálico y cat2 sea una enzima. Las reacciones se-

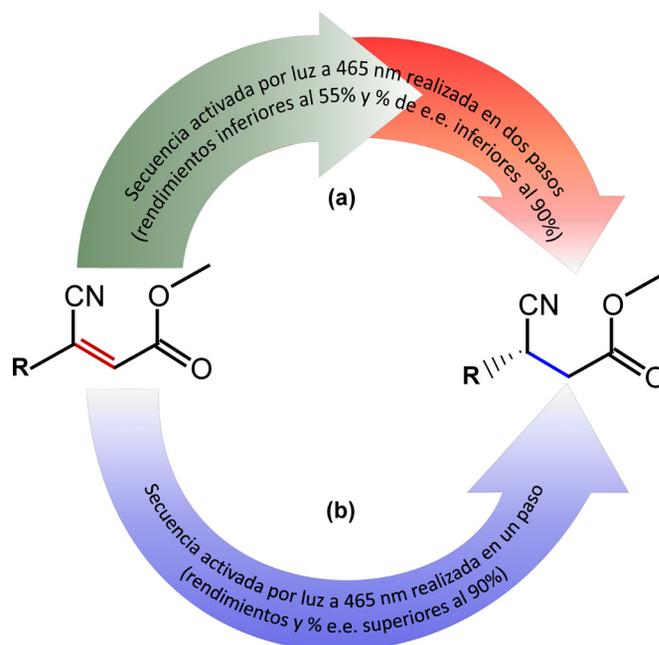
17. Litman, Z. C.; Wang, Y.; Zhao, H.; Hartwig, J. F. *Cooperative Asymmetric Reactions Combining Photocatalysis and Enzymatic Catalysis*. *Nature* **2018**, *560* (7718), 355–359.

(a) *Secuencial*(b) *Cooperativa*

cuenciales, **figura 10 (a)**, son aquellas en que se debe llevar a cabo un cambio de las condiciones de reacción entre las dos reacciones catalizadas. Esto puede deberse a distintos factores, entre ellos, la actividad de los catalizadores en los medios de trabajo: la mayoría de enzimas solo pueden trabajar en medio acuoso, mientras que la mayoría de catalizadores organometálicos clásicos trabajan en medios orgánicos. Esta diferencia hace que sea necesario cambiar el medio de reacción entre las dos etapas. Por otro lado, las reacciones quimioenzimáticas de tipo cooperativo, **figura 10 (b)**, no requieren que las condiciones de reacción se vean alteradas al pasar de una etapa a otra. Se pueden agregar los dos catalizadores y los cofactores que sean necesarios al medio de reacción desde el inicio, y la reacción se dará con normalidad.<sup>17,18</sup>

El proceso de diseño de estas reacciones en cadena es similar para ambos tipos (secuencial y cooperativa). Los compuestos objetivo suelen ser moléculas quirales y con una geometría en específica, los cuales son de gran interés para el desarrollo de compuestos biológicamente activos. Una vez que se define la molécula objetivo, se procede a buscar una enzima o catalizador (cat2) que la pueda producir con una elevada enantioselectividad. El siguiente paso es reconocer el sustrato (intermediario en la **figura 10**) que necesita la enzima o catalizador para producir el compuesto de interés; este sustrato suele tener una quiralidad y geometría definida. Para poder producir este sustrato con una elevada enantioselectividad, se buscan otros catalizadores/enzimas (cat 1) que puedan sintetizarlos a partir de compuestos que son accesibles con relativa facilidad. Se suele tener una gran variedad de cat1 y cat2 que puedan cumplir dichas funciones. Estos se prueban para ver sus rendimientos y los excesos enantioméricos (e.e.) que se obtienen al realizar las reacciones de interés (se prueban por separado). Después, se seleccionan los catalizadores más prometedores (mejores rendimientos y e.e.) para, ahora sí, probar su actividad trabajando en conjunto como muestra la **figura 10**.<sup>17-20</sup>

**Figura 10.** Esquema general de las reacciones quimioenzimáticas secuencial y cooperativas (véase más tipos en la referencia 17 <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0413-7>)



**Figura 11.** Ejemplo de fotoisomerización y reducción de alquenos mediante reacciones quimioenzimáticas de tipo (a) secuencial y (b) cooperativa (véase detalles en referencia 17).

Idealmente, se desea que estas dos reacciones sean de tipo cooperativo, ya que esto suele llevar a rendimientos mayores en toda la reacción y, en algunos casos, a mejores valores de e.e. Esto se debe, principalmente, a que el equilibrio de la reacción con cat1 se ve desplazado hacia los productos debido al continuo consumo de la reacción protagonizada por cat2. El cat2, que suele ser la enzima, da lugar a reacciones con equilibrios muy desplazados hacia los productos. Un ejemplo de esto se muestra en la **figura 11**, donde se puede observar los beneficios que brinda una reacción quimioenzimática cooperativa “one pot” frente a la misma reacción, pero de manera secuencial. Se puede observar que la reacción cooperativa presenta rendimientos y %e.e. claramente superiores frente a la reacción secuencial, como consecuencia del aprovechamiento del equilibrio.

18. Denard, C. A.; Huang, H.; Bartlett, M. J.; Lu, L.; Tan, Y.; Zhao, H.; Hartwig, J. F. *Cooperative Tandem Catalysis by an Organometallic Complex and a Metalloenzyme*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (2), 465–469.
19. Denard, C. A.; Bartlett, M. J.; Wang, Y.; Lu, L.; Hartwig, J. F.; Zhao, H. *Development of a One-Pot Tandem Reaction Combining Ruthenium-Catalyzed Alkene Metathesis and Enantioselective Enzymatic Oxidation to Produce Aryl Epoxides*. *ACS Catal.* **2015**, *5* (6), 3817–3822.

20. Wang, Y.; Bartlett, M. J.; Denard, C. A.; Hartwig, J. F.; Zhao, H. *Combining Rh-Catalyzed Diazocoupling and Enzymatic Reduction to Efficiently Synthesize Enantioenriched 2-Substituted Succinate Derivatives*. *ACS Catal.* **2017**, *7* (4), 2548–2552.

A pesar de que las reacciones quimioenzimáticas cooperativas presentan una clara ventaja frente a las secuenciales, estas no siempre son posibles. Existen casos en los cuales los catalizadores (cat1 y cat2) no pueden trabajar en el mismo medio de reacción, dificultando así que las reacciones se den en simultáneo. Frente a estos problemas existen tres alternativas, se puede utilizar evolución dirigida para lograr adaptar la enzima al medio reacción, también se puede optar por una reacción quimioenzimática secuencial o se puede intentar desarrollar una reacción cooperativa en dos fases (una para cada catalizador).<sup>18,19</sup> Las reacciones cooperativas bifásicas no alcanzan los resultados de aquellas realizadas en una sola fase, sin embargo, presentan resultados ligeramente superiores a las realizadas de manera secuencial.

## VISIÓN FINAL Y PERSPECTIVAS

Como se ha descrito, existe una gran variedad de metodologías para la preparación y evaluación de metaloenzimas artificiales, y estas pueden ser diferencias por el tipo de modificaciones que se ha empleado. Las metaloenzimas de tipo 1 son aquellas que se han preparado *de novo* o que consisten en modificar la parte globular de metaloenzimas nativas ya conocidas. El método más exitoso para preparar este tipo de enzimas es el segundo, conocido como evolución dirigida, que consiste en mutar aleatoriamente aminoácidos que puedan jugar un rol importante en la catálisis. Esto ha permitido producir metaloenzimas artificiales activas en medios no naturales o que incluso catalicen eficientemente una reacción completamente distinta a la que catalizaban naturalmente.

Las metaloenzimas de tipo 2, se forman por un cambio en el centro metálico del sitio activo, también han presentado resultados bastante prometedores, permitiendo que se catalicen reacciones que la enzima utilizada de andamio no podía catalizar eficientemente. Las metaloenzimas artificiales cumplen esto con eficiencias y velocidad que se acercan a las de enzimas nativas. Lamentablemente, al solo cambiar el centro metálico, es más difícil modificar otras aptitudes de la enzima, como su actividad en distintos solventes, sin embargo, si se trata solo de cambiar la reacción catalizada, esta clase de metaloenzimas artificiales son las más prometedoras.

Las metaloenzimas artificiales de tipo 3 son aquellas que tienen un futuro más esperanzador debido a que combinan lo mejor de los otros dos tipos. Al poder cambiar el metal sobre el cual se realiza la catálisis y, además, la parte globular externa de la proteína y sus aminoácidos, es posible diseñar metaloenzimas artificiales que puedan cumplir prácticamente cualquier función catalítica. La tecnología y teoría están disponibles, solo es cuestión de que esta rama de la investigación se siga desarrollando a pasos agigantados.

Finalmente, las reacciones quimioenzimáticas presentan una alternativa frente a las metaloenzimas artificiales. Estas no requieren modificar o rediseñar proteínas para catalizar ciertas reacciones o mejorar rendimientos, sino que buscan diseñar catalizadores organometálicos que puedan utilizarse en conjunto con proteínas ya conocidas para dar lugar compuestos de interés sintético, con elevados rendimientos. De los dos tipos mencionados (secuenciales y cooperativas), las reacciones cooperativas presentan mejores resultados, ya que, al trabajar los catalizadores en conjunto, el desplazamiento del equilibrio generado por un catalizador ayuda a mejorar los rendimientos de otro. Las reacciones quimioenzimáticas también tienen bastante potencial para sintetizar compuestos orgánicos específicos y podrían utilizarse en conjunto con metaloenzimas artificiales (de cualquier tipo) para sintetizar compuestos con incluso mayor rendimiento y selectividad.

Recibido: 9 de diciembre de 2019

Aceptado en forma final: 2 de noviembre de 2020

## BIBLIOGRAFÍA ESENCIAL

Natoli, S. N.; Hartwig, J. F. **Noble-Metal Substitution in Hemoproteins: An Emerging Strategy for Abiological Catalysis.** *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, **2**, 326–335 2019.

Dydo, P.; Key, H. M.; Hayashi, H.; Clark, D. S.; Hartwig, J. F. **Chemoselective, Enzymatic C-H Bond Amination Catalyzed by a Cytochrome P450 Containing an Ir(Me)-PIX Cofactor.** *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (5), 1750–1753.

Litman, Z. C.; Wang, Y.; Zhao, H.; Hartwig, J. F. **Cooperative Asymmetric Reactions Combining Photocatalysis and Enzymatic Catalysis.** *Nature* **2018**, *560* (7718), 355–359.