

## **Biotecnología blanca e industria farmacéutica**

Recibido el 1 de marzo de 2007

**JOSÉ MARÍA SÁNCHEZ MONTERO\***

*Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la UCM. Grupo de Biotransformaciones.  
Académico Correspondiente de la RANF*

### **RESUMEN**

La Biotecnología blanca está relacionada con la utilización de sistemas biológicos para la fabricación, transformación o degradación de moléculas gracias a procesos enzimáticos y fermentativos. Esta definición encuadra los procesos biocatalíticos y las biotransformaciones dentro de este conjunto de disciplinas y ciencias más amplio que se ha definido como Biotecnología.

La estabilización de enzimas y células para hacerlas más resistentes a los disolventes orgánicos mediante técnicas de inmovilización y modificación así como posteriormente por ingeniería genética ha supuesto el impulso significativo para este campo. Por otra parte, el conocimiento del medio de reacción así como el control de las variables que intervienen en el proceso ha supuesto una verdadera transformación tecnológica. La Biotecnología Industrial puede ser de una gran ayuda para la obtención de medicamentos (y otros bioproductos) que son difícil o imposibles de obtener mediante métodos químicos tradicionales.

En la actualidad más de 325 millones de personas en el mundo consumen medicamentos de origen biotecnológico, de lo que se deduce que la aplicación de la Biotecnología y Biocatálisis en particular ha atravesado la frontera académica en-

---

\* Discurso de ingreso como Académico Correspondiente.

Profesor Doctor J. M. Sánchez-Montero.

Grupo de Biotransformaciones. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria. 28040. Madrid.

E-mail: jsanchez@farm.ucm.es

contrando un amplio campo de acción en la Industria Farmacéutica. Los procesos biotecnológicos, por su elevada eficiencia y especificidad, cuentan entre sus propiedades más características el que generan unos menores niveles de residuos que los procesos químicos convencionales y, además, esos residuos son comparativamente mucho menos peligrosos.

**Palabras clave:** Biotransformaciones.—Estabilización.—Disolventes orgánicos.—Síntesis de fármacos.—Química verde.

## SUMMARY

### White Biotechnology and Pharmaceutical Industry

White Biotechnology is related to the utilization of biological systems for the manufacture, transformation or degradation of molecules using enzymatic and fermentative processes. This definition fits the biocatalytic processes and the biotransformations in the huge set of disciplines and sciences that have been defined as Biotechnology.

The stabilization of enzymes and cells for increasing their resistance towards the organic solvents by immobilization and modification techniques, as well as using genetic engineering, has supposed a significant impulse. On the other hand, the knowledge of the reaction media and the control of the variables affecting the process has supposed a real technological transformation. Industrial Biotechnology has become an important tool for obtaining drugs (and other bioproducts) which are difficult or impossible to obtain by chemical traditional methods.

At the present, more than 325 million people in the world use drugs with a biotechnological origin, so it can be deduced that the application of the Biotechnology (and specially Biocatalysis) has crossed the academic border finding a wide range of utilities in the pharmaceutical Industry. The biotechnological processes, due to their high efficiency and specificity, generate reduced levels of residues when compared to chemical conventional processes which on the other hand, are comparatively more dangerous.

**Key words:** Biotransformations.—Stabilization.—Organic solvents.—Drugs synthesis.—Green chemistry.

## INTRODUCCIÓN

El interés que ha despertado la Biotecnología en estos últimos años se ha traducido, entre otras cosas, en una proliferación de definiciones consecuencia directa de su observación desde diferentes enfoques, que tienen en común el empleo de seres vivos, sus proce-

sos o productos para la obtención de beneficios mediante la modificación de éstos y la de su entorno.

Por tanto, la Biotecnología no es, en sí misma, una ciencia; es un enfoque multidisciplinar que involucra varias disciplinas y ciencias (biología, bioquímica, genética, virología, ingeniería, química y medicina, entre otras) y representa una considerable diversidad de actividades industriales.

Por consiguiente podemos utilizar, como referencia, la definición de la OCDE que define la Biotecnología como: «*La aplicación de la ciencia y la tecnología a organismos vivos, así como también a partes, productos y modelos de los mismos, para alterar materiales vivos o no vivos para la producción de conocimientos, bienes y servicios*» (1).

Como consecuencia de lo anteriormente dicho, la Biotecnología tiene un impacto global a tres escalas.

Este impacto es global por naturaleza, ya que al tratarse de una tecnología, puede aplicarse a una gran cantidad de áreas o sectores como son la medicina, la farmacia, la agricultura, la alimentación, el medio ambiente, la producción industrial o la energía.

En segundo lugar, este impacto es global por alcance, pues la población demanda a lo largo de su vida atención sanitaria de calidad, así como alimentos saludables y una adecuada gestión y conservación de los recursos naturales, así como del medio ambiente.

También es global en lo que respecta al impacto que tiene sobre la economía, ya que puede considerarse como uno de los principales motores del crecimiento económico mundial, tanto en economías desarrolladas como en economías emergentes (2).

Actualmente es habitual clasificar dichas áreas de acuerdo a un código de colores con objeto de fraccionar esta complejidad que se inició con la Biotecnología roja, verde y blanca y se ha ampliado a la Biotecnología gris y azul de las cuales haremos una breve descripción (3).

- Biotecnología roja: Se refiere a las aplicaciones biotecnológicas en las áreas de salud humana y animal. Incluye tecnologías como el diagnóstico molecular, la ingeniería celular, nuevas

moléculas terapéuticas de origen biotecnológico y la terapia génica.

- Biotecnología verde: Se refiere a las aplicaciones de la biotecnología en agricultura y agroalimentación. También se incluye la investigación y obtención de plantas genéticamente modificadas como son las plantas transgénicas.
- Biotecnología blanca: Está relacionada con la utilización de sistemas biológicos para la fabricación, transformación o degradación de moléculas, gracias a procesos enzimáticos y fermentativos para aplicaciones industriales en sectores como el de los materiales, química y la energía. En estos casos, los procesos biotecnológicos se emplean como alternativa a procesos químicos convencionales, lo que conlleva ventajas económicas y medioambientales. La importancia de la biotecnología blanca para una industria más sostenible ha sido repetidamente señalada por entidades como la Comisión Europea o la OCDE, y es uno de los retos de la Plataforma Europea para la Química Sostenible.
- Biotecnología gris: Ésta se centra en las aplicaciones ambientales, creando soluciones tecnológicas sostenibles que ayudan a proteger el medio ambiente. Como ejemplo de lo dicho tendríamos la biorremediación.
- Biotecnología azul: Se refiere a las aplicaciones de la biotecnología de origen marino. Por ejemplo, búsqueda de sustancias de interés biomédico a partir de organismos marinos.

Esta clasificación por colores no consiste en una organización de una disciplina de acuerdo a criterios científicos ni técnicos, sin embargo es un sistema sencillo que ha permitido una rápida difusión.

El empleo de un biocatalizador que puede ser una enzima o una célula entera, bien en estado libre o inmovilizado para lograr una Biotransformación bajo condiciones adecuadas y con el objetivo de obtener un producto de una utilidad concreta sería objeto de estudio de la Biocatálisis.

La utilización de enzimas en Biocatálisis no se habría desarrollado si los Químicos Orgánicos no hubiesen aceptado la utilización de

estos biocatalizadores para llevar a cabo síntesis orgánicas o al menos la sustitución de pasos concretos en un proceso sintético. Este tópico de que las enzimas no podían trabajar en medios orgánicos impulsó de una manera definitiva el empleo de enzimas en síntesis orgánica.

La base de cualquier proceso biotecnológico (bioprocesos) es el uso de enzimas o células enteras, principalmente microorganismos. Podemos definir las biotransformaciones como: procesos en los que se emplean biocatalizadores para la transformación de sustratos no naturales para dicho biocatalizador y se obtienen productos de alto valor añadido.

La modificación genética, también conocida como tecnología de ADN recombinante, permite hacer microorganismos a medida que den mayor rendimiento de productos químicos concretos, o incluso producir productos nuevos si los genes son transferidos desde otros organismos. El incremento de la eficiencia de la reacción permite un mayor ámbito para reemplazar los procesos convencionales establecidos por otros más limpios, como la fermentación a más baja temperatura, en un ambiente aislado seguro. La naturaleza altamente específica de las enzimas significa que los productos químicos pueden producirse en una forma más pura, y que los procesos biológicos no sólo requieren menores aportaciones de productos químicos, sino que también producen flujos de residuos menores y más manejables.

Se conocen más de 2.000 enzimas, pero sólo se explotan unas 400, que se clasifican en seis categorías generales de acuerdo al *enzyme comission* (4). En su mayoría se trata de enzimas extracelulares y de origen microbiano. Las aplicaciones industriales son las que consumen el mayor porcentaje de biocatalizadores. La industria de detergentes consume el 32% del volumen total de enzimas producidos, la del almidón (15%), la industria láctea (14%) y la textil (10%). El resto se distribuye entre alimentación (cervecería, panadería, zumos, vino, sabores, grasas y aceites, piensos para animales y otros), curtidos, papel, combustibles, eliminación de residuos y diversas biotransformaciones (5). Podemos vislumbrar en este punto la importancia de las enzimas, por lo que se hace necesario describirlas aunque sea someramente.

## 1. ESTABILIZACIÓN DE ENZIMAS

Las enzimas son proteínas que se comportan como catalizadores muy potentes y eficaces de las reacciones químicas de los sistemas biológicos. Para llevar a cabo la catálisis, sustrato y enzima se acoplan de forma estereoespecífica. La enzima induce al sustrato a una configuración aproximada al estado de transición. Tanto la enzima como el sustrato sufren una alteración en su estructura por el hecho físico de la unión.

Una vez que la enzima reconoce al sustrato, éste se une al centro activo y en la tercera etapa se forman los productos.

El proceso de obtención es generalmente costoso y por tanto su recuperación del medio de reacción es esencial para que de nuevo puedan ser utilizadas, disminuyendo así los costes del proceso.

La reutilización de enzimas implica como paso previo la estabilización del biocatalizador, existiendo diversas técnicas para conseguirlo entre las que citaremos:

- a) Inmovilización de enzimas.
- b) Modificación química.
- c) Ingeniería proteica por mutagénesis dirigida.
- d) Ingeniería del medio de reacción.

### 1A. Inmovilización de enzimas

La inmovilización es un proceso por el cual confinamos físicamente a una enzima o célula en una determinada región del espacio, de manera que su actividad catalítica se retenga y pueda ser reutilizada.

El tener la enzima unida a una matriz sólida (enzima inmovilizada), insoluble en el medio de reacción, facilita que al final de la reacción pueda ser fácilmente recuperada y sometida a repetidos usos, lo que permite, además, que la disolución final no contenga la proteína indicada. Muchas veces, la simple unión a la citada matriz puede también aumentar la estabilidad de la enzima.

Este proceso conlleva una serie de ventajas entre las que citaremos algunas desde el punto de vista de su aplicación ya que:

- Se produce un gran aumento de la estabilidad de la enzima o célula inmovilizada.
- Se aumenta la productividad enzimática por la capacidad de reutilización.
- Se aumenta la facilidad de recuperación y purificación de los productos.
- Se aumenta la facilidad de operación y control del proceso, al trabajar en condiciones más suaves.

Pero también algunas desventajas entre las que citaré:

- Generalmente se disminuye la actividad enzimática.
- Se aumentan los problemas difusionales.
- Se aumentan los costes del proceso.

La inmovilización de enzimas es una técnica de gran interés desde el punto de vista industrial, ya que permite el uso continuado en la síntesis de un determinado producto, existiendo una gran cantidad de bibliografía sobre este tema (6-7). Dentro de las estrategias de inmovilización de enzimas o células podemos diferenciar los métodos químicos y físicos (Figura 1).

En los métodos químicos esta unión se lleva a cabo mediante enlaces covalentes a grupos activados de la matriz sólida. El entrecruzamiento intermolecular de la enzima mediante reactivos bifuncionales puede dar lugar a incrementar la insolubilidad del catalizador en el medio de reacción. Esta estrategia también se puede utilizar mediante el entrecruzamiento entre distintas moléculas de proteína o por copolimerización de la enzima modificada con un monómero insaturado en un gel de estructura tridimensional.

En general la unión a soportes mediante métodos físicos puede conseguirse mediante interacciones iónicas (adsorción), fuerzas hidrofóbicas, de van der Waals, etc. Por otra parte, ciertos polímeros naturales, celulosa, colágeno y otros, forman geles, en cuya estructura tridimensional la enzima puede quedar ocluida o confinada en

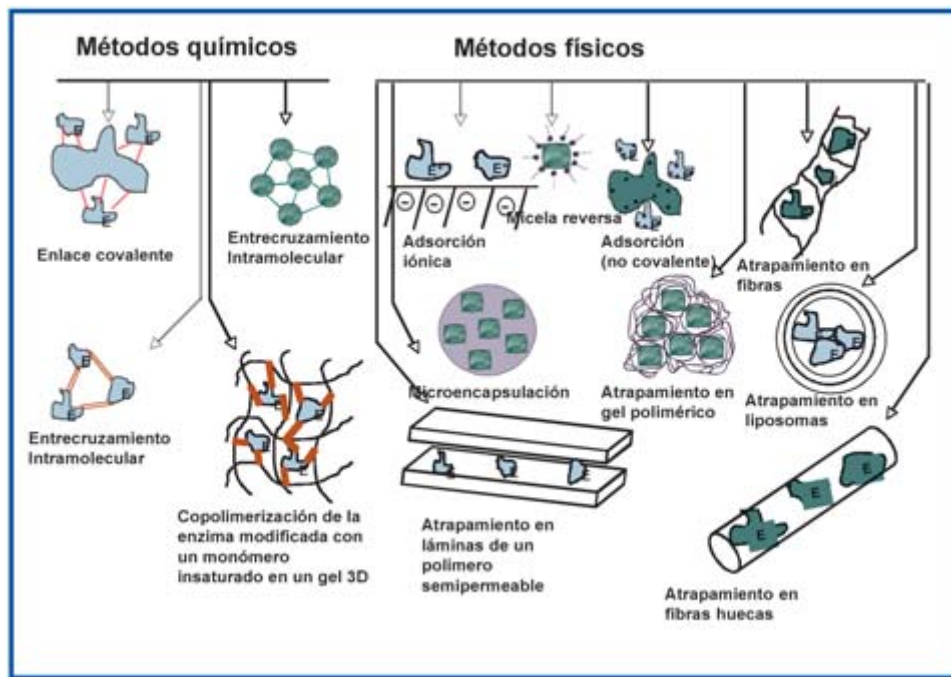


FIGURA 1. *Métodos de inmovilización de enzimas y células.*

microcápsulas de un polímero orgánico, o retenida en las fibras huecas de una membrana polimérica o en láminas de un polímero semipermeable.

La inmovilización química es una técnica muy versátil ya que permite la unión de una enzima o célula sobre una gran cantidad de soportes que pueden ser de origen orgánico e inorgánico e incluidos en estos dos grandes grupos se encuentran también una amplia gama de soportes que pueden ser naturales o artificiales. Dentro de esta última categoría prácticamente se pueden diseñar un soporte y una metodología química específica según el tipo de unión que nos interese llevar a cabo.

En la mayor parte de las ocasiones la unión entre la enzima y el soporte no puede hacerse de forma directa, por lo que será necesario el concurso de otra molécula que actúe de puente de unión entre la enzima y el soporte, existiendo numerosas metodologías disponibles a este fin (8-9).



## 1B. Modificación química

La modificación química consiste en la unión de una molécula de tamaño variable en la superficie de una enzima a través de un residuo aminoacídico modificando alguna propiedad de la enzima. En función de las características de la molécula que se introduce se puede aumentar la superficie hidrofílica o hidrofóbica de la enzima. La funcionalización puede llevarse a cabo utilizando diversas estrategias, entre las que podemos citar la unión vía *p*-nitrofenilcloroforniato, triclorotriazina, etc. (Figura 2). La utilización de triclorotriazina permite la inclusión de dos moléculas de PEG por residuo aminoacídico (10).

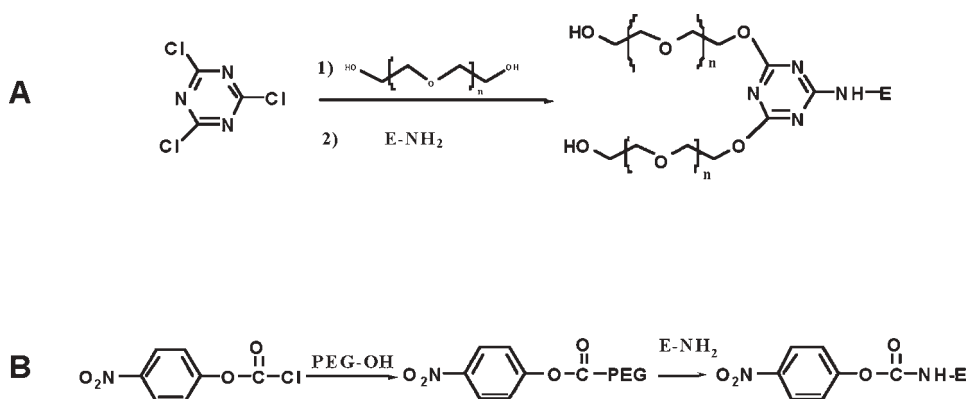


FIGURA 2. *Métodos de modificación química de enzimas.*

A) Vía triclorotriazina. B) Vía *p*-nitrofenilcloroforniato.

## 1C. Ingeniería de proteínas

Otra estrategia de estabilización es la ingeniería de proteínas que básicamente consiste en la modificación de la funcionalidad de las proteínas o creación de nuevas funcionalidades haciendo los procesos biocatalíticos más económicos y eficientes. Esto puede realizarse desde dos aproximaciones. Podemos intentar la *síntesis de novo* de proteínas por métodos químicos, o bien podemos modificar las proteínas ya existentes. En este caso el procedimiento consiste en la

sustitución de un aminoácido en una proteína, mediante el reemplazamiento artificial de un nucleótido en el gen que codifica la proteína. El procedimiento se denomina mutagénesis dirigida.

Este DNA modificado puede luego insertarse en una célula receptora y seleccionar mutantes que se diferenciarán del tipo silvestre por el cambio introducido en ese sitio específico. Como ejemplo de lo anteriormente dicho tendríamos las siete modificaciones realizadas en la amilasa maltogénica de *Thermus species* cepa IM6501: Mediante estas mutaciones se consiguió aumentar la temperatura óptima de reacción en 15° C, por lo que pasó de operar de 60 a 75° C (11).

Como hemos visto, los avances en la modificación estructural de las enzimas permiten la creación de nuevas moléculas proteicas con actividades catalíticas hechas a la medida de las necesidades.

## **1D. Ingeniería del medio de reacción**

La ingeniería del medio de reacción se basa en el diseño de las condiciones adecuadas para que una enzima pueda catalizar una reacción química en cualquier medio, ya sea el convencional (agua), o no convencional (disolventes orgánicos, fluidos supercríticos, líquidos iónicos, o sin disolvente), en sus niveles de máxima actividad y estabilidad.

La mayoría de los biocatalizadores son capaces de catalizar una reacción en ambas direcciones. Las enzimas no son las que determinan la dirección en la que transcurre la reacción, cuestión que solamente se establece por las condiciones de reacción y la posición del equilibrio. De ahí que enzimas como las hidrolasas, que en medio acuoso catalizan reacciones de hidrólisis, cuando se colocan en medios con bajo contenido en agua puedan catalizar las reacciones inversas a la hidrólisis y de transferencia de grupos (Figura 3).

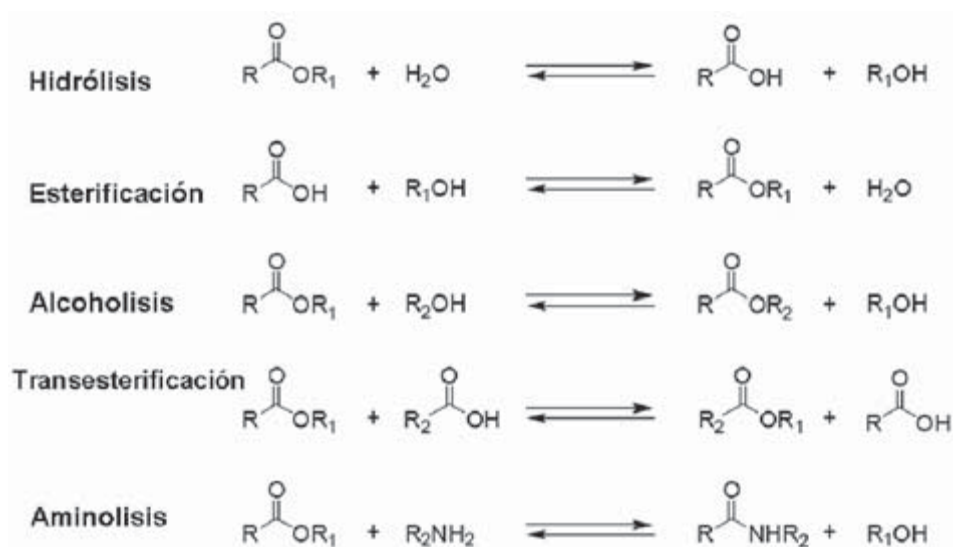


FIGURA 3. *Reacciones de hidrólisis, síntesis y de transferencia de grupos catalizadas por las lipasas.*

Los trabajos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo (12-15) han demostrado que en el caso de las hidrolasas y más concretamente las lipasas pueden llevar a cabo reacciones inversas a la hidrólisis. Para mantener la actividad enzimática parece ser que se necesita de una mínima cantidad de agua. Esta cantidad es a veces considerablemente menor que una monocapa de agua alrededor de las moléculas de enzima. El resto del medio puede ser el disolvente no convencional, lo que equivale a trabajar con la enzima con una cantidad de agua superior a la que corresponde al agua de cristalización.

Estas moléculas de agua actuarían como un lubricante frente al disolvente manteniendo intacta la estructura de la proteína tal como se indica en la Figura 4. El *grado de hidratación* de la enzima es el parámetro clave. La determinación de la cantidad de agua necesaria para cada enzima se puede llevar a cabo mediante su isoterma de adsorción de agua. En principio el agua se une a los sitios ionizables de la proteína. Cuando añadimos más agua, ésta se une a los sitios polares y cargados y posteriormente se alcanza la monocapa de agua, hasta que finalmente la enzima muestra propiedades termodinámicas en disolución.

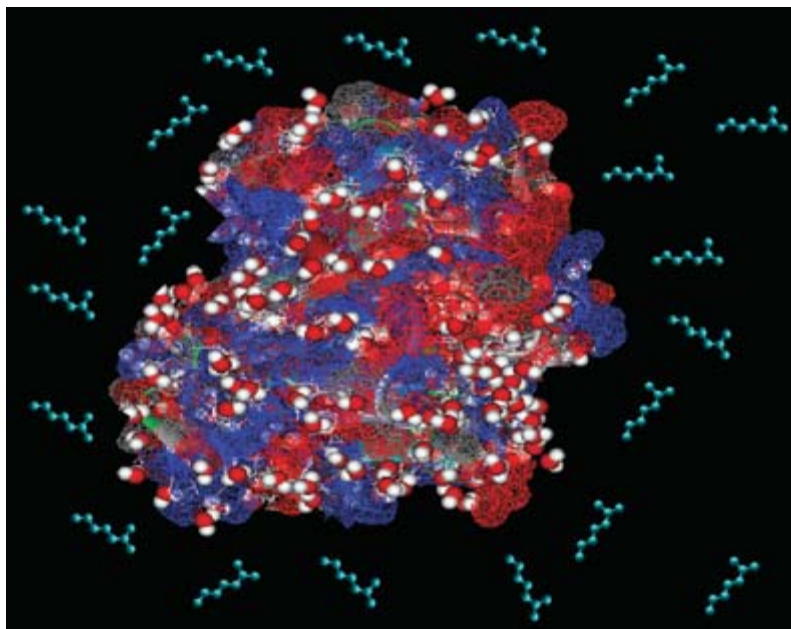


FIGURA 4. *Simulación de la lipasa de Rhizomucor miehei en un medio de reacción orgánico con la monocapa de agua esencial y moléculas de isooctano como disolvente.*

Cuando el sistema está compuesto por diferentes fases, el agua se distribuye entre las distintas fases presentes. Parte del agua se une a la enzima, otra parte se disuelve en el disolvente y una tercera en el soporte, u otras sustancias presentes en el medio de reacción hecho por el cual es muy importante realizar la isoterma en las mismas condiciones en las que va a discurrir la reacción.

Normalmente, la actividad enzimática aumenta con el incremento de la hidratación de la enzima, lo que se explica por la acción «lubricante» del agua sobre la flexibilidad interna de la proteína. A una determinada cantidad de agua existe un máximo en la actividad enzimática.

El diseño del medio de reacción incluye la variación de condiciones diferentes a las de la propia naturaleza del disolvente, como la presión, la temperatura y la presencia de aditivos.

## 2. SELECTIVIDAD ENZIMÁTICA

La Biotecnología Industrial puede ser de una gran ayuda para la obtención de medicamentos (y otras bioproductos) que son difícil o imposibles de obtener mediante métodos químicos tradicionales. Gran parte de los principios activos farmacéuticos son moléculas que presentan dentro de su estructura química centros quirales, de cuya correcta configuración depende su bioactividad. Los procesos de síntesis química se caracterizan en general por la obtención de mezclas de isómeros, que son además difíciles de purificar. En este sentido, los procesos biocatalíticos presentan una gran ventaja, ya que las enzimas producen de un modo específico y selectivo únicamente uno de los isómeros posibles, que se obtendrá de forma enantiopura. Para ilustrar esta idea sólo tenemos que retrotraernos al triste caso de la talidomida en la que el enantiómero S presenta una actividad sedante y el R es teratogénico aunque encontramos muchos otros ejemplos de este comportamiento entre los que podemos citar la (*S*)-penicilamina que tiene actividad antiartrítica y la (*R*)-penicilamina, que es tóxica, entre otros. La diferente actividad farmacológica de los dos isómeros ópticos hicieron que la Agencia Europea del medicamento así como la FDA americana sólo acepte desde el año 1992, el isómero que posee actividad farmacológica imponiendo severas restricciones en el caso de mezclas racémicas. Debido a estas dificultades, la industria farmacéutica sólo desarrolla compuestos óptimamente puros. Cabe indicar en este sentido que de los diez medicamentos más vendidos en España, siete son compuestos óptimamente activos entre los que citamos al enalapril, paroxetina, atorvastatina, dudesamina, fluoxetina, salmeterol y diltiazem. En la obtención de estos fármacos se ha usado una biotransformación en algún paso.

En los casos en que no sea posible obtener directamente los principios activos mediante procesos de biocatálisis, esta tecnología podrá permitir la obtención de ciertos precursores imprescindibles para la posterior síntesis química del principio activo final.

### 3. EL SECTOR BIOTECNOLÓGICO Y LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Las compañías farmacéuticas encuentran cada vez más difícil desarrollar y sacar al mercado nuevos productos. El número de fármacos aprobados cada año ha disminuido desde 1996, mientras que los gastos de I+D han aumentado enormemente. Este es uno de los motivos fundamentales por el que las empresas farmacéuticas buscan alianzas con las empresas biotecnológicas. Esta falta de nuevos fármacos ha llevado a que el sector farmacéutico haya sido acusado de realizar demasiadas copias de medicamentos ya existentes, que sólo añaden ligeras ventajas clínicas. Debido a ello muchas empresas farmacéuticas están dirigiendo su atención hacia las pequeñas compañías del sector biotecnológico como fuente de innovación constante en el desarrollo de nuevos fármacos (16).

En la actualidad más de 325 millones de personas en el mundo consumen medicamentos de origen biotecnológico. En EE.UU., el número total de este tipo de fármacos autorizados asciende a más de 170, el 70% de los cuales han sido autorizados durante los últimos seis años. En la actualidad se encuentran en fase de desarrollo más de 370 biomedicamentos para consumo humano, para combatir más de doscientas enfermedades. Atendiendo a la función terapéutica, 178 se dirigen a combatir el cáncer y enfermedades relacionadas con el cáncer, 47 se centran en la lucha contra enfermedades contagiosas, 26 están relacionados con alteraciones en el sistema inmunológico y 22 contra enfermedades neurológicas. Otros fármacos combatirán la diabetes, las alteraciones digestivas, los problemas cardiovasculares y alteraciones respiratorias entre otros.

De todo lo dicho anteriormente puede concluirse que la aplicación de la Biocatálisis ha atravesado la frontera académica, encontrando un amplio campo de acción en la industria farmacéutica aunque su aportación representa solo una parte de la producción de fármacos por métodos biotecnológicos.

## 4. APLICACIONES DE LAS BIOTRANSFORMACIONES EN LA PREPARACIÓN INDUSTRIAL DE FÁRMACOS

### 4.1. Síntesis de omapatrilato

El omapatrilato es un fármaco antihipertensivo que actúa como inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina y de la endopeptidasa neutra (17). Para su síntesis se siguió una estrategia convergente (Ruta 1) para la que se requieren dos intermedios la (S)-6-hidroxinorleucina y el ácido (S)-2-amino-5-(1,3-dioxolan-2-il)pentanoico, los cuales se prepararon por rutas biocatalíticas independientes.

El primer intermedio se preparó mediante una aminación reductora, usando la glutamato deshidrogenasa de hígado bovino (Método A) (18) a partir de una concentración de sustrato de 100 g/L, obteniéndose un rendimiento del 92% y un exceso enantiomérico mayor del 99%. Este procedimiento presenta el inconveniente de que la preparación del sustrato de partida requiere de varios pasos de síntesis química por lo que se desarrolló otra ruta (Método B) a partir de la 6 hidroxinorleucina racémica (método B), tratando ésta con una D-aminoácido oxidasa de riñón porcino y catalasa de hígado de bovino o con células de *Trigonopsis variabilis* (contiene ambas enzimas) produciendo la mezcla de (S)-6-hidroxinorleucina con un ee mayor del 99% y el cetoácido que se indica en la Figura 5.

El segundo intermedio fue preparado a partir de la aminación reductora mostrada en la ruta 2, usando un biocatalizador obtenido mediante una cepa recombinante de *Pichia pastoris* conteniendo la fenilalanildeshidrogenasa endógena. El proceso resultó con la producción de 15,5 kg con 97% de rendimiento y un ee mayor del 98%. Hay que mencionar que por vía química se requieren ocho pasos para la obtención de este intermedio (19). El cetal cíclico fue transformado al dimetilacetal el cual se usó para la preparación del compuesto bicíclico, como se muestra en la ruta 3.

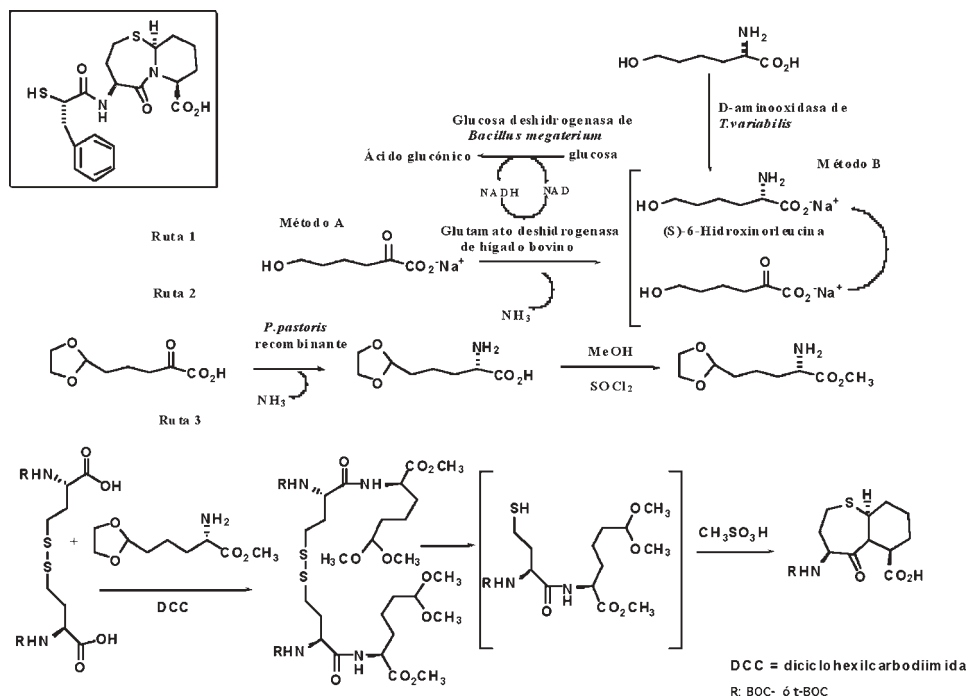


FIGURA 5. Síntesis enzimática de omapatrilato.

## 4.2. Preparación de Tromboxano A<sub>2</sub>

El tromboxano A<sub>2</sub> es un vasoconstrictor con actividad antiagregatoria de plaquetas por lo que la preparación de compuestos antagonistas del tromboxano presenta un gran interés para la industria farmacéutica (Figura 6).

En un estudio para la preparación de tromboxano se encontró que la lactona y el lactol son intermedios versátiles para una serie de derivados que condujeron a la obtención del compuesto antagonista del tromboxano A<sub>2</sub> (20, 21). La oxidación biocatalítica del diol *meso* (*exo,exo*)-7-oxabicyclo [2,2,1]heptan-2,3-dimetanol utilizando una suspensión de células húmedas al 10% (p/v) de *Nocardia globerula* ATCC221505 produjo la lactona con un rendimiento del 70% y 96% de ee, a una concentración de sustrato de 5 g/L (22, 23). Por otro



lado, partiendo del mismo sustrato y a la misma concentración inicial se obtuvo una mezcla del lactol y la lactona con un 46% de rendimiento global utilizando una suspensión de células de *Rhodococcus sp.* ATCC15992 con un ee del 96,7% y 98,4% respectivamente.

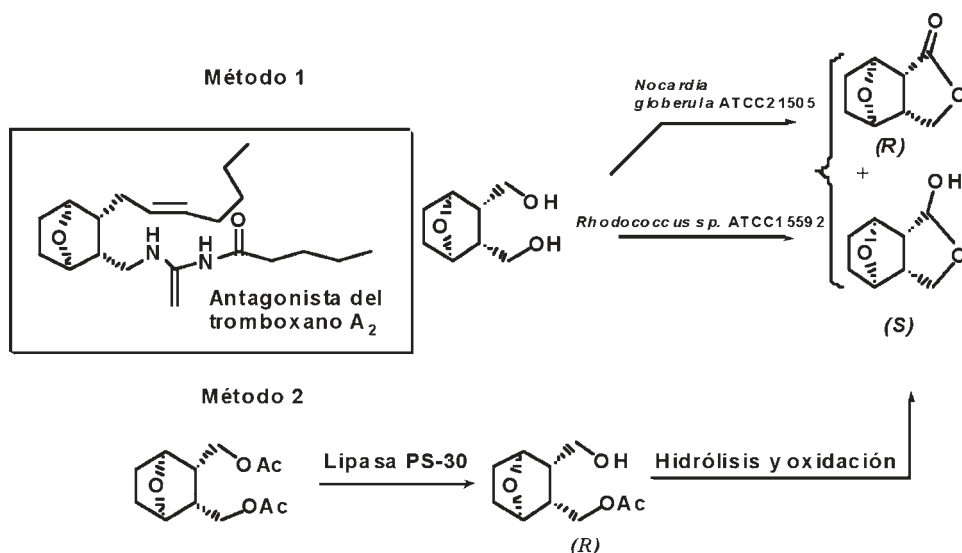


FIGURA 6. *Preparación de Tromboxano A<sub>2</sub>*.

En otra estrategia sintética (Método 2) partiendo del mismo diol meso se empleó una reacción de asimetrización enzimática de su diéster. Con este propósito se preparó el diacetato, el cual, sometido a una posterior hidrólisis con la lipasa inmovilizada PS-30, produjo el monoacetato de configuración S con un rendimiento del 75% y un exceso enantiomérico superior al 99%, empleando un sistema de reacción bifásico y a una concentración de sustrato de 5 g/L. La enzima inmovilizada se reutilizó durante cinco ciclos sin pérdida de eficiencia ni estereoselectividad. El monoacetato fue entonces convertido al lactol vía hidrólisis y oxidación química (24).

### 4.3. Modificación biocatalítica del Diltiazem

El Diltiazem, utilizado para el tratamiento de la hipertensión, presenta como mayor inconveniente su corta vida media, por lo que se han buscado modificaciones estructurales para solucionar este problema, siendo esta una estrategia muy común en Química Farmacéutica (Figura 7).

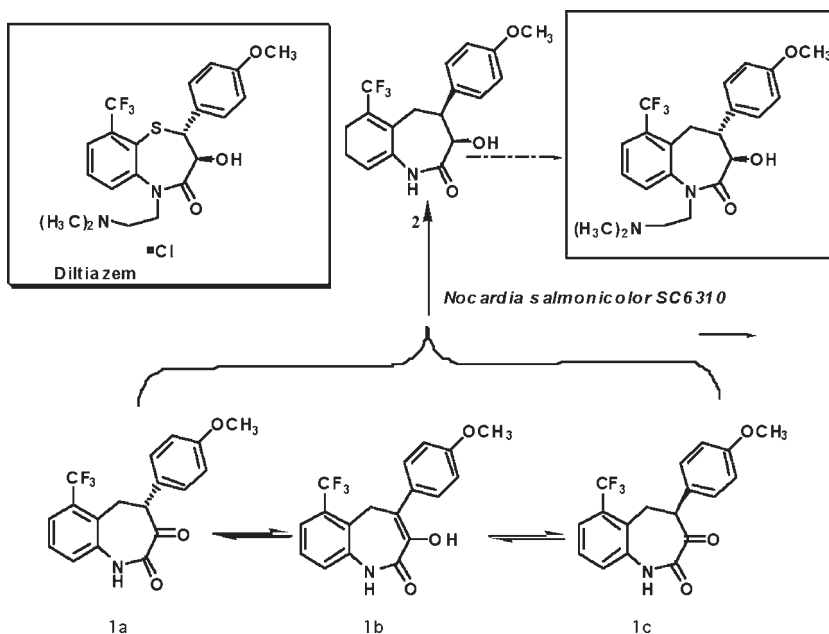


FIGURA 7. Preparación biocatalítica de Diltiazem.

Dicha modificación condujo al compuesto (cis)-3-(acetoxi)-1-[2-(dimetilamino)etil]-1,3,4,5-tetrahidro-4-(metoxifenil)-6-trifluorometil)-2H-1-benzazepin-2-ona el cual, además de presentar un efecto más prolongado es más potente. El intermedio clave en la síntesis de este compuesto es el que aparece en la Figura 7 con el número 2, el cual fue preparado mediante una reducción microbiana estereoselectiva del compuesto marcado como 1 que a su vez se encuentra como una mezcla de enantiómeros a través de una tautomería cetónica. En dicho equilibrio la forma cetónica racémica 1a y 1c es

la preferida. El microorganismo *Nocardia salmonicolor* SC6310 es capaz de biocatalizar la transformación selectiva de **1c** a **2** con un 96% de rendimiento y 99,8% de ee a una concentración de sustrato de 2 g/L (25).

#### 4.4. Preparación enantioselectiva del (*R*)-Sotalol

El (*R*)-Sotalol es un  $\beta$ -bloqueante con estructura de feniletilamina (Figura 8).

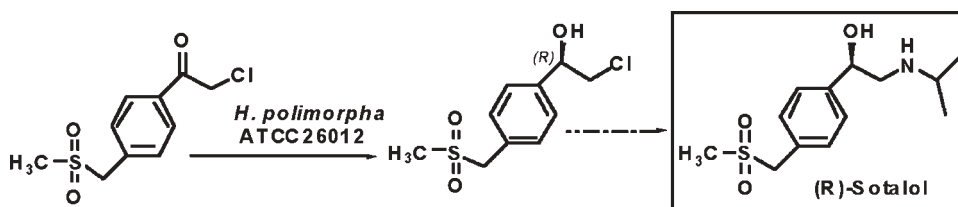


FIGURA 8. Preparación enantioselectiva de (*R*)-Sotalol.

Se comercializa con el nombre de Sotapor<sup>®</sup> por la compañía Bristol - Myers Squibb, habiéndose determinado que el enantiómero R es 50 veces más potente que el S y por tanto se ha propuesto a la clorhidrina como un precursor apropiado para la preparación enantioselectiva del (*R*)-sotalol. Se encontró que *Hansenula polymorpha* ATCC26012 cataliza la reducción enantioselectiva del carbonilo, produciendo el intermedio con la configuración (*R*) deseado en un 95% de rendimiento y con un exceso enantiomérico del 99% (26, 27).

#### 4.5. Síntesis de análogos de Fluvastatina

Otro ejemplo de reducción enantioselectiva nos muestra como el 4-cloro-acetoacetato de metilo es biotransformado al ácido (*S*)-4-cloro-3-hidroxi-butanoico a partir de una suspensión de células de *Geotrichum candidum* SC5469 con un 95% de rendimiento y un 96% de ee (Figura 9).

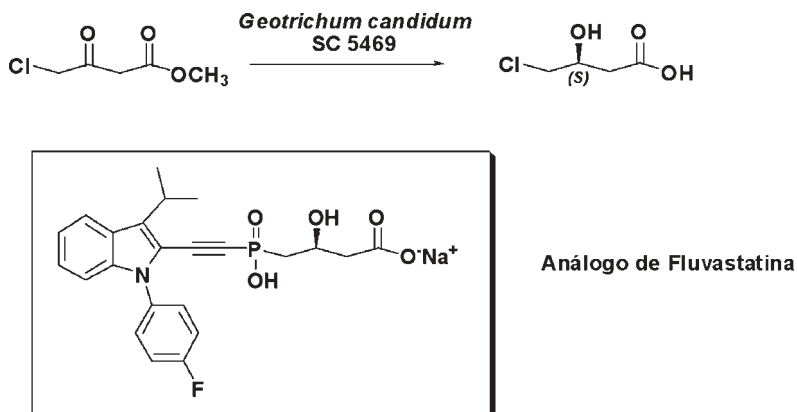


FIGURA 9. *Obtención del ácido (S)-4-cloro-3-hidroxi-butanoico como intermedio en la síntesis de Fluvastatina.*

El hidroxiéster quiral ha sido utilizado para sintetizar el compuesto final, el cual es un inhibidor de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa, análogo de la fluvastatina que se utiliza como hipolipemiante. La optimización del proceso mediante el aislamiento, purificación e inmovilización de *Geotrichum candidum* condujo a la obtención del intermedio con un 90% de rendimiento y un 98% de ee (28).

#### 4.6. Acilación de Purina

Un buen ejemplo de quimio y regioselectividad combinada de una transformación enzimática es la acilación de purina (506U78) que comenzó siendo desarrollada por Glaxo Wellcome, como un agente antileucémico (Figura 10).

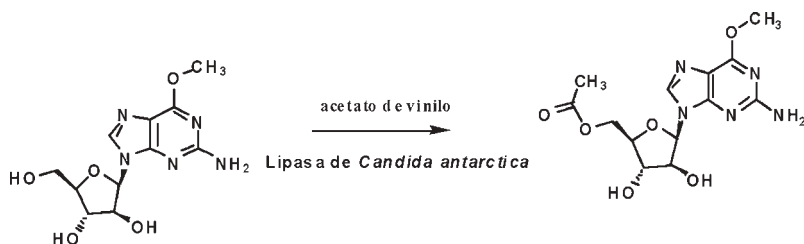


FIGURA 10. *Acilación de purina.*

Usando una lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* B y acetato de vinilo como donador de acilo se obtuvo el 5'-monoacetato con un 99% de conversión. El compuesto obtenido es más soluble por lo que aumenta la biodisponibilidad. Esta transformación es prácticamente imposible de realizar por una acetilación química convencional debido a la conocida preferencia por la N-acilación. La regioselectividad del proceso es remarcablemente alta ya que se obtiene menos del 0,1% del del 3'-acetato y aproximadamente un 0,3% del 3,5'diacetato (29).

#### 4.7. Tamiflu

A veces es interesante sobre expresar enzimas existentes en un microorganismo en orden a acumular ciertos productos como mostramos en el siguiente ejemplo. El fosfato de oseltamivir, un inhibidor de la neuroaminidasa A conocido como Tamiflu® es un fármaco para el tratamiento del virus de la gripe A y B comercializado por Hoffmann-la Roche y Gilead Sciences.

A pesar del pequeño tamaño de la molécula ésta contiene tres centros quirales y es bastante difícil de sintetizar. De todas las rutas de síntesis ensayadas se ha concluido que el ácido quínico y el ácido shikímico son los precursores más adecuados (Figura 11). El ácido quínico puede ser obtenido en grandes cantidades de la corteza del árbol de la *Cinchona* pero no se tiene la certeza de si sería una fuente fiable a largo plazo para la obtención de un fármaco del que se espera una gran demanda (30). Del árbol del anís estrellado, una especie originaria de China, Corea y Japón se extrae el ácido shikímico el cual es un intermedio en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. La sobreexpresión e interrupción de algunos genes alrededor de la síntesis y posterior conversión de ácido shikímico en *E. coli* nos lleva a la acumulación del ácido shikímico en el medio de cultivo (20 g/L), mientras que la producción de ácido quínico podría ser suprimido (31).

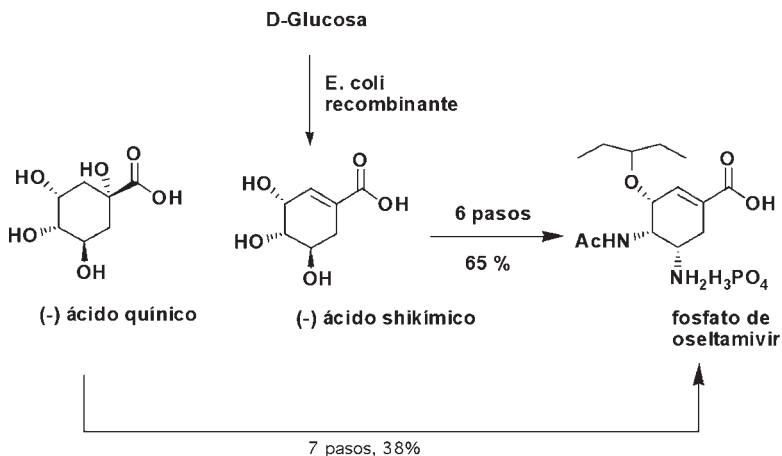


FIGURA 11. *Producción de fosfato de oseltamivir (Tamiflu).*

#### 4.8. Síntesis quimioenzimática de Acipimox

Para llevar a cabo la síntesis del ácido 5-metilpirazin-2-carboxílico, el cual se usa como intermedio para la producción de Acipimox cuyo nombre comercial es el olbetam de la laboratorios Pfizer que se utiliza como antilipolítico y de la glipizida (glucotrol), que es un agente antidiabético, se sometió a la 2, 5-dimetilpirazida a oxidación con *Pseudomonas putida* crecida en xileno (Figura 12).

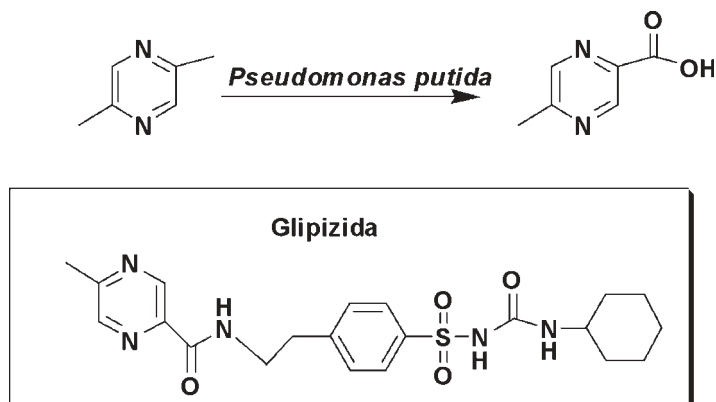


FIGURA 12. *Síntesis enzimática del ácido 5-metilpirazin-2-carboxílico, intermedio en la obtención de Acipimox.*

El producto se precipita por acidificación del medio de reacción libre de células. La concentración de sustrato puede alcanzar hasta 2 g/L con un rendimiento del 95% (32).

#### 4.9. Síntesis de (3R, 4S) acetato de azetidionona (Taxol)

La (3R, 4S) acetato de azetidionona (33) es un intermedio en la síntesis de paclitaxel (taxol) la cual se obtiene por resolución del racémico utilizando una lipasa inmovilizada de *Pseudomonas cepaea* (34). El taxol es un medicamento empleado para tratar algunos tipos de cáncer por su capacidad de inhibir la multiplicación de las células tumorales. La principal fuente de obtención natural es el árbol del tejo *Taxus brevifolia* que contiene taxol en muy bajas concentraciones. Una alternativa semisintética a partir del diterpeno tetracíclico 10-deacetil baccatina III se muestra en la Figura 13a.

Otra estrategia consiste en la preparación de biocatalizadores activados por sales para sintetizar derivados de paclitaxel (taxol) (35). La proteasa termolisina acila selectivamente el grupo hidroxilo 2' en el taxol en alcohol tertamílico como disolvente (Figura 13b).

Los rendimientos de los derivados acilados en esta posición se aproximan al 100% utilizando una termolisina activada con KCl. El adipato de vinilo generado en la posición 2' sirvió como donador de acilo para la hidrólisis catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* sobre el éster vinilo terminal. El compuesto resultante fue aproximadamente 1.700 veces más soluble en agua que el taxol de partida, lo que pone en evidencia la importancia de profármacos de taxol con una mayor biodisponibilidad.

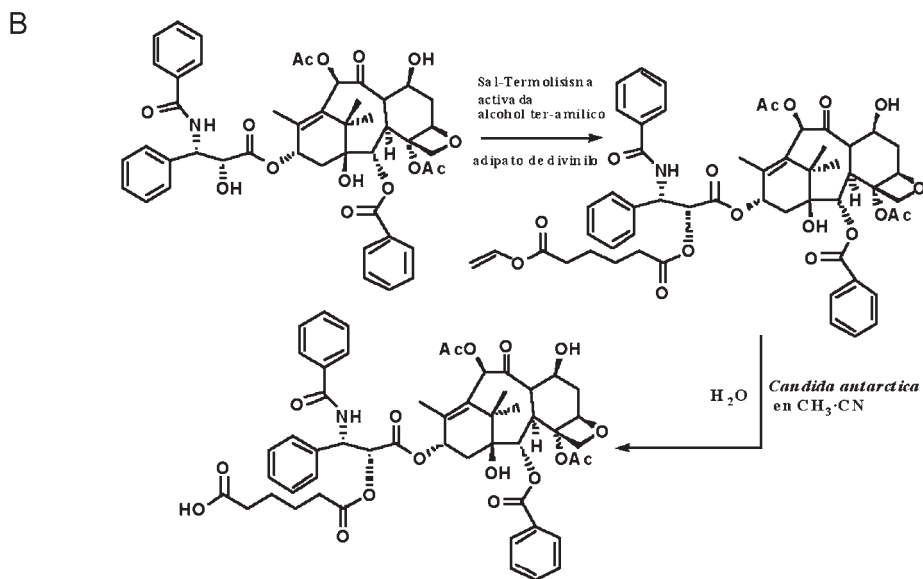
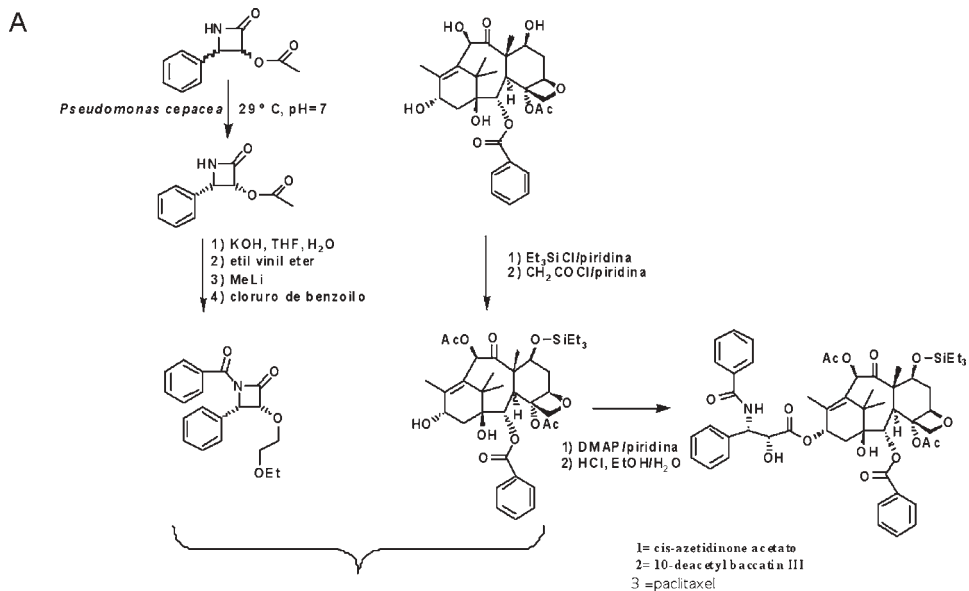


FIGURA 13. **A)** Resolución enzimática de acetato de azetidinona, intermedio de la síntesis de Taxol. **B)** Preparación de biocatalizadores activados por sales para sintetizar derivados de taxol.



#### 4.10. Síntesis de (S)-pipecólico (Incel, Ropivacaina y Lebobupivacaina)

El ácido (S)-pipecólico es un intermedio importante en la síntesis de varios fármacos entre ellos el Incel [dicitrato de Biricodar (VX-710)] de la compañía Vertex Pharmaceutical que se utiliza en terapia combinada con paclitaxel para el tratamiento del cáncer (36). También a partir del ácido (S)-pipecólico se pueden obtener los anestésicos locales Ropivacaina utilizado como anestesia epidural en el parto y Lebobupivacaina comercializados por la empresa Astra Zeneca (Figura 14).

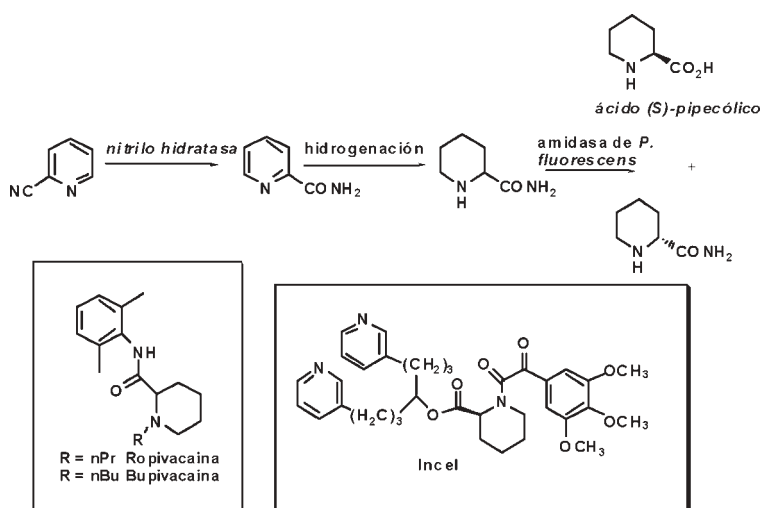


FIGURA 14. Síntesis quimioenzimática de ácido (S)-pipecólico.

La producción de este intermedio se lleva a cabo de forma eficiente por la compañía Lonza, mediante una combinación de métodos químicos y biotecnológicos. En el primer paso biocatalítico, células de un microorganismo, que contiene una nitrilohidratasa, llevan a cabo la hidrólisis de la 2-cianopiridina, produciendo la piridin-2-carboxamida, la cual por reducción química produce la amida racémica. En el segundo paso biocatalítico, células de *Pseudomonas fluorescens* DSM9924 efectúan la hidrólisis enantioselectiva del grupo amido, produciendo el ácido (S)-pipecólico y la amida (R).

### 4.11. Producción de L-carnitina

Un ejemplo impactante de lo que pueden hacer los procesos biocatalíticos es la producción de la L-carnitina (37) (Figura 15).

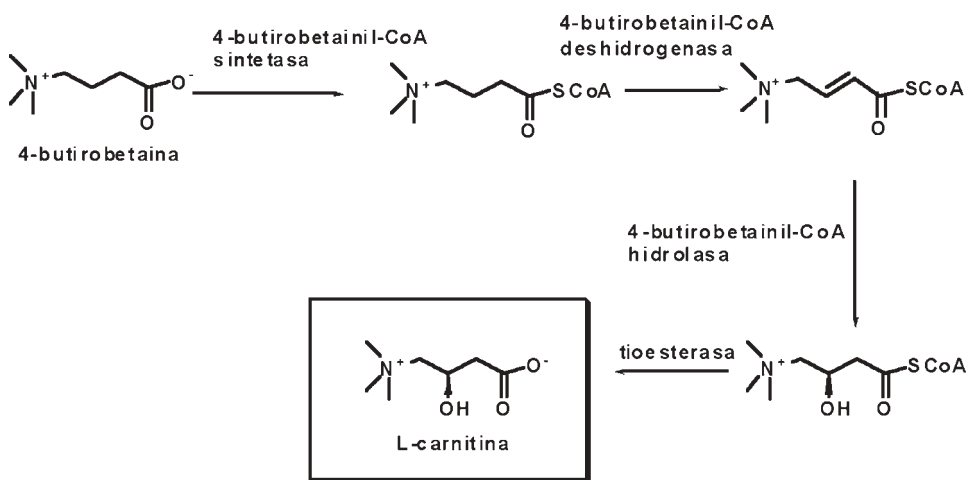


FIGURA 15. *Producción biocatalítica de L-carnitina.*

En medicina cardiovascular, la L-carnitina es fundamental en el correcto funcionamiento del corazón, por lo tanto es recomendada ante situaciones de insuficiencia cardiaca, anginas de pecho, secuelas de infarto, etc., debido a que este suplemento dietético favorece la contracción de las células musculares cardiacas. Es un vasodilatador y antioxidante a la vez.

El proceso se lleva a cabo utilizando células de un microorganismo, el cual utiliza una ruta natural que involucra cuatro enzimas. En este proceso la 4-butirotetaina se transforma a L-carnitina, la cual es excretada por las células al medio facilitando su aislamiento. El microorganismo utilizado está relacionado con los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium* y se utilizó en el proceso en su fase de crecimiento estacionaria. Como se observa en la Figura 15, las cuatro enzimas tienen una función particular, mencionando especialmente la introducción de la quiralidad por la liasa, crotonobetainil-coenzima A hidrolasa. Bajo este procedimiento se produce L-carnitina a

una escala de 50 m<sup>3</sup> con un rendimiento volumétrico de 80 g/L, y con una conversión del 99,5% y un ee mayor del 99,9%.

#### 4.12. Semisíntesis de Yondelis

Otro ejemplo interesante es la semisíntesis de Yondelis. Este es un antitumoral desarrollado por PharmaMar, aislado del tunicado marino *Ecteinascidia turbinata*, que actualmente se encuentra pendiente de registro. Es un antitumoral activo frente a sarcomas de tejidos blandos (38).

Tiene un mecanismo de acción único que implica la unión al surco menor del ADN y formación de un aducto covalente. El proceso de síntesis total fue llevado a cabo por Corey et al. utilizando un proceso de mas de 40 pasos esterocontrolados.

Los investigadores de PharmaMar han desarrollado un proceso nuevo de producción en 18 etapas utilizando cianosafracina B como producto de partida (39) (Figura 16).

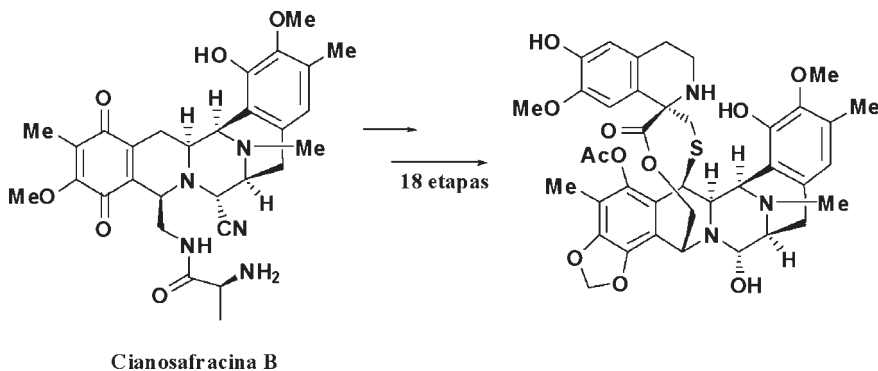


FIGURA 16. *Semisíntesis de Yondelis.*

La Safracina B es un antiobiótico de origen bacteriano aislado en la fermentación de *Pseudomonas fluorescens*. La optimización del proceso de fermentación ha permitido la síntesis del ciano derivado en escala de Kg, produciendo material de partida para la síntesis de Yondelis en un proceso robusto, sofisticado y barato.

### 4.13. Producción de antibióticos $\beta$ -lactámicos

La biotecnología es la principal herramienta también para la obtención de nuevos antibióticos que sean activos frente a las bacterias patógenas resistentes a una gran gama de antibióticos. También resulta de gran utilidad la aplicación de la ingeniería genética en microorganismos para sintetizar antibióticos sintéticos, es decir, ligeramente diferentes de aquellos obtenidos de forma natural.

DSM produce penicilina G/V por fermentación utilizando cepas de *Penicillium chrysogenum*, que han sido mejoradas por métodos clásicos de mejora de cepas así como por Ingeniería genética (40-42). Recordemos que hasta el año 1985 aproximadamente las penicilinas semisintéticas se producían vía química, a excepción del material de partida, penicilina G, que se producía por fermentación de *Penicillium chrysogenum* (Figura 17).

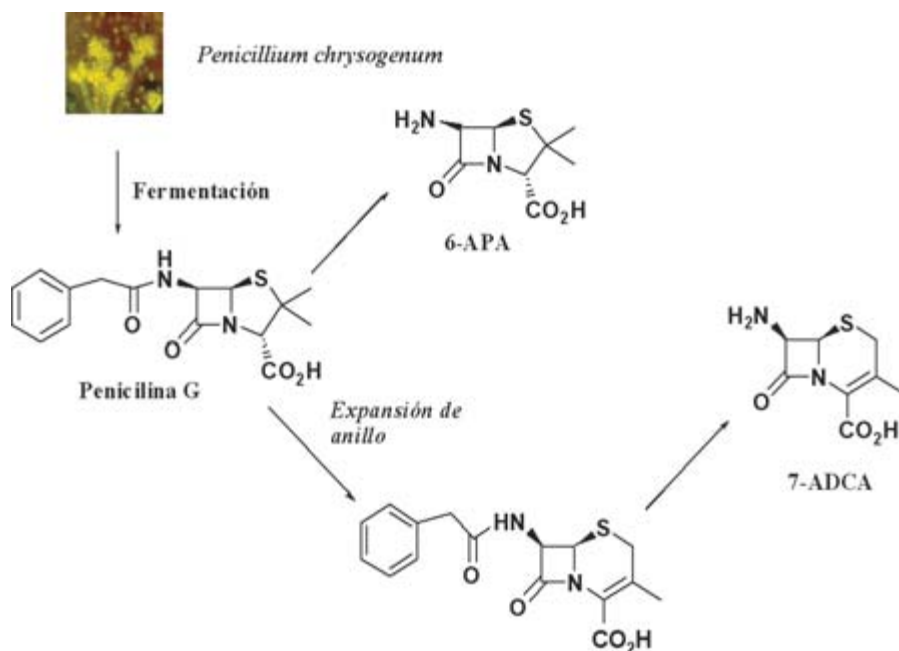


FIGURA 17. *Obtención de 6-APA y 7-ADCA a partir de Penicillium chrysogenum.*

La mayoría de las penicilinas como por ejemplo la penicilina G es transformada en ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), el cual se utiliza para síntesis de penicilinas semisintéticas, obteniendo un rango de variantes de penicilinas con distintas características antibióticas (43). El ciclo del 6-APA puede expandirse por métodos químicos o por la acción de una enzima (expandasa) a una estructura adecuada para la síntesis de cefalosporinas, como el ácido 7-amino desacetoxicefalosporánico (7-ADCA). La unión de cadenas laterales a la estructura base genera derivados de penicilina y cefalosporina que han sido tradicionalmente producidos usando una química basada en disolventes complejos a temperaturas del orden de  $-80^{\circ}\text{C}$  para preservar el lábil anillo de  $\beta$ -lactama.

Las penicilinasas (también denominadas penicilinesterasas o penicilnamidasas) son una familia de enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se utilizan desde hace tiempo en la industria de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos para obtener 6-APA por hidrólisis de las penicilinas G o V. También se emplean para obtener 7-ADCA por hidrólisis del producto que resulta después de expandir químicamente el anillo de la penicilina. Una combinación de D-aminoácido oxidasa y glutaril-acilasa se emplea para producir 7-ACA a partir de la cefalosporina C (44). Recientemente, estas acilasas se han utilizado para sintetizar antibióticos, ya que en determinadas condiciones también las enzimas pueden catalizar la reacción inversa con buenos rendimientos. De esta forma se consiguen las penicilinas «verdes» o ecológicas, denominadas así porque en su producción ya no se emplean los procesos químicos más contaminantes ni se generan tanta cantidad de residuos (45).

Como puede apreciarse en la Figura 18 la obtención de 1 Kg de 6-APA requiere de aproximadamente 20 Kg de reactivos por métodos químicos convencionales, frente a 0,02 Kg de  $\text{NH}_3$  y 2 L de agua por métodos biotecnológicos.

Desde hace tiempo, los genes de estas enzimas se han clonado y manipulado no sólo para mejorar su producción sino para obtener enzimas más eficaces tanto para la hidrólisis como para la síntesis.

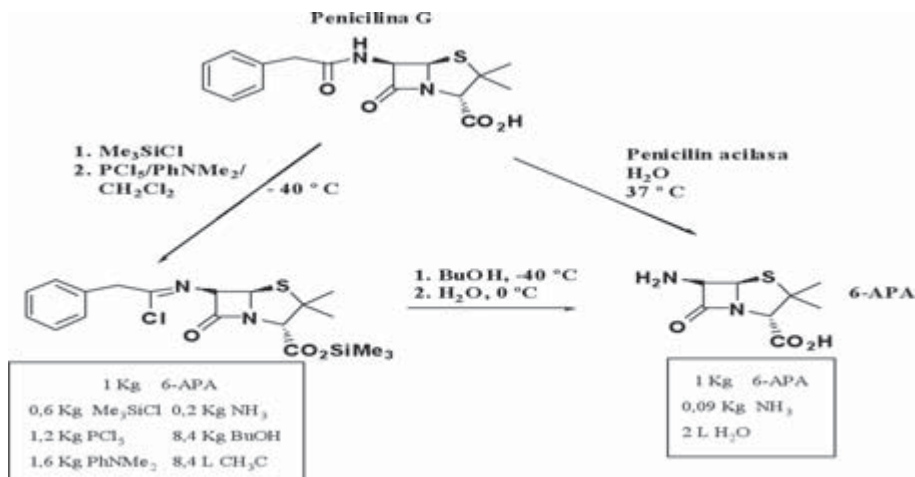


FIGURA 18. *Obtención de 6-APA por métodos químicos y métodos biotecnológicos.*

La D-fenilglicina y D-p-hidroxifenilglicina, que son las cadenas laterales que se unen al esqueleto de 6-APA o 7-ADCA en los antibióticos semisintéticos ampicilina, amoxicilina, cefalexina y cefadroxilo son también producidas por DSM (46, 47) (Figura 19).

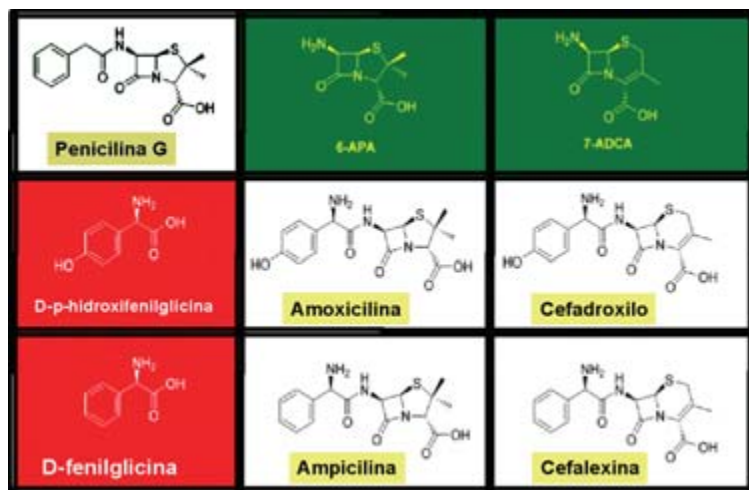


FIGURA 19. *Unión de la cadena lateral biocatalíticamente a partir de penicilacilasas.*

La unión de la cadena lateral al núcleo ha sido desarrollada desde hace tiempo por vía química pero DSM ha completado recientemente el desarrollo de un proceso biocatalítico usando otra penicilacilasa. Bajo ciertas condiciones de pH y controlando, las concentraciones de precursor y producto la unión de las dos moléculas puede competir con la reacción inversa de hidrólisis catalizada por la misma enzima y con buenos rendimientos.

## 5. BIOTECNOLOGÍA BLANCA Y QUÍMICA SOSTENIBLE

Una de las mayores aportaciones que se espera de la Biotecnología Industrial es que ayude a reducir el impacto de la industria en el medio ambiente, consiguiendo que los procesos industriales sean mucho más eco-eficientes. Una de las prioridades sería la reducción de las emisiones de CO<sub>2</sub> debido a la preocupación actual por el denominado cambio climático, entre cuyas principales causas se encuentra la emisión a la atmósfera de los gases de efecto invernadero.

Otro objetivo prioritario sería la reducción, gestión y reciclaje de residuos. Los procesos biotecnológicos, por su elevada eficiencia y especificidad, cuentan entre sus propiedades más características el que generan unos menores niveles de residuos que los procesos químicos convencionales y, además, esos residuos son comparativamente mucho menos peligrosos. Además, una parte más o menos importante de los residuos generados en los bioprocesos, son susceptibles a su vez de ser reutilizados como materia prima de partida para otros bioprocesos, lo que tiene un doble beneficio. Por un lado, contribuye a solucionar el problema medioambiental que supone la generación de residuos y, por otro lado, valoriza dichos residuos al utilizar una materia prima extremadamente barata para obtener productos de elevado valor añadido.

La Química verde o Green Chemistry tiene como objeto promover tecnologías químicas innovadoras que reduzcan el uso o generación de sustancias químicas peligrosas en el diseño, fabricación y uso de los productos químicos. De esta forma su objetivo final es reducir los problemas medioambientales no con soluciones de final de tubería, es decir no eliminando la contaminación una vez produ-

cida, sino atacando el problema de raíz es decir, utilizando procesos químicos que no produzcan residuos.

La biotecnología industrial puede proporcionar un crecimiento económico sin precedentes basado en la innovación y una tecnología benigna medioambientalmente hablando. Por estas razones, tiene que haber una transición de una sociedad basada en el uso de recursos fósiles a una de mayor sostenibilidad, donde los recursos renovables contribuyan a las necesidades materiales y energéticas. La biotecnología industrial es una tecnología clave que puede hacer esto posible. El desarrollo y uso de la biotecnología industrial es esencial para la competitividad futura de la industria europea y proporciona una base tecnológica para la sociedad sostenible del futuro.

## AGRADECIMIENTOS

*A la memoria de mi padre.*

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Science, Technology and Patents, Biotechnology Statistics in OECD Member Countries: On-line Inventory accesible en [www.oecd.org](http://www.oecd.org).
- (2) AROZENA, I. (2006): Los colores de la Biotecnología. *Biotech.* 1: 52-54.
- (3) DASILVA, E. J. (2004): The colours of Biotechnology: Science, Development and Humankind. *Electron. J. Biotechnol.* 7: 1-2.
- (4) NAGANO, N. (2005): EzCatDB: the Enzyme Catalytic-mechanism Database. *Nucleic Acids Research.* 33: 407-412.
- (5) STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S. and SCHMID, A. (2002): The production of fine Chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 548-556.
- (6) NGUYEN, H. D. and SCHUMANN, W. (2006): Establishment of an experimental system allowing immobilization of proteins on the surface of *Bacillus subtilis* cells. *J. Biotechnol.* 122: 473-482.
- (7) RAMACHANDRA RAOA, S. and RAVISHANKAR, G. A. (2002): Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechn. Advances.* 20: 101-153.
- (8) URBAN, P. L.; GOODALL, D. M.; BERGSTROM, E. T. and BRUCE N. C. (2006): On-line low-volume transesterification-based assay for immobilized lipases. *J. Biotechnol.* 126: 508-518.
- (9) KIM, J.; GRATE, J. W. and WANG, P. (2006): Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Engin. Sci.* 61: 1017-1026.



- (10) HERNÁIZ, M. J.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. and SINISTERRA, J. V. (1999): Modification of purified lipases from *Candida rugosa* with polyethylene glycol: A systematic study. *Enz. Microb. Technol.* 24: 181-190.
- (11) KIM, Y. W.; CHOI, J. H.; KIM, J. W.; PARK, C.; KIM, J. W.; CHA, H.; LEE, S. B.; OH, B. H.; MOON, T. W. and PARK, K. H. (2003): Directed Evolution of *Thermus* Maltogenic Amylase toward Enhanced Thermal Resistance. *App. Env. Microbiol.* 69: 4866-4874.
- (12) DE LA CASA, R. M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. and SINISTERRA, J. V. (1996): Water Adsorption Isotherm as a Tool to Predict the Preequilibrium Water Amount in Preparative Esterification. *Biothechnol. Lett.* 18: 13-18.
- (13) ARROYO, M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. and SINISTERRA, J. V. (1996): A New Method to Determine the Aw Range in which Immobilized Lipases Display Optimum Activity in Organic Media. *Biothechnol. Tech.* 31: 1133-1139.
- (14) ARROYO, M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. and SINISTERRA, J. V. (1999): Thermal Stabilization of Immobilized Lipase B from *Candida antarctica* on Different Supports: Effect of Water Activity on Enzymatic Activity in Organic Media. *Enz. Microbiol. Technol.* 24: 3-12.
- (15) CHAMORRO, S.; ALCÁNTARA, A. R.; DE LA CASA, R. M.; SINISTERRA, J. V. and SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. (2001): Small water Amounts Increase the Catalytic Behaviour of Polar Organic Solvents Pretreated *Candida rugosa* Lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 11: 939-947.
- (16) Biotecnología en la Medicina del Futuro. Fundación Cotec para la innovación tecnológica. 2006.
- (17) PATEL, R. N.; BANERJEE, A.; NANDURI, V. B.; GOLDBERG, S. L.; JOHNSTON, R. M.; HANSON, R. L.; MCNAMEE, C. G.; BRZOZOWSKI, D. B.; TULLY, T. P.; KO, R. Y.; LA PORTE, T.; CAZZULINO, D.; SWAMINATHAN, S.; PARKER, L. and VENIT, J. (2000): Biocatalytic preparation of a chiral synthon for a vasopeptidase inhibitor: enzymatic conversión of N2.[N-phenylmethoxy)carbonyl]L-homocysteinyl]-L-lysine (1→1')-disulfide to [4s-(41,71,10aJ] 1-octahydro-5-oxo-4[phenylmethoxy)carbonyl amino]-7H-pyrido-[2,1-b][1,3]thiazepine-7-carboxylic acid methyl ester by a novel L-lysine  $\epsilon$ -aminotransferase. *Enz. Microb. Technol.* 27: 376-389.
- (18) HANSON, R.; SCHWIDEN, M. D.; BANERJEE, A.; BRZOZOWSKI, D.; CHEN, B.-C.; PATEL, B. P.; MCNAMEE, C.; KODERSHA, G.; KRONENTHAL, D.; PATEL, R. N., and SZARKA, (1999): Enzymatic synthesis of L-6-hydroxynorleucine. *J. Bioorg. Med. Chem.* 7: 2247-2252.
- (19) HANSON, R.; HOWELL, J.; LAPORTE, T.; DONOVAN, M.; CAZZULINO, D.; ZANNELLA, V.; MONTANA, M.; NADURI, V.; SCHWARZ, S.; EIRING, R.; DURAND, S.; WASYLYK, J.; PARKER, L.; LIU, M.; OKUNIEWICZ, F.; CHEN, B.-C.; HARRIS, J.; NATALIE, K.; RAMIG, K.; SWAMINATHAN, S.; ROSSO, V.; PACK, S.; LOTZ, B.; BERNOT, P.; RUSOWICZ, A.; LUST, D.; TSE, K.; VENIT, J.; SZARKA, L. and PATEL, R. N. (2000): Synthesis of allysineethylene acetal using phenylalanine dehydrogenase from *Thermoactinomyces intermedius*. *Enz. Microb. Technol.* 26: 348-358.
- (20) DAS, J.; HASLANGER, M. J.; GOUGOUTAS, J. S. and MALLEY, M. F. (1987): Synthesis 1100-1112.

- (21) HAMANAKA, N.; SEKO, T.; MIYAZAKI, T. and KAWASAKI, A. (1991): Rational Design of Thromboxane A<sub>2</sub> Antagonists. *Adv. Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Res.* 21: 359-362.
- (22) LUNA, H.; PRASAD, K. and REPIC, O. *Tet.: Asymmetry* 1994, 5, 303-306.
- (23) PATEL, R. N.; LUI, M.; BANERJEE, A.; THOTTATHIL, J. K.; KLOSS, J. and SZARKA, L. (1992): *J. Enzyme Microb. Technol.* 14: 778-784.
- (24) PATEL, R. N.; LUI, M.; BANERJEE, A. and SZARKA, L. J. (1992): Stereoselective Enzymatic-Hydrolysis of (Exo,Exo)-7-Oxabicyclo[2.2.1]Heptane-2,3-Dimethanol Diacetate Ester in a Biphasic System L. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 180-183.
- (25) PATEL, R. N.; ROBISON, R. S.; SZARKA, L. J.; KLOSS, J.; THOTTATHIL, J. K. and MUELLER, R. H. (1991): Stereospecific Microbial Reduction of 4, 5-Dihydro-4-(4-Methoxyphenyl)-6-(Trifluoromethyl-1h-1)-Benzazepin-2-One. *Enz. Microb. Technol.* 13: 906-912.
- (26) PATEL, R. N.; BANERJEE, A.; MCNAMEE, C. G. and SZARKA, L. (1993): Stereoselective Microbial Reduction of N-(4-(1-Oxo-2-Chloroacetyl Ethyl) Phenyl Methane Sulfonamide. *J. Appl Microbiol. Biotechnol.* 40: 241-245.
- (27) KULMATYCKI, K. M.; ABOUCHEHADE, K.; SATTARI, S. and JAMALI, F. (2001): Drug-disease interactions: reduced  $\beta$ -adrenergic and potassium channel antagonist activities of sotalolol in the presence of acute and chronic inflammatory conditions in the rat. *Brit. J. Pharmacol.* 133: 286-294.
- (28) PATEL, R. N.; MCNAMEE, C. G.; BANERJEE, A.; HOWELL, J. M.; ROBISON, R. S. and SZARKA, L. J. (1992): Stereoselective Reduction of Beta-Keto-Esters by *Geotrichum-Candidum*. *Enz. Microb. Technol.* 14: 731-738.
- (29) MAHMOUDIAN, M.; EADDY, J. and DAWSON M. (1999): Enzymic acylation of 506U78 (2-amino-9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-6-methoxy-9H-purine), a powerful new anti-leukaemic agent. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 229-233.
- (30) FEDERSPIEL, M.; FISCHER, R.; HENNIG, M.; MAIR, H. J.; OBERHAUSER, T.; RIMMLER, G.; ALBIEZ, T.; BRUHIN, J.; ESTERMANN, H.; GANDERT, C.; GOCKEL, V.; GOTZO, S.; HOFFMANN, U.; HUBER, G.; JANATSCH, G.; LAUPER, S.; ROCKEL-STABLER, O.; TRUSSARDI, R. Z. and WAHLEN, A. G. (1999): Industrial synthesis of the key precursor in the synthesis of the anti-influenza drug oseltamivir phosphate (Ro 64-0796/002, GS-4104-02): Ethyl (3R,4S,5S)-4,5-epoxy-3-(1-ethyl-propoxy)-cyclohex-1-ene-1-carboxylate. *Org. Proc. Res. Dev.* 3: 266-274.
- (31) DRATHS, K. M.; KNOP, D. R. and FROST, J. W. (1999): Shikimic acid and quinic acid: Replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 1603-1604.
- (32) KIENER, A. (1992) Int. Enzymatic Oxidation of Methyl-Groups on Aromatic Heterocycles - a Versatile Method for the Preparation of Heteroaromatic Carboxylic-Acids. *C Angew. Chem Ed. Engl.* 31: 774-775.
- (33) PATEL, R. N.; BANERJEE, A.; KO, R. Y.; HOWELL, J. M.; LI, W-S. and COMEZOGU, F. T. (1994): Enzymic preparation of (3R-cis)-3-(acetyloxy)-4-phenyl-2-azetidinona: a taxol side chain synthon. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 20: 23-33.
- (34) PATEL, R. N.; SZARKA, L. J. and PARTYKA, R. A. (1993): Enzymatic process for resolution of enantiomeric mixtures of compounds useful as intermediates in the preparation of taxanes, E. R. Aquibn Sons Inc., EP552041.

- (35) KHMELNITSKI, Y. L.; BUDDE, CH. J.; ARNOLD, M.; USYATINSKY, A.; CLARK, D. S. and DORDICK, J. S. (1997): Synthesis of water soluble Paclitaxel derivatives by enzymatic acylation. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 11554-11555.
- (36) EICHHORN, E.; RODUIT, J. P.; SHAW, N.; HEINZMANN, K. and KIENER, A. (1997): Preparation of (S)-piperazine-2-carboxylic acid, (R)-piperazine-2-carboxylic acid, and (S)-piperidine-2-carboxylic acid by kinetic resolution of the corresponding racemic carboxamides with stereoselective amidases in whole bacterial cells. *Tet. Asymmetry*. 8: 2533-2536.
- (37) KULLA, H. (1991): Enzymatic hydroxylations in industrial application. *Chimica*, 45: 81-85.
- (38) COREY, E. J.; GIN, D. Y. and KANIA, R. S. (1996): Enantioselective Total Synthesis of Ecteinascidin 743. *JACS*, 118: 9202.
- (39) CUEVAS, C.; PÉREZ, M.; MARTÍN, M. J.; CHICHARRO, J. L.; FERNÁNDEZ-RIVAS, C.; FRANCESH, A.; GALLEGO, P.; ZARZUELO, M.; DE LA CALLE, F.; GARCÍA, J.; POLANCO, C.; RODRÍGUEZ, I. and MANZANARES, I. (2000): Synthesis of ecteinascidin ET-743 and phthalascidin Pt-650 from cyanosafracin B. *Org. Lett.* 10: 2545-2548.
- (40) BRUGGINK, A. and ROY, P. D. (2001): Industrial synthesis of semisynthetic antibiotics. In: Bruggink, A. (ed.), *Synthesis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics: Chemistry, biocatalysis, and process integration*, Dordrecht: Kluwer, 12-55.
- (41) WEGMAN, M. A.; JANSSEN, M. H. A.; VAN RANTWIJK, F. and SHELDON, R. A. (2001): Towards biocatalytic synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Adv. Synth. Catal.* 343: 559-576.
- (42) TRAMPER, J.; BEEFTINK, H. H.; JANSSEN, A. E. M.; OOIJKAAS, L. P.; VAN ROON, J. L.; STUBEL, M. and SCHROËN, C. G. P. H. (2001): Biocatalytic production of semi-synthetic cephalosporins: process technology and integration. In: Bruggink, A. (ed.), *Synthesis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics*, Dordrecht: Kluwer. 206-249.
- (43) ARROYO, M.; DE LA MATA, I.; ACEBAL, C. M. and CASTILLÓN, M. P. (2003): Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 507-514.
- (44) BARBER, M. S.; GIESECKE, U.; REICHERT, A. and MINAS, W. (2004): Industrial Enzymatic Production of Cephalosporin-Based  $\beta$ -Lactams. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 88: 179-215.
- (45) WEGMAN M. A.; JANSSEN, M. H. A.; VAN RANTWIJK, F. and SHELDON, R. A. (2001) Towards biocatalytic synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Adv. Synth. Catal.* 343: 559-576.
- (46) BRUGGINK, A.; ROOS, E. C. and DE VROOM, E. (1998): Penicillin Acylase in the Industrial Production of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Org. Process. Res. Dev.* 2: 128-133.
- (47) DSM Anti-Infectives. DSMPureActives™ A new standard in antibiotics. DSM Press Release, Delft, 7 December 2004.