

## Utilización de hidrolasas en la preparación de fármacos e intermedios homoquirales

**Andrés R. Alcántara León, José María Sánchez Montero\***

Grupo de Biotransformaciones (BTG).  
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica.  
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.  
Recibido el 14 de diciembre de 2009.

### RESUMEN

La exquisita regio y estereoselectividad que presentan los biocatalizadores, amén de la buena sostenibilidad inherente a su empleo, permiten la realización de protocolos sintéticos difícilmente alcanzables por las metodologías clásicas, a menos que se lleven a cabo costosos procesos de protección y desprotección. En este trabajo se revisan algunos ejemplos en los cuales las hidrolasas (las enzimas más empleadas dentro del ámbito de las Biotransformaciones) están implicadas como biocatalizadores para la obtención del eutómero (estereoisómero activo, que presenta la actividad terapéutica deseada) bien de diferentes fármacos quirales, o bien de precursores a través de los cuales se puedan sintetizar. Así, se comentarán distintos tipos de biotransformaciones para la obtención de compuestos con diferentes actividades: antivirales, anticancerosos, antihipertensivos, antiinflamatorios, etc, haciendo hincapié en la versatilidad y comodidad del empleo de los biocatalizadores en los pasos sintéticos descritos.

**Palabras clave:** Biocatalizadores; Hidrolasas; Biotransformaciones; Fármacos.

## ABSTRACT

### **Hydrolases use in the preparation of drugs and homochiral intermediates**

The excellent regio and stereoselectivity of biocatalysts, combined with their environmental friendly behaviour, make possible to carry out under biocatalytical conditions many processes which, conducted on strictly classical methodologies, would demand expensive and tedious protection and de-protection steps. In this work we review some examples in which hydrolases (the most useful enzymes in the Biotransformations field) catalyse different reactions for synthesizing only the therapeutically essential stereoisomer of different homochiral building blocks for drugs. Thus, processes leading to antiviral, anticancer, antihypertensive or antiinflammatory drugs, along with many others, are described, remarking the versatility and utility of the biocatalysts in the above-mentioned processes.

**Keywords:** Biocatalysts; Hydrolases; Biotransformations; Drugs.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los biocatalizadores, tanto en forma de enzimas aisladas como sistemas celulares, están siendo cada día más utilizados en rutas sintéticas que conduzcan a productos de interés industrial (1-8). Aunque sin duda existe un creciente interés en la aplicación de la Biocatálisis a la obtención de productos de bajo valor añadido (9, 10), su utilización está más focalizada hacia el sector del alto valor añadido, especialmente en la industria farmacéutica, puesto que la exquisita regio y estereoselectividad que presentan los biocatalizadores permite la realización de protocolos sintéticos difícilmente alcanzables por las metodologías clásicas, a menos que se lleven a cabo costosos procesos de protección y desprotección. Por otra parte, las condiciones suaves de presión y temperatura que se utilizan en las biotransformaciones evitan la aparición de reacciones colaterales indeseadas (racemizaciones, epimerizaciones o transposiciones) que perjudicarían la economía del proceso. Aún más, las modernas técnicas de modificación genética que permiten la sobreexpresión de enzimas y el aumento de sus propiedades catalíticas (estabilidad y selectividad)

está aumentando de manera considerable el interés en los procesos biocatalizados.

Desde el punto de vista del ámbito de aplicación de la Biocatálisis para la obtención de nuevos fármacos, no cabe duda de que nos enfrentamos a un amplio espectro de utilización, ya que siempre que hablemos de quiralidad, los biocatalizadores desempeñan un papel prominente; en efecto, en el año 2000, un 35% de los sintones utilizados para dicho fin eran quirales, y se espera que este número aumente hasta un 70% en el año 2016 (11). En efecto, después de décadas de una química farmacéutica esencialmente bidimensional, donde la farmacopea estaba plagada de racematos, a comienzos de los años ochenta se produjo un redescubrimiento de la estereoquímica (12). A este hecho contribuyó sobremanera la incorporación al arsenal de reacciones precedentes de nuevas metodologías de obtención de asimetría molecular, entre ellas la Biocatálisis como mencionamos anteriormente, que reavivaron el interés por el estudio estereoquímico del modo de actuación de los fármacos (13). Así, se reconoció que la mayoría de los fármacos eran realmente una mezcla de estereoisómeros, llamados *eutómero* (isómero que presenta la actividad terapéutica deseada) y *distómero* (isómero no activo, que en el mejor de los casos es inactivo y en el peor de ellos puede presentar altos niveles de toxicidad), siguiendo las definiciones de Ariens (14). Esta visión excesivamente simplista ha dado paso a una diferenciación más completa y detallada del papel de cada estereoisómero (12, 15, 16), y en este sentido, hoy día los compuestos que presentan algún centro quiral en su estructura se manufacturan de manera preferente como el eutómero, y las legislaciones más avanzadas [la FDA (Food & Drug Administration) norteamericana, como ejemplo más señero] demandan pruebas concluyentes de que los distómeros carecen de efectos nocivos para la salud. Todos recordamos el tristemente célebre caso de la ftalidomida, por lo que sin duda ha quedado manifiestamente comprobado que el empleo de fármacos homóqu岸ales es esencial para lograr el efecto terapéutico deseado. Además, existen otras ventajas ligadas a su empleo, tales como la reducción de la dosis necesaria, la simplificación del conocimiento de la relación dosis-respuesta y la minimización de la toxicidad. Estos factores farmacocinéticos y farmacodinámicos han llevado a una gradual preferencia por el empleo de enantiómeros separados tanto a nivel industrial como legislativo. Así,

en términos estadísticos, las ventas mundiales de fármacos quirales en forma del eutémero aislado crecieron en USA a un ritmo de un 13% anual hasta 133 millardos de dólares en 2000 y 147,2 millardos en 2001 (incremento de un 16,7%). En esos años, un 40 y un 36%, respectivamente, de todos los fármacos vendidos fueron enantiómeros simples, frente a un 33% en 1999 (17, 18). Esto implica que el debate entre usar racematos o enantiómeros aislados se está claramente decantando hacia los segundos, y en ese sentido el empleo de procesos biocatalizados tiene mucho aún por ofrecer.

En este sentido, dentro del amplio campo de las Biotransformaciones, sin duda las hidrolasas (enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de enlaces principalmente del tipo C-O, C-N, C-C y, en algunos casos, P-O) son las enzimas más ampliamente utilizadas. De hecho, se estima que aproximadamente un 80% de todas las enzimas usadas en procesos industriales pertenecen a esta clase (19). A ello contribuyen de manera especial todas las ventajas inherentes a su utilización, a saber:

- Ausencia de necesidad de cofactores (caros y que deben ser reciclados).
- Buena disponibilidad comercial (un gran número a precios asequibles).
- Capacidad de reconocimiento muy específico de sustratos a veces muy alejados de la estructura de sus sustratos «naturales» [lo que se ha definido recientemente como «promiscuidad catalítica» (20)].
- Posibilidad de utilización en procesos en disolventes no acuosos (especialmente en el caso de las lipasas), lo que permite llevar la biocatálisis en el sentido de la acilación en lugar de la hidrólisis.

Por ello, en este trabajo se pretende llevar a cabo una revisión acerca de los procesos más importantes en los cuales las hidrolasas están implicadas como biocatalizadores para la obtención de moléculas homquirales a través de las cuales se puedan sintetizar diferentes tipos de fármacos. Para facilitar la lectura del mismo, se ha seguido una ordenación de los procesos basándonos en el criterio de la acción terapéutica del producto obtenido.

## 2. FÁRMACOS ANTIVIRALES

### 2.1. Profármacos de lobucavir

El Lobucavir (**5**, Figura 1) es un análogo del nucleósido ciclo-butilguanina, el cual se encuentra bajo desarrollo como un agente antiviral para el tratamiento para el virus del herpes y del virus de la hepatitis B (21). Un profármaco del mismo, en que uno de los dos hidroxilos se une a la valina, **7** se ha considerado interesante para su desarrollo.

La aminoacilación regioselectiva de uno de los dos hidroxilos primarios es difícil de llevar a cabo por procedimientos químicos, aunque sin embargo podría realizarse mediante un proceso enzimático (22). En este sentido, la síntesis del profármaco lobucavir *L*-valina requiere la unión enantioselectiva de uno de los dos grupos hidroxilos del lobucavir con valina, y para ello los procesos enzimáticos fueron desarrollados por aminoacilación de ambos grupos hidroxilo del lobucavir (22). La hidrólisis selectiva del diéster **1** con lipasa M condujo a **3** con un 83% de rendimiento. Cuando el diéster metílico **9** como dihidrocloruro fue hidrolizado con lipasa de *Candida rugosa* se obtuvo **4** con un rendimiento del 87%. Los intermedios finales del profármaco lobucavir, el éster **6**, podrían ser obtenidos por transesterificación de lobucavir usando ChiroCLEC BL (61% de rendimiento) o más selectivamente usando lipasa de *Pseudomonas cepacea* (84% de rendimiento).

### 2.2. Crixivian (Inhibidor de la proteasa del HIV)

El *cis*-(*1S,2R*)-1-aminoindan-2-ol (Figura 2, **11**) es un síntón clave para la síntesis de Crixivian (indinavir) **12**, un inhibidor de la proteasa-HIV. Se ha descrito un proceso mediado por una epóxido hidrolasa de *Diplodia gossipina* para la resolución del óxido de indeno racémico **8**. El enantiómero deseado para obtener **11**, el (*1S,2R*)-óxido de indeno **9**, un intermedio quiral para la síntesis del Crixivian, se obtuvo con un rendimiento del 14% y un exceso enantiomérico del 99%, junto con el indanodiol racémico **10** como un producto secundario (23).

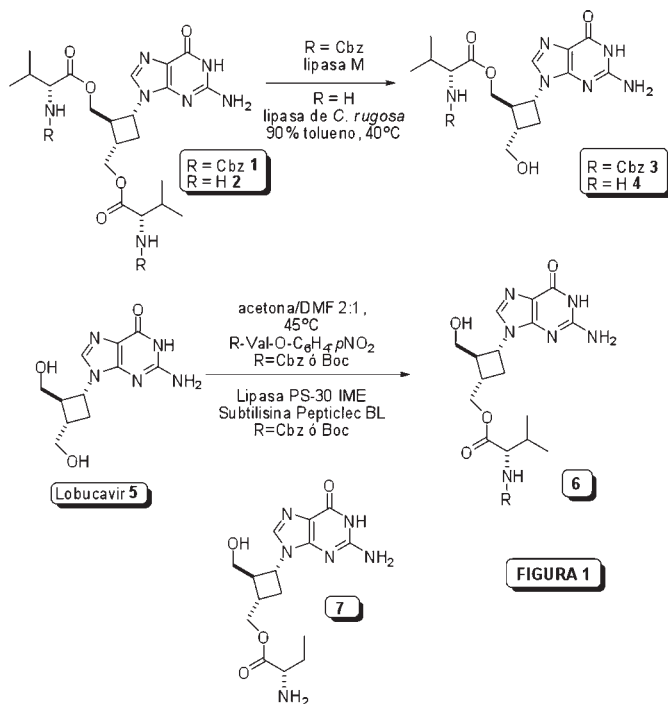
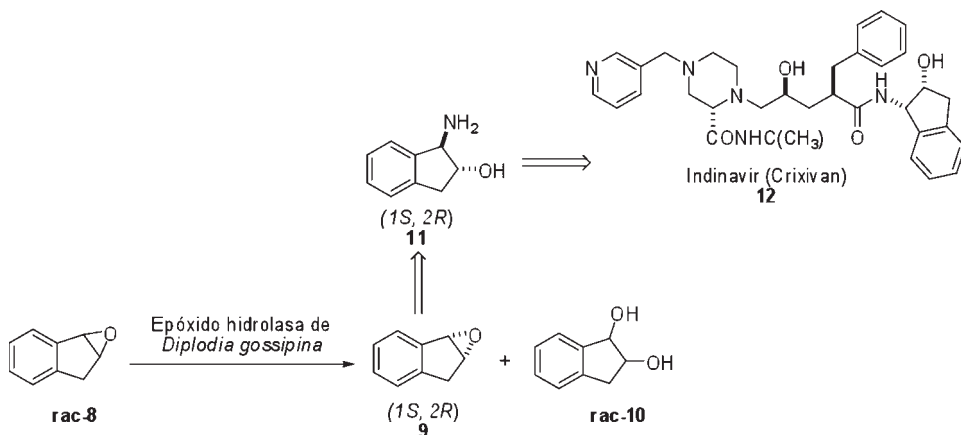


FIGURA 1

**Figura 1.** Síntesis de los intermedios quirales para el profármaco **7**, mediante hidrólisis enzimática regioselectiva de **1** y **2**, o mediante aminoacilación enzimática regioselectiva del lobucavir **5**.



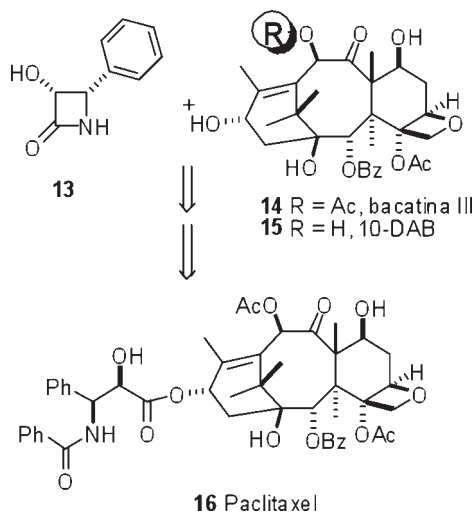
**Figura 2.** Resolución del óxido de indeno racémico **8** para la obtención de los intermedios homoquirales **9** y **11** necesarios para la síntesis del indinavir **12**.

### 3. FÁRMACOS ANTICANCEROSOS

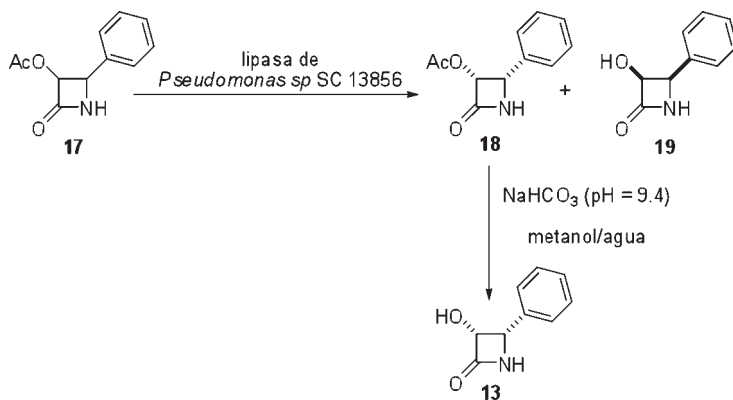
#### 3.1. Cadena lateral del taxol (Paclitaxel)

Entre los agentes antimitosis, el paclitaxel (Taxol) (**16**, Figura 3) un terpeno policíclico complejo, exhibe un único modo de acción sobre las proteínas microtubulares responsables de la formación de el huso mitótico durante la división celular, pues inhibe el proceso de despolimerización de la microtubulina (24). El Paclitaxel se ha utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer entre los que podemos citar el cáncer de ovarios, y metástasis de cáncer de mama con resultados prometedores. El Paclitaxel fue originalmente aislado de la corteza del tejo *Taxus brevifolia* y también se ha encontrado en otras variedades de tejo. El principal inconveniente es que el rendimiento es muy bajo (0,07%). Se ha estimado que son necesarias unas 20.000 libras de corteza de tejo (equivalente a 3.000 árboles) para producir 1 kg de Paclitaxel (25). El desarrollo de un proceso semisintético para la producción de Paclitaxel a partir de, por un lado, bacatina III **14** (Paclitaxel sin cadena lateral en C-13) o 10-desacetilbacatina III **15** (10-DAB, paclitaxel sin cadena lateral en C-13 y sin el acetato del C-10), y por el otro de la estructura lactámica **13** (precursora de la cadena lateral en C-13) es una muy interesante propuesta. En efecto, tanto diferentes taxanos (estructuras derivadas de **14** ó **15**), como la bacatina III o la 10-DAB pueden obtenerse a partir de agujas, brotes y cultivos jóvenes de tejo (26). Es decir, la producción de paclitaxel por un proceso semisintético podría eliminar la tala de árboles de tejo.

Así pues, lograr la correcta estereoquímica de la cadena lateral en C-13 es de crucial importancia. Para ello, se llevó a cabo la hidrólisis enantioselectiva del acetato racémico 3-(acetiloxi)-4-fenil-2-azetidina **17** (Figura 4) al correspondiente alcohol **19** y el *R*-acetato **18** (27) usando una lipasa PS-30 de *Pseudomonas cepacea* (Amano) y BMS lipasa (lipasa extracelular obtenida de la fermentación de *Pseudomonas sp.* SC 13856). El rendimiento de reacción obtenido para el (*R*)-acetato **18** fue superior al 48% (máximo teórico del 50% para una resolución cinética) con un exceso enantiomérico superior al 99,5%.



**Figura 3.** Estructuras del paclitaxel **16** y de los intermedios de semisíntesis bacatina III (**14**) y 10-DAB (10-desacetilbacatina, **15**).



**Figura 4.** Hidrólisis enantioselectiva del acetato racémico 3-(acetiloxi)-4-fenil-2-azetidinona **17**, y posterior hidrólisis química para la obtención de **13**.

La lipasa BMS y la lipasa PS-30 fueron inmovilizadas sobre polipropileno Accurel (PP), y las lipasas inmovilizadas se pueden reutilizar (diez ciclos) sin pérdida de actividad enzimática, productividad o enantiopureza del producto **18** en el proceso de resolución. El proceso enzimático fue escalado hasta 250 L (2,5 kg sustrato) usando



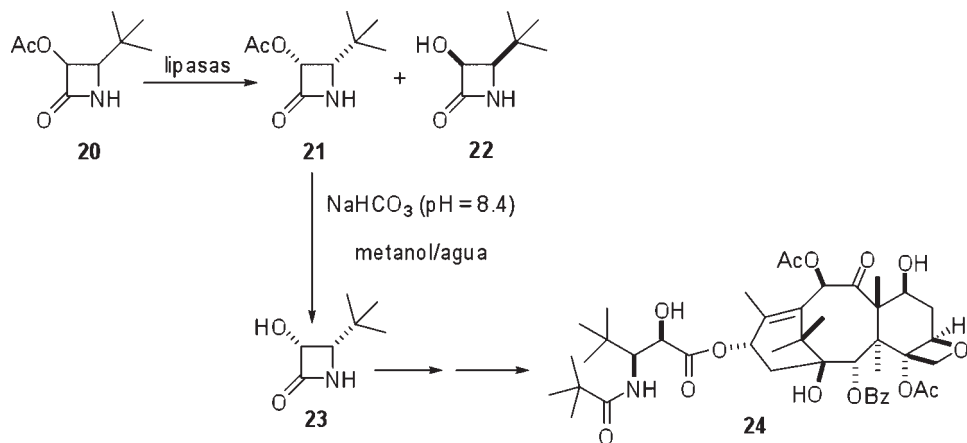
lipasa BMS y lipasa PS-30 respectivamente. De cada *batch* de reacción, se aisló el *R*-acetato **18** con un 45% de rendimiento y 99,5% de e.e. Mediante una suave hidrólisis en medio básico, el *R*-acetato se transformó químicamente al *R*-alcohol **13**, síntón que al ser acoplado a la bacatina III **14**, tras una protección y desprotección, permite preparar paclitaxel por un proceso semisintético (26).

### 3.2. Taxano activo por vía oral: Preparación enzimática de (3*R*-*cis*)-3-acetiloxi-4-(1,1-dimetiletil)-2-azetidiona

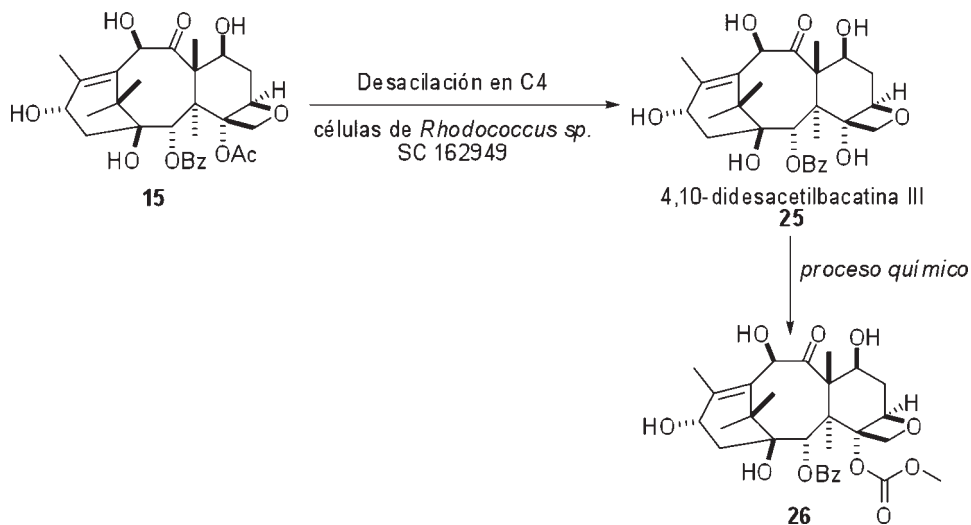
Debido a la pobre solubilidad en agua del paclitaxel, varios grupos están desarrollando análogos solubles en agua (28-30). El producto **24** (Figura 5) es un derivado de taxano soluble en agua, que cuando se administra por vía oral, resulta tan efectivo como el paclitaxel en cinco modelos tumorales [pulmón M109 y cáncer de mamas en ratón, cáncer de ovario humano (expresado en ratas y ratones), y en cáncer de colon HCT/pK] (29).

El intermedio quiral (3*R*-*cis*)-3-acetiloxi-4-(1,1-dimetiletil)-azetidiona **21** fue preparado para la semisíntesis del nuevo taxano **24**. La hidrólisis enzimática enantioselectiva de *rac*-3-acetiloxi-4-(1,1-dimetiletil)-azetidiona **20** al correspondiente (*S*)-alcohol no deseado **22** y el (*R*)-acetato buscado **21** fue realizada utilizando lipasa PS-30 (Amano) o BMS lipasa (lipasa extracelular obtenida a partir de la fermentación de *Pseudomonas* sp. SC 13856). Se obtuvo un rendimiento de reacción mayor del 48% (de nuevo un 50% es el máximo teórico) con un exceso enantiomérico mayor del 99% para el (*R*)-acetato.

Por otra parte, la semisíntesis del taxano **32** también requiere disponer de 4,10-didesacetilbacatina III **25** (Figura 6) como material de partida para la síntesis del derivado metoxicarbonilado en C4 de la 10-didesacetilbacatina **26**. Para la deacetilación de la 10-DAB **15** a **25** se empleó una hidrólisis enzimática regioselectiva utilizando como catalizador células de *Rhodococcus* sp SC 162949 aislada de soja empleando técnicas de enriquecimiento de los cultivos microbianos (30).



**Figura 5.** Hidrólisis enantioselectiva del rac-3-acetiloxi-4-(1,1-dimetiletil)-azetidiona **20**, y posterior hidrólisis química para la obtención de **23**.



**Figura 6.** Desacilación enzimática de la 10-DAB **15**.

### 3.3. Desoxiespergualina. Acetilación enzimática enantioselectiva de rac-7-[N,N'-bis(benziloxicarbonil)-N-(guanidinoheptanoil)]- $\alpha$ -hidroxiglicina

La espergualina es un antibiótico antitumoral que fue descubierto en el filtrado del caldo de cultivo de una cepa bacteriana siendo su estructura la (1*S*)-1-amino-10-guanidino-11,15-dihidroxi-4,9,12-triazanodecano-10,13-diona (31). La síntesis total vino acompañada de la condensación catalizada por el ácido del 11-amino-1,1-dihidroxi-3,8-diazaundecano-2-ona con (*S*)-7-guanidino-3-hidroxiheptanamida seguido por la separación de la mezcla de epímeros. La actividad antibacteriana o antitumoral de la espergualina racémica demostró ser la mitad de la espergualina natural (32), indicando pues la importancia de la configuración absoluta en C11 para la actividad antitumoral.

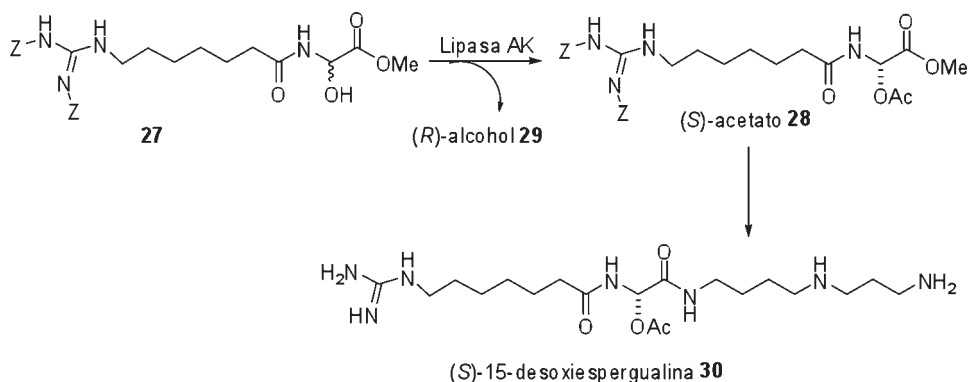
La acetilación enantioselectiva del 7-[N, N'-bis(benziloxicarbonil)-N-(guanidinoheptanoil)]- $\alpha$ -hidroxiglicina racémica (**27**, Figura 7) catalizada por la lipasa AK condujo al correspondiente (*S*)-acetato **28** y al (*R*)-alcohol **29** (33). Por su parte, el (*S*)-acetato **28** es un intermedio clave en la síntesis química de la (*S*)-15-desoxiespergualina **30**, un agente inmunosupresor y antibiótico antitumoral (34). La reacción se llevó a cabo en metil-isobutil-cetona usando una lipasa de *Pseudomonas sp.* (lipasa AK) con acetato de vinilo como agente acilante. Se obtuvo un rendimiento del 48% con un exceso enantiomérico del 98% para el (*S*)-acetato **42**. El alcohol (*R*)-**43** se obtuvo con un 41% de rendimiento y un exceso enantiomérico del 94%.

### 3.4. Acilación de Purina

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

Partiendo de la estructura **31**, y usando una lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* B y acetato de vinilo como donador de acilo se obtuvo el 5'-monoacetato **32** con un 99% de conversión. El compuesto obtenido es más soluble por lo que aumenta su 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 remarkablemente alta, ya que se obtiene menos del 0,1% del 3'-acetato y aproximadamente un 0,3% del 3',5'-diacetato (35).



**Figura 7.** Síntesis de los intermedios quirales para la obtención de la (S)-15-desoxiespergualina **30**: acilación enantioselectiva del rac-**27** para la obtención del acetato homóquiral **28**.



**Figura 8.** Acilación regioselectiva de purinas.

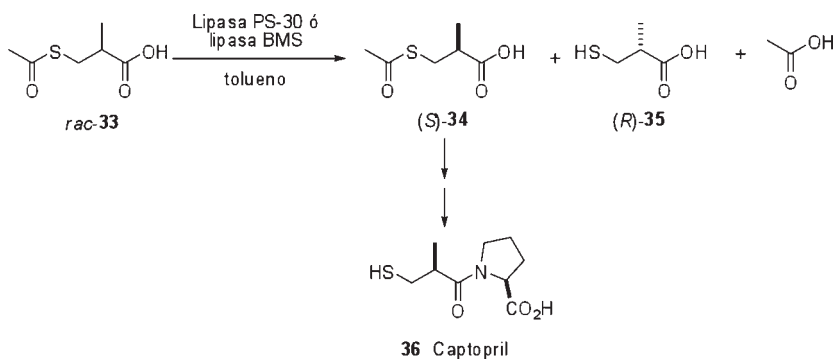
## 4. FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS

### 4.1. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

#### 4.1.1. *Captopril: Preparación enzimática del ácido (S)-3-acetiltio-2-metil propanoico*

El captopril corresponde químicamente a la estructura de 1-[(2-*S*)-3-mercapto-2-metilpropionil]-L-prolina (**36**, Figura 9). Se usa como un agente antihipertensivo mediante la supresión del sistema renina-angiotensina-aldosterona (36, 37). El captopril previene la conversión de angiotensina I a angiotensina II (AII) por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). La potencia del captopril como un inhibidor del ACE depende críticamente de la configuración del resto mercaptoalcanoilo; así, el compuesto con la configuración *S* es cien veces más activo que el correspondiente *R*-isómero (38). El resto requerido ácido (2*S*) 3-mercapto-2-metilpropiónico ha sido obtenido de una fuente microbiana a partir del ácido (2*R*)-3-hidroxi-metilpropiónico, que a su vez es obtenido por hidroxilación del ácido isobutírico (29).

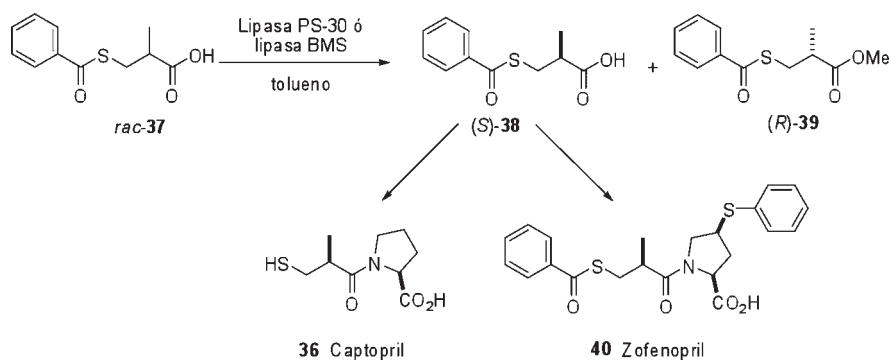
La síntesis de la (*S*)-cadena lateral del captopril fue realizada por hidrólisis enantioselectiva catalizada por lipasa del enlace tioéster del ácido 3-acetiltio-2-metil propanoico racémico **33** para obtener el compuesto (*S*)-**34** (40). Entre las distintas lipasas evaluadas, la lipasa de *Rhizopus oryzae* ATCC 24563 y la lipasa PS-30 de *P. cepacea* en medios orgánicos (1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano o tolueno) catalizó la hidrólisis del enlace tioéster del enantiómero no deseado del producto racémico **33** para dar el producto *S*-**34** deseado, y también ácido (*R*)-3-mercapto-2-metil propanoico **35** y ácido acético. De esta forma, se obtuvieron rendimientos de reacción superiores al 24% con un e.e. superior al 95% para el compuesto (*S*)-**34** usando cada lipasa.



**Figura 9.** Síntesis enzimática de los sintones para la obtención del captopril **36**: hidrólisis enantioselectiva del ácido rac-3-acetiltio-2-metilpropanoico **33**.

#### 4.1.2. Zofenopril: Preparación enzimática del ácido (S)-3-benzoiltio-2-metil propanoico

En un proceso alternativo para preparar tanto la cadena lateral del captopril **36** y del zofenopril **40**, se ha descrito una esterificación enantioselectiva del ácido 3-benzoiltio-2-metil propanoico racémico (**37**, Figura 10) catalizado por lipasas en un disolvente orgánico, para dar el R- (+) éster metílico **39**, dejando así libre el sintón deseado, el ácido S -**38** (41).



**Figura 10.** Síntesis enzimática de los sintones para la obtención del captopril **36** y del zofenopril **40**: esterificación enantioselectiva del ácido rac-3-benciltio-2-metilpropanoico **37**.

Usando lipasa PS-30 con tolueno como disolvente y metanol como nucleófilo, se obtuvo el producto deseado (S)-**38** con un 37% de rendimiento y 97% de exceso enantiomérico. Tanto la cantidad de agua como la concentración de metanol añadida a la mezcla de reacción fueron parámetros críticos; así, el agua fue añadida a una concentración de 0,1% en la mezcla de reacción. Cantidades superiores al 1% de agua conducen a la agregación de la enzima en el disolvente orgánico, con una disminución en la tasa de reacción debido a limitaciones de transferencia de masa. La tasa de esterificación disminuyó cuando la relación metanol/sustrato se incrementó de 1:1 a 4:1. Por otra parte, altas concentraciones de metanol inhibieron la esterificación debido probablemente al atrapamiento del agua esencial de la enzima. La lipasa nativa PS-30 fue inmovilizada sobre polipropileno Accurel (PP) por absorción con una eficiencia del 98,5%. La lipasa inmovilizada catalizó eficientemente la reacción de esterificación dando 45% de rendimiento con un 97,5% de exceso enantiomérico del producto (S)-**38**, permitiendo eficazmente un rendimiento y exceso enantiomérico similar del producto durante 23 ciclos de reutilización sin pérdida apreciable de actividad y productividad. El (S)-**38** es un intermedio clave para la síntesis de captopril (42) o zefenopril (43).

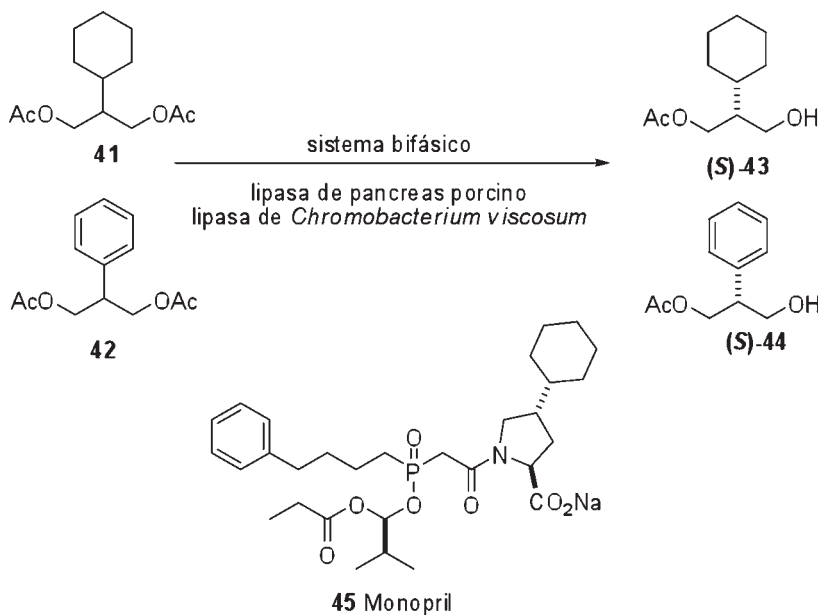
#### 4.1.3. *Monopril: Preparación enzimática de monoacetatos de (S)-2-ciclohexil y de (S)-2-fenil-1,3-propanodiol*

El monoacetato de (S)-2-ciclohexil-1,3-propanodiol **43** y (S)-2-fenil-1,3-propanodiol **44** son intermedios quirales para la síntesis quimioenzimática de Monopril (**45**, Figura 11), un fármaco antihipertensivo que actúa como inhibidor sobre la enzima convertidora de angiotensina (ACE). La hidrólisis asimétrica del diacetato de 2-ciclohexil-1,3-propanodiol **41** y el diacetato de 2-fenil-1,3-propanodiol **42** a los correspondientes (S)-monoacetatos **43** y **44** se llevó a cabo con lipasa pancreática porcina (PPL) y lipasa de *Chromobacterium viscosum* (443). Así, aplicando un sistema bifásico que contenía un 10% de tolueno, se obtuvieron rendimientos de reacción del 65% con un 99% de e.e. para el producto (S)-**43**, usando ambas enzimas. Por su parte, el (S)-**44** fue obtenido con un rendimiento del 90% con un e.e. del 99,8% utilizando lipasa de *Chromobacterium viscosum* en condiciones similares.

## 4.2. Inhibidores de la endopeptidasa neutra

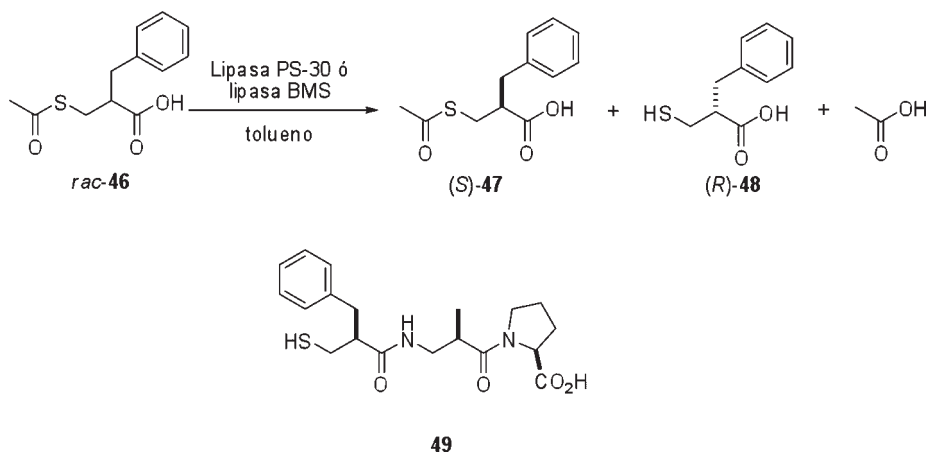
### 4.2.1. Preparación enzimática del ácido (S)- $\alpha$ -[(acetiltio)metil]benceno propanoico

El ácido (S)- $\alpha$ -[(acetiltio)metil]fenilpropanoico (**47**, Figura 12) es un intermedio quiral clave para la síntesis del inhibidor de la endopeptidasa neutra (NEP) **49** (45). La lipasa PS-30 catalizó la hidrólisis enantioselectiva del enlace tioéster del *rac*-**47** en disolvente orgánico para dar el ácido (R)- $\alpha$ -[(acetiltio)metil]fenilpropanoico **48** y el sin-ton deseado (S)-**47**, el cual se obtuvo con un rendimiento del 40% con un exceso enantiomérico del 98% (40).



**Figura 11.** Preparación de los sintones quirales para la obtención del Monopril: hidrólisis enzimática asimétrica de los diacetatos **41** y **42** a los correspondientes monoacetatos (**(S)-43** y (**(S)-44**).





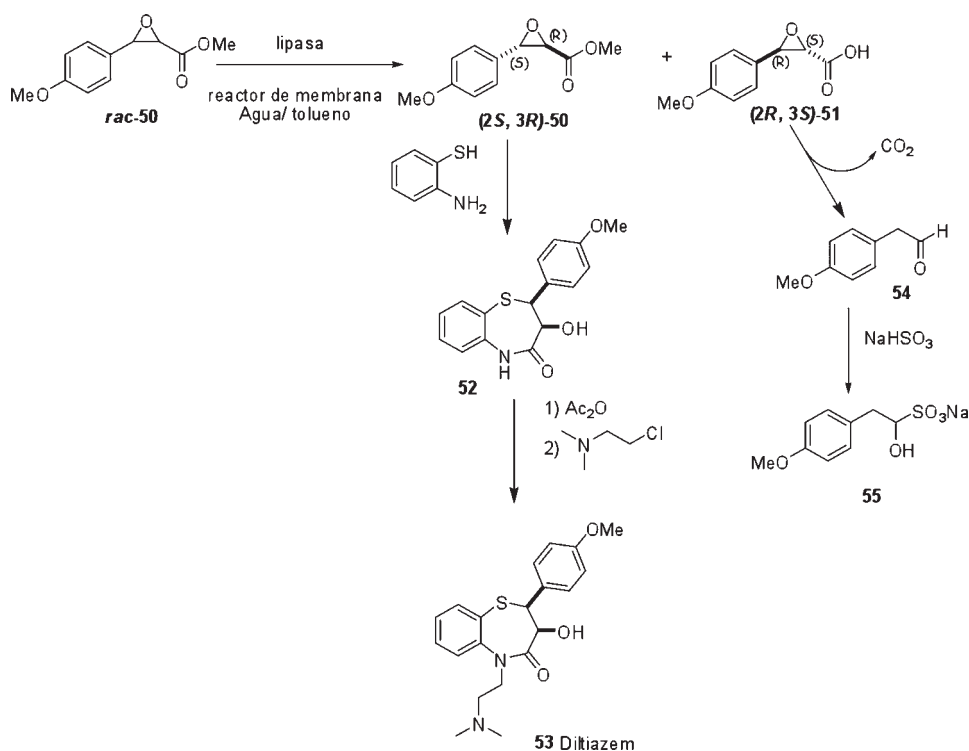
**Figura 12.** Preparación del sintón quiral para la obtención de **49** a través de la hidrólisis enzimática de **46**.

### 4.3. Bloqueantes de los canales de calcio

#### 4.3.1. *Diltiazem*

Los fármacos bloqueantes de los canales de calcio forman un grupo diverso desde el punto de vista químico y farmacológico. Desde el punto de vista químico, el diltiazem es una benzotiazepina que se usa para tratar la hipertensión y para controlar el dolor en el tórax (angina). Funciona al relajar los vasos sanguíneos para que el corazón no tenga que bombear con dificultad. También aumenta el suministro de sangre y de oxígeno al corazón. Las compañías DSM-Andeno y Tanabe Pharmaceutical han comercializado una lipasa que cataliza la resolución del éster metílico correspondiente del ácido (+)-(2*S*,3*R*)-*trans*-3-(4-metoxifenil)-glicídico (MPGM) **(2*S*,3*R*)-50**, Figura 13, un precursor clave para el diltiazem **53** (46-49). El proceso DSM-Andeno usa una lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML), mientras que el proceso Tanabe utiliza una lipasa secretada por *Serratia marcescens* Sr41 8000. En ambos, casos la lipasa cataliza la hidrólisis del racémico **rac-50** para «limpiar» el enantiómero deseado **(2*S*,3*R*)-50** del ácido producto de la hidrólisis enzimática **(2*R*,3*S*)-51**, el cual se descompone espontáneamente al aldehído **54**.

En el proceso Tanabe, en un reactor de membrana se combina la hidrólisis, separación y cristalización del **(2S,3R)-50**. En este sentido, el tolueno disuelve el sustrato racémico en el cristalizador y lo lleva hasta la membrana que contiene la lipasa inmovilizada. La lipasa cataliza la hidrólisis del enantiómero no deseado originando el ácido **(2R,3S)-51**, el cual pasa a través de la membrana en la fase acuosa. La espontánea descarboxilación del ácido da el correspondiente aldehído que reacciona con el bisulfito en la fase acuosa. En ausencia de bisulfito, este aldehído desactivaría la lipasa. El enantiómero deseado **(2S,3R)-50** permanece en la fase tolueno y se lleva hasta el cristalizador. La actividad de la lipasa baja significativamente después de ocho ciclos y la membrana puede ser recargada con lipasa adicional. Con este proceso, el rendimiento del producto cristalizado **(2S,3R)-50** fue mayor del 43% con el 100% de pureza enantiomérica.

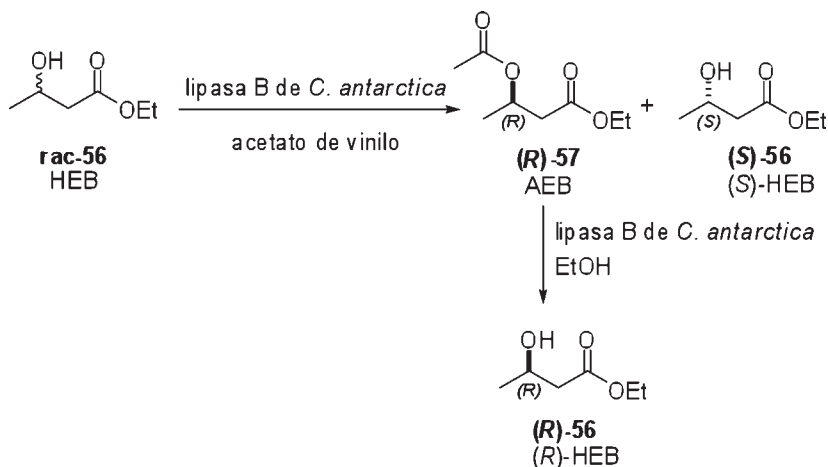


**Figura 13.** Proceso Tanabe para la preparación del sintón quiral **(2S, 3R)-50** para la obtención del diltiazem **53**.

## 5. FÁRMACOS ANTICOLESTEROLÉMICOS

### 5.1. Preparación enzimática de (R) y (S) 3-hidroxiacetato de etilo

La producción de (R) y (S) 3-hidroxiacetato de etilo (HEB), molécula clave para la obtención de fármacos que inhiben la HMG CoA reductasa, se ha desarrollado y escalado hasta la escala de kilogramos mediante un eficiente proceso enzimático en dos pasos, representado en la Figura 14. Ambos enantiómeros fueron obtenidos al 99% de pureza química y 96% de e.e. con un rendimiento del proceso completo del 73%. En la primera reacción se realizaba la acetilación del HEB racémico **56** con acetato de vinilo para la producción de (S)-HEB (**S**)-**56**. En la segunda reacción, el (R)-3-acetoxibutirato de etilo (AEB) obtenido en el primer paso por la reacción enzimática fue sometido a una etanolisis (R)-HEB ópticamente puro (**R**)-**56**. En ambas etapas se empleó, con alta productividad y selectividad, la lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* B (CALB).



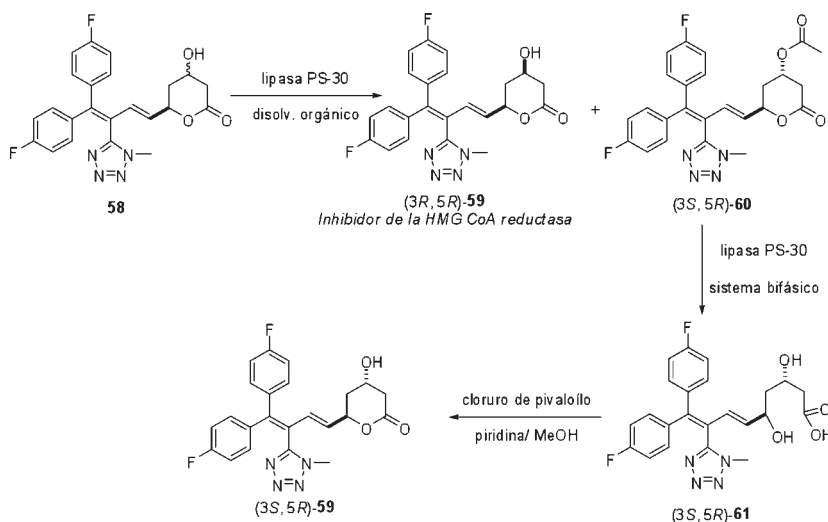
**Figura 14.** Preparación en dos pasos de los dos enantiómeros del HEB.

El tipo del éster del ácido butírico empleado influyó la enantioselectividad de la enzima. Esto es, el aumento de la cadena alquílica de etilo a octilo resultó en una disminución de la enantioselectividad, mientras que usando grupos voluminosos como bencilo o *t*-butilo, se

mejoró la enantioselectividad de la enzima. Los reactivos se hicieron recircular sobre la enzima inmovilizada en un reactor en columna hasta que se obtuvo la máxima conversión. Los productos deseados fueron separados de la mezcla de reacción en cada una de las dos etapas por destilación fraccionada. La principales características del proceso son la exclusión del disolvente y el uso de la misma enzima para los pasos de acetilación y alcoholisis para preparar kilogramos de (*S*)-HEB) y (*R*)-HEB (50).

## 5.2. Preparación enzimática de (3*R*, 5*S*)-3,5-dihidroxi-6-(feniloxi)hexanoato de etilo

La (3*R*, 5*R*)-[4-[4a,6b(E)]]-6-[4,4-bis[4-fluorofenil] 3 - (1-metil-1*H*-tetrazol-5-il)-1,3-butadienil] tetrahydro-4-hidroxi-2*H*-piren-2-ona (**59**, Figura 15) es un nuevo y potencial fármaco anticolesterolémico que actúa por inhibición de la hidroximetilglutaril coenzima A (HMG CoA) reductasa (51). Se ha descrito una ruta biocatalizada para la obtención de sintones homoquirales del tipo 1,3-diol a través de procesos catalizados por alcohol deshidrogenasas en células de *Acinetobacter calcoaceticus* SC 13876 con altas conversiones (52).



**Figura 15.** Síntesis del anticolesterolémico (3*R*, 5*R*)-**59**: acetilación enzimática diastereoselectiva de **58**.

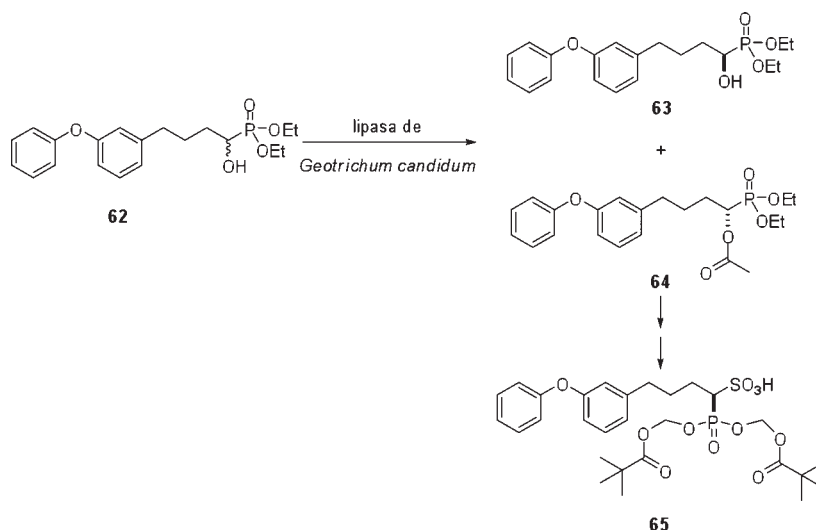
Usando un proceso de acetilación enzimática diastereoselectiva, el **(3R, 5R)-59** se preparó a partir de la mezcla diastereoisomérica **58** (543). La lipasa PS-30 y la lipasa BMS (producida por fermentación de cepas de *Pseudomonas* SC 13856) catalizaron eficientemente la acetilación de **58** (4g/L) para dar el **(3S, 5R)** acetato **60** y el compuesto buscado **(3R, 5R)**-alcohol **59**. Se logró un rendimiento máximo del 49% y un exceso enantiomérico del 98,5% para el **(3R, 5R)**-alcohol **59** cuando se utilizó tolueno en presencia de acetato de isopropenilo como donador de acilo. En metil isobutil cetona, a una concentración de sustrato de 50 g/L, se obtuvo un rendimiento máximo de reacción de un 46% y un exceso enantiomérico del 96% para el producto **59**.

El proceso enzimático fue escalado (proceso de la compañía Bristol-Myers Squibb) hasta los 640 L, usando lipasa inmovilizada PS-30 en un reactor tipo *batch* (tanque agitado discontinuo). Así, de la mezcla de reacción se aisló el **(3R, 5R)**-alcohol **59** con un rendimiento total del 35% y 98,5% de exceso enantiomérico, con una pureza del 99,5%. Asimismo, el **(3S, 5R)**-acetato **60** producido por este proceso fue enzimáticamente hidrolizado por la lipasa PS-30 en un sistema bifásico para preparar el correspondiente enantiómero **(3S, 5R)-59**.

### 5.3. Preparación enzimática del éster dietílico del ácido S-[1-(acetoxil)-4-(3-fenil)butil] fosfónico

La escualeno sintasa es la primera enzima específica en la biosíntesis del colesterol, y cataliza la condensación cabeza-cabeza de dos moléculas de pirofosfato de farnesilo (FPP) para formar escualeno. Esta enzima se ha implicado en la transformación de FPP a pirofosfato de preescualeno (PPP). En este sentido, indicaremos que los análogos de FPP son una clase importante de inhibidores de la escualeno sintasa (54). No obstante esta clase de compuestos carecen de especificidad hacia esta enzima, por lo que forman un grupo de potenciales inhibidores de otras transferasas dependientes de FPP, tales como la geranio-geranil pirofosfato sintasa. Para incrementar la especificidad de la enzima, se han sintetizado análogos de PPP y otros inhibidores basados en el mecanismo de la enzima como el compuesto **62** (Figura 16) (55). En este sentido, el éster dietílico del

ácido S-[1-(acetoxil)-4-(3-fenil)butil] fosfónico **62** es un intermedio quiral clave requerido para la síntesis química total de **65**. La acetilación enantioselectiva del éster dietílico racémico del ácido [1-(hidroxi)-4-(3-fenil)butil] fosfónico **62** se ha llevado a cabo con lipasa de *G. candidum* en tolueno usando acetato de isopropenilo como donador de acilo (56). Se obtuvo un rendimiento del 38% y un exceso enantiomérico del 95% para la obtención del compuesto **64**.



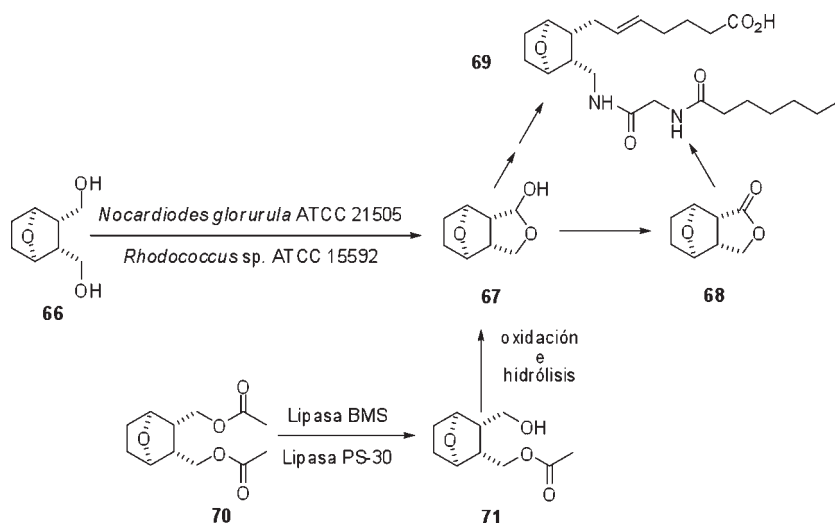
**Figura 16.** Acilación enzimática de un síntón quiral para la síntesis del inhibidor de la escualeno sintasa **65**: acilación enantioselectiva del racémico **62** para obtener el (S)-acetato **64**.

## 6. ANTAGONISTAS DEL TROMBOXANO A2

### 6.1. Preparación enzimática de lactol [3aS-(3aα,4α,7α)-4,7-epoxibencenofuran-1-(3H)-ol

El tromboxano A2 (TxA2) es una potente sustancia vasoconstrictora producida en el metabolismo del ácido araquidónico en las plaquetas de la sangre y otros tejidos. La potente actividad antiagregatoria y vasodilatadora del TxA2 juega un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis, y contribuye a la patogénesis de una gran variedad de desórdenes vasculares.

Estudios para limitar el efecto del TxA2 se han basado en inhibir su síntesis o bloquear su acción en los lugares de unión al receptor por medio de antagonistas (57, 58). El lactol [3a*S*-(3aα,4α,7α, 7aα)]-4,7-epoxibencenofuran-1-(3*H*)-ol **67** (Figura 17) o la correspondiente lactona quiral **68** son los intermedios clave en la síntesis total del ácido [1*S*-[1, 2''(Z), 3'', 4-[[7-3[[[1-oxoheptil)-amino]acetil]metil]-7-oxabicyclo-[2,2,1] hept-2-il]-5-heptanóico **69**, un nuevo agente cardiovascular de uso potencial en el tratamiento de enfermedades tromboticas (59).



**Figura 17.** Síntesis de los sintones quirales para la obtención del compuesto **69**, antagonista del tromboxano A2.

La oxidación enantioselectiva del (exo,exo)-7-oxabicyclo [2,2,1] heptano-2,3-dimetanol **66** al correspondiente (*S*)-lactol **67** y (*S*)-lactona **68** se ha llevado a cabo utilizando células de *Nocardia globerula* ATCC 21505 y *Rhodococcus* sp. ATCC15592 (60). La lactona **68** fue obtenida con un rendimiento máximo del 70% y un e.e. del 96%, respectivamente, usando una suspensión de células de *Nocardia globerula* ATCC 21505. Para el lactol **67** y la lactona **68** se obtuvieron unos rendimientos de reacción completos del 46% (lactol y lactona combinado) y 96,7% y 98,4% de e.e., respectivamente, usando suspensiones de células de *Rhodococcus* sp ATCC15592.

Por otra parte, la hidrólisis enantioselectiva del diacetato (*exo,exo*)-7-oxabicyclo [2,2,1] heptano-2,3-dimetanol **70** al correspondiente éster *S*-monoacetato **71** se ha realizado utilizando lipasa PS-30 de *P. cepacea* (61). Se obtuvo un rendimiento máximo de reacción del 75% y un e.e. mayor del 99% cuando la reacción se realizó en un sistema bifásico empleando un 10% de tolueno. La lipasa PS-30 fue inmovilizada sobre polipropileno Accurel (PP) y la enzima inmovilizada fue reutilizada durante cinco ciclos sin pérdida de actividad, productividad o e.e. del producto **71**. El proceso de reacción fue escalado hasta los 80 L (400 g de sustrato) y el producto **71** fue aislado con un rendimiento de 80% con un 99,3% de e.e. El *S*-monoacetato fue oxidado a su correspondiente aldehído, que fue hidrolizado al (*S*)-lactol **67** usado posteriormente en la síntesis quimio-enzimática del antagonista del tromboxano A2 **69**.

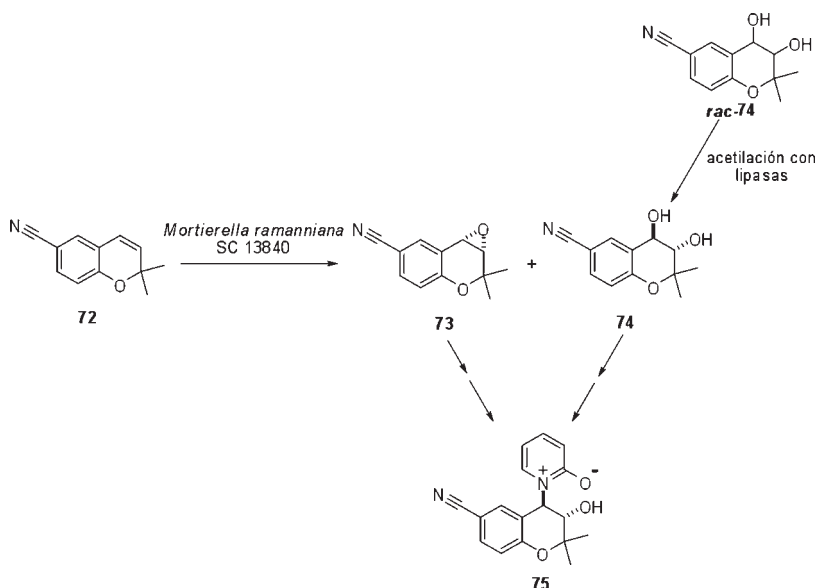
## 7. ACTIVADORES DE LA APERTURA DE LOS CANALES DE POTASIO

### 7.1. Preparación de epóxidos quirales y dioles por oxigenación microbiana

Es bien sabido que los canales de potasio juegan un importante papel en la excitabilidad neuronal y un papel crítico en la función eléctrica básica y mecánica de una amplia variedad de tejidos, incluyendo el tejido liso y el músculo cardíaco (62, 63). En este sentido, se ha desarrollado una nueva clase de compuestos altamente específicos que abren o bloquean los canales de K (64). Por lo que se refiere al primer tipo, se han sintetizado activadores de la apertura de los canales de K basados en estructuras del tipo *trans*-4-amino-3,4-dihidro-2,3-dimetil-2*H*-1-benzopirano-3-oles monosustituídos (**75**, Figura 18) (65, 66). El epóxido quiral **73** y el diol **74** son potenciales intermedios para la síntesis de **75**, a través de la oxigenación microbiana enantioselectiva del 6-ciano-2,2-dimetil-2*H*-1-benzopirano **72** al correspondiente epóxido quiral **73** y el diol **74** (67). Por tanto, nos encontramos con unas actividades monooxigenasas y epóxido-hidrolasas presentes en las células de *M. ramaniana* SC 13840 y *Corynebacterium* sp. SC 13876, que condujeron a rendimientos máximos de 67,5 y 32% y excesos enantioméricos del 96 y 89%, respectivamente,



para el (+) *trans* diol **74**. Las células de *Corynebacterium* sp. SC 13876 también produjeron el epóxido quiral **73** con un rendimiento máximo del 17% y un 88% de e.e.



**Figura 18.** Preparación de los sintones quirales para la obtención del compuesto **75**, activante de los canales de potasio.

Un proceso en una sola etapa (fermentación/epoxidación) para la biotransformación de **72** fue desarrollado usando *M. ramaniana* SC 13840. En un fermentador de 25 L, el (+) *trans* diol **74** fue obtenido con un rendimiento del 61% y un e.e. del 92,5%. Por otra parte, en un proceso en dos etapas usando una suspensión de células (10% p/v, células húmedas) de *M. ramaniana* SC 13840, el (+) *trans* diol **74** fue obtenido con un rendimiento máximo del 76% con un e.e. del 96% cuando la reacción fue realizada en un fermentador de 5L Bioflo. Se añadió glucosa para regenerar el NADH requerido para esta reacción, y de la mezcla de reacción, el (+) *trans* diol **74** fue aislado con un rendimiento completo de 65% y 97% de e.e. (98% de pureza química).

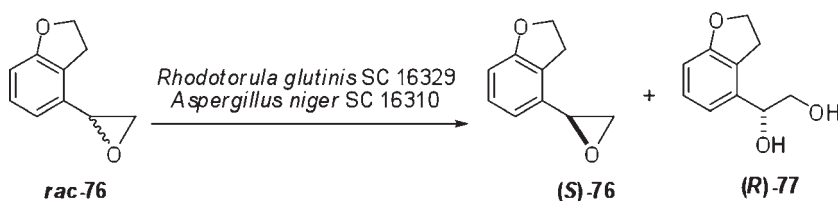
En otra aproximación biocatalizada por hidrolasas, para llevar a cabo la resolución enzimática, el (+) *trans* diol **74** fue preparado por

acetilación enantioselectiva del diol racémico **rac-74** con las lipasas de *C. rugosa* y *P. cepacea* (68). Ambas enzimas catalizaron la acetilación del enantiómero no deseado del diol racémico para dar el producto monoacetilado y el (+) *trans* diol **74**. Un rendimiento de reacción del 40% y un e.e. mayor del 90% fueron descritos con ambas lipasas.

## 8. RECEPTORES AGONISTAS DE MELATONINA

### 8.1. Hidrólisis enzimática enantioselectiva de 1-[2',3'-dihidro benzo[b]furan-4'-il]-1,2-oxirano

Las epóxido hidrolasas son enzimas que catalizan la hidrólisis enantioselectiva de un epóxido al correspondiente diol enantioméricamente enriquecido, quedando el enantiómero del epóxido que no reacciona enriquecido en una configuración contraria a la del diol (69, 70). El (*S*)-epóxido **76** (Figura 19) es un intermedio clave en la síntesis de un gran número de candidatos (71).



**Figura 19.** Preparación de los sintones quirales para la obtención de un agonista del receptor de melatonina: hidrólisis enantioselectiva de un epóxido racémico **rac-76** al correspondiente (*R*)-diol **77**.

Así, se llevó a cabo la hidrólisis enantioespecífica del racémico 1-[2',3'-dihidro benzo[b]furan-4'-il]-1,2-oxirano **rac-76** al correspondiente diol **77**, obteniendo a su vez el (*S*)-epóxido que no reaccionó (**S**)-**76** (72). Dos cepas de *A. niger* (SC 16310 y SC 16311) y *Rhodotorula glutinis* SC 16293 hidrolizaron selectivamente el (*R*)-epóxido, sin tocar el (*S*)-epóxido **76** con un e.e. mayor del 95% y un rendimiento del 45%. Por otra parte se probaron distintos disolventes al 10% en orden a mejorar la enantioselección y el rendimiento. Los

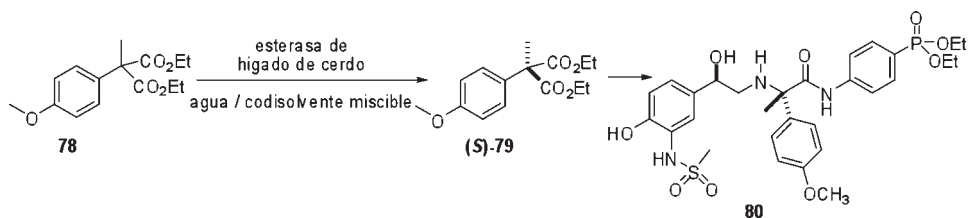
disolventes tuvieron efectos significativos sobre el grado de hidrólisis y el e.e. del (*S*)-epóxido **76** que no reaccionó. No obstante, la mayoría de los disolventes dieron un menor e.e. del producto y menor tasa de reacción que las reacciones sin ningún disolvente, excepto el *terc*butil metil éter (MTBE), que condujo a un rendimiento del 45% y un e.e. del 99,9% para (*S*)-epóxido (**S**)-**76**.

## 9. AGONISTAS DEL RECEPTOR $\beta$ -3

Los receptores adrenérgicos  $\beta$ -3 se encuentran sobre las superficies de las células de los adipocitos blancos y marrones y son responsables de la lipólisis, termogénesis y relajación del músculo liso del intestino (73). Consecuentemente, distintos grupos de investigación se encuentran desarrollando agonistas  $\beta$ -3 selectivos para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, diabetes tipo II y obesidad (74, 75). Se ha comprobado que fueron necesarias tres síntesis biocatalíticas diferentes de intermedios quirales para la síntesis total del receptor agonista  $\beta$ -3 **80** (Figura 20) (76) aunque sólo describiremos aquí la realizada por la esterasa de hígado de cerdo.

### 9.1. Hidrólisis enantioselectiva del 2-metil-2(4-metoxifenil)succinato de dietilo

El monoéster (*S*)-**79** (Figura 20) es un intermedio clave para la síntesis del receptor agonista  $\beta$ -3 **80**. La hidrólisis enzimática enantioselectiva del diéster **78** al buscado monoéster (*S*)-**79** se ha llevado a cabo utilizando esterasa de hígado de cerdo (76).



**Figura 20.** Hidrólisis enzimática enantioselectiva del 2-metil-2(4-metoxifenil)succinato de dietilo **78** al monoéster (*S*)-**79**.

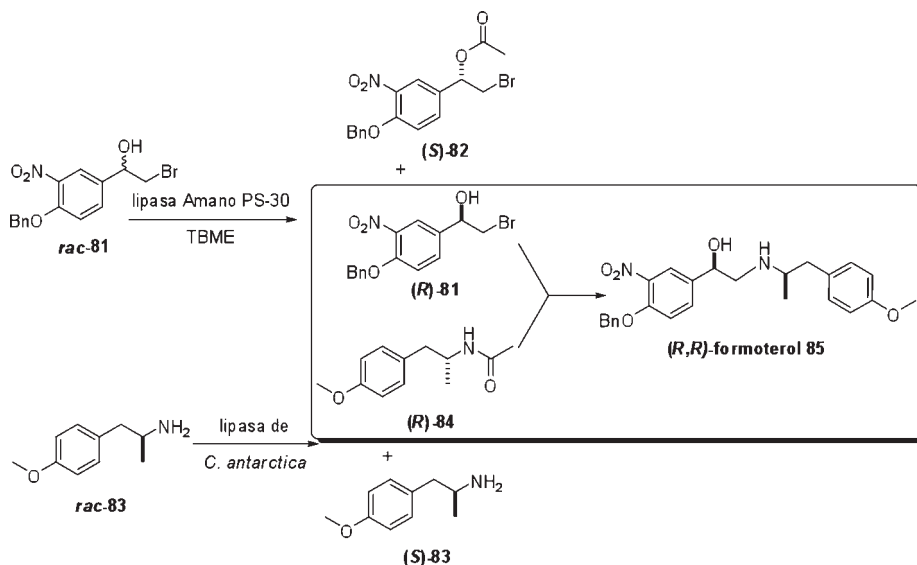
Los rendimientos de reacción y e.e. del monoéster **(S)-79** fueron dependientes del disolvente utilizado. Así, se obtuvieron altos valores de exceso enantiomérico (> 91%) con metanol, etanol, y tolueno como co-disolventes. Más concretamente, el etanol permitió el rendimiento más alto (96,7%) y el mayor e.e. (96%) para el monoéster buscado **(S)-79**. Asimismo, se observó que el e.e. de este compuesto se incrementó al disminuir la temperatura de 25 a 10° C, cuando la biotransformación se realizó en un sistema bifásico usando etanol como cosolvente. Una hidrólisis a escala semipreparativa de 30 g se llevó a cabo usando 10% de etanol como codisolvente en una mezcla de reacción de 3L (pH 7,2) a 10° C durante 11 horas. Se obtuvo un rendimiento de 96% y un e.e. del 96,9 %.

## 10. AGONISTAS DEL RECEPTOR $\beta$ -2

### 10.1. Acilación enzimática enantioselectiva

El formoterol **85** (Figura 21) es un potente agonista de los receptores  $\beta$ -2, y se comercializa como una mezcla diastereoisomérica a pesar de la variada eficacia de su eutómero. En efecto, la preparación del *(R,R)*-estereoisómero se consiguió por un proceso de resolución enzimática (77).

La *(R)*-bromohidrina **(R)-81** se preparó por una acilación enzimática a partir de un alcohol racémico **81** para formar el producto acetilado **(S)-82** y el producto deseado que no reaccionó **(R)-81** (rendimiento del 46%), usando una lipasa PS-30 de *P. cepacea*. Por su parte, la resolución de la amina *rac*-**83** se consiguió por acilación enzimática, que condujo al producto deseado **(R)-84** y un producto que no reaccionó **(S)-83** usando una lipasa de *Candida antarctica*. El rendimiento total de la reacción fue de tan sólo un 11% con un e.e. del 96%, pero cabe resaltar que la adición de 0,15 equivalentes de trietilamina llevó a un 42% de conversión y un 94% de e.e. en tan sólo cuatro horas. La hidrólisis y posterior purificación cromatográfica de **(R)-84** proporcionó la amina libre con un rendimiento del 21% y un e.e. del 94%. Seguidamente, se llevó a cabo el acoplamiento de los dos intermedios quirales dando lugar al *(R,R)*-formoterol.



**Figura 21.** Síntesis enzimática de los sintones quirales **(R)-81** y **(R)-84** necesarios para la obtención del **(R,R)-formoterol 85**.

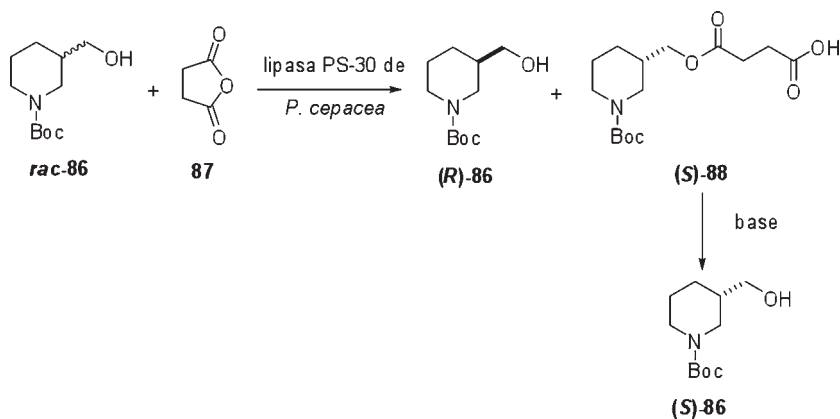
## 11. INHIBIDORES DE LA TRIPTASA

### 11.1. Preparación enzimática del S-N.(tert-butoxicarbonil)-3-hidroximetilpiperidina

La S-N(tert-butoxicarbonil)-3-hidroximetilpiperidina **(S)-86** (Figura 22) es un intermedio clave en la síntesis de un inhibidor muy potente de la triptasa (78). Dicho compuesto se obtuvo por cristalización fraccionada de la correspondiente sal distereosimétrica con el L(-)-tartrato de dibenzoilo, seguida de una hidrólisis y esterificación (79). La lipasa de *P. cepacea* resultó ser la mejor enzima para llevar a cabo la resolución estereoespecífica de la (rac)-N-(tert-butoxicarbonil)-3-hidroximetilpiperidina **rac-86**.

El compuesto **(S)-86** se obtuvo con un rendimiento del 16% y un e.e. mayor al 95% por hidrólisis del (R,S)-acetato catalizado por la lipasa PS de *P. cepacea*. Dicha lipasa también catalizó la esterificación del (R,S)-N-(tert-butoxicarbonil)-3-hidroximetilpiperidina **rac-86** con anhídrido succínico **87** dando el compuesto **(R)-86** y el

éster hemisuccínico **(S)**-86, el cual puede ser fácilmente separado del anterior e hidrolizado en medio básico para rendir **(S)**-86. El rendimiento y el exceso enantiomérico se incrementa mucho repitiendo el proceso. Tras usar el proceso repetido de esterificación/resolución el **(S)**-86 se obtuvo con un rendimiento del 32% y un 98,9 de e.e. (80).



**Figura 22.** Síntesis enzimática del sintón quiral **(S)**-86 necesario para la obtención de inhibidores de la triptasa.

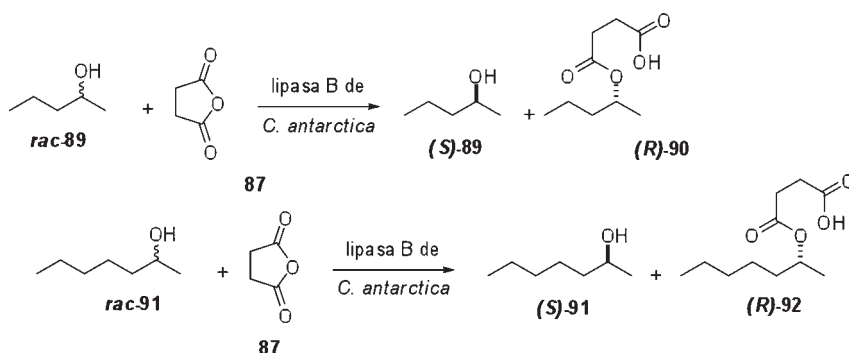
## 12. FÁRMACOS ANTI-ALZHEIMER

### 12.1. Preparación enzimática de **(S)**-2-pentanol y **(S)**-2-heptanol

El **(S)**-2-pentanol **(S)**-89 (Figura 23) es un intermedio en la síntesis de varios potentes fármacos anti-Alzheimer que inhiben la liberación del péptido  $\beta$ -amiloide y/o su síntesis (81, 82). La lipasa de *Candida antarctica* se ha descrito como eficaz en la resolución enzimática del 2-pentanol racémico **(rac)**-89 y 2-heptanol **(rac)**-91 (83).

Para dictaminarlo, se hizo un cribado de las lipasas comercialmente disponibles para llevar a cabo la acetilación enantioselectiva del 2-pentanol racémico en hexano y en presencia del acetato de vinilo como donador de acilo. De entre las varias probadas, la lipasa de *Candida antarctica* B dio un rendimiento de reacción del 49% y un 99% de

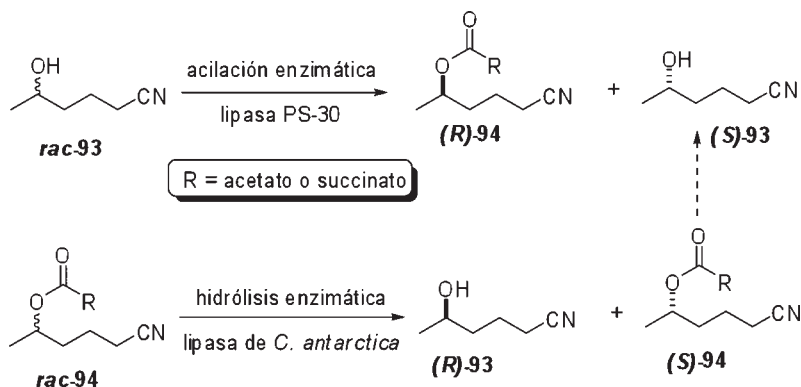
exceso enantiomérico para el (*S*)-2-pentanol (**S**-89) a una concentración de 100 g/l de sustrato. Entre todos los agentes acilantes ensayados, se eligió el anhídrido succínico **87**, debido a la facilidad para separarlo del (*S*)-2-pentanol al final de la reacción. Usando 0,68 moles de anhídrido succínico y 13 g de lipasa B por kilo de 2-pentanol racémico, se obtuvo un rendimiento máximo de reacción de 43% y un exceso enantiomérico superior al 98% para el (*S*)-2-pentanol, aislado con un rendimiento total del 38%. La resolución del 2-heptanol (*rac*)-**91** fue realizada utilizando lipasa B en condiciones similares para dar un rendimiento máximo del 44% y un e.e. > del 99% de (*S*)-2-pentanol (**S**-91), aislado con un rendimiento total del 40%.



**Figura 23.** Síntesis enzimática para la obtención de intermedios en la síntesis de fármacos antialzheimer: resolución enzimática de *rac*-2-pentanol (**rac**-89) y *rac*-2-heptanol (**rac**-90) a través de acilación enantioselectiva.

## 12.2. Preparación enzimática de (*S*)-5-hidroxi hexanonitrilo

El (*S*)-5-hidroxi hexanonitrilo (**S**-93, Figura 24, es un intermedio quiral clave en la síntesis de fármacos. La resolución enzimática del producto racémico 5-hidroxi hexanonitrilo (*rac*)-**93** se llevó a cabo por succinilación utilizando lipasa inmovilizada PS-30 como biocatalizador para obtener (**S**-93 con un rendimiento del 35%. El (*S*)-5-acetoxi hexanonitrilo (**S**-94) fue preparado por hidrólisis enzimática enantioselectiva del producto racémico 5-acetoxi hexanonitrilo (*rac*)-**94** utilizando lipasa de *C. antarctica* obteniendo un rendimiento del 42% y un exceso enantiomérico superior al 99% (84).

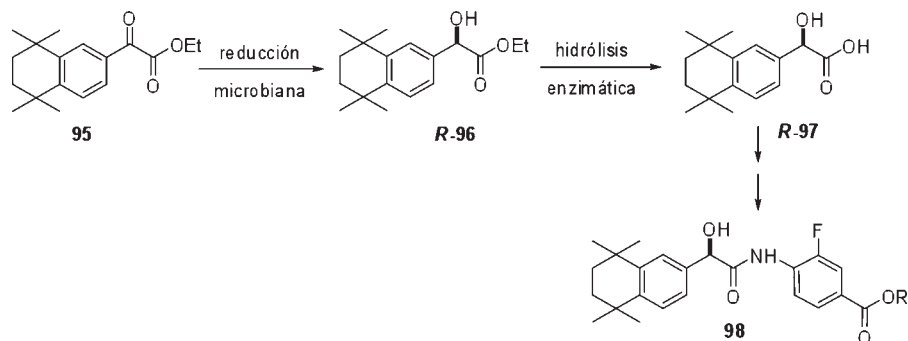


**Figura 24.** Síntesis enzimática para la obtención de intermedios en la síntesis de fármacos antialzheimer: resolución enzimática de 5-hidroxi hexanonitrilo (**rac-93**) y 5-acetoxi hexanonitrilo (**rac-94**) a través de acilación e hidrólisis enantioselectiva, respectivamente.

Un gran número de estudios han demostrado que los derivados de la vitamina A (retinoicos) son esenciales para el crecimiento normal, visión, homeostasis de los tejidos y reproducción (85). El ácido retinoico y sus análogos naturales y sintéticos ejercen una gran variedad de efectos biológicos por unión o activación de un receptor específico o conjunto de receptores (86). Estos compuestos han mostrado ejercer un efecto sobre el crecimiento celular y la diferenciación, y son fármacos prometedores para el tratamiento de cánceres (87). De estos compuestos, sólo unos pocos tienen uso clínico para el tratamiento de enfermedades dermatológicas como el acné y la psoriasis (88), o para su uso en dermatología y cáncer (89). En este sentido, el (*R*)-2-hidroxi-(1',2',3',4'-tetrahidro-1',1',4',4'-tetrametil-6-naftalenil) acetato de etilo **R-96** (Figura 24) y el correspondiente ácido **R-97** fueron preparados como intermedios en la síntesis del agonista del receptor gamma específico del ácido retinóico **98** (90).

El producto **R-96** fue obtenido por reducción enantioselectiva, a partir del oxoéster **95**. Al final de la reacción, el hidroxiéster **R-96** fue adsorbido sobre resina XAD-16 y después de la filtración fue recuperado en un 94% de rendimiento de la resina mediante extracción con acetonitrilo. El hidroxiéster **R-96** así recuperado fue tratado con Chirazyme L-2 o esterasa de hígado de cerdo (pig-liver esterase) para, en una hidrólisis muy suave, convertirlo al correspondiente (*R*)-hidroxiá-





**Figura 25.** Obtención del hidroxiácido **R-97** para su posterior transformación en el compuesto **98**, agonista del receptor gamma específico del ácido retinoico.

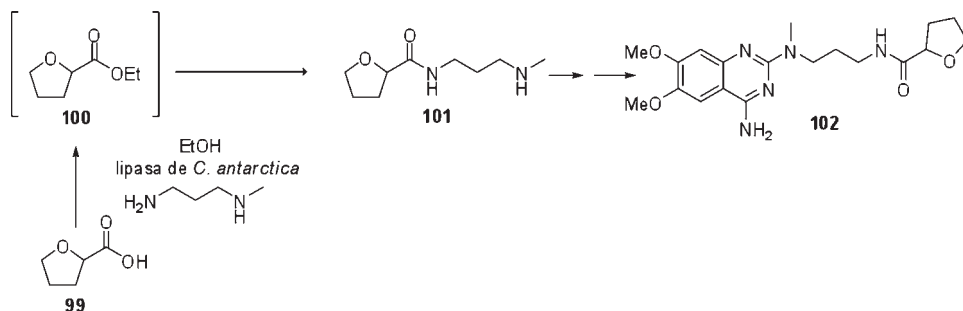
cido **R-97** con rendimiento cuantitativo, el cual posteriormente condujo al producto desado **98**.

### 13. ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR $\alpha$ 1-ADRENÉRGICO

#### 13.1. Esterificación enzimática y amonolisis

El Afuzosin (**102**, Figura 26) es un derivado de quinazolina que actúa como un potente y selectivo antagonista del receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico produciendo la contracción de la próstata y de la cápsula prostática, y reduciendo los síntomas asociados con la hipertrofia prostática benigna (91). Se han propuesto varias rutas para la síntesis química del afuzosin, con tetrahydro-*N*-[3-(metilamino)propil]-2-furanocarboxamida **101** como intermedio (92). A su vez, la síntesis de esta amida partir del correspondiente ácido 2-tetrahidrofurónico **99** es dificultosa, pues utiliza reactivos muy tóxicos así como condiciones muy drásticas (93). Dado que se han descrito reacciones de amonolisis de ésteres catalizadas por lipasas usando amoniaco o aminas como nucleófilos (94), y estas son muy suaves, se aplicó dicha estrategia.

En este sentido, se ha descrito el proceso catalizado por una lipasa para la conversión en un solo paso de ácidos carboxílicos en las amidas sustituidas a través de la formación *in situ* del éster etílico y la posterior amonolisis (95). El proceso fue optimizado para la prepara-



**Figura 26.** Obtención del intermedio tetrahidro-N-[3-(metilamino)propil]-2-furanocarboxamida por esterificación y aminólisis *in situ* del ácido **99**. Síntesis de precursores del afuzosin **102**.

ción de **101** y conllevó el tratamiento del correspondiente ácido carboxílico **99** con etanol para preparar el éster **100** en presencia de la lipasa de *C. antarctica* inmovilizada por adición de N-metil-1,3-propanodiamina. La amida **101** fue así obtenida con un rendimiento del 72%, y la enzima inmovilizada fue utilizada durante ocho ciclos en este proceso sin pérdida considerable de actividad.

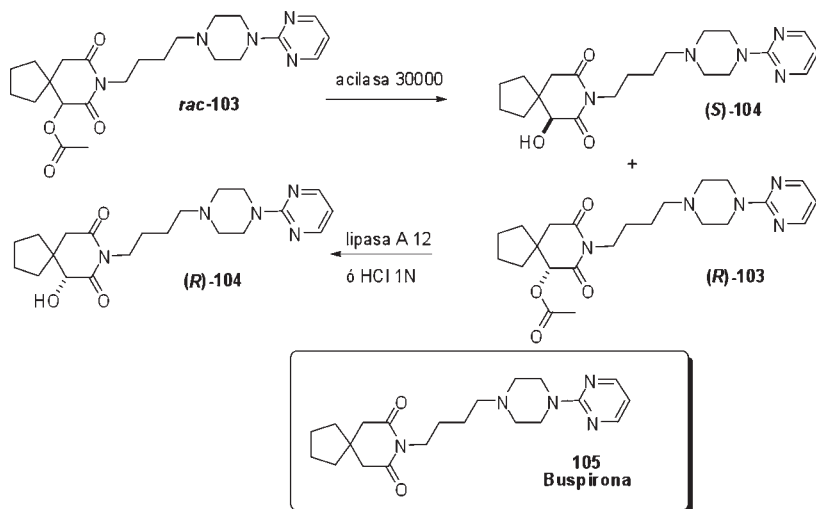
El proceso se ha demostrado que es general y puede ser aplicado a ácidos de cadena abierta, ciclos, amino, dicarboxílicos e insaturados (95). La enzima muestra un comportamiento regioselectivo en relación a grupos amino primarios y secundarios.

## 14. FÁRMACOS ANSIOLÍTICOS

### 14.1. Preparación enzimática de 6-hidroxibuspirona

La Buspirona (Buspar **105**, Figura 27) es un fármaco usado en el tratamiento de la ansiedad y depresión que produce su efecto por unión al receptor de serotonina 5HT1A (96). Principalmente como resultado de las reacciones de hidroxilación, se degrada a varios metabolitos (97) y las concentraciones en sangre vuelven a niveles bajos a las pocas horas de tomar la dosis.

Uno de los metabolitos principales, la 6-hidroxibuspirona, **104**, producida por la acción del citocromo P450 CYP3A4 del hígado, está



**Figura 27.** Preparación enzimática de la (R) y (S)-6-hidroxi buspirona (**(R)-104** y **(S)-104**) por un proceso de resolución cinética.

presente en mayores concentraciones en la sangre en humanos que la propia buspirona. Este metabolito tiene efectos ansiolíticos, lo cual se ha comprobado utilizando como modelo crías de ratas, y se une al receptor humano 5HT<sub>1A</sub> (98). A pesar de que el metabolito tiene sólo una tercera parte de la afinidad de la buspirona por el receptor humano 5HT<sub>1A</sub>, está presente en la sangre humana en concentraciones 30 ó 40 veces mayores que la buspirona, por lo que podría ser responsable de gran parte de la efectividad del fármaco (99). Para el estudio de la 6-hidroxi buspirona como un potencial fármaco ansiolítico, se precisaba la preparación y análisis de los dos enantiómeros por separado, así como el racémico. Los dos enantiómeros **(R)-104** y **(S)-104**, aislados por HPLC quiral, fueron efectivos usando un modelo ansiolítico en ratas (100). Así, mientras que el enantiómero **(R)-104** mostró una unión mas fuerte y específica para el receptor 5HT<sub>1A</sub>, el enantiómero **(S)-104** tenía la ventaja de que era mas fácilmente eliminado de la sangre.

Debido, pues, al distinto comportamiento de ambos isómeros, se ha desarrollado un proceso enzimático para la resolución de la 6-acetoxibuspirona **rac-103**. La L-aminoacilasa de *Aspergillus melleus* (acilasa de Amano 30000) fue usada para hidrolizar 6-acetoxibuspirona

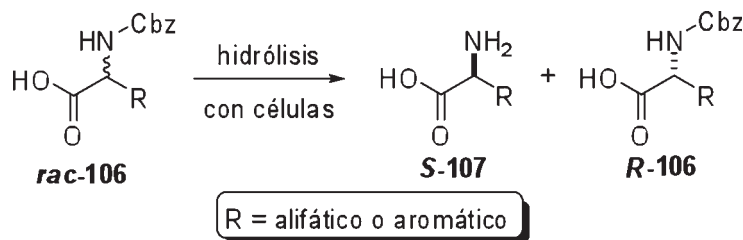
racémica al enantiómero (**S**)-**104** con un 96% de exceso enantimérico y 46% de conversión. Por su parte, el enantiómero remanente (**R**)-**104** fue convertido a (*R*)-6-hidroxibuspirona por hidrólisis ácida con un 84% de e.e. La pureza óptica de ambos enantiómeros podría ser mejorado hasta más del 99% por cristalización como un polimorfo metaestable (101).

## 15. DESPROTECCIÓN ENZIMÁTICA ENANTIOSELECTIVA DE GRUPOS CARBOBENCIOXI

Los grupos amino requieren con frecuencia protección durante las transformaciones sintéticas; al mismo tiempo, los grupos protectores deben ser eliminados. La protección enzimática y desprotección bajo condiciones suaves se ha llevado a cabo previamente. Las penicilin-G amidasa y la ftaloil amidasa se han utilizado para la desprotección enzimática de los grupos fenil acetilo y ftaloilo del correspondiente compuesto amido o imido (102, 103). Además, las acilasas han sido ampliamente usadas en la desprotección enantioselectiva de *N*-acetil-DL-aminoácidos (104), mientras que la desprotección enzimática de *N*-carbamoil *L*-aminoácidos y *N*-carbamoil *D*-aminoácidos ha sido realizada por *L*-carbamoilasas, respectivamente (105, 106).

El grupo carbobenciloxi (Cbz) se usa normalmente para proteger grupos amino e hidroxilos durante la síntesis orgánica. La desprotección química es normalmente realizada por hidrogenación con un catalizador de paladio (107, 108). No obstante, durante la desprotección química, algunos grupos son reactivos (e.g.: dobles enlaces carbono-carbono) o podrían interferir (e.g.: tioles o sulfuros) con las condiciones de hidrogenolisis. Por ello, se han desarrollado procesos de protección enzimática enantioselectiva que pueden ser llevados a cabo bajo condiciones suaves sin dañar otros grupos reactivos de la molécula. Así, en un *screening* de diferentes suelos se aisló e identificó la cepa *S. paucimobilis* SC 16113; este cultivo catalizó la ruptura enantioselectiva de grupos CBz (Figura 28) de varios aminoácidos Cbz-protégidos **rac-106** (109).

Solo los Cbz-*L*-aminoácidos protegidos fueron desprotegidos dando una conversión completa al correspondiente *L*-aminoácido **S-107**. Los Cbz-*D*-aminoácidos dieron un rendimiento menor del 2%. Los



**Figura 28.** Desprotección de aminoácidos N-carboxybenzoilados **rac-106** con un proceso enzimático.

Cbz-aminoácidos racémicos fueron también evaluados como sustratos para la hidrólisis por extractos de células de *S. paucimobilis* SC 16113. Como hemos anticipado, sólo el *L*-enantiómero fue hidrolizado, dando el *L*-aminoácido en un rendimiento mayor del 48% y un e.e. mayor del 99%. Los Cbz-*D*-aminoácidos que no reaccionaron fueron recuperados con un rendimiento mayor del 48% y un e.e. mayor del 98% (109). Esta enzima, de enorme interés por su gran selectividad, ha sido clonada y sobreexpresada en *E. coli* (110).

## 16. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROÍDICOS: ÁCIDOS 2-ARIL PROPIÓNICOS (PROFENOS)

Las enfermedades reumatoides incluyen una serie de procesos tales como artrosis, artritis reumatoide, dolores en columna vertebral, lumbago, etc., y presentan una alta incidencia de bajas laborales. En España, a principios de los noventa, se calculaba que aproximadamente un 25% de la población comprendida entre cuarenta y seis y sesenta años sufría alguna de estas patologías, y el porcentaje se elevaba a cerca de un 30% para trabajadores mayores de sesenta años, con unos altos costes laborales causados por bajas atribuidas a estos procesos (111). Estudios más recientes estiman que, por ejemplo, la artritis reumatoide afecta a aproximadamente al 0,5% de la población española mayor de veinte años (112), y que la artrosis afecta a un porcentaje entre el 15 y el 20% de dicha población (113).

Estos procesos inflamatorios se tratan con diferentes tipos de fármacos, entre los cuales los profenos (ácidos 2-arilpropiónicos, de estructura genérica **108**, Figura 29) presentan una gran importancia.

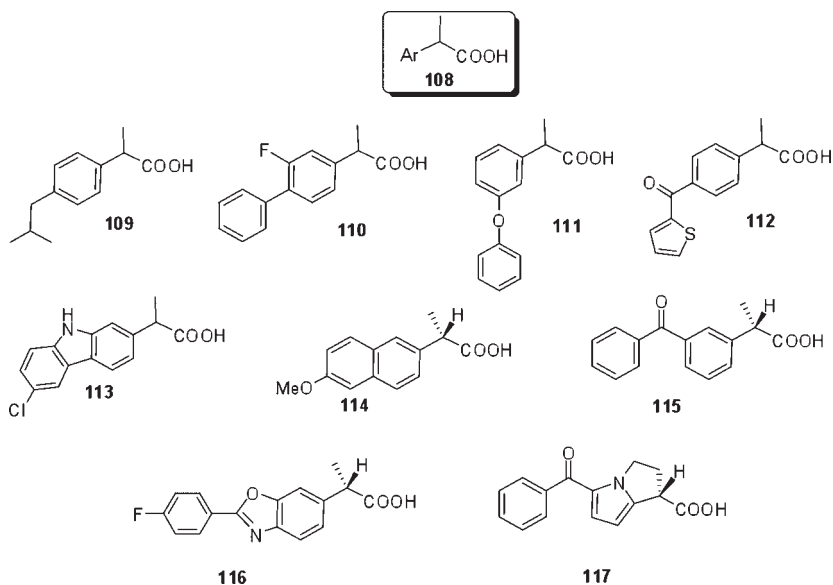


Figura 29.

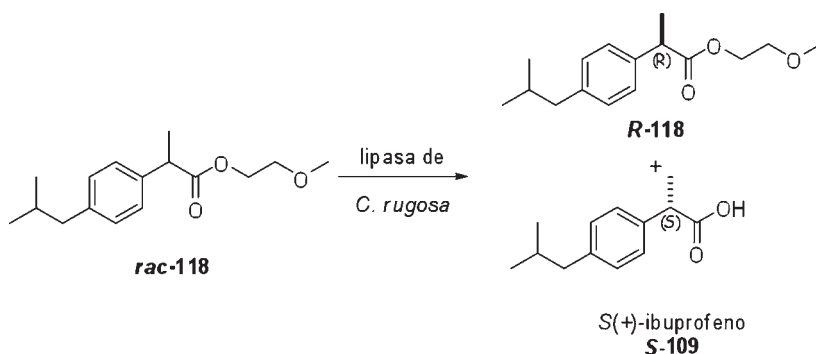
Entre ellos, citaremos el Ibuprofeno **109**, Flurbiprofeno **110**, Fenoprofeno **111**, Suprofeno **112**, Carprofeno **113**, Naproxeno **114**, Dexketoprofeno **115**, Flunoxaprofeno **116** o el Ketorolaco **117** (comercializado como sal con trometamina bajo el nombre de Toradol).

La actividad de estos fármacos está asociada a su capacidad de inhibir la ciclooxygenasa, responsable de la biotransformación del ácido arquidónico hasta prostaglandinas o tromboxanos (ver Apartado 5). Numerosos estudios farmacológicos acerca de la actividad terapéutica de los dos enantiómeros de estos compuestos han demostrado que el isómero *S*(+) no sólo tiene un mayor poder antiinflamatorio [28 veces en el caso del Naproxeno (**114**) o 160 veces para el *S*(+) Ibuprofeno] frente a su antípoda *R*(-) (**115**), el cual esencialmente inactivo como inhibidor de la síntesis de prostaglandinas (**116**), aunque puede tener efecto analgésico por mecanismos diferentes (**117**), sino que también el eutómero *S*(+) alcanza su concentración terapéutica en sangre antes que el racemato (**118**). No obstante, sólo el Naproxeno **114**, Dexketoprofeno **115**, Flunoxaprofeno **116** y el Ketorolaco **117** se venden como enantiómeros puros, mientras que el más vendido de todos, el Ibuprofeno **109**, se comercializa como racémico.

De entre las diferentes metodologías descritas para la obtención enantioselectiva del eutómero *S* de estos compuestos, la utilización de hidrolasas que catalicen, bien la hidrólisis enantioselectiva de derivados racémicos de los profenos, bien la esterificación enantioselectiva de los mismos, es una interesante alternativa. De entre los múltiples ejemplos que están descritos en la bibliografía (para una revisión, ver referencia 118), seleccionaremos alguno de los más destacados.

### 16.1. Síntesis de *S*(+)-Ibuprofeno

La compañía norteamericana Sepracor ha desarrollado un proceso industrial para la obtención del eutómero *S*(+)-Ibuprofeno **S-109**, partiendo de una mezcla racémica del correspondiente éster metoxietílico *rac*-**118** (Figura 30), catalizado por la lipasa de *C. rugosa* inmovilizada en los poros de un reactor de membrana.



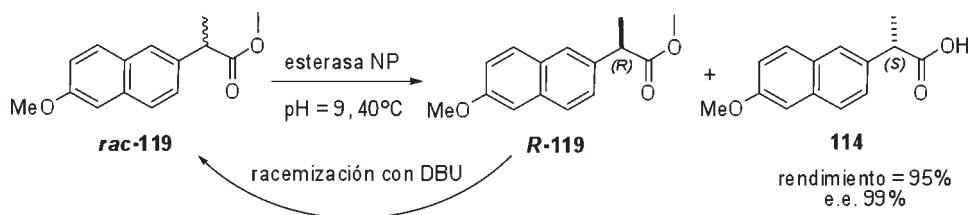
**Figura 30.** Obtención del *S*(+)-ibuprofeno **S-109** por hidrólisis del éster racémico *rac*-**118**.

La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 20° C, y a pH = 5, puesto que, aunque la lipasa muestra actividad en un amplio intervalo de valores de pH, se necesita un medio ácido para que disminuya la solubilidad del Ibuprofeno, puesto que la enzima se inhibe por exceso de producto. El principal inconveniente del proceso, la baja solubilidad de los productos en medio acuoso (por debajo de 1 mM para el *rac*-**118**) que implicaría operar con reactores de gran volumen se elimina trabajando en un reactor de fibra hueca, donde la lipasa está

atrapada no covalentemente en los poros de una membrana que separa un sistema bifásico agua-disolvente orgánico. Así, el sustrato **rac-118** se disuelve en la fase orgánica, y se circula por el exterior de la membrana, donde es convertido por la enzima y el correspondiente ácido se extrae a la fase acuosa. Posteriormente, un segundo reactor de membrana, fijado a un pH alto, permite la separación del producto **S-109** del enantiómero del éster que no ha reaccionado, **R-118**, el cual puede recircularse, lo que permite alcanzar altas productividades volumétricas (119).

## 16.2. Síntesis de S(+)-Naproxeno

Siguiendo una estrategia semejante a la descrita en el apartado anterior, la obtención del S-Naproxeno **114** se ha descrito mediante una hidrólisis enantioselectiva del correspondiente éster metílico racémico **rac-119** (Figura 31). La enzima empleada fue la esterasa NO, una carboxilesterasa recombinante, la cual, acoplada a un proceso de racemización del éster no reconocido (**R-119**) catalizado por una base permite obtener unos excelentes resultados tanto de rendimiento como de pureza óptica (120).



**Figura 31.** Obtención del S-Naproxeno **114** por hidrólisis del éster racémico **rac-119**.

## 17. CONCLUSIONES

De todos los ejemplos indicados en el presente trabajo queda manifiestamente demostrado el gran potencial que representa el uso de las biotransformaciones en la obtención de fármacos o de intermedios homocirales, máxime considerando que la revisión aquí planteada



no pretende ser exhaustiva, pues solamente se han comentado (y no todos, obviamente) ejemplos en los cuales se encuentran implicadas las hidrolasas. Existen una gran multitud de otros casos en los cuales son otras enzimas (oxidorreductasas, transferasas, liasas...) las responsables de la obtención de los compuestos de interés terapéutico, por lo que lo aquí mostrado no es sino la punta de un iceberg que debe emerger de manera indudable en los próximos años. En efecto, cuando muchas de las industrias farmacéuticas deban adecuar sus procesos a normativas medioambientalmente menos contaminantes, sin duda volverán sus ojos hacia los procesos biocatalizados, los cuales permitirán un desarrollo mucho más sostenible.

## 18. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Real Academia Nacional de Farmacia la concesión del premio Juan Abelló otorgado en la edición de 2008 de su concurso científico.

## 19. BIBLIOGRAFÍA

1. Bornscheuer, U. T. & Kazlauskas, R. J. (1999) *Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotransformations*. Wiley-VCH.
2. Patel, R. N. (2000) *Stereoselective Biocatalysis*. Dekker.
3. Drauz, K. & Waldmann, H. (2002) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Vols. 1-3, 2nd edn), Wiley-VCH.
4. Bommarius, A. S. & Riebel, B. R. (2004) *Biocatalysis* (Vol. 1), Wiley-VCH.
5. Faber, K. (2004) *Biotransformations in Organic Chemistry* (5th ed.). Springer.
6. Cao, L. (2005) *Carrier-bound Immobilized Enzymes*. Wiley-VCH.
7. Buchholtz, K., et al. (2005) *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Wiley-VCH.
8. Liese, A.; Seelbach, K. & Wandrey, C. (eds.) (2006) *Industrial Biotransformations*, 2.<sup>a</sup> ed. Wiley-VCH.
9. Schmid, A., et al. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*. 409: 258-268.
10. Schoemaker, H. E., et al. (2003) Dispelling the myths - biocatalysis in industrial synthesis. *Science*. 299: 1694-1697.
11. Rouchi, M. A. (2002) Chiral roundup. *Chem. Eng. News*. 80: 43-50.
12. Caldwell, J. (1999) Through the looking glass in chiral drug development. *Modern Drug Discov*. 2: 51-60.
13. Eichelbaum, M., Testa, B. & Somogyi, A. (eds.) (2002) *Stereochemical Aspects of Drug Action*, Springer.

14. Ariens, E. J. (1984) Stereochemistry: a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26: 663-668.
15. Eichelbaum, M. & Gross, A. S. (1996) Stereochemical aspects of drug action and disposition. *Adv. Drug Res.* 28: 1-64.
16. Caldwell, J. & Leonard, B. E. (2001) The enantiomer debate: realising the potential of enantiomers in pharmacology. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 16 (Suppl. 2): S65-S107.
17. Stinson, S. C. (2001) Chiral chemistry. *Chem. Eng. News.* 79: 45-56.
18. Agranat, I.; Caner, H. & Caldwell, J. (2002) Putting Chirality To Work: The Strategy of Chiral Switches. *Nature Reviews Drug Discovery.* 1: 753-768.
19. Wrotnowski, C. (1997) Unexpected niche applications for industrial enzymes drives market growth. *Gen. Eng. News.* 1: 14-30.
20. Kazlauskas, R. J. (2005) Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr. Op. Chem. Biol.* 9: 195-201.
21. Ireland, C., *et al.* (1997) Lobucavir: antiviral. *Drugs Future.* 22: 359.
22. Hanson, R., *et al.* (2000) Regioselective enzymatic aminoacylation of lobucavir to give an intermediate for lobucavir prodrug. *Bioorg. Med. Chem.* 8: 2681.
23. Zhang, J., *et al.* (1995) Bioconversion of indene to trans-2S, 1S-bromoindanol and 1S,2R-indene oxide by a bromoperoxidase/dehydrogenase preparation from *Curvularia protuberata* MF5400. *J. Ferment. Bioeng.* 80: 244.
24. Holton, R., *et al.* (1995) Semisynthesis of taxol and taxotere, in *Taxol Science and Application*, Suffness, M., Ed., CRC Press, New York.
25. Baldini, E., *et al.* (2004) Multicenter randomized phase III trial of Epirubicin plus Paclitaxel vs. Epirubicin followed by Paclitaxel in metastatic breast cancer patients: focus on cardiac safety. *Br. J. Cancer.* 91: 45.
26. Patel, R. N. (1995) Tour de paclitaxel: biocatalysis for semisynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.* 98: 361.
27. Patel, R. N., *et al.* (1994) Enzymic preparation of (3R-cis)-3-(acetyloxy)-4-phenyl-2-azetidinone: a taxol side-chain synthon. *Biotech. Appl Biochem.* 20: 23.
28. Baloglu, E. & Kingston, D. (1999) The taxane diterpenoids. *J. Nat. Prod.* 62: 1068.
29. Rose, W. (2001) Preclinical pharmacology of BMS-275183, an orally active taxane. *Clin. Cancer Res.* 7: 2016.
30. Holton, R.; Nadizadeh, H. & Beidiger, R. (1993) Preparation of substituted taxanes as antitumor agents, Eur. Patent Appl. 17 pp. EP 534708 A1 19930331 CAN 119:49693 AN 1993:449693.
31. Umezawa, H., *et al.* (1981) Structure of an antitumor antibiotic. Spergualin. *J. Antibiot.* 34: 1622.
32. Umeda, Y., *et al.* (1987) Synthesis and antitumor activity of spergualin analogues, III: novel method for synthesis of optically active 15-deoxyspergualin and 15-deoxy-11-O-methylspergualin. *J. Antibiot.* 40: 1316.
33. Patel, R. N.; Banerjee, A. & Szarka, L. J. (1997) Stereoselective acetylation of racemic 7-[N,N'-bis(benziloxycarbonil)-N-(guanidinoheptanoil)]-<sup>o</sup>-hidroxi-glicina. *Tetrahedron Asymmetry.* 8: 1767.

34. Nemoto, K., *et al.* (1987) Effect of 15-deoxyspergualin on graft-v-host disease in mice. *Trans. Proc.* 19(5): 3985.
35. Mahmoudian, M.; Eaddy, J. & 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.* 2: 229-233.
36. Ondetti, M. A. & Cushman, D. W. (1981) Inhibition of rennin-angiotensin system: a new approach of the theory of hypertension. *J. Med. Chem.* 24: 355.
37. Ondetri, M. A., *et al.* (1977) Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science.* 196: 441.
38. Cushman, D. W. & Ondetti, M. A. (1980) Inhibitors of angiotensin-converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem. Pharm.* 29: 1871.
39. Goodhue, C. T. & Schaeffer, J. R. (1971) Preparation of L-(+)- $\beta$ -hydroxybutyric acid by bacterial oxidation of isobutyric acid. *Biotechnol. Bioeng.* 13: 203.
40. Patel, R. N., *et al.* (1992) Stereoselective enzymatic hydrolysis of "[acetylthio]methyl]benzenepropanoic acid and 3-acetylthio-2-methylpropanoic acid. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 16: 34.
41. Patel, R. N., *et al.* (1991) Stereoselective enzymatic esterification of 3-benzoylthio-2-methylpropanoic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 29.
42. Moniot, J. L. (1988) Preparation of N-[2-(mercaptomethyl)propionyl]-L-prolines, U.S. Patent Appl. CN88-100862.
43. Ondetti, M. A.; Miguel, A. & Krapcho, J. (1982) Mercaptoacyl derivatives of substituted prolines, LS. Patent, 4316906.
44. Patel, R. N.; Robison, R. S. & Szarka, L. J. (1990) Stereoselective enzymic hydrolysis of 2-cyclohexyl- and 2-phenyl-1,3-propanediol diacetate in biphasic systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 10.
45. Hanson, R. L., *et al.* (1992) Transformation of N-, -CBZ-L-lysine to CBZ-L-oxylsine using L-amino acid oxidase from *Providencia a1califaciens* and L-2-hydroxy-isocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus confusus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 599.
46. Hulshof, L. A. & Roskam, J. H. (1989) Phenyglycidate stereoisomers, conversion products thereof with e.g. 2-nitrophenol and preparation of diltiazem. European Patent EP0343714. (*Chem. Abstr.* 113, 76603).
47. Matsumae, H.; Furui, M. & Shibatani, T. (1993) Lipase catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride. *J. Ferm. Bioeng.* 75: 93.
48. Matsumae, H.; Furui, M.; Shibatani, T. & Tosa, T. (1994) Production of optically active 3-phenylglycidic acid ester by the lipase from *Serratia marcescens* on a hollow-fiber membrane reactor. *J. Ferment. Bioeng.* 78: 59.
49. Furui, M.; Furutani, T.; Shibatani, T.; Nakamoto, Y., Mori, T. H. (1996) A membrane bioreactor combined with crystallizer for production of optically active (2R,3S)-3-(4-metoxifenil) glycidic acid methyl ester. *J. Ferm. Bioeng.* 81: 21.
50. Fishman, A., *et al.* (2001) Enzymatic resolution as a convenient method for the production of chiral resolved materials on an industrial scale. *Biotechnol. Bioeng.* 74: 256.

51. Sit, S., *et al.* (1990) Synthesis, biological profile, and quantitative structure-activity relationship of a series of novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* 33: 2982.
52. Patel, R. N., *et al.* (1993) Enantioselective microbial reduction of 3,5-dioxo-6-(benzyloxy)hexanoic acid, ethyl ester. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 1014.
53. Patel, R. N., *et al.* (1992) Enantioselective enzymic acetylation of racemic [4-[4",6\$E]]-6-[4,4-bis[4-fluorofenil]3-(1-metil-1H-tetrazol-5-il)-1,3-butadienil] tetrahidro- 4-hidroxi-2H-piren.2.ona. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 56.
54. Steiger, A.; Pyun, H. & Coates, R. (1992) Synthesis and characterization of aza analog inhibitors of squalene and geranylgeranyl diphosphate synthases. *J. Org. Chem.* 57: 3444.
55. Lawrence, M.; Biller, S. & Fryszman, O. (1995) *Preparation of -phosphonosulfinic squalene synthetase inhibitors*. US. Patent 5447922.
56. Patel, R. N., *et al.* (1997) Stereoselective acetylation of 1-(hydroxy)-4-(3 phenyl)butyl]phosphonic acid diethyl ester. *Tetrahedron Asymmetry.* 8: 1055.
57. Nakane, M. (1987) *Preparation and formulation of 7-oxabicycloheptane substituted sulfonamide prostaglandin analog useful in treatment of thrombolic disease*. US. Patent 4,663,336.
58. Ford-Hutchinson, A. W. (1991) Innovations in drug research: inhibitors of thromboxane and leukotrienes. *Clin. Exper. Allergy.* 21: 272.
59. Das, J., *et al.* (1987) Synthesis of optically 7-oxabicyclo [2.2.1]heptanes and assignments of absolute configuration. *Synthesis.* 12: 1100.
60. Patel, R. N., *et al.* (1992) Stereoselective microbial enzymatic oxidation of (exo,exo)-7-oxabicyclo [2,2,1] heptane-2,3-dimethanol to the corresponding chiral lactol and lactone. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 778.
61. Patel, R. N., *et al.* (1992) Stereoselective enzymic hydrolysis of (exo,exo)-7-oxabicyclo[2.2.1] heptane-2.3-dimethanol diacetate ester in a hiphasic system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 180.
62. Edwards, O. & Weston, A. H. (1990) Structure-activity relationships of K<sup>+</sup> channel openers. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 417-422.
63. Robertson, D. W. & Steinberg, M. I. (1989) Potassium channel openers: new biological probes. *Ann. Med. Chem.* 24: 91.
64. Hamilton, T. C. & Weston, A. H. (1989) Cromakalim, nicorandil and pinacidil: novel drugs which open potassium channels in smooth muscle. *Gen. Pharmac.* 20: 1.
65. Ashwood, V. A., *et al.* (1986) Synthesis and antihypertensive activity of 4-(cyclic amido)-2H-1-benzopyrans. *J. Med. Chem.* 29: 2194.
66. Bergmann, R.; Eierniann, V. & Gericke, R. J. (1990) 4-Heterocycloxy-2H-1-benzopyran potassium channel activators. *J. Med. Chem.* 33: 2759.
67. Patel, R. N., *et al.* (1994) Stereoselective epoxidation of 2, 2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-carbonitrile. *Bioorg. Med. Chem.* 2: 535.
68. Patel, R. N., *et al.* (1995) Stereoselective acetylation of 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-carbonitrile. *Tetrahedron Asymmetry.* 6: 123.
69. Archelas, A. & Furstoss, R. (1999) Biocatalytic approaches for the synthesis of enantiopure epoxides. *Top. Curr. Chem.* 200: 159.

70. Mischitz, M., *et al.* (1995) Asymmetric microbial hydrolysis of epoxides. *Tetrahedron Asymmetry*. 6: 1261.
71. Catt, J. D., *et al.* (1999) Preparation of benzofuran and dihydrobenzofuran melatonergic agents. US.5856529, CAN 130:11015.
72. Goswami, A., *et al.* (1999) Stereospecific enzymatic hydrolysis of racemic epoxide: a process for making chiral epoxide. *Tetrahedron Asymmetry*. 10: 3167.
73. Arch, J. R. S. (1997)  $\beta$ -3-adrenoceptors and other putative atypical  $\beta$ -adrenoceptors. *Pharmacol. Rev. Commun.* 9: 141.
74. Bloom, J. D., *et al.* (1989) Disodium (R,R) 5-[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl] amino] propyl]-1,3- benzodioxole-2,2-dicarboxylate: a potent  $\beta$ -adrenergic agonist virtually specific for  $\beta$ -3-receptors. *J. Med. Chem.* 35: 3081.
75. Fisher, L. G., *et al.* (1994) BMS-187257, a potent, selective, and novel heterocyclic  $\beta$ -3 adrenergic receptor agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6: 2253.
76. Patel, R. N., *et al.* (1998) Microbial synthesis of chiral intermediates for  $\beta$ -3-receptor agonists. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1473.
77. Campos, F., *et al.* (2000) An efficient enantioselective synthesis of (R,R)-formoterol, a potent bronchodilator, using lipases. *Tetrahedron. Asymmetry*. 11: 2705.
78. Bisacchi, G. (1999) Preparation of amidino and guanidino azetildinone compounds as tryptase inhibitors. WO 9967215, Al 19991229, CAN 132:64103, AN 1999:819347.
79. Wirz, B. & Walther, W. (1992) Enzymic preparation of chiral 3-(hydroxymethyl)piperidine derivatives. *Tetrahedron Asymmetry*. 3: 1049.
80. Goswami, A., *et al.* (2001) Chemical and enzymatic resolution of (R,S)-N-(tert-butoxycarbonyl-3-hydroxymethyl)piperidine. *Organic Process. R&D.* 5: 415.
81. Schenk, D., *et al.* (2001) Potential treatment opportunities for Alzheimer's disease through inhibition of secretases and A $\beta$  immunization. *J. Mol. Neurosci.* 17: 259.
82. Audia, J., *et al.* Preparation of N-(phenylacetyl)di- and tripeptide derivatives for inhibiting  $\beta$ -amyloid peptide release. PCT Int. Appl., WO 9822494, A2 19980528, CAN 129:41414, 126.
83. Patel, R. N., *et al.* (2000) Enzymatic resolution of racemic secondary alcohols by lipase B from *Candida antarctica*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 1015.
84. Nanduri, V. B., *et al.* (2001) Biochemical approaches to the synthesis of ethyl 5-(S)-hydroxyl hexanoate and 5-(S) hydroxyhexanenitrile. *Enzyme Microb. Technol.* 28 (7&8): 632.
85. Kagechika, H., *et al.* (1988) Retinobenzoic acids, 1: structure-activity relationship of aromatic amides with retinoidal activity. *J. Med. Chem.* 31: 2182.
86. Shudo, K. & Kagechika, H. (1989) Structure-activity relationships of a new series of synthetic retinoids, in Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids. Dawson, M. I. & Okarnura, W. H., Eds. CRC Press, Boca Raton, FL.
87. Moon, R. C. & Itri, L. M. (1984) Retinoids and cancer. *Retinoids*. 2: 327.
88. Kagechika, H., *et al.* (1988) Retinobenzoic acids, 1: structure-activity relationships of aromatic amides with retinoidal activity. *J. Med. Chem.* 31: 2182.
89. Belema, M.; Zusi, F. C. & Tramposch, K. M. (2000) Active enantiomer of RAR '(-)-specific agonist, PCI Int. Appl. WO 0016769 Al 20000330 CAN 132:246379 AN 2000:209902.

90. Patel, R. N., *et al.* (2002) Enantioselective microbial reduction of 2-oxo-2-(1',2',3',4'-tetrahydro-1',1',4',4'-tetramethyl-6'-naphthalenyl)acetic acid and its ethyl ester. *Tetrahedron Asymmetry*. 13: 349.
91. Langer, S. Z. & I-Hicks, P. E. (1984) Alpha-adrenoceptor subtypes in blood vessels: physiology and pharmacology. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6: 547.
92. Manoury, P. M., *et al.* (1986) Synthesis and antihypertensive activity of a series of 4-amino-6,7-dimethoxy-quinazoline derivatives. *J. Med. Chem.* 29: 19.
93. Manoury, P. M.; Binet, J. & Cavero, I. (1982) *Pyridine derivatives and their use in therapeutic*. Eur. Pat. Appl., EP 61379 Al 19820929 CAN 98:89179 AN 1983:89179.
94. Sánchez, V. M.; Rebollo, F. & Gotor, V. (1997) *Candida antarctica* lipase catalyzed resolution of ethyl ( $\pm$ )-3-aminobutyrate. *Tetrahedron Asymmetry*. 8: 37-40.
95. Baldessari, A. & Mangone, C. P. (2001) One-pot biocatalyzed preparation of substituted amides as intermediates of pharmaceuticals. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 11: 335.
96. Jajoo, H. K., *et al.* (1989) Metabolism of the antianxiety drug buspirone in human subjects. *Drug Met. Disposition*. 17(6): 634.
97. Mayol, R. F. (2000) *Buspirone metabolite for the alleviation of anxiety*, Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 484, 161 US 6150365 A 20001121 CAN 133:359250 AN 2000:819478.
98. Yevich, J. P., *et al.* (2003) *Antianxiety composition using BMY 28674, and preparation thereof* US. Pat. Appl. Publ., Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 588,220. U.S. 2003069251 Al 20030410 CAN 138:281 137 AN 2003:282120.
99. Yevich, J. P., *et al.* (2003) *S-6-Hydroxy-buspirone for treatment of anxiety, depression and related disorders*. U.S. Pat. App Publ.
100. Yevich, J. P., *et al.* (2003) *R-6-hydroxybuspirone for the treatment of anxiety, depression, and other psychogenic disorders*. PCT mt. Appl., WO 2003009851 Al 20030206 CAN 138:131155 AN 2003:97305.
101. Hanson, R. L., *et al.* (2005) Preparation of (R)- and (S)-hydroxybuspirone by enzymatic resolution and hydroxylation. *Tetrahedron Asymmetry*. 16(16): 2711.
102. Waldmann, H., *et al.* (1996) Selective enzymic removal of protecting groups: the phenylacetamide as amino protecting group in phosphopeptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 37: 8725.
103. Costello, C. A., *et al.* (1996) Selective deprotection of phthalyl protected amines. *Tetrahedron Lett.* 37: 7469.
104. Bommarius, A. S., *et al.* (1997) *L*-methionine related *L*-amino acids by acylase cleavage of their corresponding *N*-acetyl-*D,L*-derivatives. *Tetrahedron Asymmetry*. 8: 3197.
105. Ogawa, J. & Shimizu, S. (2000) Stereoselective synthesis using hydantoinases and carbamoylases. In *Stereoselective Biocatalysis*. Patel, R. N., Ed. Marcel Dekker, New York.
106. Ogawa, J., *et al.* (1995) Purification and characterization of *N*-carbamoyl-*L*-amino acid amidohydrolase with broad substrate specificity from *Alcaligenes xylosoxidans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 1039.



107. Sajiki, F. I., *et al.* (1998) The formation of a novel Pd/C-ethylenediamine complex catalyst: chemoselective hydrogenation without deprotection of the *O*-benzyl and *N*-Cbz groups. *J. Org. Chem.* 63: 7990.
108. Royer, G. P., *et al.* (1985) Palladium/polyethylenimine catalysts. *J. Mol. Catal.* 31: 1.
109. Patel, R. N., *et al.* (2003) Enantioselective enzymatic cleavage of *N*-benzyloxy-carbonyl groups. *Adv. Synth. Catalysis.* 345: 830.
110. Nanduri, V. B., *et al.* (2004) Cloning and expression of a novel enantioselective *N*-carbonyloxy-cleaving enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 34 (3&4): 304.
111. «Reumatos'90». (1992) *Estudio sociosanitario sobre las enfermedades reumáticas en España*. Pfizer, S. A., Spain.
112. Sociedad Española de Reumatología. *Artritis reumatoide: guía de la enfermedad para el paciente*: [http://www.ser.es/ArchivosDESCARGABLES/Guias\\_Paciente/Guia\\_Artritis.PDF](http://www.ser.es/ArchivosDESCARGABLES/Guias_Paciente/Guia_Artritis.PDF)116.
113. Sociedad Española de Reumatología. *Artrosis: guía de la enfermedad para el paciente*: [http://ww.ser.es/ArchivosDESCARGABLES/Guias\\_Paciente/Guia\\_Artrosis.pdf](http://ww.ser.es/ArchivosDESCARGABLES/Guias_Paciente/Guia_Artrosis.pdf).
114. Roszkowski, A. P., *et al.* (1971) Anti-inflammatory and analgetic properties of *D*-2-(6'-methoxy-2'-naphthyl)-propionic acid (naproxen). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 179: 114-123.
115. Adams, S. S., *et al.* (1976) Pharmacological differences between optical isomers of ibuprofen - evidence for metabolic inversion of (-)-isomer. *J. Pharm. Pharmacol.* 28: 156-157.
116. Caldwell, J., *et al.* (1988) The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylpropionic acids and their biological consequences. *Biochem. Pharmacol.* 37: 105-114.
117. Brune, K., *et al.* (1991) Aspirin-like drugs may block pain independently of prostaglandin synthesis inhibition. *Experientia.* 47: 257-261.
118. Alcántara, A. R., *et al.* (2000) Chemoenzymatic preparation of enantiomerically pure S(+) 2-arylpropionic acids with anti-inflammatory activity. *Stereo-selective Biocatalysis*. (Patel, R. N., ed.) 659-702.
119. McConville, F. X., *et al.* (1990) Enzymatic resolution of ibuprofen in a multiphase membrane reactor. In: *Biocatalysis* (Abramowicz, D. A., ed.) pp. 167-177, van Nostrand, Reinhold, New York.
120. Quax, W. J. & Broekhuinen, C. P. (1994) Development of a new *Bacillus* carboxyl esterase for use in the resolution of chiral drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 425-431.

**\* Información de contacto:**

Dr. José María Sánchez Montero.

Grupo de Biotransformaciones (BTG).

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia.

Universidad Complutense de Madrid.

Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria, 28040 Madrid.

Teléf.: 91 394 18 20. Fax: 91 394 18 22.

E-mail: jsanchez@farm.ucm.es