

**PRZEMYSŁOWE ZASTOSOWANIA LIPAZ
W SYNTYZIE ZWIĄZKÓW O WYSOKIEJ WARTOŚCI
DODANEJ – 85 LAT KATALIZY ENZYMATYCZNEJ
LIPAZAMI. CZĘŚĆ I**

**INDUSTRIAL APPLICATIONS OF LIPASES
IN THE SYNTHESIS OF HIGH ADDED-VALUE
CHEMICALS – 85 YEARS OF LIPASE-BASED
ENZYMATIC CATALYSIS. PART I**

Paweł Borowiecki

*Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny, Instytut Biotechnologii,
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa
e-mail: pawel_borowiecki@onet.eu lub pborowiecki@ch.pw.edu.pl*

*Niniejszą pracę pragnę zadedykować pamięci
Ernesta Aleksandra Syma (1893–1950) – polskiego biochemika,
enzymologa z okazji 85-lecia katalizy enzymatycznej lipazami*

Abstract

Wprowadzenie

1. Procesy katalizowane przez lipazę B z *Candida antarctica* (CAL-B)
2. Procesy katalizowane przez lipazę z *Burkholderia cepacia* (BCL)

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Paweł Borowiecki w roku 2010 ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Uczestnik stażu zagranicznego w zespole Profesora Michela Therisod w Laboratoire de Chimie Bioorganique et Bioinorganique-LCBB Universite PARIS-SUD 11. Od 2010 r. pracownik Zakładu Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych (ZTiBŚL) w Instytucie Biotechnologii, Wydziału Chemicznego PW. Specjalność – synteza i stereochemia biologicznie aktywnych związków heterocyklicznych oraz kataliza enzymatyczna z zastosowaniem lipaz. Zainteresowania naukowe: *biała*

biotechnologia (biotransformacje związków organicznych), chemia medyczna oraz biotechnologia farmaceutyczna.

ABSTRACT

Lipases (EC 3.1.1.3; triacylglycerol acylhydrolases) are the most commonly used enzymes in biotransformations of organic compounds. In living organisms lipases catalyze hydrolysis of higher fatty acid esters of glycerol, thus fulfill an essential function in metabolism of lipids (e.g. fats and oils) and lipoproteins. This year marks 125 years since J.R. Green has identified and described the first lipase isolated from germinated castor-oil beans (*Ricinus communis* L.) in the form of an extract showing hydrolytic properties. Plants, as well as bacteria are able to produce lipases what was reported in 1901 by Dutch scientist – Christiaan Eijkman. Lipases are also produced by fungi, yeasts, and various organs of higher organisms.

A strong foundation, which had a huge impact on the development of global lipase-mediated biotransformations was the discovery made in 1935 and described in *Biochemistry Journal* and *Biochemische Zeitschrift* by Polish biochemist-enzymologist Ernest Alexander Sym (1893-1950) that these enzymes retain almost full catalytic activity even in nearly anhydrous organic solvents. This was exactly fifty years before Russian chemist Alexander Klibanov in 1985 described a lipase-catalyzed reaction carried out in organic solvents. Since that moment, lipases have become extremely popular in both academic and industrial usage, nowadays being the most important among all biocatalysts used in biochemical processes carried out on an industrial scale.

The purpose of this article is to provide a brief characterization of the two most widely used in industrial biotransformations lipases – lipase B from *Candida antarctica* (CAL-B) and lipase from *Burkholderia cepacia* (BCL) – and familiarize the readers with the issues of biotechnological processes catalyzed by them. The specifics of a range of industrial applications based on lipase catalysis, including the chemical, pharmaceutical, cosmetic and food industries are also discussed.

Keywords: lipases, *Candida antarctica* lipase B (CAL-B), *Burkholderia cepacia* lipase (BCL), industrial applications, biocatalysis, enantiomerically pure compounds

Słowa kluczowe: lipazy, lipaza B *Candida antarctica* (CAL-B), lipaza *Burkholderia cepacia* (BCL), zastosowania przemysłowe, biokataliza, związki enancjomerycznie czyste

WPROWADZENIE

Pierwsze udokumentowane zastosowanie procesów biotechnologicznych miało miejsce ok. 5000 lat temu, kiedy to na obszarach bliskiego wschodu i w Egipcie wykorzystywano mikroorganizmy do różnego rodzaju fermentacji spożywczych, w tym m.in. w piekarnictwie, w serowarstwie, browarnictwie oraz przy produkcji alkoholu [1]. Natomiast pierwsze świadome zastosowanie procesów biotransformacji miało miejsce w 1823 roku, kiedy użyto bakterii kwasu octowego z rodzaju *Acetobacter* zaadsorbowanych na złożu wiórów bukowych w przemysłowej produkcji octu metodą Schützenbacha [2]. Od tamtej pory nastąpiło wiele zmian, począwszy od technik selekcji i hodowli mikroorganizmów oraz izolacji i oczyszczania enzymów, a skończywszy na chemicznych lub genetycznych modyfikacjach, służących poprawie nie tylko ich właściwości katalitycznych, ale również zwiększeniu stabilności w warunkach procesowych [3–9].

Jednymi z najczęściej wykorzystywanych enzymów w biotransformacjach są lipazy (EC 3.1.1.3; acylohydrolazy triacylogliceroli). W tym roku mija 125 lat od czasu gdy J. R. Green zidentyfikował oraz opisał pierwszą lipazę w postaci ekstraktu o hydrolitycznych właściwościach, wydzielonego z kiełkujących nasion rącznika pospolitego (*Ricinus communis* L.) [10]. Jak się później okazało, zdolność produkowania lipaz posiadają nie tylko rośliny, ale również bakterie, o czym doniósł w 1901 roku holenderski mikrobiolog Christiaan Eijkman [10]. Lipazy wytwarzane są również przez grzyby, drożdże, a także poszczególne organy organizmów wyższych, dzięki czemu szacuje się, że obecnie na rynku dostępnych jest w sprzedaży około 70 preparatów lipaz [12–15].

Omawiając początki biokatalizy z udziałem lipaz nie sposób również nie wspomnieć o Ernestie Alexandrze Teofilu Symie (1893–1950) (Rys. 1) [16–20].



Rysunek 1. Ernest Alexander Teofil Sym (1893–1950)

Figure 1. Ernest Alexander Teofil Sym (1893–1950)

Zdumiewające jest, iż postać tego wybitnego przedwojennego polskiego biochemika-enzymologa została prawie całkowicie zapomniana, a informacja, że był on światowym pionierem badań nad katalizą enzymatyczną w układach niewodnych oraz w syntezie organicznej, nie dociera do świadomości społeczności nauko-

wej nawet w kręgach polskich badaczy. Warto przypomnieć, że Alexander Sym już w latach 30-tych XX w. badał mechanizm katalizy enzymatycznej zachodzącej przy udziale lipaz, wysuwając oryginalną hipotezę, iż polega on na aktywowaniu alkoholu i/lub estru przez ich łączenie się z protonem. Przy okazji prowadził również badania nad kinetyką reakcji enzymatycznych, wykazując m.in., że esterazy i lipazy są zasadniczo tymi samymi enzymami. Jego prace poświęcone aktywności hydrolytycznej, a w szczególności syntetycznej lipaz, w tym ogólnie badaniom czynników przyspieszających działanie esteraz publikowane były w owym czasie w najbardziej prestiżowych czasopismach naukowych, m. in. w *Biochemistry Journal* oraz *Biochemische Zeitschrift* (Rys. 2A) [21–25]. Dzięki poczynynom przez Syma obserwacjom dotyczącym rozpuszczalności kwasów tłuszczowych w wodzie w obecności różnych dodatków o charakterze aktywnym w trakcie procesu ich enzymatycznej hydrolizy, podjął on badania wpływu rozpuszczalników organicznych na reakcje esteraz oraz lipaz. To z kolei doprowadziło do jego największego opisanego w 1935 roku odkrycia, że enzymy są aktywne również w bezwodnych rozpuszczalnikach organicznych. Najbardziej płodny okres w jego twórczości naukowej przypada na lata 1930–1936 podczas jego prac w Laboratorium Biochemicznym Wydziału Medycznego oraz w Zakładzie Chemii Ogólnej i Fizjologicznej Wydziału Weterynarii Uniwersytetu Warszawskiego o boku prof. Stanisława Jana Przyłęckiego. W latach 1930–1931 Aleksander Sym odbywa staże naukowe w Sztokholmie pod kierunkiem Hansa von Eulera oraz w Kaiser Wilhelm Institut, Berlin-Dahlem u prof. Carla Neuberga. Alexandrowi Symowi zawdzięczamy również pierwsze pojawienie się określenia *biokataliza* w języku polskim (prawdopodobnie po raz pierwszy w ogóle) w pracy pt.: „*Utlennienia i redukcje w układach biologicznych*” opublikowanej w 1936 roku w czasopiśmie *Biologia Lekarska* (Rys. 2B) [26].

A CXXXIX. LIPASE AND ITS ACTION. I. THE SYNTHETIC ACTION OF PANCREATIC LIPASE IN THE SYSTEM: OLEIC ACID-GLYCEROL-WATER-DISSOLVED LIPASE.
BY ERNEST ALEXANDER SYM.
From the Biochemical Laboratory, Medical Faculty, Warsaw University.
(Received May 26, 1935)

The place of action of the enzymes in the macroheterogeneous two-phase system oleic acid-pancreatic lipase in aqueous solutions may be located in the three following regions: the aqueous phase, the oleic acid phase, and the phase interface. While it is generally accepted that the reaction of hydrolysis of fat takes place at the phase interface, no exact experimental evidence in support of this view has been adduced. Further, the opinion has been expressed (Euler and Hess, 1914; Kolthoff and Wender, 1914) that the lipase of blood and of pancreatic juice differ from that extracted from organs in that they act in homogeneous systems in the aqueous phase. Willstätter (Willstätter et al. 1925) considers that the enzymic hydrolysis of fat takes place in a microheterogeneous system, and on this hypothesis he bases his theory of the adsorptive action of esters.

The object of the present description in the present paper was definitely to determine the phase of action of pancreatic lipase, in order to be able to explain both the kinetics of reactions catalysed by this enzyme and the mechanism of the action of the esters.

EXPERIMENTAL.

The reaction of the synthesis of olein was selected as the most convenient for the study of the problem outlined in the introduction. The advantage of this reaction for the purpose in question consists, firstly, in that it proceeds, to a certain extent, according to the law of mass action, in contradiction to the opposite reaction of hydrolysis of oil, which is considerably accelerated by the presence of water. Secondly, the reaction undergoes only very inconsiderable fluctuations during the period of extraction; the introduction of a new factor in the form of bulk solution is thus obtained. Finally, the addition of substances activating lipase is unnecessary, as the enzyme remains active in the system for months without decay. It was for

LXXXVII. ACTION OF ESTERASE IN THE PRESENCE OF ORGANIC SOLVENTS.
BY ERNEST ALEXANDER SYM.
From the Department of General and Biochemical Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University.
(Received December 20th, 1935)

Summary.

In the method of analyzing esterase elaborated by the author, the active preparations are placed in contact with nonaqueous solutions of the substrate. The organic solvents used were either soluble, such as acetone, or practically insoluble in water, such as benzene, carbon tetrachloride and carbon disulphide. The active enzyme preparation used in the majority of the experiments was obtained from pig pancreas.

1. When lipase was obtained by heating the fat-free pancreas tissue through a mixing machine and introducing the product in a mortar. The first step was followed by shaking three pills for 1 hour with five volumes of acetone, decanting the supernatant liquid and repeating the process. After repeating this procedure the preparation was dried in a vacuum desiccator. The dry preparation was then ground in a mortar with 100 mg. of calcium sulphate.

2. The activity of this preparation in benzene in great measure on the water content. When this is low, an approximate proportionality may be found between the water content and the velocity of reaction catalysed by the preparation (Sym, 1935, 1).

In the case of propyl acetate the activity of the esterase was obtained by shaking the dry preparation described above with 5 volumes of water for 10 min., centrifuging and drying the residue repeatedly through a layer of calcium sulphate. The activity of the dry residue obtained was studied after adding 10 g. of sodium hydroxide or acetone to 100 ml. of acetone.

3. Propyl acetate is hydrolysed by 100 mg. of pancreas when water is added at 20 mm. pressure until the reaction had the consistency of a compact gel adherent to the bottom of the flask. The substrate was not obtained in any amount in this reaction; factors than the extract from which it originated and it may be used repeatedly.

In the most proper conditions the maximum activity only in the presence of water. This paper, p. 1. It was found to be inversely proportional to the activity being catalysed in the absence of water.

Systems containing organic solvents insoluble in water, such as benzene, acetone, or in the case of propyl acetate, or in the case of water, without the activity being destroyed. But when water-soluble organic solvents are used, the enzyme undergoes a marked inactivation in the presence of higher concentrations of water.

4. The action of the enzyme preparation was studied in most cases in systems containing 10% (v/v) (100 ml.) of 0.01M NaCl, 0.01M NaOH and 100 ml. water. The velocity of the reaction was studied by determining the initial velocity of formation of the ester in the case of ester per hour which is formed in the case of acetone phase during the first hour of reaction.

B BIOLOGJA LEKARSKA
Wydawnictwo lekarskie D. S. OTOLSKIEGO
Rok XV. — Nr. 6
Czerwiec 1936

UTLENIENIA I REDUKCJE W UKŁADACH BIOLOGICZNYCH

prof.
Doc. Dr. ERNEST SYM.
TĘCZE.

- 1) Wstęp.
- 2) Teoria utleniania i redukcji.
- 3) Biologiczne układy utleniające i redukcyjne.
- 4) Teoria utleniania i redukcji.
- 5) Teoria utleniania i redukcji.
- 6) Znaczenie utleniania i redukcji w procesach biologicznych.
- 7) Znaczenie utleniania i redukcji w procesach biologicznych.
- 8) Znaczenie utleniania i redukcji w procesach biologicznych.

I) WSTĘP.

Fizjologia, a szczególnie jej dział fizjologiczny przedchodzi różnorakie odkrycia, w których opracowywano pewnego zagadnienia najwięcej ciekawość i najwięcej inwencji. Jedną z takich odkryć mogły być odkrycia dotyczące utleniania i redukcji w procesach biologicznych. W ostatnich czasach najbardziej żywym i najciekawszym zagadnieniem biologii jest zagadnienie utleniania i redukcji w procesach biologicznych. W tym zakresie odkrycia i badania prowadzone są z wielką intensywnością i z wielką energią. W tym zakresie odkrycia i badania prowadzone są z wielką intensywnością i z wielką energią. W tym zakresie odkrycia i badania prowadzone są z wielką intensywnością i z wielką energią.

Rysunek 2. (A) Przykładowe przekruki stron tytułowych publikacji z lat 1930–1936 wyraźnie podkreślające wpływ rozpuszczalników organicznych na katalizę enzymatyczną z udziałem lipaz oraz esteraz. (B) Pierwsza praca, w której pojawia się termin *biokataliza* (patrz ostatni akapit strony 266)

Figure 2. (A) Samples of cover page reprints of publications from the years 1930–1936, clearly highlighting the effect of organic solvents on enzymatic catalysis with lipases and esterases. (B) The first work, in which appears the term *biocatalysis* (see the last paragraph of page 266)

Pierwsze zastosowanie przemysłowe biotransformacji związków hydrofobowych, nierozpuszczalnych w wodzie z użyciem lipaz datuje się na rok 1980. W tym czasie koncern *Unilever* zaczął produkcję masła kakaowego z użyciem 1,3-specyficznych lipaz izolowanych z *Aspergillus niger* oraz *Rhizopus japonicus* [27]. Podobnym wielkotonażowym procesem interestryfikacji tłuszczów, w tym między innymi oleju palmowego kwasem stearynowym z zastosowaniem tych samych enzymów, trudniła się od 1981 roku firma *Fuji Oil, Co Ltd.* [28]. Datą przełomową dla rozkwitu biotransformacji syntetycznych związków organicznych okazał się rok 1985, kiedy to rosyjski chemik Alexander Klibanov stwierdził (a tak naprawdę jedynie przypomniał po Ernieście Symie), że enzymy wykazują aktywność katalityczną również w środowisku rozpuszczalników organicznych, posiadając tym samym użyteczne działanie w systemach niewodnych [29]. Wkrótce po tym, w roku 1988 dochodzi do powstania instalacji przemysłowej w koncernie *Sumitomo* do produkcji enancjomerycznie czystych 4-hydroksy-2-cyklopentanonów w procesie enzymatycznej hydrolizy ich estrów [30]. Z kolei pierwszą na skalę przemysłową transestryfikację triacylogliceroli z użyciem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, katalizowaną 1,3-specyficzną lipazą pochodzenia grzybowego z *Mucor miehei*, wdrożyła w roku 1990 firma *Unilever* [31].

W ostatnim 25-leciu technologie z udziałem lipaz [32–35] koncentrują się wyraźnie na obszarach produkcji małotonażowej i na syntezie związków wysoko-specjalistycznych oraz drogich, wymagających szczególnej czystości, a więc wszędzie tam gdzie nie ma konkurencji ze strony metod wielkoprzemysłowej syntezy organicznej. Poniżej zaprezentowano przykłady przemysłowych biotransformacji z użyciem dwóch najczęściej stosowanych lipaz - lipazy B z *Candida antarctica* (CAL-B) oraz lipazy z *Burkholderia cepacia* (BCL).

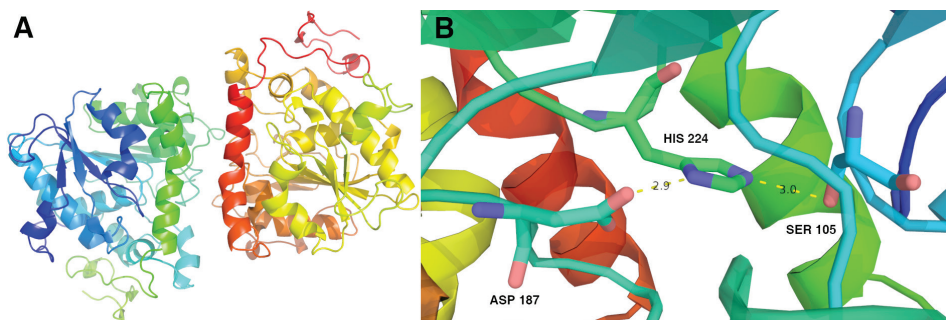
1. PROCESY KATALIZOWANE PRZEZ LIPAZĘ B Z *CANDIDA ANTARCTICA* (CAL-B)

Lipaza B izolowana z grzyba *Candida antarctica* (CAL-B), odkrytego w latach 60-tych XX w. w słonych wodach jeziora Vanda położonego w Dolinie Wrighta na Antarktydzie, jest jak do tej pory najczęściej stosowanym enzymem w procesach biokatalitycznych zarówno w skali laboratoryjnej jak również małotonażowej. Ogromna ilość pozycji książkowych, publikacji naukowych oraz patentów świadczy dobitnie o użyteczności oraz wszechstronności tego biokatalizatora szczególnie w reakcjach transestryfikacji/hydrolizy racemicznych mieszanin odpowiednio: (alkoholi i amin)/(estrów oraz amidów) [36–38]. CAL-B należy do rodziny enzymów posiadającej strukturę fałdowania α/β -hydrolaz serynowych o masie cząsteczkowej 33 kDa, punkcie izoelektrycznym pI 6,0 oraz optimum pH 7,0. W roztworach wodnych lipaza ta zachowuje pełną stabilność w szerokim zakresie pH 3,5–9,5 oraz w wysokiej temperaturze (50–60°C), utrzymując nawet 15% swej maksymalnej aktywności powyżej temperatury 70°C. Wyznaczona z wysoką roz-

dzielczością (1,55 Å) w roku 1994 przez Uppenberg i in. [39, 40] krystaliczna struktura CAL-B (Rys. 3) wykazała, iż składa się ona z 317 aminokwasów oraz posiada centrum aktywne zawierające następującą triadę katalityczną: Asp 187, His 224 oraz Ser 105. Kieszeń wiążąca substrat ma „charakter acylowy” i zbudowana jest z bardzo dużej oraz średniej przestrzeni wnękowej umożliwiającej pomieszczenie drugorzędowych alkoholi/amin z odpowiednio małym oraz bardzo dużym podstawnikiem zlokalizowanym po obu stronach centrum stereogenicznego substratu. W odróżnieniu od większości lipaz, CAL-B posiada bardzo małe „wieczko” (krótką α -helikalną strukturę), które z racji na ograniczoną możliwość przesłaniania centrum aktywnego powoduje, iż enzym ten praktycznie w ogóle nie potrzebuje aktywacji międzyfazowej by móc katalizować reakcje [41, 42], toteż doskonale nadaje się do pracy w czystych rozpuszczalnikach organicznych. Dostęp do wnętrza kieszeni aktywnej dla substratów i rozpuszczalników możliwy jest poprzez wąski kanał zbudowany z hydrofobowych aminokwasów.

Obecnie uważa się, że CAL-B jest najbardziej uniwersalnym enzymem, przejawiającym wysoką aktywność katalityczną oraz selektywność wobec zróżnicowanej strukturalnie puli substratów organicznych. W handlu lipaza B z *Candida antarctica* występuje najczęściej w postaci immobilizowanej pod odpowiednią nazwą Novozym 435, Novozyme 435 lub Novozyme SP 435 – w zależności od mikroorganizmu (*Aspergillus niger* lub *Aspergillus oryzae*), w którym przeprowadza się klonowanie oraz ekspresję białka enzymatycznego. Preparaty te, sprzedawane przez firmę *Novo Nordisk A/S* (obecnie *Novozymes A/S*) przygotowywane są na bazie CAL-B immobilizowanej w sposób fizyczny na wyprodukowanej przez firmę *Bayer* makroporowatej żywicy poli(metylo-metaakrylano-diwinyllobenzenowej) (Lewatit VP OC 1600*), posiadającej odpowiednio średnie wartości wielkości cząstek z zakresu 315–1000 μm , pola powierzchni wynoszące 130 $\text{m}^2 \times \text{g}^{-1}$ oraz średnicę porów o długości 150 Å. Tak przygotowane immobilizaty lipaz charakteryzują się bardzo dużą stabilnością w warunkach procesowych, wynikającą głównie z odporności mechanicznej wobec naprężeń ścinających w płynie towarzyszących intensywnemu mieszaniu, a także ze względu na małą wrażliwość na wysokie temperatury, zmienne pH środowiska reakcji oraz stosowane rozpuszczalniki organiczne.

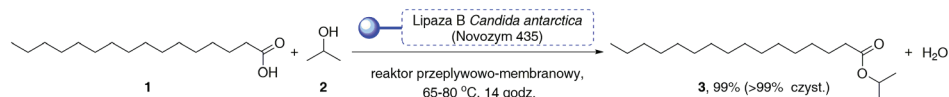
W niniejszym przeglądzie przedstawiono w skrócie jedynie kilka najważniejszych zastosowań tej lipazy jako katalizatora stosowanego w procesach otrzymywania substancji chemicznych o wysokiej wartości dodanej, których skala produkcyjna nie przekracza kilkuset kilogramów.



Rysunek 3. (A) Struktura 3D lipazy B z *Candida antarctica* (PDB ID: 1TCA). (B) Ułożenie przestrzenne reszt aminokwasowych (AK) wchodzących w skład tzw. „triady katalitycznej” (Asp 187, His 224, Ser 105) należącej do centrum aktywnego CAL-B (wzajemne odległości między AK podane zostały w Angstrmach). Struktura krystaliczna białka enzymatycznego została pobrana z bazy Protein Data Bank (PDB) oraz przetworzona za pomocą programu Pymol vs 0,99

Figure 3. (A) The 3D structure of lipase B from *Candida antarctica* (PDB ID: 1TCA). (B) The spatial orientation of the amino acid (AAs) residues in the so-called “catalytic triad” (Asp 187, His 224, Ser 105) belonging to the active-site of CAL-B (the mutual distance between the AAs are given in Angstroms). Crystal structure of enzymatic protein was downloaded from the Protein Data Bank (PDB), and processed using Pymol vs 0,99

Holenderska *UNICHEMA Chemie BV* była pierwszą firmą, która opracowała w skali przemysłowej [3,1 M (800 g×litr⁻¹)] chemoenzymatyczną syntezę cennego surowca kosmetycznego – palmitynianu izopropylu (**3**, Schemat 1) – stosowanego w produkcji mydeł, pianek, pomadek oraz kremów do skóry [43]. Reakcją pomiędzy kwasem palmitynowym (**1**) a 2-propanolem (**2**) prowadzono w reaktorze przepływowo-membranowym o działaniu okresowym z użyciem Novozymu 435. Powstającą w trakcie reakcji wodę usuwano w postaci azeotropu (alkohol/H₂O) pod ciśnieniem 0,26 bar. W wyniku tego procesu uzyskiwano produkt **3** o czystości >99% wg GC z praktycznie ilościową wydajnością (99%) w relatywnie krótkim czasie (14 godz.).

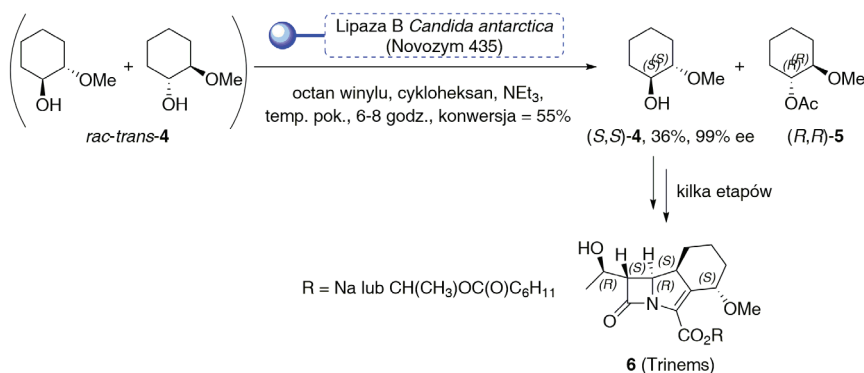


Schemat 1. Chemoenzymatyczna synteza palmitynianu izopropylu (**3**) katalizowana lipazą B z *Candida antarctica* (Novozym 435)

Scheme 1. Chemoenzymatic synthesis of isopropyl palmitate (**3**) catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435)

Bardzo wydajna procedura otrzymywania w skali przemysłowej (1*S*,2*S*)-*trans*-2-metoksycykloheksanolu [(*S,S*)-**4**] (Schemat 2) – prekursora w syntezie antybiotyków β -laktamowych **6** (Trinems) została opracowana w firmie *Glaxo Wellcome plc*. [44]. Kluczowym etapem syntezy jest rozdział kinetyczny racemicznego alkoholu *rac-trans*-**4** za pomocą octanu winylu oraz Novozymu 435 jako katalizatora z dodatkiem trietyloaminy. W tak zaprojektowanych warunkach optycznie czynny alkohol

(*S,S*)-**4** otrzymano z przeciętną wydajnością 36%, ale za to z bardzo wysoką czystością enancjomeryczną (99% ee) w czasie 6–8 godzin. Dodatkowo, wybór cykloheksanu jako rozpuszczalnika okazał się bardzo istotny, nie tylko ze względu na optymalne dopasowanie tego medium do zastosowanej lipazy, ale również z uwagi na możliwość selektywnej ekstrakcji otrzymanych produktów. Co ważne, pozwoliło to wyeliminować etap rozdzielania mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii. Stężenie racemicznego substratu *rac-trans*-**4** wynosiło 1,4 M (182 g×litr⁻¹), a użyty immobilizowany enzym wykazywał dużą stabilność procesową, zachowując ponad połowę swojej aktywności katalitycznej nawet po 9 cyklach reakcyjnych.

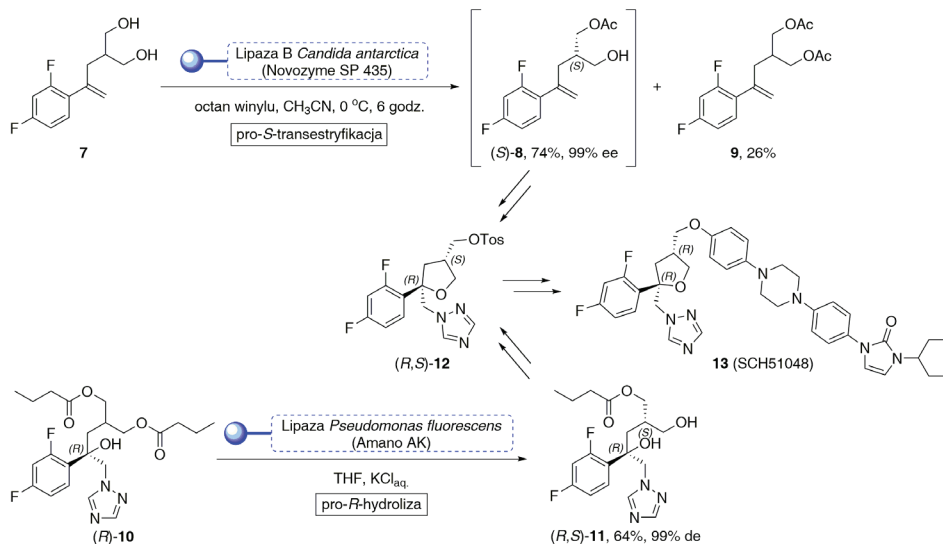


Schemat 2. Chemoenzymatyczna synteza trycyklicznych antybiotyków β -laktamowych **6** (Trinemms) katalizowana Novozymem 435

Scheme 2. Chemoenzymatic synthesis of tricyclic β -lactam antibiotics **6** (Trinemms) catalyzed by Novozym 435

Z kolei technolodzy z firmy *Schering-Plough* opracowali enzymatyczną desymetryzację prochiralnego 2-podstawionego-1,3-propanodiolu (**7**) – kluczowego półproduktu w syntezie przeciwrzybicznego preparatu **13** o handlowej nazwie SCH51048 [45, 46]. Związek **13** jest pochodną posakonazolu oraz itrakonazolu i podobnie jak one posiada udowodnioną aktywność biologiczną wykorzystywaną w leczeniu systemowych kandydoz wywołanych drożdżakami z rodzaju *Candida* oraz infekcji oddechowych wywołanych grzybami z rodzaju *Aspergillus*. Obecnie znajduje się w II fazie badań klinicznych. Na Schemacie 3 zaprezentowano dwie metody syntezy: (i) enzymatyczną desymetryzację odpowiedniej pochodnej diestrowej (*R*)-**10** oraz (ii) desymetryzację prochiralnego diolu **7**. W obu przypadkach tworzy się nieracemiczna pochodna (*R,S*)-**12**, która następnie transformowana jest w pożądaną chemoterapeutykę **13** w szeregu prostych reakcji. Desymetryzację nieracemicznego dimaślanu (*R*)-**10** przeprowadzono stosując immobilizowaną lipazę *Pseudomonas fluorescens* (lipazę Amano AK) zawieszoną w mieszaninie wodnego roztworu chlorku potasu i tetrahydrofuranu, otrzymując odpowiedni monomaślan (*R,S*)-**11** z dobrą wydajnością (64%) oraz z bardzo wysokim nadmiarem diastereoizomerycznym (99% de). Dużo szybszą i prostszą metodą okazała się ta, w której *mezo* diol **7** estryfikowano pro-*S*-selektywnie za pomocą octanu winylu i Novo-

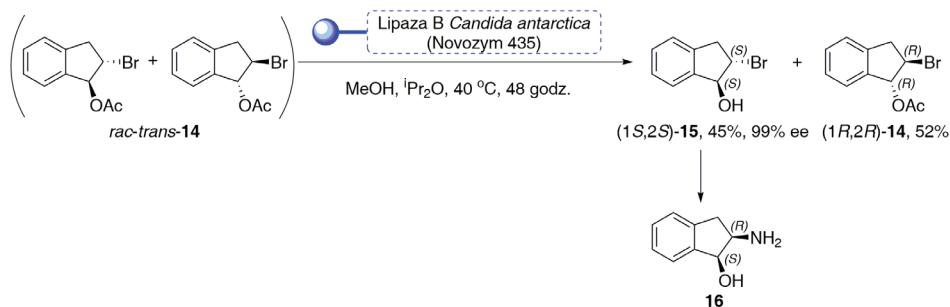
zymu 435. Wydajność otrzymanego w ten sposób monoocetanu (*S*)-**8** wyniosła 74%, a czystość enancjomeryczna 99% ee. Ponieważ kolejny etap syntezy – cyklizacja (*S*)-**8** – prowadzony był w acetonitrylu, enzymatyczną hydrolizę z udziałem lipazy CAL-B przeprowadzono w tym samym rozpuszczalniku, dzięki czemu proces mógł być kontynuowany bez wydzielenia produktu pośredniego. Stężenie użytego diolu **7** wynosiło 0,876 M ($200 \text{ g} \cdot \text{litr}^{-1}$), a podana wielkość szarzy procesu: 30 kg substratu **7** w 150 litrach acetonitrylu. W tych warunkach możliwe było 6-krotne wykorzystanie biokatalizatora bez obserwowalnych spadków efektywności jego działania.



Schemat 3. Chemoenzymatyczna synteza przeciwwgrzybicznego chemoterapeutyku **13** (SCH51048) katalizowana Novozymem 435

Scheme 3. Chemoenzymatic synthesis of antifungal agent **13** (SCH51048) catalyzed by Novozym 435

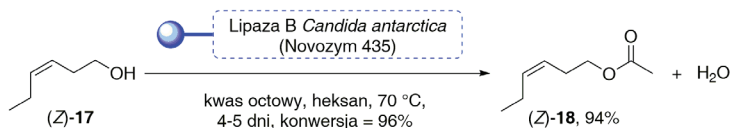
Kolejnym przykładem zastosowania lipazy B z *Candida antarctica* jest realizowana przez *Ichikawa Gosei Kagaku Co., Japan* synteza enancjomerycznie czystego (1*S*,2*S*)-*trans*-2-bromoindan-1-olu [(1*S*,2*S*)-**15**] (Schemat 4) [47]. Związek ten jest kluczowym półproduktem w syntezie *cis*-1-aminoindan-2-olu (**16**) – farmaceutycznie czynnego składnika leków antyretrowirusowych stosowanych w leczeniu wirusowego zespołu nabytego braku odporności (AIDS). Substratem w tym procesie jest racemiczny *trans*-2-bromo-1-(acetoksy)indan (*rac-trans*-**14**), który poddaje się enancjoselektywnej metanolizie katalizowanej Novozymem 435 zawieszonym w 2-propanolu. Optycznie czynny alkohol (1*S*,2*S*)-**15** o bardzo wysokiej czystości enancjomerycznej wynoszącej 99% ee otrzymywano z wydajnością 45%. Nieprzereagowany ester (1*R*,2*R*)-**14** odzyskiwano z wydajnością 52%.



Schemat 4. Rozdział kinetyczny racemicznego *trans*-2-bromo-1-(acetoksy)indanu (*rac-trans*-14) katalizowany Novozymem 435

Scheme 4. Kinetic resolution of racemic *trans*-2-bromo-1-(acetoxyl)indan (*rac-trans*-14) catalyzed by Novozym 435

Octan (*Z*)-3-heksen-1-ylu [(*Z*)-18] jest surowcem zapachowym o świeżej zielonej nucie, stosowanym jako dodatek do żywności lub w przemyśle kosmetycznym jako składnik bazy zapachowej. Opracowaniem jego przemysłowej syntezy z użyciem lipazy B z *Candida antarctica* zajął się zespół francuskich naukowców we współpracy z firmą *Naturex* (Schemat 5) [48]. Opisali oni efektywną syntezę tego surowca w skali półtechnicznej używając 5 kg (*Z*)-3-heksen-1-olu [(*Z*)-17] ($1,5 \text{ mol} \times \text{litr}^{-1}$), równomolowej ilości kwasu octowego oraz Novozymu 435 zawieszzonego w suchym *n*-heksanie. Reakcję prowadzono w temperaturze 70°C z ciągłym oddestylowywaniem tworzącej się wody, co pozwoliło otrzymać pożądaný ester (*Z*)-18 z bardzo wysoką 94% wydajnością. Użyty w tych warunkach enzym zachowywał pełną aktywność katalityczną przez 7 cykli reakcyjnych.

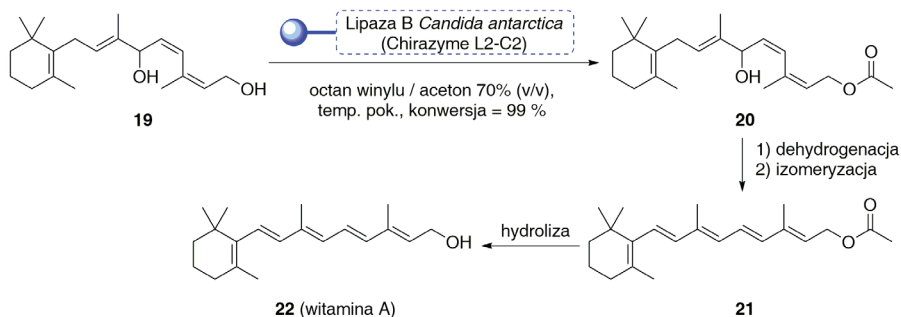


Schemat 5. Estryfikacja (*Z*)-3-heksen-1-olu [(*Z*)-17] kwasem octowym w obecności Novozymu 435

Scheme 5. Direct esterification of (*Z*)-3-hexen-1-ol [(*Z*)-17] with acetic acid in the presence of Novozym 435

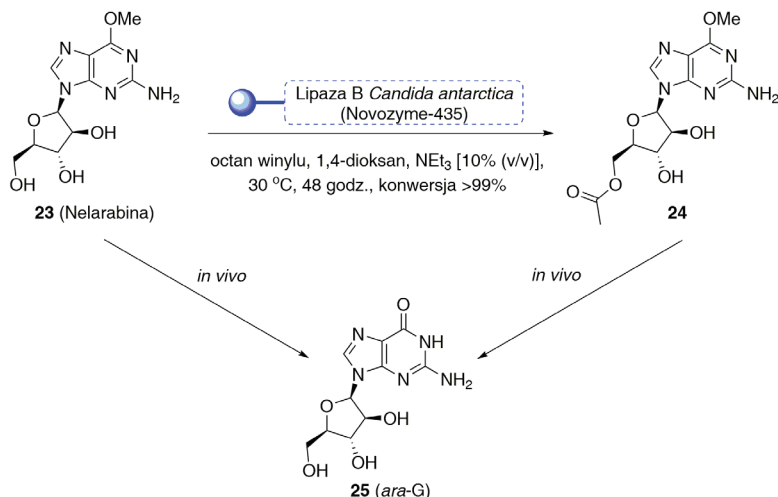
Inny immobilizowany preparat CAL-B (Chirazyme L2-C2) okazał się użytecznym katalizatorem w przemysłowej produkcji retinolu (**22**, witaminy A) realizowanej przez szwajcarską firmę *Hoffmann la Roche* od przeszło 16 lat (Schemat 6) [49, 50]. W procesie katalizowanej enzymatycznie transestryfikacji (2*Z*,4*Z*,7*E*)-3,7-dimetylo-9-(2,6,6-trimetylocykloheks-1-enylo)nona-2,4,7-trieno-1,6-diolu (**19**) stosowany jest octan winylu jako donor grupy acetylowej oraz aceton jako rozpuszczalnik. W przeciwieństwie do chemicznej estryfikacji, metoda enzymatyczna daje nie tylko bardzo wysoką selektywność (97%) acylowania **19** do odpowiedniego monoestru **20**, ale również bardzo wysoką konwersję substratu (99%). Jedyną wadą tego procesu jest mała szybkość reakcji, albowiem regioselektywna transestryfikacja

1,4 kg diolu **19** zajmuje aż 74 dni. Proces prowadzony jest w temperaturze pokojowej, co obniża koszty. Tak przygotowany półprodukt **20** (1,6 kg/szarżę) poddawany jest następnie odwodnieniu, izomeryzacji oraz hydrolizie, w rezultacie których otrzymywana jest ostatecznie witamina A (**22**).



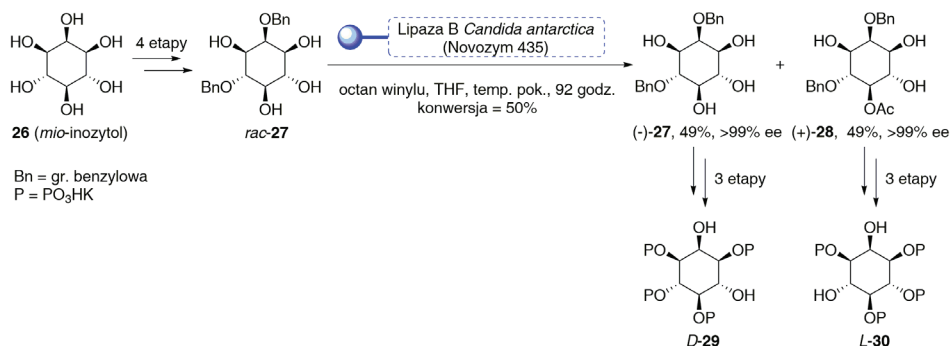
Schemat 6. Chemoenzymatyczna synteza retinolu (**22**, witaminy A) katalizowana Chirazymem L2-C2
 Scheme 6. Chemoenzymatic synthesis of retinol (**22**, vitamin A) catalyzed by Chirazymem L2-C2

Bardzo ciekawe przemysłowe zastosowanie immobilizowanej CAL-B (Novozym-435) w procesie selektywnego acetylowania leku przeciwnowotworowego – nelarabiny (**23**) – stosowanego w leczeniu niektórych odmian białaczek, opracował koncern farmaceutyczny *Glaxo Wellcome* (Schemat 7) [51]. Dzięki temu prostemu, bardzo selektywnemu oraz wydajnemu procesowi firma ta wprowadziła na rynek acetylową pochodną związku **23**, będącą znanym pro-lekiem antybiałaczkowej *ara-G* (**25**, 9- β -D-arabino-furanozylo guaniny). Za pomocą uzyskanej modyfikacji strukturalnej nelarabiny (**23**) osiągnięto znaczną poprawę jej rozpuszczalności w różnych mediach, co zwiększyło biodostępność leku oraz jego aktywność biologiczną. Dodatkowo, otrzymanie 5'-monoacetylowej pochodnej **24** przyczyniło się do lepszego poznania metabolizmu wcześniej odkrytego pro-leku **23** i co najważniejsze udowodniono dzięki temu, że zarówno nelarabina (**23**) jak również jej acetylowa pochodna **24** biotransformowane są *in vivo* do tej samej farmakologicznie aktywnej postaci leku, czyli *ara-G* (**25**). Spośród wielu przetestowanych enzymów zdecydowanie najlepszym okazał się wyżej wspomniany Novozym-435, który katalizował reakcję transestryfikacji użytej w stężeniu 50 g/litr nelarabiny (**23**) octanem winylu selektywnie w pozycji 5'-OH, z konwersjami substratu powyżej 99%. Niestety, zwiększenie stężenia **23** do 100 g/litr negatywnie wpłynęło na konwersję, obniżając jej wartość do 60–70%. Dobór optymalnych warunków katalizowanego Novozymem-435 acetylowania nelarabiny (**23**) pozwolił ograniczyć ilość zanieczyszczeń (3'-mono- oraz 5',3'-di-octanu) do mniej niż 0,5%.



Schemat 7. Regioselektywna transestryfikacja nelarabiny (**23**) octanem winylu katalizowana Novozyme-435
 Scheme 7. Regioselective transesterification of nelarabin (**23**) with vinyl acetate catalyzed by Novozyme-435

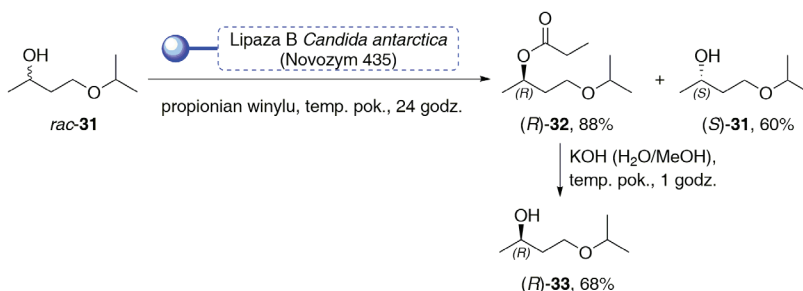
Innym przykładem użyteczności oraz wszechstronności katalizy enzymatycznej jest chemoenzymatyczny proces otrzymywania obu enancjomerów 1,3,4,5-tetrakisfosforanu *mio*-inozytolu (*D*-**29** oraz *L*-**30**) opracowany przez technologów ze szwajcarskiej firmy *Novartis Pharma AG* (Schemat 8) [52]. W kluczowym dla całego procesu etapie enzymatycznym użycie CAL-B (Novozym 435) i octanu winylu jako donora grupy acetylowej oraz tetrahydrofuranu jako rozpuszczalnika, pozwoliło uzyskać doskonały rozdział kinetyczny benzylovej pochodnej *mio*-inozytolu *rac*-**27**. Dzięki temu otrzymano odpowiedni monoester (+)-**28** oraz nieprzereagowany polialkohol (-)-**27** w postaci enancjomerycznie czystej (>99% ee) z praktycznie ilościowymi wydajnościami dla konwersji równej 50%.



Schemat 8. Chemoenzymatyczna synteza *D*-1,3,4,5-tetrakisfosforanu *mio*-inozytolu (*D*-**29**) oraz *L*-1,3,4,5-tetrakisfosforanu *mio*-inozytolu (*L*-**30**) z wykorzystaniem Novozymu 435

Scheme 8. Chemoenzymatic synthesis of *D*-*myo*-inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate (*D*-**29**) and *L*-*myo*-inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate (*L*-**30**) by using Novozym 435

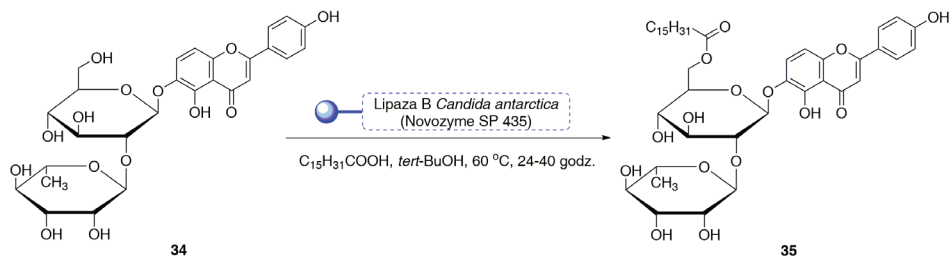
Kolejnym przykładem wykorzystania CAL-B (Novozym 435) jest przemysłowa metoda otrzymywania optycznie czynnego (2*R*)-4-(propan-2-yloksy)butan-2-olu [(*R*)-**33**] (Schemat 9) [53]. Jego synteza wykorzystująca rozdział kinetyczny racemicznego alkoholu *rac*-**31** z użyciem propionianu winylu opracowana została przez japońską firmę *Mitsubishi Gas Chemical Company*, a otrzymywany dzięki niej enancjomer (*R*)-**33** wykorzystywany jest do produkcji optycznie czynnych ciekłych kryształów.



Schemat 9. Rozdział kinetyczny racemicznego 4-(propan-2-yloksy)butan-2-olu (*rac*-**31**) katalizowany Novozymem 435

Scheme 9. Kinetic resolution of racemic 4-(propan-2-yloxy)butan-2-ol (*rac*-**31**) catalyzed by Novozym 435

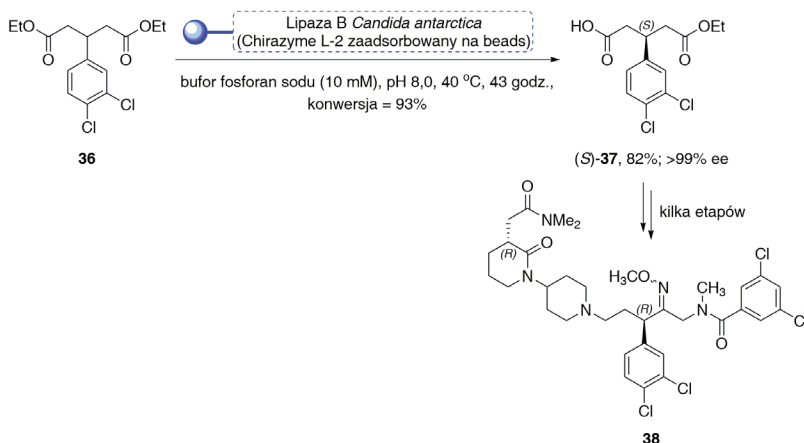
Inny preparat immobilizowanej CAL-B (Novozym SP 435) został zastosowany przez firmę *Henkel* do regioselektywnej estryfikacji glikozydu izoflawonu **34** kwasami tłuszczowymi (Schemat 10) [54]. Glikozyd **34** ze względu na swoje silne właściwości anty-utleniające, chroniące żywe komórki przed działaniem m.in. wolnych rodników, jest bardzo często stosowany w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym oraz jako dodatek do żywności. Niestety przenikanie glikozydu izoflawonolowego **34** przez błony biologiczne jest ograniczone, toteż funkcjonalizacja jego struktury celem zwiększenia lipofilowości cząsteczki jest jak najbardziej pożądana. Opracowana chemoenzymatyczna metoda syntezy jego estru z kwasem heksadekanowym (palmitynowym) **35** nie tylko poprawiła biodostępność wyjściowego związku **34**, ale dodatkowo pozwoliła wykazać, że pochodna **35** posiada potencjalne właściwości hamujące aktywność proteaz serynowych występujących w skórze właściwej oraz pozytywnie wpływa na produkcję kolagenu. To sprawia, że produkowany ester **35** stanowi doskonały surowiec kosmetyczny o działaniu zapobiegającym powstawaniu zmarszczek mimicznych oraz wiotczeniu skóry. Ponadto warty uwagi jest fakt, iż mimo że węglowodany nie należą do naturalnych substratów hydrolaz triacylogliceroli, to lipaza CAL-B okazała się bardzo efektywnym katalizatorem reakcji bezpośredniej estryfikacji glikozydu **34** kwasem heksadekanowym, gwarantując przy tym wysoce regioselektywne przekształcenie pierwszorzędowej grupy hydroksylowej w biotransformowanej cząsteczce substratu.



Schemat 10. Regioselektywna estryfikacja glikozydu izoflawonolowego **34** za pomocą kwasu palmitynowego katalizowana Novozyme SP 435

Scheme 10. Regioselective esterification of isoflavone glycoside **34** with palmitic acid catalyzed by Novozyme SP 435

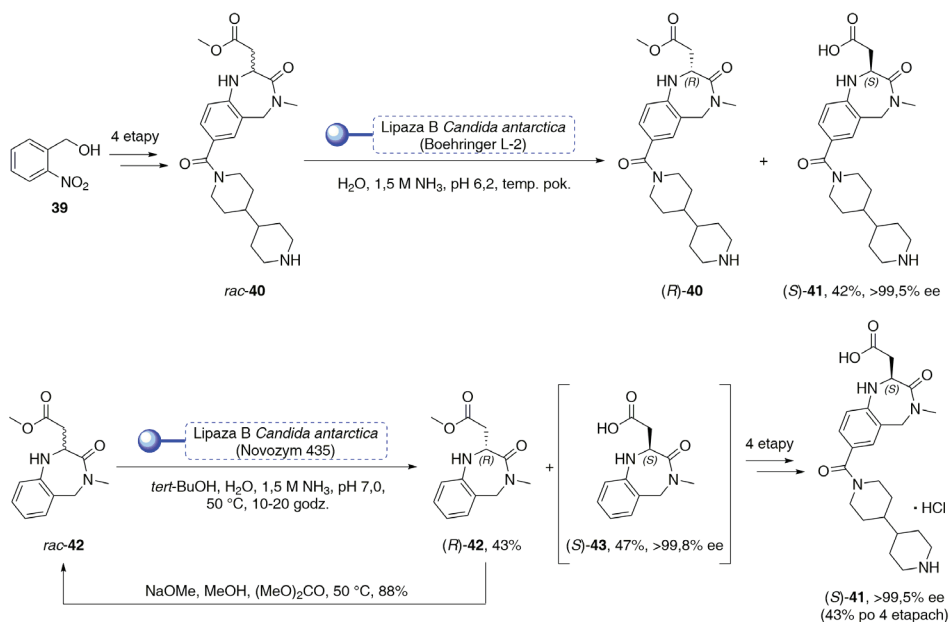
Walory CAL-B immobilizowanej na makroporowatej żywicy (tzw. *beads*) o zastrzeżonym składzie, sprzedawanej pod handlową nazwą Chirazyme L-2 przez firmę *Boehringer Mannheim*, dostrzeżono w firmie *Schering-Plough* (Schemat 11) [55]. Opracowana przez nich przemysłowa procedura desymetryzacji diestru etylowego kwasu 3-(3',4'-dichlorofenylo)glutarowego (**36**) w warunkach enzymatycznej hydrolizy w wodnym roztworze buforowym pozwoliła otrzymać enancjomerycznie czysty monoester (*S*)-**37** (>99% ee) z bardzo wysoką 82% wydajnością w relatywnie łagodnych warunkach (40°C). Synteza tego związku prowadzona była w skali 50 kg użytego substratu **36** przy jego stężeniu 100 g/litr. W jednej szarży trwającej 43 godziny otrzymywano 75,2 kg (*S*)-**37**, a w ciągu trzech szarż średnio 200 kg. Otrzymywany w ten sposób nieracemiczny produkt pośredni (*S*)-**37** służy do dalszej syntezy chiralnego związku **38** o charakterze dualnego antagonisty ludzkich receptorów tachikininowych (neurokinin NK1/NK2). Dzięki tej właściwości związek **38**, znajdujący się obecnie w fazie badań klinicznych, może być potencjalnie stosowany w leczeniu przewlekłych schorzeń, m.in. astmy, obturacyjnych skurczy oskrzeli, artretyzmu, a także migreny.



Schemat 11. Chemoenzymatyczna synteza dualnego antagonisty **38** ludzkich neurokinin (NK1/NK2) katalizowana Chirazymem L-2

Scheme 11. Chemoenzymatic synthesis of dual human neurokinin (NK1/NK2) antagonist **38** catalyzed by Chirazyme L-2

W międzynarodowym koncernie *GlaxoSmithKline Pharmaceuticals* opracowano chemoenzymatyczną syntezę chlorowodoru lotrafibanu [(S)-**41**] – aktywnego doustnie antagonisty receptora fibrynogenu GPIIb/IIIa stosowanego w profilaktyce i leczeniu żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych (Schemat 12) [56–58]. Bezpośrednim powodem opracowania enzymatycznej metody syntezy tego leku była chęć wyeliminowania newralgicznego etapu chemicznego, podczas którego dochodziło do znacznej utraty czystości enancjomerycznej kluczowego chiralnego 1,4-benzodiazepinowego półproduktu, następującej w wyniku racemizacji katalizowanej przez tworzący się *in situ* wolny jon fluorkowy. O ile w skali laboratoryjnej było w pełni możliwe selektywne zaadsorbowanie wydzielającego się fluorowodoru przez sita molekularne 3 Å i zapobieganie tym samym racemizacji, o tyle w skali pilotażowej (>50 kg) nie zdołano rozwiązać tego problemu. Ponadto, zastosowanie sit molekularnych w skali laboratoryjnej powodowało znaczne straty wydajności, gdyż w zeolicie zostawało za dużo uwięzionego produktu. Alternatywne próby doczyszczenia tego związku przez wielokrotną krystalizację nie przyniosły oczekiwanych rezultatów.



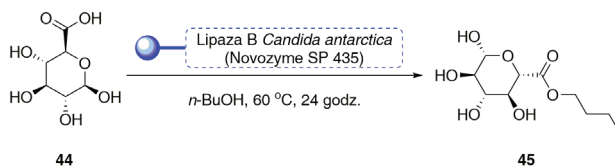
Schemat 12. Chemoenzymatyczna synteza optycznie czynnego lotrafibanu [(*S*)-41] katalizowana przez Novozym 435

Scheme 12. Chemoenzymatic synthesis of optically active lotrafiban [(*S*)-41] catalyzed by Novozym 435

Dopiero zastosowanie katalizy enzymatycznej z udziałem CAL-B w postaci dwóch różnych handlowo dostępnych immobilizatów (Boehringer L-2 oraz Novozym 435) i dwóch różnych metod (Schemat 12), zakończyło się sukcesem. W pierwszej metodzie, wychodząc z alkoholu 2-nitrobenzylowego **39**, otrzymano w 4-etapowej syntezie racemiczny ester *rac*-**40**, który następnie poddawano hydrolytycznemu rozdziałowi kinetycznemu katalizowanego lipazą Boehringer L-2 w ciełym amoniaku. Pomimo, iż czystość enancjomeryczna uzyskanego w ten sposób lotrafibanu [(*S*)-**41**] w postaci wolnej aminy była bardzo wysoka (>99,5% ee), a łagodne warunki reakcji umożliwiały ponad 100-krotne użycie enzymu, to jednak całkowita wydajność procesu była niesatysfakcjonująca. Pełny sukces komercyjny stał się możliwy dzięki zastosowaniu enzymatycznego rozdziału kinetycznego na wcześniejszym etapie syntezy wraz z jednoczesnym powtórnym wykorzystaniem nieprzereagowanego estru (*R*)-**42**. W wyniku zastosowania katalizowanej przez Novozym 435 enancjoselektywnej hydrolizy 246 kg racemicznego estru *rac*-**42** otrzymano enancjomerycznie czysty kwas (*S*)-**43** (>99,8% ee) z wydajnością 47% oraz nieprzereagowany ester (*R*)-**42** z wydajnością 43%. Traktując odpadowy ester (*R*)-**42** metanolanem sodu racemizowano go do wyjściowego *rac*-**42** z wysoką 88% wydajnością. W dalszych etapach syntezy prowadzono szereg typowych reakcji chemicznych, w tym między innymi regioselektywne jodowanie (61%), aminokarbonylowanie katalizowane palladem (86%), redukcję wodorem na palladzie (87%) oraz chlorowodorowanie

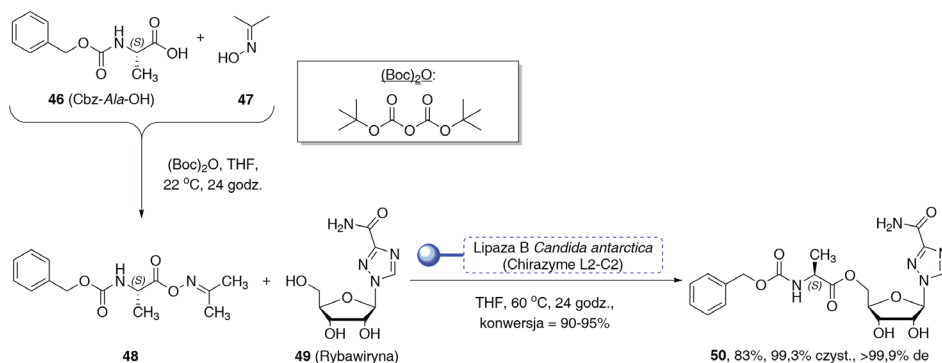
(94%), w wyniku których otrzymywano farmaceutycznie czynny nieracemiczny produkt (S)-**41** w postaci chlorowodoru z całkowitą wydajnością 20%.

Immobilizowaną CAL-B (Novozyme SP 435) zastosowano również podczas przemysłowej produkcji estrów pochodnych kwasu uronowego (Schemat 13) [59]. Patent firmy *Cognis Deutschland GmbH & Co* przedstawia prosty proces estryfikacji kwasu *D*-(-)-galakturonowego (**44**) *n*-butanolem katalizowany CAL-B w temperaturze 60°C. Otrzymywany w ciągu 24 godzin ester butylowy kwasu (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5,6-tetrahydroksyoksano-2-karboksylowego (**45**) posiada właściwości powierzchniowo czynne i przeciwbakteryjne oraz stosowany jest jako surfaktant i/lub emulsyfikator przy produkcji kosmetyków.

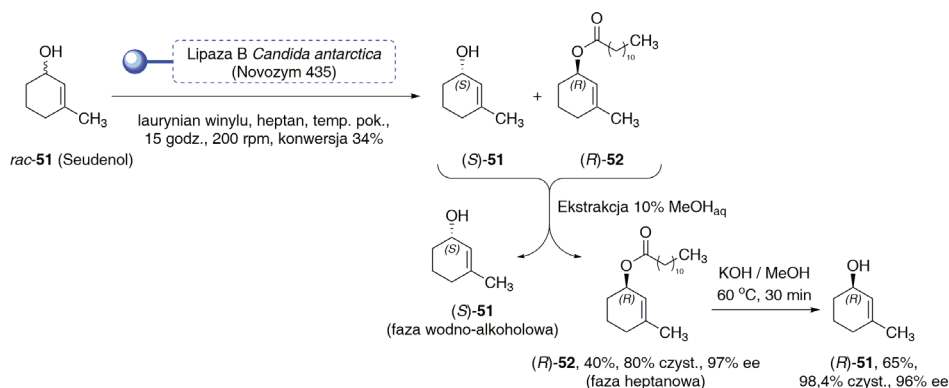


Schemat 13. Estryfikacja kwasu *D*-(-)-galakturonowego (**44**) *n*-butanolem w obecności Novozyme SP 435
Scheme 13. Esterification of *D*-(-)-galacturonic acid (**44**) with *n*-butanol in the presence of Novozyme SP 435

Kolejnym doskonałym przykładem przemysłowego wykorzystania CAL-B jest regioselektywne acylowanie rybawiryny (**49**) – leku przeciwwirusowego stosowanego w ciężkich zakażeniach wirusem RSV oraz wirusem HCV (Schemat 14) [60]. Koncern *Schering-Plough* jako pierwszy zdecydował się na zastosowanie procesu biokatalitycznego celem otrzymania odpowiedniej diastereizomerycznej pochodnej o charakterze pro-leku rybawiryny (**50**). Związek ten produkowany jest obecnie w ilości 82 kg w czterech szarżach ze średnią wydajnością każdej z nich wynoszącą 83%. Użycie lipazy Chirazyme L2-C2 zawieszanej w bezwodnym tetrahydrofuranie pozwala na regioselektywne acylowanie wyłącznie grupy 5'-OH rybawiryny (**49**) *O*-(*N*-benzyloksykarbonylo-*L*-alanylo)acetoksymem (**48**). Proces ten prowadzony w 60°C przez 24 godziny pozwala na uzyskanie 90–95% przereagowania substratu **49** w produkt **50** o nadmiarze diastereoizomerycznym >99,9%.

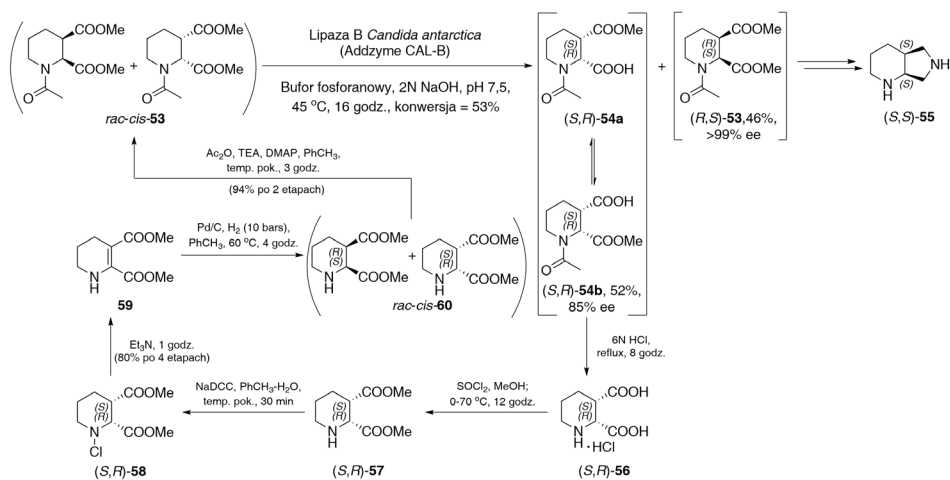
Schemat 14. Regioselektywne acylowanie rybawiryny (**49**) katalizowane lipazą Chirazyme L2-C2Scheme 14. Regioselective acylation of ribavirin (**49**) catalyzed by lipase Chirazyme L2-C2

Z kolei francuska firma *Organon S.A.* opracowała bardzo praktyczną i ekonomicznie opłacalną enzymatyczną metodę otrzymywania enancjomerycznie wzbogaconego (*R*)-seudenolu [(*R*)-**51**] – feromonu agregacyjnego kornikowatego chrząszcza *Dendroctonus pseudotsugae* (Schemat 15) [61]. Zastosowanie immobilizowanej CAL-B (Novozym 435) w reakcji transestryfikacji racemicznego alkoholu *rac*-**51** laurynianem winylu, nie tylko pozwoliło na enancjoselektywne rozdzielenie stereoizomerów *rac*-**51** w warunkach kontroli kinetycznej, ale również na skuteczne wydzielenie czystych produktów za pomocą zwykłej ekstrakcji z zastosowaniem 10% wodnego roztworu metanolu. Dzięki wyeliminowaniu procedury oczyszczania przy użyciu technik chromatograficznych, proces mógł być z powodzeniem powiększony do skali siedmiokilogramowej.

Schemat 15. Chemoenzymatyczna synteza (*R*)-seudenolu [(*R*)-**51**] katalizowana przez Novozym 435Scheme 15. Chemoenzymatic synthesis of (*R*)-seudenol [(*R*)-**51**] catalyzed by Novozym 435

Innym przykładem zastosowania lipazy B z *Candida antarctica* (Addzyme CAL-B) jest synteza (4*aS*,7*aS*)-oktahydro-1*H*-pirolo[3,4-*b*]pirydyny [(*S,S*)-**55**] – związku wykorzystywanego do produkcji moksyflokscyny (Schemat 16) – chemo-

terapeutyku z grupy fluorochinolonów, zaburzających replikację DNA bakterii [62]. Kluczowy w syntezie tego leku ester dimetylowy kwasu (2*S*,3*R*)-acetylopiperdyno-2,3-dikarboksylowego [(*R,S*)-**53**] otrzymywany jest z wydajnością 46% w postaci enancjomerycznie czystej (>99% ee) na drodze kinetycznego rozdzielania racemicznego diestru *rac-cis*-**53** katalizowanego przez Addzyme CAL-B rozpuszczonego w mieszaninie buforu fosforanowego oraz wodorotlenku sodu. Proces prowadzony jest w skali 80 gramowej użytego substratu *rac-cis*-**53** w 45°C przez 16 godz. do momentu osiągnięcia 53% konwersji. Pomimo, iż odzysk zastosowanej lipazy jest nie możliwy, to i tak biorąc pod uwagę 8-krotną oszczędność czasu (16 godz. zamiast 140 godz.) oraz koszt jej zakupu w porównaniu z immobilizowanym preparatem CAL-B, przewaga zaprojektowanej wielkolaboratoryjnej syntezy jest dość znaczna. Dodatkowo, zbędny rotamer (*S,R*)-**54a**/*(S,R)*-**54b** izolowany z wydajnością 52% oraz 85% ee przekształcany jest w 6-etapowej procedurze z użyciem tanich odczynników ponownie do *rac-cis*-**53** z łączną wydajnością wynoszącą 75%.

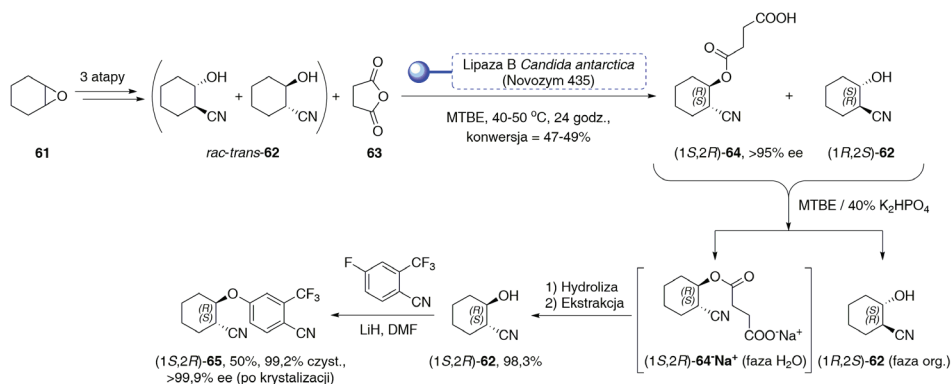


Schemat 16. Chemoenzymatyczna synteza (4*aS*,7*aS*)-oktahydro-1*H*-pirolo[3,4-*b*]pirydyny [(*S,S*)-**55**] katalizowana przez Addzyme CAL-B

Scheme 16. Chemoenzymatic synthesis of (4*aS*,7*aS*)-octahydro-1*H*-pyrulo[3,4-*b*]pyridine [(*S,S*)-**55**] catalyzed by Addzyme CAL-B

Lipaza CAL-B znalazła również zastosowanie w przemysłowej produkcji 4-[(1*R*,2*S*)-2-cyjanocykloheksyloksy]-2-(trifluorometylo)benzonitrylu [(1*S*,2*R*)-**65**] (Schemat 17) – antagonisty receptora androgenowego stosowanego w profilaktyce i leczeniu łysienia typu męskiego oraz tzw. łysienia plackowatego [63]. Firma *Pfizer Inc.* zastosowała jako substrat racemiczny *trans*-2-hydroksycykloheksanokarbonitryl (*rac-trans*-**62**) otrzymywany z tlenku cykloheksenu (**61**) na drodze prostej trzy etapowej syntezy. Rozdział kinetyczny kluczowej cyjanohydryny *rac-trans*-**62** z użyciem bezwodnika kwasu bursztynowego (dihydrofurano-2,5-dionu) (**63**) katalizowany Novozymem 435 pozwolił na selektywne otrzymanie hemibursztynianu

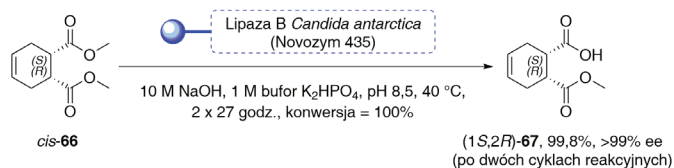
(1*S*,2*R*)-**64** o bardzo wysokim nadmiarze enancjomerycznym (>95% ee). Co więcej, związek ten (1*S*,2*R*)-**64** wydzielano w praktyczny i efektywny sposób za pomocą prostej ekstrakcji z użyciem zasadowego 40% wodnego roztworu wodorofosforanu(V) dipotasu. Następnie, po doprowadzeniu pH roztworu do odczynu kwaśnego, izolowany półprodukt (1*S*,2*R*)-**64** poddawano hydrolizie oraz ekstrakcji rozcieńczonym kwasem solnym, otrzymując (1*S*,2*R*)-**62** z bardzo wysoką wydajnością (>98%), by wykorzystać go w kolejnym etapie jako czynnik nukleofilowy w reakcji substytucji 4-fluoro-2-(trifluorometylo)benzonitrylu. Finalny produkt (1*S*,2*R*)-**65** krystalizowano kilkakrotnie, uzyskując związek enancjomerycznie czysty (>99,9% ee) z wydajnością 50% oraz czystością sięgającą 99,2% według GC.



Schemat 17. Chemoenzymatyczna synteza antagonisty receptora androgenowego (1*S*,2*R*)-**65** z użyciem Novozymu 435

Scheme 17. Chemoenzymatic synthesis of androgen receptor antagonist (1*S*,2*R*)-**65** catalyzed by Novozym 435

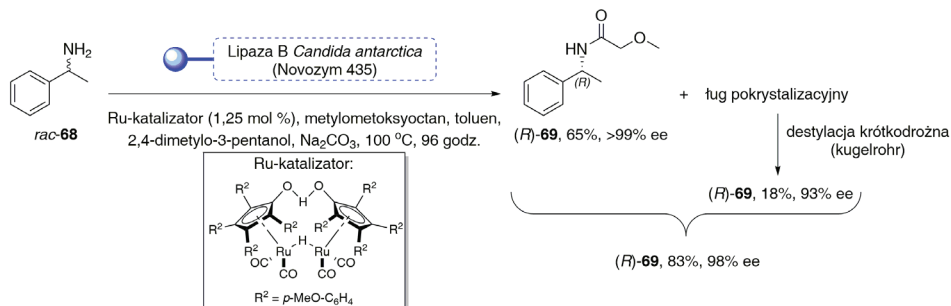
Immobilizowana CAL-B (Novozym 435) została wykorzystana przez *Bristol-Myers Squibb* w przemysłowej metodzie otrzymywania chiralnego nieracemicznego monoestru kwasu (1*S*,2*R*)-2-(metoksykarbonylo)cykloheks-4-en-1-karboksylowego [(1*S*,2*R*)-**67**] – półproduktu w syntezie potencjalnego leku – modulatora receptora chemokinowego (Schemat 18) [64]. Stereoselektywną desymetryzację komercyjnie dostępnego diestru *cis*-**66** przeprowadzono za pomocą 10 M wodnego roztworu wodorotlenku sodu w 1 M roztworze buforu (wodorofosforanu dipotowego) w obecności wyżej wymienionej lipazy. Zoptymalizowana biokatalityczna procedura pozwoliła praktycznie w sposób ilościowy (99,8%) z 3,42 kg diestru *cis*-**66** otrzymać 3,15 kg enancjomerycznie czysty monoester (1*S*,2*R*)-**67** (>99% ee).



Schemat 18. Stereoselektywna desymetryzacja dimetylo cykloheks-4-en-*cis*-1,2-dikarboksylanu (*cis*-**66**) katalizowana Novozymem 435

Scheme 18. Stereoselective desymmetrization of dimethyl cyclohex-4-en-*cis*-1,2-dicarboxylate (*cis*-**66**) catalyzed by Novozym 435

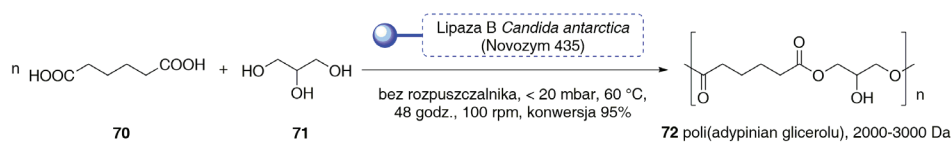
Z kolei, Bäckvall i współpracownicy z Uniwersytetu Sztokholmskiego opracowali procedurę dynamicznego rozdziału kinetycznego (DKR) racemicznej 1-fenyletyloaminy (*rac*-**68**) – chiralnego bloku budulcowego popularnie stosowanego w syntezie organicznej (Schemat 19) [65]. Istotą tego procesu jest zastosowanie podwójnego systemu katalizatorów: (i) CAL-B celem enancjoselektywnej transestryfikacji racemicznej aminy *rac*-**68** estrem metylowym kwasu metylometoksyoctowego oraz (ii) katalizatora metaloorganicznego zawierającego ruten [tzw. kompleksu Shvo; $\{[(\eta^5\text{-Ph}_4\text{C}_4\text{CO})_2\text{H}]\text{Ru}_2(\text{CO})_4(\mu\text{-H})\}$] celem wtórnej racemizacji *in situ* wolniej reagującej (*S*)-aminy. Proces prowadzony w temperaturze 100°C w toluenie z dodatkiem 2,4-dimetylo-3-pentanolu jako donora wodoru, w środowisku zasadowym, pozwala w sposób niezmiernie efektywny otrzymać enancjomerycznie czysty (*R*)-2-metoksy-*N*-(1-fenyletylo)acetamid [(*R*)-**69**] (>99% ee) z wydajnością 65% po krystalizacji. Dodatkową ilość amidu (*R*)-**69** odzyskano z ługów pokryształizacyjnych, poddając je destylacji krótkodrożnej z zastosowaniem tzw. Kugelrohr. Po połączeniu obu frakcji zawierających amid otrzymano pożądany produkt (*R*)-**69** o nadmiarze enancjomerycznym wynoszącym 98% oraz całkowitej wydajności 83%. Ze względu na bardzo dużą efektywność opracowanej metody, wydaje się wielce prawdopodobne, że jej komercjalizacja jest tylko kwestią czasu.



Schemat 19. Dynamiczny rozdział kinetyczny racemicznej 1-fenyletyloaminy (*rac*-**68**) katalizowany Novozymem 435 oraz tzw. kompleksem Shvo

Scheme 19. Dynamic kinetic resolution of racemic 1-phenylethylamine (*rac*-**68**) catalyzed by Novozym 435 and so-called Shvo's complex

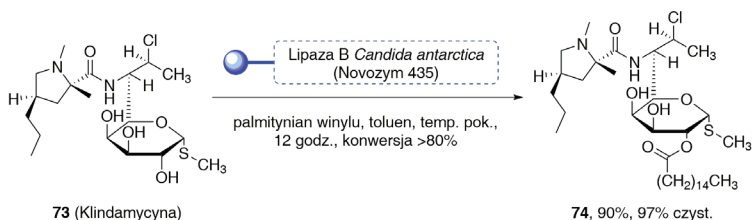
Wiele jest informacji dotyczących typowych procesów chemicznych z udziałem lipaz, natomiast zastosowanie tych enzymów w przemysłowej polimeryzacji i polikondensacji notuje się stosunkowo rzadko, chociaż wiadomo, że polimery naturalne wytwarzane są *in vivo* właśnie z udziałem enzymów. Hilterhaus i współpracownicy z Politechniki Hamburgskiej wraz z inżynierami z firmy *Bayer MaterialScience AG* opracowali w skali 0,5 kg syntezę poli(adypinianu glicerolu) (**72**) z kwasu adypinowego (**70**) oraz glicerolu (**71**, Schemat 20) [66]. Procesy estryfikacji i polimeryzacji katalizowane Novozymem 435 w warunkach bezrozpuszczalnikowych w temperaturze 60°C oraz pod ciśnieniem <20 mbar pozwalają otrzymać pożądany polimer **72** o średniej masie cząsteczkowej 2000–3000 Da z bardzo wysoką 95% konwersją osiąganą w relatywnie krótkim czasie (48 godz.).



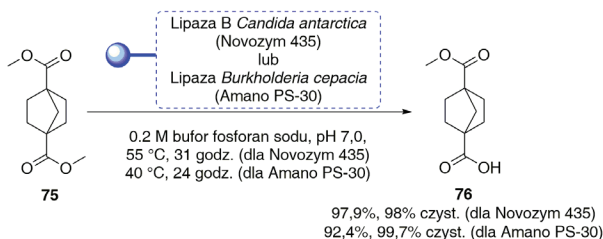
Schemat 20. Chemoenzymatyczna synteza poli(adypinianu glicerolu) (**72**) katalizowana Novozymem 435

Scheme 20. Chemoenzymatic synthesis of poly(glycerol adipate) (**72**) catalyzed by Novozym 435

Palmitynian klindamycyny (**74**) jest pro-lekiem znanego półsyntetycznego antybiotyku z grupy linkozamidów o udowodnionej efektywności w działaniu przeciwko bakteriom Gram-(+) oraz beztlenowym bakteriom Gram(-). Ponadto stosowany jest jako antybiotyk pierwszego rzutu w zwalczaniu zakażeń gronkowcem złocistym opornym na metycylinę (MRSA). Chemiczna synteza palmitynianu klindamycyny (**74**) jest bardzo nieefektywna (łączna wydajność nie przekracza 50%) oraz wymaga dużego nakładu czasu ze względu na konieczność stosowania szeregu procedur polegających na selektywnym zabezpieczeniu i odbezpieczeniu grup funkcyjnych antybiotyku **73** celem monoacylowania tylko jego grupy 2'-hydroksylowej. Zaproponowana przez chińskich naukowców jednoetapowa regioselektywna transestryfikacja klindamycyny (**73**) palmitynianem winylu katalizowana Novozymem 435 zawieszonym w toluenie pozwoliła osiągnąć konwersję 90% w zaledwie 12 godzin, a dodatkowym jej atutem jest to, iż prowadzona jest w bardzo łagodnych warunkach w temperaturze pokojowej (Schemat 21) [67]. Czystość otrzymanego monoestru **74** potwierdzona za pomocą chromatografii gazowej wynosiła 97% i jest w pełni zgodna z farmakopealnymi wymogami dla tego leku.

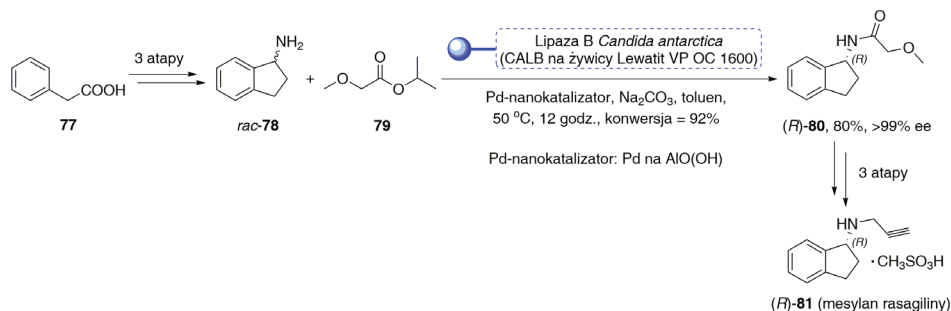
Schemat 21. Regioselektywna transestryfikacja klindamycyny (**73**) katalizowana Novozymem 435Scheme 21. Regioselective transesterification of clindamycin (**73**) catalyzed by Novozym 435

Lipaza B z *Candida antarctica* okazała się również bardzo użytecznym katalizatorem regioselektywnej hydrolizy estru dimetylowego kwasu bicyclo[2.2.1]heptano-1,4-dikarboksylowego (**75**) opracowanej przez *Bristol-Myers Squibb* (Schemat 22) [68]. Początkowo jako katalizator tej reakcji stosowano immobilizowaną lipazę izolowaną z *Burkholderia cepacia* (Amano PS-30), która hydrolizowała diester **75** do odpowiedniego monoestru metylowego **76** z wydajnością >92%. Jednakże po zastąpieniu jej Novozymem 435, monoester **76** otrzymano z jeszcze lepszą wydajnością 98%. W stosowanej skali produkcyjnej otrzymuje się 100 kg monoestru **76** o czystości 98% z wydajnością 98%. Reakcja ta przebiega z taką selektywnością, że na dzień dzisiejszy nie posiada ona konkurencji ze strony metod chemicznych.

Schemat 22. Regioselektywna hydroliza estru dimetylowego kwasu bicyclo[2.2.1]heptano-1,4-dikarboksylowego (**75**) katalizowana Novozymem 435Scheme 22. Regioselective hydrolysis of dimethyl bicyclo[2.2.1]heptane-1,4-dicarboxylate (**75**) catalyzed by Novozym 435

Kolejnym przykładem zastosowania CAL-B jako katalizatora przekształceń stereoselektywnych jest chemoenzymatyczna synteza enancjomerycznie czystego mesylanu rasagiliny [(*R*)-**81**] – leku stosowanego w terapii choroby Parkinsona (Schemat 23) [69]. Opracowana przez chińskich naukowców z Szanghajskiego Uniwersytetu Farmaceutycznego metoda syntezy bazuje na dynamicznym rozdziale kinetycznym (DKR) enancjomerów racemicznej 2,3-dihydro-1-indanoaminy (*rac*-**78**) – otrzymywanej w prosty sposób z handlowo dostępnego kwasu fenylooctowego (**77**). Kluczowy etap polega na zastosowaniu CAL-B immobilizowanej na żywicy Lewatit VP OC 1600, katalizującej rozdział kinetyczny aminy *rac*-**78** polegający na enancjoselektywnym jej acylowaniu metoksyoctanem *izo*-propylu w obecności nanokatalizatora palladowego odpowiedzialnego za racemizację *in situ*

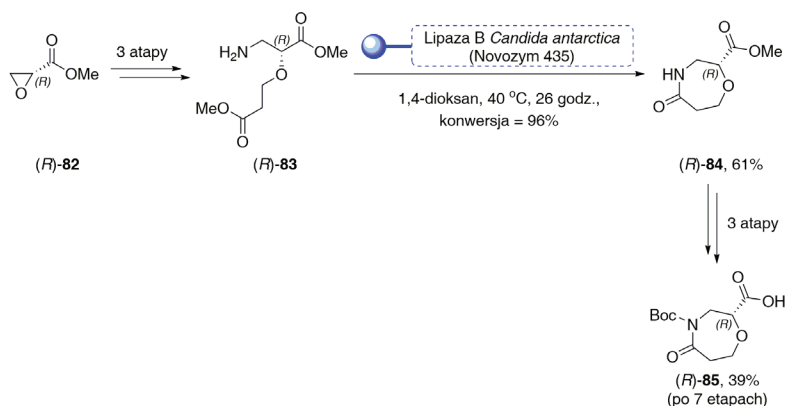
nieprzereagowanego (*S*)-enancjomeru **78**. Chiralny nieracemiczny półprodukt – (*R*)-*N*-(2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)-2-metoksyacetamid [(*R*)-**80**] – otrzymywano z doskonałym nadmiarem enancjomerycznym (>99% ee) oraz bardzo wysoką wydajnością (80%). Technologia produkcji optycznie czynnego mesylanu rasagiliny [(*R*)-**81**] została opracowana w skali 73 g (200 g/litr) i po 7 etapach syntezy uzyskiwano czysty enancjomerycznie produkt (99,9% ee) z całkowitą wydajnością 25%.



Schemat 23. Chemoenzymatyczna synteza mesylanu rasagiliny [(*R*)-**81**] katalizowana CAL-B immobilizowaną na żywicy Lewatit VP OC 1600

Scheme 23. Chemoenzymatic synthesis of rasagiline mesylate [(*R*)-**81**] catalyzed by CAL-B immobilized on Lewatit VP OC 1600 resin

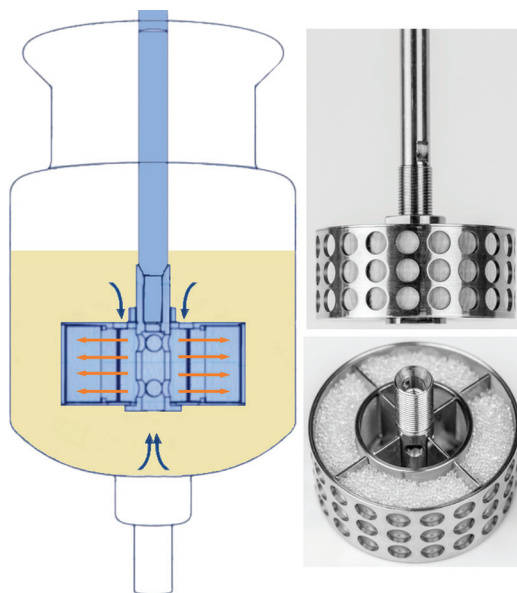
Natomiast szwedzcy naukowcy z firmy farmaceutycznej *AstraZeneca R&D* opracowali wielogramową 7-etapową wydajną syntezę kwasu (2*R*)-4-(*tert*-butoxycarbonylo)-1,4-oksazepano-2-karboksylowego [(*R*)-**85**] – popularnego syntenu używanego przy projektowaniu oraz produkcji nowych leków (Schemat 24) [70].



Schemat 24. Regioselektywna laktonizacja estru metylowego kwasu (2*R*)-3-amino-2-(3-metoksy-3-oksopropoxy)propanowego [(*R*)-**83**] katalizowana Novozymem 435

Scheme 24. Regioselective lactamization of methyl (2*R*)-3-amino-2-(3-methoxy-3-oxopropoxy)-propanoate [(*R*)-**83**] catalyzed by Novozym 435

Substratem w tym procesie był handlowo dostępny ester metylowy kwasu (2*R*)-glicydowego [(*R*)-**82**], a całkowita wydajność syntezy (*R*)-**85** wynosiła 39%. Kluczowym etapem procesu jest regioselektywna laktonizacja optycznie czynnego estru metylowego kwasu (2*R*)-3-amino-2-(3-metoksy-3-oksopropoksy)propanowego [(*R*)-**83**]. Amino diester (*R*)-**83** poddawano wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji w 6-członowy laktam (*R*)-**84** z wydajnością 61%, konwersją 96% w ciągu 26 godzin, używając do tego celu lekko ogrzewanej (40°C) zawiesiny 40% (w/w) Novozymu 435 w 1,4-dioksanie. Warte podkreślenia jest zastosowanie unikatowego systemu mieszającego – tzw. *SpinChem rotating flow cell technology* (Rys. 4) – który co prawda nie przyspieszył znacznie reakcji, ale pozwolił zachować dużo większą stabilność użytego katalizatora.

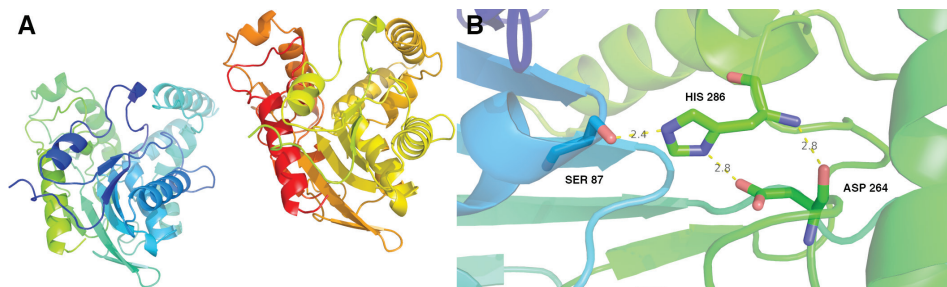


Rysunek 4. System mieszania typu *SpinChem rotating flow cell technology*
Figure 4. *SpinChem rotating flow cell technology* – stirring system type

2. PROCESY KATALIZOWANE PRZEZ LIPAZĘ Z *BURKHOLDERIA CEPACIA* (BCL)

Enzymem obecnie drugim co do częstości stosowania w małotonazowych produkcjach przemysłowych, głównie preparatów specjalnych oraz farmaceutycznych, jest lipaza izolowana z nieprzetrwalnikującej Gram(-) bakterii *Burkholderia cepacia* (BCL) (niegdyś *Pseudomonas cepacia*, PCL). Lipaza ta jest wykorzystywana jako biokatalizator do wysoce enancjoselektywnych przekształceń w szczególności chiralnych drugorzędowych alkoholi [71, 72]. Wykazywana przez nią stereopre-

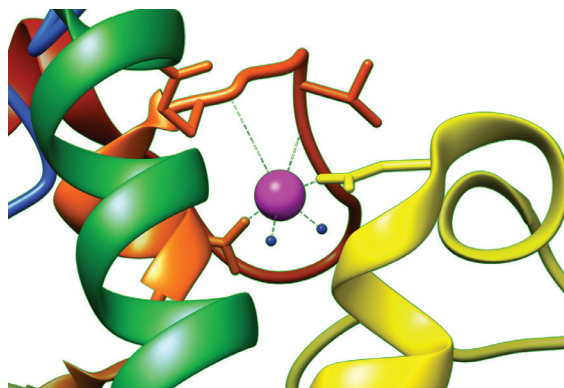
ferencja determinowana jest przez budowę substratu, podczas gdy jej stereoselektywność zależy wyłącznie od interakcji pomiędzy atomami centrum aktywnego oraz substratu [73, 74]. Trójwymiarowa struktura tego białka (PDB ID: 1OIL oraz 2LIP) została wyznaczona oraz opublikowana po raz pierwszy w roku 1997 przez dwie niezależnie pracujące grupy badawcze [75, 76]. Obecnie większość badań nad mechanizmem działania BCL odbywa się z wykorzystaniem struktury rentgenograficznej o otwartej konformacji oraz najlepszej uzyskanej jak dotąd dla lipaz rozdzielczości kryształu (1,10 Å) (PDB ID: 1YS1) opublikowanej przez zespół Profesora Kazlauskas'a (Rys. 5) [77]. Lipaza z *Burkholderia cepacia* jest białkiem o masie cząsteczkowej 33 kDa składającym się z 320 reszt aminokwasowych zawierającym jedną dużą C-domenę oraz dwie mniejsze domeny U1 oraz U2. Domena C posiada charakterystyczną topologię dla klasycznych α/β -hydrolaz z centralnie położoną β -kartką uformowaną z sześciu równoległe ułożonych pasm oflankowanych przez dwie α -helisy z jednej strony oraz cztery α -helisy z drugiej strony. Z kolei, domena U1 zawiera trzy α -helisy, a domena U2 dwie położone anty-równoległe względem siebie β -pasma oraz dwie α -helisy. Triada katalityczna składająca się z Asp 264, His 286 oraz Ser 87 ulokowana jest w C-terminalnym końcu centralnej β -kartki.



Rysunek 5. (A) Struktura 3D lipazy z *Burkholderia cepacia* (PDB ID: 1YS1). (B) Ułożenie przestrzenne reszt aminokwasowych (AK) wchodzących w skład tzw. „triady katalitycznej” (Asp 264, His 286, Ser 87) należącej do centrum aktywnego BCL (wzajemne odległości między AK podane zostały w Angstrmach). Struktura krystaliczna białka enzymatycznego została pobrana z bazy Protein Data Bank (PDB) oraz przetworzona za pomocą programu Pymol vs 0,99

Figure 5. (A) The 3D structure of lipase from *Burkholderia cepacia* (PDB ID: 1YS1). (B) The spatial orientation of the amino acid residues (AAs) in the so-called “catalytic triad” (Asp 264, His 286, Ser 87) belonging to the active-site of BCL (the mutual distance between the AAs are given in Angstroms). Crystal structure of enzymatic protein was downloaded from the Protein Data Bank (PDB), and processed using Pymol vs 0,99

Charakterystyczną cechą tej lipazy jest obecność kationu Ca^{2+} , który stabilizuje jej strukturę IV-rzędową poprzez oddziaływania z czterema atomami tlenu grup karbonylowych należących do Gln 292 i Val 296 oraz z tlenami grup bocznych reszt aminokwasowych Asp 242 i Asp 288, a także z dwoma cząsteczkami strukturalnej wody (Rys. 6).

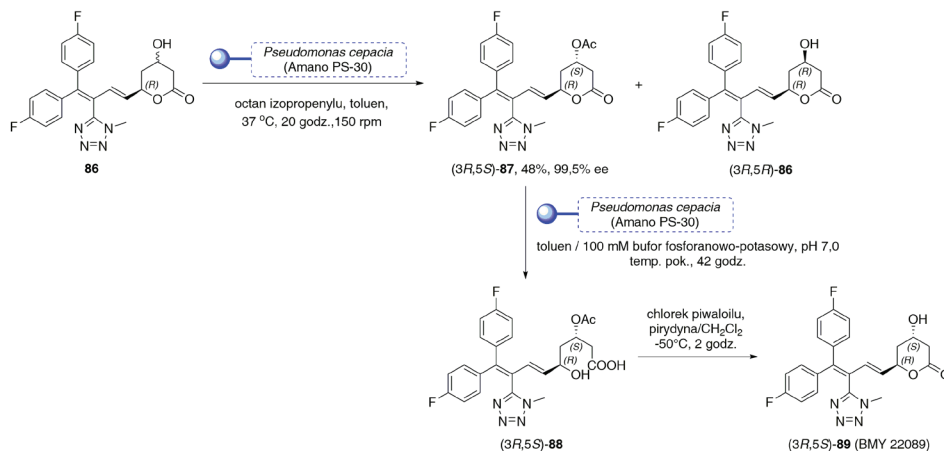


Rysunek 6. Oddziaływanie kationu Ca²⁺ (różowa, duża kula) z resztami aminokwasowymi Gln 292, Val 296, Asp 242, Asp288 lipazy z *Burkholderia cepacia* oraz dwoma cząsteczkami wody strukturalnej (niebieskie, małe kulki). Rysunek utworzony został za pomocą programu UCSF Chimera vs 1.9

Figure 6. The interaction between the Ca²⁺ cation (pink, big ball) and amino acid residues Gln 292, Val 296, Asp 242, Asp288 of lipase from *Burkholderia cepacia* and two molecules of structural water (blue, small balls). High-resolution graphic was generated with UCSF Chimera vs 1.9

Poniżej zaprezentowano kilka przykładów, gdzie BCL odgrywa kluczową rolę w otrzymywaniu niezwykle cennych substancji organicznych, których skala produkcyjna nie przekracza kilkudziesięciu kilogramów.

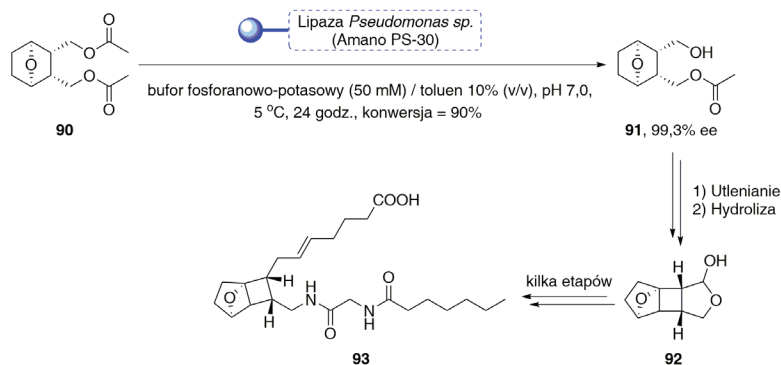
Lipaza z *Pseudomonas cepacia* immobilizowana na polipropylenowych perełkach Accurel PP (Amano PS-30) jest katalizatorem w opracowanej przez firmę *Bristol-Meyers Squibb* przemysłowej produkcji inhibitora reduktazy 3-hydrokso-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA) – [(3*R*,5*S*)-**89**] (BMY 22089) (Schemat 25) [78] – posiadającego udowodnione działanie redukujące stężenia frakcji tzw. „złego” cholesterolu (LDL) w osoczu krwi [79]. Przeprowadzona w skali 2,56 kg (9 mM, 4 g×litr⁻¹) katalizowana enzymatycznie enancjoselektywna transestryfikacja laktonu **86** octanem izopropenyłu w warunkach kontroli kinetycznej w toluenie, umożliwiła otrzymanie odpowiedniego enancjomerycznie czystego octanu (3*R*,5*S*)-**87** (99,5% ee) z wydajnością 48% oraz czystością 99,4% wg GC. Stwierdzono doświadczalnie, że enzym użyty w tym procesie zachowywał pełną aktywność katalityczną podczas pięciu kolejnych cykli reakcyjnych. Wyizolowany chromatograficznie octan (3*R*,5*S*)-**87** hydrolizowany był w układzie dwufazowym bufor/toluen przy użyciu tego samego katalizatora (Amano PS-30), a powstały związek (3*R*,5*S*)-**88** poddano reakcji z chlorkiem piwaloilu w obecności pirydyny otrzymując ostatecznie pożądaną inhibitor (3*R*,5*S*)-**89**.



Schemat 25. Chemoenzymatyczna synteza inhibitora reduktazy HMG-CoA [(3R,5S)-89] z użyciem lipazy Amano PS-30

Scheme 25. Chemoenzymatic synthesis of HMG-CoA reductase inhibitor [(3R,5S)-89] by using Amano PS-30 lipase

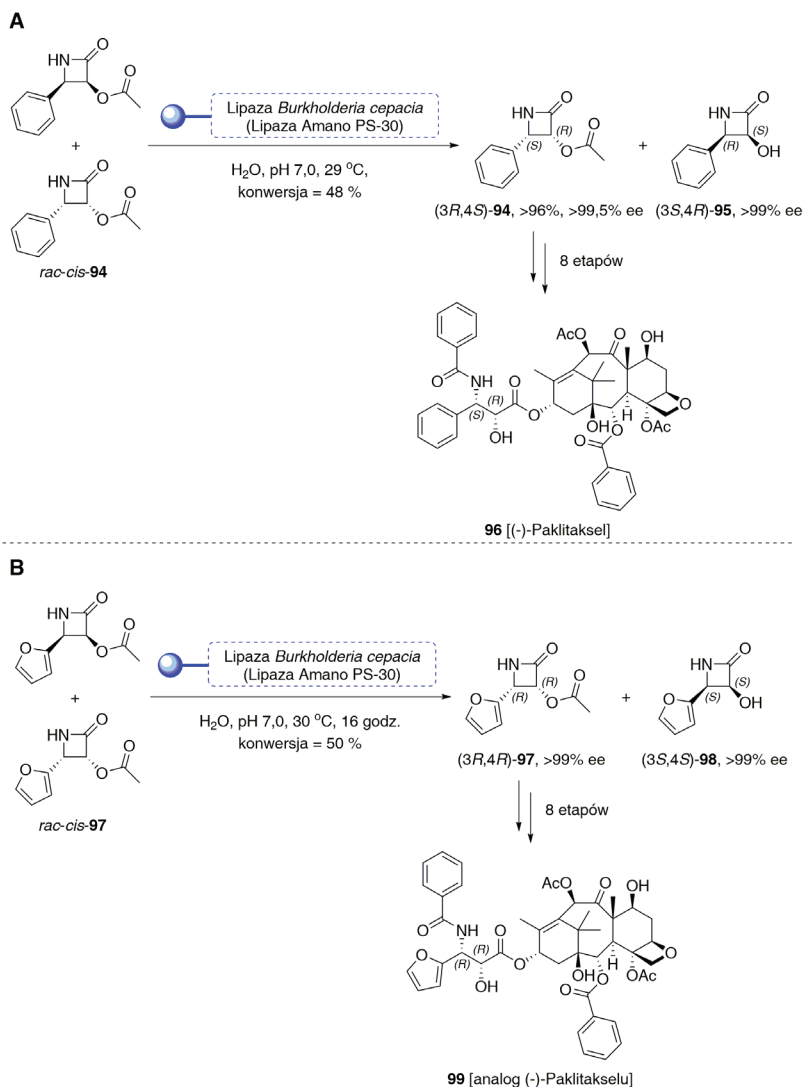
Koncern *Bristol-Myers Squibb* wykorzystuje także inny proces przemysłowy, w którym kluczową rolę odgrywa immobilizowana lipaza Amano PS-30. Jest nim stereoselektywna hydroliza dioctanu (**90**, Schemat 26) – półproduktu w syntezie **93** – skutecznego antagonisty tromboksanu A2, będącego środkiem silnie obkurczającym naczynia krwionośne [80]. Lipaza Amano PS-30 użyta w schłodzonym do 5°C układzie dwufazowym bufor/toluen katalizowała hydrolizę dioctanu **90** wysoce stereoselektywnie, pozwalając otrzymać monoocetan **91** o nadmiarze enancjometrycznym wynoszącym 99,3% z wydajnością rzędu 80%. Proces ten zoptymalizowano w skali 80 litrowej, używając 400 g substratu **90** (0,02 M, 5 g×litr⁻¹), a stosowany enzym nadawał się do powtórnego użytku w co najmniej pięciu kolejnych cyklach reakcyjnych. Pożądaný monoocetan **91** utleniono do odpowiedniego aldehydu, który następnie zhydrolizowano chemicznie otrzymując laktol **92**, a ten z kolei przekształcono w ostateczny produkt farmaceutyczny **93** w wyniku zastosowania kilku prostych reakcji chemicznych.



Schemat 26. Chemoenzymatyczna synteza chiralnego antagonisty tromboksanu A2 **93** katalizowana lipazą Amano PS-30

Scheme 26. Chemoenzymatic synthesis of thromboxane A2 antagonist **93** catalyzed by Amano PS-30 lipase

Kolejnym godnym uwagi procesem biokatalitycznym prowadzonym w *Bristol-Meyers Squibb*, wykorzystującym lipazę Amano PS-30, jest synteza popularnego cytostatyku o doskonałych właściwościach przeciwnowotworowych – (–)-paklitakselu (**96**, Schemat 27A) [81] oraz jego furanowego analogu **99** (Schemat 27B) [82]. Przedstawione poniżej syntezy opierają się w głównej mierze na enancjoselektywnej hydrolizie racemicznego octanu *cis*-azetydynonu (*rac-cis*-**94** lub *rac-cis*-**97**) katalizowanej immobilizowaną lipazą z *Burkholderia cepacia*. Oba rozdzielone kinetycznie diastereoizomery w postaci nieprzereagowanego (*R*)-octanu oraz powstałego (*S*)-alkoholu uzyskiwane są z doskonałymi nadmiarami enancjomerycznymi bliskimi 100% [nadmiary diastereizomeryczne (de) nie zostały dla tych związków podane]. Technologia syntezy (–)-paklitakselu (**96**) zaprojektowana została dla 150-litrowego reaktora, w którym enzymatycznej hydrolizie poddaje się racemiczny substrat *rac-cis*-**94** użyty w ilości 1,2 kg na szarżę (0,049 M, 10 g×litr⁻¹) ze stałą szybkością reakcji wynoszącą 0,12 g×litr⁻¹×godz.⁻¹. Dodatkową zaletą opracowanej technologii jest możliwość selektywnego wytrącania chiralnego półproduktu (3*R*,4*S*)-**94** za pomocą procedury stopniowego ochładzania mieszaniny reakcyjnej do temperatury 5°C. Stwierdzono, że zastosowanie względnie łagodnych warunków reakcji (H₂O; pH 7,0; 29–30°C) pozwala na użycie katalizatora w kolejnych 10 cyklach produkcyjnych bez jakichkolwiek widocznych spadków aktywności enzymu oraz czystości enancjomerycznej i wydajności otrzymywanego chiralnego związku (3*R*,4*S*)-**94**. Dalsza chemiczna hydroliza (*R*)-octanu (3*R*,4*S*)-**94** oraz kolejne 7 reakcji prowadzi do otrzymania odpowiednio (–)-paklitakselu (**96**) oraz jego analogu **99**.

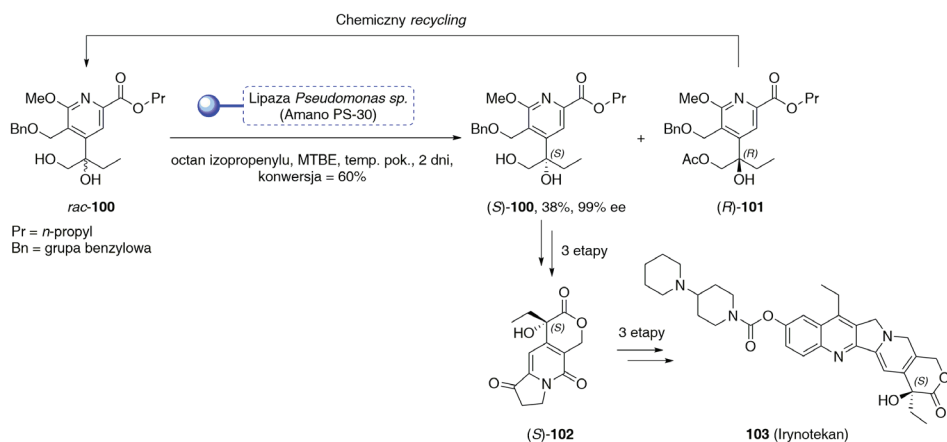


Schemat 27. Chemoenzymatyczna synteza (-)-paklitakselu (**96**) oraz jego analogu **99** z zastosowaniem lipazy Amano PS-30

Scheme 27. Chemoenzymatic synthesis of (-)-paclitaxel (**96**) and its analog **99** by using Amano PS-30 lipase

Innym przykładem komercyjnie realizowanego procesu wykorzystującego etap biokatalityczny z udziałem lipazy Amano PS-30 jest opracowana przez koncern *Yakult Pharmaceuticals* chemoenzymatyczna synteza irynotekanu (**103**, Schemat 28) [83]. Lek ten będący półsyntetyczną pochodną kamptotecyny jest powszechnie stosowany w terapiach agresywnych nowotworów jajnika oraz jelita grubego. Obecnie licencję na produkcję oraz jego sprzedaż odkupił amerykański koncern *Pharmacia and Upjohn Company*. Strategicznie ważny chiralny tricykliczny lakton (*S*)-**102**

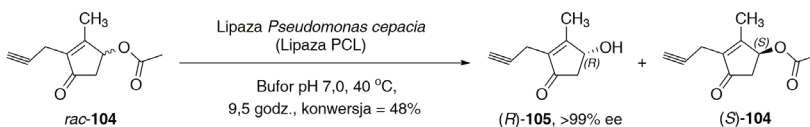
otrzymywany jest w trzy etapowej syntezie, w której diol (*S*)-**100** pełni rolę kluczowego półproduktu. Diol ten (*S*)-**100** otrzymywany jest w wyniku rozdziału kinetycznego racemicznego substratu *rac*-**100** za pomocą regio- oraz enancjo-selektywnej transestryfikacji z użyciem octanu izopropenyłu w obecności lipazy Amano PS-30. Warto dodać, że preparat enzymatyczny Amano PS-30, choć już sam w sobie jest immobilizowaną lipazą, to dodatkowo jeszcze został osadzony na Celicie 521. Reakcja enzymatyczna prowadzona była w eterze *tert*-butyloowo-metylowym (MTBE) w temperaturze pokojowej, a otrzymywany po dwóch dniach praktycznie enancjomerycznie czysty diol (*S*)-**100** (99% ee) z wydajnością 38% dla konwersji równej 60% nadawał się do dalszej funkcjonalizacji. Dla zbędnego enancjomeru (*R*)-**101** opracowano chemiczną metodę wtórnej racemizacji, co dodatkowo zwiększyło produktywność całego procesu. Przedstawiona niżej synteza została dostosowana do skali pilotażowej, a ilość produkowanego chiralnego diolu (*S*)-**100** wynosiła 35 kg z jednej szarży.



Schemat 28. Chemoenzymatyczna synteza irynotekanu (**103**) katalizowana lipazą Amano PS-30

Scheme 28. Chemoenzymatic synthesis of irinotecan (**103**) catalyzed by Amano PS-30 lipase

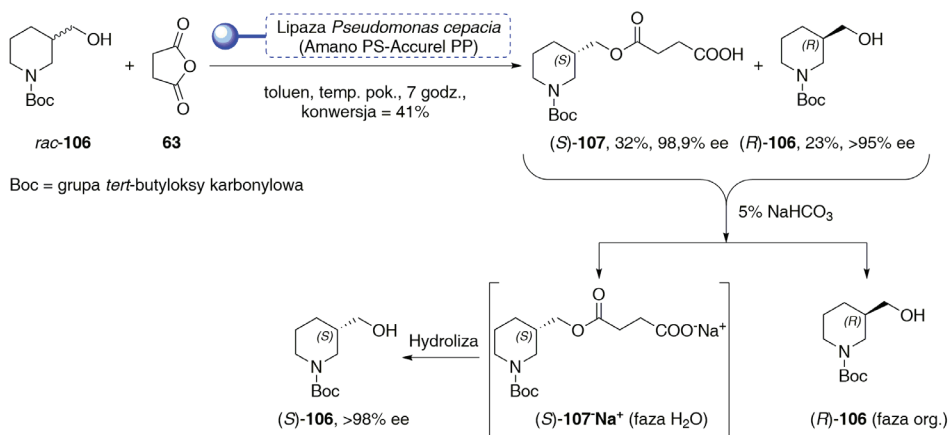
Jednym z nielicznych procesów przemysłowych, w którym stosuje się natywną lipazę z *Burkholderia cepacia* jest procedura opisana przez japońskich naukowców z Uniwersytetu Prefektury Shiga oraz inżynierów firmy *Sumitomo Chemical Co.* (Schemat 29) [84]. W tym przypadku współpraca na styku nauka-przemysł zaowocowała opracowaniem wydajnej asymetrycznej syntezy enancjomerycznie czystego (4*R*)-4-hydroksy-3-metylo-2-(prop-2-yn-1-yl)cyklopent-2-en-1-onu [(*R*)-**105**] prowadzonej w oparciu o rozdział kinetyczny racemicznego estru *rac*-**104** w reakcji enancjoselektywnej hydrolizy. Chiralny nieracemiczny alkohol (*R*)-**105** otrzymywany w bardzo łagodnych warunkach [roztwór buforowy pH 7,0; 40°C] oraz w relatywnie krótkim czasie (9,5 godzin) wykorzystywany jest następnie jako półprodukt w syntezie analogów hormonów juvenilnych – pyretroidów o doskonałych właściwościach owadobójczych oraz niskiej toksyczności wobec ssaków.



Schemat 29. Rozdział kinetyczny octanu 2-metylo-4-okso-3-propargilcyklopent-2-en-1-olu (*rac*-**104**) katalizowany natywną lipazą z *Burkholderia cepacia*

Scheme 29. Kinetic resolution of 2-methyl-4-oxo-3-propargylcyclopent-2-en-1-ol acetate (*rac*-**104**) catalyzed by native lipase from *Burkholderia cepacia*

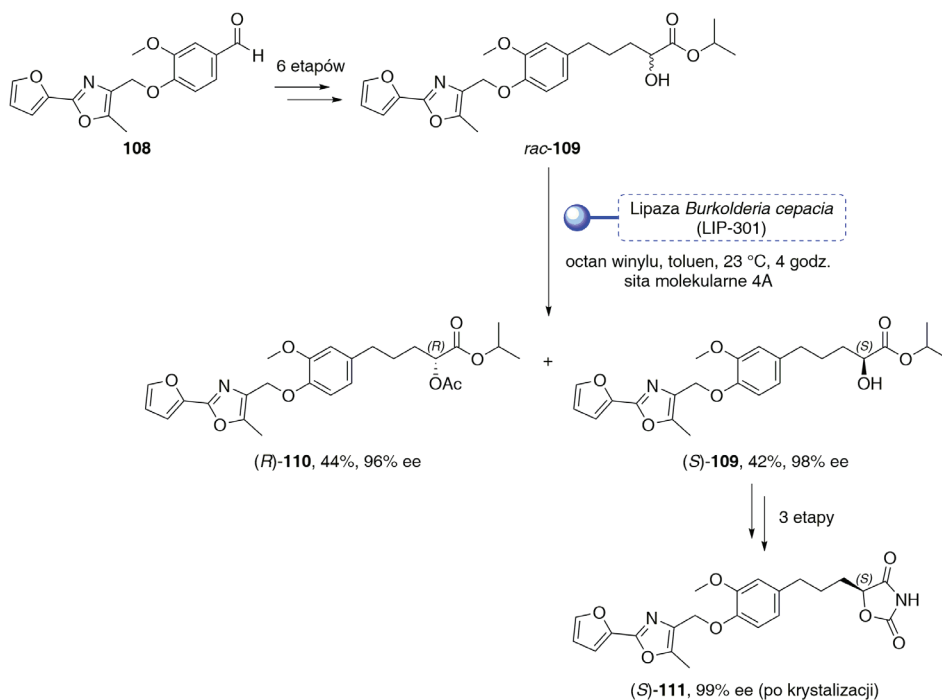
Opracowaniem technologii otrzymania (*R*)-*N*-(*tert*-butoksykarbonylo)-3-hydroksymetylopiperidyny [(*R*)-**106**] – ważnego półproduktu w syntezie inhibitora tryptazy jako potencjalnego leku w terapii mastocytozy oraz innych chorób alergicznych, zajmowano się w laboratoriach koncernu *Hoffmann la Roche*. Jednakże stosowanie klasycznych technik krystalizacyjnych z użyciem benzyłowych pochodnych kwasów winowych lub katalizy enzymatycznej za pomocą lipazy izolowanej z *Pseudomonas fluorescens* nie przyniosło pożądanych efektów. Straty ponoszone podczas krystalizacji diastereoizomerycznych soli kwasu winowego (wymagane min. 5 cykli) oraz w trakcie chromatografii w przypadku procesu biokatalitycznego, nie pozwoliły początkowo na komercjalizację tego procesu. Dopiero opracowana przez naukowców z *Bristol-Myers Squibb* procedura rozdziału kinetycznego racemicznej *N*-(*tert*-butoksykarbonylo)-3-hydroksymetylopiperidyny (*rac*-**106**) z użyciem bezwodnika kwasu bursztynowego (**63**) wobec lipazy Amano PS immobilizowanej na Accurel PP, zawieszanej w toluenie, umożliwiła nie tylko otrzymanie obu form stereoizomerycznych wyjściowego alkoholu o wysokiej czystości enancjomerycznej (*S*)-**107** (98,9% ee) oraz (*R*)-**106** (>95% ee), ale także prostą ich izolację z mieszaniny poreakcyjnej za pomocą ekstrakcji z użyciem 5% wodnego roztworu NaHCO_3 (Schemat 30) [85]. Oddzieloną sól sodową hemibursztynianu (*S*)-**107** Na^+ wprowadzono w kwas, który następnie poddawano hydrolizie, aby otrzymać ostateczny produkt (*S*)-**106** o bardzo wysokim enancjomerycznym wzbogaceniu (>98% ee). Zaprojektowana technologia jest bardzo wydajna i prowadzona w 3 litrowym reaktorze mieszalnikowym pozwala na użycie 255 g substratu *rac*-**106** (0,46 M, 99 $\text{g} \times \text{litr}^{-1}$).



Schemat 30. Enzymatyczny rozdział kinetyczny *N*-(*tert*-butoksykarbonylo)-3-hydroksymetylopiperydyny (*rac*-**106**) katalizowany lipazą Amano PS immobilizowaną na Accurel PP

Scheme 30. Enzymatic kinetic resolution of *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-hydroxymethyl piperidine (*rac*-**106**) catalyzed by Amano PS lipase immobilized on Accurel PP

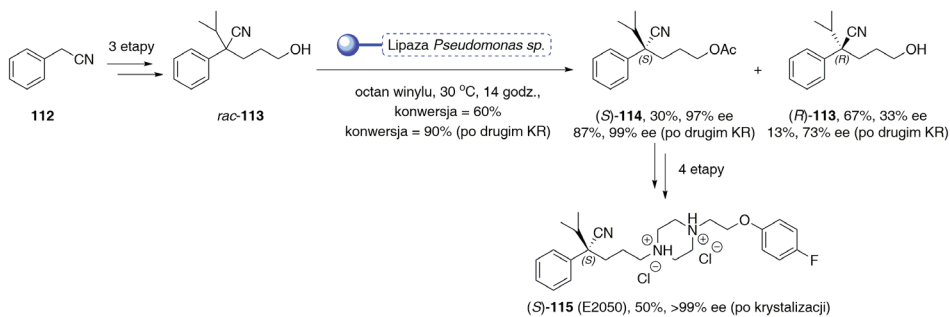
Z kolei na Schemacie 31 przedstawiono proces z udziałem immobilizowanej lipazy z *Burkholderia cepacia* (LIP-301 – *Toyobo Corporation*). Jest to opracowana przez japońską firmę *Takeda Chemical Industries, Ltd.* technologia otrzymywania optycznie czynnej pochodnej 2,4-oksazolidynodionu (*S*)-**111** – związku obniżającego poziom glukozy we krwi [86]. Asymetryczne *O*-acetylowanie racemicznego alkoholu *rac*-**109** prowadzone w temperaturze 23°C za pomocą octanu winylu katalizowane lipazą LIP-301 w obecności sit molekularnych 4 Å zawieszonych w toluenie pozwoliło w ciągu zaledwie 4 godzin otrzymać alkohol (*S*)-**109** oraz octan (*R*)-**110** o bardzo wysokim nadmiarze enancjomerycznym rzędu 96–98% oraz izolowanej wydajności z zakresu 42–44%. Wydzielony chromatograficznie alkohol (*S*)-**109** poddano następnie prostym przekształceniom chemicznym, w wyniku których po krystalizacji z mieszaniny aceton/2-propanol otrzymano niemal czysty enancjomerycznie produkt (*S*)-**111** (99% ee). Kluczowy etap enzymatycznego rozdziału kinetycznego *rac*-**109** przeprowadzony był dla skali 33 gramowej.



Schemat 31. Chemoenzymatyczna synteza nieracemicznej pochodnej 2,4-oksazolidynodionu (S)-111 katalizowana lipazą LIP-301

Scheme 31. Chemoenzymatic synthesis of non-racemic 2,4-oxazolidinedione derivative (S)-111 catalyzed by LIP-301 lipase

Firma *Eisai Co., Ltd.* jest twórcą technologii produkcji dichlorowodoru pochodnej piperazyny [(S)-155] (E2050) – selektywnego antagonisty kanału wapniowego – leku stosowanego w terapiach chorób układu krążenia (Schemat 32) [87]. Zśród wielu przetestowanych lipaz w procesie rozdziału kinetycznego racemicznego 4-cyjano-5-metylo-4-fenylheksanolu (*rac*-113) najbardziej efektywnym pod względem enancjoselektywności oraz szybkości konwersji substratu okazał się immobilizowany preparat enzymatyczny firmy *Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Japan)* z *Pseudomonas* sp. Lipaza ta katalizowała przekształcenie 18 g *rac*-113 w taki sposób, że optycznie czynny nieprzereagowany alkohol (R)-113 otrzymywano z przeciętnym nadmiarem enancjomerycznym (33%), a powstały octan (S)-114 z 97% ee dla konwersji równej 60%. Z powodu mało satysfakcjonujących wyników postanowiono usprawnić proces biotransformacji, stosując podwójny rozdział kinetyczny. Dzięki tej operacji uzyskiwano praktycznie enancjomerycznie czysty ester (S)-114 (99% ee) z bardzo dobrą wydajnością rzędu 87%. Dalsze chemiczne transformacje chiralnego octanu (S)-114 przeprowadzono w sposób wydajny (pierwsze trzy z czterech etapów wykonano w jednym reaktorze, w tzw. procedurze „one-pot”), otrzymując enancjomerycznie czysty produkt (S)-115 (>99% ee) po krystalizacji z łączną wydajnością 50%.



Schemat 32. Chemoenzymatyczna synteza selektywnego antagonisty kanału wapniowego (S)-115 (E2050) z użyciem immobilizowanej lipazy z *Pseudomonas* sp.

Scheme 32. Chemoenzymatic synthesis of the neuron-selective Ca^{2+} channel blocker (S)-115 (E2050) by using immobilized lipase from *Pseudomonas* sp.

Kolejnym przykładem użycia BCL jako efektywnego katalizatora przekształceń asymetrycznych jest chemoenzymatyczna technologia produkcji znanego fungicydu – metalaksylu [(R)-118] (Schemat 33) [88]. Bezpośrednim powodem opracowania enzymatycznej ścieżki syntezy tego związku była chęć zastąpienia metody bazującej na chiralnych chemicznych katalizatorach, która nie nadawała się do procedury powiększenia skali, a do tego optycznie czynny produkt (R)-118 uzyskiwany tą drogą był niewystarczająco czysty enancjomerycznie (95% ee). Zadania zmodernizowania technologii jego produkcji podjęli się naukowcy z koncernu *LG Chem, Ltd.*, którzy zastosowali rozdział kinetyczny racemicznego estru 2-metoksyetylowego *N*-(2,6-dimetylofenylo)alaniny (*rac*-116) w reakcji enancjoselektywnej hydrolizy w układzie dwufazowym bufor/toluen katalizowanej immobilizowanym preparatem enzymatycznym Lipase PS na Sepabead EC-Butyl. Niewątpliwą zaletą zaprojektowanej technologii jest możliwość nieskomplikowanej izolacji z mieszaniny poreakcyjnej powstającego enancjomerycznie wzbogaconego kwasu (R)-117 (96% ee) za pomocą ekstrakcji z użyciem 30% NaOH. Otrzymywany z wydajnością 34% kwas (R)-117 przekształcany jest następnie w finalny produkt (R)-118, a nieprzereagowany ester (S)-116, po racemizacji za pomocą aldehydu masłowego (tworzy z grupą aminową zasadę Schiffa ulegającą dynamicznej tautomerizacji z migracją atomu wodoru przy centrum stereogenicznym) wykorzystywany jest powtórnie w tym procesie. Szarża zoptymalizowana została dla skali 20 litrowej, w której używa się 4 kg substratu *rac*-116, a enzym stosowany w tym procesie zachowuje swoją pełną funkcjonalność katalityczną nawet po 20 cyklach reakcyjnych.

nej strukturze chemicznej [w tym skomplikowanych mieszanin (stereo)izomerów i/lub substancji posiadających w swej budowie cząsteczkowej liczne grupy funkcyjne o różnorodnej reaktywności], tam nie ma praktycznie żadnej alternatywy wobec biokatalizy enzymatycznej. Toteż jeśli zależy nam na zwiększeniu konkurencyjności oraz innowacyjności naszej gospodarki, rozwój badań nad możliwością zastosowania metod biokatalitycznych w zaawansowanych technologiach otrzymywania związków o wysokiej wartości dodanej oraz system kształcenia w tym zakresie powinny być zdecydowanie progresywne.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki jako projekt badawczy nr 2014/13/N/ST5/01589. Autor pragnie dodatkowo podziękować za częściowe wsparcie finansowe ze strony projektu pt.: „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” POIG.01.03.01-00-158/09 finansowanego ze środków Unii Europejskiej oraz anonimowym recenzentom za ich cenne wskazówki.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Ghanem, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 1721.
- [2] R.J. Hickey, R.H. Vaughn, *Industrial fermentation: Chapter 17-Acetic acid (vinegar)*, Vol 1. New York: Chemical Publishing Co., Inc. 1954, str. 498.
- [3] P.-L. Show, T.-C. Ling, J.C.-W. Lan, B.-T. Tey, R.N. Ramanan, S.-T. Yong, C.-W. Ooi, *Curr. Org. Chem.*, 2015, **19**, 19.
- [4] G. Yang, Y. Ding, *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, **22**, 5604.
- [5] L. Bora, D. Gohain, R. Das, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2013, **88**, 1959.
- [6] M.T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 12480.
- [7] M. Marciello, M. Filice, J.M. Palomo, *Catal. Sci. Technol.*, 2012, **2**, 1531.
- [8] K.-E. Jaeger, T. Eggert, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, **13**, 390.
- [9] C. Schmidt-Dannert, *Bioorg. Med. Chem.*, 1999, **7**, 2123.
- [10] J.R. Green, *Proc. Roy. Soc.*, 1890, **48**, 370.
- [11] C. Eijkman, *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene*, 1901, **29**, 841.
- [12] S. Thakur, *Int. J. Sci. Eng. Res.*, 2012, **3**, 1.
- [13] R. Sharma, Y. Chisti, U. C. Banerjee, *Biotechnol. Adv.*, 2001, **19**, 627.
- [14] K.-E. Jaeger, B.W. Dijkstra, M.T. Reetz, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1999, **53**, 315.
- [15] R.D. Schmid, Verger, R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, **37**, 1608.
- [16] *Prof. Dr. Ernest A. Sym (1893-1950)*, *Biul. Państw. Inst. Med. Morsk. Trop. J. w Gdańsku*, 1952, **4**, 3.
- [17] E. Mikulaszek, *Gruźl.*, 1951, **4**, 430.
- [18] S. Nyrek, *Med. Wet.*, 1954, 40.
- [19] W. Mozołowski, *Pol. Tyg. Lek.*, 1950, **5**, 1633.
- [20] E. Mikulaszek, *Rocz. Tow. Nauk. Warsz.*, 1950, **R.43**, 216.
- [21] E.A. Sym, *Biochem. J.*, 1936, **30**, 609.

- [22] E.A. Sym, *Enzymologia*, 1936, **1**, 156.
- [23] E.A. Sym, *Biochem. Z.*, 1933, **258**, 304.
- [24] E.A. Sym, *Biochem. Z.*, 1931, **230**, 19.
- [25] E.A. Sym, *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1265.
- [26] E.A. Sym, *Biologia Lekarska*, 1936, **R.15 nr 6**, 245.
- [27] M.H. Coleman, A.R. Macrae, *Fat process and composition*, 1980, GB 1577933.
- [28] M. Takaharu, S. Norio, H. Yukio, H. Wataru, *Method for enzymatic interesterification of lipid and enzyme used therein*, 1981, EP 0035883.
- [29] A. Zaks, A.M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1985, **82**, 3192.
- [30] M. Masayoshi, K. Tadashi, *Optically active 4-hydroxy-2-cyclopentenones, and their production*, 1988, US 4729953.
- [31] M.A. Robin, P.F. Bolton, C.I. Christopher, *Transesterification*, 1990, EP 0417823.
- [32] J. Whittall, P. Sutton, *Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations 2*, John Wiley & Sons 2012.
- [33] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Second Edition, Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland 2006.
- [34] C.T. Hou, *Handbook of Industrial Biocatalysis*, CRS Press, Taylor & Francis Group, LCC 2005.
- [35] N. End, K.U. Schoning, *Immobilized Biocatalysts in Industrial Research and Production w Topics in Current Chemistry*, 2004, 242, 273, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004.
- [36] A. Idris, A. Bukhari, *Biotechnol. Adv.*, 2012, **30**, 550.
- [37] O. Kirk, M.W. Christensen, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2002, **6**, 446.
- [38] E.M. Anderson, K.M. Larsson, O. Kirk, *Biocatal. Biotransfor.*, 1998, **16**, 181.
- [39] J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar, T.A. Jones, *Structure*, 1994, **2**, 293.
- [40] J. Uppenberg, S. Patkar, T. Bergfors, T.A. Jones, *J. Mol. Biol.*, 1994, **235**, 790.
- [41] P. Trodler, J. Pleiss, *BMC Struct. Biol.*, 2008, **8**, 9.
- [42] M. Martinelle, M. Holmquist, K. Hult, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism*, 1995, **1258**, 272.
- [43] R.A. Kemp, A.R. Macrae, *Esterification process*, 1992, Unichema Chemie BV, EP0506159.
- [44] P. Stead, H. Marley, M. Mahmoudian, G. Webb, D. Noble, Y.T. Ip, E. Piga, T. Rossi, S. Roberts, M.J. Dawson, *Tetrahedron: Asymm.*, 1996, **7**, 2247.
- [45] B. Morgan, D.R. Dodds, A. Zaks, D.R. Andrews, R. Klesse, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 7736.
- [46] A.K. Saksena, V.M. Girijavallabhan, R.G. Lovey, R.E. Pike, H. Wang, A.K. Ganguly, B. Morgan, A. Zaks, M.S. Puar, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 1787.
- [47] N. Igarashi, S. Otsutomo, M. Harata, S. Nakano, *Production of optically active trans-2-bromoidan-1-ol*, 1998, Jpn Kokai Tokkyo Koho JP10014593.
- [48] S. Bourq-Garros, N. Razafindramboa, A.A. Pavia, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **59**, 495.
- [49] B. Orsat, P. Spurr, B. Wirz, *Enzymatic acylation of a retinol derivative*, 1997, Eur. Pat. Appl. EP802261.
- [50] B. Orsat, B. Wirz, S. Bischof, *CHIMIA Int. J. for Chem.*, 1999, **53**, 579.
- [51] M. Mahmoudian, J. Eaddy, M. Dawson, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1999, **29**, 229.
- [52] K. Laumen, O. Ghisalba, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999, **63**, 1374.
- [53] T. Mine, T. Yui, *Optically active secondary alcohol and process for the production thereof*, 2000, Eur. Pat. Appl. EP980860.
- [54] R. Otto, B. Geers, A. Weiss, D. Petersohn, K. Schlotmann, K.R. Schroeder, *Novel flavone glycoside derivatives for use in cosmetics, pharmaceuticals and nutrition*, 2001, PCT Int. Appl., WO0179245.
- [55] M.J. Homann, R. Vail, B. Morgan, V. Sabesan, C. Levy, D.R. Dodds, A. Zaks, *Adv. Synth. Catal.* 2001, **343**, 744.

- [56] R.J. Atkins, A. Banks, R.K. Bellingham, G.F. Breen, J.S. Carey, S.K. Etridge, J.F. Hayes, N. Hussain, D.O. Morgan, P. Oxley, S.C. Passey, T.C. Walsgrove, A.S. Wells, *Org. Process Res. Dev.*, 2003, **7**, 663.
- [57] T.C. Walsgrove, L. Powell, A. Wells, *Org. Process Res. Dev.*, 2002, **6**, 488.
- [58] A.S. Wells, *Enzymatic resolution of benzodiazepine-acetic acid esters with a lipase*, 1998, PCT Int. Appl., WO9829561.
- [59] W. Albrecht, R. Otto, *Esters of uronic acids*, 2003, Eur. Pat. Appl., EP1306443.
- [60] M. Tamarez, B. Morgan, G.S.K. Wong, W. Tong, F. Bennett, R. Lovey, J.L. McCormick, A. Zaks, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2003, **7**, 951.
- [61] R. ter Halle, Y. Bernet, S. Billard, C. Bufferne, P. Carlier, C. Delaitre, C. Flouzat, G. Humblot, J.C. Laigle, F. Lombard, S. Wilmouth, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2004, **8**, 283.
- [62] P. Ramesh, T. Harini, N.W. Fadnavis, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2015, **19**, 296.
- [63] R. Vaidyanathan, L. Hesmondhalgh, S. Hu, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2007, **11**, 903.
- [64] A. Goswami, T.P. Kissick, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2009, **13**, 483.
- [65] L.K. Thalén, J.E. Bäckvall, Beilstein *J. Org. Chem.*, 2010, **6**, 823.
- [66] C. Korupp, R. Weberskirch, J.J. Muller, A. Liese, L. Hilterhaus, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2010, **14**, 1118.
- [67] Z. Li, Y. Zhang, M. Lin, P. Ouyang, J. Ge, Z. Liu, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2013, **17**, 1179.
- [68] Z. Guo, M.K.Y. Wong, M.R. Hickey, B.P. Patel, X. Qian, A. Goswami, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2014, **18**, 774.
- [69] G. Ma, Z. Xu, P. Zhang, J. Liu, X. Hao, J. Ouyang, P. Liang, S. You, X. Jia, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2014, **18**, 1169.
- [70] C.-J. Aurell, S. Karlsson, F. Pontén, S.M. Andersen, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2014, **18**, 1116.
- [71] C. Kim, J. Lee, J. Cho, Y. Oh, Y.K. Choi, E. Choi, J. Park, M.-J. Kim, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 2571.
- [72] A. Ghanem, H.Y. Aboul-Enein, *Chirality*, 2005, **17**, 1.
- [73] T. Schulz, J. Pleiss, R.D. Schmid, *Protein Sci.*, 2000, **9**, 1053.
- [74] D.A. Lang, M.L.M. Manesse, G.H. De Haas, H.M. Verheij, B.W. Dijkstra, *Eur. J. Biochem.*, 1998, **254**, 333.
- [75] K.K. Kim, H.K. Song, D.H. Shin, K.Y. Hwang, S.W. Suh, *Structure*, 1997, **5**, 173.
- [76] J.D. Schrag, Y. Li, M. Cygler, D. Lang, T. Burgdorf, H.-J. Hecht, R. Schmid, D. Schomburg, T.J. Rydel, J.D. Oliver, L.C. Strickland, C.M. Dunaway, S.B. Larson, J. Day, A. McPherson, *Structure*, 1997, **5**, 187.
- [77] A. Mezzetti, J.D. Schrag, C.S. Cheong, R.J. Kazlauskas, *Chem. Biol.*, 2005, **12**, 427.
- [78] R. Patel, C. McNamee, L. Szarka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992, **38**, 56.
- [79] R.A. Parker, R.W. Clark, S.Y. Sit, T.L. Lanier, R.A. Grosso, J.J. Wright, *J. Lipid Res.*, 1990, **31**, 1271.
- [80] R. Patel, M. Liu, A. Banerjee, L. Szarka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, **37**, 180.
- [81] R.N. Patel, A. Banerjee, R.Y. Ko, J.M. Howell, W.S. Li, F.T. Comezoglu, R.A. Partyka, F.T. Szarka, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1994, **20**, 23.
- [82] R.N. Patel, *Enzymatic processes for the resolution of enantiomeric mixtures of compounds useful as intermediates in the preparation of taxanes*, 1995, Eur. Pat. Appl., EP634492.
- [83] J.C. Sih, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, **73**, 1377.
- [84] H. Hirohara, M. Nishizawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1998, **62**, 1.
- [85] A. Goswami, J.M. Howell, E.Y. Hua, K.D. Mirfakhrae, M.C. Soumeillant, S. Swaminathan, X. Qian, F.A. Quiroz, T.C. Vu, X. Wang, B. Zheng, D.R. Kronenthal, R.N. Patel, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2001, **5**, 415.
- [86] Y. Momose, T. Maekawa, T. Yamano, M. Kawada, H. Odaka, H. Ikeda, T. Sohda, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 1518.
- [87] Y. Norimine, N. Yamamoto, Y. Suzuki, T. Kimura, K. Kawano, K. Ito, S. Nagato, Y. Iimura, M. Yonaga, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, **13**, 1493.
- [88] O.-J. Park, S.-H. Lee, T.-Y. Park, W.-G. Chung, S.-W. Lee, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2006, **10**, 588.