

Cascadas catalíticas en síntesis quiral

Juan Mangas-Sánchez

Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH-CSIC)

Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, España

Fundación Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID)

Avda. de Ranillas, 1-D, planta 2^a, oficina b. 50018 Zaragoza (España)

juan.mangas@unizar.es

Premio a la Investigación de la Academia 2022. Sección de Químicas

Abstract

Cascade processes combine several consecutive synthetic steps in the same reaction vessel that allow for the rapid construction of synthetic complexity in a straightforward manner. The design of multi (chemo)enzymatic cascades to build novel synthetic routes towards high-value chemicals constitutes an interesting approach to reducing the environmental toll of chemical processes. Over the past two decades, advances in the discovery of new enzymes as well as the development of chemocatalysts able to work under mild reaction conditions have expanded the operational space for the different catalytic worlds to work cooperatively. This special article presents a summary of our contributions to this area.

Introducción

La transición hacia una sociedad más sostenible implica una transformación sustancial de muchos aspectos que afectan a nuestra vida cotidiana. La industria química tiene un impacto muy significativo en nuestra sociedad ya que es la responsable de la fabricación de una

gran cantidad de productos diferentes que usamos a diario como fármacos, agroquímicos, plásticos o cosméticos. Es también un sector clave en la economía de la UE y de España tanto en volumen de mercado como en generación de empleo, en donde representa el 5,4 % del PIB y el 3,7 % de la población asalariada. El sector tiene la ambición de alcanzar la neutralidad de emisiones de carbono para 2050 y para ello es necesario un completo rediseño del sector tanto de materias primas como de los métodos de transformación de éstas en los productos finales. En este último apartado, la catálisis será un elemento clave para alcanzar estos objetivos. Todas las reacciones químicas requieren energía. Un catalizador es una sustancia que facilita que una determinada reacción química tenga lugar rebajando la energía necesaria para que se produzca por lo que, en muchas ocasiones, hace que estos procesos se lleven a cabo bajo condiciones de reacción más suaves. La catálisis tiene un impacto socioeconómico en nuestra sociedad enorme. Tecnologías esenciales como el proceso Haber-Bosch para la síntesis de amoníaco, fundamental para la síntesis de fertilizantes, o la polimerización de Ziegler-Natta para la preparación de plásticos como el polietileno, son posibles gracias a catalizadores. Tal es la importancia que aproximadamente el 90 % de los procesos químicos industriales usan catálisis, y el 35 % del PIB mundial depende de procesos catalíticos.¹

Tradicionalmente, los catalizadores se dividen en tres grupos atendiendo a su naturaleza.

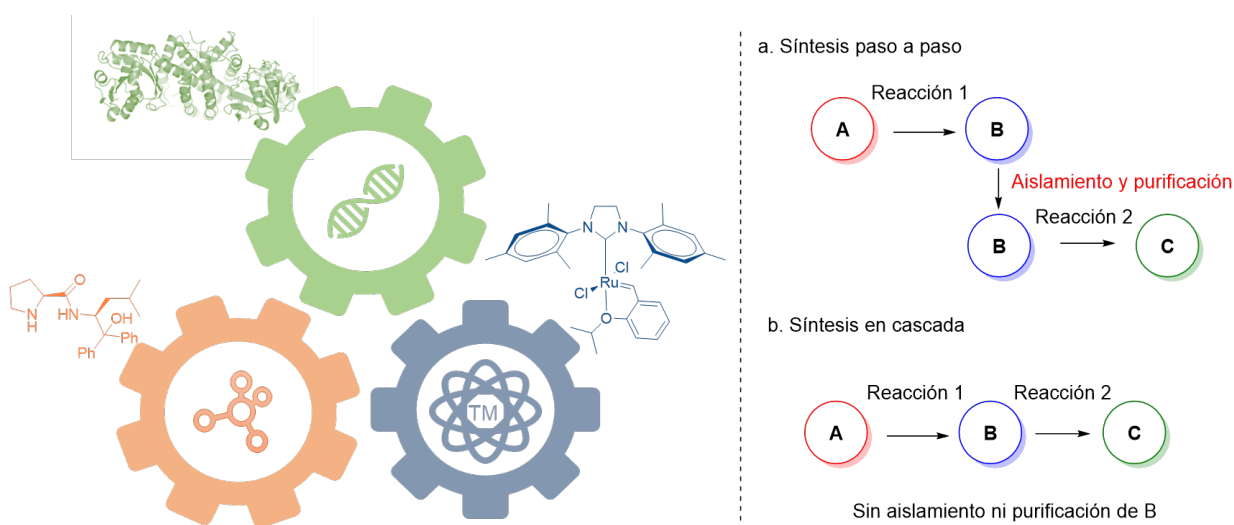
1) Catalizadores metálicos. Son especies compuestas por metales de transición. Debido a su estructura electrónica tienen una gran capacidad para activar enlaces y acelerar procesos químicos.

2) Organocatalizadores. Pequeñas moléculas orgánicas derivadas de, por ejemplo, aminoácidos u otros productos naturales capaces de activar moléculas mediante diversos mecanismos.

3) Enzimas. Proteínas cuya función es catalizar reacciones químicas en la naturaleza.²

Por otra parte, los procesos en cascada son aquellos en los que el producto de una reacción es el material de partida para la siguiente, sin necesidad de aislar o purificar los intermedios. Los organismos vivos han evolucionado para utilizar esta estrategia dentro de sus complicadas redes metabólicas para la generación de una diversidad de productos químicos enorme. Inspirados por la Naturaleza,³ los químicos orgánicos sintéticos han empezado a

usar este tipo de sistemas en el diseño de rutas sintéticas ya que presentan una serie de ventajas frente a la estrategia tradicional de síntesis por pasos. Por un lado, como no es necesaria la purificación y el aislamiento de los intermedios, se reducen significativamente el tanto el tiempo total del proceso como la generación de residuos, ya que la purificación de productos químicos generalmente lleva asociada el uso de grandes cantidades de disolvente.⁴⁻⁷ Al reducir el número de operaciones, los rendimientos globales también aumentan. En ocasiones, existe la posibilidad de que los intermedios de reacción presenten problemas de estabilidad o toxicidad por lo que el desarrollo de estrategias que permitan su conversión rápida en otros productos hace que se obtengan mayores rendimientos. Además, algunos procesos catalíticos presentan problemas de equilibrio y de inhibición por acumulación de sustrato o producto –especialmente los enzimáticos. Al acoplar reacciones en cascada en el mismo matraz, estos problemas se mitigan.



Esquema 1: Izquierda: Diferentes tipos de catalizadores, estructura de la imino reductasa de *Ajellomyces dermatitidis* (enzima, verde), catalizador de Grubbs (metal de transición, azul), catalizador de Singh (organocatalizador, naranja). Derecha: diferencias entre procesos sintéticos paso a paso (a) y en cascada (b). Muchos de estos catalizadores, además de acelerar o permitir transformaciones químicas, lo hacen además de forma asimétrica, es decir, permite el acceso a productos quirales. La quiralidad es una propiedad que presentan algunos objetos cuando no son superponibles con su imagen especular, como ocurre con moléculas que presentan un carbono con hibridación sp^3 unido a cuatro sustituyentes diferentes. La síntesis de compuestos químicos quirales es de especial relevancia en industrias como la industria farmacéutica, ya que más de la mitad de los fármacos que se comercializan poseen al menos un carbono de este tipo.⁸ La impor-

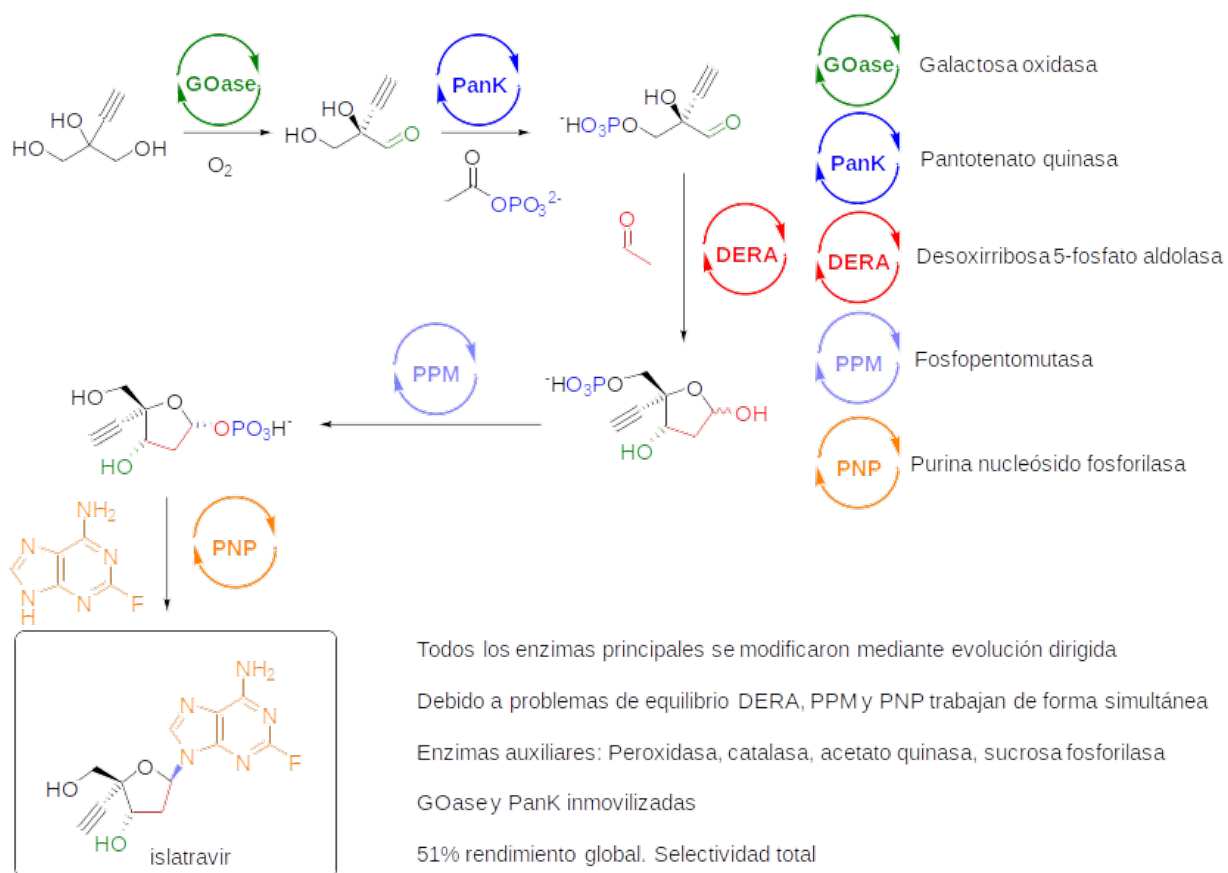
tancia reside en que, aunque tengan la misma estructura química, muchos enantiómeros muestran diferencias en actividad terapéutica, toxicología, farmacocinética, metabolismo, etc., por lo que su preparación de forma pura es de gran importancia.

En esta revisión, se presentan ejemplos de la combinación de diferentes procesos catalíticos en cascada para la preparación de compuestos quirales, muchos de ellos de alto interés en distintos sectores de la industria química, bajo condiciones de reacción sostenibles que han sido desarrolladas en nuestros grupos de investigación en la última década.

Cascadas multienzimáticas

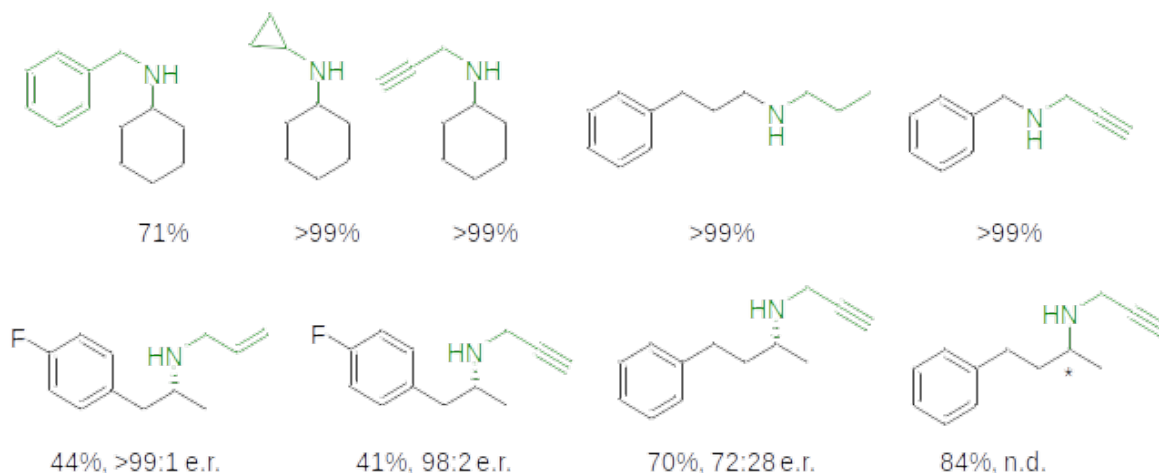
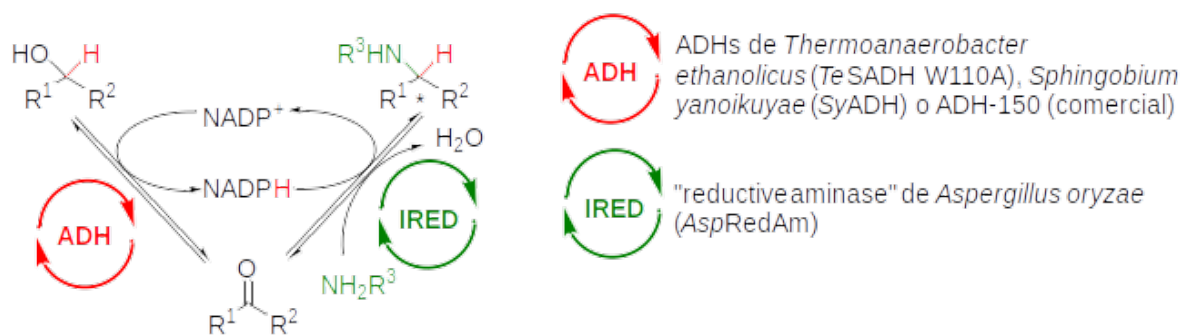
En las últimas dos décadas, los químicos sintéticos hemos intentado adaptar las complejas rutas metabólicas existentes en la naturaleza al laboratorio para aplicarlas en procesos químicos de interés combinando diferentes biocatalizadores de forma sucesiva.⁷ Estos procesos son relativamente sencillos de armonizar ya que los enzimas suelen trabajar bajo condiciones de reacción muy similares en cuanto al medio de reacción (acuoso alrededor de pH 7) como de temperatura o presión. Además, los enzimas suelen ser altamente selectivos por lo que problemas de reactividad cruzada y, por tanto, aparición de productos no deseados, suelen ser poco habituales. La construcción de cascadas multienzimáticas ha sido, y sigue siendo, objeto intenso de estudio debido principalmente al continuo descubrimiento de nuevos enzimas con aplicación en química sintética. Estas cascadas no sólo se han limitado a ejemplos de prueba de concepto, sino que también han sido aplicadas a gran escala para la preparación de productos de interés industrial. Recientemente, científicos de Merck & Co. han desarrollado una nueva síntesis para preparar el fármaco islatravir, en estudios para el tratamiento del VIH, mediante un proceso en cascada en donde se combinaron cinco enzimas de forma consecutiva para obtener el producto final con un rendimiento del 51 % (Esquema 2).⁹

En este contexto, una de las líneas de investigación principales desarrolladas en los últimos años por nuestro equipo ha sido el descubrimiento y desarrollo de nuevos biocatalizadores para llevar a cabo reacciones de reducción asimétrica de iminas (bien como imina preformada o via aminación reductora).¹⁰⁻¹⁵ Utilizando diferentes métodos para el descubrimiento



Esquema 2: Cascada multienzimática desarrollada por científicos de Merck & Co. para la preparación de islatravir.

de enzimas, hemos conseguido construir una colección de biocatalizadores muy diversa capaz de promover estas reacciones sobre un abanico de sustratos notablemente amplio en medios acuosos y bajo condiciones de reacción suaves. Esto nos ha permitido combinar estos enzimas, denominados imino reductasas (IREDs), con otros biocatalizadores para la preparación de diferentes familias de compuestos de forma asimétrica. Uno de los primeros ejemplos en los que aplicamos esta estrategia fue en la alquilación de aminas primarias con alcoholes combinando IREDs y alcohol deshidrogenasas (ADHs) mediante un sistema redox neutral o *hydrogen-borrowing* (Esquema 3). Inicialmente, el alcohol es oxidado por una ADH para obtener el correspondiente aldehído o cetona cediendo un hidruro al cofactor de nicotinamida. En un segundo paso, la IRED cataliza la aminación reductora entre la amina de interés y el compuesto carbonílico, abstrayendo el hidruro del cofactor de nicotinamida y liberándose agua como único subproducto.¹⁶

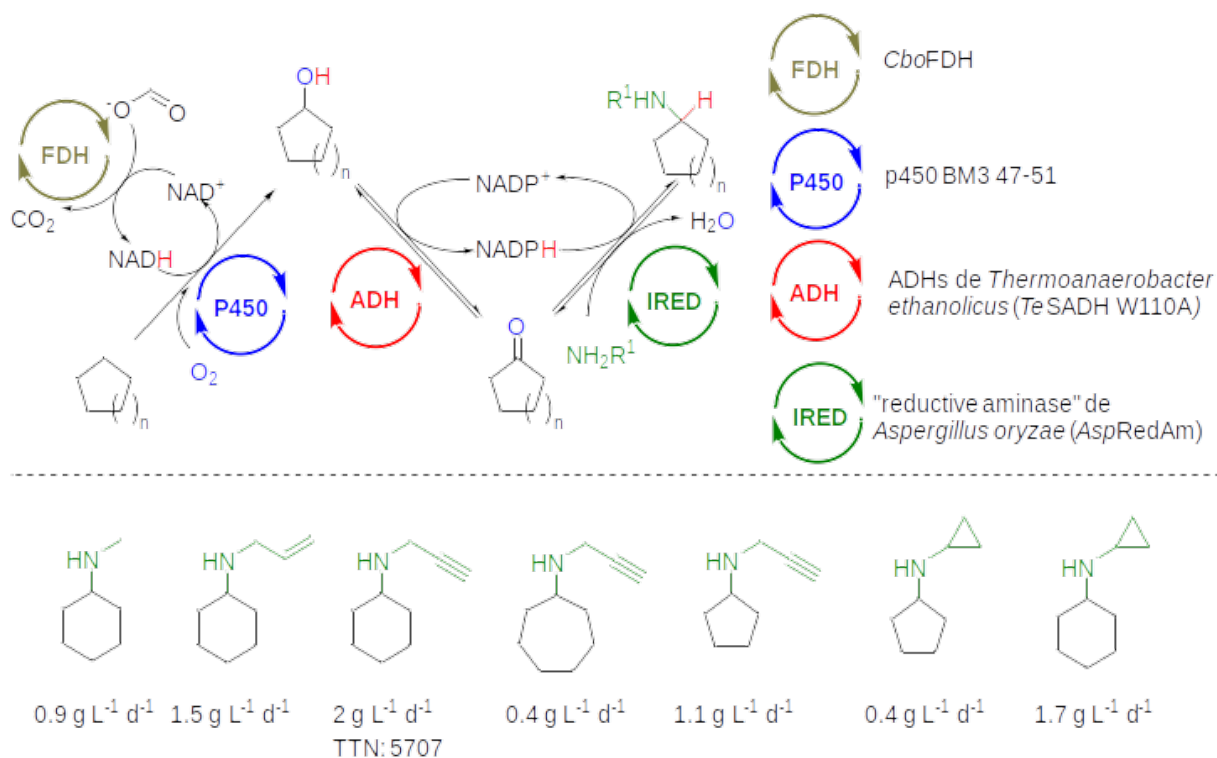


Esquema 3: Cascada *hydrogen-borrowing* para la alquilación de aminas con alcoholes combinando alcohol deshidrogenasas e imino reductasas. Conversiones y excesos enantioméricos determinadas mediante cromatografía de gases.

Este sistema lo aplicamos a alcoholes primarios y secundarios obteniendo las aminas secundarias de interés con rendimientos entre moderados y excelentes (41-99%). Cabe destacar los elevados excesos enantioméricos obtenidos en el caso de los derivados de anfetamina, productos de gran interés en la industria farmacéutica.

Una vez desarrollada esta cascada, decidimos adaptar el sistema para la aminación de enlaces C-H no activados en cicloalcanos.¹⁷ Para ello, utilizamos un citocromo P450 (P450 BM3 R47L/Y51F) para la hidroxilación de cicloalcanos generando los correspondientes alcoholes secundarios. Este enzima contiene dos mutaciones (R47L/Y51F) que previamente mostraron aumentar la afinidad por el ciclohexano.¹⁸ Ya que el citocromo utiliza cofactores de nicotinamida, insertamos dos mutaciones adicionales (R966D y W1046S) para incre-

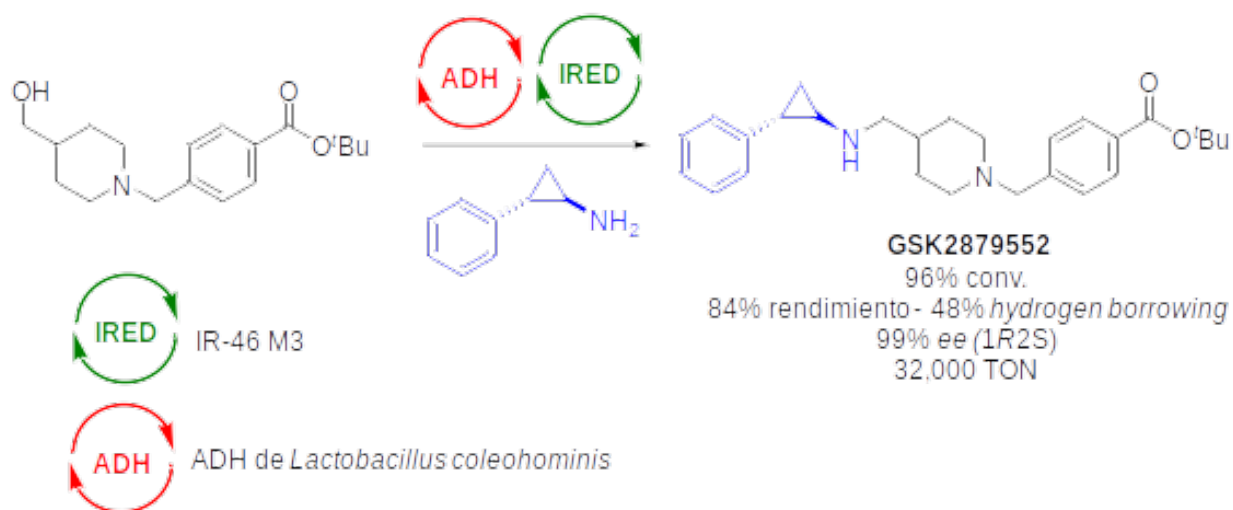
mentar la preferencia de éste por NADH en vez de NADPH, desacoplando de esta forma el paso de hidroxilación del sistema *hydrogen-borrowing*, por lo que se evita la competición por equivalentes de hidruro.



Esquema 4: Funcionalización de cicloalcanos mediante cascada multienzimática combinando monooxigenasas, alcohol deshidrogenasas e imino reductasas. Rendimientos calculados sobre la acumulación del producto en el medio de reacción tras 24h medidas por cromatografía de gases.

El potencial de estos sistemas multienzimáticos para la preparación de productos de interés industrial ha sido demostrado recientemente por investigadores de la farmacéutica de GlaxoSmithKline.¹⁹ Usando como punto de partida una IRED de su propia colección, obtuvieron una variante que permitió la síntesis del principio activo GSK2879552 que se encuentra en estudios para su uso en el tratamiento de la leucemia. Tras varias rondas de evolución dirigida en donde se optimizaron diferentes parámetros como la actividad y la estabilidad del enzima a $\text{pH} < 5$, obtuvieron un biocatalizador, IR-46 M3, que presenta un rendimiento 38000 veces superior a la del enzima nativo, permitiendo de esta forma la síntesis del fármaco a escala industrial (esquema 5). El enzima es capaz de usar selectivamente el enantiómero (1R,2S) de la amina por lo que no es necesario llevar a cabo un proceso previo de resolución cinética del sustrato. Debido a la inestabilidad del aldehído intermedio, decidieron desarrollar un proceso *hydrogen-borrowing* combinando con la ADH

de *Lactobacillus coleohominis*, obteniendo el fármaco con un 48 % de rendimiento en forma enantiopura. El proceso original consiste en la oxidación aeróbica del alcohol catalizada por Cu (I) seguido de una aminación reductora convencional que requiere la resolución cinética previa de la amina y el uso de borohidruro de sodio en cantidades estequiométricas. El proceso final presenta una reducción en la huella de carbono de aproximadamente 7 veces con respecto al proceso original. Pese a que la estrategia es menos eficiente que la reacción desde el compuesto carbonílico, este proceso representa el primer ejemplo de cascada *hydrogen borrowing* a gran escala.

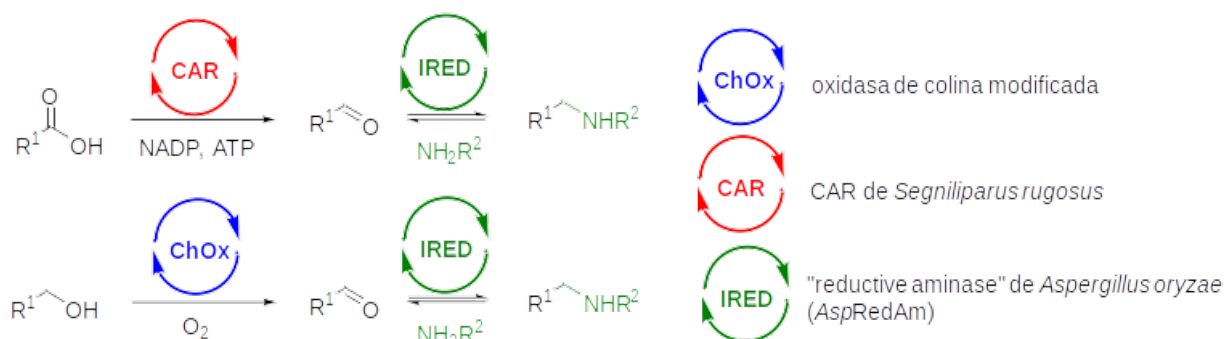


Esquema 5: Preparación a escala del ingrediente farmacéutico activo GSK2879552 mediante una estrategia *hydrogen borrowing* usando una variante de una imino reductasa modificada mediante evolución dirigida.

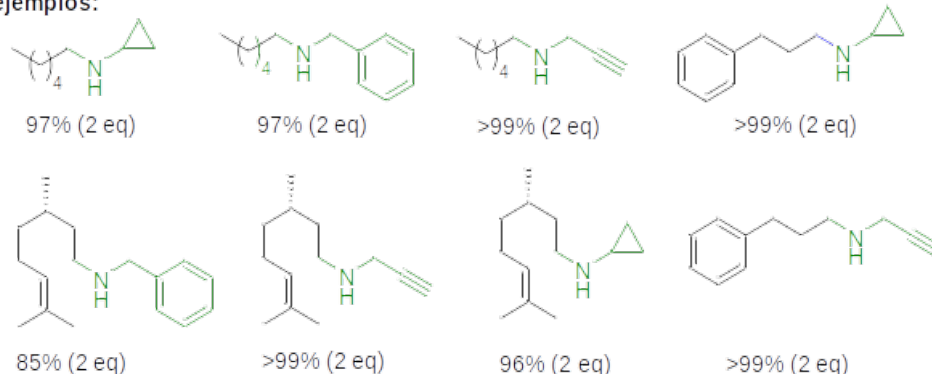
A pesar de que es un sistema elegante para la preparación de aminas quirales a partir de alcoholes o alcanos, el uso de altas concentraciones de amina de partida para desplazar el equilibrio hace que para la mayoría de los procesos a escala industrial esta estrategia presente serias limitaciones. Por esta razón decidimos explorar otros sistemas multienzimáticos que nos permitieran realizar la misma transformación de manera más eficiente. Para ello utilizamos, por una parte, una alcohol oxidasa (AOx) para la generación de los compuestos carbonílicos a partir de alcoholes a través de una oxidación aeróbica irreversible. Mientras que las ADHs catalizan la oxidación de alcoholes mediante transferencia de hidruro, las oxidasas catalizan la oxidación aeróbica en donde el oxígeno ambiental oxida al cofactor (generalmente una flavina) generándose peróxido de hidrógeno, y el cofactor oxida al sustrato, regenerándose de esta forma. El resultado global es la oxidación aeróbica irreversible que hace que, generalmente, los problemas relacionados por el equilibrio desaparezcan. Por

otra parte, las reductasas de ácido carboxílico (CARs) catalizan la reducción irreversible de ácidos carboxílicos a aldehídos a través de un mecanismo que involucra la activación del ácido carboxílico mediante adenilación seguida de la formación de un tioéster que es finalmente reducido al aldehído final usando un equivalente de cofactor de nicotinamida.²⁰ Este mecanismo hace que la reacción sea irreversible. Con todo esto, decidimos combinar la CAR de *Segniliparus rugosus* con AspRedAm para desarrollar un nuevo método de aminación reductora de ácidos carboxílicos bajo condiciones de reacción sostenibles (esquema 6). Hasta ese momento, estos procesos habían sido desarrollados por el grupo de Beller empleando catalizadores de Ru, H₂ y altas temperaturas (160°C),^{21,22} y por Fu y colaboradores empleando especies de boro, también a altas temperaturas.²³ De esta forma fuimos capaces de obtener diferentes aminas secundarias con rendimientos entre moderados y buenos (49-74 %) usando entre 0.8-4 equivalentes de la amina (frente al exceso de 50 equivalentes necesario en la cascada *hydrogen-borrowing*), lo que supone una mejora sustancial de cara a la potencial aplicación industrial de estos procesos. La cascada se lleva a cabo a 30°C, sin necesidad de usar altas presiones de H₂ y en condiciones acuosas. Además, el tratamiento y aislamiento del producto final es muy sencillo, con lo que el proceso total es mucho más sostenible que otros desarrollados hasta la fecha. Como limitación de este proceso cabe destacar que no es posible obtener aminas quirales al ser eniminas los intermedios de reacción.

Finalmente, decidimos explorar otra cascada multienzimática para la preparación de heterociclos nitrogenados quirales como las pirrolidinas y las piperidinas, estructuras que se encuentran en numerosos productos químicos de importancia industrial.²⁴ Para ello, desarrollamos una nueva estrategia para la síntesis asimétrica de estos compuestos con dos centros estereogénicos combinando IREDs con enoato reductasas (EREDs). Las EREDs son enzimas capaces de reducir dobles enlaces conjugados en sistemas α, β -insaturados y han sido ampliamente usados para la reducción asimétrica de alquenos activados con grupos electrón atractores como ésteres, cetonas o grupos nitro.²⁵ También son enzimas con la habilidad de reducir eniminas a través de la conformación abierta (esquema 7), por lo que pensamos que la combinación en el mismo reactor de estos dos tipos de reductasas podría dar lugar a la formación de varios centros quirales de manera sencilla.²⁶ Para ello preparamos una serie de eniminas y realizamos un estudio de reducción con diferentes EREDs de nuestra colección. Para determinar si la reducción se producía sobre la enimina o sobre la



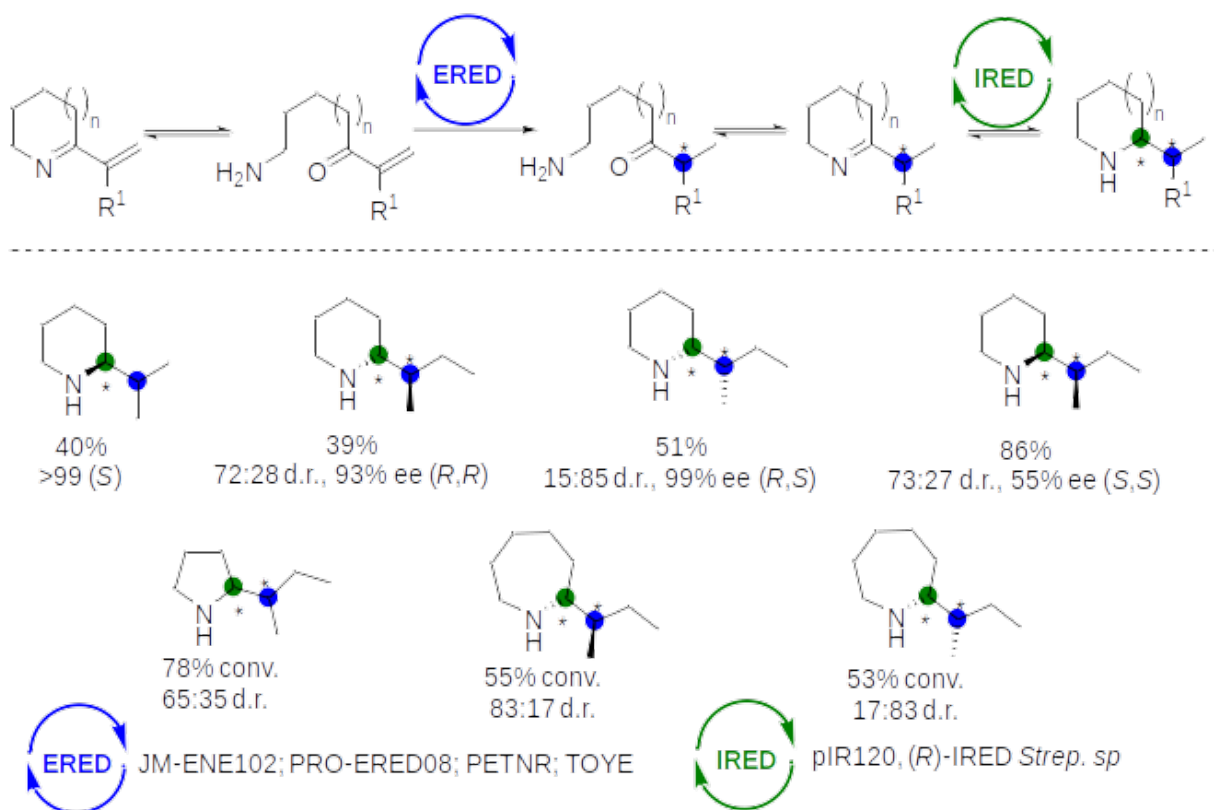
Más de 40 ejemplos:



Esquema 6: Obtención de aminas secundarias a partir de ácidos carboxílicos o alcoholes primarios mediante cascadas enzimáticas. Conversiones determinadas mediante cromatografía de gases. Equivalentes de amina entre paréntesis.

amino-enona con configuración abierta, realizamos experiments cinéticos que demostraron que la reducción de la conformación abierta es mucho más rápida, confirmando el mecanismo que se describe en el esquema 7. Cálculos teóricos sobre la electrofilia del carbono en posición β resultaron estar en concordancia con lo observado experimentalmente, apoyando la teoría de que la reducción se produce sobre las enonas y no sobre las eniminas de configuración cerrada.

Una vez finalizado el estudio del mecanismo, decidimos explorar la utilidad sintética de esta cascada combinando enzimas de ambas familias (esquema 7), obteniendo una variedad de heterociclos nitrogenados quirales de 5, 6 y 7 miembros con dos centros quirales directamente desde compuestos no quirales, demostrando el potencial que tiene la combinación de diferentes enzimas para obtener productos de alta complejidad molecular de forma sencilla.

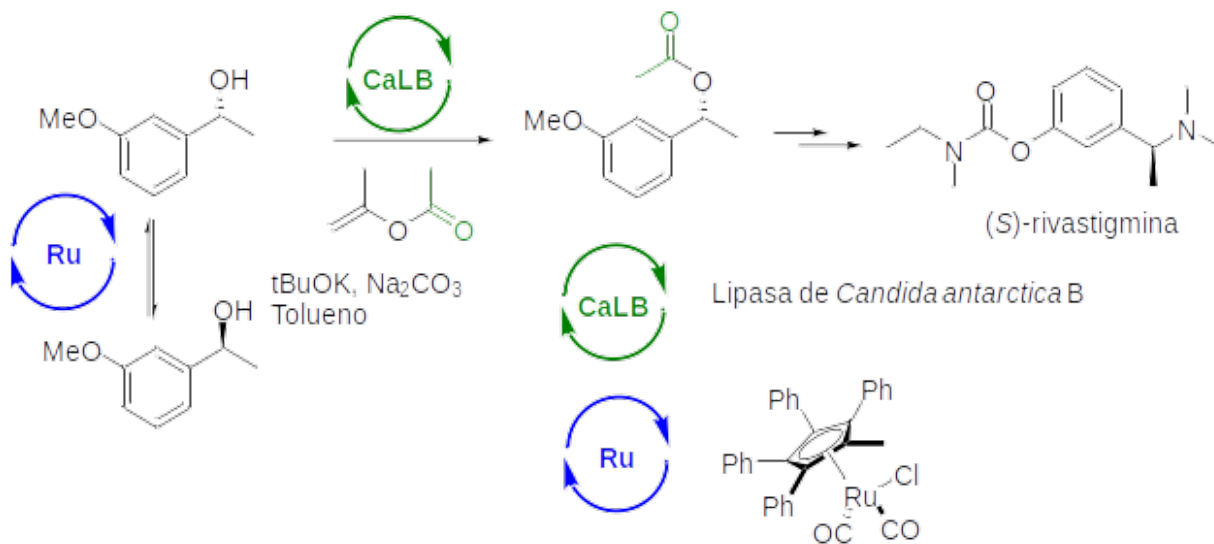


Esquema 7: Síntesis estereoselectiva de heterociclos nitrogenados de 5, 6 y 7 miembros mediante combinación de EREDs e IREDs en cascada *one-pot*. Rendimientos aislados o conversiones medidas por cromatografía de gases.

Cascadas quimioenzimáticas

Mediante la combinación de catalizadores de diferente naturaleza se puede reunir las ventajas y cualidades sintéticas de las diferentes disciplinas que existen hoy en día en catálisis. Tradicionalmente estas estrategias han sido estudiadas de forma independiente y su combinación ha sido generalmente compleja debido principalmente a problemas de incompatibilidad y a las diferencias respecto a las condiciones de reacción (disolvente, temperatura, presión). Sin embargo, el interés por la química sostenible hace que cada vez haya más catalizadores químicos disponibles capaces de trabajar bajo condiciones de reacción compatibles con los métodos biocatalíticos.^{4,5} Además, avances en ingeniería de reacción como inmovilización de catalizadores o técnicas de compartimentalización ha hecho que cada vez sea más sencillo combinar diferentes tipos de catálisis en cascada para la síntesis de compuestos quirales.²⁷

Una de las características más interesantes de los enzimas es su capacidad para diferenciar entre dos enantiómeros diferentes, y esto ha sido ampliamente explotado en procesos de resolución cinética en donde el enzima transforma uno de los enantiómeros dejando el otro inalterado, por lo que al final de la reacción los dos compuestos pueden ser separados con facilidad.²⁸ Sin embargo, esta estrategia tiene la limitación de que, como máximo, se puede obtener un 50 % de rendimiento del isómero deseado por lo que existe un interés en desarrollar alternativas que permitan obtener un rendimiento del 100 % teórico máximo. Una de ellas es la introducción de un agente que permita la racemización in situ del enantiómero que permanece inalterado en el medio de reacción, generando un proceso que se denomina resolución cinética dinámica.²⁹ En 2009 combinamos la exquisita enantioselectividad que presentan las lipasas en la resolución cinética de alcoholes secundarios junto con un catalizador de rutenio capaz de racemizar alcoholes secundarios con gran eficiencia, para la preparación de un éster quiral intermedio en la síntesis del fármaco rivastigmina (esquema 8).³⁰



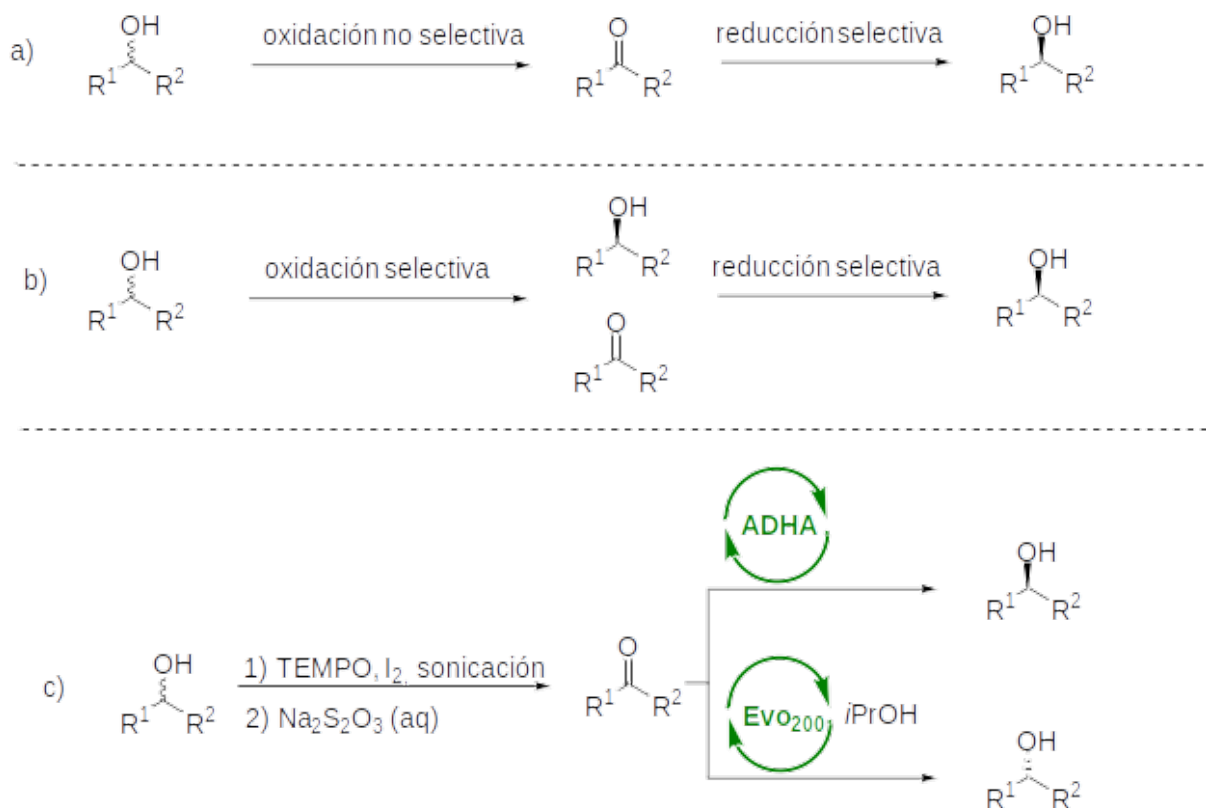
Esquema 8: Resolución cinética dinámica (DKR) de un alcohol precursor el fármaco rivastigmina combinando un catalizador de Ru y una lipasa.

Tras llevar a cabo un estudio inicial de la resolución cinética usando diferentes lipasas y optimizando diferentes parámetros de reacción como equivalentes de dador de acilo, tiempo, disolvente y temperatura, llevamos a cabo el estudio de resolución cinética dinámica usando un catalizador de Ru desarrollado previamente en el grupo del Prof. Bäckvall. Para ello utilizamos acetato de isopropenilo como dador de acilo ya que estudios previos mostraron

que el formaldehído que se forma tras reacción del acetato de vinilo inactiva el catalizador. Tras optimizar las condiciones de reacción (temperatura, disolvente, carga de catalizador, tiempo) conseguimos acoplar de forma eficiente ambos procesos y, de esta forma, se pudo obtener el éster enantioméricamente puro con una conversión del 95 % y un rendimiento aislado del 91 %. La síntesis quimioenzimática del fármaco (S)-rivastigmina se pudo completar con un rendimiento global del 29 % tras 7 pasos de reacción partiendo de 3-metoxi acetofenona comercial.

Como se ha podido ver, los alcoholes secundarios quirales son intermedios sintéticos muy interesantes en la industria farmacéutica. Además de su preparación mediante resolución cinética o cinética dinámica, existen otras estrategias empleando enzimas, algunas de ellas que involucran la combinación de éstos con agentes químicos. En este contexto, en 2015 desarrollamos una nueva metodología para la desracemización de alcoholes secundarios combinando una oxidación química con una reducción estereoselectiva en un proceso *one-pot*.³¹ Una desracemización consiste en la transformación de uno o ambos enantiómeros de una mezcla racémica en, generalmente, una especie oxidada que luego se reduce de forma selectiva a sólo uno de los dos (esquema 9a,b). En nuestro caso, decidimos explorar la posibilidad de usar el radical aminoxilo TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo) de forma catalítica en combinación con diferentes oxidantes terminales para la oxidación de alcoholes secundarios en medio acuoso y bajo condiciones de reacción suaves. Tras un estudio exhaustivo de diferentes agentes y condiciones, encontramos que la combinación TEMPO-I₂ bajo sonicación en medio acuoso a pH 10 y 30°C nos proporcionaba los mejores resultados frente a un panel de alcoholes secundarios extenso (esquema 9c). Tras desactivar el exceso de I₂ usando una disolución acuosa saturada de Na₂S₂O₃, se llevó a cabo la reducción estereoselectiva en el mismo matraz de reacción usando dos ADHs enantiocomplementarias, la ADH-‘A’ de *Rhodococcus ruber* para obtener los alcoholes de configuración *S*, y la ADHs de *Lactobacillus brevis* y la comercial EVO200 para obtener los alcoholes de configuración *R*. En todos los casos los productos finales se obtuvieron con rendimientos por encima del 90 % y de forma enantiopura en todos los casos.

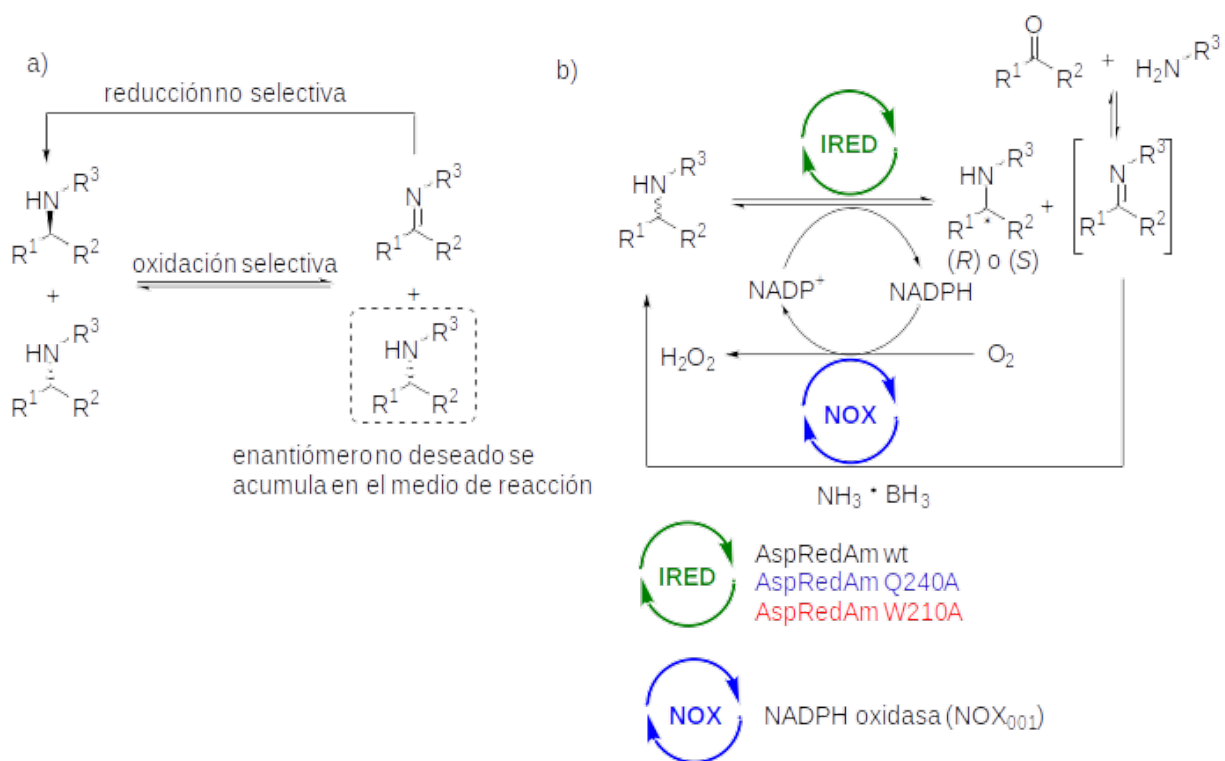
Estos procesos de desracemización también se pueden aplicar para la obtención de aminas quirales. En este caso, el procedimiento más habitual es utilizar un enzima que oxida de forma selectiva uno de los dos enantiómeros de la mezcla racémica a la correspondiente imina.



Esquema 9: Desracemización de alcoholes secundarios mediante la combinación de una oxidación química usando un sistema TEMPO-I₂ seguido de una reducción estereoselectiva utilizando ADHs enantiocomplementarias.

La adición de un agente reductor no selectivo, generalmente un borano, convierte la imina en la mezcla racémica de nuevo. Ciclos iterativos de oxidación selectiva junto con reducción no selectiva hacen que el enantiómero no deseado por el enzima se vaya acumulando en el medio de reacción (esquema 10a). En 2017, y dado que las IREDs no solo catalizan reacciones de aminación reductora sino que también son capaces de oxidar aminas a las correspondientes iminas, decidimos explorar la posibilidad de usarlas en un proceso de desracemización en el cual la IRED oxida de forma selectiva uno de los dos enantiómeros de la amina a la correspondiente imina.³² Tras evaluar mediante estudios cinéticos la capacidad de oxidación de la imino reductasa de *Aspergillus oryzae* (*AspRedAm*) frente a diferentes aminas racémicas tanto cíclicas como acíclicas, decidimos explorar el uso de una NADPH oxidasa (NOX) como sistema de regeneración del cofactor de nicotinamida. Una vez finalizada la optimización del sistema, aplicamos la estrategia para la resolución cinética a escala semipreparativa de diferentes aminas racémicas. Para obtener ambos enantiómeros, usamos las variantes enantiocomplementarias Q240A y W210A que previamente habíamos

obtenido mediante mutagénesis dirigida.¹⁰ De esta forma se pudieron obtener diferentes aminas quirales con excesos enantioméricos excelentes en la mayoría de los casos. Una vez optimizada la resolución cinética, decidimos desarrollar el proceso de desracemización. Hay que indicar que la desracemización de aminas acíclicas posee la inherente limitación de la inestabilidad de las iminas no cíclicas en medio acuoso. Esto nos obligó a tener que usar un exceso significativo del borano debido a la competición con la hidrólisis espontánea. No obstante, se pudieron obtener las aminas quirales de interés con conversiones excelentes y excesos enantioméricos totales, pudiéndose acceder a ambos enantiómeros en la mayoría de los casos estudiados.



Esquema 10: A) esquema general de la desracemización de aminas mediante rondas iterativas de oxidación selectiva seguido de reducción no selectiva. B) Resolución cinética y desracemización de aminas utilizando la IRED de *Aspergillus oryzae* y variantes en combinación con amino borano.

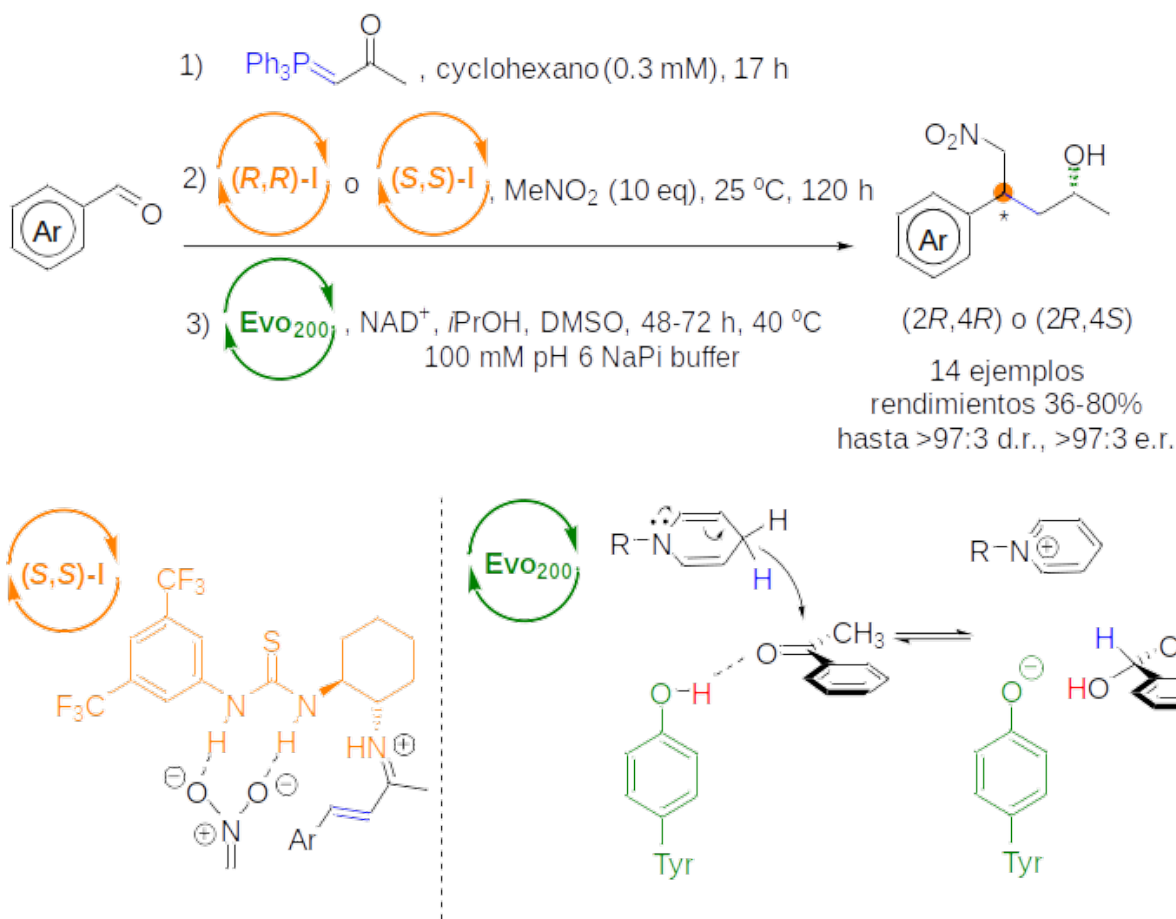
Recientemente hemos empezado a desarrollar una nueva línea de investigación en la combinación de organocatalizadores con catálisis enzimática para la preparación de compuestos quirales. La organocatálisis es el uso de pequeñas moléculas orgánicas, algunas de ellas productos naturales como los aminoácidos o alcaloides, para facilitar reacciones químicas, generalmente de forma asimétrica. A pesar de que los primeros ejemplos de este tipo de

transformaciones se pueden encontrar en los años 80, no fue hasta principios de siglo cuando de forma independiente David MacMillan³³ y Benjamin List³⁴ conceptualizaron el área de estudio. Desde ese momento, el campo ha crecido exponencialmente hasta convertirse en uno de los pilares de la catálisis asimétrica. Una muestra del impacto que ha supuesto el desarrollo de esta disciplina en síntesis química asimétrica es el reconocimiento con el premio Nobel en Química en 2021 a estos dos investigadores.

A pesar de las similitudes que existen entre la organocatálisis y la catálisis enzimática, sus aplicaciones en síntesis asimétrica son bastante diferentes. Mientras que los métodos organocatalíticos han sido ampliamente usados en procesos de formación asimétrica de enlaces C–C a través de reacciones aldólicas, Friedel-Crafts, o Diels-Alder; la biocatálisis ha encontrado una mayor aplicación en reacciones de intercambio de grupos funcionales como pueden ser procesos redox o hidrólisis.² A pesar de que existen muchas enzimas capaces de catalizar reacciones de formación de nuevos enlaces C–C, éstas suelen ser proteínas demasiado selectivas por lo que su aplicación en síntesis hasta hoy está relativamente restringida.^{35–37}

Esto hace que sean dos tecnologías complementarias desde el punto sintético y que su combinación en procesos en cascada tenga un potencial enorme para la construcción de moléculas quirales de bajo peso molecular. Los primeros ejemplos de estos procesos consistieron en la combinación de catalizadores de prolina con hidrolasas,³⁸ transaminasas³⁹ y alcohol deshidrogenasas⁴⁰ debido principalmente a la capacidad que tienen estos catalizadores de promover química de enaminas en presencia de agua. Teniendo en cuenta que el campo está poco explorado,⁴ nos planteamos la posibilidad de combinar otros tipos de activación promovidos por organocatalizadores seguidos de un paso biocatalítico para la generación de varios centros estereogénicos con alta selectividad y de forma sencilla. En concreto nos hemos centrado en la síntesis estereoselectiva de nitro alcoholes, intermedios importantes en la preparación de aminoalcoholes quirales, un grupo funcional que se encuentra presente en muchos productos de interés farmacológico. Para ello, decidimos combinar una adición de Michael asimétrica de nitrometano sobre enonas para general nitroacetonas quirales, seguido de una reducción estereoselectiva del grupo carbonilo para obtener los correspondientes nitro alcoholes ópticamente activos.⁴¹ Tras explorar diferentes organocatalizadores y condiciones, encontramos que los mejores resultados se obtuvieron con un catalizador bifuncional

tiourea-ciclohexilamina, con rendimientos de hasta el 95 % con selectividad total. En cuanto a la cetoreductasa, empleamos los enzimas comerciales y enantiocomplementarias Evo030 y Evo200. Problemas de inhibición de la Evo030 con nitrometano no permitieron la obtención de los alcoholes de configuración (*S*). Afortunadamente, la combinación del proceso de adición conjugada con la Evo200 se pudo realizar con éxito, obteniéndose los nitroalcoholes de configuración (*R,R*) y (*R,S*) con buenos rendimientos y purzas enantio- y diastereoméricas. Ya que la preparación de las enonas de partida la realizamos a través de la reacción de olefinación Wittig⁴² entre un iluro de fosfonio y el aldehído correspondiente, nos planteamos la posibilidad de combinar los tres pasos en un proceso *one-pot* secuencial que permitiría la obtención de los productos de interés a partir de aldehídos sencillos bajo condiciones suaves de reacción (esquema 11).



Esquema 11: Combinación de tioureas quirales y oxidorreductasas para preparar 1,4-nitroalcoholes quirales mediante una cascada *one-pot* de tres pasos desde aldehídos comerciales. Mecanismos propuestos para los pasos claves en la alta estereoselectividad observada.

Conclusiones y perspectivas

En la última década, investigaciones en el descubrimiento de nuevas enzimas bien sea nativas o modificadas genéticamente, unido al interés por desarrollar procesos catalíticos más sostenibles, ha posibilitado que la combinación de los diferentes mundos catalíticos sea mucho más eficaz. Estos sistemas conllevan una serie de ventajas desde el punto de vista operativo y de optimización de recursos que hace que cada vez sea más importante el diseño de rutas sintéticas para productos de interés industrial de esta manera. A pesar de estos avances, aún quedan muchos aspectos que solucionar para que estas estrategias sean algo rutinario. La incompatibilidad de los diferentes catalizadores y condiciones sigue siendo el mayor obstáculo, y las estrategias de compartimentalización desarrolladas hasta la fecha no son una solución viable a gran escala. Por ejemplo, muchas reacciones de gran interés sintético catalizadas por metales requieren de atmósfera inerte. Las estrategias actuales de segregación no permiten que se puedan combinar de forma sencilla. Alternativamente, avances recientes en los procesos en flujo continuo hacen que potencialmente se puedan solucionar todos estos inconvenientes. Bajo estos sistemas, las reacciones se realizan mientras los diferentes reactivos se van moviendo a través de reactores en forma de tubo que pueden contener los catalizadores inmovilizados. Cada reactor está completamente segregado y por tanto las condiciones de reacción pueden ser completamente diferentes en los distintos compartimentos en los que se divide el sistema. A pesar de ser ampliamente usado en algunos sectores industriales, tan sólo recientemente ha surgido un interés para aplicarlo en la síntesis de productos de alto valor añadido mediante procesos catalíticos. Ejemplos del uso de estos sistemas en procesos multienzimáticos han hecho que se hayan mejorado las productividades de los mismos procesos en batch y también han demostrado que cascadas previamente incompatibles ahora se pueden combinar de forma eficiente.⁴³ Estas observaciones se pueden trasladar a sistemas multicatalíticos en el futuro y favorecer la aceptación de estos procesos a escala industrial.

Además de los ejemplos aquí desarrollados, nuevas estrategias catalíticas que actualmente se están desarrollando y que contienen muchos elementos interesantes desde el punto de vista de la sostenibilidad de los procesos químicos, como son el uso de luz o electricidad para promover transformaciones químicas, también serán susceptibles de ser acopladas a

procesos en cascada. Ya existen algunos ejemplos en la bibliografía⁴⁴ y en los próximos años serán objeto de estudio intensivo. Finalmente, otro de los problemas relativos a los procesos multicatalíticos en cascada es la diferente cinética que presentan los distintos sistemas que hacen que no sean poco eficientes. El uso de modelos cinéticos enzimáticos ya está ayudando a optimizar los procesos multienzimáticos⁴⁵ y en el futuro se podrán aplicar a los quimioenzimáticos para mejorar su eficacia.

Agradecimientos

Resulta difícil condensar en unas cuantas líneas los agradecimientos en un sector como la investigación en donde el trabajo colaborativo es clave para el éxito, y más si cabe en un área tan multidisciplinar como la biocatálisis. A lo largo de mi carrera profesional he tenido la gran suerte de rodearme de personas brillantes por lo que me gustaría agradecer a todos los investigadores que, de forma directa o indirecta, me han ayudado tanto en el laboratorio como fuera de él. En primer lugar, a los profesores Vicente Gotor y Vicente Gotor-Fernández de la Universidad de Oviedo, por haberme introducido al fascinante mundo del uso de enzimas en síntesis química y el apoyo que me han brindado durante todo este tiempo. Al profesor Patrick Adlercreutz y su grupo de investigación la Universidad de Lund (Suecia) por haberme acogido de forma tan calurosa durante mis años en Suecia y haberme enseñado la importancia de la ingeniería de procesos en síntesis industrial. Mención especial a los profesores Nicholas J. Turner y Gideon Grogan por darme la oportunidad de trabajar en un proyecto altamente multidisciplinar y ambicioso, así como por darme la libertad para poder desarrollar mi creatividad y capacidad de gestión. También a todos mis compañeros del grupo de biocatálisis del Instituto de Biotecnología de Manchester, en especial al *IRED team*, por su ayuda, amistad y por haber creado un ambiente de trabajo tan productivo e inspirador. Al equipo de biocatálisis de Glaxo Smith Kline, Astra Zeneca, Pfizer y Prozomix por el esfuerzo colectivo y colaborativo desarrollado para descubrir nuevos biocatalizadores y llevarlos a escala industrial, demostrando que la biocatálisis es una tecnología lista para ayudar a reducir el impacto que tiene nuestra actividad industrial sobre el planeta.

Ya en estos últimos tres años, me gustaría agradecer a la Fundación Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID) por creer en mí y darme la oportunidad de volver a España para poder desarrollar mi carrera profesional de forma independiente. También a la Agencia Estatal de Investigación por la financiación recibida a través de los proyectos PID2020-115351RJ-I00 para el desarrollo de cascadas quimioenzimáticas y TED2021-130803B-I00 para el desarrollo de nuevos biocatalizadores oxidativos y su uso en síntesis orgánica. Finalmente, y de forma muy especial, mi agradecimiento a las profesoras Raquel P. Herrera, María Concepción Gimeno, y a sus respectivos grupos de investigación por acogerme con los brazos abiertos y ayudarme de forma incondicional en estos últimos tres años.

Referencias

- [1] G.J. Hutchings, C.R.A. Catlow, C. Hardacre, M.G. Davidson, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2016**, 374, DOI 10.1098/rsta.2015.0358.
- [2] C.K. Winkler, J.H. Schrittwieser, W. Kroutil, *ACS Cent. Sci.* **2021**, 7, 55–71.
- [3] S.P. France, L.J. Hepworth, N.J. Turner, S.L. Flitsch, *ACS Catal.* **2017**, 7, 710–724.
- [4] C. Ascaso-Alegre, J. Mangas-Sánchez, *Eur. J. Org.* **2022**, e202200093.
- [5] F. Rudroff, M.D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U.T. Bornscheuer, *Nat. Catal.* **2018**, 1, 12–22.
- [6] H. Gröger, W. Hummel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 19, 171–179.
- [7] J.H. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall, W. Kroutil, *Chem. Rev.* **2018**, 118, 270–348.
- [8] L.A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, *Int. J. Biomed. Sci.* **2006**, 2, 85–100.
- [9] M.A. Huffman, A. Fryszkowska, O. Alvizo, M. Borra-Garske, K.R. Campos, K.A. Canada, P.N. Devine, D. Duan, J.H. Forstater, S.T. Grosser, H.M. Halsey, G.J. Hughes, J. Jo, L.A. Joyce, J.N. Kolev, J. Liang, K.M. Maloney, B.F. Mann, N.M. Marshall, M. McLaughlin, J.C. Moore, G.S. Murphy, C.C. Nawrat, J. Nazor, S. Novick, N.R. Patel, A. Rodríguez-Granillo, S.A. Robaire, E.C. Sherer, M.D. Truppo, A.M. Whittaker, D. Verma, L. Xiao, Y. Xu, H. Yang, *Science* **2020**, 368, 1255–1259.

- [10] G.A. Aleku, S.P. France, H. Man, J. Mangas-Sánchez, S.L. Montgomery, M. Sharma, F. Leopold, S. Hussain, G. Grogan, N.J. Turner, *Nat. Chem.* **2017**, 9, 961–969.
- [11] J.R. Marshall, P. Yao, S.L. Montgomery, J.D. Finnigan, T.W. Thorpe, R.B. Palmer, J. Mangas-Sánchez, R.A.M. Duncan, R.S. Heath, K.M. Graham, D.J. Cook, S.J. Charnock, N.J. Turner, *Nat. Chem.* **2021**, 13, 140–148.
- [12] J. Mangas-Sánchez, S.P. France, S.L. Montgomery, G.A. Aleku, H. Man, M. Sharma, J.I. Ramsden, G. Grogan, N.J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, 37, 19–25.
- [13] S.L. Montgomery, A. Pushpanath, R.S. Heath, J.R. Marshall, U. Klemstein, J.L. Galman, D. Woodlock, S. Bisagni, C.J. Taylor, J. Mangas-Sánchez, J.I. Ramsden, B. Domínguez, N.J. Turner, *Sci. Adv.* **2020**, 6, 1–13.
- [14] J. Mangas-Sánchez, M. Sharma, S. C. Cosgrove, J.I. Ramsden, J.R. Marshall, T.W. Thorpe, R. B. Palmer, G. Grogan, N.J. Turner, *Chem. Sci.* **2020**, 11, 5052–5057.
- [15] M. Sharma, J. Mangas-Sánchez, S.P. France, G.A. Aleku, S.L. Montgomery, J.I. Ramsden, N.J. Turner, G. Grogan, *ACS Catal.* **2018**, 11534–11541.
- [16] S.L. Montgomery, J. Mangas-Sánchez, M.P. Thompson, G.A. Aleku, B. Domínguez, N.J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 10491–10494.
- [17] M. Tavanti, J. Mangas-Sánchez, S.L. Montgomery, M.P. Thompson, N.J. Turner, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 9790–9793.
- [18] A. Penneç, C.L. Jacobs, D. J. Opperman, M. S. Smit, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, 357, 118–130.
- [19] M. Schober, C. MacDermaid, A.A. Ollis, S. Chang, D. Khan, J. Hosford, J. Latham, L.A.F. Ihnken, M.J.B. Brown, D. Fuerst, M.J. Sanganee, G.-D. Roiban, *Nat. Catal.* **2019**, 2, 909–915.
- [20] S.R. Derrington, N.J. Turner, S.P. France, *J. Biotechnol.* **2019**, 304, 78–88.
- [21] I. Sorribes, J.R. Cabrero-Antonino, C. Vicent, K. Junge, M. Beller, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 13580–13587.
- [22] J.R. Cabrero-Antonino, R. Adam, M. Beller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 12820–12838.
- [23] M.C. Fu, R. Shang, W.M. Cheng, Y. Fu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 9042–9046.

- [24] V. Harawa, T.W. Thorpe, J.R. Marshall, J.J. Sangster, A.K. Gilio, L. Pirvu, R.S. Heath, A. Angelastro, J.D. Finnigan, S. J. Charnock, J. W. Nafie, G. Grogan, R.C. Whitehead, N.J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, 144, 21088–21095.
- [25] H.S. Toogood, N.S. Scrutton, *ACS Catal.* **2018**, 8, 3532–3549.
- [26] T.W. Thorpe, S.P. France, S. Hussain, J.R. Marshall, W. Zawodny, J. Mangas-Sánchez, S.L. Montgomery, R.M. Howard, D.S.B. Daniels, R. Kumar, F. Parmeggiani, N.J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 19208–19213.
- [27] D. Kracher, R. Kourist, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2021**, 32, 100538.
- [28] E. García-Urdiales, I. Lavandera, V. Gotor, *Enzym. Catal. Org. Synth. Third Ed.* **2012**, 1, 43–66.
- [29] L. C. Yang, H. Deng, H. Renata, *Org. Process Res. Dev.* **2022**, 26, 1925–1943.
- [30] J. Mangas-Sánchez, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 5304–5310.
- [31] D. Méndez-Sánchez, J. Mangas-Sánchez, I. Lavandera, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *ChemCatChem* **2015**, 7, 4016–4020.
- [32] G.A. Aleku, J. Mangas-Sánchez, J. Citoler, S.P. France, S.L. Montgomery, R.S. Heath, M.P. Thompson, N.J. Turner, *ChemCatChem* **2018**, 10, 515–519.
- [33] N.A. Para, D.W.C. MacMillan, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4370–4371.
- [34] B. List, R.A. Lerner, C.F.B. Iii, N. Torrey, P. Road, L. Jolla, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2395–2396.
- [35] J.J. Sangster, J.R. Marshall, N.J. Turner, J. Mangas-Sánchez, *ChemBioChem* **2022**, 23, e202100464.
- [36] M. Liu, D. Wei, Z. Wen, J. Wang, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, 9, 297.
- [37] C.L. Windle, M. Müller, A. Nelson, A. Berry, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 19, 25–33.
- [38] R. Millet, A.M. Träff, M.L. Petrus, J.E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 15182–15184.
- [39] R.C. Simon, E. Busto, J.H. Schrittwieser, J.H. Sattler, J. Pietruszka, K. Faber, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 15669–15672.

- [40] M. Heidlindemann, G. Rulli, A. Berkessel, W. Hummel, H. Gröger, *ACS Catal.* **2014**, 4, 1099–1103.
- [41.] C. Ascaso-Alegre, R.P. Herrera, J. Mangas-Sánchez, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, 61, 1–5.
- [42] G. Wittig, U. Schöllkopf, *Chem. Ber.* **1954**, 87, 1318–1330.
- [43] A.P. Matthey, G.J. Ford, J. Citoler, C. Baldwin, J.R. Marshall, R.B. Palmer, M. Thompson, N.J. Turner, S.C. Cosgrove, S.L. Flitsch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 18660–18665.
- [44] I. Peñafiel, R.A.W. Dryfe, N.J. Turner, M.F. Greaney, *ChemCatChem* **2021**, 13, 864–867.
- [45] W. Finnigan, J. Citoler, S. C. Cosgrove, N.J. Turner, *Org. Process Res. Dev.* **2020**, 24, 1969–1977.

