



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE
AMINOÁCIDOS NO CANÓNICOS**

Autor: Sara Martín Gabriel

Fecha: Febrero 2020

Tutor: Andrés Rafael Alcántara León

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	3
2	INTRODUCCIÓN	3
2.1	Selectividad enzimática	4
2.2	Tipos de biocatalizadores	4
2.3	Promiscuidad catalítica.....	5
2.4	La biocatálisis y el concepto de química verde	6
2.5	Mutagénesis racional y evolución dirigida.....	7
3	OBJETIVOS.....	8
4	MATERIAL Y MÉTODOS	9
5	RESULTADOS Y DISCUSION.....	9
5.1	Producción de aminoácidos no canónicos	9
5.2	L-homoalanina y biocatálisis.....	11
5.2.1	Síntesis química asimétrica de Levetiracetam	11
5.2.2	Método 1. Uso de deshidrogenasas para la obtención de L-homoalanina	12
5.2.3	Método 2. Obtención de L-homoalanina a partir de un aminoácido natural (treonina) utilizando transaminasas y deshidrogenasas.	13
5.2.4	Método 3. Obtención de L y D-homoalanina a partir de un aminoácido natural (metionina) utilizando transaminasas.....	15
5.2.5	Método 4. Obtención de L-homoalanina a partir 2-pirrilodinona utilizando nitrilo hidratadas	16
6	CONCLUSIONES	18
7	BIBLIOGRAFÍA.....	19

1 RESUMEN

Dentro de la industria farmacéutica, estos últimos años ha ido cogiendo fuerza el concepto de biocatálisis, que consiste en el empleo de enzimas purificadas o células enteras con el objetivo de convertir sustratos en productos diferentes a los que la enzima genera de forma habitual. Las enzimas son de gran utilidad en la síntesis de fármacos gracias a que ofrecen reacciones con temperaturas suaves y pH moderados, además de presentar alta quimioselectividad, regioselectividad y estereoselectividad para la producción de compuestos enantioméricamente puros. Todo esto contribuye a reducir los costes de producción y aplicar los 12 principios de la química verde. En el presente trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica sobre qué son los aminoácidos no canónicos, su producción y en especial sobre el aminoácido no canónico *L*-homoalanina, precursor del fármaco antiepiléptico levetiracetam, y métodos de obtención de este aminoácido a partir de diferentes rutas biocatalíticas utilizando diferentes enzimas: deshidrogenasas, aminotransferasas, y nitrilo hidratasas.

2 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la biotecnología, definida por la Sociedad Química Americana como “*la aplicación de organismos biológicos, sistemas o procesos por diversas industrias con el fin de aprender sobre las ciencias de la vida e incrementar el valor de materiales y organismos tales como productos farmacéuticos, cultivos agrícolas o ganado*” (1) ha evolucionado de forma considerable. La historia de la biotecnología se puede definir en tres grandes etapas, siendo la primera la denominada biotecnología primitiva, utilizada para la fabricación de cerveza por procesos de fermentación, aún sin saber el cambio que se producía en este alimento. Posteriormente, a mediados del siglo XIX y principios del siglo XX, aparece la segunda etapa, conocida como la biotecnología clásica, en la que Pasteur desmonta la generación espontánea y llega a la conclusión de que la fermentación es un proceso llevado a cabo por levaduras. Por último, la gran revolución biotecnológica es llevada a cabo a mediados del siglo XX, con el descubrimiento del DNA (1).

Dentro del mundo de la biotecnología se encuentra la biocatálisis, método en el cual se emplean células aisladas o enzimas para catalizar o transformar procesos químicos y obtener productos de interés para el ser humano. Este concepto se engloba dentro de la biotecnología blanca, aplicada a los procesos industriales, la cual tiende a consumir menos recursos que los procedimientos tradicionales. La biotecnología blanca también se aplica a la producción de biocombustibles y a la industria textil, responsable de la creación de nuevos materiales como plásticos biodegradables y compostables (2).

Las enzimas están diseñadas para trabajar bajo condiciones fisiológicas (*in vivo*). En cambio, el concepto de biocatálisis se refiere al uso de enzimas en procesos catalíticos bajo condiciones artificiales (*in vitro*), por lo que uno de los principales retos de la biocatálisis es transformar estos biocatalizadores fisiológicos en catalizadores capaces de trabajar en condiciones de reacción adaptadas a procesos industriales. Como cualquier catalizador, las enzimas son capaces de reducir la energía de barrera de la reacción que catalizan, sin ser alteradas como consecuencia de ésta (3). Sin embargo, las enzimas son muy complejas y presentan diferentes propiedades según su estructura a nivel molecular, y, a diferencia de los catalizadores químicos, podemos encontrar algunas desventajas derivadas del uso de estos biocatalizadores:

- ✓ Su desactivación cuando se les extrae de sus condiciones normales de trabajo
- ✓ La posibilidad de ser inhibidas por el propio sustrato o producto si está en exceso

- ✓ Algunas enzimas requieren el uso de cofactores (componentes no proteicos implicados en el proceso de catálisis)
- ✓ Algunas enzimas puede ser alérgenas, por lo que se debe tener cuidado a la hora de elegir un catalizador.

Por otro lado, las enzimas empleadas en biocatálisis presentan una serie de ventajas:

- ✓ Son catalizadores más eficientes que los catalizadores químicos, lo que implica una menor concentración de enzima para llevar a cabo la reacción.
- ✓ A diferencia de los catalizadores químicos, las enzimas son biodegradables y actúan sobre condiciones de temperatura y presión suaves.
- ✓ Presentan alta selectividad: regio, quimio y enantioselectividad
- ✓ Las enzimas son capaces de llevar a cabo reacciones que con catalizadores químicos serían imposibles, admitiendo una amplia variedad de sustratos.
- ✓ Permiten ser inmovilizadas, aumentando su actividad y pudiendo ser reutilizadas en varios ciclos.
- ✓ Pueden ser sobreexpresadas aumentando el rendimiento biotecnológico y el coste/beneficio. Además, con técnicas de ingeniería genética se pueden modificar la estructura molecular de la enzima, aumentando la especificidad del sustrato.
- ✓ La biocatálisis se podría presentar como una alternativa más ecológica comparada con la síntesis química tradicional, en la cual se utilizan residuos bastante tóxicos que tardan mucho en degradarse en nuestro medio ambiente. Cumple los principios de la química sostenible (1).

2.1 Selectividad enzimática

Los biocatalizadores presentan alta selectividad; ésto los hace muy interesantes para la síntesis de fármacos en la industria farmacéutica, debido a que la pureza enantiomérica del producto final es un proceso crucial en la síntesis de fármacos. Por ejemplo, mientras que el enantiómero *R* de un fármaco puede que sea el que ejerza la acción farmacológica (eutómero), el enantiómero *S* puede ser tóxico (distómero). Así, se distinguen tres tipos de selectividad enzimática:

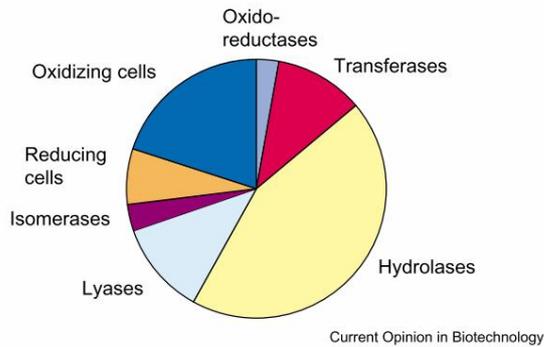
- ✓ Enantioselectividad: capacidad para distinguir entre los dos enantiómeros de una mezcla racémica, logrando que solo uno reaccione.
- ✓ Quimioselectividad: preferencia por uno de los grupos funcionales presentes en la molécula.
- ✓ Regioselectividad: diferenciar uno de los centros químicamente equivalentes de un compuesto y realizar su transformación (1).

2.2 Tipos de biocatalizadores

Las enzimas utilizadas como biocatalizadores se clasifican según el tipo de reacciones que catalizan (1):

Tipo de enzima	Reacción catalizada
<i>Oxido – reductasas</i>	Reacciones de óxido reducción
<i>Transferasas</i>	Transferencia de grupos
<i>Hidrolasas</i>	Reacciones de hidrólisis
<i>Liasas</i>	Adiciones a dobles enlaces
<i>Isomerasas</i>	Reacciones de isomerización
<i>Ligasas</i>	Formación de enlaces

La quiralidad del producto es muy importante, pero en la mayoría de los productos enantioméricamente puros, la configuración se origina en el precursor. Cuando la pureza enantiomérica es debido a una biotransformación, tanto la resolución cinética como la síntesis asimétrica ocurren. La **síntesis asimétrica** suele ser llevada a cabo por oxidorreductasas y liasas, mientras que las **resoluciones cinéticas** son exclusivamente llevadas a cabo por hidrolasas.



La mayoría de los procesos catalíticos participan enzimas hidrolíticas, solo una cuarta parte de los estudios trata sobre oxidorreductasas y menos de un 15% se encarga de las otras categorías. (Figura 1) (4).

Figura 1. Diferentes tipos de enzimas usadas en biotransformaciones industriales.

La resolución cinética de racematos y la síntesis asimétrica se consideran como estrategias útiles desde un punto de vista comercial para la preparación de la mayoría de los aminoácidos no proteínogénicos debido a su amplia gama de posibles productos.

En el proceso de **resolución cinética** enzimática, dos enantiómeros reaccionan con un biocatalizador quiral a distintas velocidades, produciendo una mezcla enriquecida en uno de los enantiómeros del producto, en la que se encuentra el enantiómero no deseado del sustrato. La mayoría de enzimas empleadas en este proceso son: lipasas, acilasas, amidasas, y nitrilasas. Sin embargo, este proceso está limitado por un rendimiento máximo teórico del 50%. Para evitar esta limitación, se puede llevar a cabo la racemización del 50% del enantiómero no deseado y su posterior reciclado. De esta manera, el sustrato puede ser transformado a un solo isómero del producto con un rendimiento teórico del 100%. Cuando este proceso de resolución cinética es combinado con racemización química o enzimática, la producción a gran escala es prometedora.

Sin embargo, en los últimos años ha ido ganando terreno la **síntesis asimétrica** de aminoácidos quirales, debido a un ahorro económico y pocos pasos de reacción. En este proceso, utilizando un catalizador quiral y siendo el producto de partida un compuesto proquiral, dicho producto de partida es directamente transformado a un solo enantiómero en un solo paso. Generalmente hay cuatro rutas principales para la obtención de estos compuestos (4):

1. Aminación reductiva asimétrica de aminoácidos
2. Transferencia asimétrica de un grupo amino a un oxoácido
3. Adición enantioselectiva de amonio a ácidos α , β -insaturados
4. Condensación aldólica de un aminoácido a un aldehído.

2.3 Promiscuidad catalítica

En el metabolismo, una enzima se optimiza a través de la evolución para una transformación química específica con un reconocimiento específico del sustrato. Aun así, muchas enzimas también presentan actividades alternativas o aceptan sustratos alternativos, diciéndose que

presentan un comportamiento **promiscuo**. Estas enzimas que presentan este comportamiento ocasionalmente pueden: i) mostrar un aumento de la actividad bajo condiciones que no son las naturales -*promiscuidad de condiciones de reacción*- ii) mostrar amplia aceptación de sustratos -*promiscuidad de sustrato*- o realizar el proceso de catálisis en un centro activo alternativo -*promiscuidad del centro activo alternativo*.

Por tanto, se define **promiscuidad catalítica** como la transformación química que se realiza a través de un mecanismo de acción diferente al natural.

El enlace formado o roto debe ser diferente del generado en la transformación natural y, por lo tanto, debe conducir a una estructura de estado de transición alternativa. Esto podría ocurrir en una enzima silvestre (*wild type*) si se somete a sustratos que no son naturales a la enzima (*promiscuidad catalítica accidental*) o en una variante de la enzima en la que se reemplazaron los residuos catalizadores de aminoácidos (*promiscuidad catalítica inducida*). La promiscuidad catalítica inducida puede lograrse ya sea a través de la unión de un cofactor no natural, como resultado de ingeniería de proteínas o la evolución dirigida (5).

2.4 La biocatálisis y el concepto de química verde

Según Anastas et al (2010), se define la química verde como *el diseño de productos químicos y procesos destinados a reducir o eliminar el uso y generación de sustancias nocivas*. Tanto la definición como el concepto de química verde fueron inicialmente formulados a principios de los años 90, y a partir de ahí ha ido surgiendo un movimiento internacional, con la creación de programas e iniciativas de gobierno. El diseño es lo más importante y están recogidos en “los 12 principios de la química verde” (figura 2) que son las pautas a seguir para conseguir sostenibilidad. La química verde ha sido aplicada a otras industrias, como la cosmética, la electrónica, energía, aeroespacial... (6).

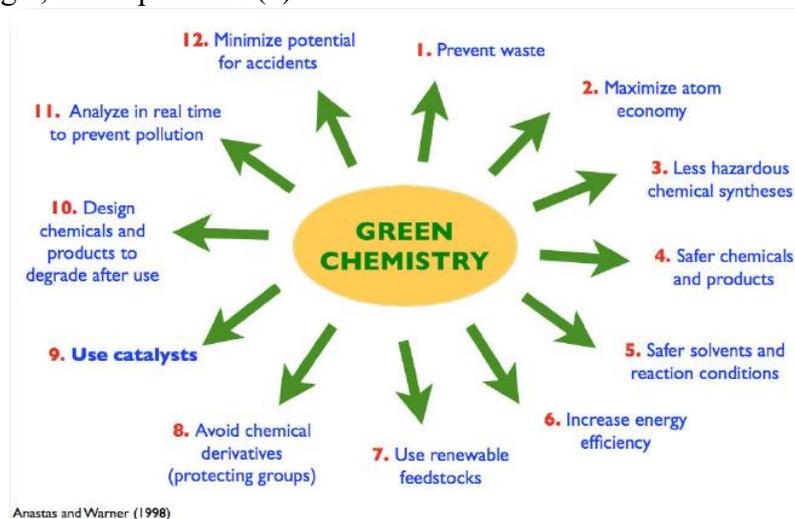


Figura 2. Los 12 principios de la química verde.

La biocatálisis juega un papel muy importante en la química verde, ya que se presenta como una solución a alternativas químicas nocivas con el medio ambiente y sigue siendo una opción económicamente viable.

Para medir si un proceso es nocivo o no para el medio ambiente, se emplea el **factor E**, que indica el impacto medioambiental del proceso. Es un parámetro químico que se expresa como

la masa de residuos por kilogramo de producto deseado en una reacción; por lo que el valor deseado es 0, que supondría 0 residuos. Cuanto más alto el valor de E, mayor número de residuos y mayor impacto medioambiental. Por ejemplo, la industria farmacéutica presenta un alto valor de E, ya que genera una alta cantidad de residuos tóxicos como disolventes y compuestos halogenados (1).

2.5 Mutagénesis racional y evolución dirigida

La mayoría de las características de las enzimas aisladas a partir de fuentes naturales no son las adecuadas para trabajar como biocatalizadores a nivel industrial, ya que son necesarias enzimas con mayor actividad y estabilidad. Estas propiedades han sido estudiadas ya desde el siglo pasado, y, en los últimos tiempos, los estudios se han centrado más en cómo alterar sus propiedades que en sus propiedades. Tanto es así que las mutaciones pueden incorporarse a los genes de una enzima con relativa facilidad, sin embargo los efectos de las mutaciones no son siempre fáciles de predecir (7).

Surge por tanto los conceptos de **mutagénesis racional**, también llamada **mutagénesis dirigida o diseño racional**, y **evolución dirigida**, dos estrategias que permiten mejorar las distintas propiedades de las enzimas, como son el aumento de la eficacia catalítica, aumento de su estabilidad, modificación de las condiciones óptimas de reacción, promiscuidad catalítica (ver concepto en el apartado 2.3) o búsqueda de nuevas actividades.

Mutagénesis racional se basa en la mutagénesis dirigida de residuos concretos del centro activo u otras zonas de la estructura de la enzima. Para ello se necesita:

1. Conocer la estructura tridimensional de la enzima
2. Conocer la relación estructura-función de la enzima
3. Saber utilizar herramientas informáticas para determinar qué tipo de modificaciones se van a realizar
4. Conocer las distintas variantes de las técnicas de mutagénesis dirigida.

Un ejemplo de la mutagénesis racional fue el diseño de una glutaril acilasa, capaz de hidroxilar CFC a 7-ACA directamente, sin necesidad de llevar a cabo la desaminación oxidativa previa. Este nuevo catalizador era capaz de llevar a cabo la reacción directamente y con una actividad 8 veces mayor que la enzima nativa.

La **evolución dirigida** es específica para ajustar las propiedades catalíticas a las condiciones deseadas. Se ha convertido en una poderosa herramienta no solo en ingeniería enzimática óptima para uso industrial, sino para resaltar las relaciones entre su secuencia proteica, estructura y función. Se aplican procesos mutagénicos, aleatorios o recombinatorios, o ambos, a un gen, generándose cierta diversidad, que es representada en una genoteca de mutantes. Esta genoteca es sometida a un proceso de selección, del cual se obtendrán los mejores candidatos que volverán a ser sometidos al proceso de mutación-recombinación-selección. Los mejores candidatos serán aquellos que se ajusten mejor a las propiedades catalíticas que queramos obtener. Los requisitos que este método requieren son:

1. Identificación y disponibilidad de un gen que codifique la proteína que queremos insertar
2. Un sistema de expresión conveniente
3. Un método efectivo para generar una genoteca de variantes
4. Un sistema de selección apropiado

Uno de los ejemplos en los que se ha utilizado la evolución dirigida para aumentar la actividad de un biocatalizador en la industria farmacéutica es en la síntesis de Montelukast, en la cual se

aumentó 300 veces la actividad enzimática de la alcohol deshidrogenasa, obteniendo altos rendimientos además de una estereoselectividad muy elevada (1).

La ventaja de la evolución dirigida frente al diseño racional es que no se requiere un conocimiento tan minucioso de la estructura tridimensional de la enzima, que, aunque es útil, no es esencial.

Es importante destacar que ambos métodos no son incompatibles, y recientemente se ha empleado un método “híbrido” denominado diseño semi-racional, que incluye la mutagénesis de saturación de sitios específicos de la enzima o mutagénesis aleatoria sobre una parte de la enzima en lugar de sobre enzima entera (7). **Figura 3.**

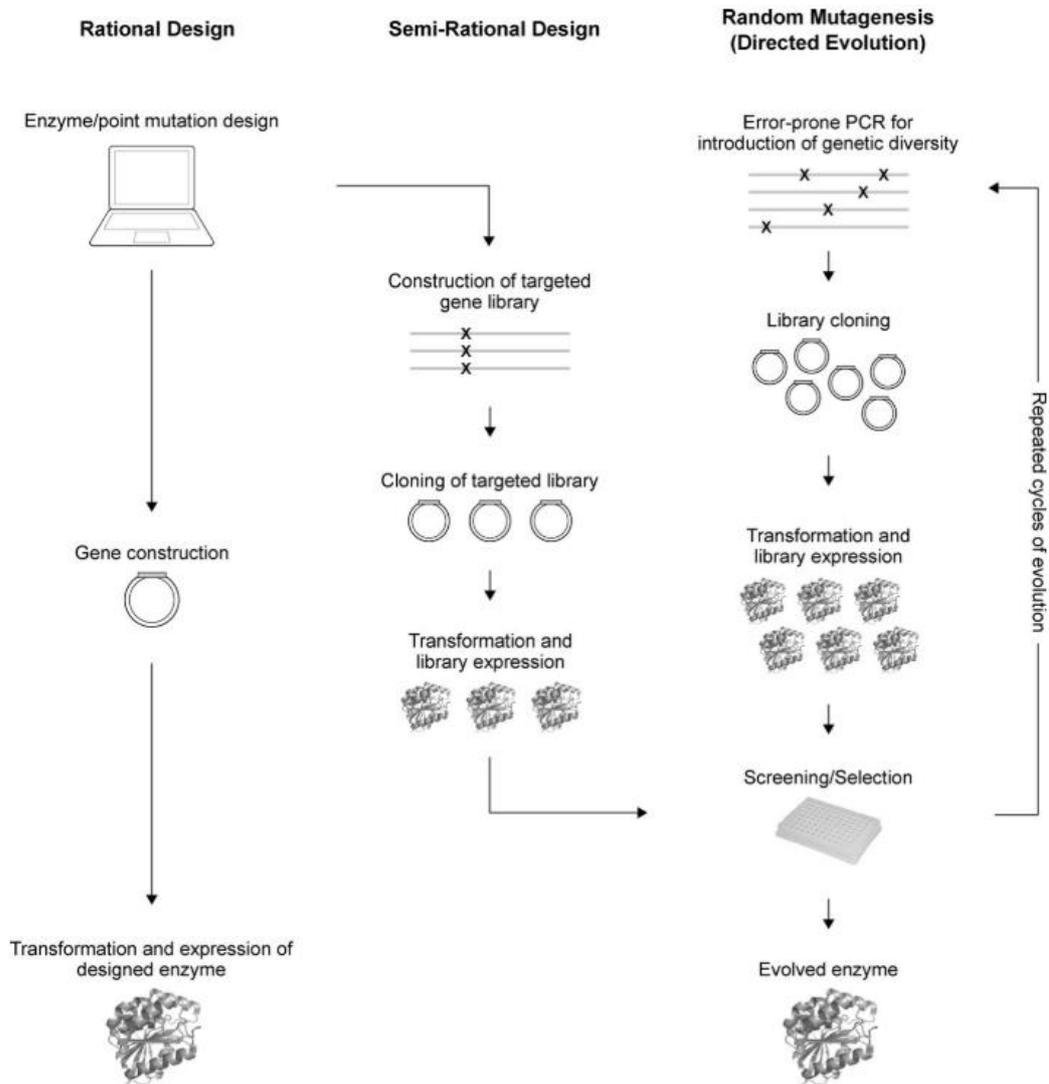


Figura 3. Estrategias para el diseño racional, o evolución dirigida de enzimas

3 OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es exponer la relevancia de la biocatálisis en el panorama actual, sus ventajas e inconvenientes y ofrecer una visión de la aplicación de los procesos de biocatálisis en el ámbito de la síntesis de fármacos, además de dar a conocer el concepto de aminoácidos no canónicos y su utilidad terapéutica, a través de la comparación de diferentes métodos de biosíntesis de levetiracetam, fármaco antiepiléptico.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica en diferentes bases de datos como PubMed, Google Academic, CIMA y diversas páginas web, y se ha tomado como referencia el libro “Fundamentos de Biotecnología Farmacéutica” (1). Se ha utilizado como gestor bibliográfico el programa Mendeley.

5 RESULTADOS Y DISCUSION

Los **aminoácidos no canónicos o aminoácidos no naturales** (*non-canonical amino acids - ncAAs/unnatural aminoacids*) son una clase de aminoácidos que se encuentran presentes en la naturaleza, pero no están incorporados en la cadena peptídica. La mayoría de estos aminoácidos son precursores de los aminoácidos naturales, análogos o metabolitos secundarios de rutas metabólicas, e incluso algunos presentan propiedades farmacológicas: antibacterianas, antiinflamatorias, antitumorales e incluso efectos antihipertensivos. Se pueden encontrar en diversos organismos ejerciendo diferentes funciones en animales, plantas y microorganismos. Sin embargo, comparados con los estudiados aminoácidos naturales, la mayoría de las rutas sintéticas de estos ncAAs se encuentran sin definir, ya que muy pocas de estas han sido estudiadas.

La preparación de estos aminoácidos depende de síntesis química o semi-síntesis. Sin embargo, la mayoría de estos aminoácidos preparados químicamente se obtienen como mezclas racémicas, pudiendo afectar a síntesis posteriores. Es aquí donde destaca el papel de la biocatálisis, la cual presenta ventajas en estereoselectividad comparado con la síntesis química tradicional. El desarrollo de rutas biosintéticas para producir estos aminoácidos requiere un alto conocimiento de su metabolismo, además de ingeniería genética y metabólica.

Es importante destacar que los ncAAs pueden contener en su estructura cadenas laterales o grupos funcionales con propiedades químicas y estructurales que los aminoácidos naturales no presentan, y la incorporación de éstos en una cadena peptídica puede originar proteínas sintéticas biológicamente activas, introduciendo características novedosas que no se encuentran en las proteínas naturales. Por ejemplo, la incorporación de aminoácidos análogos de selenometionina, norleucina y *p*-fluorofenilalanina fueron los primeros ejemplos de incorporación de ncAAs en *E. coli* (8).

5.1 Producción de aminoácidos no canónicos

Con respecto a la síntesis química de estos aminoácidos, se sabe que son difíciles de sintetizar porque usualmente contienen un estereocentro en la posición α que debe tener una configuración específica. Además, los grupos amino y carbonilo son grupos reactivos, y deben ser protegidos. Estos problemas se agravan cuando estos ncAAs contienen cadenas laterales voluminosas y complejas, grupos funcionales muy reactivos u otros estereocentros dentro de la misma molécula. La naturaleza soslaya todos estos problemas usando *enzimas*, que unen y posicionan los sustratos para acelerar una reacción específica, obteniendo aminoácidos enantioméricamente puros en el medio acuoso sin la necesidad de usar grupos protectores. A pesar de presentar las enzimas esta ventaja, muchas de ellas no son las apropiadas para la síntesis de ncAAs debido a su baja actividad, mala expresión endógena y estabilidad, y por último, su necesidad de activación alostérica. Además, muchos de estos aminoácidos son naturalmente sintetizados por cascadas enzimáticas, que pueden ser difíciles de identificar y

usar en síntesis a gran escala. Por tanto, se necesitan nuevas estrategias de síntesis, y las enzimas modificadas genéticamente ofrecen resultados prometedores.

Como hemos mencionado anteriormente, la síntesis de estos ncAAs puede ser, aparte de por síntesis o semi síntesis química, por fermentación y biocatálisis. Su síntesis por fermentación requiere un microorganismo que sea capaz de sintetizar el ncAAs que queramos. Esto es una gran complicación, ya que las rutas biosintéticas de muchos de estos aminoácidos presentan poco rendimiento o son desconocidas. Con la síntesis química se puede acceder a un gran número de ncAAs, empleando compuestos intermedios como aziridinas, lactonas derivadas de serina y muchas más. Los beneficios de la síntesis química son diversos, como por ejemplo la capacidad de obtener una variedad de aminoácidos de una única ruta sintética (Figura 4). Aun así, tiene sus limitaciones, son rutas muy complejas y en ellas se usan compuestos químicos nocivos con el medio ambiente, además de producir productos de desecho altamente contaminantes y generarse productos racémicos que conlleva su posterior purificación.

La biocatálisis se presenta como una alternativa a ambas, suplementa o reemplaza a la fermentación y a la síntesis química. Reacciones catalizadas por enzimas tienen la ventaja de que presentan condiciones suaves de reacción más todas aquellas mencionadas en el apartado de introducción (9).

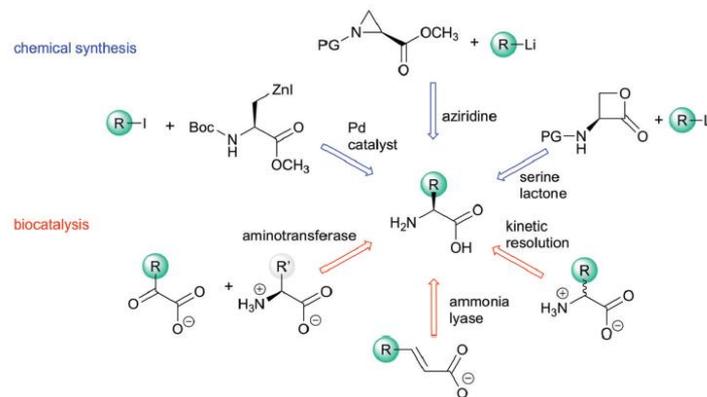


Figura 4. Diferentes métodos para sintetizar ncAAs utilizando síntesis química o biocatálisis

Este trabajo tiene como objetivo la comparación de las diferentes rutas biosintéticas de L-homoalanina, ncAAs precursor del levetiracetam (Keppra®), fármaco antiepiléptico de segunda generación, indicado:

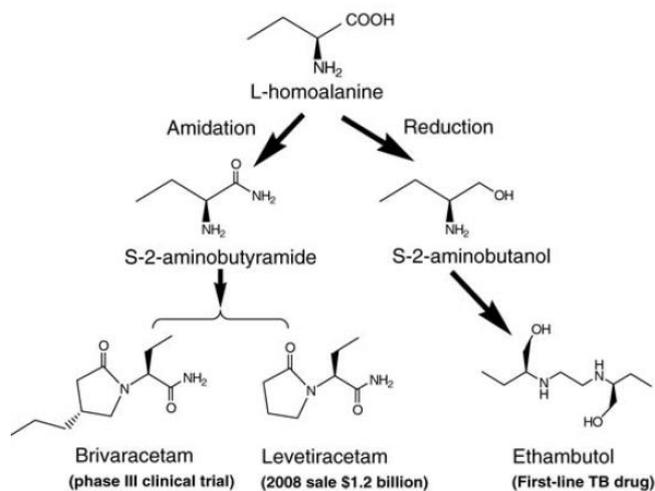
- Como monoterapia en el tratamiento de las crisis de inicio parcial con o sin generalización secundaria en adultos y adolescentes de 16 años de edad o mayores con un nuevo diagnóstico de epilepsia.

Como terapia concomitante:

- en el tratamiento de las crisis de inicio parcial con o sin generalización secundaria en adultos, adolescentes y en niños mayores de 4 años con epilepsia
- en el tratamiento de las crisis mioclónicas en adultos y adolescentes mayores de 12 años con Epilepsia Mioclónica Juvenil.
- En el tratamiento de las crisis tónico-clónicas generalizadas primarias en adultos y adolescentes mayores de 12 años con Epilepsia Generalizada Idiopática.(10)

5.2 L-homoalanina y biocatálisis

La L-homoalanina es un ncAA quiral intermediario en la síntesis de diversos fármacos. Puede ser convertido a (S)-2-aminobutiramida, precursor inmediato de los fármacos antiepilépticos levetiracetam (Keppra®) y brivaracetam. También puede ser convertido a (S)-2-aminobutanol para la síntesis del fármaco antituberculoso etambutol (figura 3). La pureza de estos fármacos es crítica para su seguridad y eficacia terapéutica. El enantiómero R de levetiracetam no tiene actividad antiepiléptica (11), y la forma R,R del etambutol puede causar ceguera (12). **Figura 5.**



Aún siendo ahora fármacos genéricos, siguen siendo tratamientos muy costosos, y muchos pacientes no pueden permitirse el tratamiento con levetiracetam, usando fármacos más baratos pero menos efectivos como fenobarbital. Esto se podría evitar desarrollando un método para la producción a gran escala de L-homoalanina.

5.2.1 Síntesis química asimétrica de Levetiracetam

Para empezar, presentaremos los diversos métodos para la síntesis puramente química de este potente fármaco anticonvulsivo. La mayoría de rutas sintéticas requieren empezar a partir de α -aminoácidos como ácido 2-aminobutírico (L-homoalanina) o derivados de éste. En otros procedimientos se lleva a cabo la resolución de etiracetam (forma activa de levetiracetam) o intermedios racémicos de los mismos:

- Ácido 2- (2-oxopirrolidin-1-il) butírico con (R)-feniletil amina seguido de la reacción consecutiva del correspondiente (S)-ácido con cloroformiato de etilo e hidróxido de amonio
- La resolución de etiracetam por HPLC
- N-dietilaminometilación de la amida primaria de etiracetam seguido de la resolución con ácido L-(+)-tartárico, y la hidrólisis del enantiómero requerido.

En otro enfoque, levetiracetam ha sido preparado por medio de hidrogenación catalítica enantioselectiva mediante el uso de Rh (I) o Ru (II) de difosfinas enantiopuras (13).

En otros artículos se describe la desracemización de ácido 2-bromobutírico mediante el uso de 4-aminodifenilamina como un auxiliar quiral para obtener el **compuesto 1** (14). A pesar de que es un enfoque quiral empleando un auxiliar, el 50% del producto se pierde como el isómero no deseado, lo que disminuye en gran medida su utilidad sintética para su producción a gran escala.

Por último, se indica cómo sería un método de síntesis química pura para la obtención de levetiracetam mediante la aplicación de la reacción de Strecker:

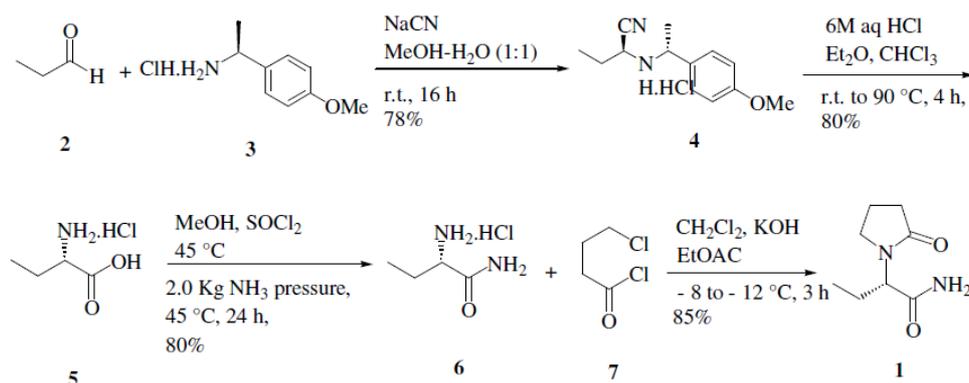


Figura 6. Síntesis química asimétrica de levetiracetam

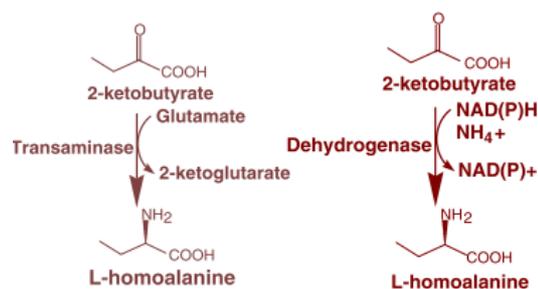
En un primer paso, al **compuesto 2** (propanal) se le añade en una solución de cianuro sódico más el **compuesto 3** (1S)-1-(4-metoxifenil)etilamina en una mezcla de metanol y agua a 25-30°C, obteniéndose el **compuesto 4**, sustancia diastereoméricamente pura, puesto que el ataque del anión cianuro se produce por la cara posterior de la imina formada entre **2** y **3**. Posteriormente, el compuesto 4 se hidroliza en ácido clorhídrico 6M, obteniendo la sal del compuesto enantioméricamente puro ácido (S)-2-aminobutírico, el **compuesto 5**, intermedio clave para la síntesis de este fármaco. Este intermedio, tras ser lavado con cloroformo, reacciona con cloruro de etionilo, amoníaco gaseoso en presencia de metanol para dar el **compuesto 6**. Por último, se produce la condensación del **compuesto 6** con cloruro de 4-clorobutanoilo, **compuesto 7**, que en presencia de hidróxido de potasio y diclorometano a bajas temperaturas se origina el **compuesto 1**, levetiracetam. Ver **Figura 6** (15).

5.2.2 Método 1. Uso de deshidrogenasas para la obtención de L-homoalanina

Los métodos convencionales para la producción a gran escala de estos ncAAs son complejos y perjudiciales para el medio ambiente. Generalmente, varios 2-oxoácidos pueden ser sintetizados químicamente y posteriormente convertidos a ncAAs por transaminasas o deshidrogenasas, obteniendo compuestos puros. Otro acercamiento sería el uso de enzimas como acilasas o amidasas para resolver las mezclas racémicas y obtener ncAAs. En comparación con estas dos técnicas, la mayoría de estos ncAAs pueden ser producidos directamente por glucosa por fermentación microbiana, aún teniendo algunos inconvenientes.

La aminación reductiva de oxoácidos con amonio es la mejor opción para la producción de este aminoácido ya que evita el uso de glutamato como el donador de aminas. Comparado con la transaminación, la aminación reductiva puede potencialmente simplificar la manipulación metabólica y reducir los costes de producción (Figura 7).

Figura 7. Comparación de diferentes métodos de obtención de L-homoalanina utilizando transaminasas o deshidrogenasas.



5.2.3 Método 2. Obtención de *L*-homoalanina a partir de un aminoácido natural (treonina) utilizando transaminasas y deshidrogenasas.

Según Park et al (2010), las transaminasas son las enzimas encargadas de la transferencia de grupos amino de un aminoácido a un oxoácido, jugando un importante papel en el metabolismo de los aminoácidos. Estas pueden ser α o ω -transaminasas (TA), según la relación de los grupos que se quiera transferir respecto al grupo carbonilo del sustrato. Las α -TA únicamente producen la transaminación entre aminoácidos y oxoácidos, mientras que la ω -TA presenta una más variada selectividad, haciendo posible la desaminación oxidativa de aminas primarias. Por eso, en contraste con el equilibrio neutro que presentan la mayoría de las reacciones α -TA, el equilibrio termodinámico de las ω -TA puede ser dirigido hacia la formación de productos utilizando aminas como donadoras del grupo amino.

Esta ruta de biosíntesis muestra un nuevo procedimiento rentable para la producción de *L*-homoalanina a partir de una ω -TA. La producción de este aminoácido se ha hecho a partir de dos reacciones enzimáticas:

La primera, la conversión de *L*-treonina a 2-oxobutirato a partir de la enzima treonina desaminasa y segundo, la transferencia de un grupo amino a partir de una bencilamina para la formación del producto final, la *L*-homoalanina (figura 8). Este último paso llevado a cabo por la enzima (*S*)- ω -TA, específica de sustrato. En esta reacción se utilizan como sustratos *L*-treonina y bencilamina, y se originan productos como amonio, benzaldehído y *L*-homoalanina. En esta reacción lo que se consigue es la sustitución del oxoácido como producto de partida, produciendo un ahorro económico importante por tener como producto inicial el aminoácido natural *L*-treonina, que se fabrica a gran escala anualmente. Asimismo, el uso de la bencilamina como el donante del grupo amino desata la restricción termodinámica de las transaminasas, permitiendo un alto rendimiento de la reacción sin la incorporación de otra enzima para remover uno de los productos originados en esta reacción. En resumen, se ha establecido una reacción de conversión directa de un aminoácido barato a un ncAA sin limitaciones termodinámicas para su conversión final.

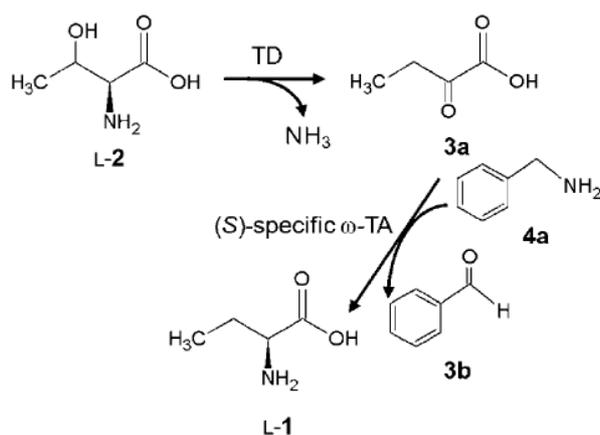


Figura 8. (L-2: treonina, 3a: oxobutirato 3b: benzaldehído, 4a: bencilamina, 4b: benzaldehído, L-1: *L*-homoalanina)

A partir de este estudio podemos concluir que a partir de un aminoácido natural podemos obtener ncAAs, productos de cada vez más interés en la industria farmacéutica. En este estudio se consiguen ventajas sobre el uso de enzimas deshidrogenasas: primero, los bajos costes de producción, ya que las DH requieren cofactores y su posterior reciclaje y segundo, el uso de ω -

TA promueve que la reacción se lleve a cabo hasta la formación del producto final sin la necesidad de una enzima adicional para eliminar uno de los productos secundarios generados en la reacción, el benzaldehído. Sin embargo, en este estudio no se implementó la extracción de los productos finales para mitigar la inhibición de ω -TA por benzaldehído, que posteriormente se debería estudiar si se quiere realizar este proceso a gran escala (16).

En el estudio dirigido por Zhang et al (2009) (17) también se vió el empleo de treonina para la producción de *L*-homoalanina a través de transaminasas. En este método de biosíntesis de *L*-homoalanina se estudió si en *E.coli* había una enzima capaz de producir la aminación entre 2-oxobutirato y *L*-homoalanina, concluyendo que se obtenían únicamente 182 mg/L. Posteriormente, tras varios experimentos se clonó y se sobreexpresó una transaminasa (IlvE), aumentando la producción de *L*-homoalanina a 1.2 g/L. Además, se adicionó 10g/L del principal donador de aminas (glutamato), aumentando la producción de este aminoácido no canónico a 3.2g/L. Todos estos resultados demostraron que las transaminasas como IlvE eran capaces de transformar 2-oxobutirato a *L*-homoalanina. Sin embargo, altas concentraciones de glutamato son necesarias para derivar el equilibrio de la reacción a la formación de *L*-homoalanina, ya que la reacción de transaminación es un proceso reversible.

A través de técnicas de evolución dirigida, se obtuvo una enzima glutamato deshidrogenasa mutante (GH2), altamente activa en la aminación de 2-oxobutirato. Cuando se sobreexpresó en *E.coli*, se produjo a 0.1g/L a partir de 30g/L de glucosa (#1) . Sin sobreexpresión de GH2, no se detectó presencia de *L*-homoalanina (#2). Con estos datos, se diseñó una ruta metabólica para dirigir el flujo de carbono a la formación de 2-oxobutirato. Dado que este compuesto deriva de la treonina, se cambió el huesped productor de *E.coli* tipo silvestre (BW25113) a una treonina sobreproductora (ATCC98082). En ésta, por tanto, se sobreexpresó tanto GH2 como treonina deshidratasa (enzima encargada de la formación de 2-oxobutirato). Esta nueva cepa fue capaz de producir 8g/L de treonina a partir de 30g/L de glucosa, resultando en la producción de 0.18g/L de *L*-homoalanina (#3) y 3.7g/L de treonina, indicando que la actividad catabólica de la enzima treonina deshidratasa no es lo suficientemente activa para producir completamente la conversión de treonina a 2-oxobutirato. Otra de las consecuencias es la acumulación de 4g/L de glutamato, debido a que las bajas concentraciones de 2-oxobutirato no pueden competir con 2-oxoglutarato para la aminación por GH2. Para remediar esto, se clonaron treonina deshidratasas de *E.coli* (IlvA_{EC}) y *Bacillus subtilis* (IlvA_{BS}) y en combinación con GH2, aumentaron significativamente la producción de *L*-homoalanina (#4 y #5), siendo la mejor la proveniente de *Bacillus subtilis* (3.8g/L de *L*-homoalanina). Sin embargo, todavía quedaba 2.5g/L de treonina remanente. Se sabe que ATCC98082 tiene una mutación rhtA23 que aumenta 10 veces la expresión del gen rhtA, cuyo producto proteico es un fuerte exportador de treonina. Se concluyó que el flujo activo de treonina podría explicar la acumulación extracelular de treonina. Después de la supresión del gen rhtA, no se vio acumulación de treonina y la concentración de *L*-homoalanina aumentó a 5.4g/L (#6) (figura 9) (17).

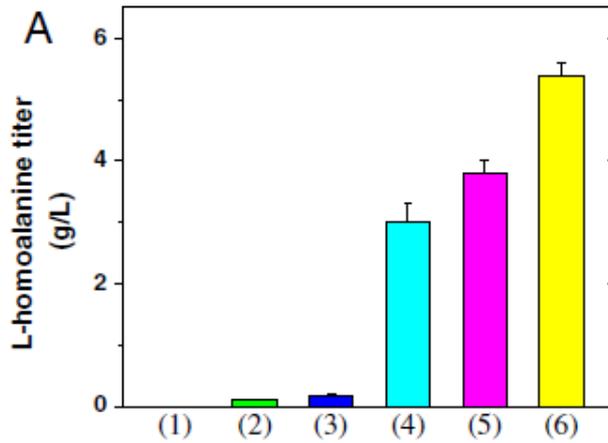


Figura 9. Producción de L-homoalanina con diferentes cepas de *E.coli* y treonina deshidratasa.

#1. Cepa BW25113 sin sobreexpresión de GDH2

#2. Cepa BW25113 con sobreexpresión de GDH2.

#3. Cepa ATCC98082 con sobreexpresión de GDH2 y treonina deshidratasa

#4. Cepa ATCC98082 con sobreexpresión de GDH2 y ΠvA_{EC}

#5. Cepa ATCC98082 con sobreexpresión de GDH2 y ΠvA_{BS}

#6. Eliminación del gen *rhtA* con sobreexpresión de ΠvA_{BS} y GDH2

5.2.4 Método 3. Obtención de L y D-homoalanina a partir de un aminoácido natural (metionina) utilizando transaminasas.

En este siguiente estudio realizado por M.V.d.M.Silva et al (2019), se describe una nueva cascada biocatalítica que nos da acceso a la producción tanto de L-homoalanina como de D-homoalanina. En este proceso se llevan a cabo dos tipos de reacciones (Figura 10):

- La primera reacción es catalizada por la enzima L-metionina γ -liasa (METase), enzima dependiente de PLP (piridoxal-5-fosfato). Esta enzima cataliza la γ eliminación de L-metionina para la producción de 2-oxobutirato, amonio y metanotiol.
- La segunda reacción incluye una transaminación producida por una enzima amino ácido aminotransferasa procedente de *E.coli*. (eBCAT) o una D aminoácido transferasa procedente de *Bacillus sp* (DATA), ambas enzimas transaminasas dependientes de PLP.

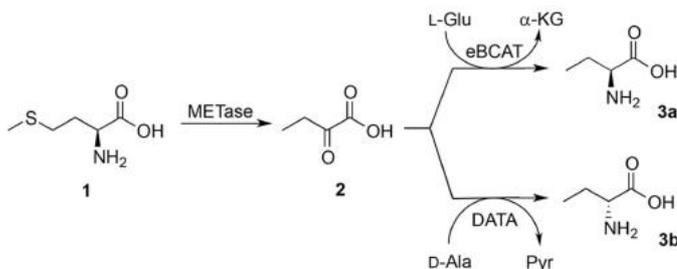


Figura 10. A partir de L-metionina (1), se obtiene ácido 2-oxobutírico (2), que a través de diferentes enzimas, eBCAT ó DATA, se obtiene L (3a) o D (3b) homoalanina, respectivamente.

La enzima eBCAT cataliza la transaminación entre *L*-glutamato y 2-oxobutirato para la producción de *L*-homoalanina. Por otro lado, DATA cataliza la misma transaminación usando en vez de glutamato como donador de aminas, *D*-alanina, obteniendo el mismo producto que la otra reacción pero con configuración opuesta (*D*-homoalanina). Como en anteriores estudios, este tipo de reacciones parten de un aminoácido natural, en este caso la metionina, del cual se fabrican toneladas altas cantidades a bajo precio, evitando el uso de oxoácidos como productos de partida y, además, evitando el uso de deshidrogenasas y cofactores, (estos últimos no son necesarios cuando se usan aminotransferasas).

El primer paso de esta ruta es la γ -eliminación del grupo metanotiol. Para estudiar este paso, se clonó y se sobreexpresó una METase de *Fusobacterium nucleatum* en *E.coli*. y, basado en trabajos anteriores (18), se demostró que las propiedades físicas de METase de diferentes organismos son relativamente similares. Los factores que influyeron más en la reacción fueron el pH y la temperatura, donde las reacciones a 40°C y pH 7 dirigió a las conversiones más altas (37-46%). Aparte, siendo enzimas dependientes de PLP, su concentración no mostró influencia en la conversión final.

El segundo paso de la reacción se afrontó desde dos estrategias diferentes ya que al ser 2-oxobutirato una molécula proquiral, la reacción puede ocurrir en un modo u otro para la obtención de ambos estereoisómeros utilizando eBCAT o DATA. Para la reacción catalizada por eBCAT, se utilizó como donante de aminas ácido *L*-glutámico y para la reacción catalizada por DATA, *D*-alanina.

Este proceso, al querer ser afrontado como una reacción “one pot”, ambas enzimas deben tener las mismas condiciones de reacción. Bajo pH 7 y una temperatura 40°C, las dos enzimas mostraron actividad. En el caso de DATA, se vio alrededor de un 65% de conversión, mientras que eBCAT mostraba únicamente una pobre conversión del 20%. Esto podría ser debido a que el desfavorable equilibrio de la reacción observado en las reacciones catalizadas por transaminasas. La reacción catalizada por DATA se paró al 65% ya que el mismo producto generado puede servir como donador de aminas para la regeneración de alanina. Por tanto, después de estos resultados, se decidió optimizar las reacciones y separarlas en dos reactores, cada uno conteniendo METase/ eBCAT o METase/DATA. Los resultados fueron de un rendimiento mayor para METase/eBCAT, que en 24h obtuvo un mayor porcentaje de producto que METase/DATA, el cual necesitó mayor tiempo de reacción. Se mostró un exceso enantiomérico de *L*-homoalanina > 99% y de *D*-homoalanina >90%.

Este estudio demuestra un nuevo método de obtención de ncAAs a partir de aminoácidos naturales, sin embargo, como en el estudio de Park et al (2010), se siguen necesitando estudios para impedir la limitación de trabajar con aminotransferasas para mejorar el rendimiento de la reacción (19).

5.2.5 Método 4. Obtención de L-homoalanina a partir 2-pirrilodinona utilizando nitrilo hidratadas

Otro método de biosíntesis completamente nuevo para la obtención de Levetiracetam [(S)- α -etil-2-oxo-1-pirrolidinacetamida], es a partir del uso de nitrilo hidratadas (nitrilhidratadas), unas metaloenzimas que contienen hierro o cobalto en su centro catalítico, y consisten de dos subunidades, α y β , localizándose el centro catalítico en la interfaz de ambas subunidades. Las subunidades no presentan homología entre ellas, sin embargo, cada subunidad es homóloga en la secuencia de aminoácidos.

La mayoría de los procesos descritos requieren posterior separación cromatográfica o resolución química usando ácidos quirales o bases, y con ello un aumento de residuos químicos. También otros procesos de obtención de este fármaco incluyen hidrogenaciones o empezar desde compuestos quirales, además de que la mayoría de las síntesis propuestas requieren el uso de haluros de alquilo nocivos para finalmente instalar el anillo de pirrolidona en el último paso de la reacción (Figura 11).

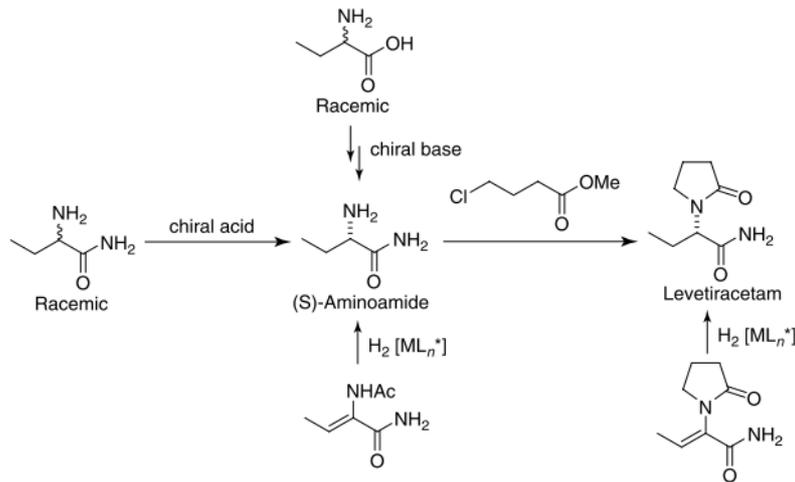


Figura 11. Síntesis de levetiracetam por síntesis química o resolución cinética.

Es por esto por lo que se ha llegado a la obtención de levetiracetam a través de una novedosa ruta biocatalítica:

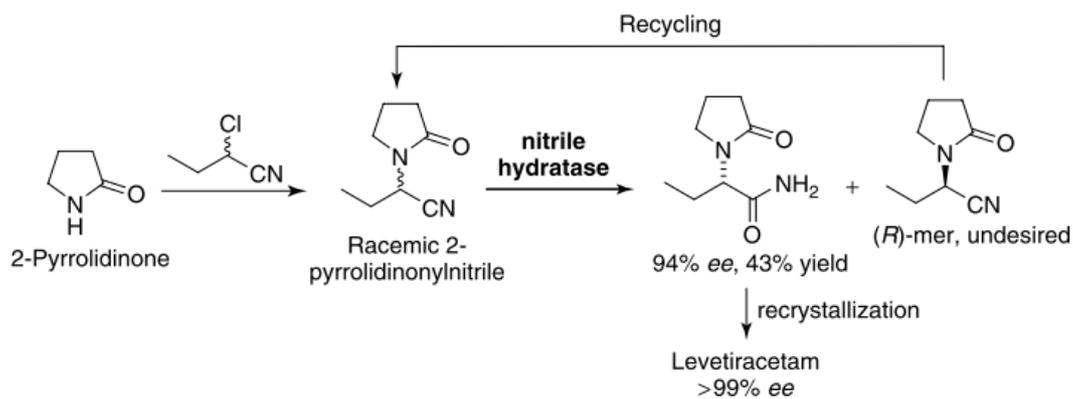


Figura 12. Síntesis quimioenzimática de levetiracetam a partir de nitrilo hidratatas.

El proceso parte de 2-pirrolidinona y por una *N*-alquilación (S_N2), utilizando 2-clorobutanonitrilo, se obtiene el compuesto racémico 2-nitropirrolidinona, que, a través de la enzima nitrilo hidratasa se consiguen ambos estereoisómeros del fármaco: R (no deseado) y S. Por último, la forma S sufre un proceso de recrystalización para la obtención de Levetiracetam. Destacaremos que el enantiómero R puede ser reciclado, obteniéndose el producto racémico, ser catalizado otra vez por la misma enzima y obtener el enantiómero S (figura 12).

Para llegar a una nitrilohidratasa capaz de catalizar la reacción mostrada en la Figura 9, se trabajó con 30 nitrilo hidratatas diferentes obtenidas del GenBank®. Un screening inicial

mostró que todas ellas tenían baja selectividad aunque muchas de ellas tenían buena reactividad. La enzima que mejor cumplía los requisitos de reacción fue NH33, obtenida de *Bradyrhizobium japonicum*, pero presentaba un 60% de exceso enantiomérico y un ratio de conversión del 20%, además de un pobre valor de E (cociente enantiomérico) de 5.0 (20). Este parámetro (no confundir con el factor E mencionado en el apartado 2.4) determina la selectividad de la reacción, y es una medida para distinguir enantiómeros bajo condiciones definidas de pH, temperatura, de manera que la eficacia estereoquímica de una resolución cinética puede ser calculada a través de este valor. Así, valores menores de 15 son inaceptables, entre 15-30 son moderados, y a partir de 30 son excelentes; aunque descritos, indicaremos que valores mayores de 200 no pueden ser determinados con exactitud debido a las inexactitudes intrínsecas a la determinación del exceso enantiomérico (20).

Esto originó mediante técnicas de ingeniería genética una mejora de la enantioselectividad, a través de una combinación de diseño racional basado en su estructura y mutagénesis. Los resultados mostraron positivas mutaciones en la subunidad β pero la mayoría de las mutaciones en la subunidad α acababan en desactivación o posible pérdida de actividad enzimática. La mutación que aumentó el valor de E al máximo (45.0) fue β Arg38Cys.

También se midieron las condiciones del medio de reacción, concluyendo que sus condiciones óptimas eran pH 6.5 a 4°C. Bajo estas condiciones, la resolución enzimática condujo a un exceso enantiomérico del 94% y un rendimiento del 43%, y tras su cristalización se obtuvo un 99% de ee. Ya que el enantiómero R puede ser reciclado, el proceso es mucho más eficiente que aquellas rutas que necesitan resolución cromatográfica, además de resolver el problema del uso de haluros de alquilo nocivos para el medio ambiente (21).

6 CONCLUSIONES

La biocatálisis está adquiriendo desde hace ya algunos años bastante importancia en la industria farmacéutica, no solo por las características de regio, quimio y enantioselectividad que se pueden llevar a cabo, sino también por sus suaves condiciones de reacción y su mayor capacidad para la obtención de compuestos enantioméricamente puros. Sin embargo, todavía queda un gran camino por recorrer, ya que pocos son los fármacos que se pueden sintetizar en su totalidad vía enzimática, siempre se necesita de algún paso adicional que requiera síntesis química.

Para empezar, se muestra cómo sería una síntesis química asimétrica mediante una reacción de Strecker, en la que también podemos ver que tras diversos pasos en la reacción uno de los intermediarios es *L*-homoalanina. Uno de los compuestos de partida es un compuesto enantioméricamente puro, habría que tener en cuenta el gasto que supondría para el laboratorio la obtención de este compuesto para la producción del producto final a gran escala.

En nuestro caso, la producción de *L*-homoalanina, compuesto intermediario en la síntesis del fármaco levetiracetam, se puede obtener por diferentes rutas. En unas se ha utilizado la enzima glutamato deshidrogenasa por la cual hemos obtenido un alto rendimiento de reacción, pudiéndose llevar a cabo en un futuro su producción a nivel industrial, haciendo accesible el medicamento a personas que se encuentran en países subdesarrollados y el uso de alternativas terapéuticas más eficaces.

Por otro lado, también se ha visto la obtención de este aminoácido a partir de enzimas transaminasas, que están adquiriendo bastante relevancia y sustituyendo a deshidrogenasas,

pero aún presentan diversos problemas a la hora de forzar el equilibrio de la reacción a la formación del producto deseado, con rendimientos no superiores al 80%, necesitando más estudios para poder hacer posible que se lleven estos procesos a gran escala.

También se ha visto un novedoso método de obtención de este fármaco que es a partir de la enzima nitrilohidrasa (nitrilasa), en la cual se obtiene el producto final a través de una ruta sencilla, a la vez que el enantiómero no deseado es reciclado para su conversión al producto deseado, por lo que las pérdidas en este proceso son prácticamente nulas, haciendo de esta una ruta simple, eficiente, evitando el uso de haluros de alquilo nocivos con el medio ambiente y con buenas expectativas de futuro.

Tras la revisión de los diferentes métodos de producción de *L*-homoalanina, la obtención de *L*-homoalanina a través de treonina se muestra a través del uso tanto de transaminasas como de deshidrogenasas. Usando transaminasas, la reacción enzimática es simple y en tres sencillos pasos obtenemos el producto deseado. No se requiere el uso de enzimas adicionales, aunque al no cuantificarse cuanto producto queda retenido por la producción del producto secundario benzaldehído, se limita a un método que no se podría llevar a cabo a gran escala. Sin embargo, la producción de *L*-homoalanina a partir de deshidrogenasas modificadas genéticamente sí que nos da resultados prometedores, obteniéndose altas concentraciones de *L*-homoalanina y no quedando remanente el producto de partida.

En la obtención *L*-homoalanina a través de metionina, se facilita la obtención de ambos isómeros, *L* y *D*. Su principal inconveniente es la utilización de glutamato como donador de aminas, que puede llevar a desequilibrios en la reacción y su bajo rendimiento en comparación con los otros métodos de biosíntesis.

Tras una revisión exhaustiva de todo lo anterior, llegamos a la conclusión de que el método más prometedor es el de la obtención levetiracetam a partir del anillo de pirrolidinona. Sería el adecuado para producirse industrialmente, ya que es un método ecológico, en el cual no se utilizan productos nocivos con el medio ambiente, es sencillo, diferente, económico, se puede reciclar el enantiómero no deseado y no se utiliza glutamato como donador de aminas. Su único inconveniente es que el rendimiento sigue siendo bajo, harían falta más estudios para llevar este proceso a la industria farmacéutica.

Es importante destacar que ninguna de estas rutas se llevan a cabo para la producción industrial de Levetiracetam, simplemente se muestran rutas alternativas para intentar sustituir a las rutas actuales, intentando seguir los 12 principios de química verde, buscando alternativas más económicas y ecológicas, utilizando enzimas modificadas genéticamente.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Martín Brieva H. Fundamentos de Biotecnología Farmacéutica. 2018. 458 p.
2. No Title [Internet]. Available from: http://www.mercadosbiotecnologicos.com/es/biotecnologia_blanca.cfm
3. Illanes A. Enzyme biocatalysis: Principles and applications. Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. 2008. 1–391 p.
4. Xue Y-P, Cao C-H, Zheng Y-G. Enzymatic asymmetric synthesis of chiral amino acids. Chem Soc Rev. 2018;1516–61.
5. Humble MS, Berglund P. Biocatalytic promiscuity. European J Org Chem. 2011;(19):3391–401.

6. Anastas P, Eghbali N. Green chemistry: Principles and practice. *Chem Soc Rev.* 2010;39(1):301–12.
7. Porter JL, Rusli RA, Ollis DL. Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. *ChemBioChem.* 2016;17(3):197–203.
8. Zou H, Li L, Zhang T, Shi M, Zhang N, Huang J, et al. Biosynthesis and biotechnological application of non-canonical amino acids: Complex and unclear. *Biotechnol Adv [Internet].* 2018;36(7):1917–27. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.07.008>
9. Almhjell PJ, Boville CE, Arnold FH. Engineering enzymes for noncanonical amino acid synthesis. *Chem Soc Rev.* 2018;47(24):8980–97.
10. No Title [Internet]. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/76325/FichaTecnica_76325.html
11. Shorvon SD, Van Rijckevorsel K. A new antiepileptic drug. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002;72(4):426–9.
12. Breuer M, Ditrich K, Habicher T, Hauer B, Keßeler M, Stürmer R, et al. Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew Chemie - Int Ed.* 2004;43(7):788–824.
13. Li X, Yeung CH, Chan ASC, Lee DS, Yang TK. An efficient synthesis of chiral homophenylalanine derivatives via enantioselective hydrogenation. *Tetrahedron Asymmetry.* 1999;10(20):3863–7.
14. Boschi F, Camps P, Comes-Franchini M, Muñoz-Torrero D, Ricci A, Sánchez L. A synthesis of levetiracetam based on (S)-N-phenylpantolactam as a chiral auxiliary. *Tetrahedron Asymmetry.* 2005;16(22):3739–45.
15. Raju V, Somaiah S, Sashikanth S, Laxminarayan E, Mulkanti K. An asymmetric synthesis of Levetiracetam. *Indian J Chem - Sect B Org Med Chem.* 2014;53B(9):1218–21.
16. Park E, Kim M, Shin JS. One-pot conversion of L -threonine into L -homoalanine: Biocatalytic production of an unnatural amino acid from a natural one. *Adv Synth Catal.* 2010;352(18):3391–8.
17. Zhang K, Li H, Cho KM, Liao JC. Expanding metabolism for total biosynthesis of the nonnatural amino acid L-homoalanine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(14):6234–9.
18. Suganya K, Govindan K, Prabha P, Murugan M. An extensive review on L-methioninase and its potential applications. *Biocatal Agric Biotechnol [Internet].* 2017;12(September):104–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.09.009>
19. Silva MV d. M, Costa ICR, de Souza ROMA, Bornscheuer UT. Biocatalytic Cascade Reaction for the Asymmetric Synthesis of L- and D-Homoalanine. *ChemCatChem.* 2019;11(1):407–11.
20. Faber K, Kroutil W. A Computer Program for the Determination of the Enantioselectivity (E-Value) in the Kinetic Resolution of Enantiomers. *Selectivity [Internet].* 2012;(December):5–7. Available from: <http://biocatalysis.uni-graz.at/enantio/DataFiles/Selectivity-Help.pdf>
21. Junhua T. New processes for Existing Active Compounds (APIs). 2010;