

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 535**

51 Int. Cl.:
C12P 41/00 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)
C07H 19/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99954779 .7**
96 Fecha de presentación: **08.10.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1119635**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2001**

54 Título: **Sistemas no homogéneos para la resolución de mezclas enantioméricas**

30 Prioridad:
09.10.1998 US 103804 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.08.2012

73 Titular/es:
**Althea Technologies, Inc.
11040 Roselle Street
San Diego, CA 92121, US y
Gilead Sciences, Inc.**

72 Inventor/es:
**YAO, Yiming;
WANG, Yi Fong y
ALMOND, Merrick R.**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 386 535 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistemas no homogéneos para la resolución de mezclas enantioméricas

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la conversión enantioselectiva mediada por biocatalizadores de las mezclas enantioméricas de ésteres hidrofóbicos usando un sistema de disolvente bifásico. Más particularmente, la presente invención se refiere a la síntesis enantioselectiva mediada por enzimas de los compuestos antivirales, tales como 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano (FTC) y sus análogos, en un sistema de reacción no homogéneo.

Antecedentes de la invención

10 Existen serios obstáculos para comercializar los procedimientos viables para la resolución enzimática de las mezclas enantioméricas de los ésteres hidrofóbicos. Por ejemplo, cuando se usa un procedimiento de conversión enzimática en presencia de un disolvente orgánico, la velocidad de inactivación de la enzima es muy elevada con respecto al mismo procedimiento llevado a cabo en un disolvente acuoso. Un problema que causa confusión es que los disolventes que son menos destructivos para el catalizador tienen a menudo menos capacidad para solubilizar la mayoría de los sustratos hidrofóbicos. En el mejor de los casos, algunos procedimientos serían más eficaces si se llevan a cabo en presencia de disolventes más hidrofóbicos, tales como los disolventes orgánicos no miscibles. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema no homogéneo, que permita que se conviertan mayores concentraciones de sustratos hidrofóbicos en producto, mientras que, de manera simultánea, consuman menos catalizador.

20 Los obstáculos mencionados anteriormente se deben superar para reducir el coste de la producción de fármacos enantioméricos de fármacos antivirales. Tales fármacos son esenciales para ganar la lucha en la conquista de las enfermedades virales emergentes. Por ejemplo, incluso hoy en día, el índice de infección por HIV continúa a un ritmo vertiginoso, con 16.000 nuevas infecciones al día a nivel mundial [Balter, M. Science 280, 1863-1864 (1998)]. Hay zonas de África subsahariana en las que al menos el 25% de la población está infectada, por ejemplo en Botswana y Zimbabwe. Sin embargo, el coste de los fármacos antivirales, actualmente está mucho más allá del alcance de la mayoría de tales víctimas de la infección por VIH.

30 Los análogos nucleósidos, tales como 3'-tiaribofuranosil- β -L-citosina ("3-TC"), 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT) [Blair E., Darby, G., Gough, E., Littler, D., Rowlands, D., Tisdale, M. Antiviral Therapy, BIOS Scientific Publishers Limited, 1998], (-)-2',3'-didexosi-5-fluoro-3'-tiacitidina ("FTC") y 2',3'-didexosi-3'-tiacitidina son agentes antivirales importantes [Liotta, D.C. 216th ACS National Meeting, Medicinal Chemistry Abstract, Boston, MA, August 23-27, 1998; Hoong, L.K., Strange, L.E., Liotta, D.C., Koszalka, G.W., Burns, C.L., y Schinazi, R. F., J. Org. Chem. 1992, 57, 5563-5565]. Se ha comercializado el 3-TC tanto como fármaco anti-VIH como fármaco anti-VHB y el FTC está en ensayo clínico para su evaluación como un fármaco antiviral [Liotta, D.C., Schinazi, R.F., y Choi, W.-B., patentes de los Estados Unidos de América N^{os} 5.210.085, 5.700.937 y 5.814.639]. Ya que la técnica es para obtener tanto el enantiómero (-) (-)-FTC como el (-)-2',3'-didexosi-3'-tiacitidina, que presenta la actividad antiviral más potente y de menor toxicidad, en comparación con los correspondientes isómeros (+), hay una necesidad imperiosa de procedimientos de preparación eficaces y rentables tanto de los isómeros (-)-FTC como de los isómeros (-)-21,3-didexosi-3'-tiacitidina para ampliar las opciones de tratamiento de los pacientes en todo el mundo [Liotta, D.C. 216th ACS National Meeting, Medicinal Chemistry Abstract, Boston, MA, August 23-27, 1998; Hoong, L.K., Strange, L.E., Liotta, D.C., Koszalka, G.W., Burns, C.L., y Schinazi, R.F., J. Org. Chem. 1992, 57, 5563-5565].

40 Se han usado muchas enzimas hidrolasa para la resolución de los ésteres de FTC [Hoong, L.K., Strange, L.E., Liotta, D.C., Koszalka, G.W., Burns, C.L. y Schinazi, R. F., J. Org. Chem. 1992, 57, 5563-5565]. Sin embargo, los impedimentos permanecen en el desarrollo práctico de los procedimientos químicos mediados por enzimas para la producción de FTC y de los compuestos similares. Primero, las enzimas hidrolasa, con la excepción de las lipasas, se han considerado vulnerables al entorno bifásico (Documento WO 97/44445 Lalonde y col., J. Am. Chem. Soc., 117, 6845-6852 (1995), Milton, y col., Chemical Abstracts, 124(5), resumen #55332 (1996), Brand y col., Chemical Abstracts, 127(20), resumen #278395 (1997)). Segundo, la solubilidad de muchos ésteres de FTC en los medios acuosos es demasiado baja para conseguir una producción económicamente viable del producto resuelto. Una solución posible ha sido añadir un disolvente co-orgánico miscible en agua para aumentar la concentración del éster en la disolución. Un ejemplo es el uso de disoluciones de acetonitrilo y agua [Hoong, L.K., Strange, L.E., Liotta, D.C., Koszalka, G.W., Burns, C.L. y Schinazi, R.F., J. Org. Chem. 1992, 57, 5563-5565; Liotta y col., patente de los Estados Unidos de América N^o 5.827.727]. Aunque el uso de un disolvente orgánico miscible en agua y una disolución acuosa aumenta la concentración del sustrato en disolución, tiene el lamentable efecto de disminuir drásticamente la conversión catalizada por la enzima y la estabilidad de la enzima. Este problema se acentúa especialmente, cuando el sustrato no está completamente disuelto, pero también está presente como una suspensión sólida sin disolver (alta concentración de la carga de sustrato). Se obtuvieron resultados similares en nuestro laboratorio. Cuando los disolventes orgánicos miscibles en agua, tales como isopropanol, dimetilformamida (DMF), 1-metil-2-pirrolidinona, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, acetonitrilo, etanol, 1-propanol se usaron como codisolventes para la resolución, la carga de concentración máxima del sustrato fue de un 3%. La presencia del

sustrato no disuelto disminuyó la enantioselectividad cuando la concentración del sustrato fue superior a un 3%. Además, el uso de disolventes orgánicos miscibles en agua y en disolución acuosa, en concentraciones de codisolventes orgánicos miscibles en agua superiores a un 20%, tenían un acentuado impacto negativo en la actividad de la enzima, especialmente en la esterasa de hígado de cerdo (PLE).

5 La presente invención se dirige específicamente a diversos impedimentos en la realización de la técnica que tienen el efecto de que la resolución enzimática de las mezclas enantioméricas sea caro económicamente. Primero, se pensó que la conversión enzimática se debería llevar a cabo en condiciones homogéneas, porque los sistemas bifásicos daban como resultado una escasa reproducibilidad [véase Liotta y col., patentes de los Estados Unidos de América N^{os} 5.827.727, 5.892.025, 5.914.331; o Matson, Patente de los Estados Unidos de América N^o 4.800.162 en la que se propone una membrana activada para separar los componentes acuosos y los orgánicos]. Una ventaja potencial para el uso de los sistemas no homogéneos sería la solubilización mejorada del sustrato. Es de suponer que, en un sistema no homogéneo, se podría tener en cuenta una concentración mayor de muchos sustratos hidrofóbicos. Antes de la presente invención, se pensaba que se deberían evitar los disolventes alcohólicos, porque estos disolventes desnaturalizan las enzimas [Liotta y col., patentes de los Estados Unidos de América N^{os} 5.827.727, 5.892.025, 5.914.331]. La presente invención es un avance sobre la técnica porque proporciona específicamente el uso de disolventes alcohólicos que forman sistemas no homogéneos con agua. Además, el uso de sistemas de disolvente no homogéneo proporciona una solubilización aumentada para más sustratos hidrofóbicos que se podrían tener en cuenta anteriormente en la técnica. Esto está en contraste con otros procedimientos en los que el mismo sustrato se hace más soluble en agua y después es dispersada en el componente acuoso (Wald y col., Patente de los Estados Unidos de América N^o 5.057.427). Además, la presente invención desvela un procedimiento que requiere una cantidad menor de enzima por unidad de producto.

Las mejoras adicionales conseguidas mediante la presente invención permiten el uso de diversos disolventes alcohólicos en un procedimiento enzimático. Además, la presente invención proporciona un modo de procedimiento alternativo, en el que los requisitos para la enzima y para el disolvente orgánico se reducen adicionalmente mediante la adición de tensioactivos. Finalmente, la presente invención se dirige al suministro de un procedimiento enzimático más eficaz que mantenga la enantioselectividad a un alto nivel.

Breve descripción de los dibujos

El esquema 1 (página 23) describe la conversión enantioselectiva de una forma enantiomérica de una mezcla enantiomérica de butirato de FTC en el correspondiente alcohol no racémico y en el éster no racémico deseado.

Sumario de la invención

La presente invención se dirige a varias mejoras en los procedimientos para la producción de un éster no racémico y quiral. Más específicamente, la presente invención se dirige al suministro de un procedimiento mejorado que usa un sistema no homogéneo bifásico empleando biocatalizadores para la resolución de las mezclas enantioméricas de los ésteres de FTC y los análogos de los ésteres de FTC. La presente invención se dirige adicionalmente a las mejoras que permiten una elevada carga de sustrato y que consumen cantidades reducidas de enzima.

Un primer procedimiento mejorado de acuerdo con la presente invención proporciona la dispersión de una mezcla enantiomérica de un éster en un sistema de disolvente orgánico para producir un componente orgánico en una carga de sustrato elevada. Se proporciona un componente acuoso y preferentemente contiene una enzima hidrolasa en dispersión. Como alternativa, se puede añadir la enzima hidrolasa al sistema no homogéneo completo o menos preferentemente al componente orgánico. El procedimiento adicional requiere el contacto del componente orgánico y del componente acuoso para formar un sistema no homogéneo, en las condiciones que permitan la resolución de la mezcla para producir un éster no racémico quiral y un alcohol no racémico. La combinación del componente orgánico y del componente acuoso forma un sistema no homogéneo. Usando sistemas no homogéneos, son posibles concentraciones más elevadas de sustrato. En una realización, después de llevar a cabo la reacción, se puede aislar el compuesto del éster no racémico quiral a partir del componente orgánico y se puede aislar el compuesto del alcohol no racémico quiral a partir del componente acuoso. Las etapas de aislamiento pueden variar, dependiendo del compuesto y de las condiciones en particular.

La presente invención también proporciona un procedimiento alternativo que produce mejores resultados mediante la reducción drástica de la cantidad de enzima requerida para la producción de un producto dado. Tal mejora se consigue mediante la adición de tensioactivo a dicho sistema no homogéneo, para producir un sistema no homogéneo mejorado que requiere menos disolvente orgánico para solubilizar el sustrato.

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento que usa una relación fase orgánica/fase acuosa reducida, que da como resultado una reducción adicional de la enzima hidrolasa requerida.

En otra realización de la presente invención, la adición de tensioactivo al sistema permite la mejora de las velocidades de la reacción enzimática y una mejor solubilización del sustrato. Las velocidades de reacción superiores dan como resultado una reducción de los costes globales de la enzima para el funcionamiento del procedimiento.

Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción, los términos definen de la siguiente manera:

Biocatalizador -- una molécula de proteína, tal como un enzima hidrolasa. Los ejemplos incluyen las esterases, las proteasas y las lipasas.

Compuesto quiral -- un compuesto que no es superponible a su imagen especular y que normalmente contiene un átomo de carbono asimétrico, en el que cuatro grupos diferentes están unidos al mismo átomo de carbono.

Codisolvente -- un disolvente orgánico.

Conversión -- el procedimiento mediante el cual se trata una mezcla enantiomérica de los compuestos con un catalizador que transforma un enantiómero sencillo en una entidad química diferente.

Diastereómeros -- los estereoisómeros que no se relacionan como reflexiones especulares entre ellos.

Dispersión -- la distribución de la enzima o del material de la mezcla enantiomérica en el disolvente. La enzima se puede presentar en forma de un cristal de enzima reticulado, enzima inmovilizada o enzima soluble y la mezcla enantiomérica puede ser soluble o puede contener partículas residuales. El sistema disperso puede contener más de tres fases con materiales sólidos cristalinos y/o materiales en forma de partículas y dos fases líquidas diferentes.

Enantiómeros -- las parejas de estereoisómeros que son reflexiones especulares entre ellos. Un enantiómero no es superponible a su imagen especular. Los enantiómeros son estereoisómeros quirales que solamente difieren en cómo reaccionan con otras moléculas quirales y en su comportamiento hacia el plano de la luz polarizada. Los enantiómeros separados giran el plano de la luz polarizada de la misma manera pero en diferentes direcciones. Los enantiómeros diferentes se distinguen mediante las denominaciones R y S y si el plano de la luz polarizada gira hacia la derecha (dextrógiro (+)) o hacia la izquierda (levógiro (-)).

Exceso enantiomérico -- en una mezcla (disolución) de dos enantiómeros en la que un enantiómero está presente en mayor proporción, la disolución presentará la rotación óptica (rotación + o -) correspondiente al enantiómero que está presente en exceso. El exceso enantiomérico es el porcentaje del enantiómero presente en exceso sobre aquel de la mezcla racémica y se calcula de la siguiente manera:

$$\frac{(\text{rotación específica de la mezcla}) - (\text{rotación específica del enantiómero puro})}{\text{exceso enantiomérico}} \times 100 = \%$$

Mezcla enantiomérica -- una mezcla de dos enantiómeros.

Enantioselectividad -- una preferencia para la conversión de un enantiómero a partir de una mezcla enantiomérica.

Butirato de FTC -- se refiere a una mezcla enantiomérica del compuesto 2',3'-didexosi-5'-butirato-5-fluoro-3'-tiacitidina o, usando una nomenclatura alternativa, el compuesto es 2-butiloximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano o, de manera menos formal es el éster 5' butirato de 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano.

Disolvente orgánico parcialmente miscible en agua -- un disolvente orgánico que no es totalmente soluble en agua a 25 °C y que forma disoluciones no homogéneas con agua. No completamente.

Sistema no homogéneo -- un medio bifásico que comprende un biocatalizador, un componente orgánico, un componente acuoso y un sustrato. Un sistema no homogéneo también se puede referir a un medio no homogéneo o a una condición no homogénea o a una composición no homogénea.

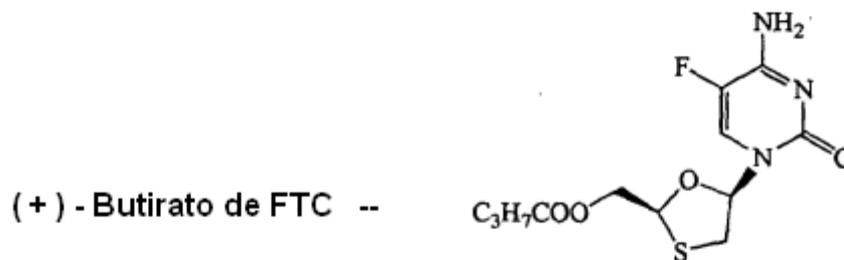
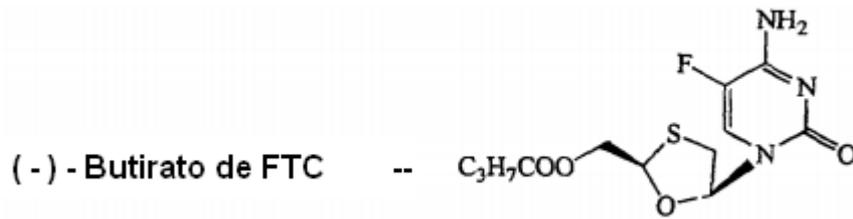
Sistema de disolvente orgánico -- una disolución que comprende uno más de los disolventes siguientes: alcanos C₁-C₈ no sustituidos, alcoholes, compuestos aromáticos, éteres de cetona, nitro, haloalcano o disolvente orgánico aromático, tal como alcohol terc-amílico, alcohol isoamílico, 1-pentanol, 3-pentanol, 1-butanol, 2-butanol, terc-butanol, 3-metil-3-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 3-etil-3-pentanol, 3-heptanol, tolueno, acetato de butilo, nitroetano, nitrometano, diclorometano, metil isobutil cetona, dimetil sulfuro, sulfolano o cualquier otro disolvente orgánico miscible en agua en menos de aproximadamente un 50% que facilite la disolución de una mezcla enantiomérica sin destruir la capacidad de funcionamiento de la enzima.

Mezcla racémica -- una mezcla equimolar de dos enantiómeros, también conocida como una modificación racémica, normalmente producida como resultado de una reacción química en un centro quiral en la que no se prefiere ningún producto enantiomérico.

Enantiómeros de resolución o resolución -- el procedimiento de separación de parejas de enantiómeros a partir de una mezcla enantiomérica.

Resolución de una mezcla racémica -- la separación de una mezcla racémica de enantiómeros.

Estereoquímica del FTC y del Butirato de FTC -- se muestra a continuación la estereoquímica de los compuestos de FTC mencionados a lo largo de la presente solicitud:



Estereoisómero -- un compuesto cuyos átomos constituyentes están colocados en el mismo orden que aquéllos de otro compuesto, pero difieren solamente en la colocación de sus átomos en el espacio. Los ejemplos de estereoisómeros son los enantiómeros y los diastereómeros.

Carga de sustrato -- la concentración de una mezcla enantiomérica. Para los ejemplos que se muestran a continuación, la carga de sustrato se expresa como el % (peso/volumen del sistema no homogéneo), es decir, en base al volumen total de disolvente. Para reiterarlo, el porcentaje de la carga de sustrato (%) (peso/volumen) está en base al volumen del sistema no homogéneo completo, que incluye tanto los componentes acuosos como los orgánicos.

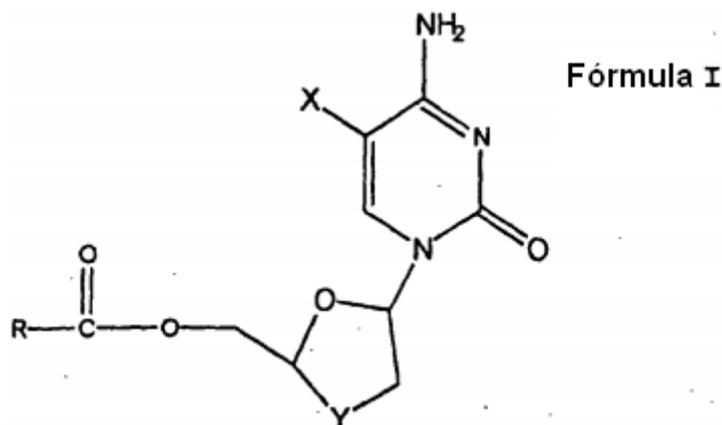
Tensioactivo -- los agentes tensioactivos que reducen la tensión superficial de las disoluciones cuando se disuelven en dichas disoluciones. Los tensioactivos también reducen la tensión interfacial entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Los tensioactivos pertenecen a tres categorías que funcionan a través de un mecanismo similar. Esas categorías incluyen los detergentes, emulgentes y agentes humectantes dependiendo de la naturaleza de las superficies involucradas. La concentración del tensioactivo se expresa como un porcentaje (%) (peso/volumen) y está en base al volumen del sistema no homogéneo completo, que incluye tanto los componentes acuosos como los orgánicos.

Disolvente orgánico inmisible en agua -- un disolvente orgánico que presenta una solubilidad máxima en agua del 10% a 25 °C y que forma disoluciones no homogéneas con el agua. La concentración del disolvente orgánico se expresa como un porcentaje (%) (volumen/volumen) y está en base al volumen del sistema no homogéneo completo, que incluye tanto los componentes acuosos como los orgánicos.

Disolvente orgánico miscible en agua en menos de aproximadamente un 50% -- un disolvente orgánico que es soluble en agua en menos de aproximadamente un 50% a 25 °C y forma una disolución no homogénea con el agua.

Codisolvente orgánico miscible en agua -- un disolvente orgánico que es totalmente miscible en agua a 25 °C.

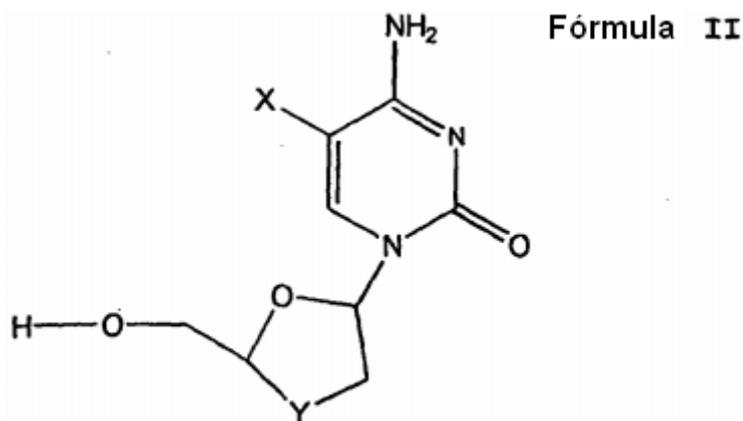
La presente invención proporciona un procedimiento y un sistema como se expone en las reivindicaciones adjuntas. El procedimiento produce un éster no racémico y quiral de Fórmula I usando una enzima hidrolasa:



en la que:

- 5 R es alquilo C₁-C₈;
 X = H o F;
 Y = CH₂, O, S, Se o NH;
 dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 10 (a) dispersión de una mezcla enantiomérica de un éster de Fórmula I con una concentración entre un 5 y un 45% (peso/volumen de un sistema no homogéneo), en un sistema de disolvente orgánico para producir un componente orgánico;
 (b) proporcionar un sistema de disolvente acuoso para producir un componente acuoso; y
 (c) poner en contacto dicho componente orgánico y dicho componente acuoso para formar un sistema no homogéneo a una temperatura entre 5 °C y 45 °C, consiguiendo la resolución de la mezcla para
 15 producir un éster no racémico y quiral de Fórmula I y un alcohol no racémico de Fórmula II;



en la que:

- X = H o F;
 Y = CH₂, O, S, Se o NH, y

- 20 en la que dicha enzima hidrolasa es dispersada en dicho componente orgánico, en dicho componente acuoso o en dicho sistema no homogéneo.

También se desvela en el presente documento un procedimiento para la producción de un éster hidrofóbico no racémico y quiral, usando una enzima hidrolasa y dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 25 (a) dispersión de una mezcla enantiomérica de dicho éster hidrofóbico con una concentración entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 25% (peso/volumen del sistema no homogéneo), en un sistema de disolvente orgánico para producir un componente orgánico;
 (b) proporcionar un sistema de disolvente acuoso para producir un componente acuoso; y

(c) poner en contacto dicho componente orgánico y dicho componente acuoso para formar un sistema no homogéneo, en las condiciones que permitan la conversión enantioselectiva de una forma enantiomérica de dicha mezcla enantiomérica en el alcohol correspondiente; y

5 en el que dicha enzima hidrolasa es dispersada en dicho componente orgánico, en dicho componente acuoso o en dicho sistema no homogéneo.

Como alternativa, la presente invención proporciona los procedimientos para la producción de un éster no racémico y quiral de Fórmula I a partir de una mezcla enantiomérica de fórmula I o a partir de una mezcla enantiomérica de un éster hidrofóbico, en la que dicho procedimiento comprende adicionalmente un tensioactivo.

10 Además, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de un éster no racémico y quiral del 2-butiloximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano usando una enzima hidrolasa y dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 15 (a) dispersión de una mezcla enantiomérica de dicho 2-butiloximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano con una concentración entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 25% (peso/volumen del sistema no homogéneo), en un sistema de disolvente orgánico para producir un componente orgánico;
- (b) proporcionar un sistema de disolvente acuoso para producir un componente acuoso; y
- (c) poner en contacto dicho componente orgánico y dicho componente acuoso para formar un sistema no homogéneo, en las condiciones que permitan la conversión enantioselectiva de una forma enantiomérica de dicha mezcla enantiomérica en el alcohol correspondiente;

20 en el que dicha enzima hidrolasa es dispersada en dicho componente orgánico, en dicho componente acuoso o en dicho sistema no homogéneo; y

en el que la concentración de dicha mezcla enantiomérica se calcula en base al volumen de dicho sistema no homogéneo.

25 Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de un éster no racémico y quiral del 2-butiloximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano usando una enzima hidrolasa y dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 30 (a) dispersión de la mezcla enantiomérica de dicho 2-butiloximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano con una concentración entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 25% (peso/volumen del sistema no homogéneo), en un sistema de disolvente orgánico para producir un componente orgánico;
- (b) proporcionar un sistema de disolvente acuoso para producir un componente acuoso; y
- (c) poner en contacto dicho componente orgánico y dicho componente acuoso para formar un sistema no homogéneo, en las condiciones que permitan la conversión enantioselectiva de una forma enantiomérica de dicha mezcla enantiomérica en el correspondiente alcohol;

en el que dicha enzima hidrolasa es dispersada en dicho componente orgánico, en dicho componente acuoso o en dicho sistema no homogéneo;

35 en el que dicho componente orgánico comprende entre aproximadamente un 5 y aproximadamente un 90% de dicho sistema no homogéneo;

en el que dicho sistema no homogéneo también comprende entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 20% de tensioactivo; y

en el que dicha concentración del tensioactivo se calcula en base al volumen de dicho sistema no homogéneo.

40 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un sistema no homogéneo para la producción de un éster hidrofóbico, no racémico y quiral usando una enzima hidrolasa, que comprende:

- 45 (a) una enzima hidrolasa;
- (b) un sustrato de éster hidrofóbico;
- (c) un componente orgánico; y
- (d) un componente acuoso.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para la resolución de un enantiómero deseado a partir una mezcla enantiomérica.

También es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para la resolución de un enantiómero deseado a partir de la mezcla enantiomérica de ésteres hidrofóbicos.

50 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento para la resolución de enantiómeros de los compuestos antivirales que tienen la Fórmula I anterior.

La realización más preferida de la presente invención proporciona un procedimiento para la resolución enantiomérica del butirato de FTC (o en el que R es propilo, X = F e Y = S del compuesto anterior de Fórmula I).

5 La carga de sustrato implica la dispersión de una mezcla enantiomérica de un éster hidrofóbico en un sistema de disolvente orgánico para producir un componente orgánico. El intervalo de concentración expresado en unidades de % (peso/volumen del sistema no homogéneo) es seleccionado del grupo que consiste en los intervalos entre aproximadamente un 0,5% y aproximadamente un 45%; entre aproximadamente un 1,0% y aproximadamente un 45%; entre aproximadamente un 5,0% y aproximadamente un 45%; entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 40%; entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 30%; entre aproximadamente un 5 y aproximadamente un 20%; entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 5%; y entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 20%.

En una realización preferida, los sistemas de disolvente orgánico de la presente invención, comprenden uno o más disolventes orgánicos miscibles en agua, en menos de aproximadamente un 50%, que faciliten la disolución de la mezcla enantiomérica

15 En la realización preferida siguiente, los sistemas de disolvente orgánico de la presente invención, comprenden uno o más alcoholes C₄-C₈.

En la realización más preferida, los sistemas de disolvente orgánico de la presente invención, comprenden uno o ambos de los alcoholes n-amílico y 3-metil-3-pentanol.

20 En una realización preferida, los sistemas de disolvente acuoso de la presente invención comprenden agua, una o más sales tamponantes, agentes alcalinizantes, conservantes antimicrobianos, estabilizantes, adyuvantes de filtración, coenzimas u otros excipientes que facilitan la dispersión y el funcionamiento de la enzima.

En la siguiente realización preferida, los sistemas de disolvente acuoso de la presente invención comprenden agua, una o más sales tamponantes, agentes alcalinizantes u otros excipientes que facilitan la dispersión y el funcionamiento de la enzima.

25 En una realización preferida siguiente, los sistemas de disolvente acuoso de la presente invención comprenden agua y un tampón fosfato entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,5 molar con un pH entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,0.

En la realización más preferida, los sistemas de disolvente acuoso de la presente invención comprenden agua, un tampón fosfato entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,4 molar con un pH entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,8.

30 En otra realización de la presente invención, la enzima hidrolasa es capaz de resolver una pareja de enantiómeros.

En otra realización de la presente invención, la enzima hidrolasa es capaz de resolver una pareja de enantiómeros mediante una reacción estereoselectiva catalizada por enzima con un enantiómero.

En una realización preferida de la presente invención, la enzima hidrolasa es capaz de resolver una pareja de enantiómeros mediante una conversión estereoselectiva catalizada por enzima de un enantiómero.

35 En la realización más preferida de la presente invención, la enzima hidrolasa es capaz de resolver una pareja de enantiómeros mediante la conversión estereoselectiva catalizada por enzima del enantiómero (+) del 2-butiriloximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano (o en el que R es propilo, X = F e Y = S de la Fórmula I anterior o butirato de FTC).

En una realización de la presente invención, el biocatalizador es una enzima.

40 En otra realización preferida de la presente invención, la enzima es una hidrolasa.

En una realización preferida de la presente invención, la enzima es seleccionado del grupo que consiste en esterases, lipasas y proteasas.

45 En la realización más preferida de la presente invención, la enzima es seleccionado del grupo que consiste en lipasa pancreática de cerdo ("PL"), lipasa de las especies *Pseudomonas*, lipasa de *Aspergillus niger*, subtilisina o esterasa de hígado de cerdo ("PLE").

En una realización de la presente invención, el biocatalizador se añade al sistema no homogéneo después de que el componente acuoso entre en contacto con el componente orgánico para producir un sistema no homogéneo.

50 En otra realización de la presente invención, se añade un biocatalizador a la fase orgánica como parte del componente orgánico antes de que el componente acuoso entre en contacto con el componente orgánico para producir un sistema no homogéneo.

En una realización preferida de la presente invención, se añade un biocatalizador a la fase acuosa para crear un componente acuoso después de que el componente acuoso entre en contacto con el componente orgánico pero antes de la agitación y de la mezcla para producir un sistema no homogéneo.

5 En la realización más preferida de la presente invención, se añade un biocatalizador a la fase acuosa para crear un componente acuoso antes de que el componente acuoso entre en contacto con el componente orgánico para producir un sistema no homogéneo.

10 En una realización de la presente invención, el sistema no homogéneo usado en el procedimiento para resolver las mezclas enantioméricas contiene un tensioactivo. El intervalo de concentración de tensioactivo en % (peso/volumen del sistema no homogéneo) es seleccionado del grupo que consiste en entre aproximadamente el 1 y aproximadamente un 30% de tensioactivo; entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 20% de tensioactivo; entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 10% de tensioactivo; entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 5% de tensioactivo; entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 30% de tensioactivo; entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 25% de tensioactivo; entre aproximadamente un 15% y aproximadamente un 25% de tensioactivo; entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 30% de tensioactivo; y entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 15% de tensioactivo.

En una realización de la presente invención, la enzima se inmoviliza en una matriz.

En una realización preferida de la presente invención, la forma enzimática es aquella en forma de un cristal reticulado de enzima, tal como, por ejemplo, aquellas descritas en el documento de solicitud de patente PCT WO 92/02617 (Navia y col.).

20 En la siguiente realización preferida de la presente invención, la forma enzimática es aquella de una disolución controlada de cristal de proteína reticulado, tal como, por ejemplo, aquellas descritas en el documento de solicitud de patente PCT WO 98/46732 (Margolin y col.).

En la realización más preferida de la presente invención, la enzima se presenta en una forma soluble.

25 En una realización de la presente invención, dichos sistemas no homogéneos comprenden entre aproximadamente un 10% y un 99% del componente orgánico. En otra realización de la presente invención, dichos sistemas no homogéneos comprenden entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 90% del componente orgánico. Más preferentemente, los sistemas no homogéneos comprenden entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 80% del componente orgánico. Incluso más preferentemente, dichos sistemas no homogéneos comprenden entre aproximadamente un 30% y aproximadamente un 70% del componente orgánico. Incluso en una
30 realización más preferida, dichos sistemas no homogéneos comprenden entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 50% del componente orgánico. En otra realización preferida, dichos sistemas no homogéneos comprenden entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 60% del componente orgánico. En una realización preferida adicional, dichos sistemas no homogéneos comprenden entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 70% del componente orgánico. En todavía otra realización preferida, dichos sistemas no homogéneos comprenden entre aproximadamente un 50% y aproximadamente un 20% del componente orgánico.

35 En una realización de la presente divulgación, dichos procedimientos para la resolución de un enantiómero deseado se llevan a cabo a una temperatura o temperaturas seleccionadas del grupo que consiste en entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 45 °C; entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 45 °C; entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 45 °C; entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 45 °C; entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 40 °C; entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 30 °C; entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 25 °C; entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 40 °C; entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 35 °C; entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 30 °C; entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 25 °C; y entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 35 °C.

45 En una realización preferida, dicho componente acuoso usado en los procedimientos de la presente invención comprende al menos el 10% (volumen/volumen) de dicho sistema no homogéneo.

En la siguiente realización preferida, dicho componente acuoso usado en los procedimientos de la presente invención comprende al menos el 50% (volumen/volumen) de dicho sistema no homogéneo.

En la realización más preferida, dicho componente acuoso usado en los procedimientos de la presente invención comprende al menos el 90% (volumen/volumen) de dicho sistema no homogéneo.

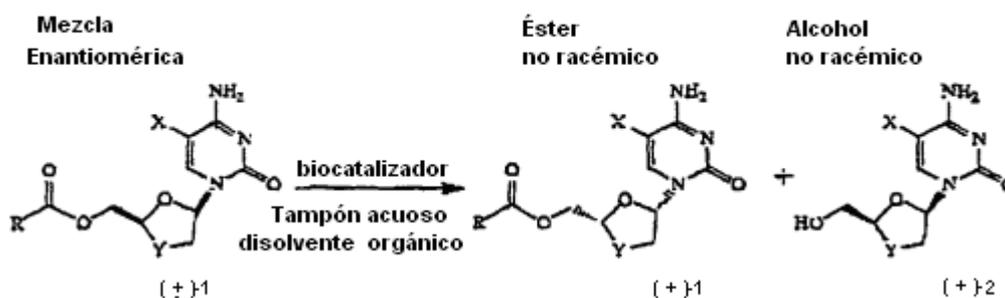
50 En una realización de la presente invención, dicho procedimiento para la resolución de un enantiómero deseado se lleva a cabo en un sistema no homogéneo que comprende un tensioactivo. Cuando un tensioactivo es parte de dicho sistema no homogéneo, el intervalo de concentración del componente orgánico en % (volumen/volumen) es seleccionado del grupo que consiste en entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 90% de dicho sistema no homogéneo; entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 80% de dicho sistema no homogéneo; entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 70% de dicho sistema no homogéneo; entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 60% de dicho sistema no homogéneo; entre aproximadamente un
55

5% y aproximadamente un 50% de dicho sistema no homogéneo; entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 30% de dicho sistema no homogéneo; entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 20% de dicho sistema no homogéneo; entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 10% de dicho sistema no homogéneo; entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 30% de dicho sistema no homogéneo; entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 20% de dicho sistema no homogéneo; entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 70% de dicho sistema no homogéneo; o entre aproximadamente un 25% y aproximadamente un 50% de dicho sistema no homogéneo; y entre aproximadamente un 30% y aproximadamente un 60% de dicho sistema no homogéneo.

El esquema de reacción para la resolución de una mezcla enantiomérica se ilustra en la reacción que se muestra en el Esquema 1 (citado posteriormente, página 23), en el que los sustratos fueron, acetato, formiato, propionato, butirato, pentanoato u otro n-alquilo y cadena ramificada o aril ésteres de FTC o derivados de tales ésteres de FTC y los codisolventes orgánicos fueron cualquier disolvente alcohólico, alcano, compuesto aromático, éter de cetona, nitro, haloalcano o disolvente orgánico aromático que fuera miscible en agua menos de un 50%, tales como alcohol n-amílico, alcohol isoamílico, alcohol terc-amílico, 3-pentanol, 1- o 3-heptanol, 3-metil-3-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 3-etil-3-pentanol, 1- o 2-butanol, nitrometano, diclorometano, metil isobutil cetona, dimetil sulfuro, sulfolano y otros.

En el Esquema 1, que se muestra a continuación, los productos de la reacción fueron un éster no racémico y un alcohol no racémico (Esquema 1). En un ejemplo, cuando X es Flúor, R es C₃H e Y es Azufre, entonces el compuesto A representa una mezcla enantiomérica de butirato de FTC. Se han usado como catalizadores diversas enzimas hidrolíticas tales como, esterasa de hígado de cerdo (PLE), lipasa de las especies *Pseudomonas* (PSL) y lipasa del *Aspergillus niger* (ANL). [Para las reacciones catalizadas por PLE en disolventes orgánicos mixtos: Véase Ariente-Fliche, C., Braun, J. y Le Goffic, F., Synth. Commun. 22, 1149-1153 (1992); Basavaiah, D. y Krishna, P.R., Pure & Applied Chem., 64, 1067-1072 (1992); Basavaiah, D., Pandiaraju, S. y Muthukumaran, K., Tetrahedron: Asymmetry, 7, 13-16, (1996); Mahmoudian, M., Baines, B.S., Dawson, M.J., y Lawrence, G.C., Enzyme Microb. Technol., 14, 911-916, (1992); Izumi, T. y Kasahara, A., patente de Japón N° JP08092269A (1996)].

Esquema 1



R es alquilo C₁-C₈, alquenoilo o alquinilo; X = H, o F; Y = CH₂, O, S, Se o NH; el biocatalizador puede ser una enzima soluble, inmovilizada o la forma de cristal de enzima reticulado; el codisolvente orgánico puede ser cualquier disolvente orgánico que sea miscible en agua en menos de aproximadamente un 50%, tal como alcohol n-amílico, alcohol iso-amílico, alcohol terc-amílico, 3-pentanol, 1- o 3- heptanol, 3-Me-3-pentanol, 4-Me-2-pentanol, 3-Et-3-pentanol, 1- o 2-butanol, nitrometano, diclorometano y otros.

Los biocatalizadores pueden ser enzima soluble, enzima inmovilizada o la forma de cristal reticulado de la enzima (CLEC™) (Altus Biologics, Inc., Cambridge, Massachusetts). La reacción se puede llevar a cabo en un reactor discontinuo, una columna, una membrana de fibra hueca [Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, pp. 138-150, editado por Drauz, K. y Waldmann, H., VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim, 1995] o un reactor de membrana [Dodds, D.R., Lopez., J.L., Zepp, C.M., y Rossi, R.F. Solicitud de Patente PCT N° WO 90/04643, Mayo, 1990].

La elección de la mejor enzima en particular para un par de sustrato dado se determina mediante el tratamiento de las muestras de los pares enantioméricos con diversas enzimas tales como la esterasa de hígado de cerdo, lipasa pancreática de cerdo, lipasas de las especies *Pseudomonas* (PSL) y lipasa del *Aspergillus niger* (ANL) y las proteasas tales como la subtilisina o la α-quimotripsina. Después del tratamiento de la mezcla enantiomérica con la enzima de resolución, los productos se aíslan usando los procedimientos de extracción estándar o de cromatografía. La enzima que produce el mayor exceso enantiomérico del producto deseado debería ser la mejor candidata para su uso en el procedimiento.

El procedimiento se puede mejorar adicionalmente mediante la elección de una combinación de una mezcla enantiomérica y una enzima de resolución dadas y determinando las condiciones ideales para el disolvente de la reacción. En un sistema bifásico, se debe determinar la elección del disolvente orgánico. El disolvente orgánico óptimo se puede determinar mediante el tratamiento de las muestras de la mezcla enantiomérica con la enzima seleccionada en presencia de la misma cantidad de una colección de disolventes orgánicos miscibles en agua no más de aproximadamente un 50%. Los disolventes particulares incluyen cualquier alcohol miscible en agua en

menos de aproximadamente un 50% de (solubilidad inferior al 50% en agua a temperatura ambiente), alcano, compuestos aromáticos, éter de cetona, nitro, haloalcano o disolventes orgánicos aromáticos, tales como alcohol n-amílico, alcohol isoamílico, alcohol terc- amílico, 3-pentanol, 1- o 3-heptanol, 3-metil-3-pentanol, 4-metil- 2-pentanol, 3-etil-3-pentanol, 1- o 2-butanol, nitrometano, diclorometano, metil isobutil cetona, dimetil sulfuro, sulfolano, etcétera.

5 Tras el tratamiento de la mezcla enantiomérica con la enzima de resolución en presencia de cantidades iguales de diversos disolventes, se aíslan los productos usando los procedimientos de extracción estándar o de cromatografía. El par disolvente/enzima que produce el mayor exceso enantiomérico del producto deseado debería ser el mejor candidato para su uso en el procedimiento.

10 La cantidad relativa del disolvente orgánico seleccionado también se debería evaluar para conseguir los mejores resultados. Para hacer esto, se sigue un procedimiento similar como se ha descrito anteriormente. Usando una enzima/mezcla racémica en particular, la relación entre el disolvente orgánico/disolvente acuoso seleccionada se varía de una manera tal como la siguiente: 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 y 5:95, ([disolvente orgánico]: [disolvente acuoso]). Las muestras idénticas de una mezcla enantiomérica se tratan con una cantidad de estándar de una enzima particular en presencia de relaciones variables de disolvente orgánico a
15 disolvente acuoso durante un tiempo establecido. El volumen total se mantiene constante. Tras el tratamiento de una mezcla enantiomérica con la enzima de resolución en presencia de cantidades iguales de diversos disolventes, los productos se aíslan usando procedimientos de extracción estándar o de cromatografía. El par sistema de disolvente/enzima que produce el mayor exceso enantiomérico del producto deseado debería ser el mejor candidato para su uso en el procedimiento.

20 Como alternativa, para algunas combinaciones de mezcla racémica:enzima:disolvente orgánico, se podría mejorar la actividad enzimática y disminuir los niveles de disolvente orgánico mediante la adición de tensioactivos a la reacción, para evaluar si se debería añadir un tensioactivo a un procedimiento particular. Se puede llevar a cabo alguna variación del siguiente procedimiento. Primero, es seleccionado un tensioactivo mediante el tratamiento de las muestras de una mezcla enantiomérica con la enzima seleccionada y una serie de tensioactivos en presencia de un sistema no homogéneo compuesto por un disolvente orgánico miscible en agua en menos de aproximadamente un 50% y un disolvente acuoso. El sistema debería ser uno que se sea compatible con la realización de la reacción en ausencia de un tensioactivo. Ejemplos de tensioactivos incluyen los Tweens, tales como Tween 20™, Tween 80™, Prionex™, Teepol HB7™, Tergitol TMN-6™, Tergitol TMN-10™, Tergitol NP-4™, Tergitol 15-S-3™, Igepal CA-630™, Tyloxapol™, Glucosa-ácido oxicolico, β-gluco-piranosido de octilo, CHAPS™, sulfosuccinato de dioctilo o ácido dexosicolico. Tras el tratamiento de una mezcla enantiomérica con la enzima de resolución en presencia de un sistema de disolvente bifásico y una cantidad constante de diversos tensioactivos, los productos se aíslan usando los procedimientos de extracción estándar o de cromatografía. La combinación de disolvente/enzima/tensioactivo que produce el mayor exceso enantiomérico del producto deseado en un tiempo establecido debería ser el mejor candidato para su uso en el procedimiento.

35 El tensioactivo se debe añadir con una concentración o intervalo de concentraciones dependiendo de cuantas muestras se puedan procesar de una vez. Para una combinación dada de disolvente/enzima/tensioactivo, se debería determinar la concentración óptima de tensioactivo. Alguien experto en la materia se dará cuenta de que se deberían preparar una serie de reacciones independientes, diferenciándose solamente en la concentración del tensioactivo. Por ejemplo, la reacción se puede llevar a cabo usando PLE en pentanol al 20% y tampón Tris(hidroximetil) aminometano o [2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol al 80% con un pH de 7,4. Se pueden preparar diez reacciones idénticas, con las concentraciones de tensioactivo siguientes: 1%, 3%, 5%, 7,5% 10%, 12,5%, 15%, 20%, 25% y 30%. Tras el tratamiento de la mezcla enantiomérica con la enzima de resolución en presencia de un sistema de disolvente bifásico y aumentando la concentración de tensioactivo durante el tiempo establecido, se aíslan los productos usando los procedimientos de extracción estándar o de cromatografía. La combinación de disolvente/enzima/tensioactivo que produce el mayor exceso enantiomérico del producto deseado en un tiempo establecido debería ser el mejor candidato para su uso en el procedimiento.

50 Los tensioactivos útiles para llevar a cabo la presente invención incluyen los catiónicos, aniónicos, no iónicos o anfotéricos o las mezclas de los mismos. El tensioactivo preferido dependerá de la enzima en particular y/o de los componentes del sustrato. Tales procedimientos de reconocimiento son bien conocidos por los expertos en la materia. Los procedimientos de reconocimiento ilustrativos se exponen en los Ejemplos 14-30.

Los ejemplos de tensioactivos catiónicos útiles incluyen aminas, sales de amina, sulfonio, fosfonio y compuestos de amonio cuaternario. Los ejemplos específicos de tales tensioactivos catiónicos incluyen:

55 Cloruro de metil trioctilamonio
(Aliquat 336)
N,N',N'-polioxi-etileno(10)-N-sebo-1,3-diaminopropano
(EDT-20,' PEG-10 sebo).

Los tensioactivos aniónicos útiles incluyen, por ejemplo, sulfonato de alquilbenceno lineal, sulfonato de alfa-olefina, sulfato de alquilo, sulfato de etoxi alcohol, ácidos carboxílicos, ésteres sulfúricos y ácidos sulfónicos de alcano. Los ejemplos de tensioactivos aniónicos incluyen:

Triton QS-30 (Aniónico)
 Aerosol 22
 Sulfosuccinato de dioctilo (AOT)
 Sulfato Sódico de Alquilo (Niaproof):

- 5 Tipo-4
 Tipo-8
 Sulfato Sódico de Alquilo (C9-C13) (TEEPOL HB7).

Los tensioactivos no iónicos útiles para la estabilización incluyen etoxilato de nonil fenol, alcohol etoxilato, trioleato de sorbitán, tensioactivos no iónicos de copolímero de bloque, óxido de polietileno o derivados del óxido de polietileno de los alcoholes fenólicos o de los ácidos grasos. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen:

Éteres de Polioxietileno:

Éter de 4 laurilo (Brij 30)
 Éter de 23 laurilo (Brij 35)

Octil Fenoxi polietoxietanol (Tritons):

- 15 Tx-15
 Tx-100
 Tx-114
 Tx-405
 20 DF-16
 N-57
 DF-12
 CF-10
 CF-54

Polioxietilensorbitán:

- 25 Monolaurato (Tween 20)

Sorbitán:

Sesquioleato (Arlacel 83)
 Trioleato (Span 85)

Éter de Poliglicol (Tergitol):

- 30 Tipo NP-4
 Tipo NP-9
 Tipo NP-35
 Tipo TMN-10
 Tipo 15-S-3
 35 Tipo TMN-6 (2,6,8, Trimetil-4-noniloxipolietilenoxtanol Tipo 15-S-40).

Después de la selección de un tensioactivo adecuado, algunas veces se puede reducir la relación del disolvente orgánico de manera significativa sin pérdida del rendimiento del producto o de la enantioselectividad. Alguien experto en la materia se dará cuenta de que uno de los procedimientos para determinar en qué cantidad se disminuye el disolvente orgánico es el siguiente: usando una combinación particular de enzima/mezcla racémica/tensioactivo la relación de disolvente orgánico a disolvente acuoso seleccionada varía como sigue a continuación: [% disolvente orgánico:% disolvente acuoso], 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 y 5:95 y otras relaciones como sea necesario. Las muestras de una muestra enantiomérica se tratan con una cantidad estándar de una enzima particular en presencia de relaciones variables de disolvente orgánico a disolvente acuoso y tensioactivo durante un tiempo establecido. Tras el tratamiento de una mezcla enantiomérica con la enzima de resolución en presencia de cantidades iguales de diversos disolventes, se aíslan los productos usando los procedimientos de extracción estándar o de cromatografía. El par disolvente/enzima que produce el mayor exceso enantiomérico del producto deseado debería ser el mejor candidato para su uso en el procedimiento.

Una consideración adicional para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención es el coste de la enzima por unidad de producto producido. La presente invención se dirige a la reducción de los requisitos de la enzima del procedimiento en base a cada unidad de producto. En una realización, la cantidad de componente orgánico se reduce en el sistema no homogéneo. En otra realización, se añade un tensioactivo al sistema no homogéneo para reducir adicionalmente la cantidad de enzima requerida y reducir adicionalmente el coste del funcionamiento del procedimiento.

La presente invención se dirige particularmente a las reacciones enzimáticas en las que el sustrato comprende un éster hidrofóbico. La presente invención se dirige adicionalmente a las reacciones enzimáticas en las que el sustrato es relativamente insoluble en las disoluciones acuosas. El uso de un sistema no homogéneo que tiene codisolventes orgánicos parcialmente miscibles en agua proporciona una solvatación mejorada para los ésteres hidrofóbicos y otros compuestos hidrofóbicos e insolubles en comparación con los sistemas que usan disolventes orgánicos miscibles en agua.

Para que la presente invención se pueda comprender mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen únicamente como propósito la ilustración y no se deben interpretar en modo alguno como una limitación del alcance de la presente invención.

10 Ejemplos

Ejemplo 1, Resolución del butirato de FTC catalizada por Esterasa de Hígado de Cerdo

El butirato de FTC racémico (1,0 g) se disolvió en 5,0 ml de alcohol n-amílico calentando a 75 °C durante 30 minutos para producir un componente orgánico. Entonces el componente orgánico se mezcló con un componente acuoso que comprendía 3,8 ml de tampón fosfato 0,3 M, pH 7,5 y el sistema no homogéneo se dejó enfriar a 35 °C. La disolución de esterasa de hígado de cerdo, 1,2 ml de disolución PLE de Altus con 650 U/ml (Altus Biologics, Cambridge, MA) se añadió entonces a la fase acuosa y la suspensión resultante se agitó con una agitación moderada. La temperatura se mantuvo a 32 °C mediante un baño de agua externo. El pH se mantuvo en 7,5 mediante la adición de hidróxido sódico acuoso al 50% cuando fue necesario. La pureza óptica del éster (-)-butirato que no había reaccionado y del producto de alcohol (+)-FTC se monitorizaron mediante un análisis por HPLC usando una columna de fase estacionaria quiral. Después de 24 horas, el enantiómero (+) del éster FTC se convirtió totalmente en base a un análisis por HPLC como se ha descrito a continuación. La extracción del éster que no ha reaccionado a partir de la fase orgánica y la evaporación del disolvente orgánico produjeron el éster (-) de FTC deseado. El rendimiento recuperado fue del 89,4% en base al enantiómero sencillo (-) y la pureza óptica fue superior al 99%.

25 Procedimientos

Condiciones para HPLC quiral: CHIRAPAK® AS; columna para HPLC de 0,46 cm x 25 cm (Daicel Chemical Inc.), fase móvil = acetonitrilo al 100%, caudal = 1 ml/min, detección uv a 260 nm. Tiempos de retención: (-)-butirato de FTC, 6,2 min.; (-)-FTC, 7,4 min.; (+)-butirato de FTC, 8,8 min.; y (+)-FTC, 11,4 min.

La actividad enzimática se determinó mediante la conversión del butirato de etilo usando un aparato Radiómetro pH-stat para seguir la producción de ácido. Se añadió butirato de etilo (40 ml) a 20 ml de ácido bórico 5 mM (pH 8) y se agitó 25 °C hasta que la disolución fue completa (10 minutos). Se añadió PLE y el pH se mantuvo en 8,0 mediante la adición de NaOH 0,01 N. Se determinó la cantidad de producción de ácido a partir de la cantidad de adición de base durante un periodo de 5 minutos.

La estabilidad enzimática se midió mientras la reacción estaba en desarrollo. Las medidas se llevaron a cabo mediante la eliminación periódica de alícuotas de la disolución de enzima y la actividad se determinó usando el ensayo con butirato de etilo.

Ejemplo 2, reacción del butirato de FTC catalizada por CLEC™-PLE en alcohol n-amílico al 83% (o 3-Me-3-pentanol)/mezcla acuosa

Las condiciones de reacción y los procedimientos fueron los mismos que en el Ejemplo 1, excepto el volumen de tampón fosfato que fue de 1 ml y el volumen del componente orgánico que fue de 8,3 ml. La conversión fue del 38% para el alcohol n-amílico y del 25% para el 3-metil-3-pentanol después de 36 h (véase la Tabla 1, Reacciones 12 y 13).

Ejemplo 3, reacción del butirato de FTC catalizada por PSL en alcohol n-amílico/mezcla acuosa al 50%

Las condiciones de reacción y los procedimientos fueron los mismos que en el Ejemplo 1, excepto que se usaron 100 mg de PSL-30 soluble (PSL-30 es el PS30 de Amano). La conversión fue del 56% después de 24 h y se hidrolizó de manera preferente el enantiómero (-). La pureza óptica del éster remanente fue del 92% con una conversión del 56% (véase la Tabla 1, Reacción 21).

Ejemplo 4, reacción del butirato de FTC catalizada por ANL en alcohol n-amílico/mezcla acuosa al 50%

Las condiciones de reacción y los procedimientos fueron los mismos que en el Ejemplo 1, excepto que se usaron 200 mg de ANL soluble. La conversión fue del 45% después de 36 h. La pureza óptica del éster remanente fue del 63% con una conversión del 45% (véase la Tabla 1, Reacción 22).

Ejemplo 5, conversión del (±)-butirato de FTC catalizada por PLE en isopropanol al 20% (u otros codisolventes orgánicos miscibles en agua)/mezcla acuosa con una concentración de sustrato del 2%

- El siguiente ejemplo ilustra la tecnología de última generación usando grandes cantidades de catalizadores enzimáticos en un sistema homogéneo. A una disolución de 1 ml de disolución PLE de Altus con 650 unidades/ml de Altus Biologics, Inc. en 39 ml de tampón fosfato 0,3 M (pH 7,5) se añadieron 10 ml de butirato de FTC al 10% en isopropanol. La mezcla resultante se agitó a 24–26 °C y se monitorizó el avance de la reacción por HPLC. La conversión alcanzó el 51% y la pureza óptica del compuesto del éster no racémico quiral remanente fue superior al 99% (rendimiento químico del 48%) después de una reacción de 22 h. Estos resultados están en base al análisis por HPLC del compuesto del éster no racémico quiral. La fase acuosa incluía los productos hidrolizados (+)-FTC y (-)-FTC. La relación de (+)-FTC y (-)-FTC fue de 96,6 a 3,4. La fase orgánica se evaporó para dar 0,457 g de (-)-butirato de FTC.
- Una reacción similar se llevó a cabo usando otros codisolventes orgánicos miscibles en agua, incluyendo acetonitrilo, DMF, 1-metil-2-pirrolidiona, metanol, etanol, terc-butanol, DMSO, piridina, di(etilenglicol)metil éter, PEG 200 y PEG 600, etcétera. El acetonitrilo dio la misma enantioselectividad alta que el isopropanol y requirió de manera similar grandes cantidades de enzima. Todos los demás disolventes dieron una enantioselectividad inferior a la del isopropanol.
- Ejemplo 6, conversión del (±)-butirato de FTC catalizada por PLE en isopropanol/mezcla acuosa al 20% con una concentración de sustrato del 5%**
- A una disolución de 2,5 ml de disolución PLE de Altus con 650 unidades/ml de Altus Biologics, Inc. en 37,5 ml de tampón fosfato 0,3 M (pH 7,5) se añadieron 10,0 ml de butirato de FTC al 25% en isopropanol. En estas condiciones, el sustrato se disolvió de manera incompleta. La mezcla resultante se agitó a 24–26 °C y la reacción se monitorizó por HPLC. La conversión alcanzó el 60% y la pureza óptica del éster remanente fue del 74% (rendimiento químico del 38%) después de un tiempo de reacción de 96 h. La enantioselectividad fue bastante inferior a la de la reacción con una concentración de sustrato del 2%.
- Ejemplo 7, conversión del (±)-butirato de FTC catalizada por PLE en isopropanol/disolución acuosa al 30% y una concentración de sustrato del 3%**
- A una disolución de 1,5 ml de disolución PLE de Altus con 650 unidades/ml de Altus Biologics, Inc. en 33,5 ml de tampón fosfato 0,3 M (pH 7,5) se añadieron 15 ml de butirato de FTC al 10% en isopropanol. La mezcla resultante se agitó a 24–26 °C y la reacción se monitorizó por HPLC. La conversión fue del 8% después de 2 h y no aumentó después de esto. La enzima perdió rápidamente toda su actividad en isopropanol al 30%.
- La Tabla 1 resume los resultados de las reacciones de la resolución del butirato de FTC con diversas enzimas en sistemas no homogéneos bifásicos que comprenden diversos disolventes orgánicos miscibles en agua en menos de aproximadamente un 50% y disoluciones tampón acuosas.

Tabla 1: Resolución de una mezcla enantiomérica de butirato de FTC con diversas enzimas en diversos sistemas bifásicos^a

Reacción	enzima	disolvente co-orgánico	tiempo (h)	conversión (%)	ee (%) ^b éster	preferencia estereoquímica
1	PLE-C ^c	alcohol n-amílico	24	52	>98	(+)
2	PLE-I ^c	alcohol n-amílico	36	53	>98	(+)
3	PLE-S ^c	alcohol n-amílico	24	52	>98	(+)
4	PLE-C	alcohol isoamílico	36	52	>98	(+)
5	PLE-C	alcohol terc-amílico	36	37	59	(+)
6	PLE-C	1-butanol	24	12	10	(+)
7	PLE-C	2-butanol	24	7	7,5	(+)
8	PLE-C	3-pentanol	36	40	67	(+)
9	PLE-C	1-heptanol	36	39	64	(+)
10	PLE-C	3-heptanol	36	39	52	(+)
11	PLE-C	3-Me-3-pentanol	36	53	>98	(+)
12	PLE-C	3-Me-3-pentanol ^d	36	25	33	(+)
13	PLE-C	alcohol ^d n-amílico	36	38	61	(+)
14	PLE-C	4-Me-2-pentanol	36	45	82	(+)
15	PLE-C	3-Et-3-pentanol	36	48	92	(+)

(continuación)

Reacción	enzima	disolvente co-orgánico	tiempo (h)	conversión (%)	ee (%) ^b éster	preferencia estereoquímica
16	PLE-C	nitrometano	36	24	32	(+)
17	PLE-C	diclorometano	36	20	25	(+)
18	PLE-C	tolueno	36	18	16	(+)
19	PLE-C	metil isobutil cetona	36	20	33	(+)
20	PLE-C	acetato de terc-butilo	36	23	29	(+)
21	PSL	alcohol n-amílico	24	56	92	(-)
22	ANL	alcohol n-amílico	36	45	63	(+)

a. Condiciones de reacción: 1 g de (±)-butirato de FTC en 10 ml de una mezcla orgánica/acuosa al 50% se hidrolizó con PLE, PSL o ANL a temperatura ambiente. b. La pureza óptica fue en base al análisis por HPLC. c. PLE-C = CLEC™-PLE, PLE-I = PLE inmovilizado, PLE-S = disolución PLE Altus 650 unidades/ml. d. en 6 ml o en una mezcla orgánica/acuosa al 83%.

5 Los ejemplos 5-7 ilustran algunos de los problemas con el uso de alcoholes miscibles en agua en sistemas homogéneos para el procedimiento de la presente invención. Tales sistemas producen el producto con una pureza óptica reducida, tiempos de reacción prolongados y desactivan la enzima.

Ejemplos 8-13, Conversión del (±)-butirato de FTC Catalizada por PLE en Sistemas No Homogéneos usando Alcohol n-Amílico y Agua.

10 Las condiciones de reacción y los procedimientos fueron los mismos que en el Ejemplo 1. El sistema no homogéneo comprende 1 ml de disolución PLE de Altus (650 U/ml) como catalizador y los volúmenes de alcohol amílico y de tampón fosfato usados se indican en la Tabla 2 a continuación. Obsérvese que en cada caso, la selectividad de la conversión del isómero (+) fue casi absoluta, de manera que la conversión deseada, ligeramente superior al 50%, da como resultado unas purzas enantioméricas del éster (-) que no ha reaccionado de aproximadamente un 100% (Véase la Tabla 2).

Tabla 2, Ejemplos 8 a 13

Ejemplo	8	9	10	11	12	13
Alcohol Amílico	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	7 ml
Tampón fosfato	7 ml	6 ml	5 ml	4 ml	3 ml	2 ml
Tiempo de reacción (h)	% Conversión					
0	0	0	0	0	0	0
1	28	26	24	21	20	19
3	43,2	42	39	34	33	33
8	49	49	48	45	41	41
24	49,8	49,8	49,2	47,5	46,7	47,3

15 **Ejemplos 14-30, Conversión del (±)-Butirato de FTC Catalizada por PLE en sistemas no homogéneos que comprenden mezclas de alcohol n-amílico y agua en presencia de tensioactivos.**

20 Los ejemplos 14 al 30 se muestran en la Tabla 3. Las condiciones de reacción y los procedimientos fueron los mismos que en el Ejemplo 1. El sistema no homogéneo comprende 1 ml de disolución PLE de Altus (650 U/ml) como catalizador y se añadieron como tensioactivo a las mezclas de reacción 1 ml (Ejemplos 14-21, 23, 24 y 30) o 0,1 g de tensioactivo (Ejemplos 25-29). El componente orgánico comprendía alcohol n-amílico y el componente acuoso

comprendía tampón fosfato 0,3 M en una relación de 50:50.

Tabla 3, Ejemplos 14 a 30

Ejemplo	Tensioactivo	% Conversión en el tiempo (t)				
		(t) Horas				
		0	1	3	7	24
14	Tween 20	0	18	34	45	50
15	Prionex	0	17	30	42	49
16	Teepol HB7	0	9	15	21	26
17	Tergitol TMN-6	0	14	32	44	48
18	Tergitol 15-S-3	0	17	29	40	47
19	Igepal CA-630	0	19	35	45	49
20	Tyloxapol	0	18	35	46	50
21	Tergitol TMN-10	0	17	30	42	48
22	No Tensioactivo	0	21	34	47,5	
23	Aerosol 22	0	7	7	8	
24	Tergitol NP-4	0	18	34	49,5	
25	Ácido Glucodesoxicólico	0	14	25	44	
26	β -Glucopiranosido de Octilo	0	15	30	47	
27	CHAPS	0	14	21	39	
28	Sulfo-succinato de Dioctilo Na ⁺ sal	0	17	32	49,5	
29	Ácido Dexosicólico Na ⁺ sal	0	13	23	43,4	
30	Tween 80	0	18	33	50	

5 El amplio reconocimiento de los tensioactivos, como se ha mostrado en la Tabla 3, revela que algunos son activadores (véanse los Ejemplos 14, 15, 19, 20, 24, 28 y 30) y algunos son inhibidores (véanse 16, 23, 27 y 29). Se escogieron quince tensioactivos para los análisis adicionales. Los tensioactivos Tergitol NP-4, Tween 80, Tiloxapol y sulfosuccinato de dioctilo sódico, todos mejoraban la actividad de PLE aproximadamente en la misma medida. La mejora en la cantidad es más aparente al final de la reacción y se puede deber a la estabilización de la enzima y a la prevención de la precipitación así como a un efecto en la eficacia catalítica.

10 **Ejemplos 31-34, Conversión del (\pm) Butirato de FTC Catalizada por PLE en mezclas Bifásicas de Alcohol n-Amílico/Agua en presencia de Tween-80.**

15 Los Ejemplos 31 a 34 se muestran en la Tabla 4. Las condiciones de reacción y los procedimientos fueron los mismos que en el Ejemplo 1. El sistema no homogéneo comprende como tensioactivo Tween 80, 0,6 ml de disolución PLE de Altus (650 U/ml) como catalizador y se indican el volumen de alcohol amílico y de tampón fosfato 0,3 M usados en la tabla siguiente.

Tabla 4, Ejemplos 31 a 34

Ejemplo	31	32	33	34
Alcohol Amílico	4 ml	4,5 ml	4,75 ml	4,9 ml
Tween-80	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	0,1 ml
Tampón Fosfato 0,3 M	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Tiempo de reacción (h)	1	1	1	1
% Conversión	10	8	6	5

Ejemplo 35, Reducciones muy favorables tanto en los requisitos de la enzima como del disolvente orgánico

Las condiciones de reacción y los procedimientos fueron los mismos que en el Ejemplo 1. El sistema no homogéneo comprendía como tensioactivo 0,5 ml de Tween 80, 0,3 ml de disolución PLE de Altus (650 U/ml) como catalizador y los disolventes fueron 2,0 ml de alcohol amílico y 7,5 ml de tampón fosfato 0,3 M. El sistema no homogéneo comprendía un componente orgánico al 25% y un componente acuoso al 75%. Después de 48 horas, el alcance de la conversión fue del 50% y la pureza óptica del éster remanente fue del 99,3%.

En el presente ejemplo, la cantidad, tanto de enzima como de disolvente orgánico, se redujo aproximadamente a la mitad a partir del nivel usado en los Ejemplos 31-34, sin pérdida del rendimiento del producto. Además, la necesidad de enzima fue solamente del 25% de la requerida en el Ejemplo 1.

10 Ejemplos 36-39, Sulfosuccinato de dioctilo (SS de Dioctilo) como tensioactivo.

Los Ejemplos 36 al 39 se muestran en la Tabla 5. Las condiciones de reacción y los procedimientos fueron los mismos que en el Ejemplo 1. El sistema no homogéneo comprendía sulfosuccinato de dioctilo (SS de Dioctilo) como tensioactivo y 0,4 ml de disolución de enzima PLE de Altus (650 U/ml) en 8 ml de tampón fosfato 0,3 M y 2 ml de alcohol amílico.

15 Tabla 5, Ejemplos 36 a 39

Ejemplo	36	37	38	39
SS de Dioctilo	10 mg	25 mg	100 mg	200 mg
Tiempo (h)	Conversión			
0	0	0	0	0
1	5	5,5	9	9
3	20	22	25	23
5,5	27	32	34	30
21	40	47	48	45

Ejemplo 40

Las condiciones de reacción y los procedimientos fueron los mismos que en el Ejemplo 1. El catalizador comprendía 714 unidades totales de esterasa de hígado de cerdo (Sigma, st. Louis, MO). El sistema no homogéneo comprendía el 50% de alcohol n-amílico como componente orgánico y un 50% de tampón fosfato 0,3 M a pH 7,4 como componente acuoso. Después de 24 horas, el alcance de la conversión fue del 50% y la pureza óptica del éster remanente fue del 97,5%.

Ejemplo 41, Mejora de Velocidad con cargas bajas de enzima y de tensioactivo aniónico

Además del uso de Tween-80, se escogió el tensioactivo aniónico sal sódica del sulfosuccinato de dioctilo para conseguir la mejora de velocidad. Como se muestra en la Tabla 6, fue suficiente el 1% de carga de este tensioactivo en el sistema no homogéneo para mejora de velocidad significativa.

Las condiciones de reacción incluían: 1 g de butirato de FTC, 0,4% de carga de PLE, 1-pentanol como disolvente orgánico, relación de disolvente 2:8, reacción llevada a cabo a 30 °C (Tabla 6).

Tabla 6, Ejemplo 41

Tiempo (h)	% Conversión con (x mg) de Tensioactivo			
	Mg de tensioactivo			
	10 mg	25 mg	100 mg	200 mg
0	0	0	0	0
1	5	5,5	9	9
3	20	22	25	23
5,5	27	32	34	30
21	40	47	48	45

Ejemplo 42, Efecto del tensioactivo en la carga de enzima y en la concentración del disolvente orgánico

5 Una realización preferida de la presente invención incluye una carga de enzima del 0,3 al 0,4% con relación al butirato de FTC con una carga de sustrato de un 10%. Se llevaron a cabo una serie de reacciones en una escala ligeramente superior para determinar con mayor exactitud la variación entre los distintos desarrollos y el efecto de la conversión en la pureza óptica. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7, Reacciones en Escala de 5 g con Cargas Bajas de Enzima (28 °C, 1-pentanol al 45%, Tween-80 al 5%, acuoso al 50%)

PLE (%)	Tween-80 (%)	Tiempo (h)	Pureza Óptica (% e.e.)
0,6	2,5	26	95,32
0,6	5	24	98,34
0,4	5	24	96,20
0,4	5	42	>99,0

10 Como se ha mostrado en la Tabla 8, las reacciones llevadas a cabo con una relación orgánica/acuosa inferior y con una carga de enzima de un 0,3% dieron una pureza óptica elevada en menos de 48 horas.

Tabla 8, Reacciones en Escala de 1 g con Cargas Bajas de Enzima, (28 °C en 1-pentanol al 20%/ Tween-80 al 5%, acuoso al 75%)

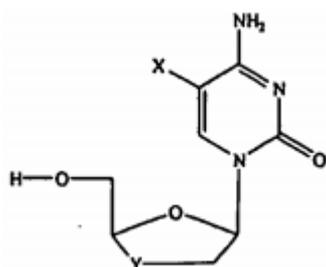
PLE (%)	Tiempo (h)	e.e. (%)
0,4 %	25	99,20
0,3 %	25	95,88
0,3 %	31	97,68
0,3 %	48	99,32

15 Mientras que los inventores han descrito anteriormente en el presente documento un número de realizaciones de la presente invención, es evidente que sus estructuras básicas se pueden alterar para proporcionar otras realizaciones que utilizan los procedimientos y las composiciones de la presente invención. Por lo tanto, se comprenderá que se debe definir el alcance de la presente invención por las reivindicaciones adjuntas al presente documento en lugar de mediante las realizaciones específicas que se han presentado anteriormente en el presente documento a modo de ejemplo.

20

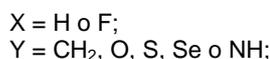
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la resolución de un compuesto de Fórmula A:



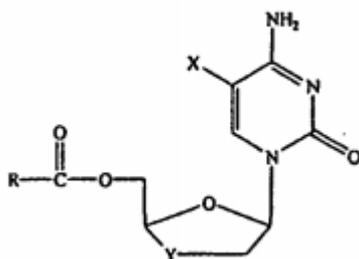
FÓRMULA A

5 en la que:



en el que el procedimiento comprende las etapas de:

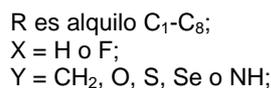
(a) dispersión de una mezcla enantiomérica de un compuesto de Fórmula B



FÓRMULA B

10

en la que:



15

con una concentración entre un 5% y un 45% (peso/volumen del sistema no homogéneo), en un sistema de disolvente orgánico para producir un componente orgánico; y
(b) proporcionar un sistema de disolvente acuoso para producir un componente acuoso; y
(c) poner en contacto el componente orgánico y el componente acuoso para formar un sistema no homogéneo a una temperatura entre 5 °C y 45 °C; y

20

en el que una enzima hidrolasa es dispersada en el componente orgánico, en el componente acuoso o en el sistema no homogéneo.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto de Fórmula B es 2-butiloximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que:

25

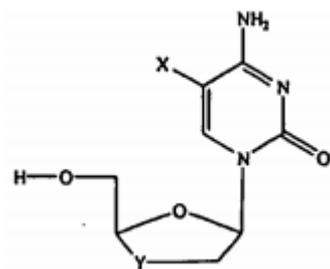
a) dicho componente orgánico comprende entre un 5 y un 90% del sistema no homogéneo; y
b) dicho sistema no homogéneo también comprende entre un 1 y un 20% de tensioactivo; y
c) dicha concentración de tensioactivo es calculada en base al volumen de dicho sistema no homogéneo.

30

4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que la enzima hidrolasa es seleccionado el grupo que consiste en esterasa de hígado de cerdo, lipasa pancreática de cerdo, lipasa de las especies *Pseudomonas*, lipasa de *Aspergillus niger* y subtilisina.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enzima hidrolasa es un cristal de enzima reticulado.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el cristal de enzima reticulado está reticulado con glutaraldehído.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enzima hidrolasa es una enzima inmovilizada.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enzima hidrolasa es una enzima soluble.
- 5 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enzima hidrolasa es la esterasa de hígado de cerdo.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el éster no racémico quiral es aislado a partir de dicho componente orgánico.
- 10 11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que dicho alcohol no racémico quiral es aislado a partir de dicho componente acuoso.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que la mezcla enantiomérica es dispersado en el componente orgánico con una concentración entre un 5% y un 15%.
13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que la mezcla enantiomérica es dispersado en el componente orgánico con una concentración entre un 5% y un 20%.
- 15 14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha mezcla enantiomérica es dispersado en dicho componente orgánico con una concentración entre un 10% y un 20%.
15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que dicho componente orgánico comprende menos de un 50% de disolvente orgánico miscible en agua.
- 20 16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho componente orgánico comprende uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en alcoholes C₄-C₈, nitrometano, diclorometano, tolueno, metil isobutil cetona, acetato de terc-butilo y alcanos.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho componente orgánico comprende uno o ambos de los alcoholes n-amílico y 3-metil-3-pentanol.
18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho tensioactivo es seleccionado del grupo que consiste en tensioactivos catiónicos, tensioactivos aniónicos y tensioactivos no iónicos.
- 25 19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho tensioactivo es seleccionado del grupo que consiste en monolaurato de polioxietilensorbitán, éter de poliglicol sulfato sódico de alquilo (C₉-C₁₃), 2,6,8-trimetil-4-noniloxipolietilenoxtanol, ácido glucodesoxicólico, β-gluco-piranósido de octilo, sulfosuccinato de dioctilo y ácido desoxicólico.
- 30 20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicho tensioactivo es un monolaurato de polioxietilensorbitán.
21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicho tensioactivo es sulfosuccinato de dioctilo.
22. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho tensioactivo es añadido al componente orgánico.
- 35 23. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho tensioactivo es añadido al componente acuoso.
24. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho tensioactivo es formulado con dicha enzima hidrolasa.
- 40 25. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que dicho sistema de disolvente acuoso comprende agua y excipientes seleccionados del grupo que consiste en sales tamponantes, agentes alcalinizantes, conservantes antimicrobianos, estabilizantes, adyuvantes de filtración, coenzimas, excipientes que facilitan la dispersión y excipientes que facilitan la función de la enzima.
26. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicho sistema de disolvente acuoso comprende agua tamponada con tampón fosfato a un pH mayor que 7.
- 45 27. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicho sistema de disolvente acuoso comprende agua tamponada con 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol o Tris (hidroximetil) aminometano.
28. Un sistema no homogéneo, bifásico para la resolución de un compuesto de Fórmula A:



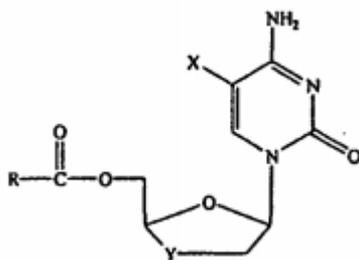
FÓRMULA A

en la que:

X = H o F;
Y = CH₂, O, S, Se o NH;

5 que comprende:

- a) una enzima hidrolasa;
- b) una mezcla enantiomérica de un compuesto de Fórmula B



FÓRMULA B

en la que:

10 R es alquilo C₁-C₈;
X = H o F;
Y = CH₂, O, S, Se o NH;

- c) un componente orgánico;
- d) un componente acuoso en contacto con el componente orgánico;

15 en el que la mezcla enantiomérica es dispersada con una concentración entre un 5% y un 45% (peso/volumen del sistema no homogéneo), en un sistema de disolvente orgánico para producir el componente orgánico.

29. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que la enzima hidrolasa es seleccionado del grupo que consiste en esterasa de hígado de cerdo, lipasa pancreática de cerdo, lipasa de las especies *Pseudomonas*, lipasa de *Aspergillus niger* y subtilisina.

20 30. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que la enzima hidrolasa es un cristal de enzima reticulado.

31. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 30, en el que el cristal de enzima reticulado está reticulado con glutaraldehído.

25 32. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que la enzima hidrolasa es una enzima inmovilizada.

33. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que la enzima hidrolasa es una enzima soluble.

34. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 29, en el que dicha enzima hidrolasa es la esterasa de hígado de cerdo.

30 35. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que dicha mezcla enantiomérica comprende 2-butiloximetil (5-fluorocitosin-il)-1,3-oxatiolano.

36. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que la mezcla enantiomérica es dispersada en el componente orgánico con una concentración entre un 5% y un 15%.

37. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que la mezcla enantiomérica es dispersada en el componente orgánico con una concentración entre un 10% y un 20%.
38. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que la mezcla enantiomérica es dispersada en el componente orgánico con una concentración entre un 5% y un 20%.
- 5 39. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que dicho componente orgánico comprende un disolvente orgánico miscible en agua en menos de un 50%.
40. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 39, en el que dicho disolvente orgánico miscible en agua en menos de un 50% comprende uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en alcoholes C₄-C₈, nitrometano, diclorometano, tolueno, metil isobutil cetona, acetato de terc-butilo y alcanos.
- 10 41. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 40, en el que dicho componente orgánico comprende uno o ambos de los alcoholes n-amílico y 3-metil pentanol.
42. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, que comprende adicionalmente un tensioactivo.
43. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 42, en el que dicho tensioactivo es seleccionado del grupo que consiste en tensioactivos catiónicos, tensioactivos aniónicos y tensioactivos no iónicos.
- 15 44. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 42, en el que dicho tensioactivo es seleccionado del grupo que consiste en monolaurato de polioxietilensorbitán, éter de poliglicol sulfato sódico de alquilo (C₉-C₁₃), 2,6,8-trimetil-4-noniloxipolietilenoxtanol, ácido glucodesoxicólico, β-gluco-piranosido de octilo, sulfosuccinato de dioctilo y ácido desoxicólico.
- 20 45. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 42, en el que el tensioactivo es un monolaurato de polioxietilensorbitán.
46. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 42, en el que dicho tensioactivo es el sulfosuccinato de dioctilo.
47. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 42, en el que el componente orgánico comprende el tensioactivo.
- 25 48. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 42, en el que el componente acuoso comprende el tensioactivo.
49. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 42, en el que el tensioactivo es formulado con la enzima hidrolasa.
- 30 50. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que dicho sistema de disolvente acuoso comprende agua y excipientes seleccionados del grupo que consiste en sales tamponantes, agentes alcalinizantes, conservantes antimicrobianos, estabilizantes, adyuvantes de filtración, coenzimas, excipientes que facilitan la dispersión y excipientes que facilitan la función de la enzima.
51. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que dicho sistema de disolvente acuoso comprende agua tamponada con tampón fosfato a un pH mayor que 7.
- 35 52. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que dicho sistema de disolvente acuoso comprende agua tamponada con 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol o Tris (hidroximetil) aminometano a un pH mayor que 7.
53. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el componente orgánico y un componente acuoso están en contacto a una temperatura entre 5 °C y 45 °C.
- 40 54. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el componente orgánico comprende un alcohol, alcano, cetona, éter, nitro, haloalcano o disolvente orgánico aromático, en el que dicho disolvente orgánico es miscible en agua en menos de un 50%.
55. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el componente orgánico comprende uno o más alcoholes C₄-C₈ que son miscibles en agua en menos de un 50%.
- 45 56. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el componente orgánico comprende alcanos C₁-C₈ no sustituidos, que son miscibles en agua en menos de un 50%.
57. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el componente orgánico comprende un disolvente miscible en agua en menos de un 50% seleccionado del grupo que consiste en alcohol n-amílico, alcohol isoamílico, alcohol terc-amílico.

58. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el componente orgánico comprende un disolvente miscible en agua en menos de un 50% seleccionado del grupo que consiste en 3-pentanol, 1-heptanol, 3-heptanol, 3-metil-3-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 3-etil-3-pentanol, 1-butanol, 2-butanol.
- 5 59. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el componente orgánico comprende nitrometano o diclorometano.
60. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el componente orgánico comprende metil isobutil cetona.
61. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el componente orgánico comprende dimetil sulfuro o sulfolano.
- 10 62. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el componente orgánico comprende un alcohol, alcano, aromático, cetona, éter, nitro, haloalcano o disolvente orgánico aromático que es miscible en agua en menos de un 50%.
63. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el componente orgánico comprende uno o más alcoholes C₄-C₈ que son miscibles en agua en menos de un 50%.
- 15 64. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el componente orgánico comprende alcanos C₁-C₈ no sustituidos, que son miscibles en agua en menos de un 50%.
65. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el componente orgánico comprende un disolvente orgánico miscible en agua en menos de un 50% seleccionado del grupo que consiste en alcohol n-amílico, alcohol isoamílico, alcohol terc-amílico.
- 20 66. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el componente orgánico comprende un disolvente miscible en agua en menos de un 50% seleccionado del grupo que consiste en 3-pentanol, 1-heptanol, 3-heptanol, 3-metil-3-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 3-etil-3-pentanol, 1-butanol y 2-butanol.
67. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el componente orgánico comprende nitrometano o diclorometano.
- 25 68. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el componente orgánico comprende metil isobutil cetona.
69. El sistema no homogéneo de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el componente orgánico comprende dimetil sulfuro o sulfolano.