



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
BIOTRANSFORMACIONES EN LA SÍNTESIS
DE ANTITUMORALES**

Autora: Ubeda Rostom Ajlani

Tutor: Andrés R. Alcántara León

Convocatoria: Julio

Resumen

El **cáncer** es la principal causa de muerte en los países económicamente desarrollados y la segunda causa principal de muerte en los países en desarrollo, en consecuencia se han investigado nuevas **dianas terapéuticas** y se han buscado formas de sintetizar estas moléculas de una manera más **sostenible**, pues la industria farmacéutica genera una gran cantidad de **residuos**. En este caso las **biotransformaciones** aparecen como una herramienta que aporta la **biotecnología** a la industria farmacéutica para cumplir los principios de la **química verde**, ya que estos procesos producen menos residuos, consumen menos energía y utilizan menos disolventes orgánicos, conduciendo de esta forma a procesos mucho más **sostenibles**. La **Biocatálisis** ha surgido como un área de gran riqueza dentro de la Biotecnología, y ha permitido la aplicación de las **enzimas** en un amplio número de industrias.

Por otro lado, la fabricación de moléculas **quirales ópticamente puras** requiere de procesos tecnológicamente **complejos** y puede involucrar costos **económicos** y **ambientales** considerables. Desde esta perspectiva los procesos **biocatalíticos** encuentran un nicho de aplicación **ideal** ya que las reacciones biocatalizadas son exquisitamente **selectivas** y en general involucran un **bajo impacto ambiental**. Incluso la incorporación de una etapa biocatalítica en el paso crucial de introducción de quiralidad de una secuencia de síntesis, puede redundar en un aumento considerable de la eficiencia del proceso total y en una disminución significativa del consumo energético y la generación de residuos ambientalmente agresivos. Así la exquisita regio y estereoselectividad que presentan los biocatalizadores, amén de la buena sostenibilidad inherente a su empleo, permiten la realización de protocolos sintéticos difícilmente alcanzables por las metodologías clásicas, a menos que se lleven a cabo costosos procesos de protección y desprotección.

En esta revisión se presentan algunos ejemplos representativos de cómo el uso de la **biocatálisis** ofrece **alternativas** útiles y más sostenibles para la preparación de medicamentos contra el cáncer, mediante la modificación de los productos naturales, como es el caso del paclitaxel (Taxol[®]); nuestro objeto de estudio. Se comentará su **semisíntesis** y los **biocatalizadores** empleados en el proceso, que son las **lipasas** (hidrolasas) o las **Alcohol deshidrogenasas** (ADH) (oxido-reductasas). Las lipasas son las enzimas empleadas mayoritariamente en la obtención de fármacos, se comentarán sus ventajas a lo largo del trabajo.

Introducción y Antecedentes

El **cáncer** es la principal causa de muerte a escala mundial. Se le atribuyen 8,2 millones de defunciones ocurridas en 2012 en todo el mundo¹. Los principales tipos de cáncer son el pulmonar, el hepático, el gástrico, el colorrectal, el de mama y el esofágico, siendo los más prevalentes el de mama, el pulmonar y el colorrectal. Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a **cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos**: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco (factor de riesgo más importante) y consumo de alcohol. Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán en aproximadamente un 70%; de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas¹.

En los últimos años se han realizado importantes avances en el tratamiento del cáncer, lo que ha llevado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a revisar este año toda la sección de la Lista relativa al cáncer: se han examinado 52 productos, confirmado 30 tratamientos, y se han incluido 16 medicamentos nuevos de los cuales 9 son agentes antineoplásicos².

Aunque el **tratamiento** más eficaz contra el cáncer sigue siendo la cirugía, la quimioterapia antineoplásica o citotóxica es imprescindible para el tratamiento en muchos pacientes. Los fármacos quimioterapéuticos actúan fundamentalmente inhibiendo el ciclo de división celular. El “Development Therapeutic Program” del “National Cancer Institute” los clasifica como: agentes alquilantes, antimetabólicos, inhibidores de la enzima topoisomerasa I y II o antimitóticos de los ácidos nucleicos. Actualmente existen 66 agentes antineoplásicos comercializados en España².

La gran mayoría de los medicamentos actualmente registrados son obtenidos por **síntesis química**, sin embargo, muchos proceden de la **naturaleza**, en concreto de las plantas. Entre ellos destacan ciertos antibióticos, corticoides y antitumorales, así como la aspirina y la morfina. Las tres principales vías de obtención de fármacos son, por el momento, la **naturaleza**, la **síntesis química** y la **biotecnología**. Esta última permite el hallazgo de moléculas mediante técnicas de ingeniería genética.

Algunos antitumorales provienen de la **modificación de compuestos naturales**, como el paclitaxel, otros se obtienen por **síntesis total** (moléculas pequeñas).

Los **productos naturales**, o bien sus derivados y análogos, representan el **50%** de las drogas que existen actualmente con uso clínico, correspondiendo la mitad de éstas a productos obtenidos a partir de las plantas superiores ³. Alrededor del 70 % de los medicamentos para el tratamiento del **cáncer** y la mitad de los nuevos fármacos introducidos en el mercado son de **origen natural** ⁴. Los productos naturales orgánicos continúan ocupando los primeros puestos en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Así en el análisis de los datos descritos en "Annual Reports on Medicinal Chemistry", entre 1984 y 1995, se indica que el 60% de los fármacos aprobados y candidatos pre – NDA , son de origen natural ⁴. Por otro lado la gran **complejidad estructural** de los productos naturales hace que su síntesis sea larga, tediosa y difícil de fabricar a gran escala ⁵. La **Biocatálisis** como se verá más adelante ayuda en la preparación de antitumorales, tanto en la modificación de productos naturales, como en la síntesis de moléculas más pequeñas con actividad antitumoral.

El término "**Química Verde**" (del inglés "Green Chemistry", más comúnmente denominado en Europa como Química Sostenible) fue propuesto por Warner y Anastas en el año 1998, y supone una nueva filosofía de diseño de los procesos industriales de manera que éstos produzcan el menor impacto medioambiental posible. Dentro de este contexto, el campo de la Biotecnología puede ofrecer una gran variedad de herramientas y alternativas que permiten que los procedimientos industriales respeten los 12 principios de la Química Verde propuestos por ambos autores anteriormente mencionados.

La **Biotecnología** es la aplicación de la ciencia y la tecnología a organismos vivos, así como también a partes, productos y modelos de los mismos, para alterar materiales vivos o no vivos para la producción de conocimientos, bienes y servicios. El término **Biocatálisis** se refiere a la utilización de células o sus enzimas aisladas para catalizar reacciones o transformaciones que conducen a la obtención de compuestos de interés, que satisfacen numerosas necesidades humanas. Mediante la biocatálisis se reducen los requerimientos de energía de los procesos químicos, se disminuyen o eliminan los costos de separación de productos, permite el uso de insumos renovables y reduce las cantidades de reactivos tóxicos. Las **biotransformaciones** son procesos en los que se emplean biocatalizadores para la transformación de sustratos no naturales para dicho biocatalizador y se obtienen productos de alto valor añadido. Esto es posible

gracias a la **promiscuidad catalítica** que se refiere a la capacidad del sitio activo de las enzimas de catalizar más de una transformación química. Sus posibles aplicaciones son el desarrollo de **nuevos biocatalizadores** capaces de acelerar determinadas reacciones que nos pueden ofrecer unas perspectivas para aplicaciones en biomedicina, síntesis orgánicas o aplicaciones industriales.

Los grandes progresos realizados en los estudios a nivel molecular de los mecanismos de actuación de muchos compuestos, han revelado la importante influencia de la **quiralidad** en la efectividad de muchas moléculas. En general, sólo uno de los enantiómeros, el **eutómero**, presenta la actividad biológica deseada; el otro isómero presenta diferente actividad; en algunos casos es inocuo para el organismo, pero en otros muchos puede inhibir el efecto del eutómero, o presentar otra actividad dañina para el organismo, como ocurrió en el conocido caso de la Talidomida (el enantiómero *R* presentaba la actividad deseada contra los mareos y vómitos de mujeres embarazadas, mientras que el enantiómero *S* era teratógeno). Por lo que, sin duda ha quedado manifiestamente comprobado que el empleo de fármacos homocirales es esencial para lograr el efecto terapéutico deseado. Las tres principales metodologías a partir de las cuales se pueden obtener compuestos ópticamente activos son la utilización de **precursores quirales** obtenidos de la **naturaleza**, la **resolución cinética** de mezclas racémicas mediante métodos físicos, catalizadores químicos o enzimáticos y la **síntesis asimétrica**, utilizando auxiliares químicos o biocatalizadores. Entre las diferentes metodologías para la obtención de enantiómeros puros cabe destacar la creciente importancia de la **biocatalisis**.

Las enzimas, como resultado de una larga evolución, muestran una gran eficiencia y selectividad. La utilización de enzimas *in vitro* ofrece una **alternativa al proceso químico** en unas condiciones más **sostenibles** y **menos contaminantes**. A parte de la **eficiencia** (aceleración mucho mayor que otro catalizador químico) y **selectividad** de los biocatalizadores cabe destacar su **biodegradabilidad** y utilidad para catalizar un amplio espectro de reacciones (**promiscuidad catalítica**). También muestran una alta **quimio-, regio- y enantioselectividad**, dicha característica es de las más deseables, ya que, al ser catalizadores quirales pueden reconocer cualquier tipo de quiralidad presente en el sustrato una vez que se formó el complejo sustrato-enzima. Además permite la realización de protocolos sintéticos difícilmente alcanzables por las

metodologías clásicas, a menos que se lleven a cabo costosos procesos de protección y desprotección. Por otra parte, las **condiciones suaves** de presión y temperatura (20 - 40°C) que se utilizan en las biotransformaciones, evitan la aparición de reacciones colaterales indeseadas (recemizaciones, epimerizaciones o transposiciones) que perjudicarían la economía del proceso. Aún más, las modernas técnicas de modificación genética que permiten la **sobreexpresión** de enzimas y el aumento de sus propiedades catalíticas (estabilidad y selectividad) está aumentando de manera considerable el interés en los procesos biocatalizados. Por último, indicar la importancia que están adquiriendo los disolventes empleados en los procesos sintéticos. No en balde, la industria farmacéutica es una de las máximas generadoras de contaminantes y residuos, ya que la relación en peso residuo/producto varía de 100 a 1.000, siendo la mayoría de los residuos los disolventes empleados en el proceso. Dado que los biocatalizadores pueden trabajar con los llamados disolventes verdes, la introducción de procesos biocatalizados en un esquema de síntesis aumenta siempre el carácter sostenible del mismo. Sin embargo, presentan algunas **desventajas**: tienen una limitada estabilidad operacional, pueden sufrir fenómenos de inhibición y solamente están disponibles en una forma enantiomérica. Otro factor a considerar es que desarrollan su máxima actividad en agua, aun cuando también actúan en otros disolventes. Por otra parte, debido a su alta selectividad, se requieren muchos catalizadores para cubrir la gran diversidad de reacciones orgánicas. Este es el problema de la disponibilidad del catalizador, y es una de las desventajas más importantes.

Es indiscutible el interés que ha despertado durante las últimas décadas el uso de estos exquisitos catalizadores en diferentes procesos industriales. En gran medida, gracias a los grandes avances que ha tenido la **biotecnología** en áreas como la microbiología industrial, la biología molecular, la ingeniería de proteínas y la ingeniería enzimática. Estas técnicas han centrado su atención en la producción eficiente de biocatalizadores que al mismo tiempo que conserven su alta **quimio-, regio- y estereoselectividad**, mejoren su estabilidad, puedan ser reutilizadas y sean compatibles con tecnologías sustentables y procesos ambientalmente más limpios.

En general, el escalado industrial de cualquier proceso biocatalizado requiere actualmente de unas etapas previas que incluyen en primer lugar la selección de la

enzima más adecuada y en segundo lugar su producción, aislamiento y purificación. A continuación su caracterización para determinar las condiciones idóneas para la catálisis enzimática, y finalmente, su inmovilización con el fin de reducir los costes. Todas estas etapas se suelen agrupar bajo el término de “**ciclo biocatalítico**”⁶.

En términos generales los **sistemas catalíticos** se dividen en enzimas aisladas y células enteras. Las enzimas aisladas no requieren equipos especiales (fermentadores) y, al estar solamente una enzima presente, la posibilidad de reacciones secundarias se ve muy disminuida. Además, se logra una mayor productividad debido a la mayor tolerancia a la concentración en un medio sin células. Por el contrario, si no se dispone de la enzima, muchas veces el proceso de aislamiento y purificación de la misma es caro, por lo que es más práctico usar células enteras, que además tienen la ventaja de no requerir el agregado de cofactores (ya que éstos se producen en la propia célula). También, los sistemas de células enteras se pueden subdividir en dos tipos: **células en crecimiento** y **células en reposo**. Las células en crecimiento tienen mayor actividad y dan más reacciones secundarias, a la vez que el aislamiento de los productos es más dificultoso. Por tanto, de ser posible se deben usar células en reposo. Las células en crecimiento deben usarse si el sustrato induce continuamente la enzima que cataliza la reacción o las enzimas necesarias para la regeneración de cofactores. El número de procesos biocatalíticos llevados a cabo en la industria ha aumentado considerablemente en los últimos años, principalmente en el sector farmacéutico o en la fabricación de productos de alto valor añadido. Las enzimas utilizadas como catalizadores de reacciones orgánicas se pueden dividir en seis grupos: oxido-reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. La mayoría de los procesos biocatalíticos se desarrollan con la utilización de hidrolasas (60%), seguido de oxido-reductasas (25 %); los otros 4 grupos de enzimas constituyen el 15% restante (**Figura 1**), adquiriendo cada vez mayor importancia las liasas, formadoras de enlace C-C. Muchas de estas enzimas se suelen emplear como biocatalizadores inmovilizados, tanto en medios acuosos tamponados como en medios no convencionales, permitiendo de este modo su estabilización en las condiciones de reacción y su reciclado.

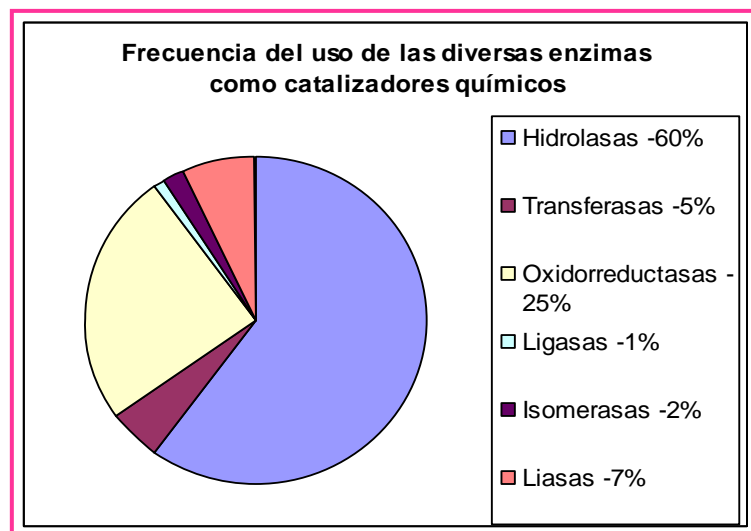
La **ingeniería de los biocatalizadores** es una etapa que abarca los distintos procesos que buscan mejorar su desempeño, desde mejoras en su formulación, incluyendo la **inmovilización**, hasta técnicas de **ingeniería genética** como la producción de

organismos recombinantes o la evolución dirigida. Las **enzimas** son biocatalizadores con excelentes propiedades para su utilización como catalizadores industriales, pero presentan algunos problemas. Uno de estos problemas es que son moléculas solubles, con lo que, su separación de los medios de reacción y su posterior reutilización puede ser complicada. Por ello se hace conveniente la **inmovilización** de la enzima previa a su utilización. La inmovilización de las enzimas simplifica la recuperación y reutilización del soporte, evitando la contaminación de los productos por la enzima, permite simplificar el diseño y control de los reactores. La inmovilización se lleva a cabo mediante la unión del catalizador a un soporte sólido. La principal **ventaja** de esta técnica consiste en la obtención de un sistema catalítico reusable y que facilita los pasos de separación y purificación de la reacción. Además los catalizadores inmovilizados son más fáciles de manipular y conservar, y resultan en una estabilización de la enzima involucrada (debido a los enlaces con el soporte) por lo que se prefiere usar enzimas inmovilizadas cuando se hacen reacciones en disolventes orgánicos o a altas temperaturas.

Como **contrapartida**, la inmovilización produce una inevitable pérdida de actividad que aumenta los costos de producción y también puede ser responsable de una menor eficiencia de producción debida a limitaciones en la transferencia de masa durante el proceso. Hay varios **métodos de inmovilización**, clasificados según el tipo de enlace con el soporte en tres tipos; de unión covalente, de unión no covalente e inmovilización mecánica. En el primero se debe formar al menos un enlace fuerte covalente entre el catalizador y el soporte. La unión no covalente incluye distintos tipos de enlaces de menor energía (fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, enlaces electrostáticos). Es característico de esta inmovilización el establecimiento de varias interacciones multipuntuales. Por último, en la inmovilización mecánica la enzima o la célula es inmovilizada por medios físicos sin mediar un enlace, pudiéndose mover libremente dentro de una "jaula" producida por polimerización, encapsulación o membranas.

Usando técnicas de biología molecular se desarrollan **sistemas recombinantes** en los cuales los genes que codifican una determinada enzima (o conjunto de ellas) se sobreexpresan en un organismo hospedador. El organismo recombinante resultante posee un nivel elevado de la enzima deseada. En estos procesos de producción de organismos recombinantes y de **evolución dirigida** se realizan distintas mutaciones

sobre la enzima, ya sea específicas en un sitio o de menor selectividad, con el fin de mejorar las características deseadas del catalizador.



La mayoría de los procesos biocatalíticos se desarrollan con la utilización de **hidrolasas** (60%).

Las hidrolasas catalizan reacciones de **hidrólisis**;
 $A-B + H_2O \rightleftharpoons AH + B-OH$

Figura 1. Frecuencia del uso de las diversas enzimas como catalizadores químicos.

Por consiguiente, la utilización de biocatalizadores en la industria química y farmacéutica es cada vez más frecuente debido a las ventajas que presentan las enzimas frente a los catalizadores inorgánicos. La utilización de enzimas en estas industrias está enfocada principalmente a la obtención de **precursores de fármacos** (APIs) y **semisíntesis** de fármacos y a la **resolución enzimática** de mezclas racémicas. En el primer caso, las empresas farmacéuticas suelen acudir a métodos de **semisíntesis** de fármacos de origen natural, en su mayor parte moléculas complejas con un gran número de centros quirales, debido a la escasez de la fuente natural del fármaco o la complejidad del proceso de Síntesis Orgánica. Un ejemplo es el paclitaxel, que se detallará posteriormente. Otra aplicación de las enzimas en Síntesis Orgánica y Farmacéutica es la **resolución de mezclas racémicas** con el fin de obtener los isómeros o enantiómeros puros, difíciles de separar por los métodos químicos clásicos. La preparación de isómeros puros es de vital importancia en el caso de aquellas moléculas de fármacos que contengan algún carbono asimétrico, ya que actualmente es obligatorio realizar los ensayos clínicos pertinentes con ambos isómeros y con la mezcla racémica, de acuerdo a las directrices de organismos internacionales como la Food and Drug Administration (FDA) o la Agencia Europea del Medicamento (EMA) antes de aprobar su comercialización.

En resumen, la biocatálisis no solo se ha establecido como un recurso adicional en la síntesis de fármacos, sino que también cobra importancia en la síntesis de otros productos químicos como herbicidas, insecticidas, edulcorantes y otros.

Objetivos

El propósito principal de la revisión bibliográfica llevada a cabo es:

- ✚ Mostrar la importancia de las biotransformaciones como recurso adicional en la síntesis de fármacos antitumorales tomando como ejemplo el Taxol[®].
- ✚ Resaltar el interés de la fuente natural en la obtención de fármacos antitumorales.
- ✚ Ilustrar el uso de enzimas hidrolasas y oxido-reductasas en la semisíntesis del Taxol[®].

Metodología

Para la elaboración de este trabajo se procedió a recopilar información sobre los procesos biocatalíticos descritos tanto en revistas científicas como en patentes registradas. Por tanto se trata de una revisión bibliográfica en la que se han consultado diversas bases de datos que se encuentran en internet. Durante la preparación y redacción de este trabajo las principales bases de datos consultadas fueron “PubMed”, “ResearchGate”, “News-Medical” y “Real Academia Nacional de Farmacia”. También se han consultado libros electrónicos, tesis doctorales y publicaciones en revistas científicas (sobretudo del CSIC). Los idiomas de búsqueda fueron tanto el inglés como el castellano.

Resultados y discusión

El paclitaxel es uno de los agentes antitumorales más prometedores desarrollados en las últimas décadas. Recientemente se cumplieron 36 años desde el descubrimiento del modo de acción de este fármaco, obtenido a partir de un extracto vegetal, y 21 desde la aprobación de su uso para el tratamiento del cáncer de mama. Dicho agente antimetabólico fue aprobado por la FAD en 1998 y se emplea para el tratamiento de cáncer de pulmón, ovario, mama y formas avanzadas del sarcoma de Kaposi. Entre los agentes antimetabólicos, el paclitaxel exhibe un único modo de acción sobre las proteínas microtubulares responsables de la formación del huso mitótico durante la división celular, pues inhibe el proceso de despolimerización de la microtubulina. El paclitaxel tiene su origen en el “tejo del Pacífico” (*Taxus brevifolia*), y su purificación

a partir de la fuente vegetal es complicada y con un rendimiento final es muy bajo. De hecho, es necesario procesar 9 toneladas de corteza obtenida de 3.000 tejos para conseguir solamente 1 kg de paclitaxel. Por ello se han establecido métodos de semisíntesis de este compuesto a partir de otras fuentes vegetales de taxenos que se explicarán detalladamente a lo largo del trabajo ⁷.

A partir de los **diterpenos** presentes en la **corteza del “tejo del Pacífico”** (*Taxus brevifolia*), se han obtenido productos con actividad **antineoplásica**. Se trata de diterpenos tricíclicos derivados del núcleo del taxano, algunos de los cuales son estrictamente diterpenoides, como la **baccatina III** y sus derivados, otros sin embargo, como es el caso del **paclitaxel**, tienen además una función amida lo cual lo convierte en un diterpeno policíclico complejo. El **paclitaxel** se aisló a partir de la corteza de *Taxus brevifolia*, dentro de una línea de investigación dirigida a la obtención de productos naturales con actividad antitumoral del Nacional Cancer Institute (NCI). Tras su aislamiento siguió un periodo de desinterés debido a que su fuente natural era muy limitada (baja concentración del principio activo en la droga (0,007% del peso seco), elevado coste del proceso de extracción, posible extinción del tejo en caso de tala indiscriminada) y porque su formulación farmacéutica era muy complicada. Sin embargo, cuando se descubrió su efecto sobre los microtúbulos celulares comenzó a ser considerado como un compuesto potencial para ser utilizado en clínica, no obstante, la escasez del producto continuaba siendo un problema.

Con el fin de solventar este inconveniente se realizó una síntesis química total del compuesto que resultó compleja, laboriosa y no era comercialmente rentable debido a los altos costes del proceso. También se puso a punto un método viable para la obtención de paclitaxel **1** por semisíntesis a partir de dos análogos estructurales, la baccatina III **5** y la 10-desacetilbaccatina III **6**; diterpenos que se encuentra en mayor proporción (0.02-0.1%) en las hojas de *Taxus baccata* y en variedades cultivadas de otras especies del género *Taxus* (mucho más asequibles por estar presentes en tejidos renovables como las hojas y porque su recolección no requiere años de cultivo ni compromete su viabilidad). En este tipo de síntesis **enantioselectiva** se han conseguido afortunadamente rendimientos de hasta el 75%. Actualmente, la fabricación se va optimizando y el Taxol[®] se produce por cultivos *in vitro* de *Taxus spp* (Python Biotech es el mayor productor de paclitaxel por este método), aumentando así el rendimiento en un 1000 aproximadamente. Mediante esta

herramienta es posible obtener cultivos de células no diferenciadas, como callos y suspensiones celulares, además de cultivos de órganos como brotes y raíces.

El descubrimiento del paclitaxel es un ejemplo muy ilustrativo de cómo los conocimientos adquiridos durante siglos en la medicina tradicional y en el estudio de los productos naturales pueden ser aplicados por la industria farmacéutica y la comunidad científica para el desarrollo de nuevos fármacos. Además constituye una muestra más de la importancia que puede llegar a tener en el futuro el preservar la biodiversidad de nuestro planeta.

CUALIDADES DEL TAXOL[®] NECESARIAS PARA SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Núcleo taxánico esterificado en la posición del C-13 con una [cadena lateral de fenilisoerina en el C-13](#) de su molécula, la que es altamente flexible, y puede adquirir conformaciones alternativas dependiendo del medio.

Cuarto anillo en forma de [anillo de "oxetano"](#) que une los C de las posiciones 4 y 5.

Tabla 1. Cualidades del Taxol[®] necesarios para su actividad biológica.

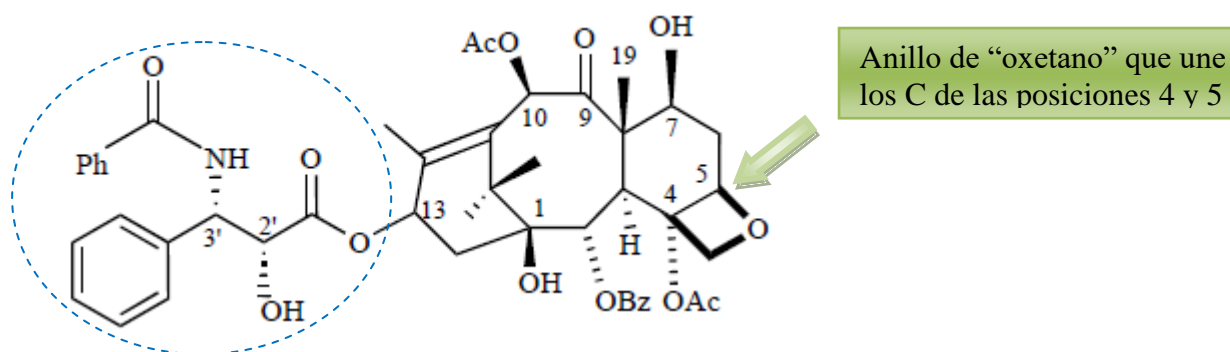


Figura 2. Estructura química de la molécula del paclitaxel (ATC Código L01CD01, Código DB DB01229, Taxol[®] BMS; Bristol-Myers Squibb).

El desarrollo de un proceso **semisintético** para la producción de Paclitaxel **1** a partir de, por un lado, bacatina III 5 (Paclitaxel sin cadena lateral en C-13) o 10-desacetilbacatina III 6 (10-DAB, paclitaxel sin cadena lateral en C-13 y sin el acetato del C-10), y por el otro de la estructura lactámica 7 (precursora de la cadena lateral en C-13) es una muy interesante propuesta. En efecto, tanto diferentes taxanos (estructuras derivadas de **5** ó **6**), como la bacatina III o la 10-DAB pueden obtenerse a

partir de agujas, brotes y cultivos jóvenes de tejo. Por ello la mayor parte de los esfuerzos se centraron en la creación de la cadena lateral en el C-13.

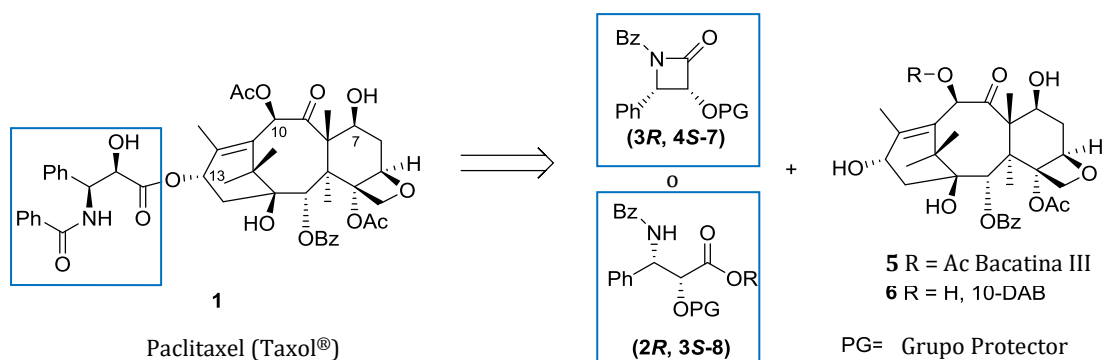


Figura 3. Estrategia semisintética de la preparación del Taxol®.

Así los productos obtenidos de forma natural 5 o 6 se acoplaron con un enantiomero *N*-benzoil azetidionona (3R, 4S)-7 o con el anillo abierto; *N*-benzoil-3-feniléster de isoserina (2R, 3S)-8 o derivados permitiendo la semisíntesis.

La semisíntesis inicial de paclitaxel publicado por el grupo Potier requiere la esterificación del ácido cinámico a la bacatina III, seguido de una hidroxilación de la cadena lateral C-13. Este proceso dio rendimientos muy bajos y no era comercialmente factible. Posteriormente, se demostró la síntesis de paclitaxel a partir de la esterificación de la bacatina III con la cadena lateral de fenilisoserina protegida en la posición 20-OH. Este proceso dio sólo un 40% de rendimiento. Posteriores síntesis prácticas y eficientes fueron desarrolladas por Holton y otros (por ejemplo, por BMS) utilizando diferentes productos intermedios de la cadena lateral y diferentes condiciones de reacción que proporcionaron rendimientos mucho más altos sin ninguna formación de epímeros. Por otro lado, los β -lactámicos pueden servir como excelentes precursores de las cadenas laterales del paclitaxel.

La reacción de **Staudinger** de cloruro de glicolil acetilo con una imina apropiada, en presencia de trietilamina, da ambas *cis*- β -lactamas **9** con un rendimiento del 90%, las cuales se separan por cristalización (caro y complejo) para proporcionar el deseado (3R, 4S)-**9**. La eliminación del sustituyente *p*-metoxifenil (PMP) con nitrato de amonio cérico proporciona entonces (3R, 4S)-**10** en un rendimiento del 92%. El acetilo se puede eliminar selectivamente mediante tratamiento con pirrolidina, y el alcohol resultante puede ser protegido con una variedad de grupos para producir (3R, 4S)-**11** en un rendimiento global de 85 a 90%.

El compuesto **11** se puede preparar con un rendimiento mayor del 75% por otras rutas alternativas. Los dos enantiómeros del *cis*-**11** son separados mediante cristalización.

Así estos dos compuestos esenciales podrían ser preparados a través de procesos puramente químicos desarrollando así la semisíntesis del Taxol[®], tal y como se muestra en la **figura 4**. La semisíntesis del Taxol[®] consiste en el aislamiento de la 10-DAB III extraída del follaje de diferentes especies de tejo, para convertirse posteriormente en Taxol[®] mediante el acoplamiento de la cadena lateral *N*-benzoil-3-fenilisoserina al grupo hidroxilo del C-13 y la acetilación en el C-10 previamente sintetizadas.

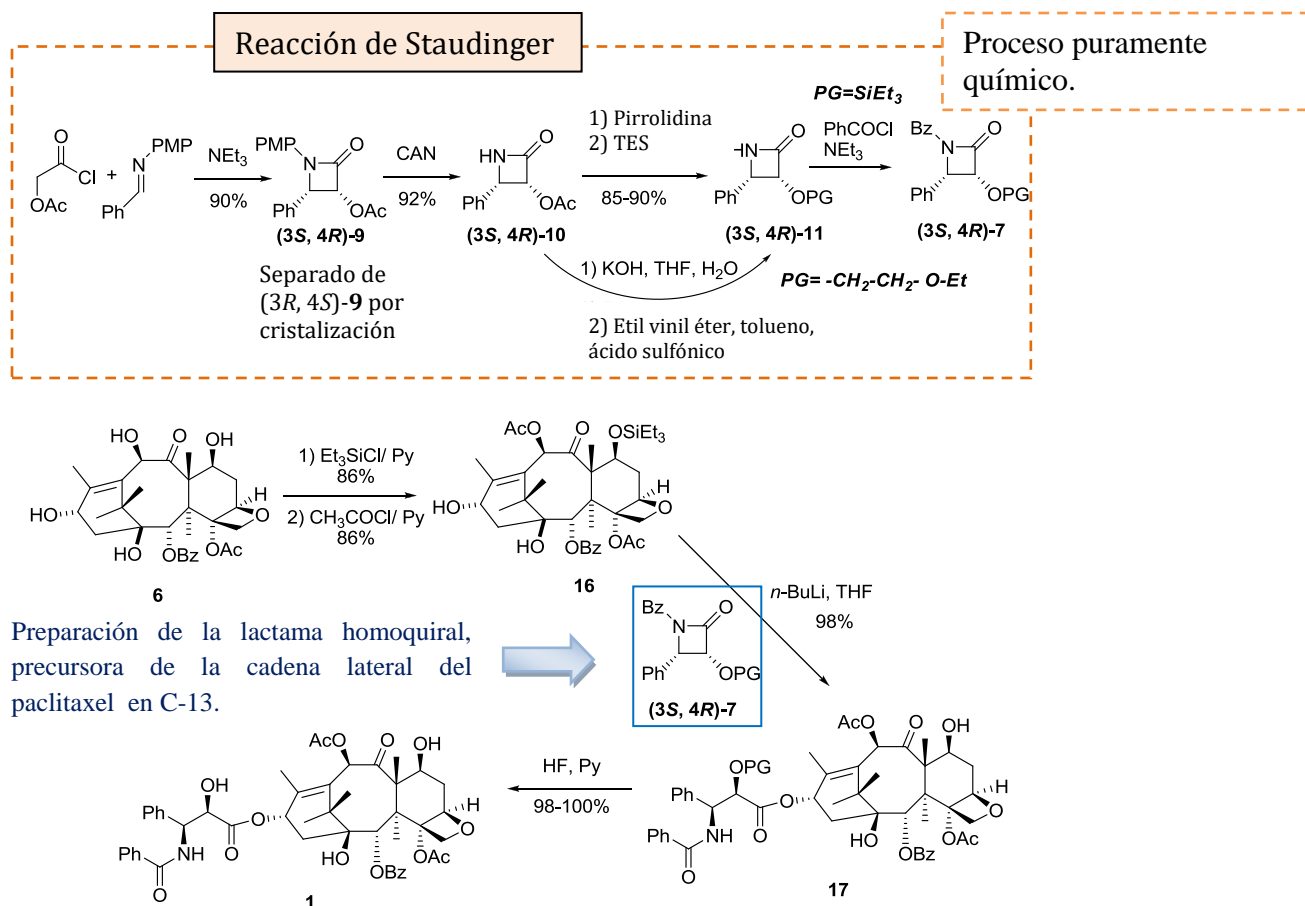


Figura 4. Estrategia semisintética desarrollada del Taxol[®].

Para optimizar estos procesos a escala de laboratorio existen dos opciones:

- + **Enriquecer** el extracto de follaje de los tejos en bacatina III o 10-DAB III mediante el uso de enzimas procedentes de cepas microbianas; C-13 taxolasa, C-10 deacetilasa y C-7 xilosidasa (**figura 5**).
- + Formar la cadena C-13 por biocatálisis usando enzimas **hidrolasas** (Lipasas) o enzimas **óxido-reductasas** (Alcohol deshidrogenasa; ADH).

Teniendo en cuenta que los **extractos del follaje** de los tejos contienen una mezcla compleja de taxanos y que el componente más abundante en esta mezcla es la 10-DAB III que se obtiene con rendimientos de 0.1% en base a peso seco se reportó la

conversión enzimática de una mezcla de taxanos a 10-DAB III. Las enzimas utilizadas fueron la **C-13 taxolasa** (cataliza el corte de la cadena lateral del C-13 de varios taxanos tal y como se muestra en la **figura 5**), la **C-10 deacetilasa** (cataliza el corte de la cadena lateral del C-13 de varios taxanos), ambas aisladas de dos cepas de *Nocardioides* y la **C-7 xilosidasa** (cataliza el corte de la xilosa del C-7 de varios xilosiltaxanos), aislada de *Moraxella sp.* Esta estrategia permitió un incremento en la cantidad recuperada de 10-DAB III, y por consecuencia del Taxol[®] semisintético.

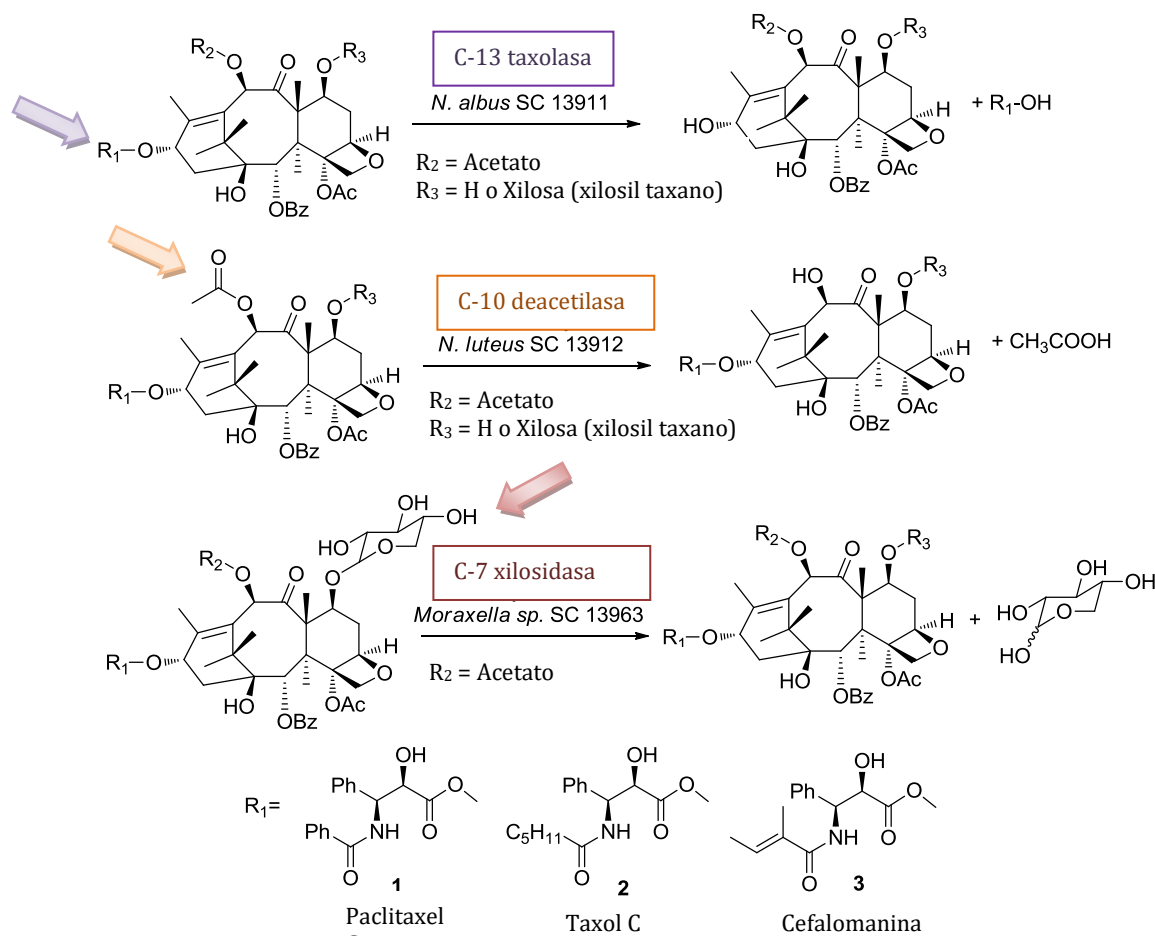


Figura 5. Reacciones enzimáticas en el núcleo del taxano.

El otro precursor clave para la semisíntesis del Taxol[®], como se muestra en la **figura 1**, es la **cadena lateral en el C-13**. Para su preparación, se describen diferentes estrategias biocatalíticas ya sea para la mejora de la síntesis química de la azetidionona enantiopúrica (3*R*, 4*S*)-**7** o para la preparación del *N*-benzoil-3-feniléster de isoserina (2*R*, 3*S*)-**8**. Como hemos dicho antes, estas dos moléculas son los reactivos necesarios para acoplar a **5 (bacatina III)** o **6 (10 DAB III)**.

Así pues, lograr la correcta estereoquímica de la cadena lateral en el C-13 es de crucial importancia. Para ello, se llevó a cabo la hidrólisis enantioselectiva del acetato

racémico 3-(acetiloxi)-4-fenil-2-azetidionona *cis*-**10** (figura 6) al correspondiente alcohol **20** y el *R*-acetato **10** usando una **lipasa** PS-30 de *Pseudomonas cepacea* (Amano) y BMS **lipasa** (lipasa extracelular obtenida de la fermentación de *Pseudomonas sp.* SC 13856). El rendimiento de la reacción obtenido para el (*R*)-acetato **18** fue superior al 48% (máximo teórico del 50% para una resolución cinética) con un exceso enantiomérico (e.e) superior al 99,5%). La lipasa BMS y la lipasa PS 30 fueron **inmovilizadas** sobre **polipropileno Accurel** (PP). Las lipasas inmovilizadas se pueden reutilizar (diez ciclos) sin perder su actividad enzimática ni su productividad. Tampoco pierden la enantiopureza del producto **18** en el proceso de resolución. Al final de la reacción se baja la temperatura y la agitación de modo que (*3R, 4S*)-**10** precipita de la mezcla de reacción y la enzima inmovilizada flota en la parte superior del reactor debido a su hidrofobicidad, permitiendo así la reutilización de la enzima y la separación del precursor **10**. De cada batch de reacción, se aísla el *R*-acetato **10** con un 45% de rendimiento y un 99,5% de e.e que mediante una suave hidrólisis en medio básico se transforma químicamente al *R*-alcohol **20**, sintón que al ser acoplado a la bacatina III **5**, tras una protección y desprotección, permite la obtención del paclitaxel **1** por un proceso semisintético.

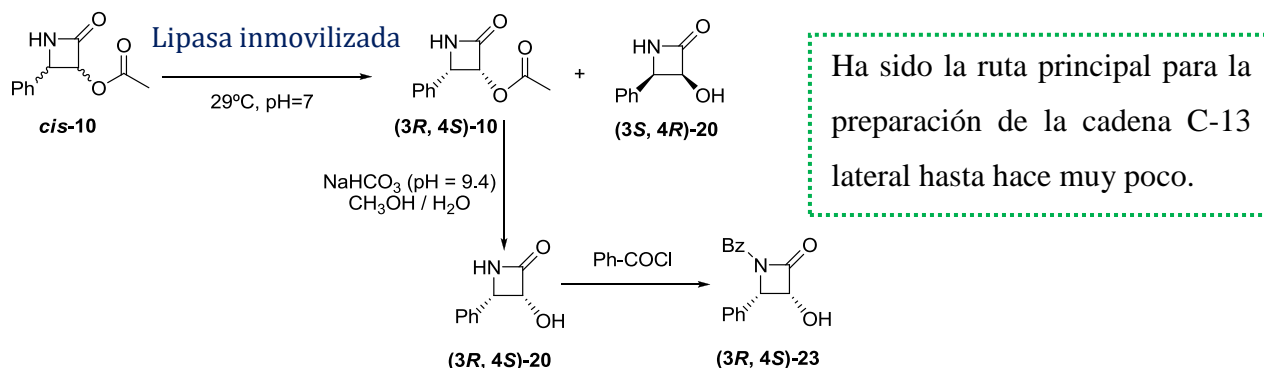


Figura 6. Hidrólisis enantioselectiva del acetato racémico 3-(acetiloxi)-4-fenil-2-azetidionona *cis*-**10**, y posterior hidrólisis química para la obtención de (*3R, 4S*)-**20**.

Ventajas del uso de hidrolasas (lipasas)
Capacidad de reconocimiento muy específico de sustratos (promiscuidad catalítica)
Elevada regio-, quimio- y enantioselectividad
Buena disponibilidad comercial
Tolerancia a la adición de disolventes miscibles con el agua
Posibilidad de utilización en procesos en disolventes no acuosos permitiendo así llevar la biocatálisis en el sentido de acilación en lugar de la hidrólisis. Se consigue la supresión de reacciones colaterales inducidas por agua o la recuperación de las enzimas por ser insolubles en disolventes orgánicos.
Ausencia de necesidad de cofactores (alto costo económico y deben ser reciclados)

Mediante otro protocolo sintético, las moléculas (3*R*, 4*S*)-**7** (*N*-benzoil azetidiona) o (2*R*, 3*S*)-**8** (*N*-benzoil-3-fenilisoserina) se pueden preparar usando una reducción biocatalítica, a partir de la 3-oxo-β-lactama *rac*-**34** o el β-oxoéster *rac*-**35** (figura 8). Las **ADH** catalizan una amplia variedad de reacciones de óxido-reducción, empleando coenzimas, tales como NAD (P), como aceptor de H. El requerimiento de cofactores representa una complicación adicional dado el alto costo económico de los mismos por lo que no resulta práctico. La alternativa para la realización de estas reacciones pasa por la regeneración de los cofactores que son adicionados en cantidades catalíticas.

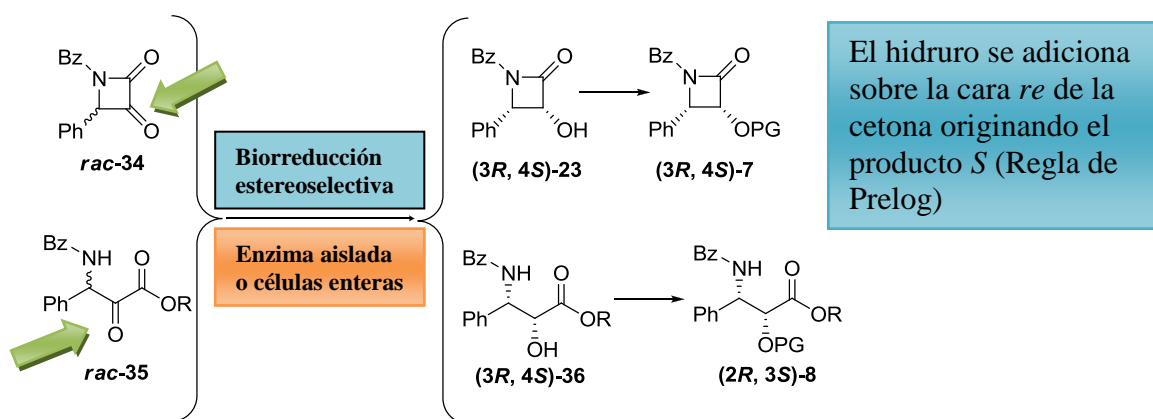


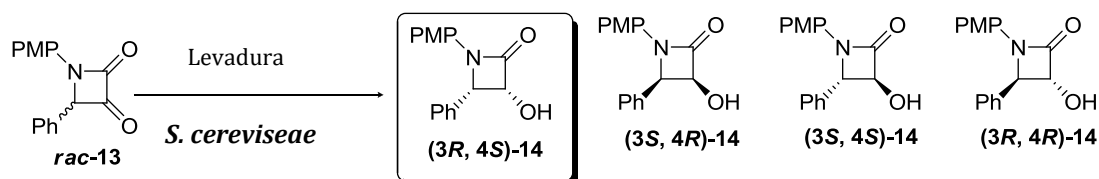
Figura 8. Biorreducción estereoselectiva para la preparación de (3*R*, 4*S*)-**7** o (2*R*, 3*S*)-**8**.

Estrategias para la regeneración enzimática de cofactores.	
Proceso acoplado a sustrato (sustrato 1°, enzima, sustrato 2°)	Proceso acoplado a enzima (2 Enzimas y 2 sustratos)
Regeneración del cofactor a expensas del sustrato 2°	Regeneración del cofactor mediante el acoplamiento de una segunda reacción enzimática catalizada por una enzima distinta a la utilizada para acelerar la reacción principal. Más efectivo se evita la inhibición competitiva
Desventaja: inhibición competitiva debido a la saturación del sitio activo por el sustrato 2°.	

A pesar del desarrollo de estos métodos eficaces de reciclaje, la utilización de cultivos de microorganismos y cultivos celulares capaces de regenerar eficientemente los cofactores utilizando el andamiaje metabólico de un organismo vivo resulta

especialmente atractiva para llevar adelante las reacciones bioquímicas de óxido-reducción.

El primer ejemplo de una reducción biocatalítica de análogos de *rac*-**13** con células de levadura proporcionó el diastereoisómero alcohol deseado (*3R*, *4S*)-**14** con la pureza óptica más alta (hasta 80% e.e en la conversión 50%) por medio de una *S. cerevisiae*, no obstante se formaron cantidades significativas del diastereoisómero *trans* (*3R*, *4R*)-**14** (figura 9).



No estereoselectiva: La levadura tiene 49 tipos de ADH con actividades opuestas

Figura 9. Biorreducción de la azetidina diona *rac*-**13**.

Por ello es necesaria una manipulación genética adicional para mayor enantio- y diastereoselectividad. Se encontraron alrededor de 40 enzimas reductasas de levadura en el genoma de *S. cerevisiae*, se clonaron, se expresaron en *E. coli* y se puso a prueba su capacidad como agentes de reducción enantioselectiva para diferentes β -cetoésteres. Una de esas enzimas (Ara1p) era eficaz en la reducción de *rac*-**13**, de modo que la cepa de *E. coli* BL21 recombinante (DE3) se ensayó para la biorreducción de este mismo sustrato. Se observó una estereoselectividad más alta para el *cis*-diastereoisómero aunque se formaba también el *trans*. Por último, el proceso fue aún más atractivo en condiciones de fermentación pues la conversión del sustrato fue del 100% y solo se formaron trazas del isómero no deseado⁸.

Además, se realizó un proceso acoplado a enzima (Yjr096w o Ydl124w) que condujo al intermedio deseado (*3R*, *4S*)-**14** con alta conversión y pureza enantiomérica. El cofactor se regeneró gracias a la Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

Por último, tal y como se ilustra en la figura 1 se puede partir también de la isoserina-*N*-benzoil-3-feniléster (*2R*, *3S*)-**8** para la síntesis de la cadena lateral C-13 por medio de una reducción microbiana enantioselectiva. Se obtuvieron rendimientos moderados y una elevada diastereoselectividad. Años después Patel y cols utilizaron diferentes microorganismos con el fin de obtener mayores rendimientos de reacción y de exceso enantiomérico para la sincronización deseada (*2R*, *3S*)-**40**⁸.

Para finalizar, el empleo de la ADH en la biotransformación del Taxol[®] permite conseguir el 100% de la conversión del sustrato dado que presenta mayor estereoselectividad que las lipasas en las que se pierde el 50% del sustrato (solo reconocen un estereoisómero). Como contrapartida, se trata de un proceso más caro por el elevado costo económico que supone el uso de cofactores así como su regeneración.

Conclusiones

- ✚ La **biocatálisis** es una **alternativa** al proceso químico en unas condiciones más **sostenibles** y **menos contaminantes** en la síntesis de fármacos antitumorales. Mediante este proceso se **reducen** los **requerimientos** de **energía** de los procesos químicos y se **disminuyen** o **eliminan** los **costos** de **separación** de productos. Además, permite el uso de insumos **renovables** y **reduce** las cantidades de reactivos **tóxicos**. De modo que la gran **eficacia** y **selectividad** de los biocatalizadores así como su biodegradabilidad, quimio-, regio- y enantioselectividad sobretodo, los convierte en un recurso adicional en la síntesis de fármacos.
- ✚ Los **productos naturales** pueden ser aplicados por la **industria farmacéutica** y la comunidad **científica** para el desarrollo de **nuevos fármacos**. Alrededor del **70 % de los medicamentos** para el tratamiento del **cáncer** y la mitad de los nuevos fármacos introducidos en el mercado son de **origen natural**.⁴ Los productos naturales orgánicos continúan ocupando los primeros puestos en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Así, en el análisis de los datos descritos en "Annual Reports on Medicinal Chemistry", entre 1984 y 1995, se indica que el 60% de los fármacos aprobados y candidatos pre-NDA (Non-Disclosure Agreement), son de origen natural.
- ✚ Las **lipasas** y las **ADH** son las enzimas utilizadas en el proceso semisintético. Las lipasas son las mayormente empleadas; trabajan a temperaturas moderadas, sin necesidad del uso de cofactores, y a pH moderado (5-8). Asimismo, permiten la llamada resolución enantioselectiva, lo cual es difícil de conseguir por medio de la síntesis convencional. El método **semisintético** es actualmente **una** de las **rutas comercialmente viables** de producción del Taxol[®].

Bibliografía

- ¹Informe mundial sobre el cáncer **2014**, IARC .
- ²Lista modelo OMS de Medicamentos Esenciales,**2015**.
- ³González A. Memoria de **2002** y citas referidas en dicha publicación.
- ⁴Hernández M. Farmacia natural contra el cáncer. La provincia, diario de las Palmas **2010**.
- ⁵Avendaño, C.; Menéndez, J. C. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs, Elsevier: **2008**.
- ⁶Seoane G.; Gonzalez D.; Schapiro V. Biotransformaciones - una alternativa sustentable en síntesis orgánica, **2004**.
- ⁷Arroyo M.; Acebal C.; De la Mata I. Biocatálisis y biotecnología, **2014**.
- ⁸Hoyos P.; Pace V.; Alcántara AR. Biocatalyzed On Water Synthesis of Chiral Building Blocks for the Preparation of Anti-Cancer Drugs: a Greener Approach. Curr Org Chem. **2013** y citas referidas en dicha publicación.
- Hernáiz M.J. Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos (I) enzimas hidrolíticas, **2012** y citas referidas en dicha publicación.
- Alcántara León AR.; Sánchez Montero J. Utilización de hidrolasas en la preparación de fármacos e intermedios homocirales, **2010** y citas referidas en dicha publicación.
- Sánchez Montero José .M. Biotecnología blanca e industria farmacéutica, **2007** y citas referidas en dicha publicación.
- Listado de principios activos e incorporación del pictograma de la conducción, AEMPS, **2016**, Versión 006.
- Avendaño, C.; Menéndez, J. C. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs, Elsevier: **2008**.
- Meštrović Tomislav y cols. Producción del Paclitaxel, News-Medical.net, **2014**.
- Centelles Josep J.; Imperial Santiago. Paclitaxel. Descubrimiento, propiedades y uso clínico, **2010** y citas referidas en dicha publicación.
- Sinisterra Gago J.V. Aplicación de las células enteras como biocatalizadores a la síntesis de productos farmacéuticos, **2012** y citas referidas en dicha publicación.
- Faber, K. Biotransformations in Organic Chemistry Springer-Verlag; Heidelberg, **2004**.