



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

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

Autor: Carlos Garrido Sánchez

D.N.I.:05953336Q

Tutor: Andrés R. Alcántara León

Convocatoria: Junio 2016

RESUMEN

Las estrategias utilizadas para sintetizar compuestos que sean farmacológicamente activos han ido cambiando con el paso de los años, buscando unas maneras más sostenibles de conseguir estos productos y con unos mayores rendimientos en las reacciones llevadas a cabo.

Por ello, la Biotecnología supuso un cambio y una revolución en la industria farmacéutica. Podemos definir la biotecnología como la aplicación de principios científicos y técnicos al procesamiento de materiales por agentes biológicos con el fin de suministrar bienes y servicios.

Este trabajo se encuentra enfocado hacia la biocatálisis aplicada, es decir, la transformación de una sustancia en otra utilizando enzimas con sustratos no naturales, aplicada a la síntesis de compuestos con actividad farmacológica, en este caso, con actividad antitumoral.

El cáncer, junto a las enfermedades cardiovasculares, es la principal causa de muerte en los países desarrollados. Esta situación es consecuencia de un aumento progresivo de la esperanza de vida, la disminución de la incidencia de las enfermedades infecciosas y las mejoras en el tratamiento de ellas, y por los estilos de vida poco saludables. Algunos de ellos son, por ejemplo, el tabaquismo y el alcoholismo, los cuales representan factores de riesgo para el desarrollo de distintos tipos de cáncer.(1)

Por ello, se ha investigado en el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas en su tratamiento, y se han buscado formas de poder sintetizar moléculas contra ellas de una manera más sostenible. En esto, la biotecnología supone una gran herramienta para los químicos y la industria farmacéutica, ya que produce menos residuos, reduce la energía de reacción y se utilizan menos disolventes orgánicos.

Por otro lado, un problema de gran importancia en la actualidad es el cambio climático y la destrucción de los ecosistemas que esto conlleva. La industria farmacéutica genera una gran cantidad de residuos en los procesos de elaboración de principios activos. En ello, el desarrollo de la biotecnología supone un gran avance por la menor generación de residuos, siendo posible así cumplir los requisitos de lo que se ha denominado como Química verde o Química Sostenible, y los doce postulados sobre los que se sostiene este término. (2)

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Como ya se ha mencionado , la biotecnología ha sufrido un gran desarrollo en los últimos años. Este área se puede clasificar en distintas áreas, que son:

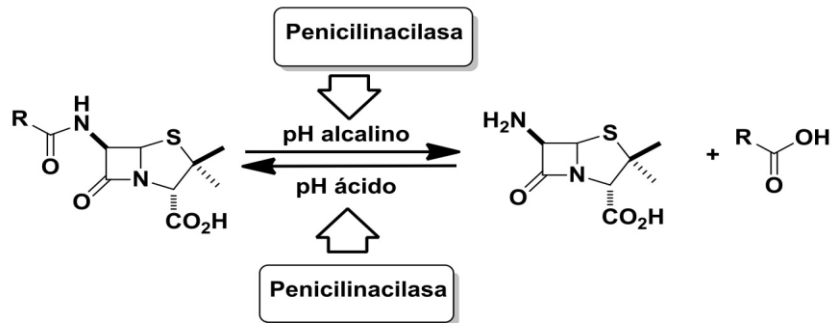
- 1- Biotecnología roja: se refiere a la aplicación de la biotecnología en áreas de salud humana y animal. En ella se incluyen tecnologías como el diagnóstico molecular o la terapia génica en el tratamiento de algunas enfermedades.
- 2- Biotecnología verde: aplicada a la agricultura y agroalimentación. Se incluye en este campo por ejemplo la investigación y obtención de plantas transgénicas.
- 3- Biotecnología gris: se centra en las aplicaciones ambientales de las biotransformaciones, como puede ser por ejemplo la bioremediación.
- 4- Biotecnología azul: se refiere a las aplicaciones de la biotecnología de origen marino. Se incluye la búsqueda de sustancias de interés médico que sean obtenidas a a partir de organismos marinos.
- 5- Biotecnología blanca: relacionada con la utilización de sistemas biológicos para la transformación, fabricación o degradación de moléculas, empleándose como alternativa a los procesos químicos convencionales.

Es en el ámbito de la biotecnología blanca es en el que se mueve el campo de la biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos, en el ámbito de este trabajo, con propiedades antitumorales. (3).

La biocatálisis aplicada es la utilización de enzimas o células enteras para conseguir la transformación de sustratos en productos que tengan interés médico. Por ello, se debe mencionar el concepto de promiscuidad catalítica, de la cual hay varios tipos:

- Promiscuidad de condiciones de reacción: se refiere a la posibilidad de que el enzima sea capaz de trabajar a distintas condiciones de reacciones, ya sea el solvente en el que trabaja, el pH...
- Promiscuidad de sustrato, referido a que un mismo enzima puede transformar distintos tipos de sustrato y actuar sobre ellos.
- Promiscuidad de catálisis, que se refiere a que un mismo enzima es capaz de llevar a cabo distintos tipos de reacción en función de las condiciones en las que se lleve a cabo. Por ejemplo, la penicilacilasa a pH alcalino es capaz de romper el enlace amida,

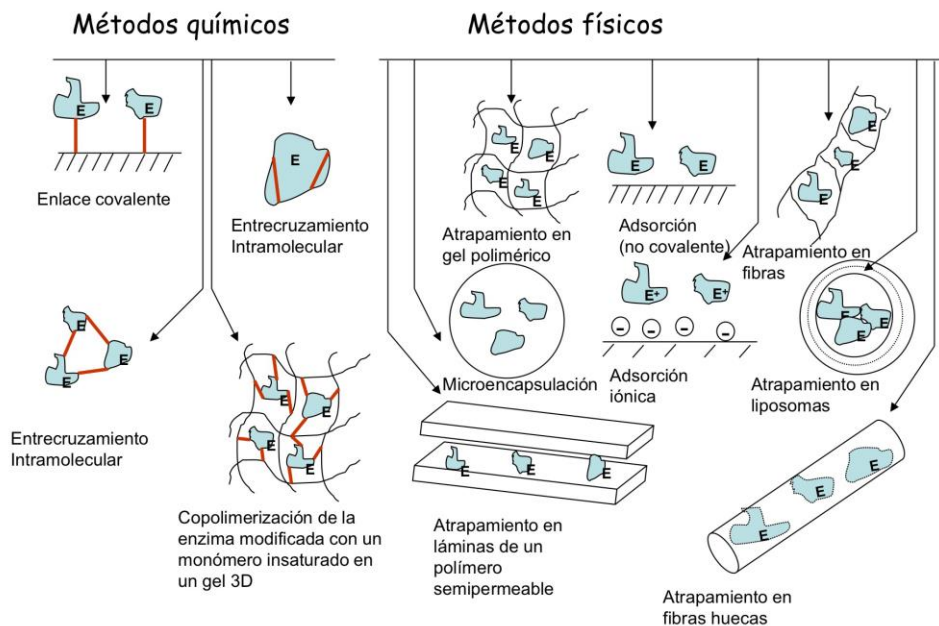
mientras que si lo ponemos a trabajar a pH ácido, lleva a cabo el paso contrario, es decir, la formación de ese enlace amídico.



Las enzimas utilizadas en biocatálisis pueden presentarse de varias maneras, ya sean como enzimas aisladas y puras, o usar células enteras que posean el enzima en concreto. Este último caso tiene la ventaja de que si el enzima en cuestión tiene la necesidad de la presencia de un cofactor para poder llevar a cabo su acción catalítica, se encuentra presente en la célula, y no es necesario adicionarlo, como sucedería en el caso de utilizar enzimas aisladas.

En la actualidad se encuentra en auge la búsqueda de nuevas enzimas naturales o la modificación de las ya existentes para llevar a cabo procesos necesarios para la síntesis, como por ejemplo, modificar la enantioselectividad del enzima, o para aumentar el rendimiento de la reacción buscada.

Así mismo, para mejorar el rendimiento de la reacción o poder facilitar el manejo de las enzimas en el proceso de síntesis, las enzimas se pueden utilizar inmovilizadas de distintas maneras.



Esta inmovilización puede ser física o química, siendo llevada a cabo por distintos procedimientos, como se muestra en el anterior esquema. (4)

Generalmente la inmovilización del enzima supone una serie de ventajas, como son el aumento de la estabilidad o el aumento de la productividad por la posibilidad de reutilización (ya que se facilita la recuperación del medio de reacción). Sin embargo, tiene una serie de inconvenientes, como es la disminución de la actividad enzimática o el aumento del coste del proceso en general. La inmovilización covalente es el método más estudiado y utilizado, tratándose de unir el enzima a un soporte mediante uniones covalentes, lo que supone una fuerte unión enzima-soporte. Estas uniones se llevan a cabo mediante la unión a través de los residuos aminoacídicos no esenciales, ya que si no se inutilizaría la actividad enzimática. Esto requiere un gran conocimiento de las estructuras primaria, secundaria y terciaria de la enzima.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es profundizar en el campo de la biocatálisis aplicada al campo de la síntesis de fármacos, concretamente de antitumorales.

La mayoría de los pacientes tratados con terapia anticáncer reciben tratamiento pre- y postoperatorio. Podemos hacer una clasificación de los compuestos antitumorales en función a su estructura química en dos grupos: aquellos que provienen de modificar los compuestos naturales, como el Paclitaxel, y las “moléculas pequeñas”. En el período entre 1981 y 2010 se han aprobado 128 nuevos fármacos en el tratamiento contra el cáncer y el 77% de ellos pertenecen a este último grupo. En cualquier caso, la biocatálisis puede ayudar a la preparación de antitumorales, tanto si se trata de modificar compuestos naturales o la síntesis total de moléculas pequeñas.(5)

Como se acaba de comentar, la industria farmacéutica se centra en los últimos tiempos en estas moléculas, porque su síntesis es más sencilla que la síntesis de productos naturales. En este caso, la biocatálisis es útil, sobre todo para conseguir la quiralidad necesaria para conseguir compuestos activos farmacológicamente, o compuestos que no sean dañinos para el organismo, como sucedió con el caso de la talidomida.

Una de las moléculas que se encuentra en Fase II de ensayos clínicos es el pelitrexol (AG2037), un inhibidor del enzima glicinamida ribonucleótido formil transferasa (GARFT). (6) Para sintetizarlo se ha usado la biocatálisis aplicada, y este será el tema de estudio de este trabajo, tanto su mecanismo de acción a nivel molecular como su síntesis, y el estudio del enzima

utilizado para ello, la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B), una de las lipasas más utilizadas en las biotransformaciones.

METODOLOGÍA

Este trabajo se basa en una búsqueda bibliográfica tanto en diversas bases de datos para la búsqueda de artículos científicos, como el uso de libros que traten el tema de la biotecnología aplicada a la industria farmacéutica y a la búsqueda de información en patentes sobre la síntesis.

Las bases de datos utilizadas son "PubMed" y "Web of Science", así como el buscador "SciFinder" que combina varias bases de datos que tratan sobre la química verde o sostenible. Se ha utilizado la base de datos "BRENDA" para el estudio del enzima CAL-B, así como diversos artículos científicos que tratan sobre su estructura y su actividad catalítica.

Se ha utilizado también el programa EndNote para la gestión de la bibliografía utilizada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

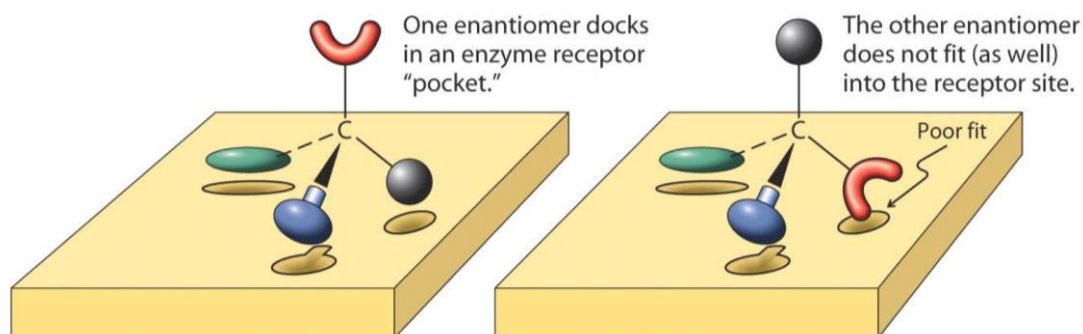
Como ya se ha comentado, el uso de la biocatálisis ha supuesto una herramienta muy útil para la síntesis de fármacos. Entre las ventajas del uso de biocatalizadores cabe destacar:

- Son catalizadores de reacción eficientes, actuando a temperaturas moderadas y a presión atmosférica.
- Presentan una elevada regio-, quimio- y enantioselectividad.
- Su actividad no queda restringida a un solo sustrato, sino que por norma general admiten un amplio intervalo de los mismos (relacionado con la promiscuidad de sustrato)
- Pueden catalizar diversas reacciones, salvando algunas dificultades y limitaciones que presenta la síntesis química convencional.
- Principalmente las hidrolasas presentan actividad catalítica en medios orgánicos. Esto posibilita la transformación de compuestos orgánicos.
- Al tener la posibilidad de ser inmovilizados, pueden ser reutilizados.
- Son altamente compatibles con los doce postulados de la química verde.
- Son biodegradables.
- Las enzimas pueden ser sobreexpresadas, lo que permite hacer los procesos biotecnológicos económicamente más eficientes.(4)

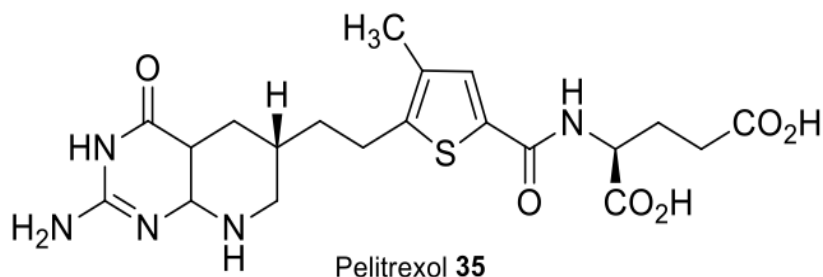
Uno de los aspectos más atractivos del uso de biocatalizadores es la enantioselectividad que presentan las enzimas. Esta se puede definir, de acuerdo con la IUPAC, como “la formación preferente de un estereoisómero con respecto al otro”. Se usa más comunmente en síntesis cuando un sustrato proquiral se transforma en una mezcla de enantiómeros en la cuál uno de ellos es mayoritario frente al otro. Esta enantioselectividad se puede medir con un parámetro denominado factor de enantioselectividad, E. Cuando este factor tiene un valor de 1-2, supone que tiene una enantioselectividad muy baja, y el proceso no es específico. El valor óptimo ronda en torno a 20-30, lo que supone que el rendimiento de la reacción es muy elevado.

Con respecto al rendimiento de la reacción enantioselectiva se debe hablar también de la resolución dinámica. Ésta se puede definir como la separación total o parcial de dos enantiómeros de una mezcla racémica. Esta resolución de enantiómeros se puede realizar utilizando enzimas, es decir, el subproducto que no nos interesa podría separarse del producto obtenido con la estereoisomería correcta y volver a ser sometido al tratamiento por el enzima.(7)

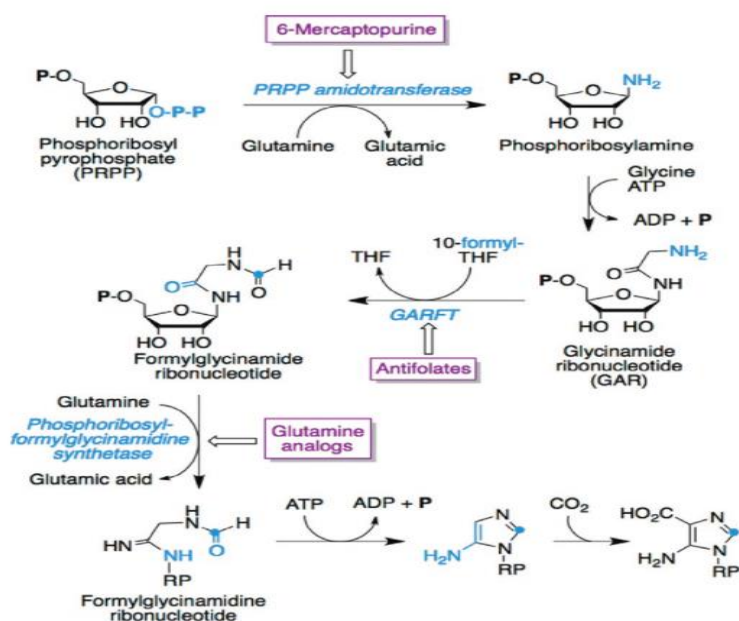
Esta enantioselectividad enzimática es muy importante, ya que químicamente es algo en muchas ocasiones difícil de conseguir, o consigue unos rendimientos menores a los que obtenemos mediante el uso de enzimas. La estereoselectividad es muy importante para los fármacos, ya que en el mejor de los casos llegamos a un enantiómero que no es activo farmacológicamente, o en el peor de los casos, es dañino.



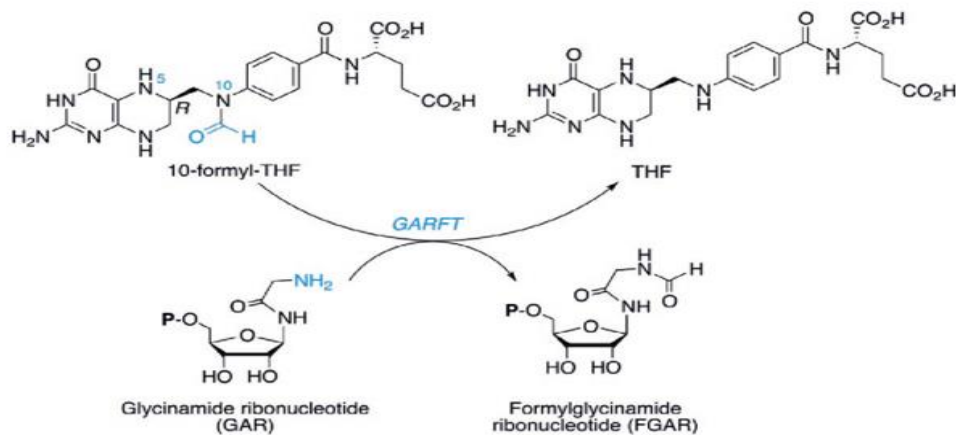
En la síntesis del Pelitrexol se ha utilizado el enzima CAL-B, una lipasa. El objeto de estudio sera la comparación entre la biosíntesis y la síntesis orgánica, y el estudio del enzima.



Pelitrexol se trata de un inhibidor del enzima glicinamida ribonucleótido formil transferasa(GARFT), enzima que participa en la síntesis de novo de purinas. (8)



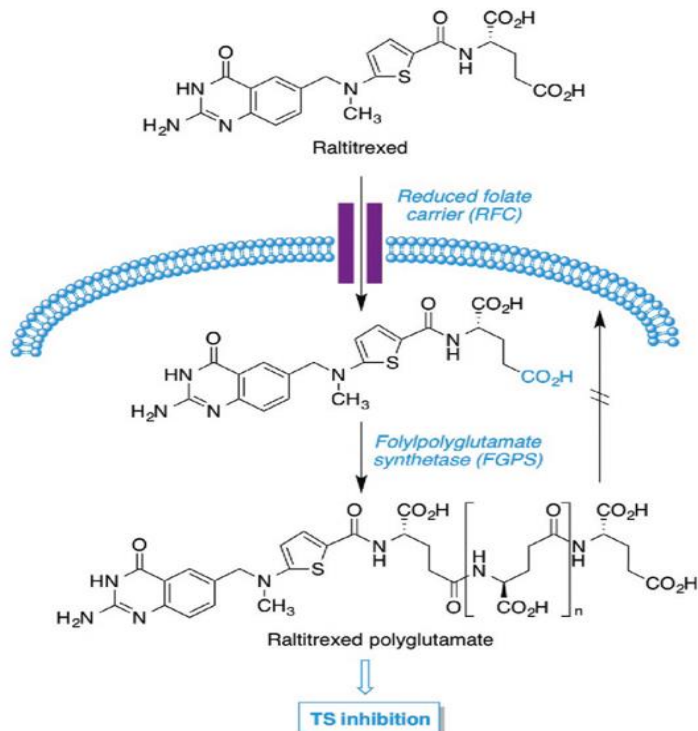
La tercera reacción en la biosíntesis de novo de purinas es la transformación de la glicinamida ribonucleótido (GAR) en el derivado formilado (FGAR) utilizando el 10-formiltetrahidrofolato como donador de formilo. Esta es la reacción que GARFT va a catalizar. En los mamíferos esta enzima es multifuncional y también cataliza el segundo y quinto paso de los pasos de esta vía metabólica.



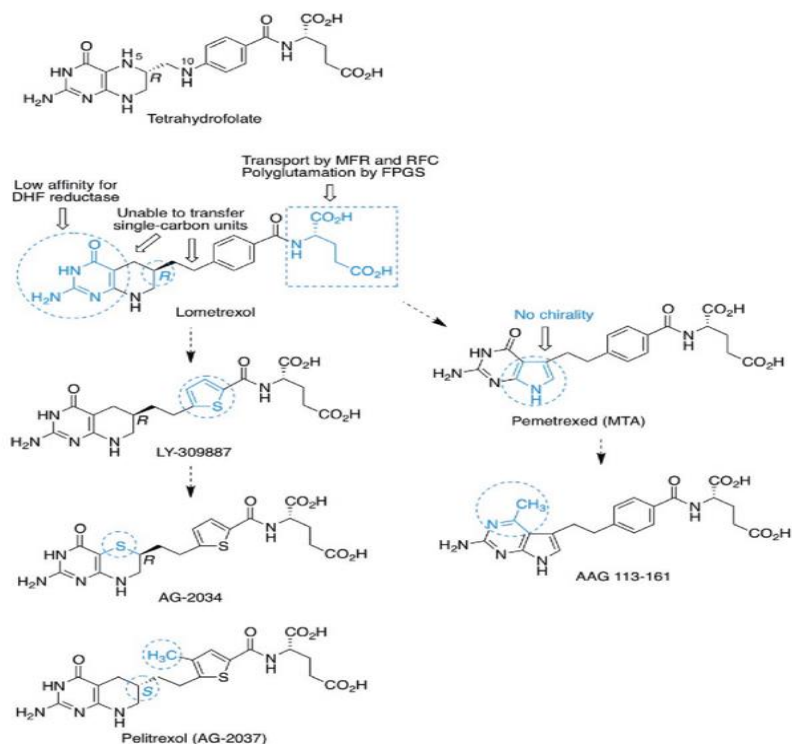
Los fármacos que van a inhibir a GARFT lo hacen de forma competitiva, es decir, son análogos al THF, pero no permiten llevar a cabo la reacción. Esto provoca una inhibición de la síntesis de purinas, y por lo tanto, una inhibición de la replicación celular, quedando el ciclo celular en fase S. Es aquí donde reside su actividad farmacológica.

Lo importante para sintetizar un fármaco es el conocimiento del enzima a inhibir, la reacción que va a catalizar, y la relación estructura- actividad del fármaco.

Lo primero que debe ocurrir para que el fármaco ejerza su actividad, es que acceda al interior de la célula. Esto se realiza mediante un transportador, una proteína denominada “reduced folate carrier” (RFC). En ese momento, el residuo terminal de glutamato es convertido por en el enzima folicopoliglutamato sintetasa (FGPS) en poliglutamato, el cuál es más potente como inhibidor enzimático y retenido en el interior celular, lo que conlleva a una duración de acción más prolongada. En el siguiente esquema se ve el proceso de transporte activo y poliglutamación del raltitrexed, un fármaco multidiana. En el caso del Pelitrexol el proceso de entrada en la célula funciona del mismo modo, por eso el residuo de glutamato es indispensable para su actividad.

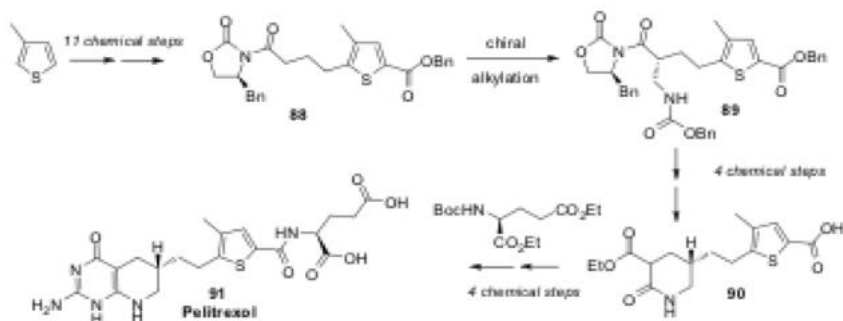


Los fármacos deben ser incapaces de participar en el proceso de transferencia de carbonos, como sucede en el caso del lometrexol, la primera molécula descubierta que fue lo suficientemente potente como para usarse en la clínica. A partir de esta, se fueron realizando modificaciones para ir mejorando sus propiedades. Todas ellas son análogas al THF, pero carecen de los nitrógenos en las posiciones 1 y 5, por lo que no consiguen realizar la transferencia de carbonos. Además, posee el núcleo de 2-aminopirimidina-4-ona, idéntico al encontrado en la molécula de THF. Sin embargo, en las posteriores investigaciones clínicas se observó que producía una toxicidad acumulativa, por lo que se empezaron a crear análogos. Todos ellos poseen dicho núcleo. En concreto, peltitrexol posee un tiofeno, bioisómero del bencilo que posee el THF en su cadena lateral, lo que le concede nueve veces más potencia como inhibidor de GARFT, y posee la configuración opuesta al resto, siendo el eutómero el isómero S, en el C-6. Asimismo, este compuesto es mejor tolerado que el resto y posee un interesante sinergismo con 5-fluorouracilo (5-FU). Se encuentra en fase II de estudios clínicos en pacientes con adenocarcinoma y cáncer de colon o recto cuando la combinación de fluorouracilo y leucovorina ha fracasado como tratamiento.

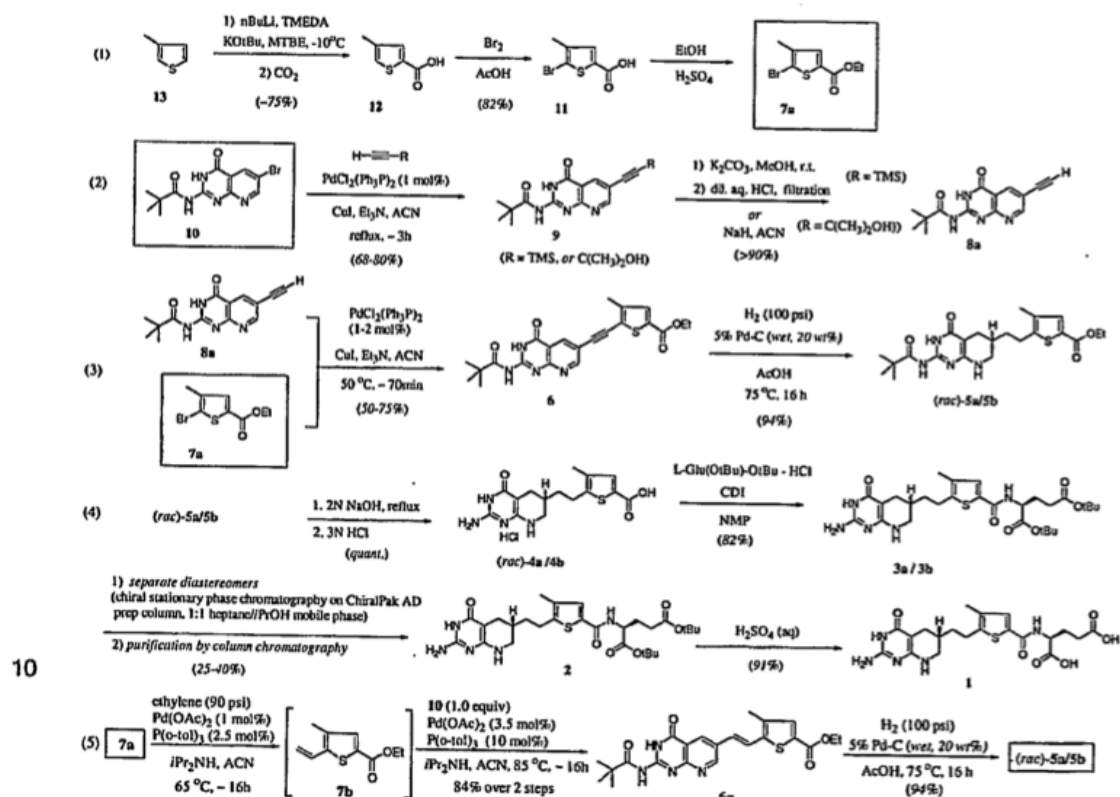


Una vez conocida la estructura del Pelitrexol y los grupos funcionales esenciales para su actividad, en este trabajo se tratará sobre la síntesis del compuesto. Primero se realizó una síntesis completamente química del fármaco. Sin embargo, se trata de una síntesis con muchos pasos, y difícil de conseguir, con unos rendimientos de reacción bastante bajos.

Esta síntesis completamente química requiere más de 20 transformaciones químicas, con unos rendimientos de aproximadamente el 2%. Se incluye el paso de la alquilación quiral de Evans, utilizando 4-bencil-2-oxazolidiona, seguida de 11 pasos para aumentar la longitud de la cadena lateral hasta lo deseado y óptimo, una alquilación quiral de nuevo para introducir un aminometileno, una ciclación intramolecular y finalmente, la construcción de la dihidropirimidina, utilizando posteriormente una guanidina para proveer al final de la molécula la unión de un éster de ácido glutámico, seguido finalmente de una desprotección global de todos los nitrógenos que existen en la molécula. Esto es lo que aparece descrito en el siguiente esquema de reacción. Como se puede comprobar, no es algo que cumpla los requisitos de la Química Sostenible.(9)



Posteriormente se realizó un rediseño de la síntesis, y mediante un análisis retrosintético se llegó a una nueva síntesis en la que, partiendo de dos sintones a los que se llegaba mediante una síntesis química, se combinaba la reacción de acoplamiento de Sonogashira, seguido de unos pasos químicos, y finalmente se llegaba a una mezcla racémica, separándose los diastéromeros formados mediante cromatografía. Esto es lo que se muestra en el siguiente esquema sintético.



Como se puede comprobar, se trata de una síntesis en la que se utilizan muchos tipos distintos de disolventes para llevar a cabo las reacciones, además del uso de metales como catalizadores en algunas reacciones. Todo ello son productos de desecho de las reacciones que no cumplen con los doce postulados de la química sostenible, como sucedía con la síntesis original, aunque en este caso el rendimiento de reacción es mayor. Sin embargo, esta síntesis también sufre de ciertos inconvenientes. Uno de ellos, es que al llegar al compuesto 3a/3b, se trata de la mezcla de diasterómeros que serán separados por la columna cromatográfica. Se trata de los diasterómeros (R,S) y el (S,S). El primero de ellos no puede ser reciclado, con lo que se debe deshechar, lo que supone que como máximo se puede obtener un 50% de rendimiento en la reacción. El otro inconveniente tiene que ver con la separación de los diasterómeros. Ambos tienen una baja solubilidad en los disolventes orgánicos de la columna, lo que nos lleva a tener que emplear muchos tipos distintos de ellos, lo que supone el uso de cientos de litros de estos disolventes por kilogramo de material, lo que además nos lleva a un rendimiento de aproximadamente un 25%.

Por todo ello, este protocolo de síntesis incumple los 12 postulados ya nombrados, lo que llevó a idear la síntesis quimioenzimática del pelitrexol.

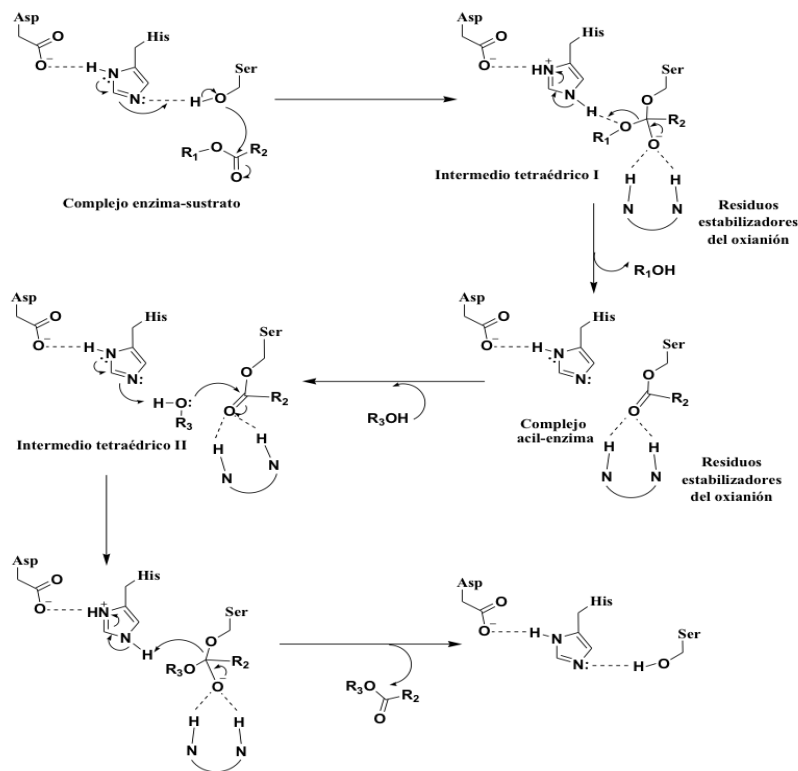
SÍNTESIS DEL PELITREXOL USANDO LA BIOCATÁLISIS APLICADA.

Actualmente para sintetizar nuestro principio activo se usa lo que se conoce como biocatálisis aplicada, es decir, el uso de enzimas para llevar a cabo las reacciones químicas, con las ventajas e inconvenientes que eso conlleva como ya se ha mencionado en este trabajo.

Para realizarlo, se ha utilizado el enzima CAL-B, la cual se trata de la lipasa de *Candida antarctica*.

Esta lipasa pertenece al grupo de las hidrolasas. Éstas son enzimas que catalizan la ruptura de enlaces, clasificándose en función del enlace que hidrolizan. Son un extenso grupo que presentan tres características que las hacen idóneas para el químico orgánico: presentan una amplia especificidad de sustratos, tienen una alta estereoselectividad y por último, son capaces de catalizar más tipos de reacciones además de la hidrólisis, como condensaciones o alcoholisis. Además, muchas de ellas están disponibles comercialmente, como es el caso de CAL-B, toleran la adición de disolventes miscibles con el agua, como son el DMSO o DMF (lo que en nuestro caso las hace idóneas para la síntesis), además de ser activas en un gran número de disolventes orgánicos más hidrofóbicos. (4)

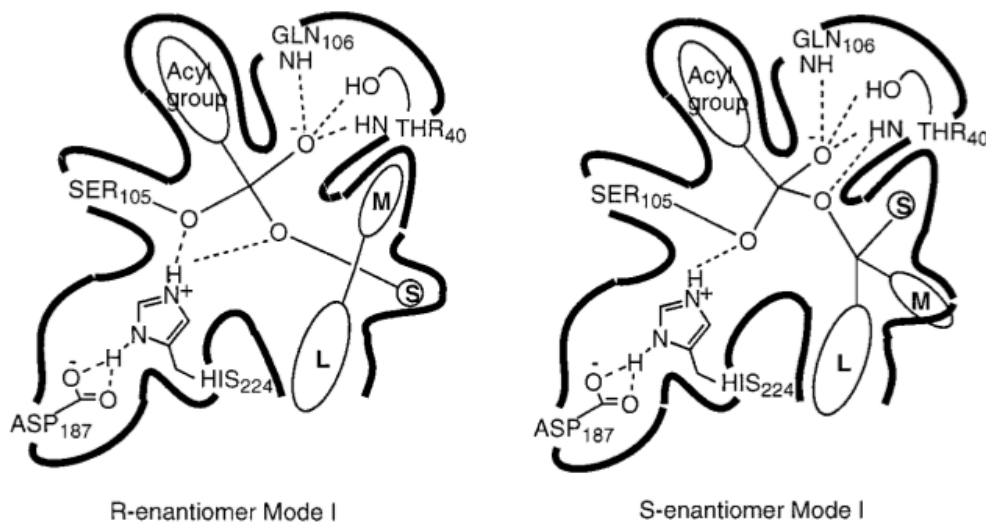
En nuestro caso en particular nos centraremos en las lipasas. Estas catalizan de forma natural la hidrólisis de ésteres formados a partir de glicerol y ácidos grasos de cadena larga. Como ya se ha comentado, aceptan un gran número de sustratos, lo que las convierte en una herramienta muy versátil para llevar a cabo distintos protocolos sintéticos. Normalmente se emplean para procesos de resolución cinética de alcoholes secundarios mediante la hidrólisis de sus correspondientes ésteres. En el mecanismo catalítico de las lipasas están implicados los aminoácidos que conforman la triada catalítica, como se resume en el siguiente esquema.



Con respecto a la estructura de esta lipasa, al igual que el resto de su grupo, posee el sitio catalítico ya mencionado con la triada clásica, un bolsillo oxianiónico que estabiliza el intermedio de transición, y un bolsillo estereoespecífico en el que se acomodan el resto de sustituyentes del sustrato y que va a ser el que determine el isómero mayoritario formado, como se explica más adelante. (4)

Además, las lipasas poseen dos conformaciones, una abierta y una cerrada. El paso de una a otra viene determinada por una alfa-helice, denominada “lid”, que oculta el sitio activo del medio. Cuando lid es desplazado, se expone el sitio catalítico al medio y el sustrato puede acceder a él, produciéndose la catálisis.

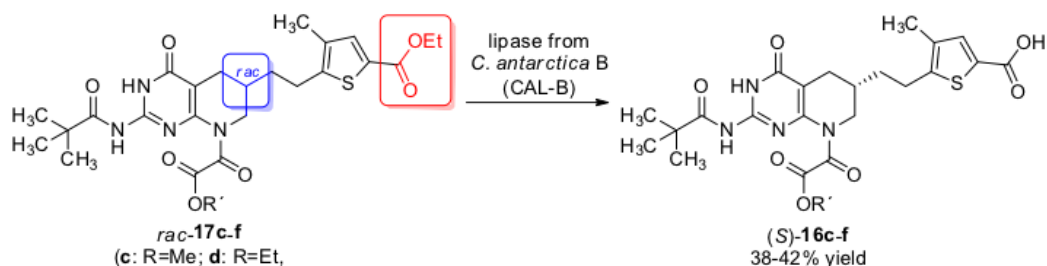
Este enzima, en su forma silvestre, normalmente proporciona el enantiómero R. Sin embargo, en este caso el eutómero es el isómero S. A pesar de ello, se recurre al uso de CAL-B porque existe una variante que se obtuvo por modelado molecular para la obtención del isómero S. Este modelado molecular consiste en la modificación mediante técnicas de ingeniería genética de la secuencia aminoacídica de la lipasa para conseguir modificarla. Se puede tener como objetivo la modificación de la estabilidad ante la temperatura o el pH, o en este caso, cambiar a enantioselectividad enzimática. Para ello lo primero que se debe conocer es la estructura terciaria y el funcionamiento del enzima. CAL-B posee 317 residuos de aminoácido. Mediante la combinación de la cinética enzimática y del modelado molecular, se descubrió que la formación de uno y otro isómero depende de de la unión que realice con el enzima y de la orientación que adopte en el sitio activo del enzima. Esto es lo que se resume en el siguiente esquema, en el que se visualiza la unión de algun sustrato, donde S es la cadena mas corta en la molécula, M la mediana y L la más larga, en la formación del intermedio tetraédrico. En función de la colocación que pueda adoptar y de las uniones que realice, se formara uno u otro isómero.



Posteriormente , mediante técnicas de modelado molecular y utilizando un diseño racional, se crea la lipasa S selectiva de CAL-B, cuya enantioselectividad aumenta al aumentar la temperatura. Esto sucede al cambiar el trifano 104 por una alanina en el llamado “bolsillo estereoespecífico” del enzima (esquematisado en el esquema anterior junto al sitio catalítico)

Este enzima se presenta en diferentes preparados comerciales que difieren en el soporte sobre el que se incorpora la enzima.(10)

La actuación de CAL-B en la síntesis de Pelitrexol se produce en el momento en que tenemos la mezcla de diasterómeros y, a diferencia de lo que se realiza en la síntesis química, no se hace una separación cromatográfica, si no que se hace una resolución de los diasterómeros de forma enzimática. Tiene la ventaja de que el subproducto (R,S) que antes debíamos deshechar, en este caso podemos transformarlo en el isómero que nosotros queremos, con lo que aumenta el rendimiento de la reacción y tenemos menos productos de deshecho.

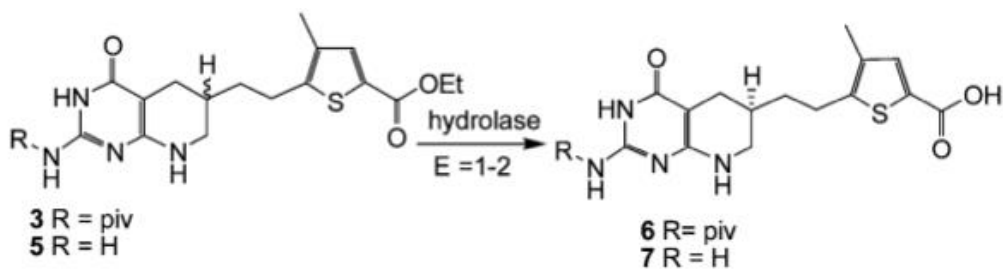


Como se puede apreciar en este caso, el centro estereogénico no se encuentra en una posición cercana al punto de actuación del enzima, si no que se encuentra a 7 enlaces de distancia en el que existe además un anillo aromático en dichos enlaces. Esto es lo que se conoce como una resolución enzimática con un estereocentro remoto.

Un estereocentro remoto se define como un grupo separado por una cadena de no menos de tres átomos o un grupo aromático del grupo que va a sufrir la transformación enzimática. Esto es lo que se produce en este caso, ya que la lipasa va a actuar sobre el éster terminal de la molécula y el centro estereogénico se va a producir en el C-6 de la molécula.

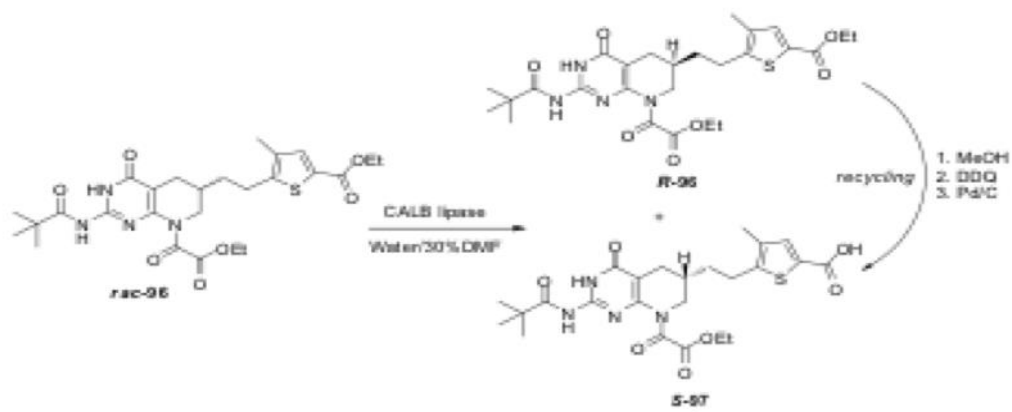
Esta es una de las grandes ventajas que tiene la biocatálisis aplicada, la posibilidad de resolución de estereocentros remotos, cosa que con la síntesis química convencional es más difícil de lograr y conlleva muchos más pasos. (11)

Como ya se ha dicho, partimos del rac3a/3b para la síntesis del pelitrexol y realizamos una resolución enzimática, como se indica en el siguiente esquema sintético:



Esta es la primera reacción que se llevó a cabo. Se obtenía una actividad de más del 85% tras cinco horas de transformación. Desafortunadamente, mostraba una enantioselectividad bastante baja (con un coeficiente enantioselectivo $E=1-2$). Para mejorarlo, se produce la adición de cosolventes y se llega a un valor de $E=10$. (12)

Sin embargo, basándose en otros estudios en los que se utilizaba la enzima CAL-B(13) para la ruptura de derivados de ester oxalámicos, se esterifica la molécula con ácido oxalámico, para utilizar la enzima e hidrolizar este éster para obtener mejores valores de E . Esto además tiene la ventaja de que la presencia del éster oxalámico aumenta mucho la solubilidad en los disolventes orgánicos utilizados (DMF). (12)

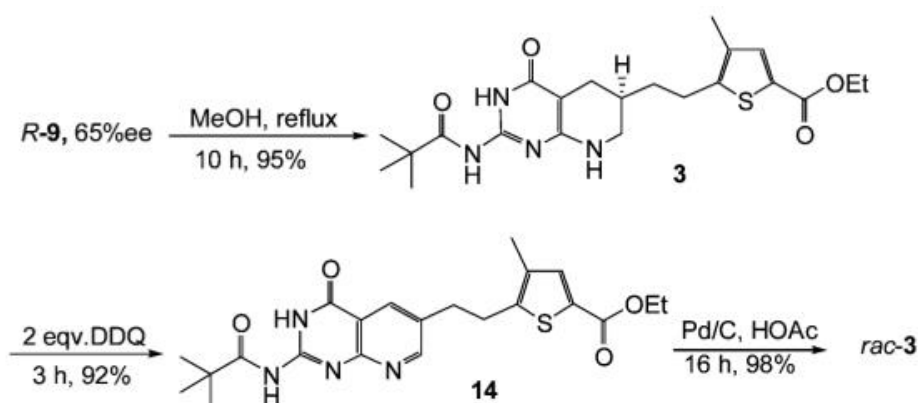


Sin embargo, sorprendentemente la ruptura del éster oxalámico no se producía, si no que CAL-B y otra serie de enzimas más que se utilizaron, hidrolizaban el éster etílico terminal y no el oxalámico recientemente creado, y además aumentaba el valor de E a valores de 20-59. Asimismo el ácido en configuración S formado precipita espontáneamente en el medio, lo que facilita su separación del medio de reacción que contiene el producto R no deseado, que posteriormente será racemizado para poder ser convertido en el isómero S . (12)

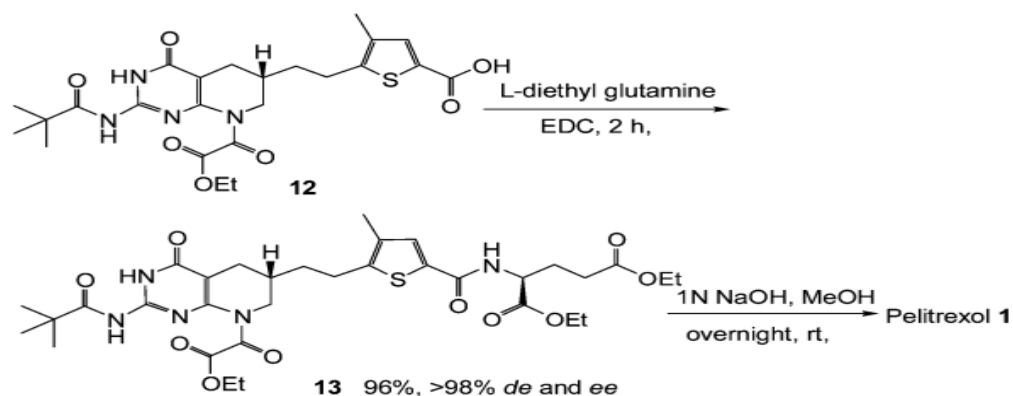
Para mejorar más aún el rendimiento de la reacción se lleva a cabo la manipulación de las condiciones de reacción en función de las características del enzima. Este es uno de los métodos para mejorar el rendimiento enzimático muy usado en el campo de la biotecnología.

Experimentalmente se demostró que el pH óptimo para la reacción está entre 4-5. Valores de pH menores de tres se disminuye radicalmente la actividad enzimática y valores mayores de 5 hasta 8 promueve la ruptura del éster N-oxalámico, por lo que nos encontraríamos con el problema anterior, ya que el valor de E bajaría de nuevo a valores de 1-2. (12)

Como se observa en el esquema anterior, la reacción se lleva a cabo en agua con un 30% de DMF, el cual no es un disolvente “verde”, pero que incrementa la solubilidad de los sustratos en el medio de reacción, lo cual es crucial. Como última ventaja de este proceso es la posibilidad de la racemización del producto indeseado (el isómero R). Esto se produce mediante un reflujo en metanol, seguido de una reoxidación con DDQ, formando un doble enlace que posteriormente será reducido mediante una hidrogenación con paladio. (12)



Una vez hidrolizado el éster terminal, tenemos el producto inmediatamente anterior a nuestro principio activo. Es necesario adicionar la cadena de glutámico en el extremo, grupo que es esencial para el funcionamiento del fármaco. Esto se consigue adicionando dimetilglutamina. Una vez introducida la cadena, se realiza una N-desprotección de todos los nitrógenos a la vez, es decir, se realiza una triple desprotección en “one-pot” utilizando como grupo desprotector NaOH en metanol. Como resultado obtenemos el principio activo, Pelitrexol. (12)



CONCLUSIONES

Actualmente aparece la gran necesidad para la industria farmacéutica de sintetizar compuestos con actividad antitumoral. Esto conlleva a la búsqueda de nuevos procedimientos para mejorar los rendimientos de síntesis, disminuir la producción de residuos y del uso de disolventes orgánicos complicados posteriormente de eliminar... Esto conlleva una serie de ventajas, como son ventajas económicas, ya que los rendimientos aumentan y además no es necesario emplear tantos medios en la eliminación de residuos, y como ventajas con el medio ambiente, ya que se verá menos afectado y esto permitirá un mayor avance en la industria.

Además, también se ve la necesidad de obtener productos que sean enantioméricamente puros, ya que la isomería de los productos determinará la actividad farmacológica del principio activo, así como modificar su potencia por ejemplo.

Por todo ello, la industria farmacéutica ha buscado soluciones para llevar a cabo algunas síntesis en la biocatálisis aplicada. Esta presenta la ventaja de unos mayores rendimientos, una menor producción de productos, y la obtención de productos enantioméricamente puros, o al menos con una mayor pureza que lo que se consigue con la síntesis química. En este trabajo se ha explicado la síntesis del pelitrexol, y el enzima utilizado, CAL-B. En comparación con la síntesis química, la síntesis quimioenzimática presenta las ventajas recientemente nombradas, ya que esta lipasa trabaja a temperaturas moderadas, sin necesidad del uso de cofactores, y a pH moderado (entre el rango de 5-8). Asimismo, permite lo que se conoce como la resolución enantioselectiva con un estereocentro remoto, lo cual es difícil de conseguir por medio de síntesis convencional. En resumen, la biotecnología aplicada tiene unas grandes ventajas con respecto a la química y por ello se encuentra en auge en la actualidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global Cancer Statistics. *CA-Cancer J. Clin.* 2011, 61, 69-90.
2. Li, C-J.; Anastas, P.T. Green chemistry: present and future. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41.
3. Sánchez Montero, J.M. Biotecnología blanca e industria farmacéutica. *Anales Real Academia Nacional de Farmacia*, 2007, 73 : 501-535.
4. Hernáiz, M. J. (2012). Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos (I) enzimas hidrolíticas. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*
5. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 2012, 75, 311-335.
6. Robert, F.; Garrett, C.; Dinwoodie, W. R.; Sullivan, D. M.; Bishop, M.; Amantea, M.; Zhang, M.; Reich, S. D. Results of 2 phase I studies of intravenous (iv) pelitrexol (AG2037), a glycinamide ribonucleotide formyltransferase (GARFT) inhibitor, in patients (pts) with solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 2004, 22, 213S-213S.
7. Fessner W., Anthonsen T. *Modern biocatalysis: stereoselective and environmentally friendly reaction*, Wiley-Vch: 2009.
8. Avendaño, C.; Menéndez, J. C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, Elsevier: 2008.
9. Doval Santos, E. Z.; Flahive, E. J.; Halden, B. J.; Mitchell, M. B.; Notz, W. R. L.; Tian, Q.; O'neil-sla Wecki, S. A. Convergent synthesis of a garft inhibitor containing a methyl substitute thiophene core and a tetrahydropyrido[2,3-d]pyrimidine ring system and intermediates therefor. *WO/2004/113337*, December 29, 2004.
10. Magnusson, A. O.; Takwa, M.; Hamberg, A.; Hult, K. An S-selective lipase was created by rational redesign and the enantioselectivity increased with temperature, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 4582- 4585.
11. Cunha A., Ferreira E., Oliveira C., Omori A. Biocatalysis for desymmetrization od stereocenters beyond the reactive center: how far is enough? . *Biotechnology Advances* 33 (2015) 614-623.
12. Hu, S. H.; Kelly, S.; Lee, S.; Tao, J.; Flahive, E. Efficient chemoenzymatic synthesis of pelitrexol via enzymic differentiation of a remote stereocenter. *Org. Lett.* 2006, 8, 1653-1655.
13. Hu, S. H.; Tat, D.; Martinez, C. A.; Yazbeck, D. R.; Tao, J. H. An efficient and practical chemoenzymatic preparation of optically active secondary Amines. *Org. Lett.* 2005, 7, 4329-4331.

