FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

BIOTRANSFORMACIONES PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA.

Autor: Luis Miguel Vázquez Costal

D.N.I.: 77464289J

Tutor: Andrés R. Alcántara León

Convocatoria: Junio

Resumen

El cáncer, junto a las enfermedades cardiovasculares, es la principal causa de muerte en los países desarrollados y un problema de salud cada vez más frecuente en los países en vías de desarrollo. Esta situación es consecuencia del aumento progresivo de la esperanza de vida, la disminución de la incidencia de enfermedades infecciosas y la asimilación de hábitos de vida poco saludable.

Por otro lado, el cambio climático y la destrucción de los ecosistemas son un problema mundial relacionado con las actividades laborales del ser humano. Por ello y con el fin de disminuir el impacto medioambiental producido por las industrias químicas surgió el término de "Química verde" y sus 12 principios.

Así 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.

Por ello este trabajo busca proponer alternativas biocatalíticas para la síntesis de compuestos derivados de la *L*-tirosina los cuales son punto de partida de la síntesis de diversos compuestos con actividad antitumoral.

Para ello se analizan diversos trabajos publicados con el fin de sintetizar derivados de la tirosina mediante biotransformaciones y se proponen alternativas para optimizarlos.

En primer lugar se analiza el empleo de la Tirosina Fenol-Liasa de *Citrobacter freundii*, la cual debido a su promiscuidad catalítica puede ser empleada para sintetizar derivados de *L*-tirosina cuando en la naturaleza se media su hidrólisis.

Posteriormente se procede estudiar una resolución cinético-dinámica de derivados de *L*-tirosina empleando la VHb-DAAO, la cual es una oxidasa selectiva de *D*-aminoácidos conjugada con una hemoglobina bacteriana que aumenta su estabilidad, y una transaminasa de aminoácidos aromáticos con la finalidad de obtener derivados de la *L*-tirosina con un exceso enantiomérico elevado.

Otro proceso biocatalítico que se propone es recurrir a la Tirosina Amonio-Liasa de *Rhodotorula glutinis*, la cual a pesar de tener un mecanismo de acción muy diferente a la Tirosina Fenol-Liasa, también posee promiscuidad de acción, situación que podemos

aprovechar para sintetizar derivados de *L*-tirosina partiendo de derivados del ácido para-cumarico.

Finalmente se propone el estudio de la Fenilalanina hidroxilasa para diseñar biotransformaciones que tengan como objetivo transformar derivados de la fenilalanina (más fáciles de obtener) en derivados de la *L*-tirosina y se hace una lista de otros candidatos aptos para llevar a cabo biotransformaciones con este objetivo, entre los que se destaca la Catecol O-metiltransferasa SafC, con la finalidad de estimular el interés por la aplicación de este campo en las síntesis farmacéuticas.

Introducción y antecedentes

El término "Química Verde" (del inglés "Green Chemistry", más comúnmente denominado en Europa como Química Sostenible) fue propuesto por Warner y Anastas [1] 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 [2] propuestos por ambos autores anteriormente mencionados.

En efecto, así la llamada Biotecnología Blanca propone el empleo de organismos y/o enzimas que realicen estos procesos industriales de manera más sostenible, fundamentalmente empleando para ello las Biotransformaciones, procesos por los cuales sustratos no naturales son transformados por enzimas libres o enzimas intracelulares, produciendo sustancias de interés.

Este concepto de promiscuidad de las enzimas las hace una herramienta muy versátil para la industria; así las enzimas pueden presentar *promiscuidad catalítica* si catalizan procesos distintos de su reacción natural, *promiscuidad de sustrato* si emplean sustratos distintos de su sustrato natural, *promiscuidad de sitio activo* si son capaces de actuar por un lugar distinto al sitio activo natural y/o *promiscuidad de condiciones de reacción* si es posible su catálisis en condiciones distintas a sus condiciones normales.

Por lo consiguiente, la Biocatálisis nos permite optimizar procesos industriales debido a que la gran precisión (*quimio,regio y estereoselectividad*) de los biocatalizadores reduce la producción de residuos, disminuye la necesidad de emplear costosos procesos de protección y desprotección y mejora la eficiencia energética del proceso al trabajar en condiciones de reacción muy suaves. De hecho, estos biocatalizadores pueden hacerse aún más precisos y

robustos mediante los protocolos de *evolución dirigida*, que se iniciaron con los trabajos pioneros de Pim Stemmer y Frances Arnold [3], y que hacen que hoy día nos encontremos inmersos en lo que se conoce como la *tercera ola* de la Biocatálisis. Estas técnicas nos abren un gran abanico de posibilidades para desarrollar nuevos biocatalizadores a través de la evolución de enzimas *wild-type* para obtener nuevas y/o mejoradas propiedades de interés industrial.

Por otro lado, con el progresivo aumento de la esperanza de vida de la población en las últimas décadas ha aumentado la incidencia de enfermedades crónicas como el cáncer. En el año 2010 existían 206 moléculas con actividad antitumoral aprobadas por la FDA [4] y en el período de tiempo entre enero de 2011 y marzo de 2015 se han aprobado 58 nuevos compuestos con actividad anticancerígena por la misma agencia.

Así, la búsqueda de compuestos con actividad antitumoral ha cobrado gran importancia en las últimas décadas y la tendencia actual se basa en la síntesis de pequeñas moléculas o en la búsqueda de nuevos productos naturales con actividad antineoplásica.

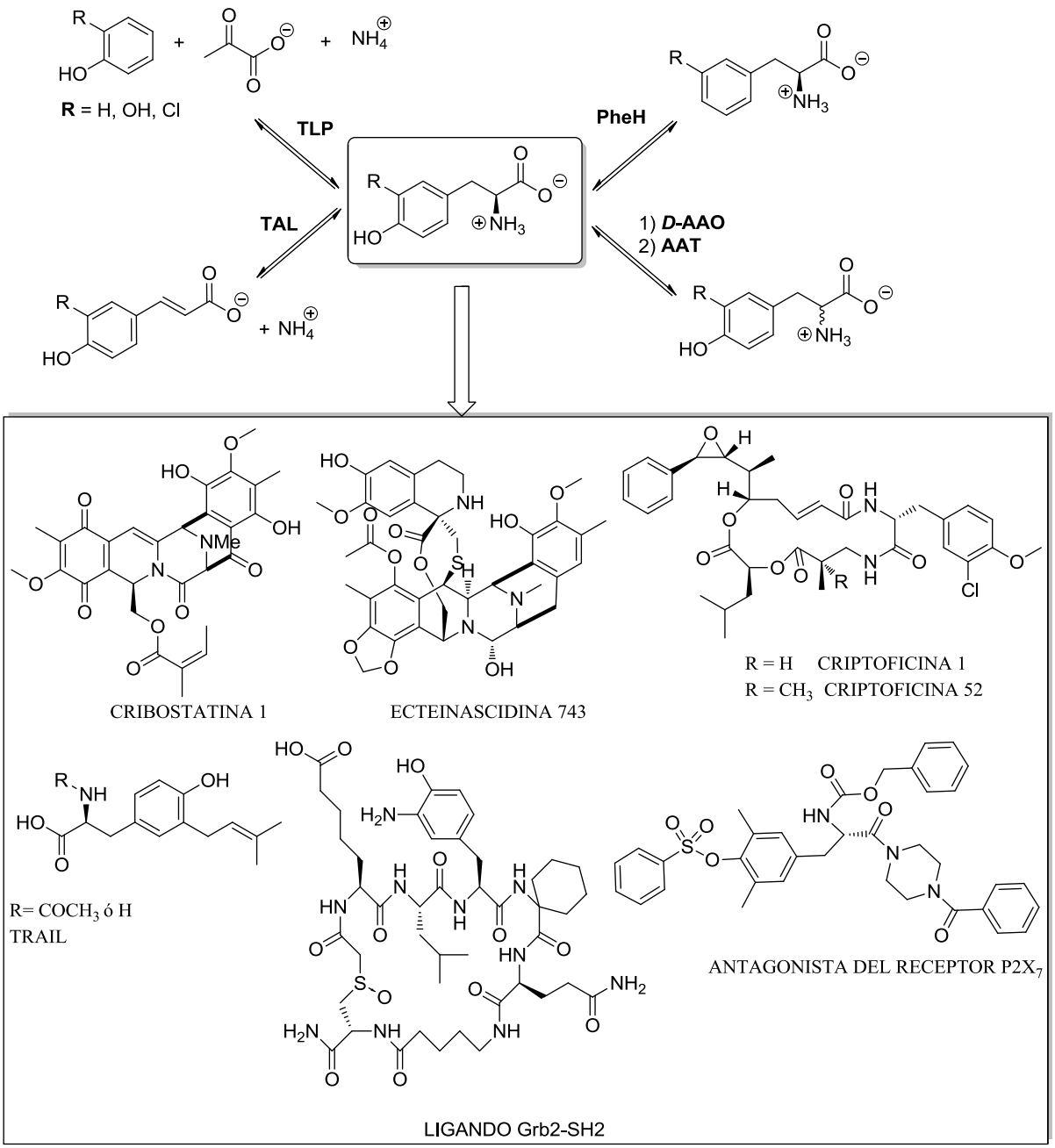
En este sentido, la Biocatálisis es una gran herramienta para la síntesis asimétrica de estas moléculas ya que generalmente solo uno de los isómeros tiene actividad antitumoral o sirve como producto intermedio para la síntesis de estos compuestos.

Objetivos

El objetivo de este trabajo es buscar alternativas basadas en procesos biocatalíticos para sintetizar compuestos derivados de la *L*-tirosina, que son compuestos intermedios clave en la síntesis de diversos agentes cancerígenos:

1. Algunos de estos derivados tienen actividad antitumoral por sí mismos, tales como la 3,5-dimetil-*L*-tirosina o la 3-metil-*L*-tirosina, que tienen actividad anticancerígena en carcinoma y linfoma pero no en sarcoma [5].
2. Además, la síntesis de una gran variedad de compuestos anticancerígenos precisa de otros derivados de tirosina, tales como la 3-cloro-*L*-tirosina, esencial para la síntesis de las Criptoficinas 1 y 52 [6], fármacos que interrumpen la mitosis al impedir la polimerización de los microtúbulos, mecanismo similar al de los alcaloides de la *Vinca*.
3. Por otra parte, las Safracinas son importantes agentes antitumorales y antibióticos, entre los que destaca la Ecteinascidina-743 (Yondelis®), cuya síntesis parte de la 3-hidroxi-*O*,5-dimetil-L-tirosina [7].

4. Finalmente, otros derivados de la *L*-tirosina son el punto de partida para la síntesis de pentapeptidos no fosforilados que interaccionan con el dominio SH2 de la proteína Gbr2 [8], de antagonistas del receptor $P2X_7$ [9], de la Cribostatina 4 [10] y de diversos ligandos inductores de la apoptosis relacionados con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) [11].



Esquema 1. Esquema general de los objetivos del trabajo, en el que se presentan los principales procesos estudiados y los principales fármacos cuya síntesis parte de los derivados de la *L*-tirosina.

Metodología

En esta revisión bibliográfica se presentan algunos ejemplos representativos de procesos biocatalíticos descritos en la bibliografía que pueden ser adaptados y/o optimizados para sintetizar compuestos derivados de la *L*-tirosina de forma más sostenible y eficiente en comparación con los procedimientos empleados actualmente.

Para la elaboración de este trabajo se procedió a recopilar información sobre procesos biocatalíticos descritos tanto en revistas científicas como en patentes registradas.

Esta información se puede consultar a través de diversas bases de datos que se encuentran en internet. Durante la preparación y redacción de este trabajo las principales bases de datos consultadas fueron "Web of Science", "Pubmed" y la plataforma "Scifinder", la cual coordina información de varias bases de datos relacionadas con el campo de la química y donde también se pueden consultar las patentes registradas.

Además de estas bases de datos se han empleado diversos programas informáticos. Se empleó el programa ChemBioDraw® con el fin de dibujar todas las moléculas que aparecen en el trabajo y se empleó Endnote X7® para organizar todas las citas y referencias bibliografías del trabajo.

Para el estudio de las enzimas se empleó principalmente la Base de Datos "BRENDA" y la herramienta BLAST, con el fin de buscar isoenzimas o mutantes que pudieran servir como alternativa a las empleadas en los procesos biocatalíticos. Asimismo, estos programas proporcionaron la información necesaria sobre la arquitectura del centro activo de las enzimas y sobre su entorno para poder proponer posibles mutaciones dirigidas con la finalidad de mejorar los procesos biocatalíticos.

Resultados y discusión

La búsqueda de nuevas enzimas nos ha permitido desarrollar procesos biocatalíticos adecuados para la obtención de compuestos derivados de la *L*-tirosina con un exceso enantiomérico elevado. Esta búsqueda nos ha aportado un elevado número de candidatos aptos para catalizar estas reacciones, algunas de ellas empleando las variedades "silvestres" de las enzimas y otras recurren a modificar las enzimas mediante mutación dirigida para adecuar los procedimientos a los objetivos establecidos para el proceso biocatalítico.

1. Tirosina Fenol-Liasa (TPL, EC 4.1.99.2)

La Tirosina Fenol-Liasa, (TPL) es una enzima dependiente de fosfato de piridoxal que en la naturaleza cataliza la degradación de la tirosina a fenol, piruvato y amonio [12]. Este proceso de β-eliminación es reversible; por ello, es factible emplear esta enzima para sintetizar derivados de la tirosina y la fenilalanina mediante procesos biocatalíticos. En este sentido, se han descrito diferentes usos de TPLs de diferentes procedencias (fundamentalmente del género *Citrobacter*) con el fin de optimizar el proceso de síntesis asimétrica de compuestos derivados de la *L*-tirosina, como se identifica en la Figura 1.

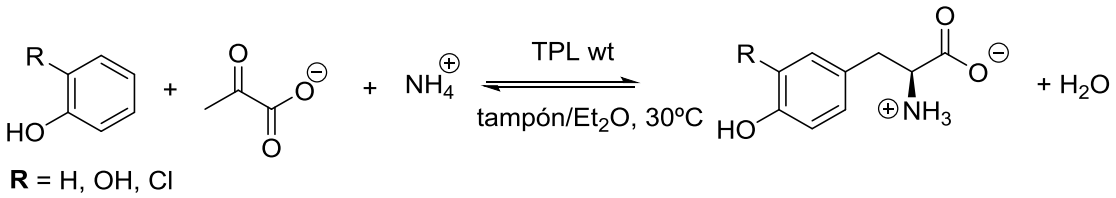


Figura 1. Síntesis biocatalítica de los derivados de la *L*-Tirosina catalizada por la Tirosina Fenol-Liasa (TPL).

Uno de los métodos biocatalíticos más desarrollados para la obtención de derivados de la *L*-tirosina utilizando TPLs fue propuesto en el trabajo de Seisser y cols. [13]. En este trabajo se emplea la TPL de *Citrobacter freundii* debido a que se conoce más sobre su estructura y su mecanismo de acción que de sus homologas pertenecientes a otras especies del género *Citrobacter*. Estos autores estudiaron los principales parámetros que influyen en la reacción catalizada por la variedad silvestre de la TPL y modificaron estos parámetros con el fin de optimizar el protocolo de síntesis, así, en primer lugar se determinó la actividad enzimática de la TLP en medios con distintos valores de pH y se determinó que el pH óptimo de la enzima se encontraba entre los valores de pH 8-9, por ello a partir de este punto todas las experiencias se realizaron en medio con tampón fosfato a pH 8.

No obstante, el principal problema que plantea este método de síntesis es que los derivados de fenol empleados como sustratos en la reacción son muy poco solubles en medio acuoso, por lo que se procedió a evaluar la actividad enzimática al añadir codisolventes orgánicos, bien miscibles con agua (acetonitrilo, AcN) o inmiscibles (éter dietílico, Et_2O).

Tras la determinación de la actividad enzimática en estos dos medios y en medio acuoso con valores de pH mayores a 11 (donde son parcialmente solubles los fenoles) se observó que los mejores resultados se obtenían en el sistema bifásico compuesto por solución acuosa tamponada a pH 8 y por Et_2O en una proporción del 7% (v/v).

Por otro lado, se determinó en el protocolo del proceso que además de estas condiciones se debe añadir amonio a una concentración de 180 mM y dos equivalentes de piruvato por cada equivalente de fenol, el cual se añade al medio de reacción en una concentración de 240 mM. Así, este procedimiento permite obtener *L*-tirosina a partir de fenol, piruvato y amonio en presencia de TPL y fosfato de piridoxal (actividad "clásica" de la TPL), sino que además permite la obtención de la 3-hidroxi-*L*-tirosina y la 3-fluoro-*L*-tirosina partiendo del catecol y orto-fluorofenol respectivamente.

Con el fin de emplear este método para sintetizar otros derivados de *L*-tirosina se procedió a variar la especificidad de sustrato de la enzima mediante su mutación dirigida por diseño racional. A este efecto se analizó la estructura de la TPL cristalizada [14] y se identificaron 5 aminoácidos (Phe36, el Thr125, la Met288, la Met379 y el Phe448), ubicados en las proximidades al lugar de unión del fenol dentro del sitio activo, que podían interaccionar de forma desfavorable con los sustituyentes del anillo aromático. Por tanto, se procedió a modificar la TPL de *Citrobacter freundii* sustituyendo estos aminoácidos por aminoácidos más pequeños con el fin de disminuir estas interacciones desfavorables, facilitando así su unión al sitio activo de la enzima. Así los aminoácidos no polares se cambiaron por valina mientras que la Thr125 se cambió por serina.

Tras probarse la batería de enzimas mutantes, se comprobó que el mutante M379V era el que presentaba mayor capacidad de catalizar la síntesis de un mayor número de compuestos debido a que es capaz de reconocer no solo el orto-fluorofenol, sino también el orto-clorofenol, el orto-metilfenol y el orto-metoxifenol para transformarlos en derivados de la *L*-tirosina; sin embargo, este mutante ha perdido la capacidad de emplear el catecol como sustrato de reacción.

En todos los casos, se ha comprobado mediante el uso de HPLC con fase estacionaria quiral que mediante esta biotransformación se pueden obtener los diferentes derivados de la *L*-tirosina con un exceso enantiomérico mayor al 97%, lo que permite reducir los costes de separar ambos isómeros, haciendo el proceso de síntesis más eficiente tanto económica como energéticamente.

2. Transaminasas (EC. 2.6.2.-)

Las transaminasas son una importante y versátil herramienta para obtener *L*-aminoácidos mediante biotransformaciones debido a su elevada regio- y estereoselectividad. Existen en la naturaleza una gran diversidad de transaminasas con características y propiedades muy

diferentes, y su empleo en la síntesis de compuestos derivados de la *L*-tirosina es muy importante, puesto que permiten obtener un elevado exceso enantiomérico y evita la necesidad de proteger y desproteger otros sustituyentes de las moléculas de sustrato durante la reacción.

En este sentido, un método basado en la acción de transaminasas para la obtener compuestos derivados de la *L*-tirosina consiste en la coordinación de dos pasos biocatalíticos sucesivos, el primero mediado por una oxidasa y el segundo por una transaminasa, con la finalidad de realizar una resolución cinético-dinámica de una mezcla de derivados de *D*- y *L*-tirosina, tal y como se esquematiza en la Figura 2.

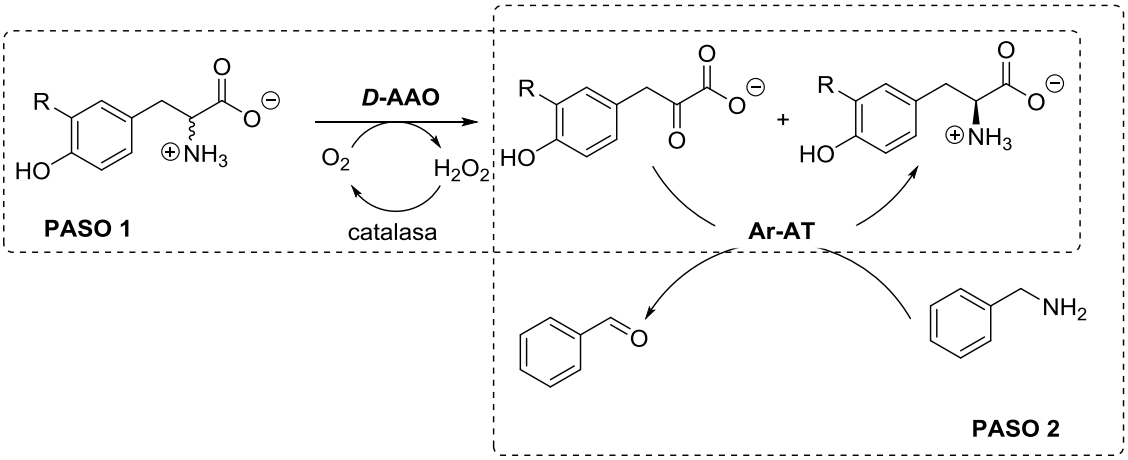


Figura 2. Proceso multienzimático para la obtención de derivados de *L*-tirosina

El primer paso biocatalítico emplea una *D*-aminoácido-oxidasa (*D-AAO*) [15], en un proceso de resolución cinética para oxidar de manera enantioselectiva los derivados de *D*-tirosina hasta su correspondiente α-oxoácido, sin que los derivados de la *L*-tirosina se vean afectados. En efecto, las *D*-aminoácido oxidasas (DAAOs) son unas enzimas peroxisomales que catalizan la desaminación oxidativa de los *D*-aminoácidos a su correspondiente α-oxoácido, utilizando el oxígeno como aceptor de electrones y produciendo como residuo de la reacción peróxido de hidrogeno. Por ello es necesario añadir la catalasa al medio de reacción para eliminar el peróxido de hidrogeno que se produce. Asimismo, cabe resaltar el hecho de la importancia crucial que tiene la presencia de oxígeno como cosustrato en el proceso catalizado por la DAAO, diversos grupos han descrito proteínas de fusión en las que se expresan juntas la DAAO y la hemoglobina encontrada en las bacterias Gram negativas del género *Vitreoscilla* (VHb) [16].

Esta proteína de fusión VHb-DAAO es capaz de captar el oxígeno disuelto en el agua y liberarlo de forma controlada para que la oxidasa actúe de forma óptima. Así, se ha comprobado que este complejo aumenta la estabilidad y la actividad de la DAAO en aquellos procesos biocatalíticos en los que se utiliza este biocatalizador para obtener la cefalosporina C [17].

La segunda fase de este proceso emplea una aminoácido-aromático transaminasa (EC. 2.6.1.57), también denominada aminoácido-aromático:2-oxoglutarato aminotransferasa o abreviadamente ArAT [18], capaz de catalizar la aminación en alfa del α-oxoácido en presencia de un donador de grupo amino como es la bencilamina.

Dentro de las ArAT, una buena candidata para emplearse en este proceso de biotransformación es la ArAT (AT-1) de *Pseudomonas aeruginosa,* la cual en la naturaleza es capaz de catalizar la conversión del 4-hidroxifenilpiruvato a tirosina empleando ácido aspártico como donador de grupo amino [19].

Otro posible biocatalizador que puede ser empleado para este proceso es una transaminasa quimérica expresada en *E. coli*, según describen Luong y Kirsch [20]. En este trabajo se produjeron distintas enzimas quiméricas combinando residuos de la ArAT y de la aspartato aminotransferasa de *E. coli.*

En efecto, se observó que al realizar seis cambios en el sitio activo de la aspartato aminotransferasa se conseguía disminuir la polaridad del centro activo, aumentando al mismo tiempo la afinidad de la enzima por los compuestos aromáticos en detrimento de los compuestos dicarboxílicos.

Asimismo, la mutación que tiene un papel más importante en el reconocimiento de los compuestos aromáticos es la sustitución de la asparagina en la posición 297 de la estructura primaria por serina.

Este método, que coordina dos procesos biocatalíticos para la deracemización de los derivados de tirosina, es muy eficiente desde el punto de vista económico, ya que el α-oxoácido producido por la DAAO se reutiliza por la transaminasa para producir más cantidad del enantioméro que nos interesa, aumentando el rendimiento y reduciendo al mismo tiempo la cantidad de residuos producidos por el proceso.

Esta metodología está muy estudiada en la desracemización de la homoalanina [21] ya que la *L*-homoalanina es el punto de partida de la síntesis de fármacos muy utilizados como son el agente antituberculoso etambutol o los antiepilépticos levetiracetam o brivaracetam [22].

3. Amonio Liasas (EC. 4.3.1.-)

Las amonio-liasas son enzimas que catalizan la ruptura del enlace carbono-nitrógeno, por mecanismos distintos a la hidrólisis o la oxidación, liberando amonio. Al estudiar la estructura de estas enzimas cristalizadas se observó que poseían un cofactor poco común, la 3,5-dihidro-5-metiliden-4*H*-imidazol-4-ona (MIO), la cual es formada por la secuencia -Ala-Ser-Gly- de manera postraduccional. El papel de la MIO en la reacción es el recibir un ataque electrofílico de tipo Friedel-Crafts sobre el anillo aromático del sustrato, de manera que pueda arrancarse el protón del anillo aromático que desencadena la reacción, como se indica en la Figura 3.

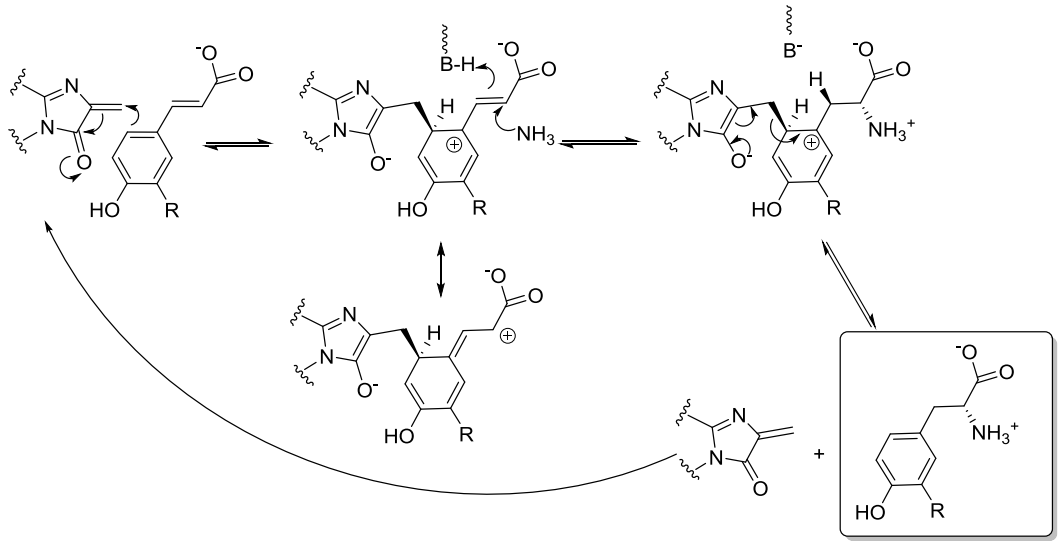


Figura 3. Reacción adición al doble enlace catalizada por la TAL mediado por el cofactor MIO.

En 1981 el grupo de Yamada comprobó que la fenilalanina amonio-liasa (PAL) no solo puede catalizar la ruptura de la molécula de fenilalanina, sino que también puede ser utilizada para sintetizar la fenilalanina partiendo del ácido trans-cinámico en presencia de una concentración elevada de amonio [23]. Desde entonces se han escrito varios trabajos sobre el uso de las fenilalanina amonio-liasas para sintetizar derivados de las arilalaninas. Así, en 2014 Lovelock y Turner publicaron un trabajo en el cual utilizaban la PAL de *Anabaena variabilis* para mediar procesos biocatalíticos en los cuales obtenían derivados de la fenilalanina [24], pero observaron que estos métodos fracasaban al intentar producir derivados de la *L*-tirosina.

Este hecho fue debido a que no se empleó la enzima correcta; en efecto, diversos estudios establecieron que las PAL surgieron a partir de las Histidina Amonio-Liasas (HAL) cuando las plantas y los hongos comenzaron a separarse de los otros reinos [25]. En su trabajo Ritter y Schulz estudiaron la PAL de *Petroselinum crispum* y llegaron a la conclusión de que la enzima era idéntica a la HAL del mismo organismo pero con 207 residuos extra.

De hecho, el grupo de Watts comprobó que, al modificar el sitio activo de la Tirosina amonio-liasa (TAL) mediante la sustitución de la histidina 89 por fenilalanina, la enzima cambiaba su especificidad de sustrato y se convertía en una PAL muy activa, y lo mismo ocurría al modificar la PAL [26].

Aun así existen protocolos en los que se puede emplear las PALs para sintetizar compuestos derivados de la *L*-tirosina, un ejemplo es el trabajo de Zhao y colaboradores [27], donde se emplea la PAL de la levadura *Rhodotorula rubra* para sintetizar compuestos derivados de arilalaninas y se consigue producir compuestos derivados de la *L*-tirosina aunque con bajos rendimientos.

Por tanto, se podría optimizar este protocolo empleando la PAL de *Rhodotorula glutinis* en vez de la de *Rhodotorula rubra,* ya que se conoce mejor la estructura y función de la primera, y se podría aplicar el mismo procedimiento de optimización que se realizó en el apartado uno del trabajo con la Tirosina fenol-liasa (TPL):

1. En primer lugar, se debería determinar con precisión el pH óptimo para que actúe la enzima, que debería estar en torno al pH 8.
2. Posteriormente, se procedería a evaluar la actividad enzimática en un medio de reacción compuesto por medio acuoso y un disolvente orgánico miscible con agua (p.ej. acetonitrilo) y en un medio de reacción compuesto por medio acuoso y un disolvente orgánico no miscible con el agua (p.j. dietileter) para poder determinar en qué medio de reacción la enzima trabaja mejor.
3. Finalmente, se procedería a evaluar la posibilidad de modificar la enzima para aumentar el rendimiento del proceso biocatalítico, Una mutación que se pude realizar para optimizar el proceso es la descrita anteriormente en el trabajo de Watts y su equipo, cambiando la histidina en posición 89 por fenilalanina para cambiar la especificidad de la enzima y convertir así la PAL en una TAL con la finalidad de aumentar el rendimiento del proceso.

Por lo tanto, el procedimiento optimizado teórico sería disponer el derivado del ácido para-cumarico adecuado con la PAL mutante H89F en un medio saturado en amonio (5 M) compuesto por medio acuoso (alrededor de pH 8) y por el disolvente orgánico adecuado a una proporción 7% (v/v).

4. Fenilalanina-hidroxilasa

Para finalizar, el último proceso biocatalítico que voy a proponer es el empleo de la Fenilalanina-hidroxilasa (PheH). Esta enzima es la responsable de que la tirosina no se considere un aminoácido esencial, puesto que la PheH, en la naturaleza, se encarga de catalizar la hidroxilación en posición *para* del aminoácido esencial fenilalanina para producir tirosina, tal y como se esquematiza en la figura 4 para R = H.

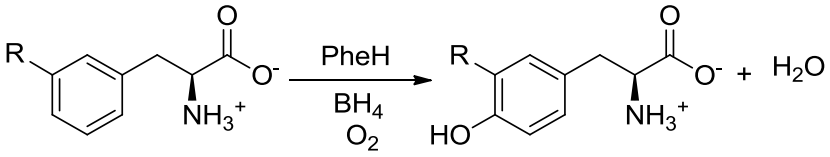


Figura 5. Reacción de hidroxilación de un compuesto derivado de la fenilalanina para obtener derivados de la L-Tirosina mediado por la fenilalanina-hidroxilasas.

La PheH es, de todos los posibles candidatos para mediar procesos biocatalíticos de síntesis de derivados de la *L*-tirosina, probablemente el menos estudiado, debido a la gran complejidad de esta enzima. En efecto, la PheH humana es una enzima alostérica compuesta por cuatro subunidades idénticas y sometida a varios mecanismos de regulación, donde cada subunidad está compuesta por un dominio regulador *N*-terminal, el sitio activo y el dominio *C*-terminal por donde se unen las subunidades.

Por ello resulta interesante estudiar las PheH de organismos más sencillos para intentar aplicarlas en procesos biocatalíticos.

Un candidato adecuado sería la PheH de *Chromobacterium violaceum,* la cual es una enzima compuesta por una sola unidad proteica y que no presenta el dominio de regulación enzimática.

Al comparar la PheH humana y la procariota se observa que la secuencia proteica tiene solo un 35% de similitud, aunque la estructura del sitio activo es muy similar [28], presentando ambas enzimas una triada catalítica compuesta por -histidina-histidina-glutamato-, la cual coordina un átomo de hierro junto a dos moléculas de agua.

Al estudiar con detenimiento la PheH procariota se observa que existen cuatro residuos que ayudan a que el sustrato se coloque próximo al segundo átomo de hierro coordinado, concretamente un puente de hidrogeno entre los residuos Ser349 y Arg270, una interacción central con el residuo de Leu278 y empaquetamiento del anillo por la His285 [29].

Por lo tanto podría usarse esta PheH procariota para desarrollar derivados de la *L*-tirosina de forma muy similar a como la Tirosina hidroxilasa produce la 3-hidroxitirosina partiendo de derivados de la fenilalanina sustituidos. Asimismo, también sería importante realizar mutaciones dirigidas en estos cuatro residuos que ayudan a colocarse al sustrato para observar si estos pequeños cambios pueden aumentar la afinidad de la enzima por los derivados de la fenilalanina.

5. Otros procedimientos

Existen más posibilidades y candidatos para la síntesis de compuestos derivados de la *L*-tirosina. Así, una posibilidad interesante sería el empleo de Catecol 4-O-metiltransferasas para la obtención de derivados sustituidos en el hidroxilo aromático de la *L*-tirosina.

Estas enzimas tienen gran posibilidad aplicación debido a que están muy estudiadas debido a su papel crucial en el metabolismo de las catecolaminas, que son sustancias derivadas de la tirosina y la fenilalanina. Además, existe una gran diversidad de análogos procarioticos que podrían ser empleados.

De hecho, Nelson y su grupo estudiaron la capacidad de la Catecol 4-O-metiltransferasa de *Myxococcus xanthus*, denominada SafC, para catalizar la metilación del hidroxilo aromático de los compuestos derivados de la L-Tirosina [30], como se indica en la Figura 5.

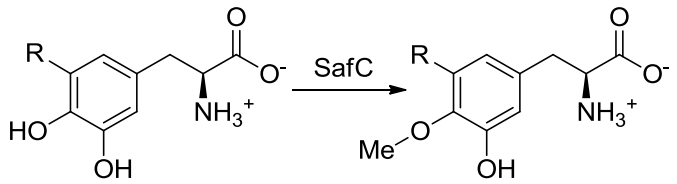


Figura 5. Reacción de metilación de un compuesto derivado de la Tirosina mediado por SafC.

Estos autores comprobaron que la SafC tenía mayor afinidad por la *L*-dopa que por otros derivados de la tirosina, pero esta no tenía actividad sobre la *L*-tirosina, por lo cual se procedió a comprobar su actividad sobre la 5-metil-*L*-dopa. Se constato así que la actividad disminuía considerablemente con respecto a la *L*-dopa, pero la reacción se producía, al igual que en el catecol, la dopamina y el ácido cafeico, de manera que se vio que la enzima solo

actuaba con los catecoles, constatando que en el caso del ácido cafeico la enzima perdía su estricta regioselectividad.

Por ello al final del trabajo estos autores propusieron la aplicación de esta enzima para procesos biocatalíticos con la finalidad de sintetizar análogos de la tirosina que tengan actividad contra el Parkinson.

Además de esta existen numerosas posibilidades como sería la aplicación de una aminomutasa, una racemasa o una oxidasa. Según los objetivos que se plantee el trabajo existe una gran diversidad de enzimas que estudiar para proponer y desarrollar nuevos procesos biocacalíticos destinados a la producción de derivados de la *L*-tirosina.

Conclusiones

La necesidad actual de sintetizar grandes cantidades de fármacos anticancerígenos obliga a la industria a optimizar sus procedimientos sintéticos con el fin de mantener el rendimiento óptimo de producción y a su vez disminuir la producción de sustancias de desecho derivadas de estos procesos que puedan afectar al medio ambiente.

Por ello, en el panorama actual de la producción industrial de medicamentos toman cada vez más importancia conceptos como la síntesis asimétrica, la química verde y las biotransformaciones.

A lo largo de este trabajo se ha explicado que actualmente existe una gran demanda de compuestos derivados de la *L*-tirosina para poder sintetizar un gran número de compuestos anticancerígenos, algunos de los cuales están siendo muy utilizados hoy día y con grandes resultados. Uno de ellos es la Ecteinascidina-743 (Yondelis®) el cual ha demostrado tener una importante actividad antitumoral en el sarcoma de tejidos blandos y en el cáncer de ovario resistente a cisplatino [31].

El principal problema que presenta esta molécula es que actualmente se produce de forma industrial mediante semisíntesis, partiendo de la cianosaframicina B en un proceso que requiere diez pasos de reacción y produce una gran cantidad de residuos. En cambio mediante el uso de biotransformaciones podemos obtener compuestos derivados de la *L*-tirosina en medio acuoso con una producción mínima de sustancias de desecho, que serían los sintones sobre los cuales plantear la creación del anillo de tetraisoquinolina, núcleo de la molécula activa.

Por ello hemos planteado la aplicación de procesos biocatalíticos para sintetizar compuestos derivados de la *L*-tirosina para así poder producir industrialmente un gran número de compuestos con actividad antitumoral produciendo un mínimo impacto en el medio ambiente.

Estos procesos se llevan a cabo, generalmente, en medios acuosos y requieren cantidades mínimas de disolventes orgánicos en caso de que las moléculas sean poco solubles, reduciendo de esta manera una gran cantidad de sustancias de desecho.

Por otra parte, el hecho de trabajar en condiciones de reacción suaves, generalmente a presión atmosférica con una temperatura en torno a los 30ºC y a valores de pH próximos a 8, supone asimismo un importante ahorro económico ya que las condiciones de reacción no son muy diferentes a las atmosféricas.

Como ventaja adicional, los procesos biocatalíticos se caracterizan por su extremada precisión, traducida ésta en términos de estero-, regio- y químioselectividad, por lo cual generalmente la reacción produce un único producto. Esto evita el tener que recurrir a procedimientos adicionales, con la finalidad de aislar nuestro producto de interés de una mezcla compleja y así también permite disminuir el costo global del proceso.

Este punto es muy importante ya que los distintos isómeros de la misma molécula tienen propiedades distintas; así, los derivados de la *D*-tirosina también se emplean para sintetizar compuestos con actividad antitumoral, pero su utilidad no se ha abordado en este trabajo. Por ello es muy importante el empleo de las biotransformaciones ya que nos permiten diseñar procesos biocatalíticos en los cuales obtengamos el isómero que nos interesa con un elevado exceso enantiomérico, evitando la producción de mezclas racémicas.

Finalmente, otra ventaja de la aplicación de las biotransformaciones para la síntesis de estos compuestos es que no tenemos la necesidad de proteger los sustituyentes de nuestros sustratos ya que las condiciones de reacción son muy suaves y la enzima, debido a su precisión, solo catalizará la reacción en los grupos que hayamos establecido durante el diseño y normalización del proceso, antes de aplicarlo a gran escala.

Pero estos procesos también tienen sus desventajas, ya que no todas las enzimas son promiscuas en lo que se refiere a la catálisis de sustratos distintos al suyo natural, presentando pues una versatilidad limitada, y otras presentan estructuras complejas y delicadas, que precisan de una estabilización previa a su uso industrial, con el consiguiente esfuerzo económico e intelectual.

Por ello este campo de investigación está abierto a una gran diversidad de aplicaciones, al existir un elevado número de enzimas, las cuales cambian de una especie a otra y de un reino a otro. En consecuencia, intentar optimizar una biotransformación requiere mucho tiempo y trabajo, puesto que se requiere aislar los candidatos más adecuados para llevar a cabo nuestros objetivos, evaluar en qué condiciones actúan mejor y meditar si se puede mejorar el proceso mediante mutaciones puntuales en las enzimas elegidas.

De todo lo dicho hasta ahora se infiere claramente que el área de las biotransformaciones es un campo muy complejo donde aún existe mucho por estudiar, presentando muchas más variables que estudiar que las abordadas (por causas de limitación de espacio) en este trabajo; se puede trabajar con enzimas aisladas o con células enteras, se pueden utilizar las variedades silvestres de las enzimas, las variedades mutantes e incluso se puede sintetizar nuevas enzimas según nos interese, se pueden conjugar las enzimas a proteínas, a anticuerpos y a otras especies químicas, se pueden inmovilizar las enzimas para que puedan reutilizarse durante más tiempo, pueden fijarse al reactor, a electrodos o membranas e incluso pueden entrecruzarse entre ellas formando los CLEA o los CLEC que aumentan la vida útil de la enzima.

Por lo tanto las biotransformaciones son procesos muy útiles y complejos con un gran número de ventajas en la síntesis de compuestos con actividad antitumoral y son un campo que tiene que desarrollarse para favorecer la aplicación de los principios de la química verde a la industria. Este desarrollo de las biotransformaciones ayudará sin duda a obtener protocolos de síntesis de compuestos antitumorales más eficientes tanto desde el punto de vista energético como económico.

Bibliografía

[1] Anastas, P. T.; Warner, J. C., *Green chemistry: theory and practice*. Oxford University Press: Oxford, **1998**.

[2] Li, C.-J.; Anastas, P. T., *Green Chemistry: present and future*. Chem. Soc.Rev., **2012**, *41*.

[3] Arnold, F. H., *Design by directed evolution.* Acc. Chem. Res., **1998**, 31, 125–131.

[4] 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.

[5] Jorgensen, E. C.; Wiley, R. A., *Methyl-Substituted Tyrosines and Related Compounds as Potential Anticancer Agents.* J. Pharm. Sci., **1963**, 52, 122 – 125.

[6] McCubbin, J. A.; Maddess, M. L.; Lautens, M., *Total synthesis of cryptophycin analogues via a scaffold approach.* Org. Lett., **2006**, 8, 2993 – 2996.

[7] De Paolis, M.; Chen, X.; Zhu, J., *A short enantioselective synthesis of protected L-3-hydroxy-4-methoxy-5-methyl phenylalanine and its corresponding aldehyde - A common subunit of ecteinascidin-743, safracin and congeners.* Synlett., **2004**, 4, 729 –731.

[8] Song, Y.L.; Peach, M. L.; Roller, P. P.; Qiu, S.; Wang, S.; Long, Y.Q., *Discovery of a novel nonphosphorylated pentapeptide motif displaying high affinity for Grb2-SH2 domain by the utilization of 3 '-substituted tyrosine derivatives.* J. Med. Chem., **2006**, 49, 1585 – 1596.

[9] Lee, G. E.; Joshi, B. V.; Chen, W.; Jeong, L. S.; Moon, H. R.; Jacobson, K. A.; Kim, Y., *Synthesis and structure-activity relationship studies of tyrosine-based antagonists at the human P2X(7) receptor.* Bioorg. Med. Chem. Lett., **2008**, 18, 571 – 575.

[10] Chen, X.; Zhu, J., *Total synthesis of the marine natural product (-)-cribrostatin 4 (renieramycin H).* Angew. Chem., **2007**, 119, 4036 – 4039.

[11] Ahmed, F.; Ohtsuki, T.; Aida, W.; Ishibashi, M., *Tyrosine Derivatives Isolated from Streptomyces sp IFM 10937 in a Screening Program for TRAIL-Resistance-Overcoming Activity*. J. Nat. Prod., **2008**, 71, 1963 – 1966.

[12] Kumagai, H.; Yamada, H.; Matsui, H.; Ohkishi, H.; Ogata, K., *Tyrosine Phenol Lyase: 1. Purification, crystallization and properties.* J. Biol. Chem., **1970**, 245, 1767 – 1772.

[13] Seisser, B.; Zinkl, R.; Gruber, K.; et al, *Cutting Long Syntheses Short: Access to Non-Natural Tyrosine Derivatives Employing an Engineered Tyrosine Phenol Lyase.* Advanced Synthesis and Catalysis, **2010**, 352, 731–736.

[14] Phillips, R. S.; Yuan Chen, H.; Faleev, N. G., *Aminoacrylate Intermediates in the Reaction of Citrobacter freundii Tyrosine Phenol-Lyase.* Biochemistry, **2006**, 45, 9575 – 9583.

[15] Fotheringham, I.; Archer, I.; Carr, R.; Speight R.; Turner, N. J., *Preparative deracemization of unnatural amino acids.* Biochem. Soc. Trans., **2006**, 34, 287.

[16] Lin, Y. H.; Li, Y. F.; Huang M. C.; Tsai, Y. C., *Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin in Aspergillus terreus to alleviate the effect of a short break in aeration during culture.* Biotechnol. Lett., **2004**, 26, 1067.

[17] Khang, Y. H.; Kim, I. W.; Hah, Y. R.; Hwangbo J. H.; Kang, K. K., *Fusion protein of Vitreoscilla hemoglobin with D-amino acid oxidase enhances activity and stability of biocatalyst in the bioconversion process of cephalosporin C.* Biotechnol. Bioeng., **2003**, 82, 480.

[18] Islam, M.M.; Hayashi, H.; Mizuguchi, H.; Kagamiyama, H.; *The substrate activation process in the catalytic reaction of Escherichia coli aromatic aminoacid aminotransferase.* Biochemistry., **2000**, 39, 15418-15428.

[19] Whitaker, R.J.; Gaines, C.G.; Jensen, R.A., *A Multispecific Quintet of Aromatic Aminotransferases That Overlap Different Biochemical Pathwaysin Pseudomonas aeruginosa* J. Biol. Chem., **1982**, 257, 13550–13556.

[20] Luong, T. N.; Kirsch, J. F., *A general method for the quantitative analysis of functional chimeras: applications from site-directed mutagenesis and macromolecular association.* Protein Sci., **2001**, 10, 581–591.

[21] Seo, Y. M.; Mathew, S.; Bea, H. S.; Khang, Y. H.; Lee, S. H.; Kim, B.G.; Yun, H., *Deracemization of unnatural amino acid: homoalanine using D-amino acid oxidase and omega-transaminase.* Org. Biomol. Chem., **2012**, 10, 2482–2485.

[22] Taylor, I. N.; Brown, R. C.; Bycroft, M.; King, G.; Littlechild, J. A.; Lloyd, M.C.; Praquin, C.; Toogood, H. S.; Taylor, S. J. C., *Application of thermophilic enzymes in commercial biotransformation processes.* Biochem. Soc. Trans., **2004**, 32, 290 – 292.

[23] Yamada, S.; Nabe, K.; Nobuhiko, N.; Nakamichi, K.; Chibata, I., *Production of L-Phenylalanine from trans-Cinnamic Acid with Rhodotorula glutinis Containing L-Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity.* Appl. Environ. Microbiol., **1981**, 42, 773.

[24] Lovelock, S.L.; Turner, N.J., *Bacterial Anabaena variabilis phenylalanine ammonia lyase: A biocatalyst with broad substrate specificity*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2014**, 22, 5555-5557.

[25] Ritter, H,; Schulz, G.E., *Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. Plant Cell.*, **2004**, 16, 3426-3436.
[26] Watts, K.T.; Mijts, B.N.; Lee P.C.; Manning A.J.; Schmidt-Dannert, C., *Discovery of a substrate selectivity switch in tyrosine ammonia-lyase, a member of the aromatic ammonia lyase family.* Chem Biol., **2006**, 13, 1317-1326.
[27] Zhao, J.; Yang, S.; Jiang, Y., *Enzyme-catalyzed asymmetric amination of trans-cinnamic acid analogs.* Youji Huaxue, **1993**, 13, 486-489.
[28] Abu-Omar M.M.; Loaiza A.; Hontzeas N., *Reaction mechanisms of mononuclear non-heme iron oxygenases.* Chem Rev., **2005**, 105, 2227–2252.
[29] Andersen, O.A.; Flatmark, T.; Hough, E., *Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation*. J Mol Biol., **2002**, 320, 1095–1108.
[30] Nelson, J.T.; Lee, J.; Sims, J.W.; Schmidt, E.W., *Characterization of SafC, a catechol 4-O-methyltransferase involved in saframycin biosynthesis.* Applied and Environmental Microbiology, **2007**, 73, 3575-3580.
[31] Le, V.H.; Inai, M.; Williams, R.M.; Kan, T., *Ecteinascidins. A review of the chemistry, biology and clinical utility of potent tetrahydroisoquinoline antitumor antibiotics*. Nat. Prod. Rep., **2015**, 32, 328-347.