



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE HEPARINAS Y
MECANISMO DE ACCIÓN**

Autor: AINHOA GARRIDO PÉREZ

D.N.I.: 50997865B

Tutor: M^a José Hernáiz Gómez Dégano

Convocatoria: JUNIO 2019

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	4
1. Generalidades de las heparinas	4
1.1 Mecanismo de acción de la heparina	5
2. Obtención de compuestos de interés: Biocatálisis.....	7
OBJETIVOS	9
METODOLOGÍA	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
1. Biosíntesis de heparina.	9
2. La síntesis de heparinas en la actualidad	10
3. Estrategias quimioenzimática para la síntesis de HBPM	11
3.1 Obtención del esqueleto de heparina	11
3.2 Modificaciones sobre el esqueleto de heparina.	11
3.2.1: Primera modificación: NDST.....	11
3.2.2: Segunda y tercera modificación por C-epimerasa y 2-OST.....	13
3.2.3: Cuarta modificación: Sulfatación por 6-OST.....	13
3.2.4: Quinta modificación: Sulfatación por 3-OST.....	14
3.3 Donador sulfo para las N-Sulfataciones.....	14
4. Síntesis química y estrategias quimioenzimática para síntesis de HUBPM	15
5. Progresos en las heparinas gracias a la síntesis quimioenzimática	17
CONCLUSIONES	17
BIBLIOGRAFÍA	18

RESUMEN

La heparina es uno de los anticoagulantes más empleados en clínica, es utilizado para el tratamiento de la trombosis venosa profunda, síndrome coronario agudo, embolismo pulmonar, y enfermedad tromboembólica profunda entre otras. Esto explica la alta demanda que presenta, según la AEMPS desde 1992 esta ha ido creciendo. La principal y única fuente permitida de obtención de heparina actualmente en Europa es la mucosa del intestino porcino, a pesar de los riesgos que ello conlleva, como la posible presencia de microorganismos infecciosos en la materia de partida y la dificultad de llevar a cabo unas adecuadas cGMP. En 2007 se produjo la crisis de las heparinas debido a la muerte de 100 personas, como consecuencia de unas heparinas contaminadas, durante el procesamiento químico de las mismas, además se descubrieron otros contaminantes derivados del propio tejido animal.

Todo esto, condujo a la búsqueda de nuevas estrategias, más seguras y de paso más eficaces, eficientes, económicas y respetuosas con el medio ambiente para obtener este anticoagulante. La principal estrategia que se llevó a cabo y en la que se sigue trabajando es la síntesis quimioenzimática, que permite realizar reacciones más selectivas y sencillas. Son hasta ahora muchos los avances logrados, pero hay que seguir trabajando para desbancar a la mucosa de intestino porcino como nuestra principal fuente de obtención de estas heparinas.

ABSTRAC

Heparin is one of the most used anticoagulants in clinical practice, it is used for the treatment of deep vein thrombosis, acute coronary syndrome, pulmonary embolism, and deep thromboembolic disease among others. This explains the high demand that presents, according to the AEMPS since 1992 this has been growing. The main and only allowed source of heparin currently in Europe is the porcine intestinal mucosa, despite of the risks it cause, for example the possible presence of infectious microorganisms in the starting material and the difficulty of carrying out the adequate cGMP. In 2007 the heparin crisis occurred due to the death of 100 people, as a result of contaminated heparins, during the chemical processing of them. In addition other contaminants derived from the animal tissue itself were discovered.

All this led to the search for new strategies that were more save, efficient, economical and respectful with the environment to obtain this anticoagulant. The main strategy that was carried out and which is still working is chemoenzymatic synthesis, which allows more selective and simple reactions, so far many advances have been made, but we must continue working to pass the porcine intestinal mucosa as the main source of obtaining these heparins.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. Generalidades de las heparinas

Las heparinas son glicosaminoglicanos, constituidos por unidades repetidas de glucosamina mediante unión 1→4 además, contienen restos de ácido idurónico y glucurónico con sulfatación variable. Las heparinas son fármacos que se usan como anticoagulantes que actúan en la hemostasia secundaria, tanto en la vía intrínseca como extrínseca de la coagulación.

En la vía extrínseca el factor VII se activa por unión al factor tisular (FT) situado en el endotelio lesionado. El complejo FT-VIIa junto con las plaquetas, los fosfolípidos y el Ca^{2+} activan al factor X. Este factor Xa, junto con el Va (activado por trombina previamente), las plaquetas y el Ca^{2+} forman el complejo activador de la protrombina que transforma la protrombina en trombina y esta, en consecuencia, el fibrinógeno (soluble) en fibrina (insoluble). Por su parte, en la vía intrínseca se van activando una serie de factores en cadena: XIIa, XIa y IXa. Este factor IXa junto con el Ca^{2+} , las plaquetas y el factor VIIIa, activado por trombina previamente, activan al factor X. Este factor X junto con el factor Va, las plaquetas y el Ca^{2+} son como he explicado antes el complejo activador de la protrombina, y es justo aquí dónde ambas vías, intrínseca y extrínseca, confluyen (*Figura 1*). Así es como, a través de ambas vías, el fibrinógeno soluble da lugar a la fibrina insoluble y se forma un coágulo. (1)

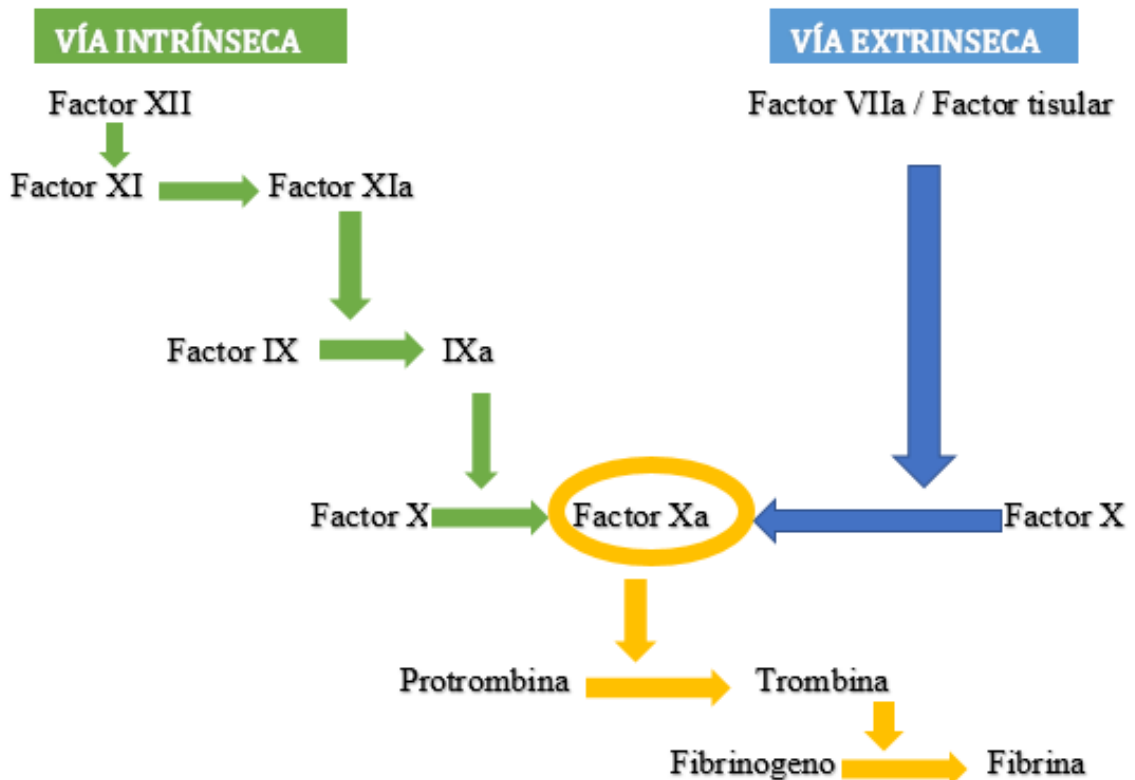


Figura 1. Vía intrínseca y extrínseca de la coagulación

Para asegurar que la sangre se mantiene en estado fluido y que no se forman coágulos que impidan la correcta circulación sanguínea, contamos con la antitrombina III (AT III) que inhibe algunos factores hemostáticos. Su inhibición es fundamentalmente sobre los factores Xa y IXa pero también inhibe a la trombina (IIa), impidiendo así, la formación de la fibrina y ejerciendo un efecto antitrombótico y anticoagulante. (2)

Las heparinas, se unen a la antitrombina III produciendo un cambio conformacional en ella que mejora su reactividad con los factores de la coagulación potenciando así el efecto de la antitrombina III y, por tanto, el predominio de la actividad anticoagulante.

Dentro de las heparinas distinguimos las de bajo peso molecular (HBPM), que son oligosacáridos fragmentados y las heparinas no fraccionadas (HNF) que son polisacáridos de longitud completa, por su farmacocinética son más indicadas para uso clínico las primeras (3). Las HBPM son el fármaco de elección para la enfermedad tromboembólica venosa y se usan también para síndromes coronarios agudos, trombosis asociada a la gestación, accesos vasculares para la diálisis, entre otros. Recientemente se ha desarrollado también una heparina de ultra bajo peso molecular (HUBPM), fondaparinux, esta solamente presenta el pentasacárido responsable de la actividad, el problema es el elevado coste económico que supone sintetizarla.

1.1 Mecanismo de acción de la heparina

La heparina tiene actividad anticoagulante, gracias a su actuación como catalizador en la reacción de la AT III con los factores de la coagulación citados. La AT III es un inhibidor de serinoproteasas, actúa inhibiendo los factores de la coagulación activados, de esta forma regula la coagulación y por tanto, el flujo sanguíneo. Así la unión de la heparina a la AT III provoca un aumento de la reactividad de esta última con los factores de la coagulación, potenciando así su actividad anticoagulante y siendo por tanto, de gran utilidad para el tratamiento de enfermedades tromboembólicas y trombosis. Es importante destacar que la AT III libre tiene una reactividad lenta ya que su centro reactivo está plegado hacia dentro. (4)

Dentro de la heparina se diferencian dos regiones responsables de su actividad, por un lado el pentasacárido $\rightarrow 4) \text{GlcN (N-glucosamina)/AcS6S (1} \rightarrow 4) \text{GlcP (ácido glucurónico) (1} \rightarrow 4) \text{GlcNpS3S6S (1} \rightarrow 4) \text{IdoAp (ácido idurónico)2S (1} \rightarrow 4) \text{GlcNpS6S (1} \rightarrow$, cuyo grupo 3-O-sulfo es fundamental (Figura 2) y por otro la siguiente secuencia repetitiva de disacáridos trisulfatados $\rightarrow 4) \text{IdoA2S (1} \rightarrow 4) \text{GlcNS6S (1} \rightarrow$. (. (Figura 3).

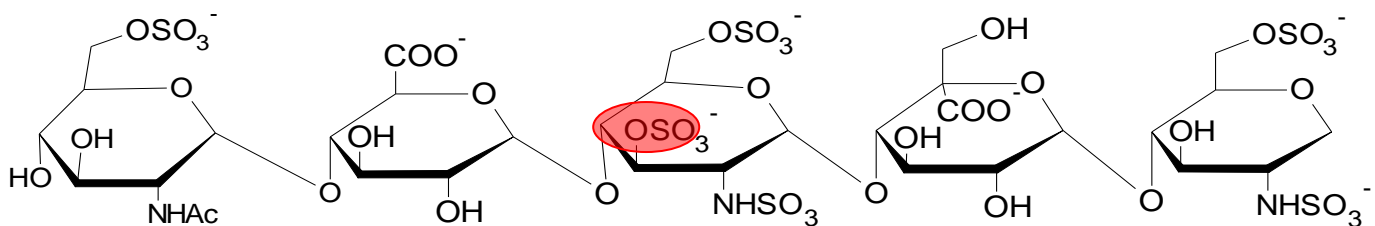


Figura 2. Pentasacárido de unión a AT III.

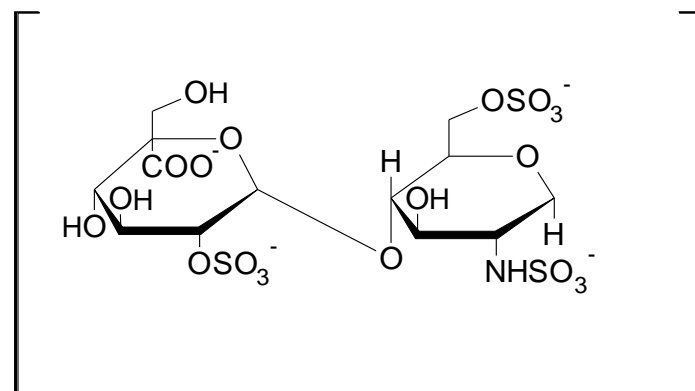


Figura 3. Disacárido trisulfadado

La AT III presenta dos sitios de unión para heparina, por un lado está el centro de reconocimiento y por otro el componente alostérico. El centro de reconocimiento está situado en la hélice D de la AT III, donde se une el pentasacárido de la heparina con alta afinidad y provoca un cambio conformacional en ella, que permite una mayor exposición del centro activo, que antes de la unión permanecía plegado hacia el interior (5). Esto por tanto, tiene como consecuencia el aumento de la reactividad de la antitrombina con los factores Xa y IXa en 100 veces. Por otro lado, situado más allá del sitio de unión del pentasacárido, se encuentra el segundo sitio de unión, el componente alostérico, que tiene un residuo básico al que se une la secuencia repetitiva de disacáridos trisulfatados, lo que produce un aumento de la reactividad de la antitrombina con los factores Xa y IXa de 100 a 1000 veces. Además, este es el único mecanismo por el que se explica el aumento de la reactividad de la antitrombina en 1000 veces con la trombina (Figura 4). Así, para el aumento de la reactividad de la AT III con los factores Xa y IXa es suficiente la unión del pentasacárido al centro de reconocimiento de la AT III, sin embargo, para el incremento de la reactividad de la AT III con la trombina, es necesario además de la unión citada anteriormente, la unión de la secuencia de disacáridos trisulfatados de la heparina al componente alostérico para formar un complejo ternario HP-AT III-IIa. (6)

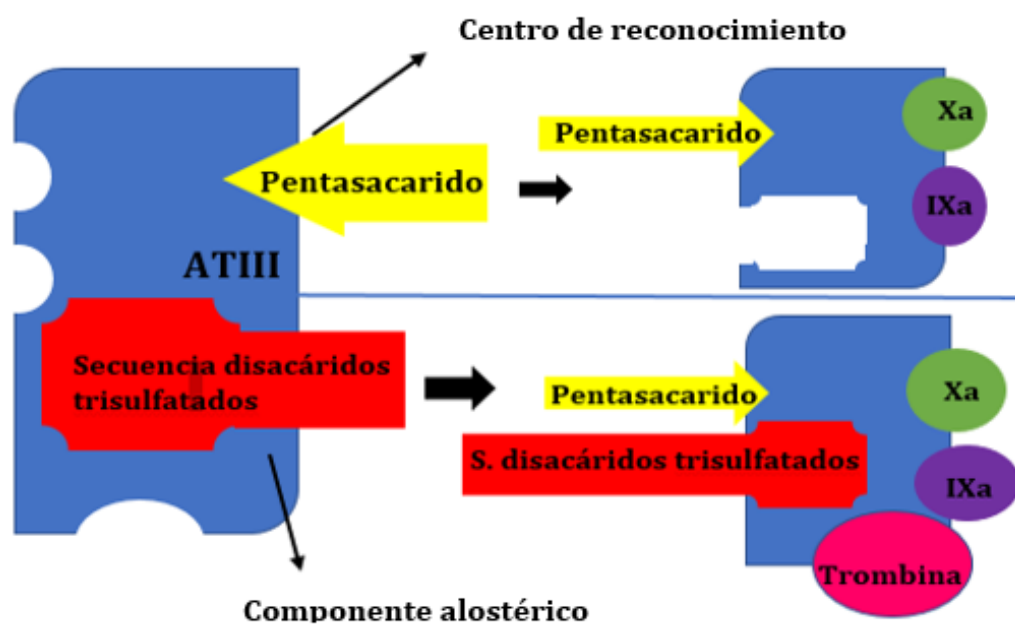


Figura 4. Interacciones ATIII-Heparina

2. Obtención de compuestos de interés: Biocatálisis

La historia de la heparina se remonta a 1916, en la primera Guerra Mundial, fue descubierta por Jay McLea un estudiante de medicina. En 1920 se inició la producción de HBPM a partir de hígado canino y bovino, después de pulmón e intestino bovino y posteriormente de intestino porcino. Su síntesis antes y actualmente esta basada en el uso de animales como principal fuente de obtención y posterior despolimerización química de la misma. A lo largo de la historia, se han producido distintos problemas de contaminación de estas heparinas obtenidas de animales; en 2008 se notificaron 100 muertos en EEUU que estaban siendo tratados con heparina, debido al desarrollo de reacciones adversas graves, como erupción cutánea, aumento del ritmo cardíaco y respuesta anafiláctica entre otras. Esto se debió a la presencia de un contaminante en las heparinas denominado OSCS, derivado del proceso de despolimerización química. Si bien, este no es el único contaminante de heparinas derivado de la despolimerización química, se han descrito derivados del propio tejido animal y del proceso de semisíntesis. (6)

Actualmente la mayoría, de los contaminantes pueden detectarse mediante PCR o ácido nitroso, el problema es que tras estos controles se pueden producir otras contaminaciones no detectables. Si bien, este problema no es el único que tienen las heparinas de origen animal, en 1990 a raíz del brote de encefalopatía espongiiforme bovina, se dejó de emplear esta fuente para la preparación de heparinas, debido al peligro que conllevaba. Por eso, debemos tener en cuenta que los animales son susceptibles de presentar distintas enfermedades infecciosas, lo que supone un peligro, ya que los usamos como fuente de obtención de fármacos para uso humano. Por otro lado, la despolimerización química requiere el uso de numerosos reactivos y las reacciones no son todo lo selectivas que podríamos conseguir. Además, distintos métodos de despolimerización dan lugar a HBPM con distintos pesos moleculares y por tanto con actividad distinta, hay mucha heterogenicidad en ese aspecto. (7)

Además de estos problemas derivados de la contaminación durante el proceso de síntesis de HBPM, existen otros de gran importancia clínica. La HBPM se elimina a través de la vía renal, lo que supone una limitación de uso para aquellas personas con insuficiencia renal, además, no tenemos un antídoto que neutralice por completo su actividad, contamos con la protamina, pero esta lo hace solo parcialmente.

Es por todo ello que debemos hacer uso de la tecnología actual que tenemos a nuestro alcance y buscar nuevas alternativas para la obtención de heparinas, con el fin de evitar todos estos problemas, entre estas alternativas, destacamos la biocatálisis.

“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” (8).

Las enzimas son moléculas orgánicas constituidas por aa, son catalizadores, es decir, tienen la capacidad de acelerar la velocidad de las reacciones, además, son específicas, se recuperan íntegras tras la reacción llevada a cabo, no se consumen, son biodegradables y no tóxicas. Gracias a su especificidad, son capaces de diferenciar sustratos muy similares entre sí y trabajar a temperaturas y pHs muy variables. Los biocatalizadores pueden presentar 3 tipos de selectividad (9):

- Regioselectividad: Una reacción regioselectiva es aquella en la que pudiéndose formar varios isómeros constitucionales se forma uno preferentemente, gracias a la precisión del biocatalizador.

- Estereoselectividad: Una reacción estereoselectiva es aquella en la que existe la posibilidad de que se formen distintos estereoisómeros, pero se forma uno de ellos con mayor preferencia, gracias a la capacidad del biocatalizador de discernir entre ellos.
- Quimioselectividad: En una reacción habiendo grupos funcionales iguales, pero con distinta reactividad, el biocatalizador puede ser capaz de distinguirlos y actuar así selectivamente sobre uno de ellos.

Uno de los problemas de los biocatalizadores es su inestabilidad a nivel industrial, por ello se habló de inmovilización enzimática que consiste en confinar físicamente un biocatalizador en una determinada región del espacio de manera que su actividad catalítica se retenga y pueda ser reutilizada. (1971, 1er Enzyme Engineering Conference, Henniker, New Hampshire, USA). Esto tiene sus ventajas, como el aumento de la estabilidad del biocatalizador, aumento de la productividad por la capacidad de reutilización, facilidad de recuperación y purificación de compuestos, pero también desventajas, disminuye un poco la actividad enzimática, mayor coste económico y aumento de los problemas difusionales entre otros.

Es por ello, por lo que los biocatalizadores son una herramienta útil para la obtención de productos, ya que por sus características contribuyen a la llamada química verde. Esta fue descrita por PT Anasta y JC. Warner: "La química verde consiste en la utilización de una serie de principios encaminados a reducir o eliminar el uso y generación de sustancias peligrosas en el diseño, fabricación y aplicación de los productos químicos" (10). Se fundamenta en 12 principios:

- 1.Prevencción de residuos
- 2.Economía atómica
- 3 Metodología de síntesis de toxicidad reducida
- 4.Diseño de compuestos químicos más seguros
- 5.Diminución del uso de sustancias auxiliares
- 6.Eficacia energética
- 7.Utilización de materias primas renovables
- 8.Reducción de derivados
- 9.Potenciación de la catálisis
- 10.Diseño de los productos biodegradables
- 11.Desarrollo de técnicas para analisis a tiempo real
- 12.Minimizar el potencial de accidentes químico

La biocatálisis cumple con algunos principios de la química verde como el 1, pues lo biocatalizadores son muy precisos y generan pocos residuos; el 6, ya que se trabaja a temperatura y presiones suaves; el 8, reduce la necesidad de usar grupos protectores; el 9 y el 10, pues los biocatalizadores son mucho más biodegradables que los catalizadores químicos. Por tanto, la biocatálisis es útil para conseguir múltiples productos, como la heparina, de acuerdo con los principios de la química verde, contribuyendo así al menor impacto que la elevada producción de sustancias químicas por el método convencional conlleva.

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es llevar a cabo una revisión bibliográfica acerca de la síntesis enzimática de heparinas de bajo peso molecular y ultra bajo peso molecular, comenzando por una explicación breve sobre la actividad de las heparinas, así como sus usos, su mecanismo de acción, una visión global de la biocatálisis y su relación con la química verde; Continuando con un estudio más profundo sobre la biosíntesis de heparina, su síntesis actual y las distintas estrategias llevadas a cabo para la síntesis enzimática de heparinas, así como las repercusiones de estas.

METODOLOGÍA

El trabajo se ha realizado mediante una recopilación bibliográfica, acerca de las características generales de la heparina, sus indicaciones, su mecanismo de acción y su síntesis actual y enzimática. Para ello, se ha empleado la base de datos PubMed, la página de la AEMPS, el texto Fundamentos de Biotecnología farmacéutica y algún libro electrónico recogido en la bibliografía. Para la realización de las figuras se ha usado ChemSketch.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El consumo de heparinas ha ido aumentando en los últimos años según un informe de la AEMPS (11) en 1992 el consumo de heparinas y derivados era de 10,53 DDD/1000Hab y en 2006 de 50,65 solo en España. Estas cifras explican la necesidad de encontrar un método de síntesis eficaz y seguro para la obtención de heparinas con el objetivo de abastecer las necesidades y hacerlo de la forma menos costosa, más económica y menos contaminante posible.

1. Biosíntesis de heparina.

La heparina endógena está presente únicamente en los gránulos de los mastocitos, su síntesis tiene lugar en el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico. Lo primero que se produce es la formación de un enlazador, que se une al residuo de serina, de la serglicina, proteína, presente en la membrana del mastocito. A partir de este enlazador, que es un tetrasacárido (GlcA-Gal-Gal-Xyl), se inicia la polimerización con la unión de más unidades de disacáridos GlcNAc y GlcA, activados por UDP, así se va elongando la cadena gracias a la acción de dos polimerasas, la exotosina glicosiltransferasa 1 (EXT1) y la exotosina glicosiltransferasa (EXT2) dando lugar así a la columna vertebral no sulfatada de la heparina. (7)

Por último, se lleva a cabo una serie de modificaciones, en primer lugar actúa la *N* desacetilasa/*N*-sulfotransferasa (NDST), que es una enzima con doble función, actúa primero sobre los residuos de GlcNAc, con actividad desacetilasa eliminando el grupo acetilo y sobre esta ya desacetilada actúa con actividad *N*-sulfotransferasa (NST) añadiendo un grupo *N*-sulfo. A continuación, actúa la *C5* epimerasa transformando el ácido *D*-glucurónico (GlcA) en idurónico (IdoA), después actúa la 2-*O*-sulfotransferasa (2-OST) que cataliza la transferencia de un grupo sulfo a la posición 2-OH del IdoA preferentemente frente a GlcA y por último

actúan la 6-O sulfotransferasa (6-OST) y la 3-O-sulfotransferasa (3-OST) que agregan respectivamente grupos sulfo en las posiciónes 6-OH y 3-OH de GlcNAc. (Figura 5). Todas estas sulfotransferasas requieren un donante sulfo el 5'-fosfosulfato de 3'-fosfoadenosin para poder añadir los grupos sulfo a las posiciónes citadas, son los llamados PAPS. (7)

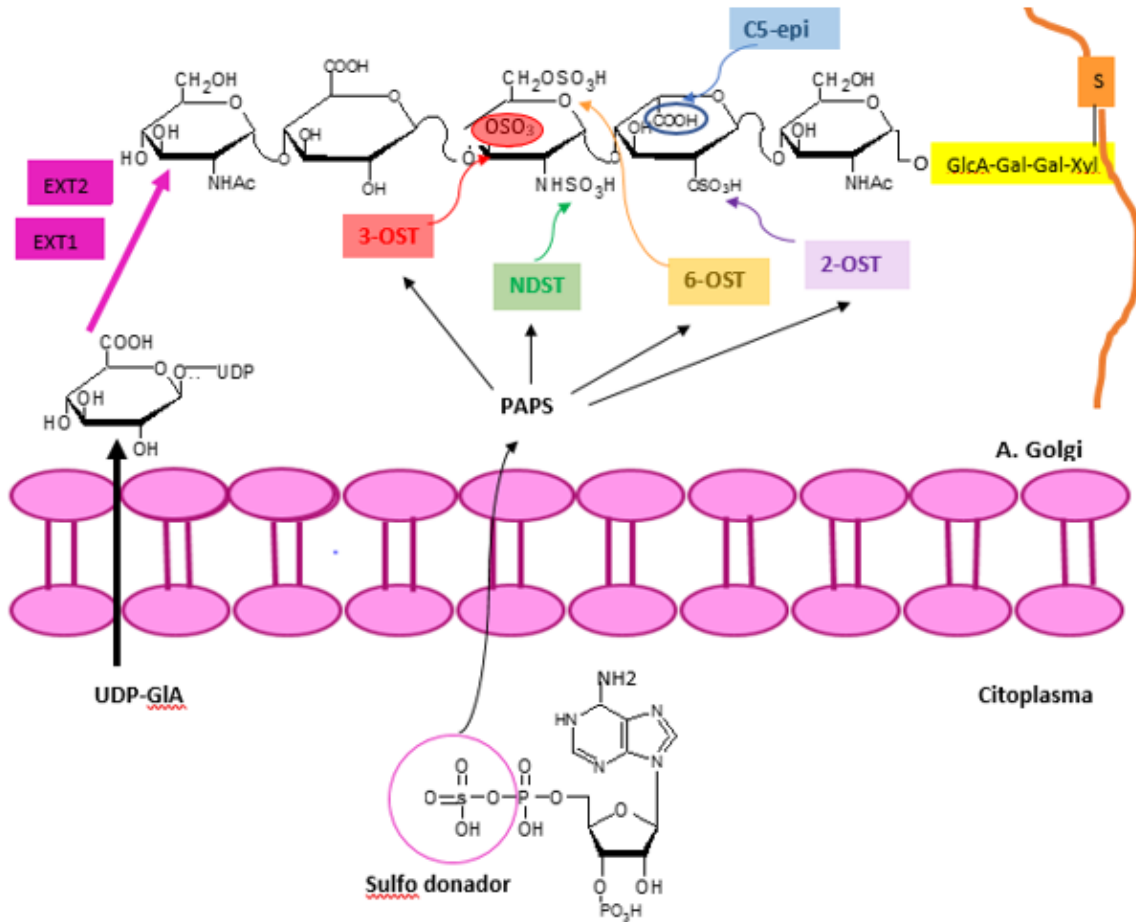


Figura 5. Biosíntesis de heparina

2. La síntesis de heparinas en la actualidad

Actualmente la fuente principal de producción de HBPM es el intestino de porcino, además es la única aprobada actualmente por la FDA, contiene una gran cantidad de mastocitos, dónde se sintetiza la heparina a nivel endógeno. En primera instancia se usaron hígados caninos, bovinos, intestino y pulmón bovino, pero estos dejaron de usarse a raíz del brote de encefalopatía espongiiforme bovina. (12)

La primera fase de la producción tiene lugar en los mataderos, de dónde se obtienen los intestinos de origen porcino, se empapan en solución salina, a continuación se raspan para obtener las mucosas que son la parte de interés y se conservan en metabisulfito sódico. Todo este proceso se lleva a cabo de acuerdo a las cGMP y los despojos obtenidos tienen que cumplir con los requisitos de salud necesarios para que sean aptos para el consumo humano, garantizando así la seguridad del producto obtenido. El siguiente paso es la digestión, para precipitar la heparina de las células de la mucosa, se puede hacer mediante autólisis, digestión química o enzimática. A continuación, el objetivo es conseguir la heparina cruda, para ello, primero se resuspende con solución salina la heparina precipitada con en el paso anterior y a continuación se vuelve a precipitar con alcohol, para eliminar así los nucleótidos y las impurezas. El siguiente

paso es purificar la heparina, esto es realizado por una compañía farmacéutica, consiste en primer lugar en redissolver la heparina cruda, filtrarla para eliminar las proteínas, blanquearla y por último una nueva filtración para eliminar la solución salina que quede y un secado a vacío a altas temperaturas. De esta forma conseguimos una HNF. (13) (12)

A partir de la HNF podemos llegar a la HBPM por distintos métodos, bien a través cromatografía por exclusión de tamaño o por despolimerización química o enzimática. A nivel industrial, el más utilizado es la despolimerización. La despolimerización enzimática se lleva a cabo mediante el empleo de liasa II de heparinas aisladas de *Flavobacterium heparinum* que despolimerizan enzimáticamente la HNF. Por su parte, la despolimerización química se lleva a cabo mediante escisión peroxidativa, escisión con ácido nitroso, y eliminación química beta, así se obtienen entre otras la enoxaparina y dalteparina sódica. El problema de esta despolimerización química es que se generan una serie de artefactos, como el 2-6, anhidromanitol, de los que todavía no tenemos datos acerca de los efectos secundarios que pueden causar. (7)

3. Estrategias quimioenzimática para la síntesis de HBPM

Para llevar a cabo esta síntesis enzimática son necesarias, las enzimas, los donantes sulfos, para las correspondientes modificaciones y los polisacáridos como sustratos.

3.1 Obtención del esqueleto de heparina

El primer paso de la síntesis quimioenzimática de las heparinas, es la obtención de los polisacáridos. Estos se han obtenido del heparosán, ya que presenta la secuencia de disacáridos que se repite en la heparina GlcA-GlcNac y que es el cebador necesario para que las enzimas puedan iniciar la síntesis. (14)

Así a partir de este cebador, actúan dos de las enzimas de mayor relevancia en la síntesis la EXT1 y las EXT2, que permiten la elongación de la cadena de heparina al ir enlazando los disacáridos GlcNac y GlcA. EXT1 y EXT2 no han podido ser expresadas en *E. coli*, así pues, como sustituto de estas se usan respectivamente la glicosiltransferasa bacteriana de la cepa *E. coli* K5 (Kfi) y la heparosán sintetasa 2 de *Pasteurella multocida* (pmHS2). (7)

3.2 Modificaciones sobre el esqueleto de heparina.

3.2.1 Primera modificación: NDST

Sobre el esqueleto de heparina se producen una serie de modificaciones, la primera de ellas es llevada a cabo por la NDST. Esta si recordamos tiene una doble actividad, cada una de ellas localizada en un dominio independiente, actúa primero como desacetilasa transformando GINAc en GINH₂ y sobre esta con actividad NST dando lugar a GlcNs. Con la NDST ocurre algo similar que con las EXT, esta tiene un gran tamaño y es complicado expresarla en *E. coli* en grandes cantidades. Por otro lado, existen 4 isoformas de la misma en el genoma humano y cada una de ellas tiene distinta especificidad de sustrato. Además, se ha visto que el sustrato invitro de NDST no permite posicionar el residuo de GlcNs en un sitio específico, en consecuencia se forman mezclas de producto con distintos residuos de GlcNs en distintas posiciones y con distintos tamaños. Así para poder solucionar esto último, habría que llevar a cabo tras la síntesis un proceso de purificación bastante complejo que reduciría por tanto el rendimiento del proceso. (14)

De tal forma que la solución a todos estos problemas citados, se basa en expresar en *E. coli* únicamente el dominio que corresponde a la actividad *N*-sulfotransferasa (NST), lo que nos obliga a partir de un sustrato GlcNH_2 , (ya desacetilado) ya que no disponemos de la actividad desacetilasa. Ahora bien, no se pudo introducir directamente el GlcNH_2 al cebador usando KfiA o pmHS2, como alternativa se usó un residuo de UDP-*N*-trifluoroacetil glucosamina (UDP-NTFA) que actúa como análogo de UDP-GlcNAc. Este UDP-NTFA sí es un excelente sustrato de las glicosiltransferasas KfiA y pmHS2. A continuación, se llevó a cabo la reacción a condiciones básicas añadiendo hidróxido de litio que elimina el grupo *N*-trifluoroacetil y permite obtener el GlcNH_2 sobre el cual ya puede actuar la NST que expresamos en *E. coli* dando lugar al residuo GlcNS (Figura 6). Para llevar a cabo esta sulfatación se utiliza el donador PAPS del que se hablará más adelante. (14)

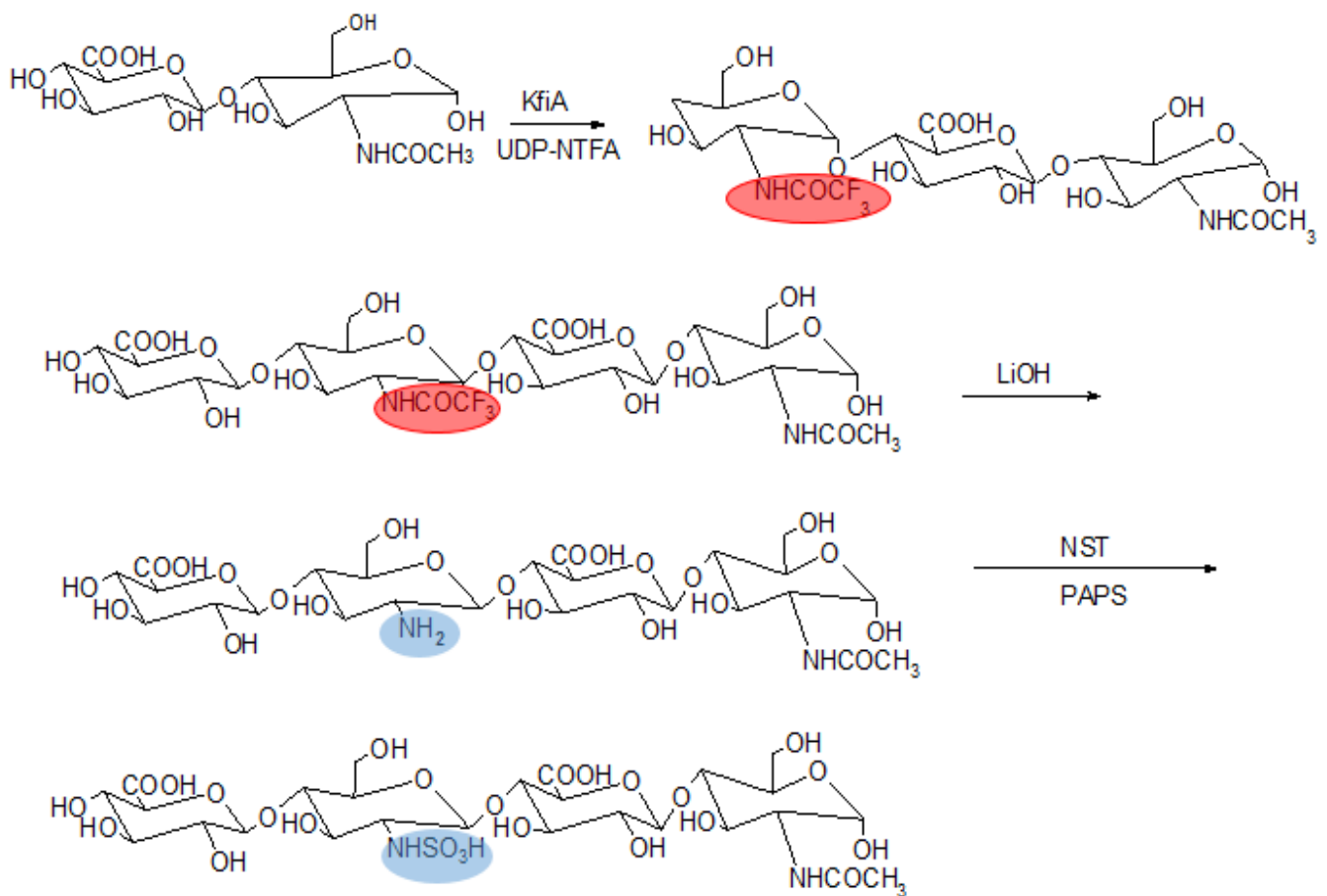


Figura 6. Transformación del esqueleto de heparina por NST

3.2.2 Segunda y tercera modificación por C-epimerasa y 2-OST.

La segunda modificación que se produce es la llevada a cabo por la C-5epimerasa, que se encarga de transformar reversiblemente el GlcA en IdoA. Esta enzima se logró expresar en *E. coli* a través de un plásmido y se obtuvo también a partir de células de insecto mediante la expresión en un baculovirus. Por su parte, la 2-OST encargada de la tercera modificación actúa sulfatando la posición C2 de los residuos IdoA con preferencia sobre los GlcA. Esta enzima se ha conseguido expresar en *E. coli* en forma de proteína de fusión de maltosa y en *K. lactis*.

A diferencia de lo que ocurría con la NSTD, C-5epimerasa solo se presenta en una isoforma y el gen que la codifica se sitúa en el cromosoma 9. Esta enzima se encuentra unida a la membrana, por tanto, para que pueda llevar a cabo su actividad sobre el esqueleto de heparina, tiene que translocarse al aparato de Golgi, pero se ha visto que para que esto ocurra es necesaria la presencia de 2-OST. Además, esta permite que tras sulfatar el residuo IdoA (IdoA2), formado por la C5-epimerasa, este no se transforme de nuevo en un residuo GlcA, ya que la actividad de esta enzima si recordamos es reversible. Las reacciones se producen sobre el residuo de GlcA que se filtra por un residuo de GlcNS entre los extremos reductor y no reductor. (14)

Esto se realizó sobre un heptasacárido que contenía tres residuos de GlcA, a los que se denominó: Gu2, Gu4 y Gu6, al incubarlos con C5-epimerasa y 2-OST se vio que solo el residuo Gu4 había sido transformado en IdoA2 y que el resto permanecieron igual (Figura 7). (14)

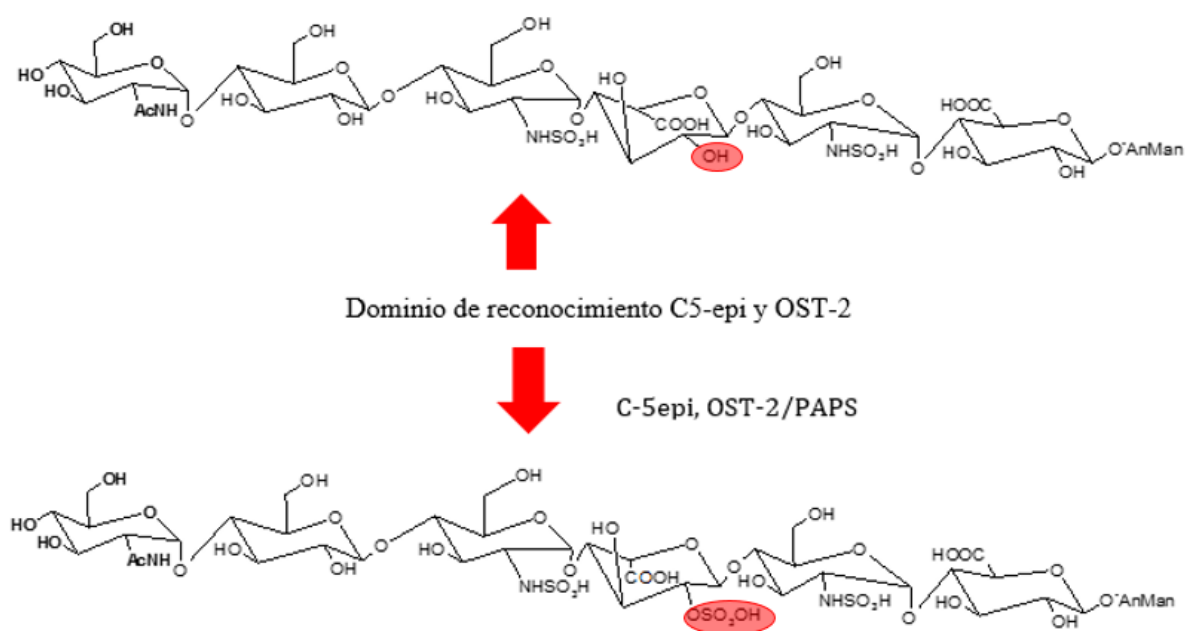


Figura 7. Obtención del residuo IdoA2 sulfatado en un heptasacárido

3.2.3: Cuarta modificación: Sulfatación por 6-OST

La 6-OST es la enzima encargada de llevar a cabo la sulfatación en posición C6 sobre los residuos GINS y GlcNac, formando GINS6S y GlcNac6S respectivamente. Existen 3 isoformas distintas de esta enzima pero se ha visto que todas ellas tienen prácticamente la

misma especificidad por los sustratos (15). 6-OST-1 y 6-OST-3 se han podido expresar como una proteína de fusión de la proteína de fusión a maltosa y cada una de ellas por separado también se han logrado expresar en células Origami de *E. coli* y en levaduras. (14)

Para conseguir que la sulfatación se lleve a cabo en la posición C6 sobre GlcNAc y no sobre GlcNS, se desarrolló una estrategia enzimática. El objetivo fue introducir un grupo 6-O-sulfo en un residuo de glucosamina (Gu4) cercano al extremo reductor de un hexasacárido. Para ello primero se introdujo el grupo 6-O-sulfo en el Gu4 de un tetrasacárido y después este se elongó hasta conseguir un hexasacárido, así de esta forma se logró la sulfatación específica en Gu4 y no en Gu2. (Figura 8).

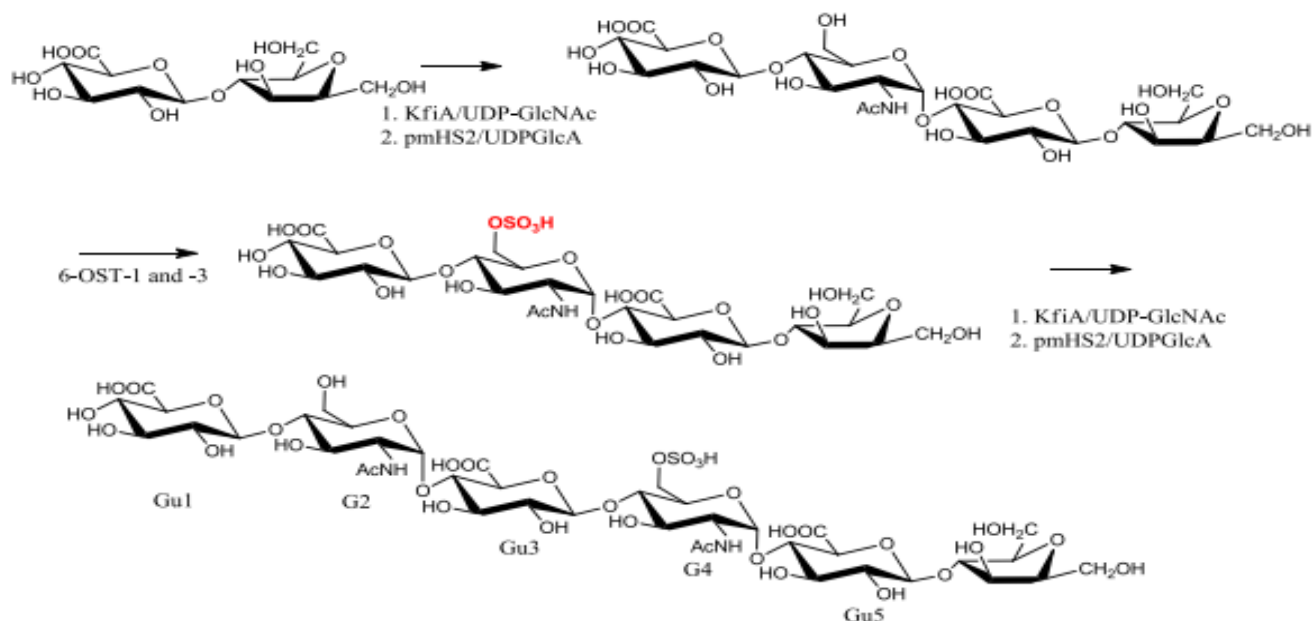


Figura 8. Estrategia de 6-O-sulfatación sobre un residuo Gu4 (14).

3.2.4: Quinta modificación: Sulfatación por 3-OST

La 3-OST lleva a cabo la sulfatación en C3 sobre residuos de glucosamina vinculados a residuos GlcA y e IdoA. Distintas isoformas de esta enzima se han expresado en *E. coli* o en células de insectos mediante expresión en baculovirus. Existen hasta 7 isoformas (3-OST- 1, -2, -3A, -3B, -4, -5 y -6) y cada una de ellas lleva a cabo la 3-O-sulfatación sobre GlcNS situados en distintas localizaciones del esqueleto de heparina . 3-OST-1 lleva a cabo la sulfatación sobre el GlcNS situado en un residuo de IdoA o GlcA; 3-OST-2, -3A,-3B,-4,-6 sulfatan al residuo GlcNS enlaza a IdoA2S del extremo no reductor y 5-OST por su parte sulfata el GlcNS localizado en residuos IdoA, IdoA2 o GlcA. Así según lo que queramos sintetizar será necesario usar una isoforma de la enzima u otra, las más empleadas para la síntesis y expresadas en *E.coli* son 3-OST-1, 3-OST-3 y 3-OST-5. (14)

3.3 Donador sulfo para las N-Sulfataciones

Para llevar a cabo estas N-sulfataciones y el resto de las necesarias, se requieren como a nivel endógeno los donares sulfo, PAPS, el problema es que estos tienen un alto coste, por ello se han buscado distintas estrategias para mejorar este paso. Una de las estrategias consiste

en regenerar los PAPS, estos donan su grupo sulfo, de tal manera que para que puedan volver a utilizarse es necesario, que recuperen este grupo, para ello se ha empleado la enzima aril-sulfotransferasa-IV (AST-IV) (Figura 9). Esta en presencia elevada de p-nitrofenil sulfato lo que hace es catalizar la transferencia de un grupo sulfato desde el p-nitrofenil sulfato (sustrato mucho más barato que los PAPS) , hasta el PAP, obteniéndose de nuevo PAPS, ya listo para poder volver a usarse en la síntesis de la heparina como donadores sulfo. A pesar de esto, este es uno de los pasos limitantes de la síntesis, debido al elevado coste que supone la obtención inicial de PAPS , una de las opciones más rentables es expresar la pirofosfatasa de *E.coli* , la APS quinasa de *Penicillium chrysogenum* y la ATP sulfurilasa de *Kluyveromyces lactis* en un mismo recipiente, así a partir de ATP y sulfato por la acción de estas enzimas obtenemos PAPS de forma mucho más económica. (Figura 10). (7)

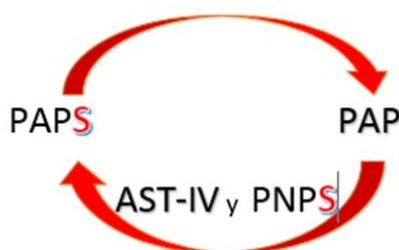


Figura 9. Reciclaje de PAPS

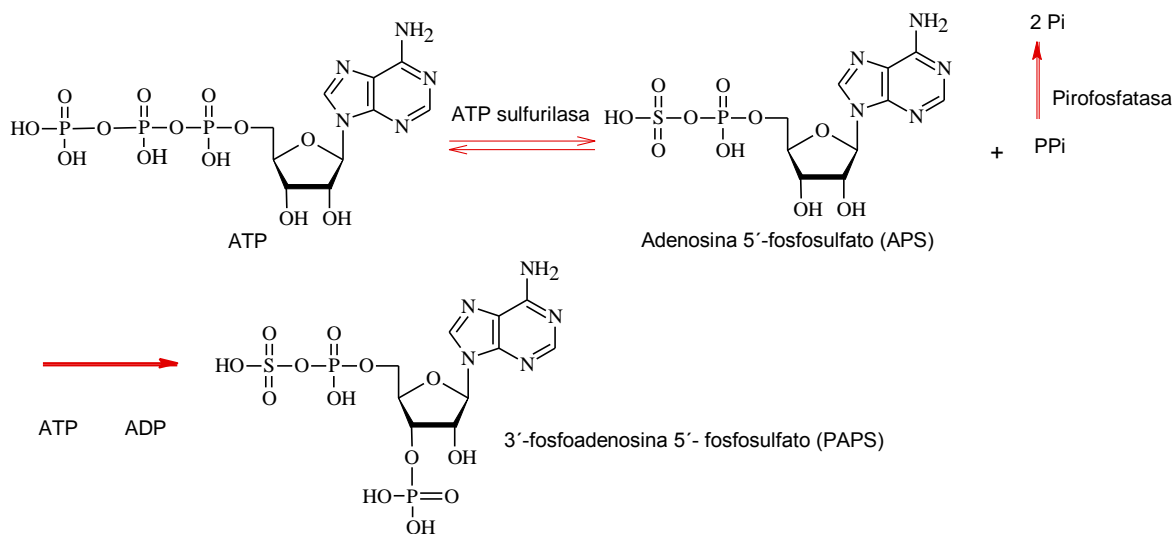


Figura 10. Obtención de PAPS a partir de ATP

4. Síntesis química y estrategias quimioenzimática para síntesis de HUBPM

Hace ya una década, se sintetizó químicamente una heparina de ultrabajo peso molecular, fondaparinux bajo el nombre comercial Aritxa, esta contiene únicamente el pentasacárido de unión a ATIII, necesario para la inhibición del factor Xa. Su uso está aprobado en el tratamiento de la trombosis venosa profunda el problema, es el elevado precio que tiene, debido a lo costosa que es su síntesis ya que requiere numerosos pasos, unos 50 (16,17). Además, su rendimiento es bajo (0,1%), por eso se han buscado otras alternativas, ya quimioenzimáticas, para mejorar el proceso. Se consiguió elaborar una en 12 pasos, empleando polimerasas para la formación y elongación del esqueleto y distintas enzimas encargadas de las modificaciones

como la C5-epimerasa y distintas sulfotransferasas. La HUBPM conseguida en esta síntesis en 12 pasos tuvo un perfil anticoagulante muy similar al de fondaparinux. (16,18)

Se elaboraron dos HUBPM con los dominios de unión a AT III tanto de la heparina porcina como bovina, por métodos quimioenzimáticos, para tratar de solventar los problemas anteriores. Además una de ellas tiene una estructura parecida a la heparina humana (heparina 1) y la otra tiene la misma estructura que fondaparinux salvo por la sustitución de una aglicona de metilo por un disacárido (heparina 2).

Para la síntesis de ambas se partió de un disacárido (Figura 11), para ir elongando la cadena y formar el esqueleto de las heparinas, en este caso un tetrasacárido, se emplearon dos glicosiltransferasas ya citadas antes KfiA y pmmH2, cada una en un paso (a,b, Figura 11). A continuación, se introdujo el monosacárido no natural (GlcNTFA) y apartir de este tetrasacárido (4) la síntesis se bifurcó para dar las dos HUBPM. Para la síntesis de la heparina 1, se elongó el tetrasacárido hasta un heptasacárido mediante 3 pasos (a,b,c) alcanzando un rendimiento del 80% y a continuación se llevaron a cabo 5 pasos (d,f,g,h) para realizar las modificaciones del esqueleto de heparina, primero la transformación de GlcNTFA a GlcNS en medio básico y después la actuación de C-5epi, 2-OST, 6-OST y 3-OST, cada una en un paso, llegando así hasta la heparina 1 (Figura 11). (16)

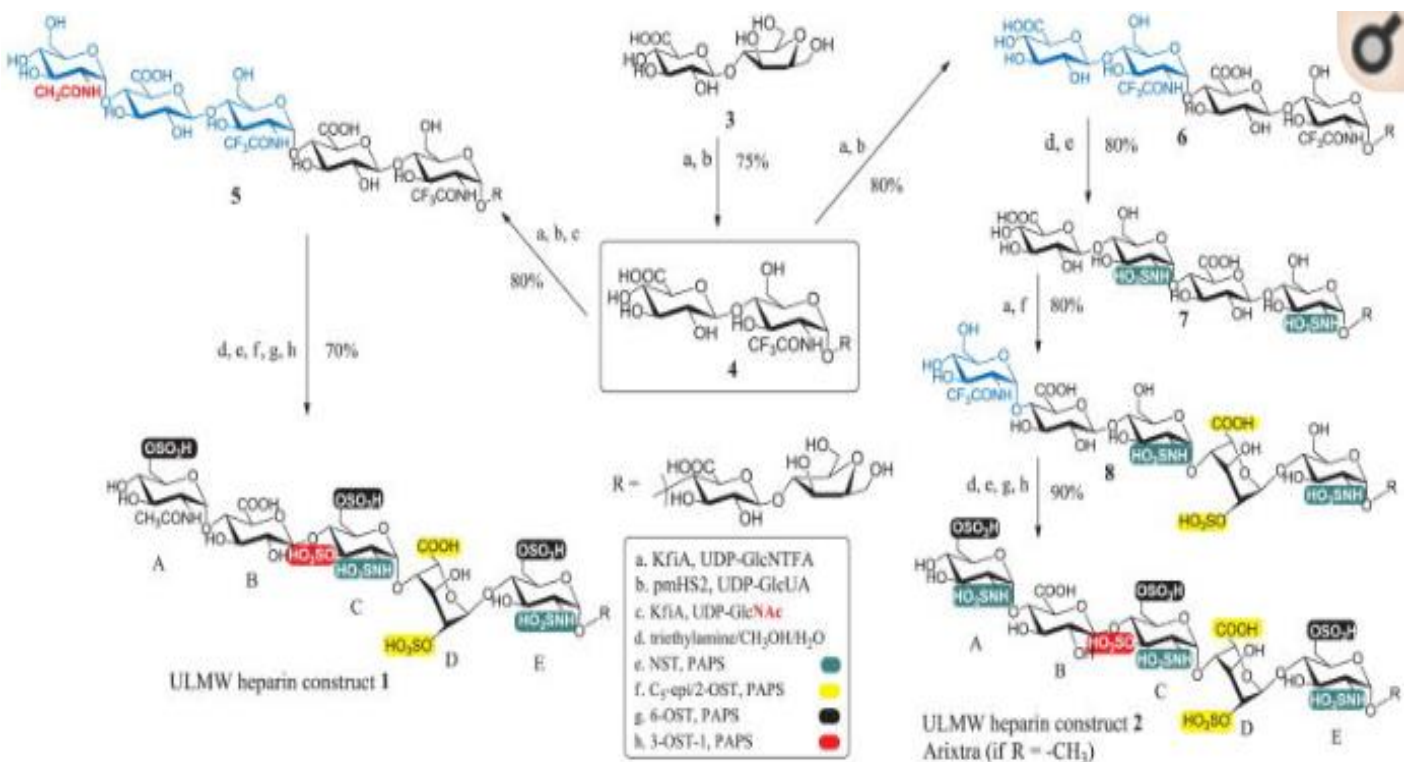


Figura 11. Síntesis quimioenzimática de dos HUBPM (16).

Para la síntesis de la heparina2 a partir del tetrasacárido se realizaron 10 pasos, dos para convertirlo en un hexasacárido, (a,b) otros dos para formar un hexasacárido con residuos N-sulfo en lugar de N-TFA (d,e). A continuación, en otro paso este se elongó hasta heptasacárido (a) con un extremo no reductor GlcNTFA para evitar más tarde que C5-epi y 2-OST actuen sobre GlcA. Este se trato con C5-epi y 2-OST (f). Y el resultado de ello se introdujo en un único recipiente junto con el monosacárido no natural, NST, 6-OST, 3-OST y PAPS para finalizar la

síntesis y obtener así la heparina² (Figura) . Este proceso en total se realizó en 12 pasos con un rendimiento del 37%. (16)

Después, se comprobó que tanto las afinidades de unión a AT III, como las IC₅₀ de ambas HUBPM eran muy similares a las de fondaparinux y además se habían conseguido por un proceso mucho más corto, sencillo y menos costoso.

5. Progresos en las heparinas gracias a la síntesis quimioenzimática

El desarrollo quimioenzimático de la síntesis de heparinas, ha permitido descubrir que ciertos problemas, de los citados al comienzo del texto, como la falta de un antídoto que neutralice la heparina totalmente pueden ser resueltos. Además, aunque lejos de lo deseable gracias a estas estrategias también se ha logrado una síntesis mucho más rápida y menos costosa de HUBPM, similares a fondaparinux.

Una muestra de ello es que se sintetizaron una serie de HBPM de distintos tamaños, 6,8,10 o 12 residuos de azúcar que se denominaron, por su tamaño 6mer, 8mer, 10mer y 12mer respectivamente, presentando todos ellos el pentasacárido responsable de la actividad. Para ello se partió de un monosacárido comercial (1-O- (para-nitrofenil) -glucurónido (GlcA-pNP), para elongar el esqueleto de heparina se usaron las glicosiltransferasas ya citadas anteriormente, KifiA y pmmH2 y para las modificaciones las enzimas ya vistas (2-OST, 6-OST, NST etc). (7,19)

Una vez sintetizadas se compararon tanto in vitro como in vivo con otras HNF y se vio que la actividad anticoagulante era mayor. Además, se estudió la capacidad de la protamina para neutralizar estas HBPM sintéticas y se comprobó que dependiendo del tamaño de estas, la sensibilidad a la protamina variaba. Al parecer las más pequeñas constituidas por 6, 8 y 10 azúcares seguían mostrando una sensibilidad baja, pero la más grande (12 azúcares), mostraba una sensibilidad mayor aunque no lo suficiente para que fuera totalmente neutralizada por la protamina. Así pues lo que se hizo a continuación fue modificar esta de 12 azúcares, sulfatandola y se comprobó en un ratón ex vivo que esta sí que era neutralizada totalmente por protamina al igual que las HNF (7). Por tanto, parece ser que no solo es importante el tamaño de la HBPM sino también el patrón de sulfatación para su neutralización por la protamina. La ventaja es que la síntesis quimioenzimática nos permite sintetizar HBPM de distintos tamaños y con patrones de sulfatación variados, así pues tarde o temprano parece ser que se logrará una HBPM que se neutralice totalmente por la protamina y cumpla con el resto de requisitos para ser usada clínicamente de forma segura y eficaz.

CONCLUSIONES

Las heparinas fueron descubiertas hace ya más de un siglo, desde entonces han supuesto una gran herramienta terapéutica para el tratamiento de muchos pacientes, en distintas situaciones clínicas como la trombosis venosa profunda, enfermedad tromboembólica profunda, embolismo pulmonar, síndrome coronario agudo entre otras. Además, siguen siendo unos de los anticoagulantes más empleados.

La historia, al final como en todo permite aprender de los errores cometidos, la síntesis de heparinas no ha sido fácil y se han cometido errores, que han conducido a la contaminación del medicamento y con ello la muerte de hasta 100 personas en EEUU en 2008. Esto y la

ambición por mejorar y lograr heparinas, más seguras, más eficaces, más sencillas de obtener, menos contaminantes y más baratas han hecho que numerosos científicos hayan puesto todo su empeño en desarrollar nuevas técnicas para conseguirlo, como es la síntesis quimioenzimática. Tal y como se ha visto en este trabajo son múltiples los avances realizados, pero toda vía queda mucho para satisfacer la demanda anual de 100 toneladas y obtener la heparina ideal, con las características citadas, pero estamos en el camino.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guillermo J. Ruiz Argüelles. Guillermo J. Ruiz Delgado. Fundamentos de Hematología. Capítulo 18 Fisiología. [Internet]. 5ª Edición. México: Panamericana; 2014. Disponible en: <https://www-medicapanamericana-com.bucm.idm.oclc.org>
2. Bertram G. Katzung. Susan B. Masters. Anthony J. Trevar. Farmacología básica y clínica. 11ª Edición. México. Mac Graw Hill Interamerica; 2010. Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com>
3. Javier Anguita-Velasco. Ventana a otras especialidades: Indicaciones y utilización de las heparinas de bajo peso molecular. GH [Internet]. 2006; 5 (1): 38-41. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-continuada-8-pdf-70000314>
4. Laercio Pol-Fachin y Hugo Verli. Glicobiología estructural de la dinámica de la heparina en el exosito 2 de las proteasas en cascada de la coagulación: Implicaciones para la actividad antitrombótica de los glicosaminoglicanos. Glycobiology, Volumen 24, Número 1, enero de 2014, páginas 97-105. Disponible en: <https://academic.oup.com/glycob/article/24/1/97/1988546>
5. Gettins, PG, y Olson, ST. Serpinas inhibitorias. Nuevos conocimientos sobre su plegado, polimerización, regulación y liquidación. La revista bioquímica (2016), 473 (15), 2273-2293. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5266585/>
6. Liu, H., Zhang, Z., y Linhardt, RJ. Lecciones aprendidas de la contaminación de la heparina. Informes de productos naturales (2009) , 26 (3), 313-321. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3498470/>
7. Chandarajoti, K., Liu, J., y Pawlinski, R. Diseño y síntesis de nuevas heparinas sintéticas de bajo peso molecular. Diario de trombosis y hemostasia (2016): JTH , 14 (6), 1135-1145. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4907857>
8. Humberto Martín Brieva. Fundamentos de Biotecnología farmacéutica. Edición 1ª Madrid: Dextra; 2018.
9. John E. Smith. Biotecnología. 4ª Edición. Zaragoza. Acribia S.A; 2004
10. Pilar Cabildo Miranda. Pilar Cornago Ramírez. Consuelo Escolástico León. Soledad Esteban Santos. Mª de los Ángeles Farrán Morales. Marta Pérez Torralba. Dionisa Sanz del Castillo. Procesos orgánicos de bajo impacto ambiental. Química verde [Internet]. 1ª Edición. Madrid. UNED EDITIONS; Disponible en:

<https://ebookcentral.proquest.com/lib/universidadcomplutensebooks/reader.action?docID=3202913>

11. www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/antiagregantes.pdf
12. Vaidyanathan, D., Williams, A., Dordick, JS, Koffas, M., y Linhardt, RJ. Heparinas de ingeniería como nuevos fármacos anticoagulantes. *Bioingeniería y medicina traslacional* (2016), 2 (1), 17–30. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5412866/>
13. . Van der Meer, JY, Kellenbach, E., y van den Bos, LJ. De la granja a la farmacia: una descripción general de los métodos de fabricación de heparina industrial. *Moléculas* (2017), 22 (6), 1025. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6152658/>
14. Xianxuan Zhou, Timothy R. O'Leary, Yongmei Xu, Juzheng Sheng y Jian Liu. Síntesis quimioenzimática de sulfato de heparán y heparina, *Biocatálisis y biotransformación* (2012), 30: 3, 296-308.
15. Li Fu, Matthew Suflita y Robert J. Linhardt. Heparinas de bioingeniería y heparán sulfatos. *Revisiones avanzadas de administración de medicamentos*. Elsevier 2016. (97): 237-249
16. Xu, Y., Masuko, S., Takeddin, M., Xu, H., Liu, R., Jing, J., ... Liu, J. (2011). Síntesis quimioenzimática de heparinas de peso molecular ultra bajo homogéneas. *Science* (2011) , 334 (6055),498-501. Disponible://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3425363/
17. Oduah, EI, Linhardt, RJ y Sharfstein, ST (2016). Heparina: Pasado, Presente y Futuro. *Productos farmacéuticos* (2016) , 9 (3), 38.
18. Matthew Suflita¹, Li Fu, Wenqin He, Mattheos Koffas y Robert J. Linhardt. Heparina y polisacáridos relacionados: síntesis utilizando enzimas recombinantes e ingeniería metabólica. *Microbiol Biotechnol* (2015) 99:7465–7479.
19. Xing Zhang, Vijayakanth Pagadala, Hannah M. Jester, Andrew M. Lim, Truong Quang Pham,^cAnna Marie P. Goulas,^b Jian Liu and Robert J. Linhardt. Síntesis quimioenzimática de heparán sulfato y oligosacáridos de heparina y análisis de RMN: pavimentación. El camino a una biblioteca diversa para glicobiólogo. *Chem Sci* (2017): 8,7932.