



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
EMPLEO DE BIOCATALIZADORES PARA LA
OBTENCIÓN DE SINTONES ÚTILES EN LA
PREPARACIÓN DE FÁRMACOS I.

Autor: JUAN IGNACIO ALCARAZ LÓPEZ

Tutor: ANDRÉS R. ALCÁNTARA LEÓN

Convocatoria: JUNIO

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	2
USO DE ENZIMAS AISLADAS FRENTE A CÉLULAS COMPLETAS	6
MÉTODOS DE ESTABILIZACIÓN	5
OBJETIVOS	7
METODOLOGÍA	7
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
SAXAGLITPINA.....	8
SÍNTESIS QUÍMICA VS BIOCATÁLISIS	10
CONCLUSIONES	17
BIBLIOGRAFÍA	18

RESUMEN

La síntesis de fármacos es un campo al que puede ser aplicada la biocatálisis. Esta consiste en el empleo de enzimas purificadas o que forman parte de una célula, con el objetivo de convertir sustratos en productos que suelen ser diferentes a los que la enzima genera de manera natural, este procedimiento se enmarca en la biotecnología industrial y la química sostenible. De este modo la síntesis de fármacos se beneficia de la estereoselectividad, quimioselectividad y regioselectividad que ofrecen las enzimas, sus condiciones de trabajo más suaves y mayores rendimientos. Todo ello reporta unos menores costes de producción y una industria más sostenible.

En el presente trabajo se desarrolla una revisión biobibliográfica acerca de la síntesis de la saxagliptina, un fármaco oral empleado frente a la diabetes tipo II, que actúa inhibiendo la dipeptidilpeptidasa IV. Este fármaco presenta ocho esteroisómeros diferentes de los cuales, el esteroisómero 2'S,2S,cis es el empleado terapéuticamente.

La retrosíntesis de este fármaco nos muestra dos sintones: (S)-N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina y N-Boc-L-cis-4,5-metanoprolinamida, para los cuales existen desarrollados procedimientos de biocatálisis que efectúan algún paso de su síntesis. En el caso de (S)-N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina la biocatálisis se efectúa por *Escherichia coli* JM110, que expresa fenilalanina deshidrogenasa y formato deshidrogenasa para catalizar, con un porcentaje de 80 – 100% de rendimiento y una pureza enantiomérica del 98%, la reducción de un grupo cetona a una amina. La síntesis del sintón N-Boc-L-cis-4,5-metanoprolinamida cuenta con un procedimiento de biocatálisis en el que se emplea la enzima lipasa B de *Candida antarctica* para efectuar la formación de una amida desde un éster de etilo con un rendimiento del 98% y sin racemización.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La expansión de la población humana a partir la II Guerra Mundial, pasando de 2.500 millones de personas hasta los 5.000 millones en 1987, siendo las estimaciones hoy en día de más de 7.000 millones de personas causó un aumento en las necesidades que se debían satisfacer y con ello de los recursos que se debían emplear para cubrirlas (8). Este hecho llevó en los años 80 a que se tomara conciencia sobre el deber de cubrir estas necesidades de una manera sostenible, de tal modo que las necesidades del presente no condicionaran capacidad de las futuras generaciones de satisfacer sus propias necesidades. Es en esta reflexión donde se enmarca la

química sostenible, que podríamos definir como, aquel uso de la química que se vale de los recursos existentes en un ratio en el cual pueden ser reemplazados de manera natural y cuya generación de desperdicios no es superior al ratio de su remediación (9). Dentro de la química sostenible encontramos la biocatálisis, o lo que es lo mismo, el empleo de enzimas purificadas o que forman parte de una célula, con el objetivo de convertir sustratos en productos que suelen ser diferentes a los que la enzima genera de manera natural (10). La biocatálisis es a su vez parte un campo mayor la biotecnología, definida por la Federación Europea de Biotecnología como el uso integrado de la bioquímica, la microbiología y la ingeniería genética para poder aplicar las capacidades de microorganismos, células cultivadas animales o vegetales o parte de los mismos en la industria, en la salud y en los procesos relacionados con el medioambiente (11).

La biocatálisis aplicada a la obtención de sintones útiles en la preparación de fármacos se enmarca en la biotecnología industrial o biotecnología blanca, está relacionada con la elaboración de producir bienes y servicios usando organismos y materiales biológicos consiguiendo de este modo procesos medioambientalmente sostenibles, lo que la convierte en parte de la química verde y hace que este desplazando a la industria convencional (12). El uso de esta tecnología que desplaza a la síntesis química tradicional se debe no solo a una preocupación por el hecho de tener que cubrir unas necesidades cada vez más elevadas con unos recursos que son limitados como hemos visto en la introducción, sino a las ventajas que a continuación se exponen:

La biocatálisis nos ofrece un abaratamiento en los costes de producción, si bien el coste de producción de los biocatalizadores encargados de realizar las biotransformaciones puede llegar a ser elevado, estos costes se ven disminuidos cuando la producción se realiza a grandes escalas y se reutilizan. Este último dato nos indica el carácter medioambientalmente sostenible de esta técnica, ya no solo por la capacidad de reutilizar los biocatalizadores cuando estas se encuentran inmovilizadas, a lo que hemos de sumar que al tratarse de sistemas biológicos son completamente degradables. Su uso frente a los de catalizadores tradicionales nos permita adquirir una mayor eficiencia catalítica, velocidades de reacción entre 10^8 - 10^{10} veces superior a aquellas reacciones no mediadas por enzimas y todo ello se consiga con concentraciones únicamente de entorno al 10^{-3} - 10^{-4} % en porcentaje molar, da lugar también a un abaratamiento de los costes de producción (13).

El empleo de biocatalizadores nos ofrece modificar las condiciones de trabajo para conseguir llevar a cabo las biotransformaciones en condiciones más suaves, que aquellas en las que de manera habitual se desarrollan los procesos, ya que su actividad en muchos casos se da en un rango de pH de 5 a 8 y en unas temperaturas entre 20°C y 40°C (13).

Una gran ventaja ofrecida por los biocatalizadores es la habilidad de emplear sustratos y operar bajo condiciones diferentes a las que de manera natural se dan cuando estas desarrollan su papel biológico. Este hecho se conoce con el concepto de promiscuidad, propiedad que muestran algunas enzimas cuando se encuentran *in vitro*, de manera práctica podemos considerar varios tipos: promiscuidad de las condiciones de uso de la enzima presentada por aquellas que poseen actividad catalítica en condiciones de reacción diferentes a las naturales, tales como medios anhidros, temperaturas o pHs extremos; promiscuidad del sustrato enzimático se da en las enzimas con una laxa especificidad sobre el sustrato que catalizan; promiscuidad catalítica, es decir, enzimas que tiene la capacidad de catalizar diferentes transformaciones químicas con diferentes estados de transición, además, puede darse de manera accidental: una reacción secundaria catalizada por el tipo salvaje, o de manera inducida: una nueva reacción establecida por una o varias mutaciones que reencaminan la reacción catalizada por el tipo salvaje (14).

A todos estos puntos anteriormente explicados debemos sumar varios aspectos muy importantes que nos aportan las biotransformaciones, ya que al tratarse de reacciones catalizadas por enzimas vamos a conseguir: quimioselectividad, regioselectividad, y estereoselectividad. Estas propiedades son de gran importancia en la industria farmacéutica en la cual la obtención de un enantiómero de manera pura puede ser vital en ciertos casos, puesto que cada enantiómero presenta una actividad completamente distinta, (Ilustración 4), y en algunos casos solo uno de los enantiómeros es activo (Ilustración 1) (13).

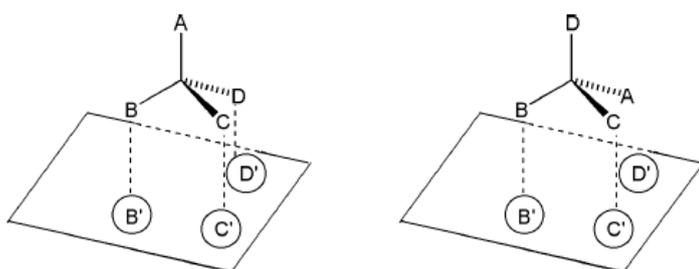


Ilustración 1. Modelo de la interacción por tres puntos (7).

De manera que la quimioselectividad nos asegura que solo van a tener lugar las reacciones catalizadas por la enzima, de este modo evitamos reacciones secundarias con grupos funcionales muy reactivos o similares presentes en el sustrato, lo que evita la aparición de productos secundarios (15). La regioselectividad viene derivada en este caso de la estructura terciaria de la enzima que hace que la reacción solo pueda llevarse a cabo en caso de que la

conformación espacial de la molécula que actúa como sustrato coincida con la de su centro catalítico. La estereoselectividad deriva de la composición estructural de las enzimas están compuestas por L-aminoácidos y debido a ello son catalizadores quirales. Como consecuencia, cualquier tipo de quiralidad presentada en el sustrato será reconocida una vez que se forme el complejo enzima-sustrato, por lo que podrán distinguir entre diferentes enantiómeros y diastereoisómeros (13).

Los anteriores párrafos muestran las fortalezas que se derivan del empleo de biocatalizadores, pero para poder ser capaces de comprender si su uso está justificado o no debemos conocer los puntos débiles que se derivan de su uso, estos son:

El empleo de los biocatalizadores nos otorga quiralidad enzimática que para cada uno será siempre la misma debido a la imposibilidad de emplear D-aminoácidos en la formación de enzimas, por lo que no es posible invertir la quiralidad de una reacción empleando el mismo biocatalizador, estrategia permisible con los catalizadores químicos, este problema solo puede paliarse en el caso de seguir empleando la biocatálisis buscando otra enzima diferente que lleve a término la reacción con la quiralidad inversa (13).

En algunos casos los biocatalizadores necesitan de la presencia de cofactores para ejercer sus funciones de manera correcta, cofactores como el NAD^+/NADH o ATP, que son inestables y presentan un precio muy elevado. En este caso para evitar la necesidad de regeneración externa del cofactor se puede recurrir a emplear la célula de manera completa, siendo esta la encargada de regenerar (13)

Las enzimas presentan una tendencia a sufrir fenómenos de inhibición por parte del sustrato o del producto cuando se modifica la proporción de uno de los dos, cuando la inhibición es realizada por el sustrato podemos actuar manteniendo disminuida su concentración de estos, en el caso de la inhibición por producto la solución requiere de su retirada (13)

Finalmente, al tratarse de productos biológicos pueden dar lugar a la aparición de alergias, por lo que deben ser controlados de igual manera que los catalizadores químicos y manejados con el mismo cuidado (13).

MÉTODOS DE MEJORA DE LOS PROCESOS BIOCATALÍTICOS

El desarrollo de los procedimientos de biocatálisis implica diversos métodos como pueden ser: la ingeniería de proteínas y la ingeniería del medio de reacción. Con estos métodos se pretende

conseguir unas condiciones de trabajo más favorables, mayores rendimientos rendimiento y convertir los procesos en medioambientalmente sostenibles.

La ingeniería de proteínas nos permite modificar la función de las proteínas o incluso dotarlas de una nueva función catalítica, este proceso se produce mediante evolución dirigida, que trata de seguir misma estrategia que emplea la naturaleza, esto es posible gracias a los avances en biología molecular que nos permiten leer y modificar secuencias genéticas, lo que nos capacita para crear enzimas en el laboratorio que sean capaces de operar bajo las condiciones que nosotros deseemos. El procedimiento consiste en introducir mutaciones en enzimas preexistentes y buscar cuales de los mutantes han adquirido funcionalidades útiles, estas a su vez serán empleadas como punto de partida para la siguiente búsqueda de mutantes, este ciclo se mantendrá de manera hasta que se consiguen las características deseadas (16, 17).

La ingeniería del medio de reacción consiste en variar las condiciones en las que se va a llevar a cabo la producción, hasta que se consigan los máximos niveles de estabilidad y actividad. Esta parte es muy importante ya que influye no solo en la actividad y estabilidad del biocatalizador, sino que también afectará a la dirección en la que se desarrollará la reacción (16).

USO DE ENZIMAS AISLADAS FRENTE A CÉLULAS COMPLETAS

La definición de biocatálisis nos indica que se puede recurrir tanto a células completas como a enzimas en estado aislado la elección de una u otra forma como biocatalizador dependerá de factores como el tipo de reacción, la necesidad de cofactores, la escala en la que se va a realizar el proceso... Cada una de las formas nos ofrece unas ventajas y también unos inconvenientes que se deberán valorar a la hora de tomar la decisión, los principales son:

En un primer momento la comparativa entre enzimas aisladas y células completa nos arroja: una simplificación en el modelo de trabajo y una alta productividad debido a la mayor concentración enzimática tolerada cuando recurrimos a enzima aislada nos otorga, siendo su desventaja la necesidad de reciclar de manera exógena los cofactores necesarios para el proceso. En el caso de que se optara por emplear la célula entera este problema de reciclaje de los cofactores no existiría, pero nos encontraríamos con la necesidad de un equipo de trabajo más caro y con unos procedimientos de trabajo más largos debido a los grandes volúmenes generados, también observaríamos que la productividad disminuiría a consecuencia de menor concentración de biocatalizador tolerada, de igual modo pasa con el empleo de disolventes

orgánicos, finalmente nos encontramos con la posibilidad de sufrir reacciones secundarias desencadenadas por el metabolismo celular (13).

OBJETIVOS

El objetivo es mostrar una visión de la biocatálisis mostrando sus ventajas e inconvenientes, los procedimientos de los que se vale ofreciendo una visión de la aplicación de los procesos de biocatálisis en el ámbito de la síntesis de fármacos mediante la comparación de la síntesis química del fármaco saxagliptina frente a los métodos de síntesis con la ayuda de biocatálisis.

METODOLOGÍA

La metodología para la realización del presente trabajo de fin de grado consistió en una revisión bibliográfica en la que se han empleado las bases de datos SCOPUS, Web of Science, SciFinder y PUBMED. Se ha empleado en las tres primeras bases de datos el acceso remoto proporcionado por la biblioteca de la Universidad Complutense de Madrid. Ha sido necesario, así mismo, consultar patentes las cuales se han obtenido de la página web freepatentsonline.com.

Como buscador bibliográfico se ha recurrido también al buscador BUCEA de la biblioteca de la Universidad Complutense de Madrid, a través del cual se ha obtenido acceso a revistas científicas del CSIC y de la Real Academia de Farmacia, y libros en formato electrónico. Se ha consultado bibliografía en formato físico obtenida de la biblioteca de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Las palabras clave en la búsqueda ejercida en las bases datos anteriormente mencionadas han sido: *saxagliptin, synthesis, biocathalysis, white biotechnology*.

Finalmente, la elaboración de bibliografía de la presente memoria se ha elaborado con el programa EndNote.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SAXAGLITPINA

La saxagliptina (*Ilustración 2*) desarrollada por Bristol-Myers Squibb, fue aprobada por la Federal Drugs Administration (FDA) el 31 de julio de 2009 (2), para ser empleada en el tratamiento de la diabetes tipo II, enfermedad crónica que se inicia en la edad adulta, con una mayor incidencia entre los 50 y 60 años y una comorbilidad con la obesidad en muchos casos.

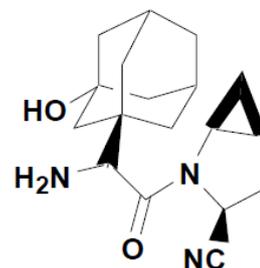


Ilustración 2. Saxagliptina (4).

La diabetes tipo II comienza con un aumento de la concentración plasmática de insulina consecuencia del intento que las células beta pancreáticas llevan a cabo para compensar la pérdida de sensibilidad a esta hormona que sufren los tejidos. Esta pérdida de sensibilidad provoca una alteración del metabolismo de los hidratos de carbono y eleva la glucemia. Si esta situación se mantiene en el tiempo el páncreas es incapaz de continuar secretando las cantidades de insulina necesarias para regular la glucemia dando lugar a situaciones de hiperglucemia que generan complicaciones como infecciones, úlceras de difícil curación que llevan a la amputación de miembros, alteraciones retinianas o renales (18, 19).

El estudio Di@bet.es nos muestra que al menos el 30% de la población muestra alguna alteración con los hidratos de carbono, teniendo la diabetes una prevalencia en España ajustada por edad y sexos del 13,8 % (95% CI 12,8 – 14,7 %) (20). A nivel global la prevalencia diabetes era del 8,5 % en 2014 y las proyecciones a futuro la sitúan en 2030 como la séptima causa de muerte (21). Estos datos representan todos los tipos de diabetes, pero se asemejan bastante a la realidad de la diabetes tipo II ya que representa el 90% de los casos de diabetes existentes (18).

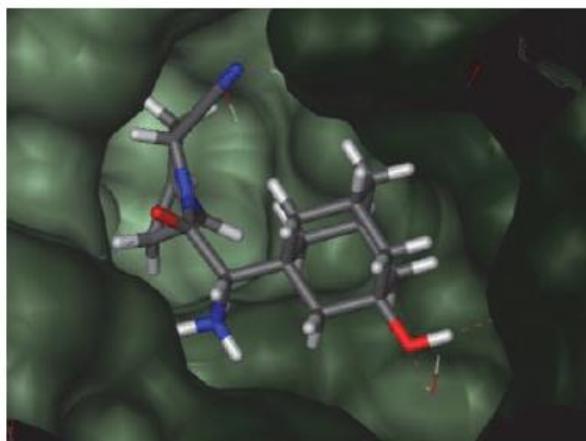
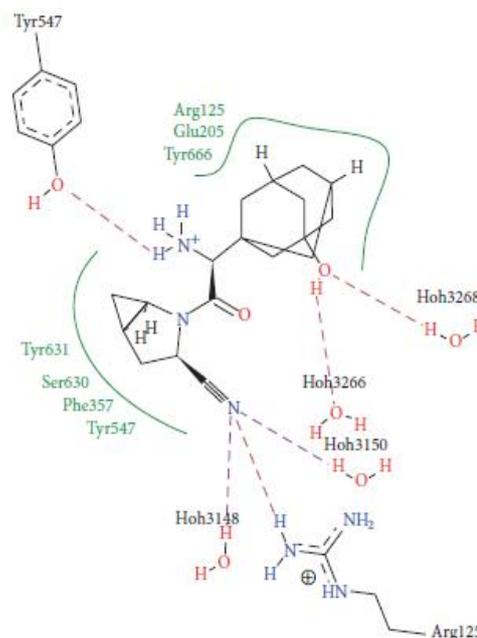


Ilustración 3. Inhibición de la enzima dipeptidilpeptidasa-IV (DPP-IV) por parte de la saxagliptina (1).



La saxagliptina pertenece al grupo farmacológico de las gliptinas, fármacos orales que abordan terapéuticamente la resistencia a la insulina, actúa inhibiendo de manera reversible la enzima dipeptidilpeptidasa-IV (DPP-IV) (*Ilustración 3*) enzima serina aminopeptidasa que hidroliza las incretinas: GLP-1 (glucagon-like peptide 1) y GIP (polipéptido inhibidor gástrico).

El papel fisiológico de las incretinas es estimular la secreción de insulina y suprimir la secreción del glucagón, realentizar el vaciado gástrico, reducir el apetito y el consumo de alimentos ([22](#)). La administración exógena de incretinas no es viable para el abordaje terapéutico por que son rápidamente degradadas, es por ello que se potencia endogenamente mediante los inhibidores de la DPP-IV ([5](#)).

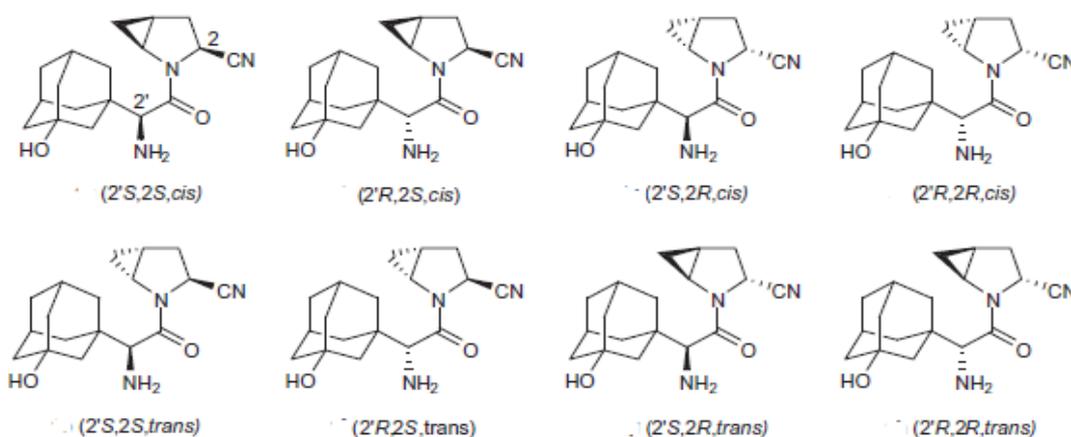


Ilustración 4. Estereoisómeros de la saxagliptina (6).

La saxagliptina cuenta con ocho estereoisómeros (*Ilustración 4*) de los cuales solo dos presentan actividad farmacológica, estos son el isómero 2'S,2S,cis y el isómero 2'S,2S,trans; entre ellos además se establece una gran diferencia de actividad cuando procedemos a observar

sus concentraciones inhibitorias 50 siendo la IC₅₀ de 30,3 nM para el isómero 2'S,2S,cis y una IC₅₀ de 4364 nM para el isómero 2'S,2S,trans. Por ello es el isómero 2'S,2S,cis el que se emplea en el tratamiento de la diabetes tipo II (6).

SÍNTESIS QUÍMICA VS BIOCATÁLISIS

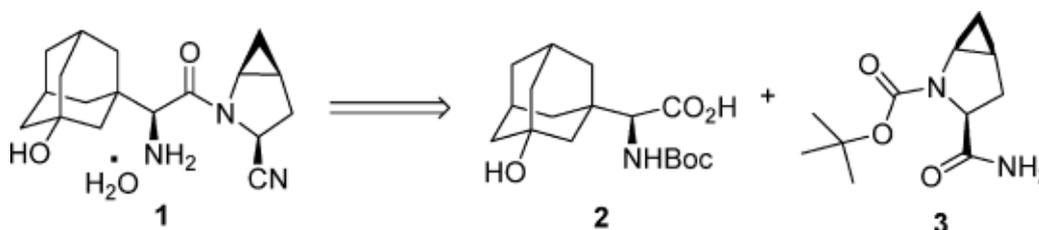


Ilustración 5. Retrosíntesis de saxagliptina (1) obteniendo los sintones (S)-N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina (2) y N-Boc L-cis-4,5-metanoprolinamida (3) (2).

La retrosíntesis de saxagliptina ((S)-3-hidroxiadamantilglicina-L-cis-4,5-metanoprolinamida) nos muestra dos sintones: (S)-N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina y N-Boc-L-cis-4,5-metanoprolinamida (2). (Ilustración 5).

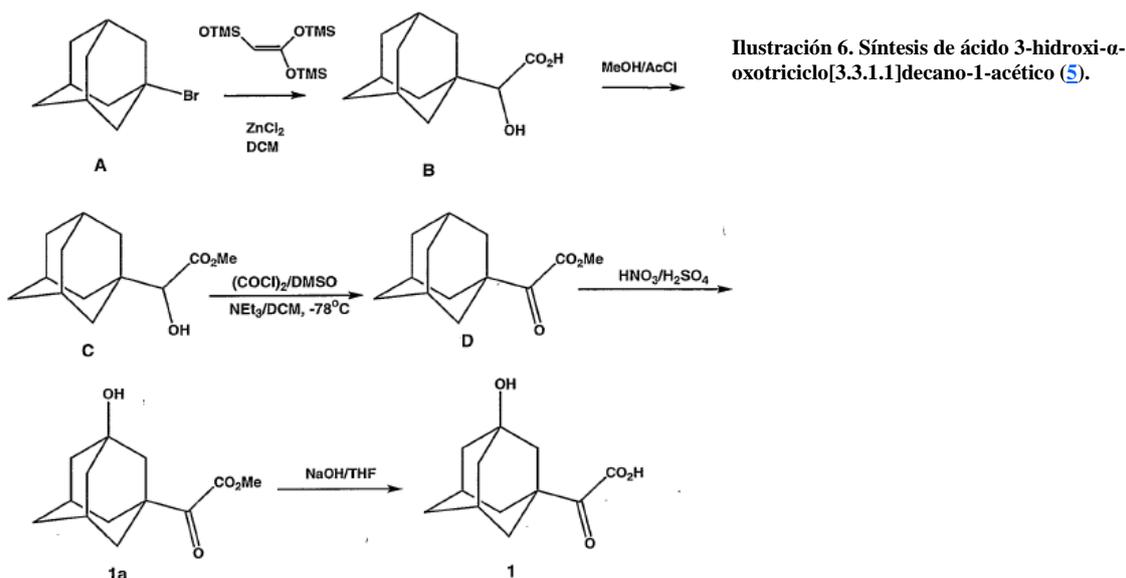


Ilustración 6. Síntesis de ácido 3-hidroxi-α-oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético (5).

Para la producción del sintón (S)-N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina partimos de bromuro de adamantilo (Ilustración 6). El bromuro de adamantilo se somete a una alquilación mediante 1,1,2-tri(trimetilsilil) etilenil éter, cloruro de zinc en diclorometano (DMC) para producir ácido α-hidroxitriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético. El siguiente paso es una protección mediante esterificación con cloruro de acetilo en metanol consiguiendo el éster metílico del ácido α-hidroxitriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético. Una vez protegido es sometido a una oxidación de Swern, llevada a cabo en medio trietilamina - DCM a -78°C y efectuada con dimetilsulfoxido (DMSO) y cloruro de oxalilo, de este modo llegamos al éster metílico del ácido α-oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético. Este éster es hidroxilado con ácido nítrico en medio ácido sulfúrico concentrado dando lugar al éster metílico del ácido 3-hidroxi-α-

oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético. El último paso consiste en eliminar el grupo protector con hidróxido de sodio en medio tetrahidrofurano (THF) (5). A partir de este punto podemos proceder de dos modos:

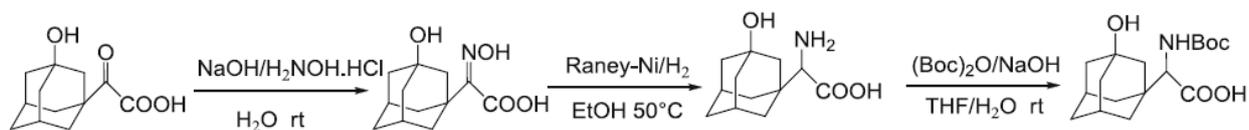


Ilustración 8. Síntesis química del sintón (S)-N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina desde ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético (3).

La síntesis química (*Ilustración 8*) se puede efectuar haciendo reaccionar el ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético con una mezcla de hidrocloreto de hidroxilamina e hidróxido sódico en medio acuoso durante dos horas para conseguir un rendimiento del 90%. A continuación, una reducción en medio etanol a 50°C durante siete horas en las que el ácido 2-(3-hidroxi-1-adamantil)-2-hidroxiiminoacético es agitado con hidrógeno en presencia del catalizador Ni-Raney, tras finalizar la reacción el catalizador se retira por filtración secada con bisulfito sódico anhidro (Na_2SO_4), el rendimiento de esta reducción es de un 86%. El último paso consiste en la protección con ditert-butildicarbonato ($(\text{Boc})_2\text{O}$) ejecutada a temperatura ambiente mezclando una solución de 3-hidroxiadamantilglicina en medio acuoso a pH 10 ajustado con hidróxido sódico y una solución de $(\text{Boc})_2\text{O}$ en THF, una vez finalizada la reacción se ajusta a pH 3 con ácido clorhídrico y se realiza una separación de fases con acetato de etilo, conservando la fase orgánica que es lavada con salmuera secada con Na_2SO_4 , de este consiguiendo una mezcla racémica del sintón N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina, con un rendimiento del 88% (3).

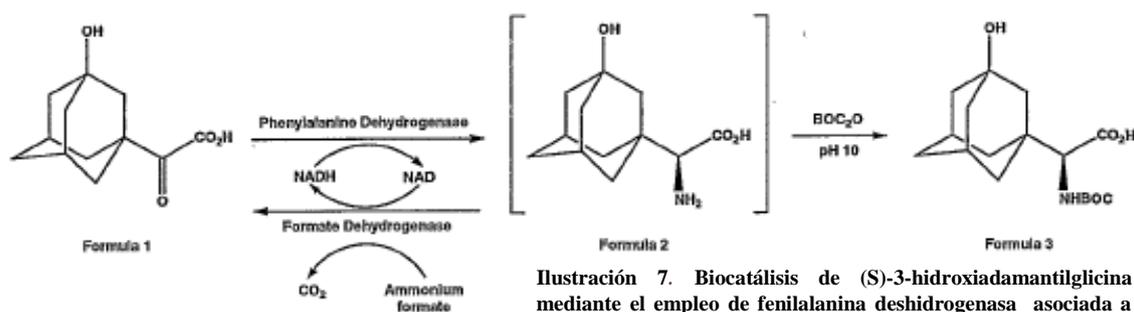


Ilustración 7. Biocatálisis de (S)-3-hidroxiadamantilglicina mediante el empleo de fenilalanina deshidrogenasa asociada a formato deshidrogenasa (5).

El otro método para continuar la síntesis, que fue el escogido por Bristol-Myers Squibb, implica un procedimiento de biocatálisis (*Ilustración 7*). En él que se emplea una mezcla parcialmente purificada de fenilalanina deshidrogenasa y formato deshidrogenasa (PDHmod/FDH). Mediante ingeniería del medio de reacción se llegó a las condiciones óptimas en las cuales partimos de ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético, en una mezcla acuosa a pH 7,8-8,2 ajustada con NaOH, para de este modo solubilizar el ácido, se obtiene una solución

clara mediante una filtración posterior a la adición de carbón. A esta solución filtrada se le incorpora formato de amonio en cantidad suficiente para conseguir un coeficiente formato de amonio – solución de ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético de 2 a 1. Esta mezcla se ajusta al pH anterior de igual modo. Se aúna junto a la mezcla NAD en un rango de 900 a 1 hasta 1.200 a 1, de NAD – solución de ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético y opcionalmente un agente reductor como el ditiotreitól o β -mercaptoetanol, preferiblemente el primero. Una vez se ha conseguido disolver todos los componentes anteriores se añade el extracto celular de *E. coli* en una proporción de 400 – 600 UI PDH por gramo de solución de ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético. La mezcla es calentada a 37-40 C° y diluida con agua manteniendo el pH, hasta la formación de la amina ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético. El ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético es protegido con ditert-butildicarbonato sin ser necesario aislarlo, ya que estará libre de restos celulares. Se añade en un rango de 2 a 1 o 2,2 a 1. El pH es modificado a hasta 9,5 a 10,5 con NaOH. El compuesto ya protegido es extraído y cristalizado, con un rendimiento de 80 al 100% y una pureza enantiomérica del 99% (5).

La fenilalanina deshidrogenasa (PDH) empleada en la biocatálisis, gracias a su promiscuidad de sustrato, procede de *Thermoactinomyces intermedius*, ATCC 33205, y ha sido modificada, mediante ingeniería de proteínas, al introducir una mutación en su extremo carbono terminal. La mutación hace que presente un cambio en sus dos últimos aminoácidos de modo que evita la secuencia del codón stop, y se extienda en 12 aminoácidos más que la versión salvaje de la enzima. En primer lugar, se expresó en *Pichia pastoris* para aprovechar que de manera endógena expresa la enzima formato deshidrogenasa (FDH), ATCC 20864, con la que conseguía el reciclaje de NAD⁺ en NADH necesario para el funcionamiento de fenilalanina deshidrogenasa y a su vez genera formato de amonio sustrato de la reacción. El rendimiento al emplear *P. pastoris* era del 100% para el extracto de celular, con una pureza enantiomérica del 100%, mientras que las células húmedas nos dan un rendimiento del 64%, y del 80% para células secadas por calor (5, 23). Sin embargo, la producción a gran escala se realizó en *Escherichia coli*, para ello las cepas empleadas son transfectadas con el plásmido pBMS-2000-PPFDH-PDH mod., que codifica la secuencia de fenilalanina deshidrogenasa modificada y de formato deshidrogenasa, dando lugar a la cepa *E. coli* JM110 (5).

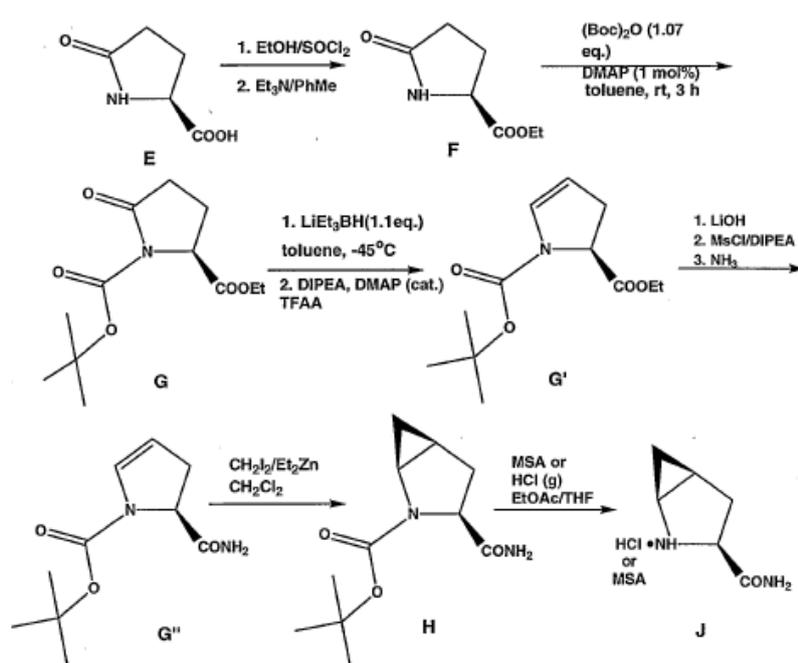
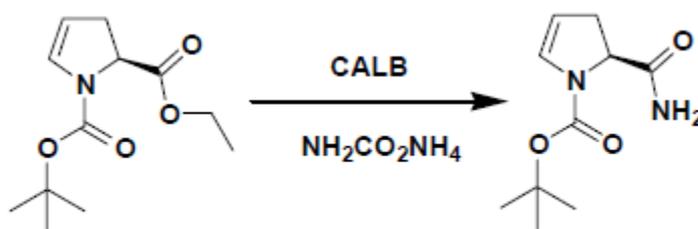


Ilustración 9. Síntesis química del sintón N-Boc-L-cis-4,5-metanoprolinamida (5).

Para obtener el otro sintón (*Ilustración 9*) necesitamos partir del ácido L-piroglutámico, este será el sustrato de una reacción de esterificación efectuada en dos pasos: primero es tratado con etanol y cloruro de tionilo, seguidamente se añade trietilamina en tolueno para obtener entonces L-piroglutamato de etilo. La reacción continua con la protección del nitrógeno del anillo pirrólico que se efectúa añadiendo $(\text{Boc})_2\text{O}$ 1,07 equivalentes por cada equivalente de éster, 4-dimetilaminopiridina (DMAP) al 1% molar y utilizando como medio de reacción tolueno durante 3 horas dando lugar a (5S)-2-oxopirrolidin-1,5-dicarboxilato de 1-(1,1-dimetiletil)-5-etilo con un rendimiento del 83%. Una vez conseguida la protección se reduce el grupo cetona del anillo pirrólico con trietilborohidruro de litio (LiEt_3BH) 1,1 equivalentes por cada equivalente de éster, el medio de reacción es tolueno a -45°C , seguidamente se produce una eliminación con N,N-diisopropiletilamina (DIPEA), DMAP en cantidades catalíticas, y anhido trifluoroacético (TFAA) como medio. El producto de la reacción anterior, 4,5-dihidro-1H-pirrolil-1,5-dicarboxilato de 1-(1,1-dimetiletil)-5-etilo, es hidrolizado por saponificación con hidroxio de lito, tras lo cual es tratado con cloruro de mesilo (MsCl) y amonio para formar la amida correspondiente (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1-carboxilato de 1,1-dimetiletilo, con un rendimiento en este proceso de reducción y aminación del 30%. El procedimiento continúa efectuando la reacción de Simmons-Smith, una ciclopropanación que sigue el siguiente esquema: se disuelve el producto de la reacción anterior en DCM, por otro lado se enfría a -30°C DCM al que se le añaden dimetoxietano, dietilcinc al 30% en tolueno, y diiodometano; toda esta mezcla se añade al tanque de reacción inicial junto con una solución saturada de bicarbonato y es agitada hasta conseguir la formación de precipitado. Este es

filtrado, lavado y resuspendido en DCM, la solución final se decanta y la fase orgánica se lava con una solución al 50% de salmuera, mientras que el solvente se elimina por un intercambio con heptano dando una pasta del producto, consiguiendo [1S-(1 α ,3 β ,5 α]-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxilato de 1,1-dimetiletilo, con un rendimiento del 80%. La deprotección es el paso final esta es cursada en medio isopropanol a 60°C durante 3 horas, tiempo durante que el ácido metanosulfónico se añade de manera controlada. Una vez finalizada la adición la reacción se enfría hasta 20°C, dando un rendimiento del 94% de la sal del ácido metasulfónico del (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida. El medio empleado es isopropanol ya que nos permite solubilizar [1S-(1 α ,3 β ,5 α]-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxilato de 1,1-dimetiletilo de partida, pero es un medio poco soluble para la sal del ácido metasulfónico del (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida lo que se produce la cristalización de la sal antes de que finalice la adición de todo el ácido metanosulfónico. Esta reacción va a producir también la aparición de compuestos secundarios: 1 equivalente de CO₂, 0,85 equivalentes de isopropil terc-butil éter, 0,15 equivalentes de isobutileno. También en el transcurso de la reacción se produce la formación de metanosulfonato de isopropilo un éster genotóxico pero cuyos niveles son inferiores a 5 ppm, y de 1000 ppm en la solución filtrada. El procedimiento descrito en este párrafo es el que se efectúa en la síntesis propuesta en la patente de Bristol-Myers Squibb (2, 5, 6).



Ácido (5S)-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1,5-dicarboxílico

Ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1-carboxílico

Ilustración 10. Biocatálisis del ácido (5S)-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1,5-dicarboxílico en ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1-carboxílico mediada por la lipasa B de *Candida antarctica*. (4)

En este caso también podemos emplear un proceso biocatalítico en la síntesis del sintón L-cis-4,5-metanoprolamida (*Ilustración 10*) esta tiene lugar en la conversión del ácido (5S)-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1,5-dicarboxílico en ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1-carboxílico. La biotransformación es realizada por la lipasa B de *Candida antarctica* que efectúa la amonólisis del éster empleando carbamato de amonio como donador de amonio. En un primer momento la biocatálisis nos da un rendimiento del 71%, cuando las condiciones de trabajo son las siguientes 50°C y concentración de 12% v/v de éster, y un 18% de productos secundarios. El proceso de biocatálisis continuó su puesta a punto, valiéndose de la ingeniería del medio de

reacción, para llegar a un rendimiento del 79% y una reducción al 13% de productos secundarios, para que se dieran estos resultados el medio de reacción contenía cloruro cálcico a una concentración de 100 g/L. Si al medio de reacción se le sumaba ascarita en una concentración de 200 g/L se llega a conseguir un rendimiento del 95%. Cuando en lugar de ascarita se adicionaba sodalime se conseguía un rendimiento del 84%. En ambos casos, ascarita y soladime, se logra aumentar el rendimiento por la adsorción del dióxido de carbono liberado por la descomposición del carbamato de amonio. Finalmente, la puesta a punto del procedimiento dio lugar al mayor rendimiento 98% y un 2% de productos secundarios, sin que tenga lugar racemización cuando se combinaba cloruro cálcico 100 g/L y ascarita 200 g/L (4).

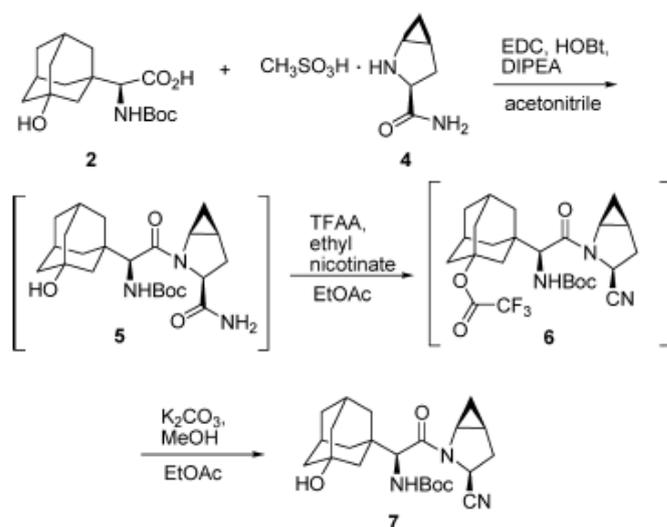
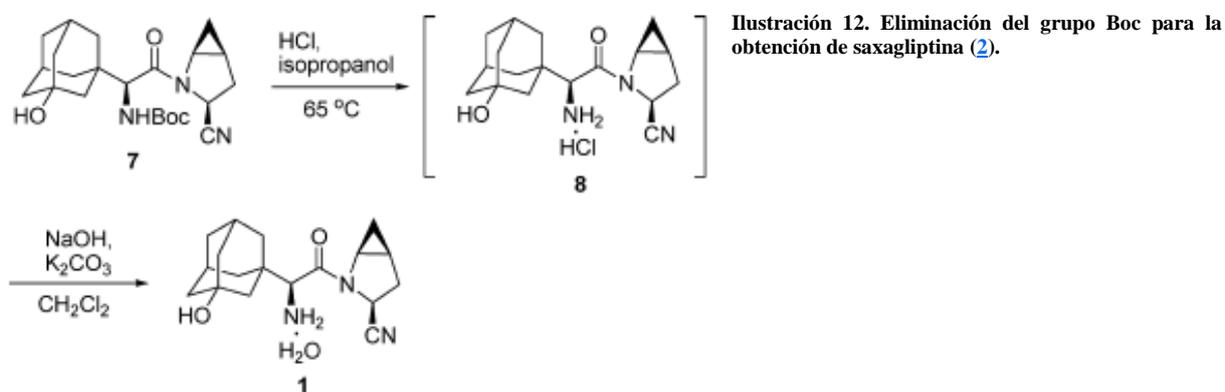


Ilustración 11. Formación de (S)-N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina-L-cis-4,5-metanoprolinitrilo (2).

El siguiente paso (*Ilustración 11*) consiste en un acoplamiento de amida, la reacción tiene lugar entre la sal del ácido metanosulfónico de L-cis-4,5-metanoprolinamida y (S)-N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina en presencia de hidrócloruro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC), 1-hidroxibenzotriazole hidrato (HOBt) y diisopropiletilamina (DIPEA) en medio acetonitrilo. El rendimiento obtenido de (S)-N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina-L-cis-4,5-metanoprolinamida del 95 al 99% con una duración de 2-3 horas para que la reacción se complete del todo, aunque a los 30 minutos ya se ha completado en más de un 90%. Una vez acoplada la amida se procede a obtener el grupo nitrilo, en primer lugar, se añade acetato de etilo para acidificar el medio de reacción y de este modo precipitar los productos básicos secundarios generados anteriormente, se incorpora nicotinato de etilo y anhídrido trifluoroacético (TFAA) para conseguir la deshidratación de la amida. A su vez el TFAA reacciona con el grupo hidroxilo del adamantano actuando como grupo protector, este también reacciona con las cantidades residuales de HOBt formando trifluoroacetato de triazol por ello se procede a realizar dos lavados con bicarbonato potásico para eliminar el 90% de HOBt, los productos residuales se eliminan con tetrametiletilendiamina (TMEDA) con el que

forman una sal que es insoluble en acetato de etilo pero soluble en agua, por lo que se pueden eliminar por separación de fases. El nicotinato de etilo se elimina en un 90% del medio de reacción con ácido clorhídrico 2N formando una sal. La reacción continúa procediendo a la retirada del grupo trifluoroacetilo unido al grupo hidroxilo del adamantano para ello se recurre a carbonato potásico 25% en peso, con una pequeña cantidad de metanol. La reacción tiene lugar durante una hora a 40°C, siendo enfriada cuando finaliza hasta 15°C, temperatura a la que se procede a modificar el medio de reacción pasando a ser una mezcla de 25% isopropanol 75% agua consiguiendo la cristalización del producto. El rendimiento total de la reacción desde los sintones la sal del ácido metanosulfónico de L-cis-4,5-metanoprolinamida y (S)-N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina hasta (S)-N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina-L-cis-4,5-metanoprolinitrilo es del 78% con una pureza del 99,7% (2).



Finalmente, el último paso de la síntesis (*Ilustración 12*) consiste en la eliminación del grupo protector terc-butoxicarbonilo (Boc) para lo cual se añade ácido clorhídrico concentrado a 65°C, formando secundariamente 1 equivalente de CO₂, 0,4 equivalentes de isobutileno y 0,6 equivalentes de terc-butanol. Se forma así la sal del ácido clorhídrico de saxagliptina de la que vamos a obtener la sal monohidrato mediante la adición de hidróxido de sodio concentrado 50% en peso para neutralizar el ácido clorhídrico, y ajustando el pH con carbonato potásico 25% en peso, ambas añadidas en presencia de cloruro de metileno para solubilizar la saxagliptina, que es destilada bajo condiciones atmosféricas para eliminar los restos acuosos del medio y de este modo evitar la cristalización del monohidrato de saxagliptina al añadir acetato de etilo durante la destilación. Este procedimiento supone un riesgo de formación de una amida cíclica. Una vez destilado se incorpora agua para formar la sal monohidrato de saxagliptina con un rendimiento de entre 86 – 90% y una pureza del 99,9% (2).

CONCLUSIONES

Como hemos visto la retrosíntesis del fármaco saxagliptina da lugar a dos sintones para los cuales existen procedimientos de biocatálisis desarrollados, si bien solo uno se emplea en la síntesis del fármaco de manera habitual, la biocatálisis de (S)-3-hidroxiadamantilglicina efectuada por PDHmod/FDH. En ambos ejemplos de biocatálisis podemos observar cómo se consigue una simplificación de la reacción al necesitar de un menor número de pasos, condiciones trabajo más suave, menor duración de la reacción, mayores rendimientos y menor porcentaje de racemización.

En el caso de la biocatálisis de (S)-3-hidroxiadamantilglicina efectuada por PDHmod/FDH, la conversión se realiza en un único paso frente a los dos necesarios por la síntesis química, a una temperatura de 40°C por los 50°C de la síntesis química, a un pH de 8 frente al pH de 10 necesario para realizar la transformación de manera química. En cuanto al rendimiento la biocatálisis alcanza valores del 80 al 100% y una pureza enantiomérica del 98%, mientras que por síntesis química obtendremos una mezcla racémica y un rendimiento del 68,11%.

Para la biocatálisis del ácido (5S)-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1,5-dicarboxílico en ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1-carboxílico mediada por la lipasa B de *Candida antarctica* las condiciones de trabajo se ven simplificadas al realizar en un solo paso un procedimiento que por la vía química necesita de tres etapas. En estas etapas se emplea hidróxido de litio un reactivo considerado corrosivo y peligroso para la salud por la agencia europea de sustancias y mezclas químicas (ECHA) (24). El rendimiento de la reacción es de un 98% con un 100% de pureza enantiomérica, frente al 30% de rendimiento que nos ofrece la vía química tradicional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rozano L, Abdullah Zawawi MR, Ahmad MA, Jaganath IB. Computational Analysis of Gynura bicolor Bioactive Compounds as Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitor. *Advances in Bioinformatics*. 2017;2017:16.
2. Savage SA, Jones GS, Kolotuchin S, Ramrattan SA, Vu T, Waltermire RE. Preparation of Saxagliptin, a Novel DPP-IV Inhibitor. *Organic Process Research & Development*. 2009;13(6):1169-76.
3. Chen Y, Wang A, Tao Z, Deng Y, Hu X. A facile synthesis of saxagliptin intermediate N-Boc-3-hydroxyadamantylglycine. *Research on Chemical Intermediates*. 2015;41(7):4113-21.
4. Gill I, Patel R. Biocatalytic ammonolysis of (5S)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)-5-ethyl ester: Preparation of an intermediate to the dipeptidyl peptidase IV inhibitor Saxagliptin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006;16(3):705-9.
5. Politino MCD, Syracuse, New York, 13209, US), Cadin, Matthew M. (2 Bundy Avenue, Auburn, New York, 13021, US), Skonezny, Paul M. (3471 Van Wie Drive East, Baldwinsville, New York, 13027, US), Chen, Jason G. (4956 Tinderbox Circle, Manlius, New York, 13104, US), inventor; BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (Route 206 and Province Line Road, Princeton, New Jersey, 08543-4000, US), Politino, Michael (111 Century Drive, Syracuse, New York, 13209, US), Cadin, Matthew M. (2 Bundy Avenue, Auburn, New York, 13021, US), Skonezny, Paul M. (3471 Van Wie Drive East, Baldwinsville, New York, 13027, US), Chen, Jason G. (4956 Tinderbox Circle, Manlius, New York, 13104, US), assignee. PROCESS FOR PREPARING DIPEPTIDYL IV INHIBITORS AND INTERMEDIATES THEREFOR 2005.
6. Dong J, Gong Y, Liu J, Chen X, Wen X, Sun H. Synthesis and biological evaluation of all eight stereoisomers of DPP-IV inhibitor saxagliptin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2014;22(4):1383-93.
7. Delgado Cirilo A, Minguillón Llombart C, Joglar Tamargo J, e-libro C. *Introducción a la química terapéutica*. 2. ed. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 2003.
8. Unidas N. Población 2018 [Disponible en: <http://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html>].
9. Horváth IT. Introduction: Sustainable Chemistry. *Chemical Reviews*. 2018;118(2):369-71.
10. Hughes G, Lewis JC. Introduction: Biocatalysis in Industry. *Chemical Reviews*. 2018;118(1):1-3.
11. Muñoz de Malajovich MA. *Biotecnología* (2a. ed.). Buenos Aires, ARGENTINA: Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes; 2012.
12. Kafarski P. Rainbow code of biotechnology. *Chemik*. 2012;66(8):814-6.
13. Faber K. *Biotransformations in organic chemistry: a textbook*. 5th rev. and corr. ed. Berlin [etc.]: Springer; 2004.

14. Hult K, Berglund P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. Trends in Biotechnology. 2007;25(5):231-8.
15. García PC, Cruz SV, Mirón CE. Fundamentos de síntesis de fármacos: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona; 2005.
16. Sánchez Montero JM. Biotecnología blanca e industria farmacéutica. Anales de la Real Academia de Farmacia. 2007;73(2):501-35.
17. Arnold FH. Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. Angewandte Chemie International Edition.0(0).
18. Hall JE. Guyton y Hall: tratado de fisiología médica. Décimoterceraón. ed. Barcelona: Elsevier Health Sciences Spain; 2016.
19. González Hernández Á. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 2ª ed. Barcelona [etc.]: Elsevier; 2014.
20. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. Diabetologia. 2012;55(1):88-93.
21. OMS. OMS | Diabetes 2018 [Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>].
22. Flórez J. Farmacología humana. 6aón. ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
23. Hanson RL, Goldberg SL, Brzozowski DB, Tully TP, Cazzulino D, Parker WL, et al. Preparation of an Amino Acid Intermediate for the Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor, Saxagliptin, using a Modified Phenylalanine Dehydrogenase. Advanced Synthesis & Catalysis. 2007;349(8-9):1369-78.
24. ECHA. Lithium hydroxide [Web]. ECHA; 2018 [actualizado 14/03/2018. 1: [Disponible en: https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.013.804?disssubinfo_WAR_disssubinfoportlet_backURL=https%3A%2F%2Fecha.europa.eu%2Fes%2Fsearch-for-chemicals%3Fp_id%3Ddisssimplesearch_WAR_dissearchportlet%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D1%26disssimplesearch_WAR_dissearchportlet_sessionCriteriaId%3DdisSimpleSearchSessionParam101401523469367247].