



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**“BIOCATÁLISIS COMO HERRAMIENTA EN
EL DESARROLLO SOSTENIBLE DE
FÁRMACOS (I)”**

Autor: Lucía Ruiz Martínez

Tutor: Pilar Hoyos Vidal

Convocatoria: Junio 2018

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	3
OBJETIVOS	9
METODOLOGÍA.....	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
CONCLUSIONES	18
BIBIOGRAFÍA.....	19

RESUMEN

La biocatálisis aplicada a la industria farmacéutica, hace referencia al uso de enzimas para obtener compuestos enantioméricamente puros que serán empleados en la fabricación de medicamentos, los cuales cada vez demandan una mayor regio-, quimio-, y estereoselectividad. Además la biocatálisis resulta muy interesante económicamente y respeta en gran medida los principios de la química sostenible.

Cuando se intentan escalar las reacciones de biocatálisis desde el laboratorio a la industria, se producen complicaciones relacionadas, en su mayoría, con problemas de estabilidad enzimática, los cuales se han solucionado gracias al desarrollo de métodos de inmovilización enzimática y, en ocasiones, de ingeniería genética.

Hay muchas aplicaciones para los procesos biocatalíticos, entre las cuales se encuentra la síntesis o semi-síntesis de medicamentos ampliamente conocidos como son la **pregabalina**, el **ibuprofeno**, el **paclitaxel**, y la **sitagliptina**. Todos estos medicamentos permiten ofrecer una visión general y útil de los posibles usos de la biocatálisis dentro de las competencias farmacéuticas, tanto a nivel de laboratorio como a nivel industrial.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los compuestos enantioméricamente puros son cada vez más demandados en la industria farmacéutica, así como en otras áreas como la industria química o la agroalimentaria. Es bien sabido que los compuestos quirales presentan las mismas propiedades físicas, sin embargo los distintos enantiómeros de una molécula se comportan de manera distinta a nivel de los receptores. Esto se traduce en que uno de los enantiómeros de la molécula puede establecer la interacción adecuada con el receptor, mientras que el otro no se une a dicho receptor; es decir, la quiralidad es sumamente importante ya que puede determinar la interacción fármaco-receptor. ⁽¹⁾⁽²⁾

Para que un principio activo ejerza la acción deseada debe unirse de forma específica al receptor adecuado (**Figura 1**); esta unión fármaco-receptor requiere una gran complementariedad y tiene una gran importancia, ya que si logramos que las moléculas de un principio activo interaccionen exclusivamente con los receptores que conforman la diana

terapéutica estaremos evitando la interacción con otros receptores, y por tanto estaremos minimizando los efectos adversos de dicho medicamento. Por todo esto se siguen buscando rutas sintéticas para la obtención de compuestos ópticamente puros.



Fig. 1. Unión de distintos enantiómeros al receptor. ⁽³⁾

En este contexto, la biocatálisis, que utiliza enzimas como catalizadores biológicos para obtener compuestos que presentan un alto grado de pureza, es una excelente herramienta para la obtención de compuestos enantiopuros.

Dentro de las características de los procesos biocatalíticos hay varios puntos que cabe resaltar:

- A menudo las enzimas utilizadas provienen de microorganismos tales como bacterias, levaduras u hongos, aunque también pueden obtenerse de mamíferos, o incluso ser enzimas modificadas genéticamente para mejorar sus características. También se pueden utilizar tanto células enteras como enzimas aisladas.
- Al tener un origen biológico, son catalizadores biodegradables que actúan en condiciones suaves de pH y temperatura, y además suelen presentar actividad en medio acuoso, por lo que prima el agua como disolvente, el cual resulta barato y no contaminante para el medioambiente. Algunas enzimas permiten el uso de disolventes orgánicos, los cuales favorecen ciertas transformaciones.
- Las enzimas son sumamente específicas, lo que supone que reaccionen exclusivamente con un sustrato concreto evitándose así otras reacciones no deseadas.

- En numerosos casos, la catálisis enzimática permite la obtención de un determinado enantiómero, lo que supone una gran ventaja en el proceso de síntesis ya que a menudo los compuestos obtenidos presentan una mayor pureza.
- No se requieren grupos de activación o de protección, muy típicos en las rutas clásicas de síntesis. Esto permite reducir el número de pasos necesarios en una ruta de síntesis, lo que supone un ahorro de tiempo y de recursos.
- Las condiciones de reacción son similares para la mayoría de enzimas, por tanto hay ocasiones en las que se puede realizar una cascada de reacciones en un mismo tanque de reacción; de esta forma se consigue una reducción de los gastos en materiales y disolventes y además se reducen los tiempos.

Por todas estas propiedades, la biocatálisis es cada vez más utilizada en Química Farmacéutica, ya que permite obtener compuestos intermedios de numerosas rutas de síntesis, lo que supone una reducción en el número de pasos, un importante ahorro económico, procesos más sostenibles para el medioambiente, etc.

La biocatálisis, ha permitido obtener excelentes resultados a pequeña escala, pero el punto más crítico es el salto a la escala industrial; a menudo las condiciones de reacción a nivel industrial suponen altas temperaturas durante largos periodos de tiempo, niveles extremos de pH, elevadas concentraciones tanto de productos como de sustratos, etc., y las enzimas no suelen soportar este tipo de condiciones, ya que por su naturaleza proteica se desnaturalizan con cierta facilidad.

Para solventar estos problemas, se investigan diferentes métodos que permitan aumentar la estabilidad de las enzimas en las condiciones de reacción; entre ellos podemos destacar las técnicas de ingeniería molecular, que permiten a través de distintas mutaciones obtener enzimas que soporten de una manera mucho más eficiente las condiciones experimentales, y sobre todo, la técnica sin duda más utilizada, la inmovilización de las enzimas, lo cual les confiere mayor estabilidad. ⁽⁴⁾

Dentro de las técnicas que permiten inmovilizar y manejar las enzimas de una forma más conveniente son más recomendables las formulas sólidas que las líquidas, ya que de esta

forma se permite una separación más sencilla del producto a la vez que se minimiza e incluso se elimina la contaminación del producto final.

Los métodos de inmovilización enzimática se agrupan básicamente en tres categorías:

- **Unión a un soporte** a través de enlaces débiles, como puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals, los cuales suelen resultar poco efectivos ya que en los procesos industriales estos enlaces se rompen con facilidad y se produce la separación de la enzima al soporte; enlaces iónicos; o enlaces covalentes. Estos últimos son los que permiten las uniones más fuertes entre enzima y soporte, lo cual supone una gran ventaja en cuanto a la estabilidad, pero también la desventaja de que, en caso de la enzima sea desactivada durante el proceso y tengamos que desecharla, no se podrá recuperar fácilmente el soporte, el cual suele ser costoso.
- **Atrapamiento del enzima** en una red polimérica, la cual puede ser orgánica (como la poliacrilamida), inorgánica (como la sílica sol-gel) o una membrana a modo de fibra hueca o microcápsula. En este caso la matriz polimérica se crea estando ya en contacto con las enzimas, de tal forma que estas quedan atrapadas en el interior y no unidas a la superficie, como pasaba en el caso anterior.
- **Cristales enzimáticos a través de enlaces cruzados** (CLECs, del inglés *Cross-Linked Enzyme crystals*) o agregados enzimáticos a través de enlaces cruzados (CLEAs, del inglés *Cross-Linked Enzyme Aggregates*) que evitan la utilización de soportes. La gran ventaja de este método es evitar la “dilución de actividad” que deriva del uso de soportes, los cuales no dejan de ser residuos no catalíticos que reducen el rendimiento y la productividad, ya que ocupan un espacio que no puede ser utilizado ni por reactivos ni por productos de la reacción. Con el uso de CLECs y CLEAs obtenemos una actividad catalítica más elevada, mayor estabilidad y reducción en los costes de producción.

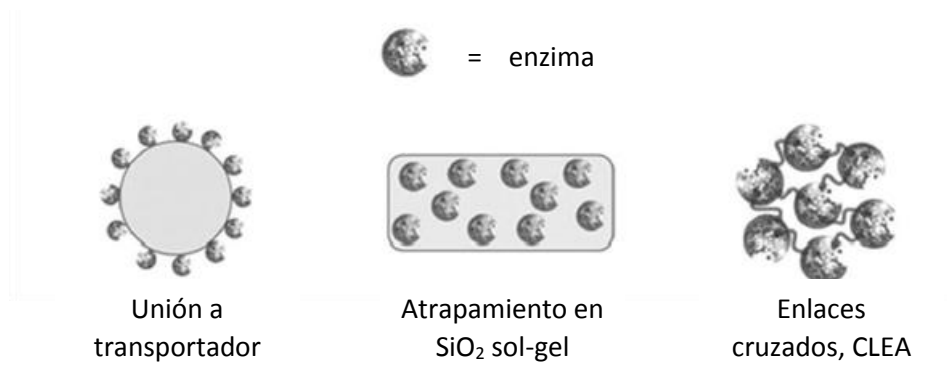


Fig. 2. Diferentes métodos de inmovilización enzimática. ⁽⁴⁾

La industria química produce una gran cantidad de residuos, lo que supone, además de un enorme gasto económico, un gran problema a nivel medioambiental, ya que el tratamiento y la eliminación de estos residuos a menudo es costosa y/o requiere demasiado tiempo.

El desarrollo sostenible se definió como “aquel que cubre las necesidades de la generación presente sin comprometer la satisfacción de las necesidades de las generaciones futuras”⁽⁵⁾. En base a todo esto nació la Química Sostenible (del Inglés *Green Chemistry*) que buscaba la utilización de materias primas menos contaminantes (preferiblemente renovables), eliminar el gasto excesivo y evitar el uso de reactivos y disolventes tóxicos y/o peligrosos en la fabricación y aplicación de productos químicos, y que permitiesen un rendimiento apropiado de los procesos de síntesis.

La Química Sostenible sigue 12 principios fundamentalmente:

- Reducir la generación de residuos, ya que es mejor evitar su formación que intentar eliminarlos una vez finalizada la reacción.
- Eficiencia o economía atómica, lo que supone que encontremos en el producto final la gran mayoría de productos utilizados, siendo muy reducida la cantidad de productos secundarios.
- Materiales menos tóxicos y peligrosos durante todo el proceso, tanto para el hombre como para el medio ambiente.
- Diseño de productos seguros, ya que es importante que, además de ser eficaces, los productos químicos no resulten tóxicos.

- Inocuidad de los disolventes y de las sustancias auxiliares; en una reacción química el disolvente puede suponer más de la mitad del material empleado en el proceso y por tanto gran parte del gasto y del impacto ambiental. Dentro de los distintos tipos de disolventes empleados encontramos 4 grupos:
 - Clase 1: inaceptables en la elaboración de productos farmacéuticos por su toxicidad o por tener un elevado impacto ambiental, como puede ser el benceno.
 - Clase 2: presentan toxicidad de forma intrínseca, por tanto deben ser utilizados con moderación; esto sucede con el metanol o el acetonitrilo, por ejemplo.
 - Clase 3: son los de elección por su baja toxicidad y riesgo para la salud, y encontramos alcoholes o éteres, por ejemplo.
 - Clase 4: no hay suficiente información como para asegurar su toxicidad y seguridad; se incluyen, por ejemplo, el éter diisopropílico o el metil tetrahidrofurano.
- Diseño de eficiencia energética, con técnicas de trabajo a presión y temperatura ambiente, por ejemplo, lo que supone una minimización del impacto ambiental y del gasto económico.
- Preferiblemente, y siempre que sea posible, materias primas renovables.
- Síntesis más cortas (evitando derivatizaciones), como pueden ser los pasos de protección/desprotección.
- Catalizadores en lugar de agentes estequiométricos.
- Diseño de productos biodegradables.
- Métodos analíticos para prevenir la contaminación; lo más adecuado sería siempre la monitorización y control del proceso a tiempo real para evitar la formación de sustancias nocivas.
- Procesos químicos que sean propiamente seguros, de esta forma se podrán evitar posibles accidentes relacionados con el manejo de los materiales.

Salta a la vista que la biocatálisis resulta interesante en el contexto de la Química Sostenible, ya que esta forma de trabajo cumple con la mayoría de los principios anteriormente expuestos aun habiendo pequeñas variaciones en función de la reacción y las condiciones en las que nos encontremos. Estamos ante la posibilidad de utilizar biocatalizadores (enzimas) que resultan renovables y biocompatibles, además se evita el uso de metales como catalizadores en las reacciones químicas, los cuales hay que retirar del producto final porque pueden resultar peligroso y son altamente contaminantes para el medioambiente. ⁽⁵⁾

OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo general la adquisición de nociones básicas sobre biocatálisis, realizando una introducción sobre el tema y recogiendo algunas descripciones de los procesos empleados, tanto a nivel de laboratorio como a nivel industrial.

Para esto se recogen procesos de síntesis de medicamentos comercializados, los cuales incluyen alguna etapa en la que se usen técnicas biocatalíticas y que resultan ilustrativos para comprender la utilidad del uso de enzimas en la química farmacéutica. Estos medicamentos son: la pregabalina, el ibuprofeno y el paclitaxel, como ejemplos de empleo de lipasas; el paclitaxel como ejemplo de empleo de reductasa; y la sitagliptina como ejemplo de empleo de transaminasas.

METODOLOGÍA

El método empleado en la realización de este trabajo ha sido la revisión bibliográfica. Para ello se han realizado búsquedas en diferentes bases de datos como *PubMed*, *ScienceDirect*, *Google scholar*... donde se han seleccionado artículos científicos, tesis doctorales y/o fragmentos de libros de texto; todo ello relacionado con Bioquímica, Química Orgánica y Farmacéutica, Biocatálisis, Química ecológica, Enzimas y reacciones específicas, etc. Una vez seleccionada la información que ha sido considerada útil e interesante, se ha sintetizado y resumido de una forma práctica, de acuerdo a los objetivos establecidos.

También se ha utilizado CIMA en algunos casos para consultar la ficha técnica de los medicamentos comercializados que contienen principios activos de interés para este trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde un punto de vista industrial, la bioatálisis resulta sumamente interesante en la producción de principios activos farmacéuticos (APIs, del inglés *active pharmaceutical ingredients*), ya que ofrece unos resultados muy prometedores en cuanto a regio-, quimio- y estereoselectividad de los medicamentos. Como ya hemos visto, también presenta ventajas económicas y medioambientales, y permite la separación de compuestos racémicos con unas condiciones de reacción muy suaves.

En este momento el mercado ofrece una gran variedad de enzimas con fines biocatalíticos, y aunque las enzimas aisladas son las más utilizadas, también existe la posibilidad de utilizar células enteras, las cuales resultan útiles cuando el proceso de síntesis requiere varias reacciones encadenadas, catalizadores o simplemente la enzima de interés no puede ser aislada de la célula. ⁽⁶⁾

Algunas de las enzimas más comúnmente utilizadas son las hidrolasas, que incluyen las lipasas, esterasas, acilasas, amilasas, proteasas, etc.; y las oxidoreductasas, dentro de las cuales encontramos las reductasas, monooxigenasas, etc. Aunque también hay otras enzimas que puede resultar sumamente interesantes, como por ejemplo las transaminasas.

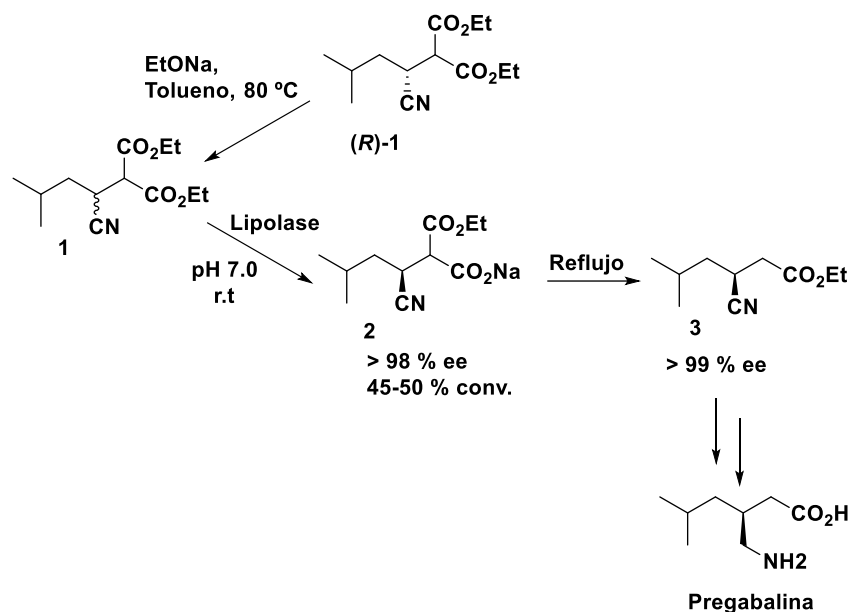
A continuación se presentan algunos ejemplos de fármacos que se encuentran actualmente en el mercado y que incluyen procesos biocatalíticos en sus procesos de síntesis o semi-síntesis.

Uno de los ejemplos clásicos donde se puede observar la unión entre biocatálisis y química sostenible es en la **síntesis de pregabalina** llevada a cabo por Pfizer (Lyrica®). La pregabalina es un principio activo análogo al GABA (ácido gamma-aminobutírico) [ácido (S)-3-(aminometil)-5-metilhexanoico] y pertenece al grupo de antiepilépticos, atendiendo a la siguiente clasificación: Antiepilépticos, otros antiepilépticos. Ejerce su acción a nivel del Sistema Nervioso Central al unirse a una subunidad auxiliar (proteína $\alpha 2\text{-}\delta$) de los canales de calcio dependientes del voltaje. La pregabalina tiene indicación para el tratamiento complementario de la epilepsia, tratamiento de depresión y ansiedad, y para el tratamiento del dolor neuropático en neuropatía diabética, neuralgia postherpética y lesión de la médula espinal. (CIMA)

El primer proceso de síntesis de la pregabalina consistía en una ruta que requería como paso inicial la condensación de tres moléculas, seguida de una sustitución con un grupo ciano para obtener el intermediario **1** (éster etílico del ácido *rac*-2-carboxietil-3-ciano-5-metilhexanoico). Después, este compuesto debía pasar por tres pasos más, hidrólisis, reducción y descarboxilación, para obtener el compuesto racémico de la pregabalina (ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico), el cual debía ser sometido a tres pasos más dentro de un proceso de cristalización, que incluía el uso del ácido (S)-(+)-mandelico, para la resolución final de la Pregabalina.⁽⁷⁾ Aunque este método conseguía buenos resultados en cuanto a rendimiento, resultaba costoso y merecía la pena buscar métodos ecológicamente más sostenibles.

Sin embargo, se descubrió que se podía aprovechar la acción catalítica de lipasas inmovilizadas para introducir quiralidad en uno de los pasos intermedios. Una de las lipasas ensayadas procedía de *Candida antártica B*, y con ella se obtuvieron unos valores de conversión moderados (18%–24%) y unos excesos enantioméricos (*ee*) entre 87-94%.⁽⁸⁾

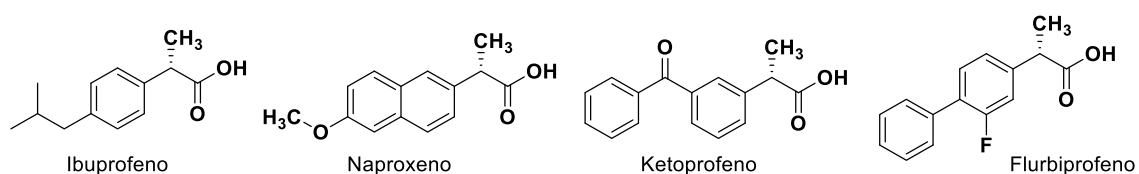
Para obtener mejores resultados en la síntesis de pregabalina, se ha desarrollado un procedimiento que utiliza una lipasa de *Thermomyces lanuginosus* modificada genéticamente (TLL), la cual se encuentra comercializada como Lipolasa®. Esta enzima permite hidrolizar de forma enantioselectiva el compuesto **1** (CNDE) (hidrólisis de uno de los grupos éster), el cual ya existe y resulta relativamente barato de obtener, para generar el compuesto **2** (enantiómero (3S)-2-carboxietil-3-ciano-5-metilhexanoico). El enantiómero R del compuesto **1** que queda sin utilizar se puede reciclar usando etóxido sódico en etanol a 80°C, lo que supone minimizar las pérdidas de reactivos y la optimización del proceso. Después de obtener el compuesto **2**, este sufre rápidamente una descarboxilación que permite aislar el compuesto **3** (ácido (S)-3-ciano-5-metilhexanoico etil-éster), precursor de la pregabalina (**Esquema 1**). Esta ruta se realiza en medio acuoso, por lo tanto es más sostenible medioambientalmente y resulta favorable económicamente. Además esta ruta permite incrementar el rendimiento en un 40-45% con respecto a las primeras generaciones de síntesis de pregabalina, con más de un 99% de pureza y más de un 99% *ee*.⁽⁷⁾



Esquema 1: síntesis quimioenzimática optimizada de Pregabalina

Para mejorar este proceso se utilizan células enteras de *Escherichia coli* que expresan la lipasa (Lipolasa®), ya que resultan fáciles de cultivar y nos permiten obtener una mayor cantidad enzima. Con este método es posible obtener una conversión del 42,4% y un ee del 98% en tan solo 20h a partir una concentración de sustrato de 255g/L.⁽⁹⁾

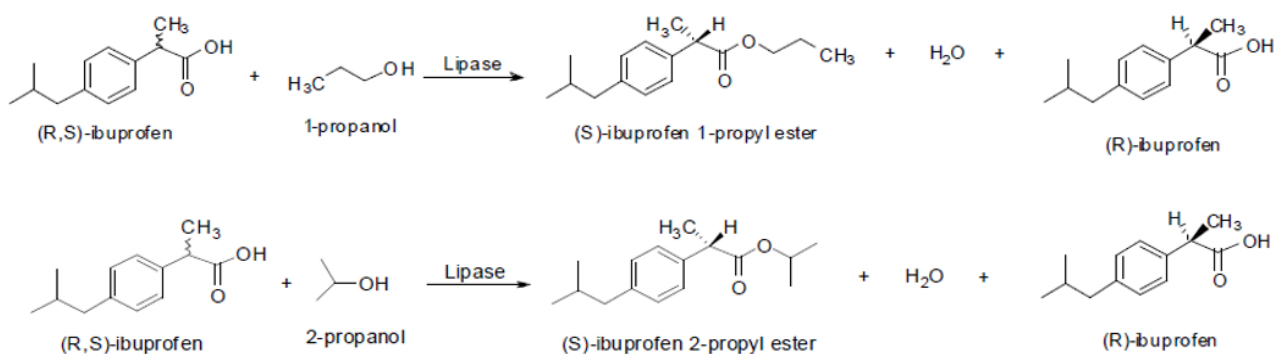
Por otro lado, otro de los ejemplos más característicos del empleo de biocatálisis es el uso de lipasas en la preparación de AINEs, es decir, en la síntesis de Inhibidores de la Ciclooxygenasa (COX), como son el ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno o furbiprofeno. Los ácidos 2-aril-propionicos o profenos son ampliamente utilizados por su poder analgésico y antiinflamatorio. La actividad de estos medicamentos reside principalmente en el enantiomero-S, aunque a menudo se comercializan en forma de racémicos.



El **ibuprofeno** está catalogado dentro de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Actúa inhibiendo la COX y por tanto impidiendo la síntesis de prostaglandinas, que son las encargadas de mediar la respuesta inflamatoria. Está indicado en el tratamiento sintomático de la fiebre, en el tratamiento del dolor de intensidad leve a moderada (incluida la migraña), en el tratamiento sintomático de: artritis (incluyendo la artritis reumatoide juvenil), artrosis, espondilitis anquilosante y de la inflamación no reumática; y además se utiliza para el alivio de la sintomatología en la dismenorrea primaria. (CIMA)

El S-ibuprofeno es el encargado de la actividad terapéutica, ya que presenta una capacidad inhibitoria de la COX *in vitro* 160 veces mayor que su enantiómero R; de hecho la acumulación de este racémico en el organismo puede producir alteraciones a nivel fisiológico. La posibilidad de utilizar únicamente el S-ibuprofeno, tendría también la gran ventaja de poder reducir la dosis de fármaco para tratar las patologías. Por todo esto se han hecho grandes esfuerzos por obtener un producto con una gran pureza en cuanto a enantioselectividad.

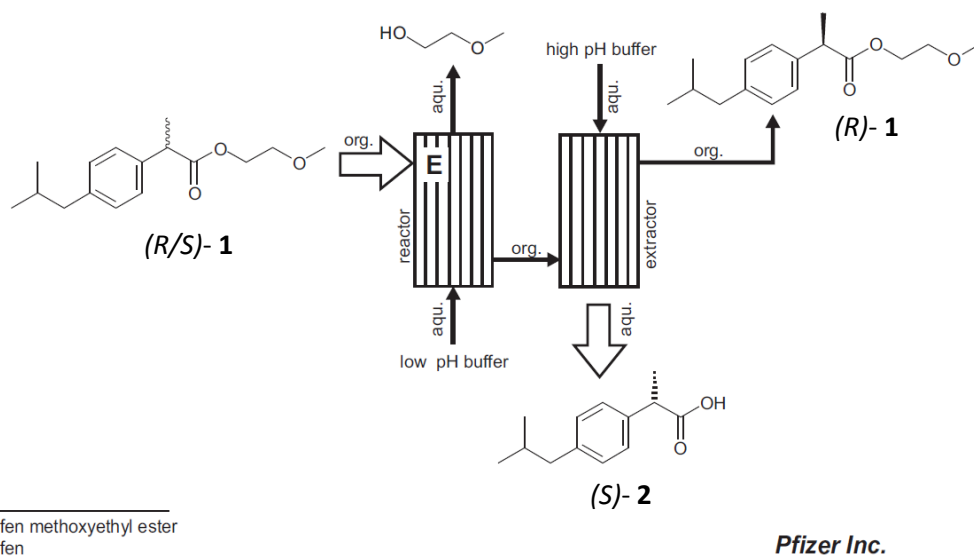
Actualmente hay varios métodos que permiten la resolución racémica del (R, S)-ibuprofeno, entre ellos, métodos biocatalíticos como el uso de lipasas procedentes de *Candida rugosa* para obtener el S-ibuprofeno. Uno de estos métodos consiste en el uso de 1-propanol ó 2-propanol junto con la lipasa, incubando la reacción en agitación durante 96h y siempre a bajas temperaturas (no superiores a 55°C).⁽¹⁰⁾ **(Esquema 2)** Con este método alcanzamos un 98% de exceso enantiomérico (ee).



Esquema 2: esterificación biocatalítica por lipasa de (R,S)- ibuprofeno a partir de 1-propanol y 2- propano.⁽¹⁰⁾

Existe otro método para la resolución racémica del (R, S)- ibuprofeno, que aprovecha las propiedades catalíticas mejoradas de una esterasa modificada genéticamente, que procedía originalmente de *Aeropyrum pernix* K1, y técnicas de ultrasonido en condiciones óptimas (potencia del ultrasonido de 200 W y temperatura de 35 °C). Gracias a este método, la enzima puede ser utilizada en varios ciclos manteniendo una actividad relativa superior al 99%, se consigue una actividad enzimática casi 90 veces mayor, y por tanto permite obtener unos resultados de enantioselectividad muy superiores comparado con el método de agitación convencional.⁽¹¹⁾

Sin embargo, el método para la resolución racémica del metoxietilester de (R, S)- ibuprofeno, patentado por *Pfizer Inc.*®, consiste en el uso de una lipasa procedente de *Candida cylindraceae*. La enzima presenta actividad en un amplio rango de valores de pH, sin embargo su actividad se ve disminuida en presencia del producto (ibuprofeno). Para evitar esta inhibición, se ha desarrollado un proceso trabajando a diferentes pHs; en un primer reactor se trabaja a pH ácido, y como los sustratos presentan una muy baja solubilidad en el medio acuoso, se utiliza una membrana de fibras huecas con la lipasa inmovilizada en su interior. El metoxietilester de ibuprofeno, sustrato de la reacción, se solubiliza en medio orgánico y se pone en contacto con la parte exterior de la membrana, la cual se encuentra separando el medio orgánico del acuoso; después de la hidrólisis carboxílica del éster que tiene lugar de forma enantioselectiva, el ibuprofeno es arrastrado por la fase orgánica. En un segundo reactor donde se combina otro módulo de membranas ajustadas a un valor de pH elevado, es donde se consigue separar de forma sencilla el producto, (S)-ibuprofeno, del éster que no ha reaccionado con la enzima.⁽¹²⁾ **(Esquema 3)**



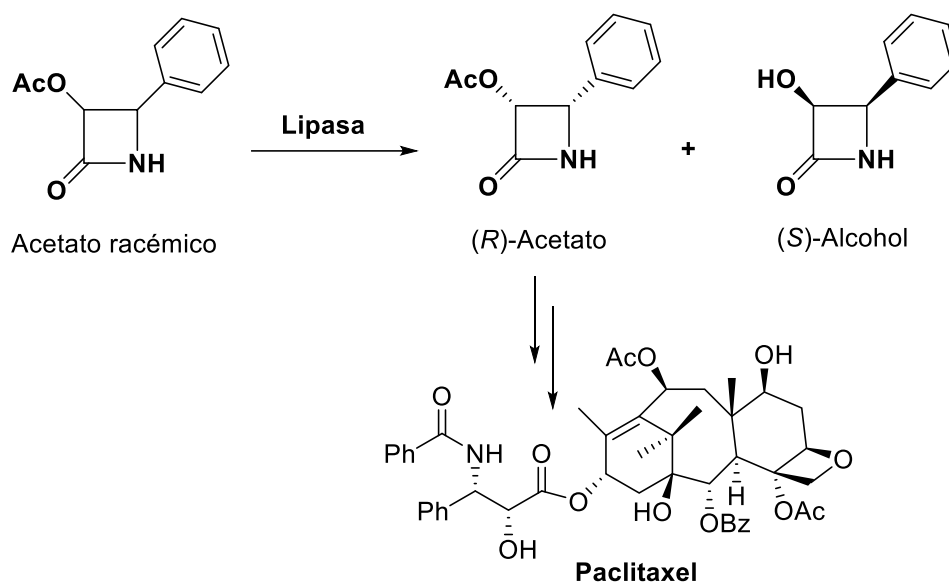
Esquema 3: proceso de resolución racémica para la obtención de (S)- Ibuprofeno (Pfizer Inc[®])

Otro de los ejemplos que resultan muy interesantes lo encontramos en el caso del **paclitaxel**, que es un agente citostático que interfiere en los procesos mitóticos celulares al estimular el ensamblaje de microtúbulos a partir de los dímeros de tubulina; de esta forma se estabilizan los microtúbulos y se impide la despolimerización, lo que provoca la inhibición de la reorganización dinámica normal de la red microtubular, que resulta esencial para la interfase celular y para los procesos mitóticos. Su uso está indicado para el tratamiento del carcinoma de ovario, de mama, de pulmón no microcítico avanzado y en sarcoma de Kaposi vinculado al SIDA. (CIMA)

El paclitaxel se obtiene de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*). Conseguir una cantidad suficiente de esta sustancia en la naturaleza supondría talar estos árboles, lo cual resultaría completamente insostenible; por esto se llevan a cabo métodos semisintéticos, donde se incluyen pasos biocatalíticos, para obtener el paclitaxel sin que suponga un desastre medioambiental.

La hidrólisis enantioselectiva del compuesto racémico inicial es llevada a cabo con gran eficacia por la lipasa PS-30, procedente de *Pseudomonas cepacia*, y permite la obtención (3R-cis)-acetiloxi-4-fenil-2-acetidinona, un intermedio necesario en la síntesis del paclitaxel.⁽¹³⁾

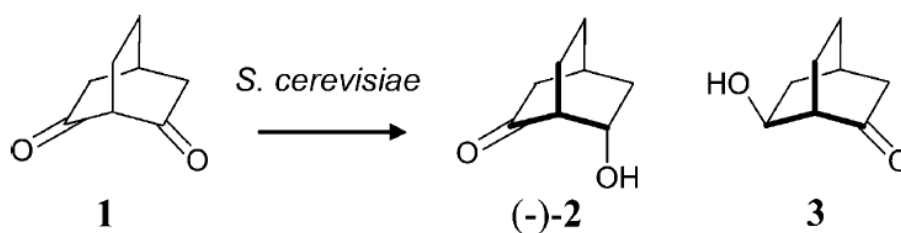
(Esquema 4)



Esquema 4: Hidrolisis mediante lipasas para obtención de intermediarios en la síntesis de paclitaxel.

La reacción enzimática se lleva a cabo en presencia de tampón fosfato, para mantener un pH 7.0. La reacción se produce a la temperatura de 29°C y debe mantenerse en agitación a 200 rpm. Después de 48 horas, la reacción ofrece un rendimiento del 96% y un ee del 99,6%. Para recuperar la enzima con el fin de ser reutilizada posteriormente, se utiliza una técnica que, tras la centrifugación del caldo de reacción, realiza varios lavados con etanol frío seguidos de concentraciones a vacío.

Otro intermedio en la síntesis de derivados de taxanos es el (1R,4S,6S)-6-hidroxibiciclo [2.2.2] octan-2-ona (Compuesto **2**), que se puede obtener a través de la reducción del biciclo[2.2.2]octano-2,6-diona (compuesto **1**), utilizando células enteras de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente.⁽¹⁴⁾ (**Esquema 5**)



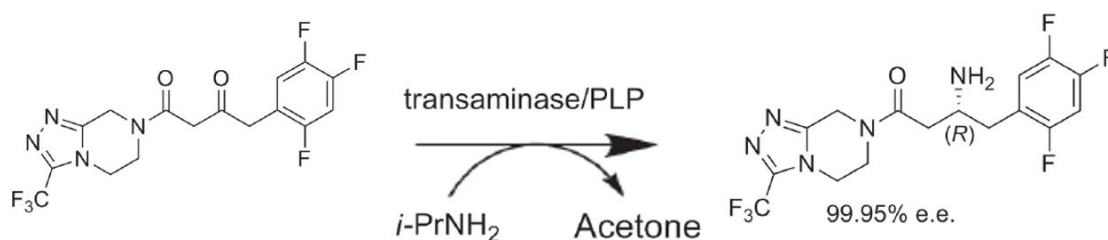
Esquema 5: Obtención mediante reducción de compuestos intermedios en la síntesis de taxanos

En este caso, la enzima presentaba una baja estereoselectividad, por tanto se requería que la levadura se encontrara muy concentrada para obtener un rendimiento adecuado; sin embargo, esto también tenía el inconveniente de que la reacción se veía frenada por la acumulación de producto al haber tanta actividad enzimática. La solución se obtuvo gracias a la modificación genética de la enzima, que permitía, después de utilizar una cromatografía en gel de sílice y una recristalización posterior para concentrar los productos, obtener un aislamiento del compuesto del 59%, un rendimiento del 98% y un ee del 98%, aunque para realizar la reducción enzimática es necesario limitar la concentración de sustrato a 5 g/L.

Un último ejemplo en el que se aplica la biocatálisis es en la **síntesis de la sitagliptina**, catalogada dentro de los medicamentos usados en diabetes. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la dipeptidil- peptidasa 4 (DPP-4), y está indicado en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, ya que consiguiendo una mejoría en el control glucémico de los pacientes. (CIMA)

La síntesis clásica de sitagliptina incluía una hidrogenación asimétrica de una enamina a alta presión, utilizando un catalizador quiral a base de rodio. Con este método el rendimiento y la estereoselectividad no resultaban muy adecuadas, y además los productos presentaban contaminación por rodio, lo que suponía la necesidad de recurrir a procesos de purificación adicionales y costosos.

Para solucionar estos inconvenientes se ha desarrollado una transaminasa enantioselectiva, la cual cataliza la aminación reductora de la prostagliptina, usando isopropilamina, en la amina quiral R-sitagliptina. Con esta técnica se ha conseguido un rendimiento del 92% y un ee mayor del 99%. (**Esquema 6**)



Esquema 6: conversión mediante transaminasa de prostagliptina en (R)-sitagliptina

Lo más interesante de este ejemplo es que la transaminasa original, procedente de *Arthrobacter sp.*, no mostraba una actividad adecuada al entrar en contacto con el sustrato. Fueron necesarias 27 mutaciones para conseguir adaptar la enzima a la forma del sustrato; es decir, se fueron realizando modificaciones genéticas que suponían alguna mejora en la actividad enzimática, se seleccionaron y se combinaron para conseguir una enzima que se adaptase correctamente al sustrato. ⁽¹⁵⁾

CONCLUSIONES

La biocatálisis como estrategia en la síntesis de medicamentos resulta realmente interesante, ya que ofrece las herramientas para desarrollar procesos que permiten mejorar tanto el rendimiento como la estereoselectividad de los principios activos. La biocatálisis también suele resultar más rentable económicamente y más respetuosa con el medioambiente, y no solo es útil a nivel de laboratorio, sino que las enzimas pueden ser utilizadas también a nivel industrial.

Dentro de las hidrolasas, las lipasas son una de las enzimas más utilizadas en la síntesis de diversos fármacos, como antidepresivos como la pregabalina, AINEs como el ibuprofeno o antitumorales como el paclitaxel. Sin embargo puede haber distintas rutas de síntesis para un mismo principio activo, y por tanto pueden resultar útiles distintas enzimas para el mismo objetivo, como vimos en el caso del paclitaxel que, aparte de lipasas, también podía incluir reductasas en su ruta sintética.

Es muy interesante el caso del ibuprofeno, en el que se utilizan enzimas procedentes de microorganismos del mismo género pero de distinta especie (*Candida cylindraceae*, *C. rugosa*); y el paclitaxel, donde se utilizan células enteras, con las limitaciones que ello supone.

En el caso de la sitagliptina se ve claramente como, gracias a la combinación de la ingeniería genética y la biocatálisis, se pueden obtener enzimas que atiendan perfectamente a las necesidades actuales, y que permitan optimizar los procesos sintéticos ofreciendo muchas posibilidades a nivel industrial.

BIBIOGRAFÍA

- 1) Muñoz Solano D, Hoyos P, Hernáiz M, Alcántara A, Sánchez-Montero J. *Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs*. *Bioresource technology*. 2012;115:196-207.
- 2) Choi J, Han S, Kim H. *Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects*. *Biotechnology Advances*. 2015;33(7):1443-1454.
- 3) Gotor-Fernández V, Brieva R, Gotor V. *Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2006;40(3-4):111-120.
- 4) Sheldon R, van Pelt S. *Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how*. *Chem Soc Rev*. 2013;42(15):6223-6235.
- 5) Sheldon R. *Biocatalysis and Green Chemistry*. In: N. Patel R, ed. by. *Green Biocatalysis*. 1st ed. John Wiley & Sons, Inc; 2016. Chapter 1.
- 6) Arroyo M, de la Mata I, García J, Barredo J. *Biocatalysis for Industrial Production of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs)*. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. 2017;:451-473.
- 7) Martinez C, Hu S, Dumond Y, Tao J, Kelleher P, Tully L. *Development of a Chemoenzymatic Manufacturing Process for Pregabalin*. *Organic Process Research & Development*. 2008;12(3):392-398.
- 8) Carvalho A, Fonseca T, Mattos M, Oliveira M, Lemos T, Molinari F et al. *Recent Advances in Lipase-Mediated Preparation of Pharmaceuticals and Their Intermediates*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(12):29682-29716.
- 9) Li X, Zheng R, Ma H, Zheng Y. *Engineering of *Thermomyces lanuginosus* lipase Lip: creation of novel biocatalyst for efficient biosynthesis of chiral intermediate of Pregabalin*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;98(6):2473-2483.
- 10) Siodmiak T, K. Ruminski J, P. Marszall M. *Application of Lipases from *Candida rugosa* in the Enantioselective Esterification of (R,S)-Ibuprofen*. *Current Organic Chemistry*. 2012;16(8):972-977.
- 11) Zhao D, Yue H, Chen G, Jiang L, Zhang H, Wang Z et al. *Enzymatic resolution of ibuprofen in an organic solvent under ultrasound irradiation*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2014;61(6):655-659.

- 12) Liese A, Seelbach K, Wandrey C. *Industrial biotransformations*. Weinheim: Wiley-VCH; 2006;(EC3.1.1.3):294-296
- 13) Patel R, Banerjee A, Szarka L. *Biocatalytic synthesis of some chiral pharmaceutical intermediates by lipases*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 1996;73(11):1363-1375.
- 14) Johanson T, Carlquist M, Olsson C, Rudolf A, Frejd T, Gorwa-Grauslund M. *Reaction and strain engineering for improved stereo-selective whole-cell reduction of a bicyclic diketone*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007;77(5):1111-1118.
- 15) Savile C, Janey J, Mundorff E, Moore J, Tam S, Jarvis W et al. *Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture*. Science. 2010;329(5989):305-309.

CIMA: [Internet]. Available from: <https://www.aemps.gob.es/cima/publico/home.html>