



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

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

Autora: María Gómez Muñoz

Tutora: María José Hernáiz Gómez-Dégano

Convocatoria: Junio

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABREVIACIONES.....	4
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	5
Heparina y glicosaminoglicanos	5
Mecanismo de acción. Relación estructura-actividad	7
Indicaciones.....	8
OBJETIVOS.....	9
METODOLOGÍA	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
Síntesis biológica.....	10
Obtención actual de la heparina	12
Síntesis química.....	13
Síntesis quimioenzimática.....	13
CONCLUSIONES	18
BIBLIOGRAFIA.....	18

RESUMEN

La heparina es el fármaco anticoagulante más utilizado en el mundo hoy en día. Éste medicamento, utilizado para el tratamiento de la coagulación y los trastornos trombóticos, es enumerado como uno de los medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Toneladas de estos glicosaminoglicanos se usan anualmente como productos farmacéuticos y nutracéuticos, siendo el mercado anual de la heparina de ~7 millones de dólares; no obstante, éste sigue siendo un producto que se obtiene mayoritariamente a partir de tejido animal en unas condiciones no tan ideales de buenas prácticas de fabricación (cGMP) con los consiguientes riesgos de adulteración y contaminación. Una crisis de contaminación en 2007-2008 aumenta el ímpetu para proporcionar fuentes de heparina no derivadas de animales. Asimismo, existe una creciente preocupación por la escasez de heparina porcina dada la enorme cantidad de animales que deben sacrificarse para satisfacer la demanda actual. Es entonces cuando surge la necesidad de encontrar nuevos enfoques para su producción, entre los que se incluye la modificación quimioenzimática. La heparina modificada por ingeniería genética elimina muchos elementos estructurales indeseables presentes en las heparinas derivadas de tejidos animales.

ABSTRACT

Heparin is the most widely used anticoagulant drug in the world today. This medicine, used for the treatment of coagulation and thrombotic disorders, is catalogued as one of the essential medicines of the World Health Organization (WHO). Ton quantities of these glycosaminoglycans are used annually as pharmaceuticals and nutraceuticals, with the annual market for heparin being ~ 7 million dollars; nevertheless, this continues to be a product obtained mainly from animal tissue under less than ideal current good manufacturing practice (cGMP) conditions with the attendant risks of adulteration and contamination. A contamination crisis in 2007-2008 increases the impetus to provide non-animal-derived sources. Likewise, there is growing concern about the scarcity of porcine heparin taking into account the huge number of animals that must be slaughtered to meet current demand. It is then when the need arises to find new approaches for its production, among which the chemoenzymatic modification is included. Genetically engineered heparin removes many undesirable structural elements present in heparins derived from animal tissues.

ABREVIACIONES

2-O-sulfotransferasa (2OST); 2-O-sulfotransferasa 1 (2OST-1); 3'-fosfoadenosin-5'fosfato (PAP); 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato (PAPS); 3-O-sulfotransferasa (3OST); 3-O-sulfotransferasa 1 (3OST-1); 3-O-sulfotransferasa 3 (3OST-3); 3-O-sulfotransferasa 5 (3OST-5); 6-O-sulfotransferasa (6OST); 6-O-sulfotransferasa 1 (6OST-1); 6-O-sulfotransferasa 3 (6OST-3); ácido D-glucurónico (GlcA); ácido L-idurónico (IdoA); antitrombina III (ATIII); arilsulfotransferasa IV (AST-IV); buenas prácticas de fabricación (cGMP); C5-epimerasa (C5 Epi); condroitin sulfato (CS); encefalopatía esponjiforme bovina (EEB); factor II activado (factor IIa); factor X activado (factor Xa); galactosa (Gal); glicosaminoglicano (GAG); glucosamina (GlcN); glucosaminil *N*-deacetilasa/*N*-sulfotransferasa (NDST); glicosaminoglicano (GAG); heparina no fraccionada (HNF); heparina de bajo peso molecular (HBPM); heparina de ultra bajo peso molecular (HUBPM); heparosán sintasa 1 (PmHS1); heparosán sintasa 2 (PmHS2); histidina (His); *N*-acetil (NA); *N*-acetil-D-glucosaminil transferasa (kfiA); *N*-acetilgalactosamina (GalNAc); *N*-acetilglucosamina (GlcNAc); *N*-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa (GlmU); *N*-deacetilasa/*N*-sulfotransferasa 1 (NDST-1); *N*-sulfato (NS); *N*-sulfoglucosamina (GlcNS); *N*-sulfotransferasa (NST); Organización Mundial de la Salud (OMS); *p*-nitrofenilo (PNP); polisacárido capsular (CPS); *p*-sulfato de nitrofenilo (PNS); relación estructura-actividad (SAR); sulfato de heparán (HS); uridin 5'-difosfato acetilglucosamina (UDP-GlcNAc); uridin 5'-difosfato ácido glucurónico (UDP-GlcA); uridin 5'-difosfato *N*-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA); xilosa (Xyl)

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Heparina y glicosaminoglicanos

La heparina es el anticoagulante más antiguo utilizado en medicina clínica. Fue descubierta en 1916 por Jay Mclean, un estudiante de medicina, en el Johns Hopkins Hospital en un intento de aislar sustancias tromboplásticas. Estudios posteriormente realizados condujeron al inicio de su uso clínico en 1935, constituyendo un avance monumental debido a la escasez de alternativas clínicamente viables. Décadas de investigación han proporcionado información adicional sobre su estructura y mecanismo de acción anticoagulante, aunque nuestro conocimiento actual de la heparina sigue siendo incompleto. Se le dio el nombre de heparina porque se extrajo por primera vez a partir del hígado. ^(1, 2)

La heparina es un polisacárido de origen natural perteneciente a la familia de los *glicosaminoglicanos sulfatados* (mucopolisacáridos). Dentro de la misma nos encontramos con el sulfato de heparan, molécula estrechamente relacionada con la heparina en cuanto a vía biosintética, aunque difiere en su localización y estructura. En cuanto a la función, según recientes estudios ⁽¹⁾ se han visto nuevas indicaciones para la heparina comparables a las del sulfato de heparan.

El sulfato de heparan es un glicosaminoglicano ampliamente distribuido por la superficie celular y la matriz extracelular, mientras que la heparina se encuentra principalmente de forma intracelular en los gránulos de los mastocitos, liberándose junto con la histamina en una respuesta alérgica. ^(1, 4, 6)

Siendo una molécula estructuralmente compleja, el glicosaminoglicano se compone de una cadena principal consistente en unidades repetidas de disacáridos con una fórmula general basada en residuos de ácido urónico y aminoazúcares. Los aminoazúcares más habituales son *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) y el ácido urónico puede ser ácido D-glucurónico (GlcA) o bien ácido L-idurónico (IdoA). Los dímeros están unidos entre sí por enlace (1→4) glucosídico en posición beta [**Figura 1**]. ⁽⁴⁻⁷⁾

La heparina, presentando pesos moleculares que varían entre 5-40kDa, es una forma especial de HS con un mayor nivel de sulfatación y un mayor contenido en IdoA. La estructura heparínica consiste en unidades repetidas de disacáridos compuestas por residuos de ácido urónico (L-idurónico (IdoA) o ácido D-glucurónico (GlcA)) y *N*-acetil-D-glucosamina. Con frecuencia se presenta como un único dominio *N*-sulfatado extendido, mientras que el HS exhibe una estructura con dominios alternos *NA* y *NS*, compuestos de

regiones contiguas *N*-acetil no sulfatadas y *N*-sulfatadas, respectivamente, y dominios NA/NS mixtos. (5, 8, 9)

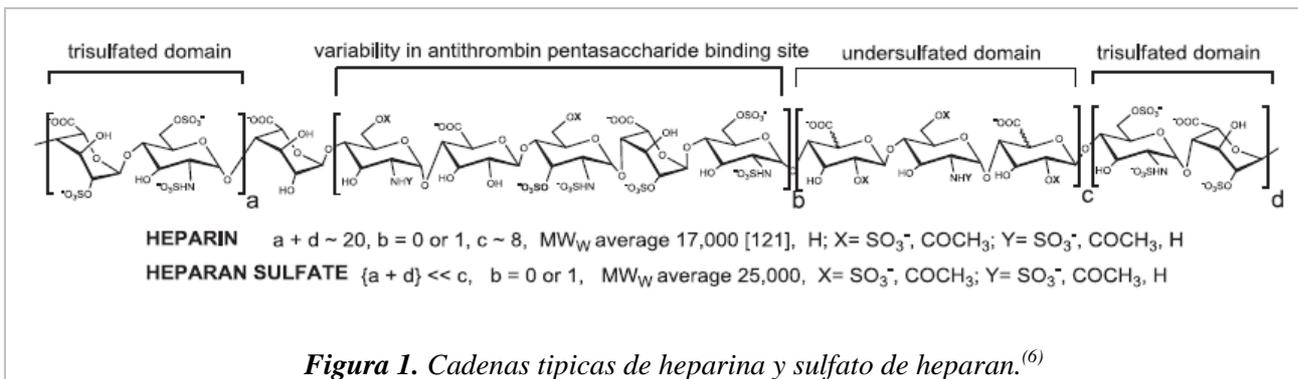


Figura 1. Cadenas típicas de heparina y sulfato de heparan.⁽⁶⁾

Debido a la heterogeneidad de su estructura, la bioactividad y acción fisiológica de la heparina no fraccionada (HNF) es amplia e impredecible. La investigación y el desarrollo posteriores dieron como resultado la introducción de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) a finales de los años setenta y principios de los ochenta, en un experimento para producir un perfil de actividad más predecible [Figura 2].

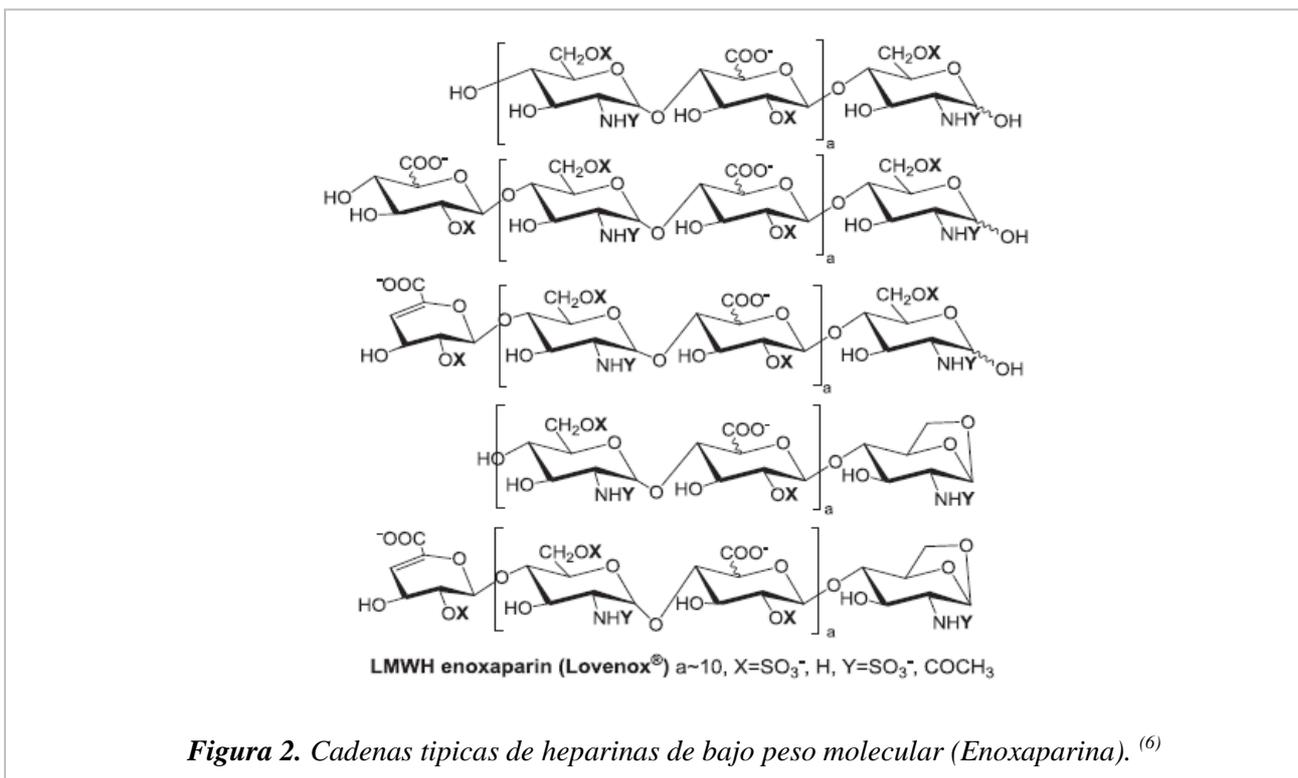
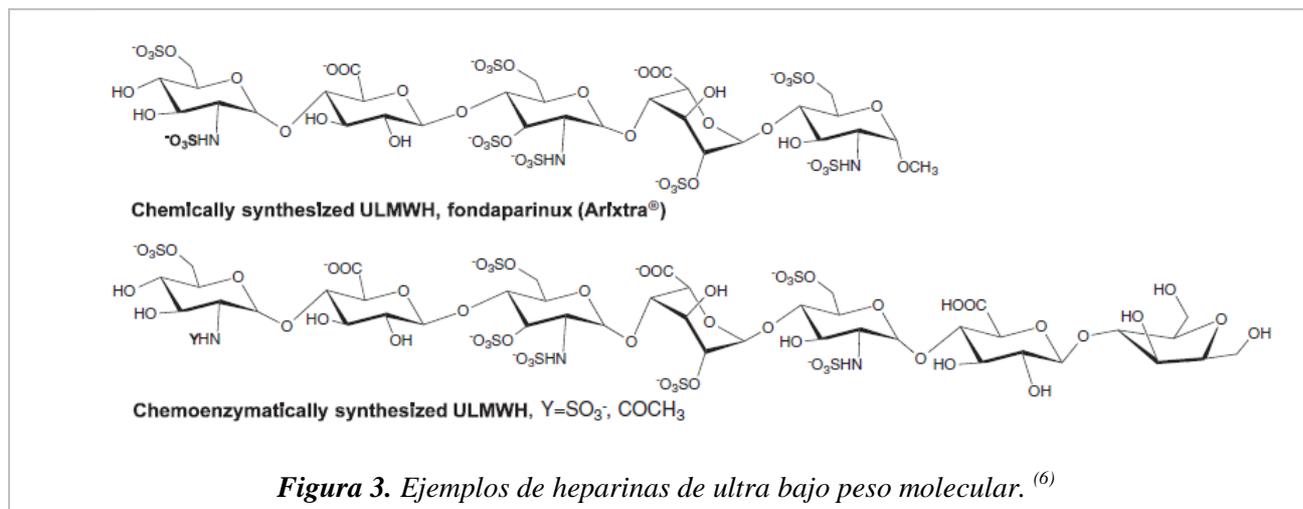


Figura 2. Cadenas típicas de heparinas de bajo peso molecular (Enoxaparina).⁽⁶⁾

Las heparinas de ultra bajo peso molecular (HUBPM) se desarrollaron a principios de la década de 2000 a través de procesos químicos sintéticos [Figura 3]. El motivo fue producir agentes con un perfil de efectos secundarios incluso mejor, mientras promocionaban propiedades anticoagulantes similares o mejores. Aunque algunas HUBPM han encontrado

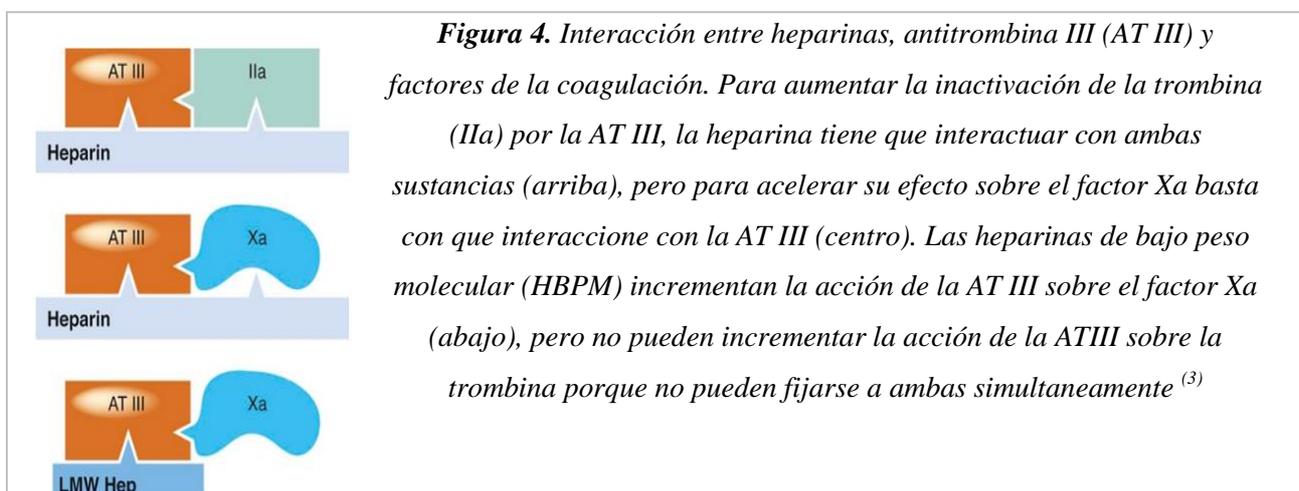
uso clínico, no se implementan ampliamente debido en parte a su alto costo, resultando en una baja relación beneficio-coste. (1, 10, 11)



Mecanismo de acción. Relación estructura-actividad

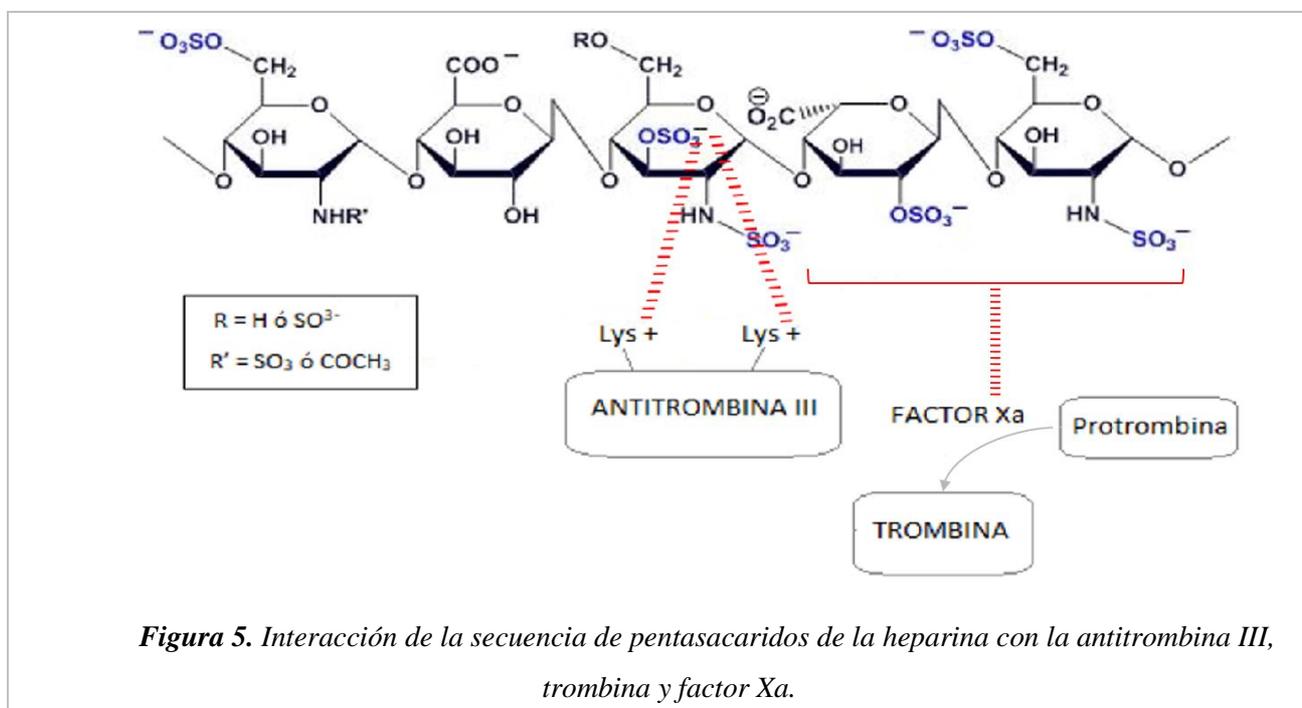
La heparina inhibe la coagulación, tanto in vivo como in vitro, indirectamente uniéndose a la antitrombina III (AT III) y facilitando posteriormente el efecto inhibitor de la AT sobre la trombina y el factor X activado (factor Xa) (la AT III incrementa su afinidad por las serina proteasas). Solo la heparina no fraccionada (HNF) que contiene al menos 18 secuencias de sacaridos puede influir en la acción de la AT III sobre la trombina; sin embargo, los fragmentos HNF de cualquier longitud que contengan una única secuencia de pentasacáridos pueden inhibir la acción del factor Xa.

Las heparinas de bajo peso molecular (HBPM, HUBPM) aumentan la acción de la antitrombina III sobre el factor Xa pero no su acción sobre la trombina, porque las moléculas son demasiado pequeñas para unirse tanto a la enzima como al inhibidor [Figura 4]. (3)



La heparina tiene propiedades anticoagulantes debido a la presencia de 3-O-sulfatación, que puede unirse fuertemente a la antitrombina III, inhibidor de serina proteasa. Esta unión causa un cambio conformacional que activa la antitrombina, inhibiendo la trombina y serina proteasas involucradas en la cascada de coagulación. (5, 9, 12)

La secuencia de pentasacáridos presente en los polisacáridos HS y heparina que incluye $\rightarrow 4) \text{GlcNS6S} (1 \rightarrow 4) \text{GlcA} (1 \rightarrow 4) \text{GlcNS3S6S} (1 \rightarrow 4) \text{IdoA2S} (1 \rightarrow 4) \text{GlcNS6S} (1 \rightarrow$, es responsable de su unión específica al inhibidor de serina proteasa antitrombina III (AT). Por otro lado, la secuencia repetida de disacáridos trisulfatados $\rightarrow 4) \text{IdoA2S} (1 \rightarrow 4) \text{GlcNS6S} (1 \rightarrow$ corresponde al sitio de unión de la heparina a la trombina (o factor IIa, FIIa) y facilita el ensamblaje del complejo ternario de heparina-AT-FIIa requerido para la actividad anticoagulante global de la heparina [Figura 5]. (13)



Indicaciones

En la actualidad, la heparina (que incluye HNF, HBPM, HUBPM) se usa con mayor frecuencia como *anticoagulante*. Los anticoagulantes están indicados para evitar trombosis venosa profunda (p.ej. preoperatorias), extensión de una trombosis venosa profunda establecida, embolia pulmonar, trombosis y embolización en pacientes con fibrilación auricular, trombosis sobre válvulas cardíacas protésicas, coagulación en circulaciones extracorpóreas (p.ej. durante hemodialisis), progresión de la lesión miocárdica en pacientes con angina inestable y durante el tratamiento del infarto de miocardio con elevación de ST.⁽³⁾

Los fragmentos de heparina (p.ej. enoxaparina, dalteparina) o un pentasacárido sintético (fondaparinux), conocidos como heparinas de bajo peso molecular (HBPM) requieren menos requisitos para el monitoreo, una mayor biodisponibilidad y la posibilidad de una administración ambulatoria. Sin embargo, las HBPM se eliminan principalmente por vía renal, lo que limita su uso en pacientes con insuficiencia renal. Además, la actividad anticoagulante de las HBPM está parcialmente neutralizada por el sulfato de protamina. ^(1, 14, 15)

Además de esta usual indicación como anticoagulante, a lo largo de los años ha aumentado el interés en las posibles aplicaciones de la heparina para otros fines. Estas aplicaciones van desde su uso como antiinflamatorio y antitumoral hasta la prevención de enfermedades infecciosas y su uso como nanovehículos para la administración de medicamentos. ⁽¹⁾

Por su parte, el sulfato de heparan (HS) desempeña papeles esenciales en una serie de procesos biológicos, controlando la angiogénesis, desarrollo embrionario, respuestas inflamatorias, metabolismo de lípidos, enfermedad infecciosa, metástasis tumoral y coagulación de la sangre. ⁽¹³⁾

OBJETIVOS

Analizar la estructura heparínica, la relación con su actividad y los métodos existentes para su producción descritos recientemente. Nos centramos fundamentalmente en la síntesis quimioenzimática de heparinas así como en la obtención por bioingeniería.

METODOLOGÍA

Este trabajo es una recopilación bibliográfica de estudios sobre técnicas de obtención de la heparina, concretamente síntesis quimioenzimática. Se han utilizado bases de datos como Pubmed o Science y el texto “Pharmacology; Rang y Dale”.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis biológica

Como se ha mencionado, la heparina y el HS comparten una vía biosintética esencialmente idéntica. La ruta completa incluye tres partes: síntesis de una región enlace tetrasacárida, alargamiento de la cadena principal (o polimerización) y modificación de la misma. ⁽⁸⁾

La biosíntesis de la heparina se produce principalmente en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi de los mastocitos [Figura 6]. La síntesis de la región de enlace requiere cuatro enzimas para construir un dominio tetrasacarídico (GlcA-Gal-Gal-Xyl) unido a un residuo de serina de una proteína del núcleo, serglicina. Una vez completa la biosíntesis de la región de enlace tetrasacárida, las enzimas glicosiltransferasas catalizan la adición alterna de los residuos activados UDP-GlcA y UDP-GlcNAc para polimerizar la cadena, que es después modificada por sulfotransferasas. Estas sulfotransferasas usan un donante, 3'fosfoadenosina-5'fosfosulfato (PAPS), para transferir grupos sulfato a una posición específica de hidroxilo o amino de un residuo de azúcar. La modificación comienza por la glucosaminil *N*-deacetilasa/*N*-sulfotransferasa (NDST) convirtiendo unidades de GlcNAc en *N*-sulfoglucosamina (GlcNS). Después, la C5-epimerasa convierte algunas unidades de GlcA en ácido idurónico (IdoA), trabajando en conjunto con la 2-O-sulfotransferasa que incorpora grupos sulfato en la posición 2 de IdoA. El polisacárido es finalmente modificado por 6-O-sulfotransferasa (6-OST) y 3-O-sulfotransferasa (3-OST), incorporando grupos sulfato en las posiciones 6 y 3 de la glucosamina (GlcN), respectivamente. La acción de NDST en GlcNAc dicta los niveles de O-sulfonación y epimerización. ^(1, 4-6, 8, 16-19)

Hay un total de 12 enzimas involucradas en esta ruta, que actúan conjuntamente para producir la molécula deseada. Sin embargo, muchas de estas enzimas tienen varias isoformas (p.ej. 6-OST y 3-OST), que pueden explicar la heterogeneidad de la heparina y permiten que estas enzimas dirijan la biosíntesis del glicosaminoglicano relacionado, sulfato de heparan. El grado de sulfatación y localización de los residuos de sulfato determina el espectro de actividad del producto. Tras la degranulación de los mastocitos, la heparina en forma de peptidoglicano se transforma en la heparina GAG mediante la acción de proteasas y β -endo glucuronidasa. ^(1, 5, 6, 20)

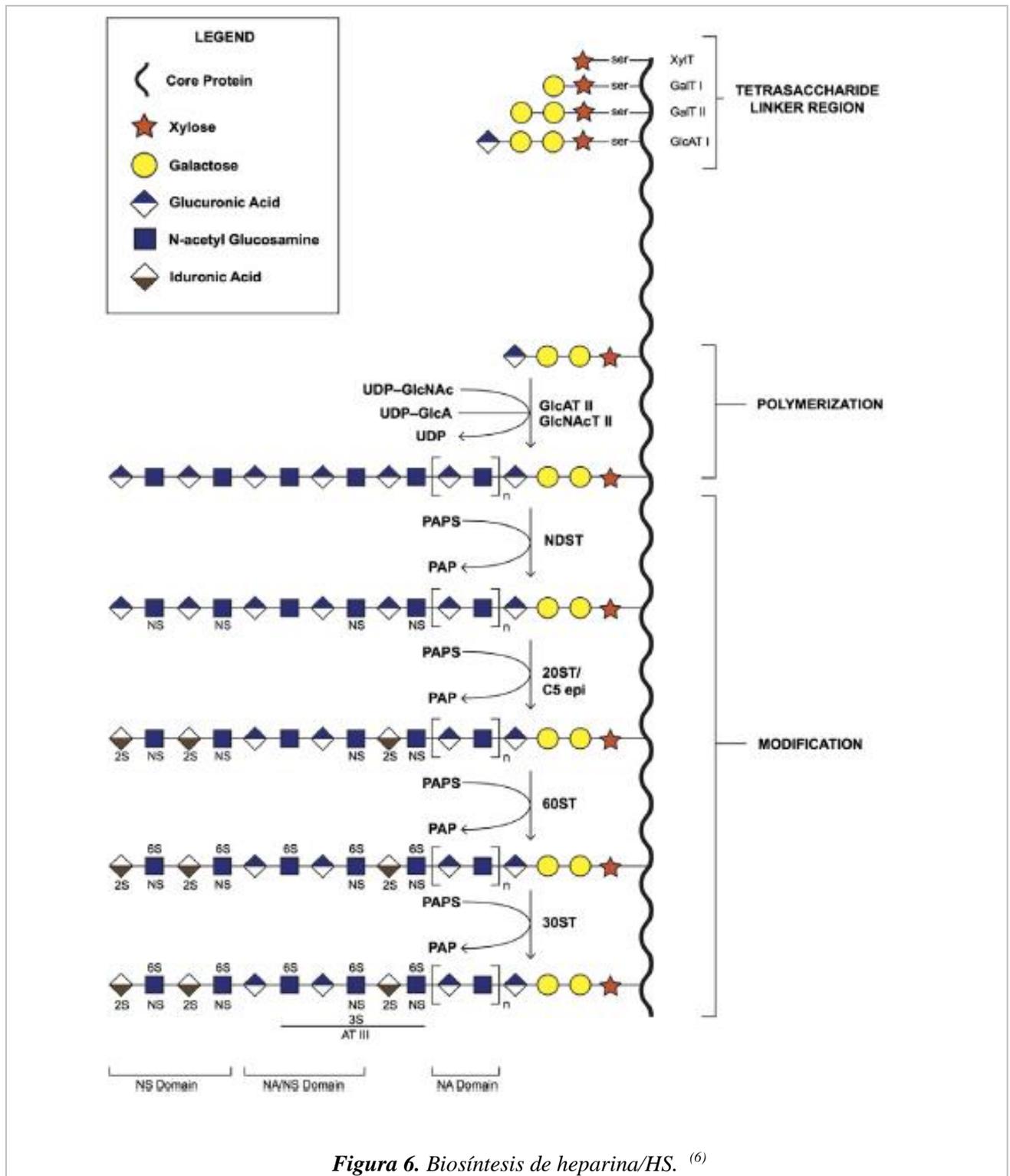


Figura 6. Biosíntesis de heparina/HS. ⁽⁶⁾

Obtención actual de la heparina

Actualmente la heparina deriva de tejido animal con los consiguientes riesgos de adulteración y contaminación. El método utilizado actualmente para la preparación comercial de heparina ha cambiado desde el utilizado a principios del siglo XX e implica cinco pasos básicos: 1. preparación de tejido; 2. extracción de heparina del tejido; 3. recuperación de heparina cruda; 4. purificación de heparina; y 5. recuperación de heparina purificada. ⁽²¹⁾

Sin embargo, para minimizar el impacto ambiental de alta ceniza, alta demanda bioquímica de oxígeno de proteína hidrolizada, la extracción de heparina cruda normalmente tiene lugar en las instalaciones de los mataderos, no estando bajo condiciones de buenas prácticas de fabricación (cGMP).

En un principio la fuente primaria de tejido fue el hígado de perro, de donde fue aislada por primera vez, evolucionando posteriormente a pulmón de vaca y finalmente a intestino porcino.

La preparación de heparina a partir de tejidos de rumiantes obtenidos en mataderos presenta una especial preocupación particularmente por la posibilidad de transmisión de enfermedades virales y priónicas. Ejemplos pueden ser la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB, enfermedad de las vacas locas), apareciendo tanto en humanos como en el propio ganado, y la tembladera o scrapie que afecta a ovejas. Por lo tanto, el uso de productos de tejidos bovino y ovino como productos farmacéuticos inyectables ha disminuido y estos tejidos ahora se usan raramente en la producción de heparina.

Asimismo, una crisis en 2008 de importancia para la salud pública que causo alrededor de 100 muertes solamente en los Estados Unidos, además de otras reacciones adversas, se atribuyó a la contaminación de muestras de heparina, conteniendo un GAG sulfatado en exceso. La falta de supervisión y cGMP en mataderos deja a la cadena de suministro de heparina abierta a este tipo de adulteración, que puede ser difícil de detectar. Desde entonces, varios enfoques de la bioingeniería de la heparina han estado bajo investigación, incluidos entre ellos la modificación quimioenzimática. ^(5, 22)

Además de la susceptibilidad de las poblaciones animales a enfermedades infecciosas y las alteraciones (debidas a las variaciones estacionales, geográficas y de subespecie) que puede sufrir el producto obtenido de una especie animal, la sobreexplotación puede potencialmente reducir drásticamente el suministro. Es por todo ello que nuevas técnicas de obtención de heparina son estudiadas.

Síntesis química

A pesar de los grandes avances en la química de carbohidratos, la síntesis química de oligosacáridos más grandes que los pentasacáridos sigue siendo desafiante.

En 2002 Sanofi introdujo un pentasacárido heparínico sintético, Arixtra® (fondaparinux), una heparina de ultra bajo peso molecular (HUBPM). La preparación de estas heparinas se realiza mediante escisión química o enzimática controlada de heparina no fraccionada (HNF) en una reacción de despolimerización, produciendo así fragmentos de un menor peso molecular. Esta síntesis fue crítica para confirmar la estructura del pentasacárido de unión a AT y para comprender su relación estructura-actividad (SAR).

Sin embargo, la demanda de este fármaco no es muy alta debido a su alto coste (atribuido a los múltiples y tediosos pasos involucrados en la síntesis química, obteniéndose un rendimiento total de un 0,1%), perfil farmacológico pobre, irreversibilidad e ineffectividad en numerosas aplicaciones. ^(1, 4, 6, 13)

Síntesis quimioenzimática

La síntesis quimioenzimática de heparina, basada en métodos químicos y enzimáticos combinados, ha surgido como un enfoque alternativo al puramente químico. Este enfoque es particularmente eficaz para sintetizar polisacáridos sulfatados y oligosacáridos grandes, donde la síntesis química falla habitualmente.

Imitando la ruta biosintética de HS, este método representa una estrategia prometedora para abordar muchos desafíos sintéticos. El componente enzimático de la síntesis generalmente se realiza en condiciones suaves (20-37°C) usando medio acuoso (solvente "verde") que cataliza reacciones de glicosilación con una alta estereoselectividad (enlaces α - o β -glicosídicos) y reacciones de sulfonación con excelente regioselectividad, sin la necesidad de los repetitivos pasos de protección y desprotección. ^(4, 6, 13)

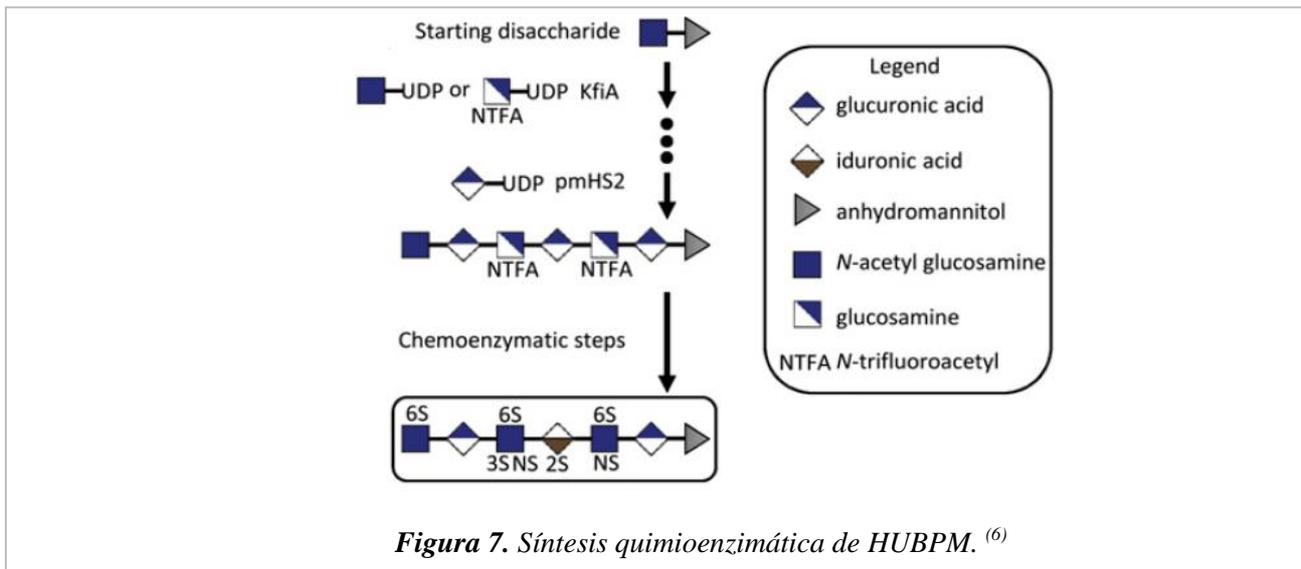
La síntesis quimioenzimática de sulfato de heparan (HS), heparina no fraccionada (HNF), HBPM y HUBPM como fármacos ahora se ha hecho posible con la expresión exitosa de enzimas biosintéticas recombinantes de heparina que incluyen glicosiltransferasas y sulfottransferasas [Tabla 1]. Las proteínas recombinantes a excepción de HS polimerasa se han expresado en *Escherichia coli*, células de insectos y en levaduras, ofreciendo una fuente abundante de enzimas para llevar a cabo la síntesis quimioenzimática de la heparina, basada en la acción de las polimerasas para la formación y elongación de la cadena principal, y una modificación adicional. ^(4, 6, 8)

Nombre	Abreviación	Gen
N-acetil-D-glucosaminil transferasa	KfiA	<i>Escherichia coli K5</i>
Heparosan sintasa 1 y 2	PmHS1, PmHS2	<i>Pasteurella multocida</i>
N-acetil-glucosamina-1-fosfato uridiltransferasa	GlmU	<i>Escherichia coli K5</i>
Arilsulfotransferasa IV	AST-IV	<i>Rattus norvegicus</i>
C5-epimerasa	C5 Epi	<i>Cricetulus griseus (célula CHO)</i>
2-O-sulfotransferasa 1	2OST-1	<i>Cricetulus griseus (célula CHO)</i>
6-O-sulfotransferasa 1	6OST-1	<i>Mus musculus</i>
6-O-sulfotransferasa 3	6OST-3	<i>Mus musculus</i>
3-O-sulfotransferasa 1	3OST-1	<i>Mus musculus</i>
3-O-sulfotransferasa 5	3OST-5	<i>Mus musculus</i>
3-O-sulfotransferasa 3	3OST-3	<i>Mus musculus</i>
N-deacetilasa/N-sulfotransferasa	NDST-1	<i>Rattus norvegicus</i>

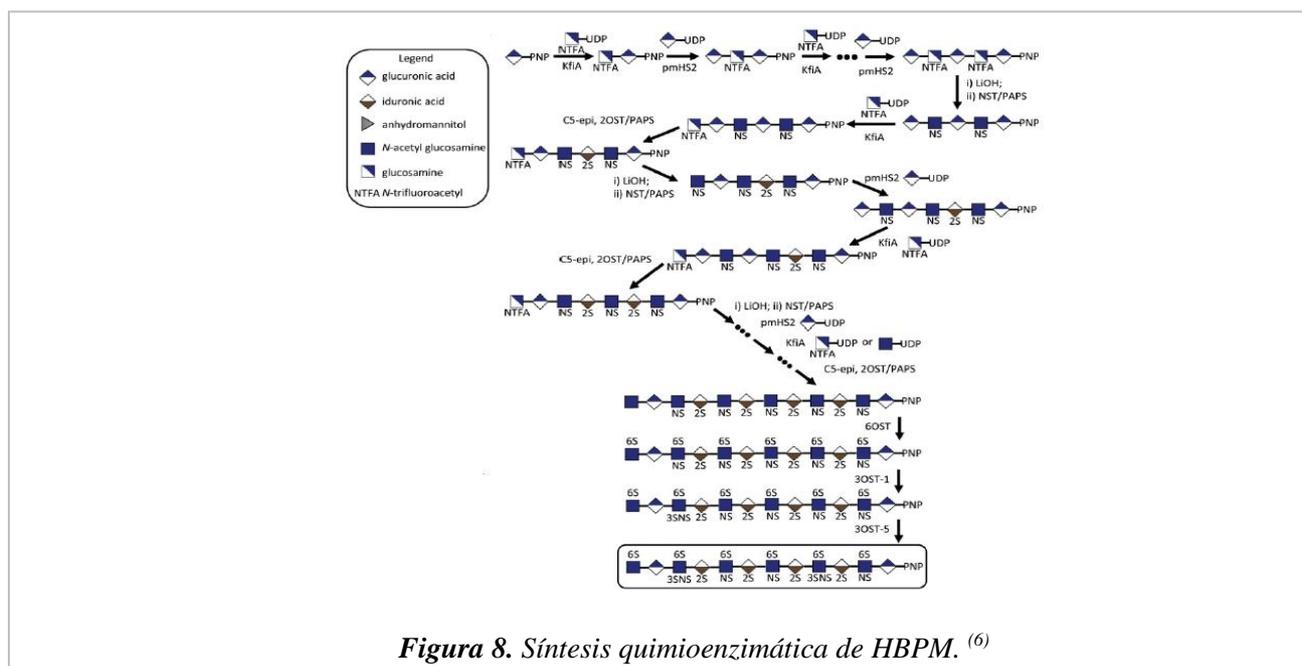
Tabla 1. Enzimas recombinantes usadas en la síntesis quimioenzimática de HS y heparina. ⁽⁶⁾

El diseño cuidadoso del esquema de reacción y el control del proceso es necesario para preparar una heparina de bioingeniería que sea química y biológicamente equivalente a la heparina derivada de animales actualmente utilizada.

En un principio, una HUBPM de tipo fondaparinux se sintetizó quimioenzimáticamente usando enzimas de biosíntesis de heparina. Se obtuvo un heptasacárido homogéneo en 12 etapas. La molécula se sintetizó a partir de donantes UDP-azúcar (UDP-GlcA y UDP-GlcNAc naturales y UDP-GlcN-trifluoracetato no natural (-GlcNTFA)) y un aceptor de disacárido derivado de heparosano con un residuo de anhidromanitol condensado en anillo, todo ello usando *N*-acetil glucosaminiltransferasa (KfiA) y heparosano sintasa (PmHS2) [Figura 7]. El alargamiento de la cadena catalizada por enzimas proporciona la estereoquímica anomérica correcta con un rendimiento superior al 80%, lo que sería imposible de lograr usando la glucosilación química. ⁽²³⁾



A partir de un aceptor de *p*-nitrofenilglucurónido comercialmente disponible, esta síntesis quimioenzimática iterativa se ha extendido a la preparación de HBPM, hasta la longitud del dodesacárido. En 22 pasos [Figura 8], muchos menos de los requeridos para la síntesis química de fondaparinux, este dodesacárido se obtuvo con ~40% de rendimiento. Esta HBPM homogénea mostró una actividad anti-factor Xa que podría revertirse completamente con sulfato de protamina. Además, posee un aclaramiento hepático, lo que permite el uso potencial de este agente en pacientes con insuficiencia renal. Por lo tanto, la síntesis quimioenzimática iterativa ofrece un enfoque eficaz para preparar la próxima generación de HBPM con propiedades terapéuticas mejoradas. Estos resultados sugieren que la síntesis quimioenzimática dirigida y controlada de fármacos similares a la heparina se puede llegar a cabo de manera factible. ^(1, 6)



A diferencia de la síntesis quimioenzimática de los oligosacáridos LMWH y ULMWH, el proceso para preparar *heparina por bioingeniería* comienza con una fermentación de *E. coli* k5 para preparar el polisacárido capsular (CPS), heparosano, que luego es químicamente de-*N*-acetilado y *N*-sulfonado. El tratamiento de *N*-sulfo, *N*-acetil heparosano con las enzimas recombinantes O-sulfotransferasas y C5-epimerasa en presencia de un sistema de reciclaje de cofactores PAPS da como resultado una heparina modificada genéticamente que se parece mucho a las propiedades químicas y biológicas de la heparina [Figura 9].

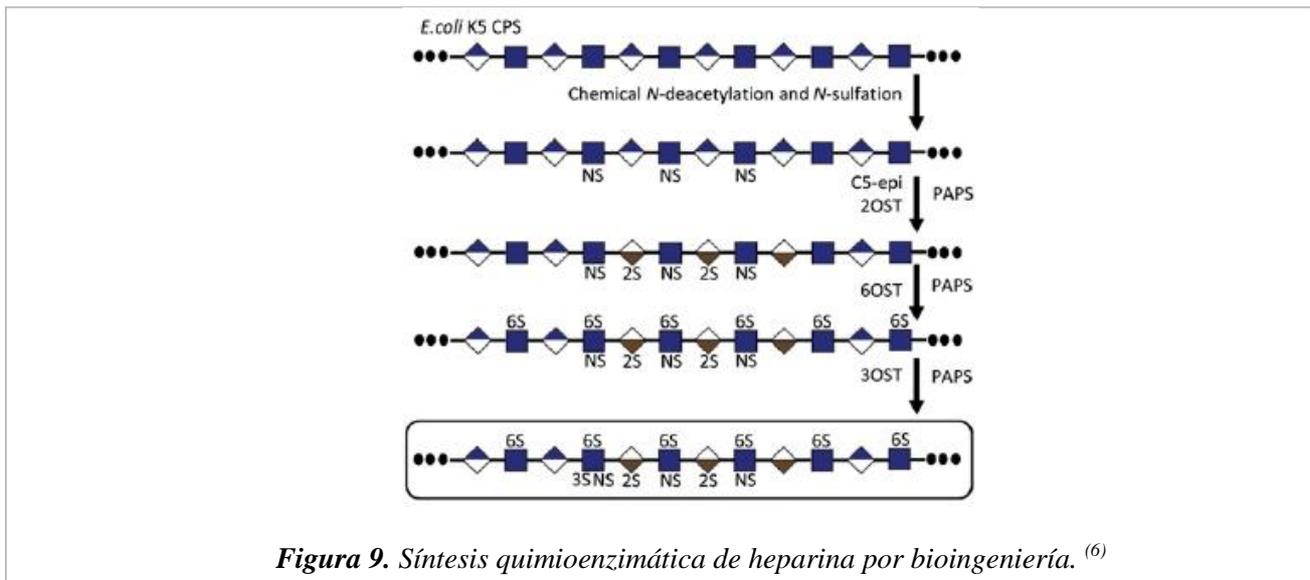


Figura 9. Síntesis quimioenzimática de heparina por bioingeniería. ⁽⁶⁾

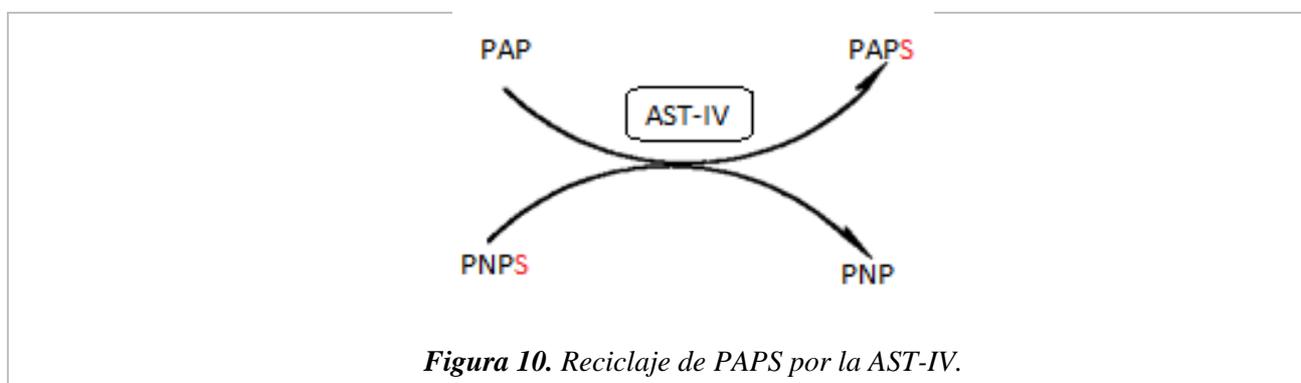
Este método elimina muchos elementos estructurales indeseables presentes en las heparinas derivadas de los animales, incluidos los azúcares de la región enlace, los modificadores de blanqueo y los sacáridos de base modificada. ⁽⁵⁾

Las limitaciones de la síntesis quimioenzimática incluyen las *especificidades* del sustrato de las enzimas, que pueden limitar la variedad de estructuras producidas, y los desafíos para la *comercialización* en el futuro que incluyen escalado, así como reducción en los costos de heparosano, PAP (cofactor) y enzimas recombinantes. ⁽⁵⁾ Se han propuesto estrategias para superar algunas de estas limitaciones, incluido el control del proceso, la incorporación de ingeniería metabólica y la optimización del cultivo.

Se han intentado algunos de estos, como la síntesis en un solo recipiente en el que se mezcla un precursor, heparosano, con todas las enzimas biosintéticas de heparina apropiadas simultáneamente. Este enfoque, que requiere la optimización de las concentraciones relativas de enzimas, ofrece el potencial para aumentar la escala; Sin embargo, otros aún no han visto fructificación. ^(1, 6)

Las enzimas biosintéticas recombinantes de heparina, C5 epimerasa, 2OST, 6OST y 3OST, se expresan actualmente fusionadas a proteína de unión a maltosa o (His)₆, permitiendo así la conveniente purificación e inmovilización de enzimas. La inmovilización estabiliza estas enzimas y permite su fácil recuperación y reutilización, lo que simplifica la purificación del producto. Una investigación reciente mostró que las enzimas mantienen más del 80% de actividad después de la inmovilización. Estas enzimas recombinantes se inmovilizaron en gel de agarosa ligadas a un grupo amino con una carga de 20mg/ml de gel termoestabilizado. ⁽⁵⁾

Asimismo, un sistema de reciclaje de cofactores que involucra a la arilsulfotransferasa IV (AST-IV), se usa para convertir el caro cofactor 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (PAP) en PAPS mediante la transferencia de un grupo sulfo de un donador sacrificial no costoso, *p*-sulfato de nitrofenilo (PNPS), a PAP, suponiendo la regeneración de PAPS. La reacción también produce *p*-nitrofenol (PNP) que puede recuperarse y sulfonarse químicamente [Figura 10]. Este sistema de regeneración de cofactor ahorra costos, ya que PAPS es casi 1000 veces más costoso que el *p*-sulfato de nitrofenilo (PNPS). El acoplamiento de esta reacción a las reacciones de OST no solo supera la fuerte inhibición del producto de estas sulfotransferasas por PAP, sino que también proporciona un sistema de monitorización de la reacción. ^(6, 24, 25)



CONCLUSIONES

Dentro de un siglo de su descubrimiento, la heparina se ha aplicado con éxito en varios escenarios clínicos y sigue siendo uno de los anticoagulantes más comúnmente utilizados en la actualidad.

Varios avances han sido enfocados a la comprensión de los mecanismos de acción y espectro de sus actividades biológicas. También se ha adquirido una nueva visión de las posibles formas de la bioingeniería y la síntesis de heparina y moléculas similares a heparina orientadas a satisfacer la necesidad actual de seguridad y mitigar la preocupación por la escasez en el suministro actual. A pesar de estos avances, hay más posibilidades de mejorar.

En resumen, la síntesis quimioenzimática como potencial método de obtención de heparina trae consigo unas mejoras en seguridad del compuesto final al eliminar impurezas creadas por otros métodos, en ecología al cambiar el medio de reacción y añadir reciclaje de compuestos y en economía al disminuir el coste de producción. El mayor desafío de hacer una heparina por bioingeniería es satisfacer la demanda mundial anual de más de 100 toneladas por año.

BIBLIOGRAFIA

1. **Eziafa I. Oduah; Robert J. Linhardt; Susan Susan T. Sharfstein.** Heparin: past, present and future. *Pharmaceuticals* 2016, 9, 38.
2. **Mclean, J.** The Discovery of Heparin. *Circulation* 1959, 19, 75-78.
3. **Ritter J.M.; R.J. Flower; G. Henderson.** Rang & Dale's Pharmacology, 8^o. *Students and healthcare practitioners worldwide* 2015.
4. **Tatiana N. Laremore; Fuming Zhang; Jonathan S. Dordick; Jian Lu; Robert J. Linhart.** Recent progress and applications in glycosaminoglycan and heparin research. *Current Opinion in Chemical Biology* 2009, 13:633-640.
5. **Matthew Sufliya; Li Fu; Wenqin He; Mattheos Koffas; Robert J. Linhardt.** Heparin and related polysaccharides: synthesis using recombinant enzymes and metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015, 99 :7465-7479.

6. **Li Fu; Matthew Suflita; Robert J. Linhardt.** Bioengineered heparins and heparan sulfates. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2016, 237-249.
7. **Stringer S.E.; Gallagher J.T.:** Heparan sulfate. *Int J Biochem Cell Biol* 1997, 29:709-714.
8. **Xianxuan Zhou; Timothy R.O'Leary; Yongmei Xu; Juzheng Sheng; Jian Liu.** Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin. *Biocatalysis and Biotransformation* 2012, 30:3, 296-308.
9. **R.J. Linhardt.** Heparin: structure and activity. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 2551-2564.
10. **Gray, E.; Mulloy, B.; Barrowcliffe, T.W.** Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin. *Thromb. Haemost.* 2008, 99, 807-818.
11. **Shaughnessy, S.G.; Young, E.; Deschamps, P.; Hirsh, J.** The Effects of Low Molecular Weight and Standard Heparin on Calcium Loss from Fetal Rat Calvaria. *Blood* 1995, 86, 1368-1373.
12. **Esko J.D.; Lindahl U.** Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* 2001, 108-167-173.
13. **Xing Zhang; Vijayakanth Pagadala; Hannah M. Jester; Andrew M. Lim; Truong Quang Pham; Anna Marie P. Goulas; Jian Liu; Robert J. Linhardt.** Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin oligosaccharides and NMR analysis: paving the way to a diverse library for glycobiochemists. *Chem. Sci.*, 2017, 8, 7932-7940.
14. **Gómez-Outes, A.; Suárez-Gea, M.L.; Lecumberi, R.; Rocha, E.; Pozo-Hernández, C.; Vargas-Castrillón, E.** New Parenteral Anticoagulants in Development. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 2011, 5, 33-59.
15. **Chandarajoti K.; Liu J.; Pawlinski R.** The design and synthesis of new synthetic low-molecular-weight-heparins. *J. Thromb Haemost* 2016; 14:1135-45.
16. **Linhardt, R.J.; Toida, T.** Heparin Oligosaccharides: New Analogues Development and Applications. In *Carbohydrates in Drug Design*; **Witckaz, Z.J., Nieforth, K.A., Eds.; Marcel Dekker Inc.:** New York, NY, USA, 1997; 227-341.
17. **Peterson S.; Frick A.; Liu J.:** Design of biologically active heparan sulfate and heparin using an enzyme-based approach. *Nat Prod Rep* 2009; 26: 610-627.

18. **Mikami T.; Kitagawa H.** Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2013, 1830:4719-4733.
19. **Sugahara K.; Kitagawa H.** Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr Opin Struct Biol* 2000, 10:518-527.
20. **X. Shi; J. Zaia.** Organ-specific heparan sulfate structural phenotypes, *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 11806-11814.
21. **Evans T.D.; Mozen M.M.** Process for purifying heparin. *US Patent.* 1962.
22. **Liu H.; Zhang Z.; Linhardt R.J.** Lessons learned from the contamination of heparin. *Nat Prod Rep* 2009, 26:313-321.
23. **Y. Xu; S. Masuko; M. Takeddin; H. Xu; R. Liu; J. Jing; et al.,** Chemoenzymatic synthesis of structurally homogeneous ultra-low molecular weight heparins, *Science* 2011, 334, 80, 498-501.
24. **M. Burkart; M. Izumi; E. Chapman; C. Lin; C. Wong.** Regeneration of PAPS for the enzymatic synthesis of sulfated oligosaccharides. *J. Org. Chem.* 2000, 65, 5565-5574.
25. **Priscilla Paul; Jiraporn Suwan; Jian Liu; Jonathan S. Dordick; Robert J. Linhardt.** Recent advances in sulfotransferase enzyme activity assays. *Anal Bioanal Chem* 2012, 403:1491-1500.