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

FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

JUAN IGNACIO ALCARAZ LÓPEZ

JUNIO 2018

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

MÉTODOS DE MEJORA DE LOS PROCESOS BIOCATALÍTICOS

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

INGENIERÍA DE PROTEÍNAS

Modifica la función de las proteínas o las dota de nuevas funciones catalíticas.
Efectuada mediante evolución dirigida, que sigue la estrategia de que emplea la naturaleza.
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).

INGENIERÍA DEL MEDIO DE REACCIÓN

Variar las condiciones de producción, hasta conseguir los máximos niveles de estabilidad y actividad. Influye la actividad, estabilidad del biocatalizador, y la dirección en la que se desarrolla la reacción (16).

ENZIMAS AISLADAS *VS.* CÉLULAS COMPLETAS

ENZIMAS AISLADAS

- Simplificación en el modelo de trabajo.
- Alta productividad debido a la mayor concentración enzimática tolerada.
- Necesario reciclar de manera exógena los cofactores.

CÉLULAS COMPLETAS

- Necesidad de un equipo de trabajo más caro y con unos procedimientos de trabajo más largos debido a los grandes volúmenes generados.
- Productividad disminuida a consecuencia de menor concentración de biocatalizador tolerada
- No es necesario el reciclaje de cofactores.
- Posibilidad de sufrir reacciones secundarias desencadenadas por el metabolismo celular.

QUÍMICA SOSTENIBLE

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).

Las necesidades del presente no deben condicionar la capacidad de las futuras generaciones de satisfacer sus propias necesidades (9).

BIOTECNOLOGÍA

Uso integrado de la bioquímica, la microbiología y la ingeniería genética para 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).

BIOCATÁLISIS

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).

VENTAJAS

- ✓ Abaratamiento en los costes de producción.
- ✓ Medioambientalmente sostenibles.
  - ✓ Reutilizables.
  - ✓ Biodegradables.
- ✓ Mayor eficiencia catalítica.
  - ✓ Velocidades de reacción 10^8- 10^{10} superior a reacciones no enzimáticas.
- ✓ Condiciones de trabajo suaves.
  - ✓ pH 5-8
  - ✓ 20 - 40 ºC.
- ✓ Promiscuidad enzimática.
  - ✓ De las condiciones de uso de la enzima: poseen actividad catalítica en condiciones de reacción diferentes a las naturales.
  - ✓ Del sustrato enzimático: laxa especificidad sobre el sustrato que catalizan;
  - ✓ Catalítica: capacidad de catalizar diferentes transformaciones químicas con diferentes estados de transición.
- ✓ Quimioselectividad.
- ✓ Regioselectividad.
- ✓ Estereoselectividad.

INCONVENIENTES

- × Imposibilidad de invertir la quiralidad de una reacción empleando el mismo biocatalizador.
- × Necesidad de cofactores (NAD^+/NADH o ATP), son inestables y presentan un precio muy elevado.
- × Sufren fenómenos de inhibición por parte del sustrato o del producto.
- × Al tratarse de productos biológicos pueden dar lugar a la aparición de alergias.

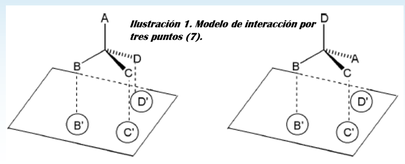


Ilustración 1. Modelo de interacción por tres puntos (7).

METODOLOGÍA

Revisión bibliográfica empleado:

- Las bases de datos SCOPUS, Web of Science, SciFinder y PUBMED.
- Consulta de patentes obtenidas de la página web freepatentsonline.com.
- El buscador BUCEA de la biblioteca de la Universidad Complutense de Madrid, para la consulta de revistas científicas del CSIC y de la Real Academia de Farmacia, y libros en formato electrónico.
- 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.*

OBJETIVOS

Exponer 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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La saxagliptina cuenta con ocho estereoisómeros de los cuales solo dos presentan actividad farmacológica, estos son el isómero 2'S,2S,cis y el isómero 2'S,2S,trans.

- IC50 de 30,3 nM para el isómero 2'S,2S,cis.
- 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).

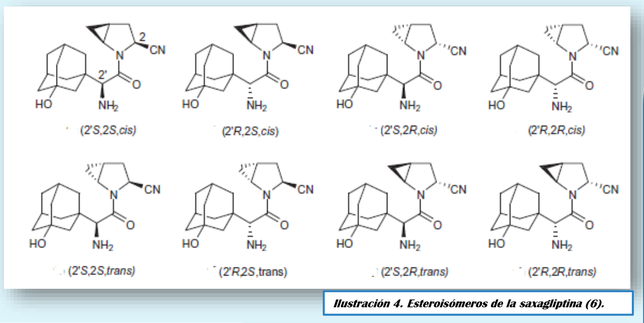
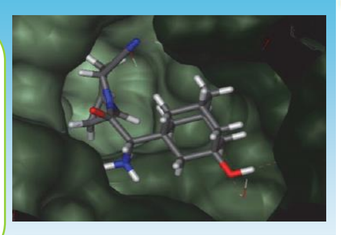


Ilustración 4. Esteroisómeros de la saxagliptina (6).

SAXAGLIPTINA

Desarrollada por Bristol-Myers Squibb fue aprobada por la Federal Drugs Administration (FDA) para el tratamiento de la diabetes tipo II el 31 de julio de 2009 (2).

- Grupo fármacológico de las gliptinas. Abordan la resistencia a la insulina.
- Inhibidor reversible de la enzima dipeptidilpeptidasa-IV (DPP-IV). serina aminopeptidasa que hidroliza las incretinas: GLP-1 (glucagon-like peptide 1) y GIP (polipéptido inhibidor gástrico).



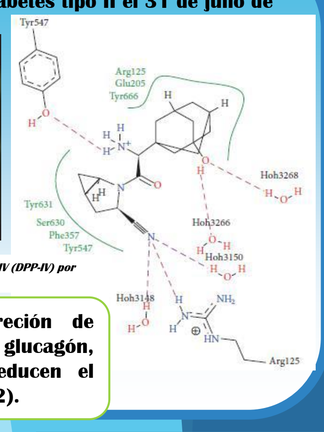


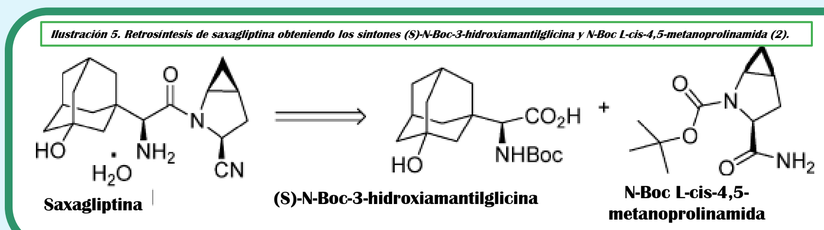
Ilustración 3. Inhibición de la enzima dipeptidilpeptidasa-IV (DPP-IV) por parte de la saxagliptina (1).

La administración exógena de incretinas no es viable al ser degradadas (5).

Las incretinas estimulan la secreción de insulina y suprimen la secreción del glucagón, realentizan el vaciado gástrico, reducen el apetito y el consumo de alimentos (22).

RETROSÍNTESIS

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



Saxagliptina | (S)-N-Boc-3-hidroxiamantilglicina | N-Boc L-cis-4,5-metanoprolinamida

SÍNTESIS DESDE LOS SINTONES

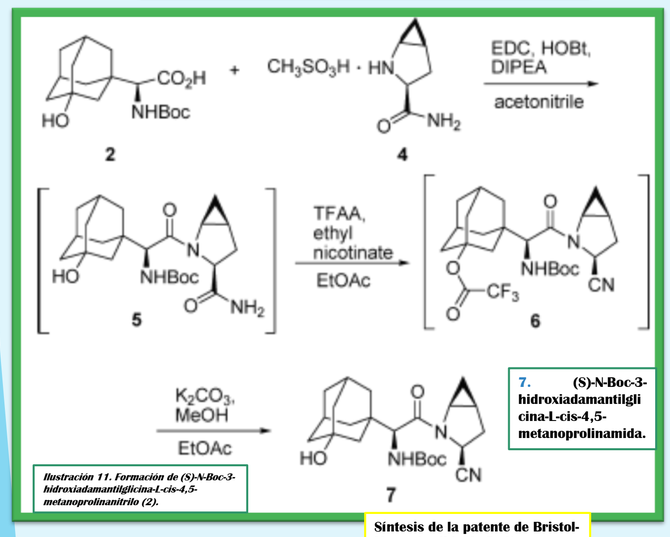


Ilustración 11. Formación de (S)-N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina-L-cis-4,5-metanoprolinanitrilo (2).

7. (S)-N-Boc-3-hidroxiadamantilglicina-L-cis-4,5-metanoprolinamida.

Síntesis de la patente de Bristol-Myers Squibb (2, 5, 6).

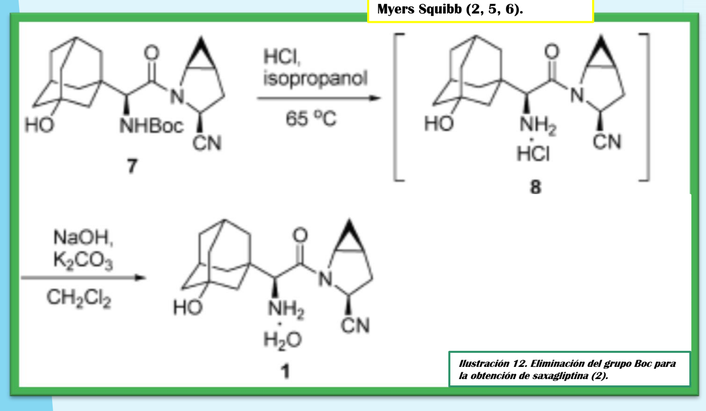
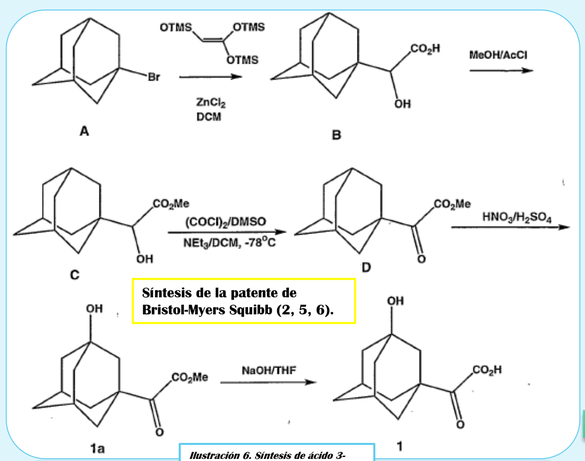


Ilustración 12. Eliminación del grupo Boc para la obtención de saxagliptina (2).

SÍNTESIS (S)-N-Boc-3-hidroxiamantilglicina



Síntesis de la patente de Bristol-Myers Squibb (2, 5, 6).

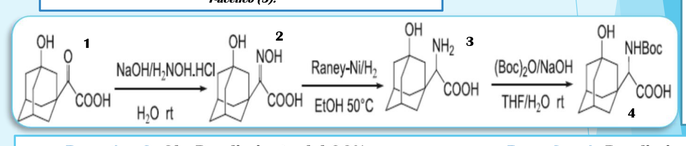
Ilustración 6. Síntesis de ácido 3-hidroxi-α-oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético (5).

- Acoplamiento de los sintones 2-3 h.
- Rendimiento (2 + 4) – 7 78 %. Pureza 99,7%.
- Rendimiento 7 – 1 86% - 90%. Pureza 99,9%.

SÍNTESIS QUÍMICA

A. Bromuro de adamantilo.
B. Ácido α-hidroxitriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético.
C. Éster metílico del ácido α-hidroxitriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético
D. Éster metílico del ácido α-oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético
1a. Éster metílico del ácido 3-hidroxi-α-oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético
1. ácido 3-hidroxi-α-oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético.

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



1. ácido 3-hidroxi-α-oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético
2. 2-(3-hidroxi-1-adamantil)-2-hidroxiiminoacético.
3. 3-hidroxiamantilglicina
4. N-Boc-3-hidroxiamantilglicina

- Paso 1 a 2. 2h. Rendimiento del 90%.
- Paso 2 a 3. 7h. Rendimiento del 86%.
- Paso 3 a 4. Rendimiento del 88% (3).
- Todos los pasos dan lugar a mezclas racémicas.

BIOCATÁLISIS

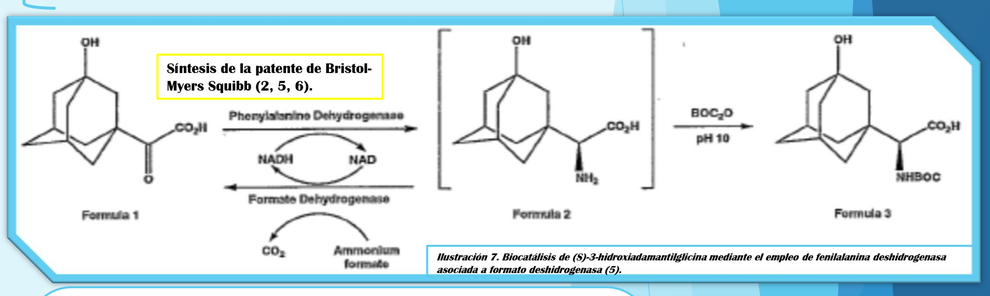
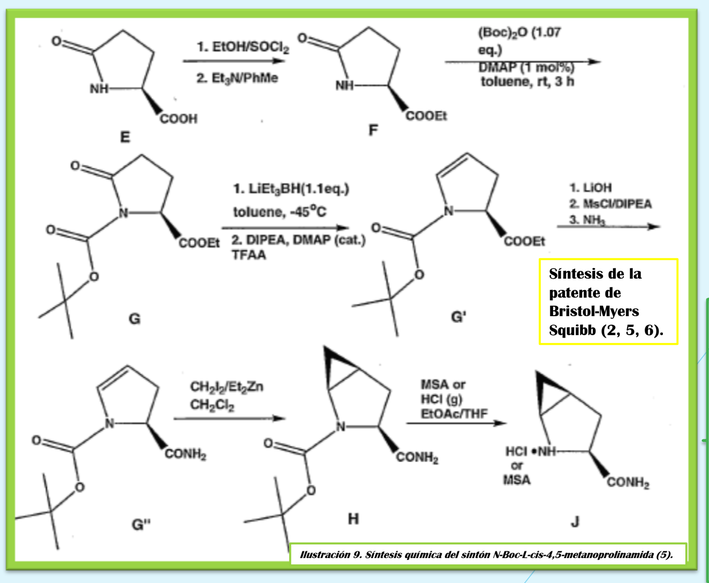


Ilustración 7. Biocatálisis de (S)-3-hidroxiadamantilglicina mediante el empleo de fenilalanina deshidrogenasa asociada a formato deshidrogenasa (5).

- Fenilalanina deshidrogenasa (PDH) de *Thermoactinomyces intermedius.*
- Rendimiento *P. pastoris* del 100% pureza enantiomérica del 100% (5, 23).
- Producción a gran escala en *Escherichia coli* JM110 transfectada con pBMS-2000-PPFDH-PDH mod. rendimiento de 80 al 100% y una pureza enantiomérica del 99% (5).
- pH 7,8-8,2 Tª 37 -40ºC.

Fórmula 1. ácido 3-hidroxi-α-oxotriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético
Fórmula 2. ácido (αS)-α-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1]decano-1-acético
Fórmula 3. (S)-3-hidroxiadamantilglicina

SÍNTESIS QUÍMICA N-Boc L-cis-4,5-metanoprolinamida



Síntesis de la patente de Bristol-Myers Squibb (2, 5, 6).

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

E – G. 3h. Rendimiento 83%.
G – G''. Rendimiento 30%.
G'' – H. Rendimiento 80%.
H – J. 3h. Rendimiento 94%.

E. Ácido L-piroglutámico.
F. L-piroglutamato de etilo.
G. (5S)-2-oxopirrolidin-1,5-dicarboxilato de 1-(1,1-dimetiletil)-5-etilo.
G'. 4,5-dihidro-1H-pirrolil-1,5-dicarboxilato de 1-(1,1-dimetiletil)-5-etilo.
G''. (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1-carboxilato de 1,1-dimetiletilo.
H. [1S-(1α,3β,5α]-3-aminocarbonil)-2- azabiciclo[3.1.0]hexano-2-carboxilato de 1,1-dimetiletilo.
J. Sal del ácido metasulfónico del (1S,3S,5S)-2-azabiciclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida.

BIOCATÁLISIS N-Boc L-cis-4,5-metanoprolinamida

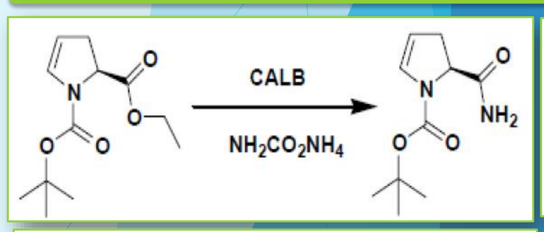


Ilustración 10. Biocatálisis del ácido (5S)-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1,5-dicarboxílico en ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1-carboxílico mediada por la lipasa B de Candida antartica. (4)

- Lipasa B de *Candida antartica* media la amonolisis.
- Rendimiento 98% cloruro cálcico 100 g/L y ascarita 200 g/L, Tª 50ºC, concentración de 12% v/v de éster.

CONCLUSIONES

La biocatálisis consigue una simplificación de la reacción:

- Menor número de pasos.
- Condiciones de trabajo más suaves.
- Menor duración de la reacción, mayores rendimientos y menor porcentaje de racemización.

Para la biocatálisis ácido (5S)-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1,5-dicarboxílico del en ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrolil-1-carboxílico mediada por la lipasa B de *Candida antartica* 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.

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 40ºC por los 50ºC 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%.

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 THEREFOR2005.
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 terapeútica. 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. 19
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. Décimotercerán. 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. Gaón. 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/100.013.8047_disssubsinfo_WAR_disssubsinfoportlet_backURL=https%3A%2F%2Fecha.europa.eu%2Fes%2Fsearch-for-chemicals%3Fp_p_id%3Ddisssimplesearch_WAR_disssearchportlet%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D1%26_disssimplesearch_WAR_disssearchportlet_sessionCriteriaId%3DdissSimpleSearchSessionParam1014015234693672 47.