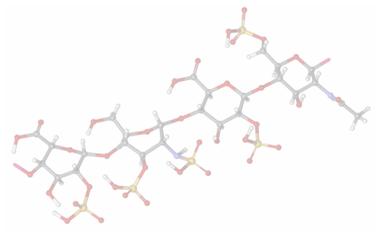




SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE HEPARINAS Y MECANISMO DE ACCIÓN

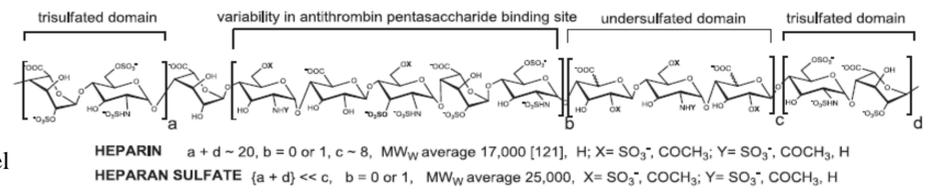
Trabajo de fin de grado
María Gómez Muñoz

Grado en Farmacia. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid



INTRODUCCIÓN

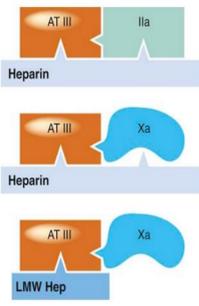
- La heparina fue descubierta en 1916. Perteneciente a la familia GAG junto al sulfato de heparan, su composición cuenta con *unidades disacarídicas* de ácido urónico (*L-idurónico/D-glucurónico*) y un aminoazúcar (*D-glucosamina*), unidas por enlace $\beta 1 \rightarrow 4$.
- Teniendo pesos moleculares variantes entre 5-40kDa, es una forma especial de HS con un mayor nivel de sulfatación y un mayor contenido en IdoA.
- En 1935 comienza a usarse clínicamente como anticoagulante.



Tipos de heparinas

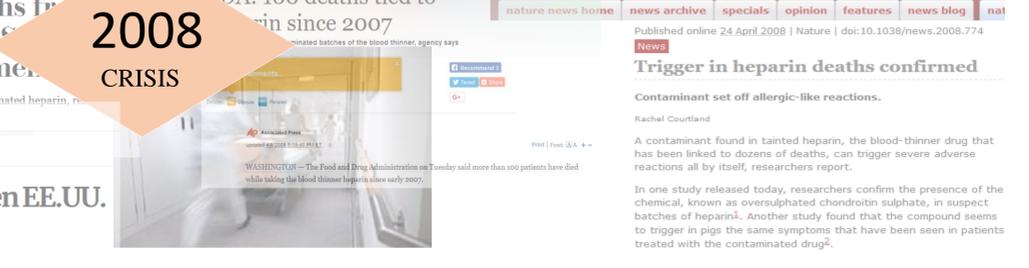
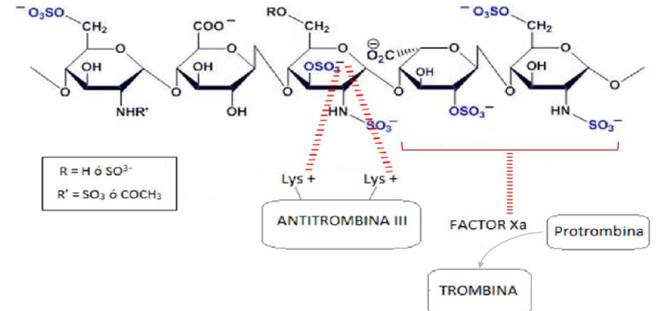
Anticoagulante

- Heparina no fraccionada (HNF)
- Heparinas de bajo peso molecular (HBPM)
- NO en insuficiencia renal**
- Baja neutralización**
- Heparinas de ultra bajo peso molecular (HUBPM) - Fondaparinux



Mecanismo de acción - SAR

La heparina activa a la ATIII produciendo un cambio conformacional, inhibiendo la cascada de coagulación. Según el tamaño de la molécula, la interacción varía. La heparina no fraccionada interacciona con la ATIII y facilita el posterior efecto inhibitor de la ATIII sobre la trombina y el factor Xa. Las heparinas de menor tamaño aumentan la acción de la ATIII sobre el factor Xa únicamente. La propiedad anticoagulante de la heparina se debe a la 3-O-sulfatación.



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".

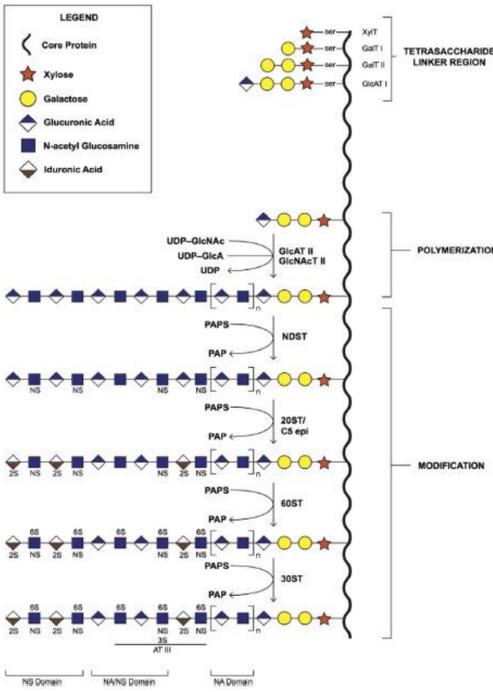
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención actual de la heparina

- Preparación de tejido; 2. Extracción de heparina del tejido; 3. Recuperación de la heparina cruda; 4. Purificación de heparina; 5. Recuperación de heparina purificada.
- Mataderos \rightarrow malas condiciones cGMP \rightarrow CONTAMINACIÓN

Síntesis biológica

12 enzimas involucradas



Nuevas estrategias

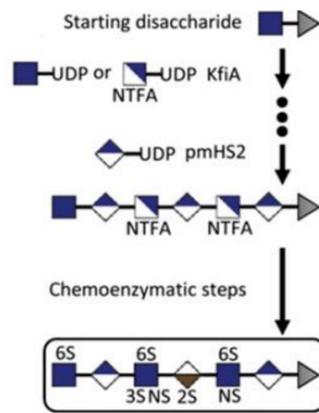
Síntesis química

- Síntesis de *fondaparinux* (HUBPM) por escisión química o enzimática controlada de heparina no fraccionada (HNF).
- Reacción de despolimerización.
- Baja relación beneficio/coste. Rto. 0,1%**

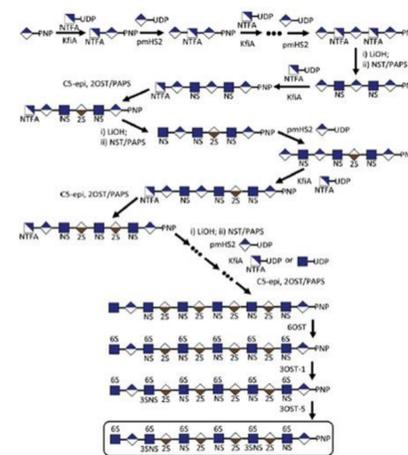
Síntesis enzimática

Heparinas por síntesis quimioenzimática

HUBPM. Heptasacárido en 12 etapas. **Rto. ~80%**

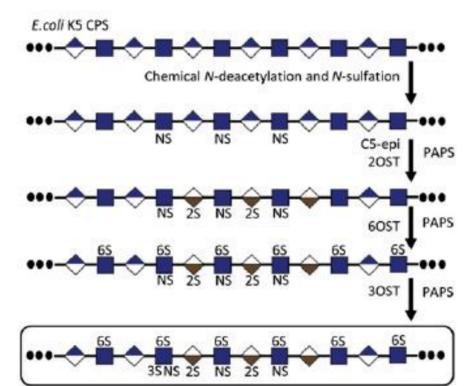


HBPM. Dodesacárido en 22 etapas. **Rto ~40%**
SI en insuficiencia renal (CIh)
Buena neutralización



Heparina por bioingeniería

Fermentación de *E. coli* k5 para preparar el polisacárido capsular (CPS), heparosano.



Nombre	Abreviación	Gen
N-acetil-D-glucosaminil transferasa	KfiA	<i>Escherichia coli</i> K5
Heparosano sintasa 1 y 2	PmHS1, PmHS2	<i>Pasteurella multocida</i>
N-acetil-glucosamina-1-fosfato uridiltransferasa	GimU	<i>Escherichia coli</i> K5
Arisulfotransferasa IV	AST-IV	<i>Rattus norvegicus</i>
C5-epimerasa	C5 Epi	<i>Cricetulus griseus</i> (célula CHO)
2-O-sulfotransferasa 1	2OST-1	<i>Cricetulus griseus</i> (célula CHO)
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>

Enzimas biosintéticas recombinantes expresadas en *E. coli*, células de insectos y levaduras

CONCLUSIONES

- La heparina sigue siendo uno de los anticoagulantes más utilizados.
- Nuevas formas de producción satisfacen la necesidad actual de seguridad y preocupación por escasez de suministro.
- La síntesis quimioenzimática trae consigo mejoras en seguridad, ecología y economía.

VENTAJAS enzimas

Esteroselectividad
Regioselectividad

Eliminación de etapas de protección/desprotección

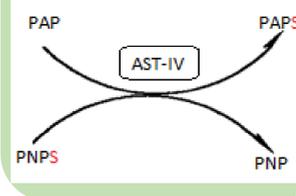
Tª 20-37°C.
Medio acuoso.

Eliminación de elementos estructurales indeseables

Reciclaje de enzimas (gel de agarosa) y cofactores

LIMITACIONES enzimas

Especificidad de sustrato de las enzimas
Desafíos en comercialización (escalado, coste)



BIBLIOGRAFÍA

Ezafia I. Oduah; Robert J. Linhardt; Susan Susan T. Sharfstein. Heparin: past, present and future. *Pharmaceuticals* 2016, 9, 38. Li Fu; Matthew Sufliata; Robert J. Linhardt. Bioengineered heparins and heparan sulfates. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2016, 237-249. 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.