

ENZYMOVÁ SYNTÉZA A JEJÍ VYUŽITÍ VE VÝROBĚ KLADRIBINU

ZDEŇKA ČÍŽKOVÁ, VLADIMÍR MAŤHA a KAREL BENEŠ

VUAB Pharma a.s., Středisko Enzymy České Budějovice, Nemanická 2722, 370 10 České Budějovice, Česká republika
zcizkova01@gmail.com

Došlo, přijato 27.9.24.

Enzymová syntéza představuje alternativu k chemické syntéze a poskytuje nové možnosti v přípravě farmaceuticky účinných látek. Cílem je minimalizovat neefektivnost chemického způsobu přípravy a zvýšení jeho účinnosti. Navzdory pokroku se biotechnologické procesy v syntéze nukleosidů, kde se využívá katalýzy nukleosidovými fosforylasami, průmyslově aktivně neuplatňují. Rozvoj enzymového způsobu syntézy by mohl přinést výhody jak z hlediska zlepšení účinnosti a jednoduchosti procesu, tak minimalizaci spotřeby organických rozpouštědel a tím i dopadu na životní prostředí. Využití enzymové syntézy ve výrobě kladribinu přináší jednoduchý a rychlý způsob výroby této účinné látky ve vysoké čistotě bez vzniku nežádoucích vedlejších produktů.

Klíčová slova: enzymová syntéza, transglykosidasy, nukleosidový analog, kladribin

Obsah

1. Úvod
2. Výhody enzymové syntézy
3. Enzymová syntéza kladribinu
4. Nový přístup v enzymové syntéze kladribinu
5. Závěr

1. Úvod

Nukleosidy a fosforylované formy, nukleotidy, jsou vysoce funkční biomolekuly, jež patřily mezi první organické molekuly na Zemi¹. β -nukleosidy jsou stavebními jednotkami DNA a RNA, podílejí se na přenosu buněčné energie a jako kofaktory enzymových přeměn jsou využívány všemi organismy na naší planetě. V posledních letech se analogy nukleosidů staly významnými sloučeninami v lékařské i biologické oblasti. Jsou využívány jako farmaceuticky účinné látky v léčbě různých druhů rakoviny i proti virovým infekcím^{2,3}. V mnoha případech může podávání analogů nukleosidů inhibovat polymerasy nebo kinasy tak, aby se zpomalila buď virová proliferace, nebo příznaky rakoviny, což umožní imunitnímu systému pacienta vyrovnat se s onemocněním. Další možností je zásah do replikace buněk a zavedení mutací, které vedou ke snížení životaschopnosti nebo dokonce smrti buněk⁴.

Výroba nukleosidů však není nijak triviální. Jejich relativně vysoký obsah heteroatomů způsobuje, že jsou mnohé z nich špatně rozpustné v běžných organických rozpouštědlech. Uspořádání množství funkčních skupin

(zejména na ribosylové části) vyžaduje vysoký stupeň ochrany těchto skupin a vysoký stupeň selektivity v klíčových vazebných krocích. Z tohoto důvodu je „účinná“ syntéza nukleosidů stále považována za výzvu v oblasti organické chemie i po více jak sedmdesáti letech výzkumu⁵.

Syntéza nukleosidů se obvykle provádí *N*-glykosylací nukleobáze, kdy se na heterocyklickou bázi naváže ribosylová skupina. Ačkoliv tato kritická reakce pro přípravu nukleosidů působí jednoduše, je komplikovaná zejména problémy s diastereospecifitou a regiospecifitou, která je způsobena nízkou nukleofilitou bázi a hustotou funkčních skupin na ribosylové části⁶.

Požadovaná vazba nukleobáze k anomernímu centru a ribosylové skupiny za vzniku β -nukleosidu není selektivní a je doprovázena vedlejšími reakcemi včetně tvorby α -nukleosidů, výsledkem je komplexní směs α - a β -nukleosidů. Syntéza nukleosidových analogů je časově náročná a často ji charakterizují malé výtěžky, nízká čistota produktu i vysoké procesní náklady. Dlouhodobým trendem ve výrobě je zlepšení a zjednodušení procesu syntézy, objevuje se snaha nahradit chemickou syntézu aplikací přístupů tzv. zelené chemie, zejména enzymovou syntézou^{7,8}.

2. Výhody enzymové syntézy

Principy zelené chemie a obavy o životní prostředí jsou ve farmaceutickém průmyslu stále více diskutovány⁹. Cílem je především minimalizovat neefektivnost chemické

syntézy, množství chemického odpadu a zvýšit účinnost syntéz. Vývoj nových chemických reakcí a reakčních podmínek, které mohou potenciálně přinést výhody pro chemické syntézy z hlediska účinnosti zdrojů a energie, selektivity produktů, jednoduchosti procesu a bezpečnosti pro zdraví a životní prostředí¹⁰. K řešení těchto problémů jsou zapotřebí nová inovativní řešení ve všech syntetických procesech, ať jde o suroviny, reakce, rozpouštědla nebo možnosti separace. Enzymové syntézy se zaměřují na nalezení nových reakcí, které mohou zvyšovat zisk cílového produktu, a naopak minimalizovat vznik vedlejších produktů. Použití enzymů zvyšuje chemo-, regio- a stereoselektivitu reakce, což souvisí s rozvojem tzv. průmyslové biotechnologie v systémech výroby léčiv¹¹. Základním požadavkem pro enzymovou syntézu je enzym, záleží však na jeho zdroji, ceně a dostupnosti.

Většina přístupů se stále zaměřuje buď na molekuly podobné již existujícímu léčivu, čímž se uplatňuje tzv. heterocyklická chemie, nebo na jednotlivé transformace. V literatuře chybí komplexní posouzení udržitelnosti nebo účinnosti pro chemii typu glykosylace¹².

V důsledku tohoto trendu došlo k velkému vývoji v oblasti enzymových nukleosidových fosforylas¹³. Jedná se o enzymy, které se nejčastěji používají pro syntézu nukleosidů transglykosylací, kde se přenášejí glykosylové zbytky z nukleosidů na různé purinové nebo pyrimidinové báze a analogy na akceptorové báze. Nukleosid fosforylasy reverzibilně katalyzují fosforylaci ribo- a deoxyribonukleosidů štěpením *N*-glykosidických vazeb nukleosidů za vzniku nukleobáze a pentosy-1-fosfátu. Ta se posléze spojí s požadovanou modifikovanou bází buď stejně, nebo jiné nukleosidové fosforylasy za vzniku nukleosidového analogu^{11,14}. Zajímavé je, že nukleosidové fosforylasy vykazují dokonalou regio- a stereoselektivitu, glykosylace umožňuje reakce s nechráněnými funkčními skupinami a snadno dostupnými výchozími materiály¹⁵. Kombinovaným použitím dvou nebo více enzymů lze navrhnout složitější syntézy, kdy je umožněno vytvářet ireverzibilní a reverzibilní proces, posunout reakční rovnováhu a částečně nebo úplně eliminovat nežádoucí produkty. Nejčastěji je v syntéze nukleosidových analogů používána purinová nukleosidová fosforylasa (PNP) v kombinaci s uridin fosforylasou (UP), popř. thymidin fosforylasou (TP). Společné použití těchto dvou enzymů umožňuje vyrábět purinové nukleosidy z pyrimidinových nebo naopak. Další zajímavou strategií je provádění enzymových vícečetných reakcí, které napodobují přirozené reakce biosyntetické dráhy. Při této reakci probíhá biotransformace v jedné nádobě postupně nebo současně, čímž vzniká méně odpadu, neboť se zamezí navazujícím operacím¹¹.

Ačkoliv jsou veškeré výhody použití nukleosidových fosforylas nesporné, jejich využití v průmyslových výrobních procesech stále chybí. Může to být způsobeno těmito třemi problémy: 1) netriviální zpracování enzymových syntéz zahrnující nukleosidy, 2) obtíže spojené s rozsáhlými syntézami, přípravou těchto enzymů a jejich účinným (opětovným) použitím a 3) omezený obsah substrátu¹⁶.

Bohužel, stále existuje pouze pár studií zahrnujících vývoj a následné zpracování ve schématu biokatalytické syntézy nukleosidů. Většina studií je omezena pouze na přítomnost požadovaného produktu v reakční směsi, následná izolace produktu není zmiňována. Výjimku tvoří syntézy farmaceuticky významných nukleosidů, léku proti HIV islatravir nebo molnupiravir k léčbě Covid-19, které byly zveřejněny firmou Merck¹⁶.

Islatravir byl syntetizován pomocí pěti enzymů navržených aplikací řízené evoluce. Tyto enzymy působí na nepřirozené substráty, které byly zkombinovány se čtyřmi pomocnými enzymy ve třístupňové biokatalytické kaskádě. Samotná syntéza byla postavena na smíchání suspenze nerozpustné nukleobáze a suspenze nerozpustného nukleosidu za využití filtrace. Celková syntéza vyžaduje méně než původní počet kroků než u dříve popsaných syntéz¹⁷.

K syntéze molnupiraviru byla využita nová biokatalytická kaskáda, která zahrnovala upravenou ribosyl-1-kinasu a uridinofosorylasu. Tyto navržené enzymy využívají fosfát pomocí pyruvát oxidasy opakovaně¹⁸. Syntéza byla oproti islatraviru postavena na metodě extrakce a rekrystalizace. Pro oba produkty platí, že byly izolovány ve vysoké čistotě pouze na základě jejich rozpustnosti a bez použití chromatografických metod¹⁶.

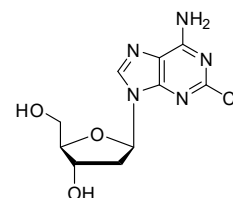
3. Enzymová syntéza kladribinu

Kladribin (2-chloro-2'-deoxyadenosin, obr. 1) je purinový nukleosidový analog, jenž byl původně vyvinut pro léčbu různých druhů rakoviny krve¹⁹.

Ačkoliv je toxickou molekulou, jeho vliv v léčbě neoncologických indikací, zejména roztroušené sklerózy, je velmi perspektivní. Vykazuje vysokou biologickou dostupnost, dobrou účinnost a bezpečnostní profil pro léčené pacienty²⁰.

Jsou známy minimálně dva polymorfy kladribinu. V prvním případě se jedná o krystalickou formu I, která byla charakterizována především rentgenovou práškovou difrakcí. Druhou pevnou formou je amorfni kladribin, jež byl taktéž charakterizován rentgenovou práškovou difrakcí a infračervenou spektroskopií²¹.

V současné době je kladribin na trhu dostupný pouze jako zcela syntetický produkt. Z toho důvodu se kolektiv autorů rozhodl pro náhradu enzymovou cestou, kdy díky její vysoké katalytické účinnosti, přirozené selektivitě a jednoduchému zpracování dojde ke zmenšení nákladů,



Obr. 1. Struktura kladribinu

efektivnějšímu využití zdrojů a nižšímu podílu odpadních produktů.

Přestože byl kladribin poprvé připraven v experimentálních podmínkách pomocí semipurifikované deoxyribosyltransferasy již v roce 1984 (cit.²²), nedošlo zatím k úspěšné realizaci jeho biosyntézy v provozních podmínkách. Jeden z hlavních důvodů tohoto neúspěchu představují náklady spojené s cenou enzymů. Z tohoto důvodu byla snaha nahradit enzymy použitím suspenze bakteriálních buněk, minimalizovat množství enzymů nebo využít možnosti jejich opakovaného použití imobilizací na vhodném nosiči²³.

Všechny zmíněné postupy náhrady enzymů byly již experimentálně testovány při biosyntéze kladribinu, a ačkoliv snižují náklady na enzymy, jsou doprovázeny řadou technických problémů. Například to, že živé buňky, ať již volně v suspenzi nebo imobilizované na nosiči, produkují vedle cílových enzymů i řadu vedlejších metabolitů. Ty mohou ovlivnit průběh reakce nebo izolaci cílového produktu. Nízké koncentrace enzymů vyžadují dlouhý reakční čas, a především používání organických rozpouštědel v reakční směsi. I navrhovaná imobilizace enzymů, která se jeví jako perspektivní, má nicméně určitá omezení, např. náklady na pořízení nosičů, složitost metodologií imobilizace, náklady a složitost likvidace imobilizovaného biokatalyzátoru, snížení aktivity imobilizovaných enzymů ve srovnání s volnými enzymy či inaktivace enzymů v důsledku imobilizačních postupů.

I přes všechna výše uvedená omezení se provozním podmínkám nejvíce přiblížil postup uvedený ve švýcarském vynálezu. Autoři použili jako zdroj enzymů imobilizované buňky *Escherichia coli* produkující rekombinantní UP a PNP v přítomnosti aprotického polárního rozpouštědla²⁴. Nicméně i v tomto vynálezu je řada technických nesrovnalostí. Je zde uvedeno použití jak vodných reakčních médií, tak médií s obsahem polárních aprotických organických rozpouštědel, 20% DMSO (dimethylsulfoxid) nebo DMF (*N,N*-dimethylformamid). Navíc se postup jeví jako univerzální, tj. použitelný jak pro vodné roztoky, tak i ty s obsahem organických rozpouštědel. Avšak ze znalosti fyzikálně chemických vlastností kladribinu vyplývá, že se rozpustnost v těchto rozpouštědlech zásadně liší. Lze jen těžko očekávat, že bude precipitovat za stejných podmínek z vodných roztoků jako z těch s obsahem organických rozpouštědel. Ověřovací experimenty, které byly prováděny kolektivem autorů, ukázaly, že ani po četných opakováních se nepodařilo zopakovat izolační postup podle vynálezu²⁴. Dále v publikovaném popisu reakce použili autoři celkovou enzymovou aktivitu 187,5 U l⁻¹ média. Bohužel v textu chybí detailní popis reakčního času, neboť při takto nízké koncentraci enzymu lze očekávat velmi nízkou produkci kladribinu v rozsahu 0,10 g l⁻¹ h⁻¹. Vzhledem k prezentované produkci 4,0 až 5,0 g l⁻¹ představuje reakční čas v řádu dní. Čím delší je doba syntézy, tím lze očekávat různá omezení a problémy, včetně zvýšených požadavků na sterilitu procesu syntézy. S ohledem na prá-

ci s imobilizovanými buňkami lze očekávat produkci i jiných enzymů (metabolitů), což může zásadním způsobem ovlivnit čistotu i kvalitu produkovaného kladribinu.

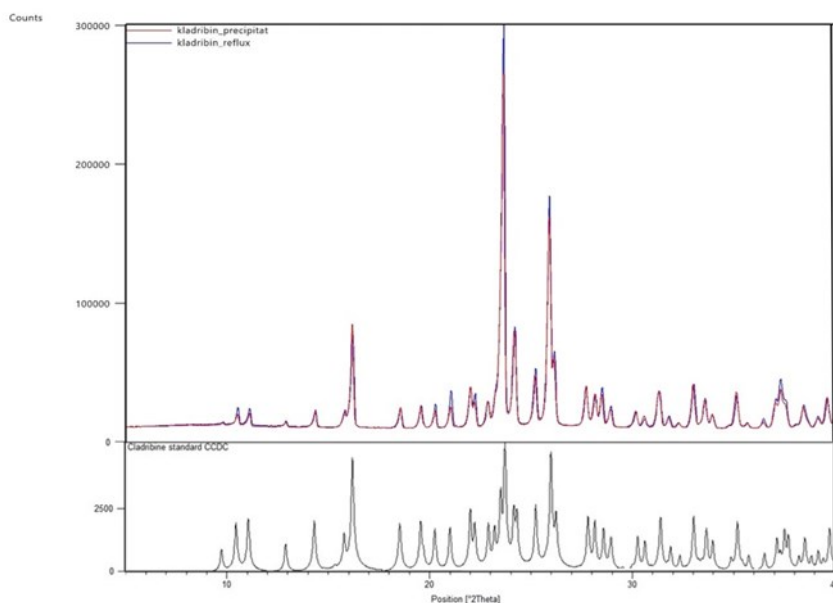
4. Nový přístup v enzymové syntéze kladribinu

Vývoj nové enzymové syntézy kladribinu byl výzvou pro poskytnutí rychlé, ekonomicky výhodné a z hlediska ochrany životního prostředí šetrnější účinné látky, která by v kvalitě odpovídala požadavkům evropského nebo amerického lékopisu (EP, USP). Syntéza je založena na přítomnosti vysoké koncentrace volně rozpuštěných transglykosidas ve vodném roztoku, zcela bez obsahu organických rozpouštědel. Samotná enzymová syntéza probíhá ve fosfátovém pufru a obsahuje vstupní suroviny 2-chloradenin, 2'-deoxyuridin a enzymy UP a PNP v koncentraci minimálně 20 000 U l⁻¹. Optimální hmotnostní poměr mezi 2-chloradeninem a 2'-deoxyuridem je 1:4. Tento způsob přípravy umožňuje získat výtěžek kladribinu 5 a více g l⁻¹ h⁻¹, přičemž výsledný precipitát (1. krystal) obsahuje kladribin o minimální čistotě 98 %. Tento první krystal se může přechistit pod refluxem do čistoty min. 99,9 %. Jak precipitát (1. krystal), tak přečištěný kladribin pod refluxem byly charakterizovány rentgenovou práškovou difrakcí, kterou byla potvrzena krystalická forma. Difraktogramy obou vzorků byly porovnány s databází CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre), kde byla nalezena 100% shoda s krystalickým kladribinem forma I (referenční kód 02-097-8778) (obr. 2). V provedených experimentech se neprojevovaly žádné rozdíly ve fyzikálně chemických vlastnostech enzymově připravené API oproti chemicky dostupné účinné látce.

Transglykosidasy jsou v reakčním médiu přítomny ve formě volných enzymů a mohou být v semipurifikované nebo purifikované formě. Semipurifikovanou formou se rozumí hrubý proteinový precipitát získaný kombinací tepelné precipitace a následného vysolení. Purifikovaná forma je enzym přečištěný chromatografickými metodami. Výhodou je, že po skončení reakce lze enzymy jednoduše odstranit z reakčního roztoku tepelnou inaktivací a následnou filtrací. Kladribin o vysoké čistotě tak lze získat pouhou precipitací ze zakoncentrovaného média zcela bez použití chromatografických metod.

5. Závěr

Náhrada chemické syntézy enzymovou je velmi výhodná a perspektivní cesta, ať už z hlediska spotřebovaných chemikálií, množství energie, ekonomiky procesu nebo stále více diskutované ochrany životního prostředí. Použití vysoké koncentrace volně rozpuštěných transglykosidas představuje elegantní řešení při přípravě kladribinu i dalších analogů nukleosidů bez nutnosti imobilizace či jiné úpravy enzymů.



Obr. 2. Porovnání difraktogramů kladribinu – precipitát (první krystal), pod refluxem přečištěný první krystal a struktura standardu z databáze CCDC

LITERATURA

- Ruiz-Mirazo K., Briones C., de la Escosura A.: *Chem. Rev.* 114, 285 (2013).
- Koonin E. V., Dolja V. V.: *Curr. Opin. Virol.* 3, 546 (2013).
- Jordheim L. P., Durantel D., Zoulim F., Dumontet C.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 447 (2013).
- Eastman R. T., Roth J. S., Brimacombe K. R., Simeonov A., Shen M., Patnaik S., Hall M. D.: *ACS Cent. Sci.* 6, 672 (2020).
- Meanwell M., Silverman S. M., Lehmann J., Adluri B., Wang Y., Cohen R., Campeau L.C., Britton R.: *Science* 369, 725 (2020).
- Vorbrüggen H., Ruh-Pohlentz C.: *Synthesis of Nucleosides*. Organic Reactions, Berlin 1999.
- Anastas P., Eghbali N.: *Chem. Soc. Rev.* 39, 301 (2010).
- Sheldon R. A.: *Green Chem.* 19, 18 (2017).
- Bryan M. C. a 13 spoluautorů: *Green Chem.* 20, 5082 (2018).
- Li C. J., Trost B. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 13197 (2008).
- Lapponi M. J., Rivero C. W., Zinni M. A., Britos C. N., Trelles J. A.: *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 133, 218 (2016).
- Kaspar F., Stone M. R. L., Neubauer P., Kurreck A.: *Green Chem.* 23, 37 (2020).
- Pugmire M. J., Ealick S. E.: *Biochem. J.* 361, 1 (2002).
- Kaspar F., Giessmann R. T., Neubauer P., Wagner A., Gimpel M.: *Adv. Synth. Catal.* 362, 867 (2020).
- Kaspar F., Giessmann R. T., Hellendahl K. F., Neubauer P., Wagner A., Gimpel M.: *ChemBioChem* 21, 1428 (2020).
- Westarp S., Kaspar F., Neubauer P., Kurreck A.: *Curr. Opin. Biotech.* 78, 102829 (2022).
- Huffman M. A. a 34 spoluautorů: *Science* 366, 1255 (2019).
- McIntosh J. A. a 20 spoluautorů: *ACS Cent. Sci.* 7, 1980 (2021).
- Tallman M. S., Hakimian D.: *Blood.* 86, 2463 (1995).
- Giovannoni G.: *Neurotherapeutics* 14, 874 (2017).
- Henschke J. P., Zhang X. (Scinopharm Taiwan Ltd.): *PCT Int. Appl. WO* 2011 054179 (2011).
- Carson D. A., Wasson D. B., Beutler E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 2232 (1984).
- Homaei A. A., Sariri R., Vianello F., Stevanato R.: *J. Chem. Biol.* 6, 185 (2013).
- Zuffi G., Monciardini S. (Explora Laboratories SA): *EP* 1932918 (2008).

Z. Čížková, V. Matĥa, and K. Beneš (*VUAB Pharma a.s., Department of Enzymes, České Budějovice, Czech Republic*): **Enzymatic Synthesis and Its Use in Cladribine Production**

Enzymatic synthesis is an alternative to chemical synthesis and provides new possibilities in the preparation of pharmaceutically active substances. The aim is to minimize the inefficiency of the chemical method of preparation and increase its effectiveness. Despite advances, biotechnological processes in nucleoside synthesis using catalysis by nucleoside phosphorylases are not actively applied industrially. The development of an enzymatic synthesis route could bring benefits in terms of improved efficiency, process simplicity, and minimization of organic solvent consumption and thus environmental impact. The use of enzymatic synthesis in the production of cladribine provides a simple and rapid way of producing this active substance in high purity without the formation of undesirable by-products.

Keywords: enzymatic synthesis, transglycosidases, nucleoside analogue, cladribine



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.