

Przewaga technologii enzymatycznej w produkcji leków – nowy światowy standard

The advantage of enzyme technology to drug manufacturing process
– new world standard

prof. dr hab. n. farm. Andrzej Stańczak¹, mgr farm. Barbara Kuliś

¹ kierownik Zakładu Farmacji Szpitalnej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

PDF FULL-TEXT
www.lekwpolisce.pl

Oddano do publikacji: 06.08.2014

Słowa kluczowe: amoksycylina, synteza enzymatyczna, antybiotykooporność.

Streszczenie: Większość naturalnych antybiotyków powstaje w wyniku biosyntezy, wykorzystując odpowiednie szczepy grzybów i bakterii. Jednak w przypadku penicylin półsyntetycznych i cefalosporyn wykorzystywane są metody tradycyjnej syntezy chemicznej. Wymaga to zastosowania często toksycznych odczynników oraz dużych nakładów energii. Przełomem w produkcji tych antybiotyków była synteza antybiotyków β -laktamowych w środowisku wodnym, z wykorzystaniem enzymów. Przykładem takiego antybiotyku jest amoksycylina, często stosowana razem z kwasem klawulanowym jako inhibitorem β -laktamaz. Otrzymany w ten sposób antybiotyk cechuje wysoka czystość i brak zanieczyszczeń typowych dla syntezy chemicznej. Zastosowane metody mają charakter ekologiczny i wpisują się w szeroko rozumiane pojęcie „Green Chemistry”.

Key words: amoxicillin, enzymatic synthesis, antimicrobial resistance.

Abstract: The most of natural antibiotics are produced by biosynthetic methods from the appropriate strains of bacteria and fungus. However, in semisynthetic penicillins and cephalosporins cases the method of chemical synthesis are applied. These productions requires often toxic chemicals and large energy consumption. Synthesis of β -lactam antibiotics in water solution using enzymes in their production was turning point. Amoxicillin often applied with clavulanic acid is good example of that medicine. Amoxicycillin obtained this way characterized by high purity and lack of pollutions typical of chemical synthesis. Using these methods have ecological nature and put down in term “Green Chemistry”.

Wprowadzenie

Procesy z udziałem enzymów są powszechnie wykorzystywane w przyrodzie i stanowią podstawę wszystkich procesów biochemicznych zachodzących w organizmach żywych. Enzymy są zatem biokatalizatorami, które cechuje wysoka specyficzność i selektywność do substratów, co zapewnia wysoką jakość powsta-

jącego produktu. Sam proces enzymatyczny polega na katalizowaniu reakcji chemicznych przez odpowiedni enzym z właściwych dla niego substratów. W wyniku tego powstaje produkt charakteryzujący się konkretnymi, oczekiwanymi właściwościami.

Wiele właściwości enzymów jest od dawna wykorzystywanych w przemyśle spożywczym, zwłaszcza w produkcji żywności. Również

wiele naturalnych antybiotyków jest produkowanych przez bakterie i grzyby z wykorzystaniem ich własnych procesów enzymatycznych. Natomiast przełom stanowi zastosowanie enzymów w syntezie półsyntetycznych penicylin i cefalosporyn, i jest to niewątpliwie przyszłość w syntezie leków. Reakcje te przebiegają w łagodnym środowisku i nie wymagają tak dużych nakładów energii, dzięki nim ogranicza się ilość produktów ubocznych, co korzystnie wpływa na środowisko. Już wiele firm farmaceutycznych zwróciło uwagę na korzyści płynące z zastosowania procesów enzymatycznych [1].

Amoksycylina i kwas klawulanowy

Amoksycylina należy do aminopenicylin, czyli penicylin półsyntetycznych i jest jednym z najczęściej przepisywanych antybiotyków o szerokim zakresie działania. Znajduje się w grupie antybiotyków β -laktamowych, które charakteryzują się działaniem bakteriobójczym. Każdy antybiotyk z tej grupy hamuje syntezę ściany komórkowej bakterii. Enzymy odpowiedzialne za budowę ściany komórkowej są hamowane przez antybiotyki z grupy β -laktamów, m.in. amoksycylinę. Ponadto dodatkowym działaniem antybiotyków z tej grupy jest wpływ na autolizę komórki bakteryjnej poprzez unieczynnienie inhibitorów hydrolaz, dzięki czemu szybciej dochodzi do samozniszczenia bakterii. Ze względu na możliwość wystąpienia oporności na antybiotyki β -laktamowe, która jest wynikiem wytwarzania przez drobnoustroje β -laktamaz, amoksycylina jest łączona z kwasem klawulanowym, który jest inhibitorem tychże enzymów. Kwas klawulanowy jest naturalnym antybiotykiem, wytwarzanym przez *Streptomyces clavuligerus*. W swojej budowie ma (podobnie jak amoksycylina) pierścień

β -laktamowy. Sam kwas klawulanowy ma słabe działanie przeciwbakteryjne i nie jest stosowany w monoterapii. Wykazuje natomiast bardzo silną inhibicję β -laktamaz, dzięki czemu nasila działanie połączonych z nim antybiotyków [2,3,4].

Produkcja większości półsyntetycznych antybiotyków β -laktamowych odbywa się na drodze syntezy chemicznej. W procesie tym kwas 6-aminopenicylanowy (6-APA) reaguje ze związkiem będącym prekursorem łańcucha bocznego amoksycyliny (pochodną kwasu 6-aminopenicylanowego).

Mimo dość dużej wydajności (około 90%) tradycyjny proces chemiczny wymaga niezwykle agresywnych związków chemicznych, takich jak chlorki kwasowe lub krzemowe grupy protekcyjne oraz dużych objętości bardzo toksycznych rozpuszczalników [5,6]. Dlatego przełomem były badania podjęte przez firmę DSM (Delft, Holandia) nad biosyntezą antybiotyków β -laktamowych w środowisku wodnym, z wykorzystaniem enzymów [7].

Enzymy i ich znaczenie w produkcji amoksycyliny

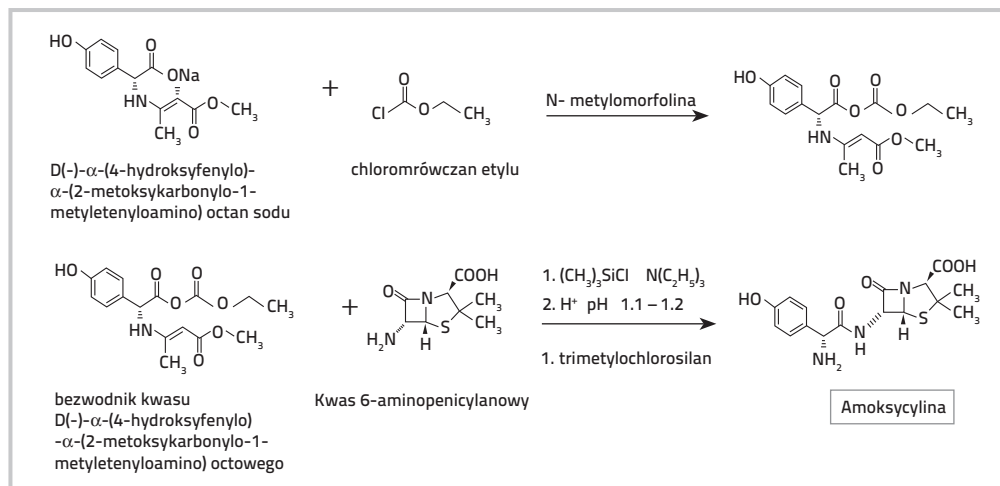
Enzymy znajdują się w każdej komórce zwierzęcej, roślinnej, a także w komórkach mikroorganizmów. Ich główną rolą jest katalizowanie reakcji zachodzących w poszczególnych cyklach i szlakach przemian biochemicznych komórki. Ważną cechą każdego enzymu jest jego specyficzność dotycząca substratu, co oznacza, że może on katalizować tylko określoną reakcję. Jest to uwarunkowane strukturą przestrzenną enzymu, a ściślej strukturą jego centrum aktywnego, które w specyficzny sposób łączy się z konkretnym substratem. Reakcja ta jest typem reakcji ciągłej, dlatego enzymy mogą w sposób nieprzerwany katalizować odpowiednią

dla siebie reakcję. Jeśli nie są narażone na działanie czynników, które będą miały destrukcyjny wpływ na ich aktywność, mogą wówczas pracować bez przerwy, do całkowitego wyczerpania substratu. Między innymi z tego względu zwrócono na nie uwagę przy produkcji różnego rodzaju substancji wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym, np. do produkcji aminopenicylin i cefalosporyn. Produkcja z wykorzystaniem enzymów jest często korzystniejsza niż synteza tego samego produktu na drodze chemicznej. Sprzyjają temu takie czynniki jak optymalizacja warunków zachodzącej reakcji, czyli pH, temperatura, odczynniki chemiczne, produkt o pożądanej konfiguracji stereochemicznej, która wykazuje określone działanie farmakologiczne, a także czas, w jakim można go uzyskać.

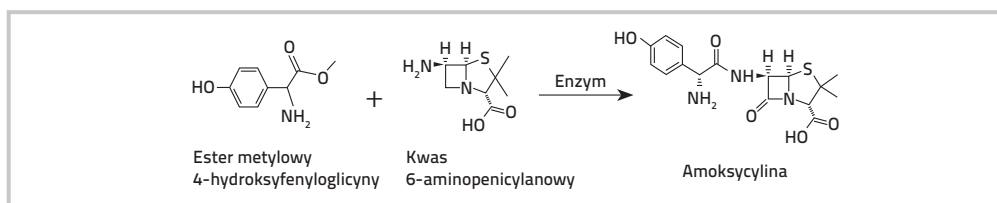
W przypadku amoksycyliny przeprowadzono szereg badań mających na celu ustalenie optymalnych warunków jej wytwarzania z użyciem immobilizowanych enzymów bakteryjnych, pozyskiwanych głównie ze szczepów *Escherichia coli*.

W biosyntezie antybiotyków β -laktamowych zazwyczaj stosowany jest enzym produkowany przez grzyby i bakterie: acylaza penicyliny G (*Penicillin G Acylase*) – PGA, której zadanie polega na katalizowaniu reakcji przyłączenia estru metylu p-hydroksyfenyloglicyny (HPGM) z kwasem 6-aminopenicylanowym (6-APA), w wyniku czego powstaje cząsteczka amoksycyliny.

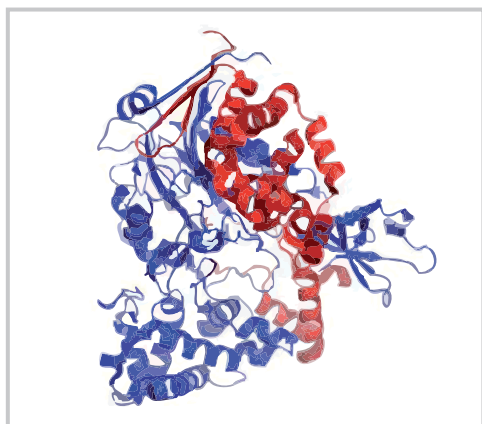
Reakcja z zastosowaniem enzymu jest selektywna, co oznacza, że nie powstają produkty uboczne charakterystyczne dla reakcji chemicznych oraz stosuje się łagodne środowisko reakcji, bez użycia rozpuszczalników



Ryc. 1. Synteza chemiczna amoksycyliny [9]



Ryc. 2. Synteza enzymatyczna amoksycyliny [5]

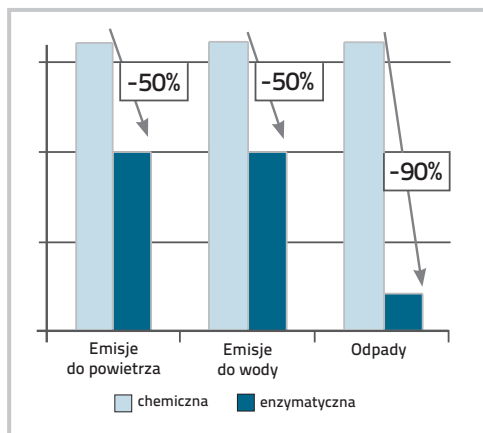


Ryc. 3. Obraz struktury enzymu PGA [10]

organicznych, stosowanych podczas czysto chemicznej syntezy amoksyliny, tj.:

- izopropanolu
- chlorku piwalowego
- kwasu piwalowego
- chlorku metylenu
- dimetyloacetamidu i trietyloaminy [11,12].

Taka synteza umożliwia też zredukowanie ilości produktów ubocznych reakcji syntezy, co w konsekwencji przyczynia się do zmniejszenia (o około 50%) utylizowanych substancji chemicznych, gazów, jak również redukcji zanieczyszczeń o 90%, dzięki czemu zdecydowanie ogranicza się zanieczyszczenie środowiska.



Ryc. 4. Porównanie emisji zanieczyszczeń emitowanych przy produkcji syntezy chemicznej i syntezy enzymatycznej [7]

Ograniczenie korzystania z organicznych rozpuszczalników powoduje, że poprawia się czystość otrzymanego produktu o około 1,6%, co przyczynia się do podwyższenia jakości amoksyliny [7].

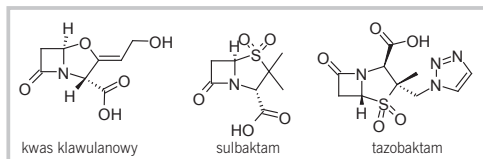
DSM Pure Actives – pionier w enzymatycznej produkcji amoksyliny

Od 1997 r. holenderska firma DSM Sinochem Pharmaceuticals, Netherlands B.V. jako pierwsza na świecie zaczęła produkować antybiotyki β -laktamowe metodą syntezy biokatalitycznej. Pierwszym uzyskanym w ten sposób antybiotykiem była cefaleksyna, należąca do cefalosporyn. W 2002 r. na rynek został wprowadzony preparat, który jako pierwszy zawierał amoksylinę zsyntetyzowaną na zasadzie biokatalizy. Wydarzenie to wpłynęło na utworzenie wspólnej nazwy dla otrzymywanych w ten sposób antybiotyków β -laktamowych – DSM Pure Actives. Na uwagę zasługuje fakt, iż dzięki zastosowaniu takiej produkcji znacznie zmniejsza się emisja gazów do atmosfery (o około 50%) i toksycznych produktów ubocznych do wody (o około 50%), co zalicza ją do tzw. Green Chemistry [7,13,14,18].

Dwa w jednym

Początkowo wprowadzenie do lecznictwa antybiotyków dawało nadzieję na rozwiązanie problemu chorób infekcyjnych. Jednak nadmierne i nieuzasadnione ich stosowanie, w tym również w weterynarii, spowodowało pojawienie się zjawiska lekooporności u coraz większej liczby szczepów. Równocześnie nie ma nowych przełomowych odkryć w tej dziedzinie. Jednym ze sposobów walki z lekoopornością jest stosowanie leków złożonych z dwóch antybiotyków lub antybiotyku i inhibitora enzymu nieczynniającego ten antybiotyk. Sam pomysł nie jest nowy i stosowany był w przypadku sulfonamidów (Biseptol

= sulfametozazol + trimetoprim). Podobnie jest w przypadku antybiotyków β -laktamowych. Odkrycie czynnika niwelującego działanie penicylin – enzymów β -laktamaz było o tyle istotne, że zmusiło naukowców do poszukiwań związków hamujących te enzymy. Aby zapobiec działaniu β -laktamaz, niektóre antybiotyki łączy się z inhibitorami β -laktamaz (takimi jak np. kwas klawulanowy, sulbaktam, tazobaktam) – ryc. 5.



Ryc. 5. Struktura chemiczna inhibitorów β -laktamaz [17]

Szereg preparatów zawiera amoksycylinę i kwas klawulanowy, ale tylko w niektórych z nich amoksycylina jest pozyskiwana na drodze syntezy enzymatycznej. Wpływa to na czystość substancji czynnej i wysoką jakość leku. Tak otrzymana amoksycylina nie ma pozostałości rozpuszczalników organicznych, które mogą uczulać pacjentów, ponadto charakteryzuje się dłuższym okresem ważności, a więc i działania. Jednak, jak każdy antybiotyk należący do grupy penicylin, może powodować działania niepożądane w postaci reakcji uczuleniowych. Występują one zwłaszcza u osób nadwrażliwych na działanie penicylin. Dlatego bardzo ważnym aspektem terapii zakażenia bakteryjnego jest przeprowadzenie dokładnego wywiadu z pacjentem przed rozpoczęciem leczenia amoksycyliną z kwasem klawulanowym. Wiele wielkocząsteczkowych związków biologicznie czynnych może występować w postaci kilku izomerów optycznych, różniących się przestrzennym ułożeniem podstawników w każdym z nich. Na ogół produktem klasycznej syntezy chemicznej są mieszaniny poszczególnych izomerów. Jedynie reakcje przebiegające na drodze biosyntezy są na tyle selektywne, że zapewniają otrzymanie ściśle określonych izomerów i tak też jest w przypadku amoksycyliny.

Podsumowując, wykorzystanie procesu enzymatycznego w produkcji amoksycyliny niesie za sobą wiele korzyści dla pacjentów i środowiska (tab. 1).

Tab. 1 Korzyści z zastosowania procesu enzymatycznego w produkcji amoksycyliny

Korzyści dla pacjenta

wysoka jakość leku → wysoka skuteczność działania

wysoka czystość amoksycyliny → poprawa smaku preparatu

lepsza biodostępność leku

dłuższy termin ważności leku

zmniejszenie zanieczyszczeń → zmniejszenie ilości substancji mogących wywoływać uczulenie

Korzyści dla środowiska

minimalizacja produktów ubocznych reakcji enzymatycznej → mniej zanieczyszczeń

mniej emitowanego CO₂ do atmosfery

mniej zanieczyszczeń emitowanych do wody

zminimalizowanie aparatury do produkcji antybiotyku → ograniczenie zużycia energii

zmniejszenie degradacji fauny i flory

Piśmiennictwo:

- Nowak D., „Enzymy jako nowoczesne narzędzie technologiczne”, *Agro Przemysł* 2/2008, s. 28-30.
- Gorczyca M., Zejc A., *Chemia leków – podręcznik dla studentów farmacji i farmaceutów*, PZWL, Warszawa 2008, s. 649-654.
- Janiciec W., *Farmakodynamika – podręcznik dla studentów farmacji tom 2*, PZWL, Warszawa 2008, s. 1099-1109, 1123-1124.
- <http://www.urpl.gov.pl/> – Charakterystyka Produktu Leczniczego – Ramoclav.
- Alemzadeh I., Borghiei G., Vafi L., Roostaazad R., “Enzymatic Synthesis of Amoxicillin with Immobilized Penicillin G Acylase”, *Chemistry and Chemical Engineering Vol. 17*, No. 1, Sharif University of Technology, June 2010, s. 106-113.
- Anuj K., Chandel L., Venkateswar Rao, M., Lakshmi Narasu, Om V. Singh, “The realm of penicillin G acylase in β -lactam antibiotics”, *Enzyme and Microbial Technology* 42, 2008, s. 199-207.
- <http://www.dsm-sinochem.com>
- Wegman M.A., Janssen M.H., van Rantwijk F., Sheldon R.A., “Towards Biocatalytic Synthesis of β -Lactam Antibiotics”, *Adv. Synth. Catal.* 2001, 343, No. 6-7.
- <http://drugssynthesis.blogspot.com/2011/11/laboratory-synthesis-of-amoxicillin.html>
- <http://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/p06875/structures.jsessionid=739f675e-2d2ee455e512f5d77f9c30ad>
- “Process for the preparation of hydroxy-alpha-amino-benzyl penicillin” Pat. US 4193918
- Deaguero A.L., “Improving the enzymatic synthesis of semi-synthetic beta-lactam antibiotics via reaction engineering and data-driven process engineering”, *Dissertation*, Georgia Institute of Technology, 2011.
- Jordan A. and Gathergood N., “Designing Safer and Greener Antibiotics” 2013, 2, 419-438; doi:10.3390/antibiotics2030419.
- Pereira S.C., Bussamara R., Marin G., Camargo L., et al., “Enzymatic synthesis of amoxicillin by penicillin G acylase in the presence of ionic liquids”, *Green Chem.*, 2012, 14, 3146.
- Babic M., Hujer A.M., Bonomo R.A., “What’s new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases”, *Drug Resistance Updates* 9 (2006) 142–156.
- Watkins R.R., Papp-Wallace K.M., Drawz S.M. and Bonomo R.A., “Novel β -lactamase inhibitors: a therapeutic hope against the scourge of multidrug resistance”, *Frontiers in Microbiology, Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, (2013) Volume 4, Article 392.
- Bassetti M., Ginocchio F., Mikulska M., “New treatment options against gram-negative organisms”, *Critical Care*, (2011), 15:215.
- Khetan S.K., Collins T.J., “Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry”, *Chem. Rev.* 2007, 107, 2319-2364 2319.

prof. dr hab. n. farm. Andrzej Stańczak
anstanczak@o2.pl