

# Matematično modeliranje kinetike encimsko katalizirane sinteze statinskega intermedija

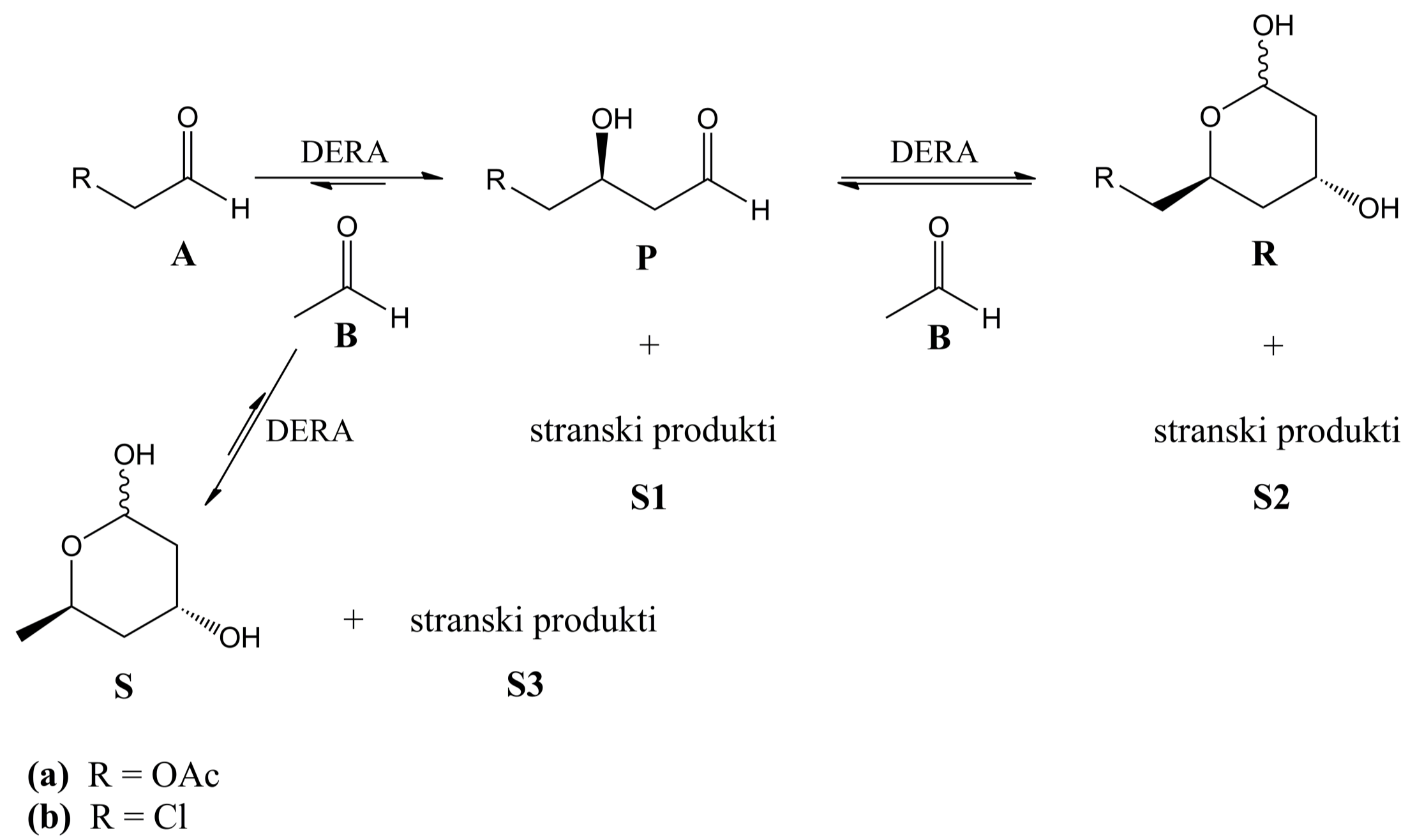
Aleš Ručigaj, Matjaž Krajnc

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Večna pot 113, SI-1000 Ljubljana, Slovenija  
E-mail: ales.rucigaj@fkt.uni-lj.si, matjaz.krajnc@fkt.uni-lj.si

## Uvod

Statini so uveljavljene zdravilne učinkovine, ki v krvi znižajo koncentracijo holesterola in lipoproteina nizke gostote (LDL) z inhibicijo encima 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA-reduktazo (HMG-CoA reduktaza), ki katalizira pretvorbo HMG-CoA v mevalonat pri sintezi holesterola v jetrih<sup>1</sup>. Odkritje je imelo velik vpliv na preprečevanje bolezni, kot so hiperholesterolemija ter bolezni srca in ožilja. Tako tudi ni presenetljivo, da so statini najpogosteje predpisana in obenem tudi najbolj učinkovita zdravila za zdravljenje motenj pri presnovi lipidov. Za pripravo popolnoma sinteznih statinov, znanih tudi kot superstatini, je zaradi njihove zapletene strukture, ki sestoji iz popolnoma substituiranega heterocikličnega skeleta in nanj pritrjene 3,5-dihidroksi-6-heptenojske ali heptanojske stranske kiralne verige, možnih več sinteznih pristopov<sup>2</sup>. Kemija superstatinov se je v dveh desetletjih raziskav in razvoja že temeljito izboljšala. Kljub vsemu povečane komercialne zahteve po statinih in želja po preprostejši pripravi na industrijskem nivoju spodbujajo k učinkovitejšim in okolju prijaznejšim načinom priprave nekaterih stranskih statinskih intermediatov. To je tudi eden od razlogov, zakaj se raziskave osredotočajo na zamenjavo nekaterih popolnoma sintetičnih pristopov sinteze z encimsko kataliziranimi, ki veljajo za visoko stereoselektivne<sup>1,3</sup>.

Sinteza statinskega intermedija je potekala z uporabo encima 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA), ki se je nahajal v obliki surovega lizata. Izbor encima DERA kot biokatalitičnega sredstva je temeljil na možnosti kataliziranja reakcije med dvema aldehidoma, pri čemer se tvori nov aldehidni produkt. Najosnovnejši opis procesa vključuje reakcijo med substituiranim acetaldehidom **A** in acetaldehidom **B** kot substratom, pri tem nastaja vmesni aldolni adukt **P**, ki v ponovni reakciji a acetaldehidno molekulo **B** tvori laktol **R**. Hkrati v sekundarni reakciji tri molekule acetaldehida tvorijo stranski produkt 6-metil-laktol **S**. Zaradi neočiščenosti encima in zmožnosti katalize alternativnih stranskih reakcij nastajajo tudi neželeni stranski produkti **S1**, **S2**, **S3** (Shema 1). Ob tem velja omeniti tudi, da na sam potek reakcije bistveno vpliva aktivnost encima, ki se med reakcijo zmanjšuje kot posledica inaktivacije encima s strani substratov<sup>4,5</sup>.



Shema 1. Reakcijska shema DERA katalizirane reakcije pri tvorbi ključne stranske verige statinskega intermedija **R**.

## Eksperimenti

Izvedba šaržnih in polšaržnih eksperimentov v steklenem reaktorju delovnega volumna 0,5 L in zagotavljanje mešanja s propellerskim mešalom. Encimsko katalizirano reakcijo sem vodil pri temperaturi 37 °C ob zagotovljenem konstantnem mešanju 600 rpm. pH vrednost reakcijske zmesi sem z dodajanjem 12,5 % amonijakalne vodne raztopine vzdrževal na vrednosti 6,2. V primeru vseh izvedenih eksperimentov sem uporabil 233 mL encimske suspenzije z namenom zagotavljanja enakih začetnih pogojev v času opravljanja eksperimentalnega dela. Količina dodanih reaktantov je sledila stehiometričnemu razmerju med reaktantoma substituiran acetaldehid (**A**) : acetaldehid **B** = 1 : 2, upoštevajoč zgolj glavno reakcijo.

Baza eksperimentalnih podatkov

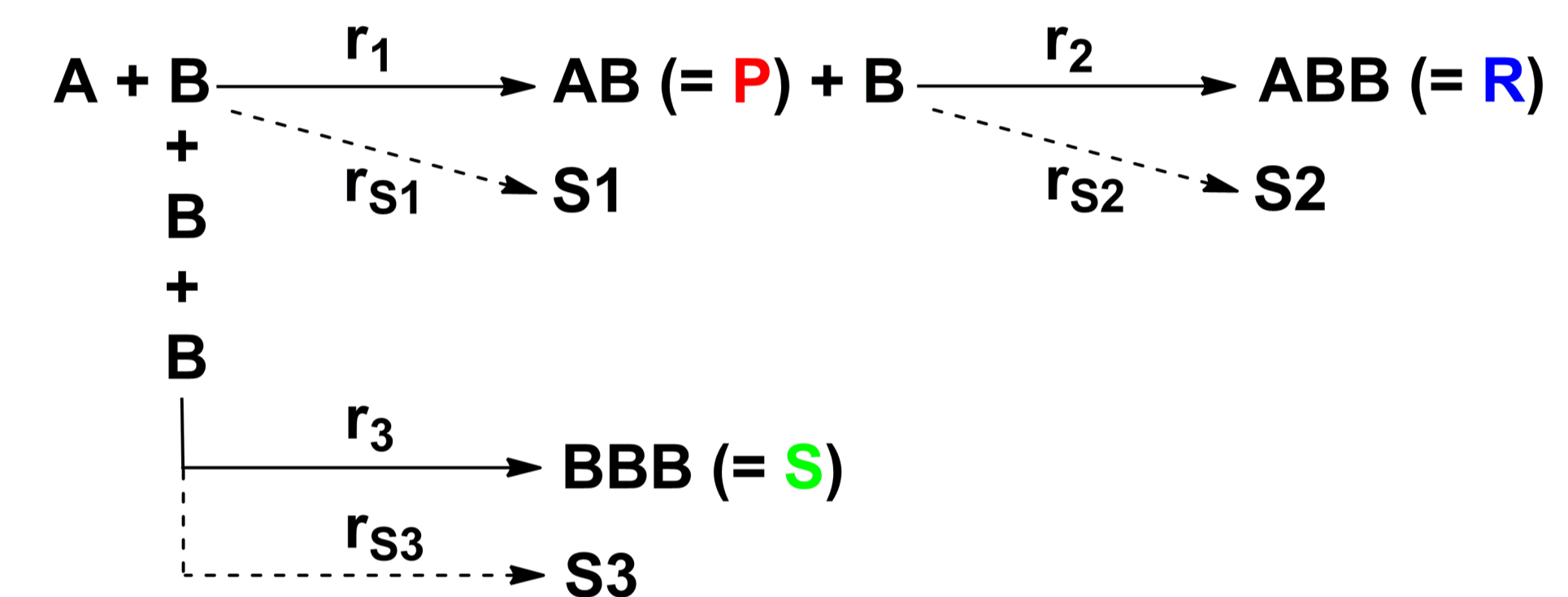
Postavitev kinetičnega modela

Matematično modeliranje

Uporaba kinetičnega modela pri simulaciji procesa

## Potek matematičnega modeliranja

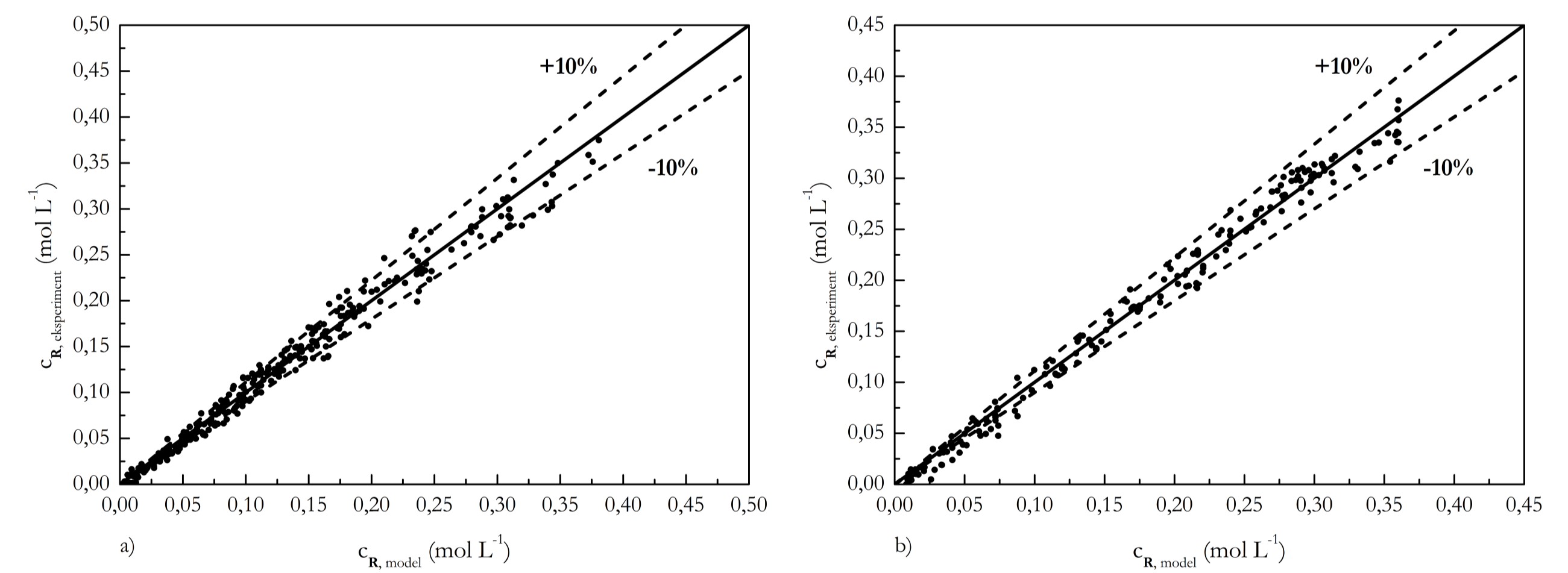
Postavitev kinetičnega modela



Slika 1. Predvidena poenostavljena reakcijska shema kot pomoč pri nadaljnjem oblikovanju kinetičnega modela.

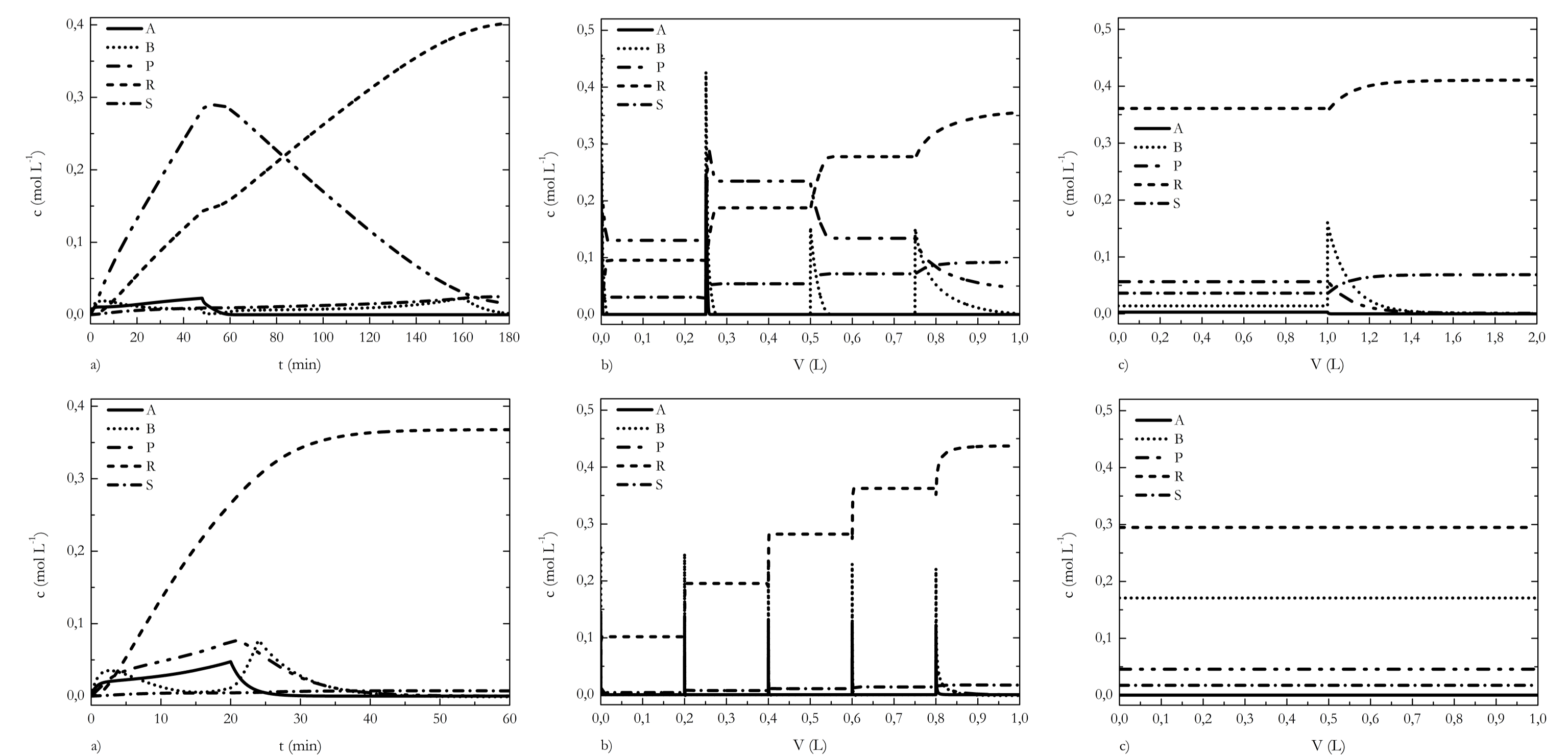
Pridobitev kinetičnih parametrov

- Optimizacijska rutina
- Ujemanje eksperimentalnih podatkov z izračunanimi modelnimi vrednostmi



Slika 3. Ujemanje izračunanih vrednosti z eksperimentalnimi za glavni produkt **R** reakcije acetiloksiacetaldehid/acetaldehid (a) in kloroacetaldehid/acetaldehid (b).

Simulacija poteka reakcije



Slika 4. Simulacija encimsko katalizirane reakcije v polšaržnem (a), PFR (b) in CSTR-PFR (c) reaktorju za reakcijo acetiloksiacetaldehid/acetaldehid (**A**) in kloroacetaldehid/acetaldehid (**B**).

## Zahvala

Zahvaljujemo se Leku d.d. za finančno podporo tega projekta (SDC-CROS-2011/349) in za zagotavljanje encima DERA v obliki surovega lizata. Za razvoj GC analitske metode se zahvaljujemo D. Orkiču (Lek d.d.), za pripravo acetiloksiacetaldehida S. Borišku (Lek d.d.) in za posnete <sup>1</sup>H NMR in <sup>13</sup>C NMR sprektre B. Aliču. Za finančno podporo se zahvaljujemo tudi Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo (P2-0191).

## Reference

1. Istvan, E. S.; Deisenhofer, J., Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* **2001**, 292 (5519), 1160-1164
2. Časar, Z., Historic overview and recent advances in the synthesis of super-statins. *Curr. Org. Chem.* **2010**, 14 (8), 816-845
3. Pollard, D. J.; Woodley, J. M., Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends*

4. Ručigaj, A.; Krajnc, M., Optimization of a crude deoxyribose-5-phosphate aldolase lyzate-catalyzed process in synthesis of statin intermediates. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, 17 (5), 854-862
5. Ošljaj, M.; Cluzeau, J.; Orkič, D.; Kopitar, G.; Mrak, P.; Časar, Z., A Highly Productive, Whole-Cell DERA Chemoenzymatic Process for Production of Key Lactonized Side-Chain Intermediates in Statin Synthesis. *PLoS ONE* **2013**, 8 (5), e62250