



Biokatalytická příprava farmaceutického prekurzoru s využitím rekombinantního enzymu

Radka Chaloupková

Enantis s.r.o. a Loschmidtovy laboratoře, PŘF MU

Enantis



biotech firma
založena
v roce 2006



spin off
společnost
Masarykovy
univerzity



vlastní
laboratoře v
inkubátoru JIC
INBIT



výzkum a vývoj
v oblasti
proteinů
a enzymů



12
zaměstnanců
na hlavní PP
(8 v R&D)

Loschmidtovy laboratoře

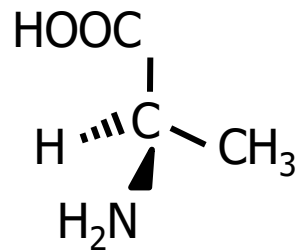
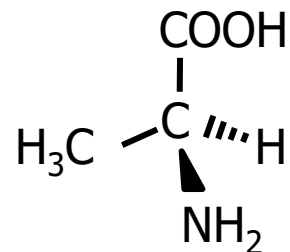
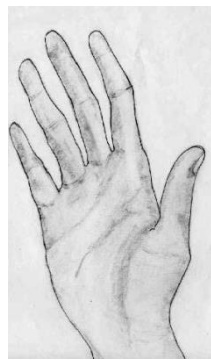
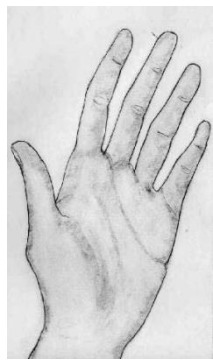
- fundamentální principy enzymové katalýzy
- inženýrství enzymů/proteinů pro praktické aplikace
- vývoj mikrofluidních systémů pro screening
 - vývoj softwarů



Optická čistota látek

Chirální molekula

- neztotožnitelná se svým zrcadlovým obrazem
- obsahuje jeden nebo více středů chiralidy



Optická čistota látek

Chirální molekula

- neztotožnitelná se svým zrcadlovým obrazem
 - obsahuje jeden nebo více středů chiralidy
- enantiomery chirálních látek mají rozdílné biologické účinky

THALIDOMID

(*R*)-enantiomer
**sedativum a
hypnotikum**



(*S*)-enantiomer
**teratogenní a
karcinogenní účinky**

Optická čistota látek

Chirální molekula

- neztotožnitelná se svým zrcadlovým obrazem
 - obsahuje jeden nebo více středů chiralit
- enantiomery chirálních látek mají rozdílné biologické účinky
- **prekurzory léčiv** - požadavek vysoké optické čistoty (**e.e. > 98%**)

Výroba opticky čistých látek

Chemicky

Enzymaticky

- enzymy jsou chirální molekuly tvořené L-aminokyselinami
 - enzymy jsou enantioselektivní

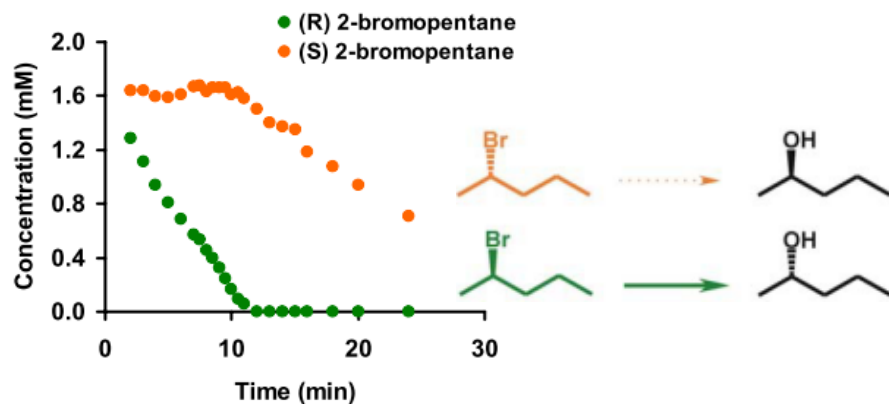
$$E = \frac{k_A}{k_B} = \frac{(k_{\text{cat}} / K_m)_R}{(k_{\text{cat}} / K_m)_S}$$

Výroba opticky čistých látek

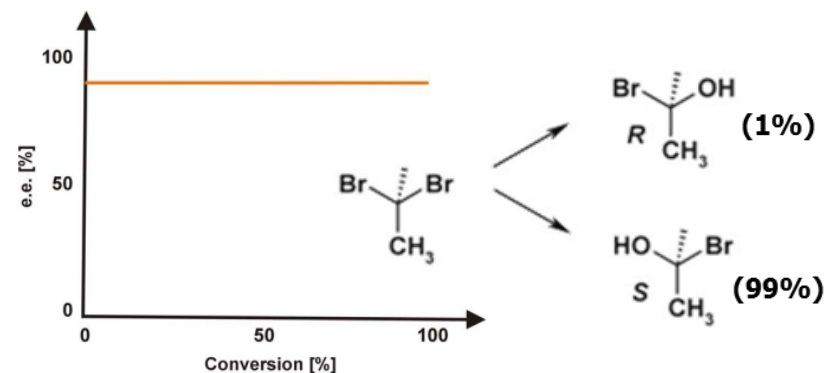
Chemicky Enzymaticky

- enzymy jsou chirální molekuly tvořené L-aminokyselinami
 - enzymy jsou enantioselektivní

A) KINETICKÉ ROZLIŠENÍ



B) ASYMETRICKÁ SYNTÉZA z prochirálního substrátu

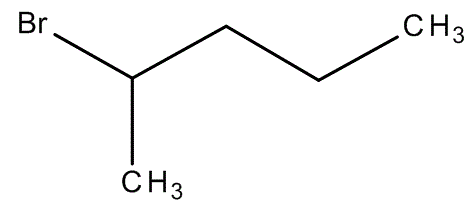
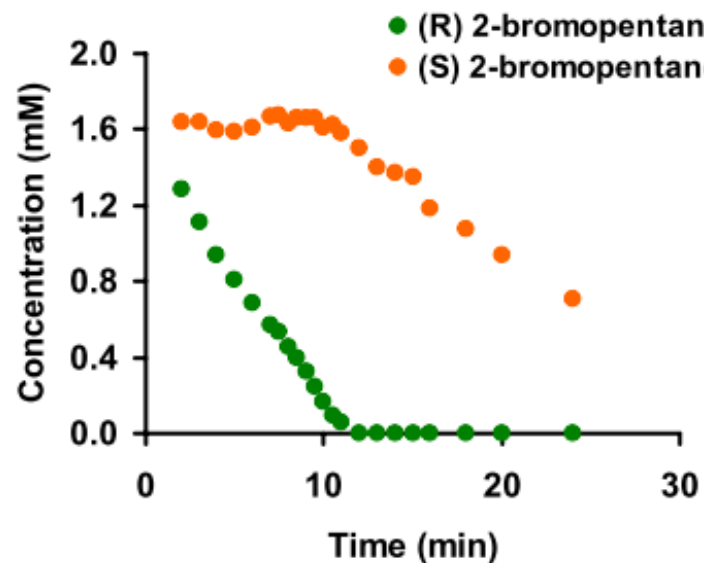


Plán cvičení

Syntéza opticky čistého (*S*) 2-brompentanu pomocí rekombinantně připravené halogenalkandehalogenasy

- enantioselektivita: $E = 130$

1.223



1. Příprava reakční směsi

15 ml glycinového pufru
2 μ l 2-brompentanu



Odběr v čase 0:
1 ml reakční směsí



2. Zahájení reakce

14 ml glycinového pufru
2 μ l 2-brompentanu
+0.5 ml DbjA 1.9 mg/ml



3. Odběry z reakční směsi:

v časech 2, 4, 6, 8, 10, 12,
14,16, 18 a 20 minut



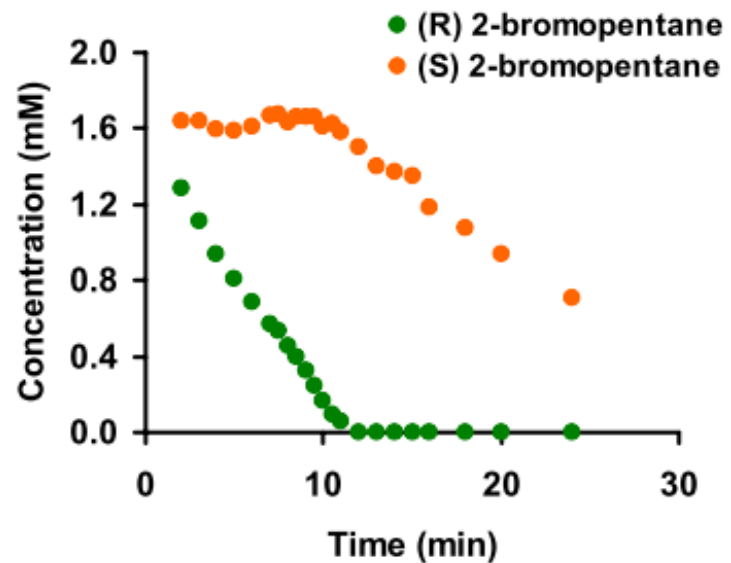
1 ml reakční směsí



4. Měření vzorků na GC s chirální kolonou



5. Analýza dat = získání koncentračního profilu



Výpočet enantiomerního nadbytku
a výtěžku (*S*)-2-brompentanu

Úkoly

1. Vypočtete koncentraci enzymu (mM) v reakční směsi

$$M_w (\text{DbjA}) = 35\,126 \text{ g/mol}$$

2. Vypočtete teoretickou koncentraci substrátu (mM) v reakční směsi na začátku reakce

$$M_w (\text{2-brompentan}) = 151.047 \text{ g/mol}$$

$$\rho = 1.223 \text{ g/ml}$$

3. Vypočtete enantiomerní nadbytek ee (%) a výtěžek (%) (*S*)-2-brompentanu z experimentálních dat