



Universidad de la República
Facultad de Química-PEDECIBA Química

**NUEVAS HERRAMIENTAS BIOCATALÍTICAS
PARA LA SÍNTESIS ASIMÉTRICA:
TRANSAMINASAS, MONOAMINOXIDASAS E
IMINOREDUCTASAS.**

César Alberto Iglesias Santos

2018

Trabajo presentado a la Facultad de Química-Universidad de la República
para aspirar al título de
Doctor en Química

Orientadores

Dra. Sonia Rodríguez

Dr. David González

Dr. Nicholas Turner

A “la Marga”, “el Iglesias”, “el Lucho”, Luciano y
Fio, a la abuela y a mi aliada incondicional Agus...

RESUMEN

La academia ha reconocido la necesidad de tener en cuenta tanto las métricas ambientales como las económicas a la hora de desarrollar procesos que, en última instancia, encontrarán aplicación en la fabricación de productos químicos. Las aminas quirales son porciones de moléculas que constituyen un grupo de "estructuras preferidas" ("privileged scaffolds") que son frecuentes en los productos naturales, fármacos, agroquímicos y otros productos químicos, y que se incluyen habitualmente en el diseño de bibliotecas para el descubrimiento de nuevas drogas. También se conoce que el 80 % de los 20 fármacos más recetados en medicinas son aminas quirales, lo que hace que estos compuestos sean valiosos componentes básicos en la industria farmacéutica. Esta tesis tiene como objetivo principal investigar nuevos biocatalizadores en síntesis para la producción de aminas quirales, utilizando tanto enzimas reportadas como nuevas enzimas aún no identificadas.

Mediante análisis de motivos aminoacídicos conservados detectados en secuencias disponibles y análisis de motivos de iminoreductasas reportados en paralelo a nuestro trabajo, se realizó una búsqueda de nuevas IRED. Como resultado, se han encontrado varias secuencias que cumplen con las características para ser potenciales enzimas reductoras de iminas. Además, se aplicó un enfoque de "genome mining and motif análisis", para la selección de potenciales secuencias R - ω -TA. A partir de 423 candidatos, la secuencia R - ω -TA de *Capronia semiimmersa* fue seleccionada, clonada y expresada en *Escherichia coli*. La enzima expresada demostró aceptar *D*-alanina así como también isopropilamina como grupo aminodonor y tener actividad sobre una variedad importante de cetonas. Además, ha sido demostrada la aplicación de una cascada quimioenzimática novedosa para la síntesis regio y estereoselectiva de un panel de pirrolidinas 2,5-disustituidas a partir de las correspondientes 1,4-dicetonas. Al mismo tiempo, se logró establecer un sistema de desracemización de aminas en una misma reacción, con cinco biocatalizadores actuando paralelamente de manera simple y práctica. De esta forma se logran obtener las aminas enantioméricamente puras a partir de una mezcla racémica o a partir de la amina con estereoquímica opuesta. Por otra parte, se logró ampliar los sistemas enzimáticos aplicados a la síntesis de aminas quirales, para ello se utilizó un nuevo tipo de transaminasa bifuncional denominada α , ω -DTAs, perteneciente a la metabolización de la putrescina. Este nuevo sistema, requiere solamente 3-5 equivalentes de aminodonor en el medio de reacción en contraste a los 50-500 equivalentes de grupo aminodonor utilizados normalmente.

Agradecimientos

Escribir a quien agradecer me llevo bastante tiempo (con alguna amenaza de por medio jeje igual no voy a dar nombreSRG). No por no saber a quien dedicar estas palabras, sino directamente porque terminar un doctorado implica a adentrarse en una etapa de cambios profundos. En estos 5 años y medio muchas pero muchas personas han contribuido a que esta tesis haya llegado a su fin, espero no olvidarme de naides...

Primero que nada, quiero agradecer a mi madre científica, Sonia "la jefa", Aceptar adentrarse a un tema desconocido es solo para valientes y si será valiente la jefa que además me acepto como estudiante. Me has dicho que ya no tenés nada para darme como científica, pero todos los días me enseñás algo. Gracias por creer en mí, por los retos, por las lecciones de vida y de laboratorio. Por tu apoyo incondicional, por aceptarme y abrir tu ventana para observarme y guiarme en el túnel, en el cual con tu capacidad asombrosa lograste aplacar y soportar muchos, pero muchos de mis defectos y elevaste a la potencia mis pocas virtudes. Por ayudar a cumplir este loco y anhelado sueño de ser Doctor a este gurí de Barros Blancos.

Además, quiero agradecer a David por aceptar ser la pata orgánica de este trabajo, por apoyar mis ideas locas de intentar hacer pseudoefedrina en un principio, por apoyar el rumbo que tuvo la tesis, por los consejos, por disponer siempre de ese minuto para sacar simples dudas orgánicas, por los titulares de lunes. Al Prof. Nicholas Turner por abrir las puertas de su mega laboratorio a un uruguayo desconocido. Por brindar apoyo y estar siempre dispuesto a volar a este país en el sur del mundo.

Estoy especialmente agradecido a toda el Área Microbiología que me han acompañado en este largo camino, por los almuerzos, los aprendizajes, por bancar la convivencia del día a día en los momentos difíciles y los no tan difíciles. En particular a él querido Lab 12, a los viejos y a los nuevos, por aguantar mis locuras, mis malos días, mi risa, mi seriedad. Por su amistad, las charlas, las cervezas. ¡¡Somos un lindísimo grupo humano, aunque Mari nos rete jeje!! (Mari B, Mil, Vale, Vicky, Gaby DR, Paola, Mariu, Susana, Martin, Sofia, Felipe, Caro, Nicol, Stefani, Luis). A los sonios del 12 y del intergalactic team Diego U, Ari y Gonza. (Gracias por bancarme como "jefe" jaja).

A las jefas del 12, María Julie, Gianna y María Inés, por sus anécdotas, sus historias, su apoyo, sus valiosos comentarios y sus grandes enseñanzas.

¡¡Gracias A los lab 14 y 17!! Silvana V, Silvana A, Ada, Mari G, Eloisa, Paula, Angie, Sole, Belén, Gaby G, Pia, Ana F, Lu, Javier, Silvana T, Lupe, Cecilia, Emi, Andrea, Inés B, Diego R.

A la vieja guardia del 12 que ya no están Lia, Mari R, Rodrigo, Diego R, Matías.

Al área bioquímica por siempre abrir sus puertas para usar los equipos y las charlas de pasillo enriquecedoras. A Agustín “Coco” Castilla por ser mi mano y musculo derecho de las frustraciones, por adorar al Peñarol del quinquenio.

A el LBB por las cervezas cocinadas, las cenas y viajes compartidos. Por los almuerzos. Por ser parte de mi crecimiento científico. Por ser así como son, una especie rara y hermosa a la vez. Por formar parte de mi circulo. Emi, Choni, Paula, Pilar, Wilson, Lari, Luis, Facu, Carlos.

Al LSO por las sonrisas cuando iba a robar solventes y sustratos, por compartir ese conocimiento orgánico en todo momento. Nia, Gonza C, Mari P, Vicky A, Viro, Bruno, Peixoto, Paola, Daniela, Seo. En particular a Nachito Carrera, por enseñarme a observarme mejor a mí mismo, por ser un guía en las sombras, por las charlas, por los consejos, por la doble ipa rompe cabezas.

A todos los que hicieron mis estadías en Manchester (mi segunda casa) más amenas. Shahed, Niky, Sarah, Anthony, Antonio, James, Fabio, Iustina, Anya, Bas, Natahlie, Michel, Antje, Rachel, Paula T, Diego, Bea, Kathy, Nick W, Lucy, Juan.

A mis amigos de toda la vida por darme para adelante siempre, Gonzalo, Alfonso, Diego, Adrián, Maxi, Pao, Day. A la banda de FQ. Guzman, Juancey , Marce, Paula, Cami, Ric, Gaby C, Pichon, Paola, Dani. A la querida banda del Garage LBDG, un lindísimo grupo humano donde nunca falta el asado de por medio. A la banda COMOVOY por los futbol.

A mis padres por bancarse 11 años de carrera sin quejarse y dando siempre para adelante, esta tesis no existiría sin su apoyo. A mi hermano el “bebote” Lucho Iglesias por la compañía, por nunca tocarme un pelo a pesar de ser un hermano pesado y que le usara toda la ropa, por darme dos sobrinos hermosos. A mi tío Carlos por su apoyo. A la abuela que hasta su ultimo día me regalo una sonrisa. A toda la flia. A mi querido km 26 de Barros Blancos.

Al fiat uno del 96!! el cual me acompañó a lo largo de toda la tesis, por momentos siendo mi amigo más fiel, a los choferes de Copsa y a la aduana del aeropuerto....

Y en el final a Agus, la rubia ojos color jade, amiga incondicional, compañera, mi hechicera en este camino. Por sus correcciones finales el sábado a las 8 de la noche y mucho más que no se podría describir con palabras....

CONTENIDO

Resumen.....	3
Agradecimientos	4
Índice de Figuras.....	11
1. Introducción.....	17
1.1. Química verde y Biocatálisis.....	18
1.2. Síntesis de aminas quirales	22
1.2.1. Quiralidad y “Aminas de oro”	22
1.2.2. Síntesis química de aminas quirales	25
1.2.3. Síntesis enzimática de aminas quirales	28
1.2.3.1. Monoaminoxidasas	29
1.2.3.2. Transaminasas	32
1.2.3.3. Iminoreductasas.....	39
1.2.4. Fábricas celulares vs cascadas enzimáticas libres de células.....	44
1.3. ¿La cuarta ola de la biocatálisis?	48
1.4. Objetivo general.....	50
1.4.1. Objetivos específicos	50
2. Resultados y Discusión	51
2.1. Búsqueda de nuevas iminoreductasas en rutas metabólicas.....	52
2.1.1. Clonado y expresión de gen <i>EasG</i> de <i>Claviceps purpurea</i>	53
2.1.1.1. Clonado de <i>EasG</i> en vector de bajo número de copias pKK223-3 y estudio de expresión	58
2.1.2. Clonado y expresión de gen <i>Irp3</i> de <i>Yersinia enterocolítica</i>	62
2.1.1.2. Expresión mediante cultivo de autoinducción 4ZY-LAC-SUC:	63
2.1.3. Identificación y clonado de nuevas iminoreductasas a partir de genomas de <i>Streptomyces</i> nativos.....	66
2.1.3.1. Alineamiento <i>R</i> -iminoreductasa vs. <i>S</i> -iminoreductasa.....	66
2.1.3.2. Búsqueda de IRED en genomas nativos.....	67
2.2. Explorando bases de datos genómicas microbianas en busca de nuevas transaminasas.	72
2.2.1. Identificación <i>in-silico</i> de nuevas <i>R</i> -transaminasas a partir de bases de datos genómicas.....	72
2.1.1. Clonado, expresión y caracterización de <i>R</i> -TA de <i>Capronia semiimmersa</i>	78

2.2.1.1. Caracterización y estudio de actividad de <i>R</i> -transaminasa.....	80
2.2.1. Clonado y expresión en pET22b+ de <i>R</i> -TA de <i>Capronia semiimera</i>	86
2.2.1.1. Determinación de parámetros cinéticos y temperatura óptima.....	92
2.2.1.2. Análisis bioinformático de <i>R</i> -TA Cap.....	93
2.2.1.3. Discusión final.....	95
2.3. Diseño racional de variantes de <i>R</i> -TA de <i>Capronia semiimera</i>	98
2.3.1. Mutaciones sitio dirigidas en cavidad P y en el <i>loop</i> de entrada del sitio activo de <i>R</i> -TA Cap.....	108
2.4. Aplicaciones en síntesis de aminas quirales.....	113
2.4.1 Cascada ω -TA / MAO para la síntesis de 2,5 pirrolidinas y 2,6 piperidinas disustituidas.....	113
2.4.1.1. Síntesis de los sustratos utilizados: 1,4 y 1,5 dicetonas.....	116
2.4.1.2. Síntesis enzimática de pirrolinas y piperinas mediante ω -TAs.....	118
2.4.1.3. Resolución Cinética Dinámica quimioenzimática MAO-N/ NH_3BH_3 con 2(<i>S</i>)-pirrolinas y 2(<i>S</i>)-piperinas.....	122
2.4.1.4. Síntesis asimétrica en un solo paso de (2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 37 a escala preparativa.....	124
2.4.2. Cascada MAO-N/ ω -TA para la desracemización de aminas quirales.....	126
2.4.3. Cascada MAO-N/ ω -TA para la desalquilación de aminas secundarias.....	130
2.5. Explorando nuevas estrategias biocatalíticas en síntesis enzimática de aminas.....	133
2.5.1. Transaminación biocatalítica con donantes de aminas de bajo costo mediada por transaminasas bifuncionales.....	133
2.5.2. <i>n</i> -Butilamina como donante alternativo de aminas para la transaminación biocatalítica estereoselectiva de cetonas.....	139
Conclusiones y perspectivas a futuro.....	144
4. Materiales y métodos.....	149
4.1. Métodos microbiológicos y moleculares.....	150
4.1.1. Medios de cultivo y reactivos.....	150
4.1.2. Vectores y cepas.....	150
4.1.2.1. Mantenimiento de cepas de <i>E. coli</i>	151
4.1.3. Técnicas moleculares.....	151
4.1.3.1. Transformación por electroporación.....	152
4.1.3.2. Transformación por Heat shock.....	153
4.1.3.3. Manipulación de ADN y clonado <i>R</i> -TA Cap e IRED EasG.....	153
4.1.3.4. Manipulación de ADN y clonado <i>R</i> -TA Cap en pET22b (+).....	153

4.1.3.5. Manipulación de ADN y subclonado IRED EasG en pKK223-3.....	154
4.1.3.6. Sobreexpresión de Iminoreductasas EasG o Irp3 en <i>E. coli</i>	154
4.1.3.7. Sobreexpresión de <i>R</i> -TA Cap en <i>E. coli</i> JM109(pKK 223-3- <i>R</i> -TA Cap).....	155
4.1.3.8. Sobreexpresión de <i>R</i> -TA Cap en <i>E. coli</i> BL21(DE3) (pET22b- <i>R</i> -TA Cap)	155
4.1.3.9. Sobreexpresión de monoaminoxidasas D5 y D9 en <i>E. coli</i>	156
4.1.3.10. Purificación de MAO-N.....	156
4.1.4. Determinación de parámetros cinéticos de <i>R</i> -TA cap.....	157
4.1.5. Análisis de muestras para expresión de proteínas.....	159
4.1.6. Análisis bioinformático para la búsqueda de nuevas <i>R</i> -TA	160
4.1.7. Elucidación de modelo estructural de <i>R</i> -TA Cap	160
4.2. Síntesis orgánica y biotransformaciones.....	161
4.2.1. Reactivos y procedimientos generales	161
4.2.2. Biotransformaciones.....	162
4.2.2.1. Ensayos de reducción de iminas con Irp3 y EasG	162
4.2.2.2. Ensayo espectrofotométrico de consumo de NADPH con enzima purificada EasG. .	162
4.2.2.3. Resolución cinética de aminas racémicas con sistemas de células enteras sobreexpresando <i>R</i> -TA de <i>Capronia semiimmersa</i>	162
4.2.2.4. Síntesis asimétrica de aminas ópticamente puras con lisado celular con <i>R</i> -TA Cap sobreexpresada, utilizando D-alanina como aminodonor	163
4.2.2.5. Síntesis asimétrica de aminas ópticamente puras con enzima purificada, utilizando D-alanina como aminodonor.....	163
4.2.2.6. Síntesis asimétrica de aminas ópticamente puras con enzima purificada, utilizando isopropilamina como aminodonor.....	163
4.2.2.7. Síntesis de aminas con transaminasas comerciales ATA 113 y ATA 117	164
4.2.2.8. Deracemizaciones a escala analítica con variantes MAO-N.....	164
4.2.2.9. Cascada one-pot transaminasa ATA113/MAO-N D9 para la síntesis de (<i>S</i>)-2- metil-5-fenilpirrolidina	165
4.2.2.10. Síntesis asimétrica de aminas ópticamente puras mediante ω TAs con cadaverina como sustrato aminodonor	165
4.2.2.11. Cascada enzimática para la síntesis de aminas utilizando ω TAs, aldehido reductasa (AlRed) y fosfito deshidrogenasa (PtxD)	166
4.2.3. Síntesis de sustratos.....	167
4.2.3.1. Síntesis de complejos de homoenolato de indio (Shen).....	167
4.2.3.2. Síntesis de 1-4 dicetonas	167
4.2.3.3. Síntesis de 1-5 dicetonas	169

4.2.3.4. Preparación de (2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-y (2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,5-pirrolidinas como estándares.	170
4.2.4. Datos de RMN de pirrolidinas y piperidinas sintetizadas enzimáticamente a escala preparativa.....	173
4.3. Métodos analíticos.....	175
5. Bibliografía.....	177
6. Anexo.....	194
6.1. Secuencias aminoacídicas y nucleotídicas.....	195
6.2. Espectros RMN y GC Capítulo 2.4	198
6.3 Publicaciones.....	220

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.2-1: Los 12 principios de la química verde. ²	19
Figura 1.2-1: Enantiómeros (+)-tramadol y (-)-tramadol.....	22
Figura 1.2-2: Ejemplos de productos naturales y fármacos que contienen aminas quirales en su estructura.	24
Figura 1.2-3: Resolución quiral de 2-fluoro-4-(pirrolidin-2-il)benzoato de metilo racémica a través de la formación de sal diastereomérica diseñada por Abbott Laboratories.....	25
Figura 1.2-4: Principios básicos de una reacción de resolución cinética. En este ejemplo, el <i>ee</i> del (S)-enantiómero aumenta con el tiempo a medida que el (R)-enantiómero se consume en reacción. Cuando se emplea racemización in-situ, el rendimiento de la reacción ya no está limitado al 50% y el proceso se convierte en una resolución cinética dinámica.....	26
Figura 1.2-5: Hidrogenación asimétrica utilizando un complejo catalizador basado en iridio en combinación con el ligando quiral Xiliphos (estructura mostrada) para la producción del agroquímico (S)-metolaclor.	27
Figura 1.2-6: Hidrogenación por transferencia asimétrica de derivados de dihidroisoquinolina catalizados por complejos de Ru(II) quiral.....	27
Figura 1.2-7: Caja de herramientas enzimática para la síntesis de aminas quirales ^{16,18,50,53-62}	28
Figura 1.2-8: Esquema general de un proceso de desracemización: la MAO-N cataliza la oxidación enantioselectiva de aminas, seguida por una reducción química no selectiva de la imina aquiral.....	30
Figura 1.2-9: Una combinación de evolución dirigida y diseño racional ha llevado al desarrollo de variantes MAO-N con actividad en un amplio espectro de sustratos.....	30

Figura 1.2-10: Reacción de desimetrización con MAO-401 para producir la imina, sustrato para la adición y reacción de Strecker y obtener de esta manera el bloque de construcción intermediario para la síntesis de boceprevir.....	31
Figura 1.2-11 : Las Transaminasas pueden ser aplicadas tanto en síntesis asimétrica a partir de la cetona(arriba) como para la resolución de aminas racémicas.	32
Figura 1.2-12: Mecanismo catalítico de ω -Transaminasas	34
Figura 1.2-13: Técnicas de desplazamiento de	36
Figura 1.2-14: Diferentes rutas para la síntesis de sitagliptina, a la izquierda se observa la ruta biocatalítica con la cual se obtiene un 99% <i>ee</i> y a la derecha la ruta quimio-catalítica que da como resultado 97% <i>ee</i> . (Extraído de C. K. Savile <i>et al.</i> ¹⁰²).....	37
Figura 1.2-15: Transaminación con transaminasa de <i>E.coli</i> utilizando cadaverina como grupo aminodonor y piruvato como grupo aceptor para la síntesis de ficuseptina:	38
Figura 1.2-16: Esquema simplificado de mecanismo de IREDs(Figura tomada de Rodriguez-Mata, M. <i>et al.</i>).....	40
Figura 1.2-17: Reacciones catalizadas por células enteras aplicada a reducción de iminas.....	41
Figura 1.2-18:	42
Figura 1.2-19: Reducción de los 2,3,3,3-trimetil-3H-indoles por (<i>S</i>)-IRED de <i>Paenibacillus lactis</i> (PLISIR). ¹²⁰	42
Figura 1.2-20: Cascada en célula entera PAL-PAD-SMO-EH-ALDH-HMO-TA	45
Figura 1.2-21: Cascada en célula entera PAL-PAD-SMO-EH-ALDH-HMO TA.....	45
Figura 1.2-22 Cascada CAR- ω TA IRED	46
Figura 1.2-23 Cascada secuencial “one pot-two step” para la síntesis de (1R,2R)-norpseudoefedrina y (1R,2R)-norefedrina.....	46
Figura 1.2-24 Cascada mediada por transaminasas en combinación con enzima derivada de vía biosintética de alcaloides norcoclaurina sintasa.....	47
Figura 2.1-1: Reducción estereoselectiva de imina a amina catalizada por una IRED utilizando NADPH como cofactor.	52
Figura 2.1-2: Mecanismo propuesto de la conversión de aldehído chanoclavina-I (1) en agroclavina (2) mediante isomerización no enzimática con la ayuda de GSH y reducción de un iminio por EasG.	53
Figura 2.1-3: Alineamiento y comparación de secuencias de proteína EasG de <i>C. purpurea</i> con iminorreductasas de <i>Streptomyces</i>	54
Figura 2.1-4: Vector de expresión pET22b(+) (EasG) diseñado para sobreexpresión de EasG en <i>E.coli</i>	54

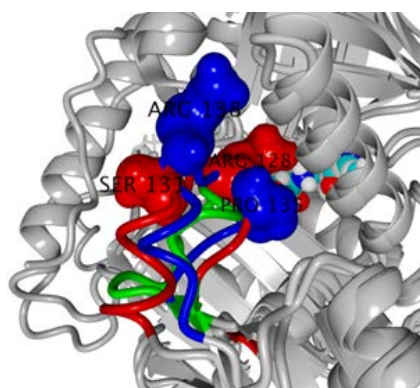
Figura 2.1-5: Análisis de la expresión proteica de <i>E.coli BL21(DE3)</i> (<i>pET22b+ EasG</i>) en LB-Amp a 26°C mediante SDS-PAGE.....	55
Figura 2.1-6: Sustratos de interes con enlaces imina utilizados en rastreo de actividad iminoreductasa de EasG.....	56
Figura 2.1-7: Biotransformaciones mediante células enteras <i>E.coli BL21 DE3</i> (<i>pET22b+EasG</i>) en buffer con glucosa con los sustratos de Fig. 2.1-6.....	56
Figura 2.1-8: EasG purificada por IMAC	57
Figura 2.1-9: Esquema de ensayo de actividad imino-reductasa mediante descenso de absorbancia por consumo de NADPH.....	57
Figura 2.1-10: Vector de expresion pKK223-3 EasG diseñado para expresión controlada por promotor <i>tac</i> de EasG en <i>E.coli</i>	58
Figura 2.1-11: Esquema método RFC. 1. PCR para síntesis de megaprimer 2. PCR de alta fidelidad para clonado de EasG en vector 3. Digestión con Dpn I 4. transformación en <i>E.coli</i> JM109.....	59
Figura 2.1-12. Gel de agarosa de productos de PCR para verificación de la inserción de EasG en pKK223-3. Se puede observar en los carriles 9-12 la presencia de una banda del tamaño esperado.	59
Figura 2.1-13: Análisis de la expresión proteica.	60
Figura 2.1-14: Sustratos utilizados para el rastreo de actividad de <i>E.coli</i> JM109 (<i>pKK 223-3 EasG</i>).....	61
Figura 2.1-15: Yersiniabactin, el sideróforo producido por <i>Yersinia sp.</i>	62
Figura 2.1-16: Análisis por SDS-Page de <i>E.coli BL21(DE3) Irp3-N Yersinia</i> y <i>E.coli BL21(DE3) Irp3-C Yersinia</i> en cultivo autoinducción.	63
Figura 2.1-17: Sustrato original de Irp3	64
Figura 2.1-18: Visión del túnel al sitio activo.....	65
Figura 2.1-19: Motivos conservados considerados para “genome mining” en genomas de <i>Streptomyces</i> nativos	66
Figura 2.1-20: Análisis de expresión de proteínas por SDS-PAGE.....	69
Figura 2.2-1: Esquema de reacción catalizado por transaminasas dependientes de PLP.	72
Figura 2.2-2 : Identificación de los principales motivos aminoacídicos que permiten predecir la función de las proteínas de PLP clase IV (Tomado de Hohne <i>et al.</i> 2010)....	73
Figura 2.2-3: Representación esquemática del proceso bioinformático aplicado para identificar R-TA	74
Figura 2.2-4: Secuencia aminoacídica de transaminasa seleccionada. En amarillo se marcan los motivos analizados.	76
Figura 2.2-5: Alineación de posible R-TA de <i>Capronia semiimmersay R-ω-transaminasas</i> previamente reportadas.....	76

Figura 2.2-6: Árbol filogenético obtenido de R-TA Cap y otras transaminasas reportadas.	77
Figura 2.2-7: Plásmido construido pKK223-3 R-TA Cap	78
Figura 2.2-8: SDS-PAGE TA de R-TA Cap expresada en <i>E.coli</i> en diferentes condiciones:	79
Figura 2.2-9 : Caracterización de especificidad de sustratos de R-TA Cap usando D-Alanina como grupo amino-donor	80
Figura 2.2-10: Docking en el sitio activo de R-TA de <i>Capronia</i> del intermediario PMP-etilbencilamina.....	82
Figura 2.2-11: Sistema de reacción TA-GDH-LDH.	83
Figura 2.2-12: Plásmido pET22b(+) R-TA Cap construido. El gen de la R-TA se acoplo a la cola de 6 histidinas para posterior purificación de la enzima.	86
Figura 2.2-13: SDS-PAGE de R-TA Cap sobrepresada y purificada por IMAC.....	87
Figura 2.2-14: Caracterización de la especificidad del sustrato de R-TA Cap usando D-alanina como aminodonor.....	88
Figura 2.2-15: Esquema con diferentes aminodonores aplicados a la síntesis asimétrica de aminas	90
Figura 2.2-16: Determinación de temperatura óptima.	92
Figura 2.2-17: Modelo de superposición estructural de R-TA Cap (rojo), <i>Arthrobacter</i> R-TA (verde) y su mutante G136F (azul). Se observa la diferencia en el bucle cercano al sitio activo.....	93
Figura 2.3-1: Esquema de sitio de unión al sustrato indicando la cavidad G y la cavidad P.	99
Figura 2.3-2: Alineamiento de R-TAs con actividad reportada y estructura cristalizada, en salmón se resaltan aminoácidos presentes en cavidad G y en verde en cavidad P. .100	
Figura 2.3-3: Alineamiento de R-TA Cap con R-TA de <i>Arthrobacter</i> y mutante ATA-117-Rd11	101
Figura 2.3-4: Modelo estructural de R-TA Cap con docking de PLP-etilbencilamina..102	
Figura 2.3-5: Sitio de unión del sustrato de R-TA Cap	102
Figura 2.3-6: Modelo de superposición estructural de R-TA Cap (rojo), Ab-RATA (verde), su mutante Ab-RATA G136F (azul) y ATA-117-RD11 (magenta).	104
Figura 2.3-7: Modelo estructural de R-TA Cap con docking de PLP-etilbencilamina en el sitio activo simplificado para mejor visualización.....	105
Figura 2.3-8: Modelo estructural de R-TA Cap con docking de PLP-etilbencilamina en el sitio activo.....	105
Figura 2.3-9: Modelo de superimposición estructural de R-TA Cap (rojo), <i>Arthrobacter</i> R-TA (verde) y su mutante G136F (azul).	107
Figura 2.3-10: Sustratos utilizados para evaluación de variantes de R-TA generadas .108	

Figura 2.3-11: Modelo R-TA: Distancia Arg128 a acido carboxílico de grupo aminodonor.	110
Figura 2.4-1: Propuesta quimioenzimática para la síntesis de 2,5-pirrolidinas y 2-6 piperidinas disustituidas mediante el empleo de S o R ω -transaminasas (TA) y monoaminooxidasa (MAO-N).....	114
Figura 2.4-2: Aminación reductiva a escala preparativa (25 mM) de la cetona 34 mediada por las TA (<i>S</i>)-ATA113 o (<i>R</i>)-ATA117, seguida de ciclización espontánea.	115
Figura 2.4-3: Síntesis a escala analítica de (2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- y (2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>) pirrolidinas mediada por MAO-N D5.....	116
Figura 2.4-4: Síntesis de 1,4-dicetonas de acuerdo a procedimiento elaborado por Shen <i>et al.</i> y rendimiento del producto aislado.	117
Figura 2.4-5: Síntesis de 1,5-dicetonas de acuerdo a procedimiento elaborado por Harrowen <i>et al.</i> ²¹⁵ y rendimiento del producto aislado.....	117
Figura 2.4-6: Dicetonas sintetizadas para estudio de la generalidad del proceso TA-MAO	117
Figura 2.4-7: Procesos desarrollados para reacciones de transaminasas que superan los desafíos de el pobre equilibrio de la reacción y la inhibición de los sustratos y productos.	118
Figura 2.4-8: Aminación reductiva mediada por ω -TAs de 1,4 y 1,5-dicetonas.....	120
Figura 2.4-9: Esquema de reacción de la resolución cinética dinámica realizada con las <i>S</i> -pirrolinas y <i>S</i> -piperinas para obtener aminas con los dos carbonos quirales de interés.	122
Figura 2.4-10: Cascada TA/MAO-N en dos pasos en mismo recipiente para la síntesis asimétrica a escala preparativa de (2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 37	125
Figura 2.4-11: Esquema de reacción implementado para la síntesis de aminas quirales partiendo de mezclas racémicas utilizando sistema “one pot-two steps” con 5 enzimas.	127
Figura 2.4-12: Cascada MAO-N/ ω -TA para la dealquilación enzimática de aminas. En el recuadro se encuentran los sustratos ensayados.	130
Figura 2.5-1: Sistemas de reacción para la utilización de TAs	133
Figura 2.5-2: Cladograma a partir de la secuencia de aminoácidos que muestra las relaciones evolutivas entre varias enzimas transaminasas.....	135
Figura 2.5-3: Ensayo de actividad utilizado para la caracterización de ω -ATAs y α,ω -DTAs.	136
Figura 2.5-4: Panel de cetonas aromáticas y alifáticas ensayadas con enzimas SpuC.	137
Figura 2.5-5: Resumen de las estrategias de desplazamiento del equilibrio de la transaminación con la transaminasa bifuncional SpuC.....	140

ABREVIATURAS

AADH Aminoacido deshidrogenasa	FAD Flavín adenín dinucleótido
ATA Amino transaminasa	FID Detector de ionización de llama
NH ₃ BH ₃ Complejo de amonia-borano	GC Cromatografía de gases
CAR Acido carboxil-reductasa	GDH Glucosa deshidrogenasa
CHAO Ciclohexilaminoxidasa	6-HDNO 6-hydroxi-D-nicotinoxidasa
DMF Dimetilformamida	HPLC Cromatografía líquida de alta eficacia
DMSO Dimetilsulfoxido	HRP Peroxidasa
dH ₂ O Agua destilada	IPTG Isopropil-β-D-1 tiogalactopiranósido
E. coli Escherichia coli	IRED Imino reductasa
ERED Enoato reductasa	KRED Ceto-reductasa
EtOAc Acetato de etilo	LB Caldo Luria Bertani
EtOH Etanol	LDH Lactato deshidrogenasa
MAO-N Monoamino oxidasa	
MeOH Metanol	
MS Espectrometria de masas	
NAD(P)H Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	
PCR Reaccion de cadena polimerasa	
TA Transaminasa	
TB Terrific broth	
ω-TA ω-transaminasa	
THF Tetrahidrofurano	



1. INTRODUCCION

Capítulo 1

1.1. Química verde y Biocatálisis

Como en muchas otras actividades humanas, la química ha visto la mayor parte de su progreso desencadenado por un constante deseo de hacer las cosas mejor. Este concepto aplicado en las industrias puede implicar ahorros significativos cuando utilizan el proceso en cuestión, o ahorrar muchos pasos en una determinada síntesis al investigador. Además, las cuestiones relacionadas con el medio ambiente y la salud también han sido un gran impulso, sumado al deseo de reducir los residuos.¹

La química verde, utiliza eficientemente las materias primas (preferiblemente renovables), disminuye los residuos y evita el uso de reactivos y disolventes tóxicos-peligrosos en la fabricación y aplicación de productos químicos (Fig. 1.1-1). La teoría en la implementación de la química verde como tal, tiene como primer objetivo la prevención primaria de la contaminación más que la remediación de desechos. En los últimos veinticinco años, este concepto se ha afianzado firmemente tanto en la industria como en el mundo académico.²⁻³

La academia ha reconocido la necesidad de tener en cuenta tanto las métricas ambientales como las económicas a la hora de desarrollar procesos que, en última instancia, encontrarán aplicación en la fabricación de productos químicos. Más allá del uso de reactivos en manera estequiométrica, la catálisis ofrece beneficios significativos, y hoy en día, se está poniendo cada vez más énfasis en las reacciones químicas mediadas por componentes de origen biológicos. La biocatálisis puede definirse como la síntesis de sustancias químicas con la ayuda de materiales biológicos como por ejemplo, enzimas en su forma purificada, como parte de un lisado celular, o células enteras, para convertir un sustrato xenobiótico en un producto.^{4,5}

La biocatálisis, es todavía descrita como un campo de ciencia emergente y la misma está cobrando un impulso sustancial en la actualidad. La razón de su crecimiento puede atribuirse a la creciente conciencia del agotamiento de los recursos naturales del medio ambiente y a la urgente necesidad de preservarlos. Esta conciencia ha llevado a las industrias a darse cuenta de sus serias contribuciones a la contaminación ambiental, y las ha hecho adaptarse lentamente para hacer que sus procesos actuales y futuros sean más verdes y limpios.

Figura 1.2-1: Los 12 principios de la química verde.²



Desde 2010, el número de patentes presentadas que tienen relación con la biocatálisis y que mencionan al menos una de las seis clases de enzimas ha aumentado exponencialmente. Sin embargo, no son sólo las empresas las que documentan su mayor interés mediante la patente de sus invenciones. En los últimos diez años, las universidades también se han mostrado muy activas patentando sus innovaciones biocatalíticas.⁶

El trabajo pionero de Zaks y Klibanov en 1984, demostró que las lipasas a altas temperaturas son más estables en disolventes orgánicos, y llevó a la conclusión de que las enzimas podían aplicarse ampliamente en la síntesis orgánica. Además, la necesidad creciente de métodos económicos para la síntesis de estructuras quirales presentes en fármacos a nivel industrial brindó la oportunidad de aplicar ampliamente métodos biocatalíticos altamente enantioselectivos. Sin embargo, en ese momento, la aplicación se vio limitada por la escasez de enzimas comerciales, que consistían principalmente en hidrolasas, como lipasas y proteasas, utilizadas en la elaboración de alimentos, bebidas y en detergentes para ropa.^{7,8}

Hace veinticinco años, era necesario adaptar el proceso a la enzima, a partir de entonces se idearon formas de adaptar la enzima al proceso, surgiendo el concepto de evolución dirigida como una forma de diseñar enzimas que exhiban parámetros de proceso específicos, tales como actividad, especificidad y estabilidad. Métodos para la generación de diversidad, como ADN *shuffling*, error prone PCR o mutagénesis por saturación fueron vanguardia.⁹⁻¹⁴ Sin embargo, en ese entonces se necesitaban desarrollos significativos en métodos de rastreo para el análisis de las bibliotecas, y era necesario desarrollar la capacidad de detectar una amplia gama de diferentes transformaciones químicas.

Hasta el día de hoy el método de selección o rastreo de las bibliotecas es el cuello de botella de la evolución dirigida. En épocas más recientes, varios grupos han abordado la cuestión crucial de la eficacia dedicando la investigación al desarrollo de métodos que garanticen bibliotecas de mutantes de mayor calidad, ya que son más pequeñas y requieren menos análisis.^{9,15}

Hoy en día, es posible diseñar enzimas para adaptarlas a nuestras propias necesidades específicas, es decir, enzimas elaboradas mediante análisis y diseño previo mediante el uso de técnicas como evolución dirigida.¹⁶⁻¹⁷ Una aproximación diferente para la búsqueda de variantes enzimáticas aptas para un proceso dado es la búsqueda a partir de la naturaleza. La evolución natural ha generado un sin número de variantes enzimáticas de las cuales aún conocemos muy poco. Basta con saber que estudios indican que existen más de 1 billón (10^{12}) de especies de bacterias, archaea y hongos microscópicos y que sólo un número pequeño de todas las especies microbianas han sido descritas, para visualizar el potencial biocatalítico allí existente.¹⁸⁻¹⁹

Gracias a los avances en la secuenciación de ADN, en las últimas dos décadas, se han secuenciado más de 20000 genomas bacterianos y fúngicos, disponibles en el dominio público. Actualmente, un gen de interés puede identificarse *in silico* mediante “genome mining” de dichas bases de datos. El gen en el plazo de una semana puede ser sintetizado, posteriormente clonado en un microorganismo huésped; y, mediado el escalado y optimización de la producción, la enzima que codifica este gen puede ser producida a escala industrial a precios aceptables.²⁰

Además, su almacenamiento y estabilidad operativa pueden optimizarse mediante inmovilización, lo que permite una recuperación y mantenimiento rentables. Dado que las enzimas pueden a menudo catalizar reacciones que de otro modo serían difíciles de llevar a cabo por medios químicos tradicionales, la biocatálisis se ha convertido en un atractivo método industrial y se ha integrado en los sistemas industriales de síntesis orgánica convencionales, particularmente para la síntesis enantioselectiva de intermediarios farmacéuticos activos (APIs).

La biocatálisis se ha convertido en una tecnología clave para la síntesis de API en la industria farmacéutica en lo que se denomina "Pharma green technologies". Sin embargo, la biocatálisis de cierta manera también impone condiciones de reacción que afectan al medio ambiente, como el uso de una gran cantidad de agua como disolvente y una baja carga de sustrato, que deben tenerse en cuenta para la evaluación del proceso.^{4,7} Recientemente, Turner y O'Reilly propusieron directrices para la retrosíntesis biocatalítica y las reglas para identificar posibles síntesis enzimáticas de la molécula diana.^{21,22}

1.2. Síntesis de aminas quirales

1.2.1. Quiralidad y “Aminas de oro”

En el año 2000, el 35 % de todos los intermediarios farmacéuticos eran quirales, y las ventas de medicamentos ópticamente puros alcanzaban los 10.000 millones de dólares anuales.²³ Se espera que el mercado mundial de enzimas industriales alcance casi 7.100 millones de dólares para 2018.

El mundo ha evolucionado para ajustarse al fenómeno de las moléculas quirales; en la naturaleza, los componentes esenciales de la vida existen predominantemente en forma de un único enantiómero, en particular los L-aminoácidos y los *D*-azúcares. A medida que progresaba la comprensión de la bioquímica y la farmacología, se hizo evidente que, en los sistemas biológicos, enantiómeros opuestos de una misma molécula pueden tener efectos profundamente diferentes en el entorno fisiológico, debido a que en el punto receptor la quiralidad afecta al reconocimiento y la unión de estas moléculas.

Un ejemplo de este efecto puede observarse con el tramadol, un analgésico compuesto por dos enantiómeros que contribuyen a su actividad a través de diferentes mecanismos (Fig. 1.2-1). (+)-tramadol es un agonista del receptor opiáceo e inhibe la recaptación del neurotransmisor serotonina, (-)-tramadol inhibe la recaptación de norepinefrina, aumentando los efectos inhibitorios sobre la transmisión del dolor dentro de la médula espinal. La droga se vende como el racemato, ya que los dos enantiómeros contribuyen a un efecto analgésico sinérgico.²⁴

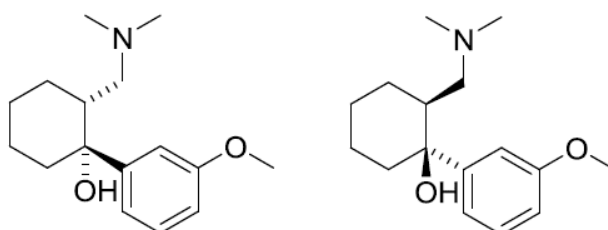


Figura 1.2-1: Enantiómeros (+)-tramadol y (-)-tramadol

Sin embargo, en la mayoría de los fármacos no se observa esta acción complementaria, sino que mientras un isómero es activo, el otro no lo es o tiene una actividad biológica no deseada. El ejemplo más ilustrativo de la gran variedad de efectos que pueden tener dos enantiómeros, se puede constatar en el caso de la Talidomida, un fármaco desarrollado y distribuido por la compañía farmacéutica alemana Grünenthal. El mismo fue prescrito a mujeres embarazadas para tratar las náuseas matutinas.

Se retiró poco después de su lanzamiento al público, luego de que la actividad teratogénica del (*S*)-enantiómero del compuesto se hizo evidente.²⁵

Los efectos adversos de drogas administradas como racematos han exigido tanto a la industria farmacéutica como a los reguladores que garanticen la seguridad de los pacientes. Actualmente, existen requisitos reglamentarios contenidos en la "Declaración de política para el desarrollo de nuevos fármacos estereoisoméricos de 1992 por parte de la FDA y la Unión Europea". Entre ellos se incluye el requisito de que los componentes farmacéuticos activos que entran en etapa de ensayos clínicos se presenten como formulaciones que contienen sólo el enantiómero activo.²⁶ De hecho, algunos medicamentos que antes se comercializaban como mezclas racémicas han sido relanzados bajo una marca diferente: ésta se denomina "Chiral switch" una nueva estrategia muy popular en el sector farmacéutico.²⁷

Las aminas quirales son porciones de moléculas que constituyen un grupo de "estructuras preferidas" ("privileged scaffolds") que son frecuentes en los productos naturales, fármacos, agroquímicos y otros productos químicos²⁸, y que se incluyen habitualmente en el diseño de bibliotecas para el descubrimiento de nuevas drogas. Aminas y aminoácidos son parte esencial de todas las proteínas y ácidos nucleicos, pero a su vez también son parte de muchos compuestos bio-activos. Algunas aminas son importantes neurotransmisores (ej. adrenalina), otras como los alcaloides muestran enorme variedad de estructuras y funciones biológicas.

La figura 1.1-2 ilustra algunos ejemplos de aminas en la naturaleza y medicamentos actualmente en el mercado que presentan aminas quirales como una parte integral dentro de su estructura. Se estima que el 40% de los productos farmacéuticos actuales contienen una amina quiral. A su vez, el 75% de los fármacos y candidatos a fármacos en un amplio rango de áreas terapéuticas (antihipertensivos, antibióticos, antivirales, antidepresivos, antidiabéticos, tratamientos para la enfermedad de Parkinson, antihistamínicos y tratamientos para la incontinencia urinaria) contienen en su estructura una amina quiral. También se conoce que el 80 % de los 20 fármacos más recetados en medicinas son aminas quirales, lo que hace que estos compuestos sean valiosos componentes básicos en la industria farmacéutica.^{29,22,30,31,32}

Las aminas quirales son un ejemplo de compuestos cuya producción se ha beneficiado del uso de la biocatálisis. El desarrollo de métodos catalíticos rentables y sostenibles para la producción de aminas quirales enantioméricamente puras es un desafío clave que enfrenta la industria farmacéutica y la de química fina. Por lo tanto existe una creciente demanda de métodos sintéticos ampliamente aplicables que aporten la amina deseada con un alto rendimiento y exceso enantiomérico (*ee*).^{7,33} En vista de la importancia de las aminas quirales como sintones para la obtención de fármacos, se está realizando un esfuerzo considerable para su preparación.³⁴

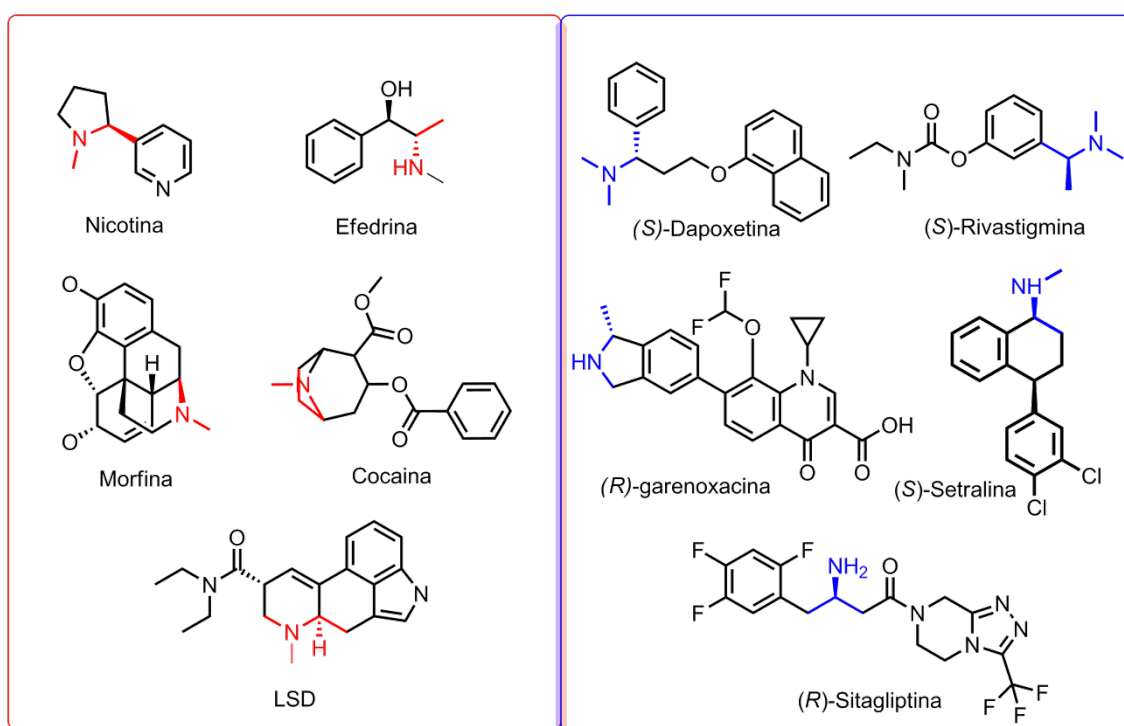


Figura 1.2-2: Ejemplos de productos naturales y fármacos que contienen aminas quirales en su estructura.

1.2.2. Síntesis química de aminas quirales

Hay dos estrategias principales empleadas para obtener aminas quirales en forma de un solo enantiómero: resolución de los dos enantiómeros o síntesis asimétrica directa.

Por ejemplo, la formación de sales diastereoméricas para resolución clásica representa una técnica utilizada para separar los enantiómeros. A diferencia de los enantiómeros, los diastereómeros tienen diferentes propiedades fisicoquímicas y por lo tanto pueden separarse utilizando técnicas de cristalización. Abbott Laboratories, informó sobre la resolución quiral de 2-fluoro-4-(pirrolidin-2-il) benzoato de metilo racémica a través de la formación de sal diastereomérica. Se encontró que la cristalización de una mezcla racémica de la base con ácido tartárico conducía a una sal de 88 % *ee* en la cual el diastereómero indeseado se incorporaba dentro de los cristales como una solución sólida. Para evitar este efecto, se desarrolló una eficiente resolución de dos cristalizaciones. El grueso del enantiómero indeseado se elimina en la primera cristalización, de modo que la segunda cristalización puede dar lugar a un material de pureza óptica aceptable³⁵

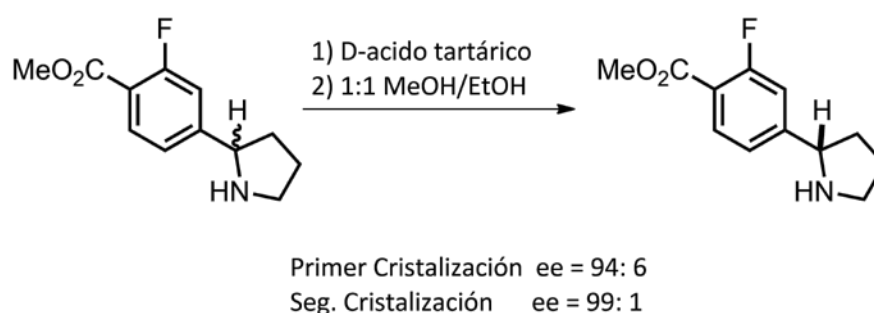


Figura 1.2-3: Resolución quiral de 2-fluoro-4-(pirrolidin-2-il)benzoato de metilo racémica a través de la formación de sal diastereomérica diseñada por Abbott Laboratories.

Un enfoque opuesto para la resolución de enantiómeros es la resolución cinética. En este caso, los dos enantiómeros reaccionan con otro reactivo o catalizador a velocidades diferentes. El método se basa en que uno de los enantiómeros tiene una velocidad de reacción significativamente mayor que el otro; por lo tanto, el %*ee* del enantiómero menos reactivo aumenta a medida que el enantiómero más reactivo se consume en la reacción (Fig. 1.2-4). Con el fin de reducir los residuos, se puede emplear un proceso de reciclado/racemización en el enantiómero no deseado, de forma de reinsertarlo en la reacción para que se produzca la resolución. Con esto, el rendimiento del producto podría teóricamente alcanzar el 100% con un 100% *ee* utilizando una estrategia de resolución cinética dinámica. Sin embargo, la racemización también sería

una reacción competidora en este sentido, y debe tener una tasa de reacción más rápida (Fig. 1.2-4). Esto fue usado con gran éxito en la síntesis de duloxetina de Eli Lilly.³⁶

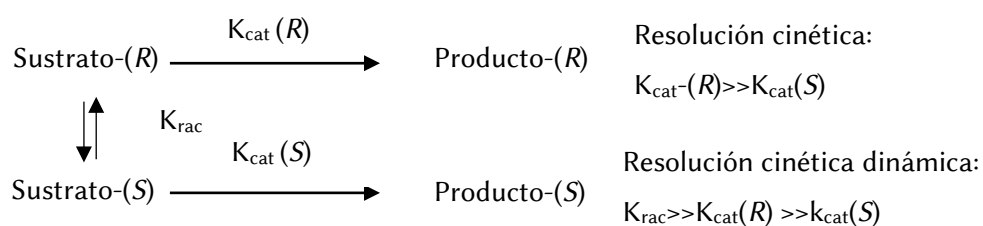


Figura 1.2-4: Principios básicos de una reacción de resolución cinética. En este ejemplo, el *ee* del (S)-enantiómero aumenta con el tiempo a medida que el (R)-enantiómero se consume en reacción. Cuando se emplea racemización *in-situ*, el rendimiento de la reacción ya no está limitado al 50% y el proceso se convierte en una resolución cinética dinámica.

Una desventaja de la resolución cinética o de la formación de sal diastereomérica es que el rendimiento teórico se limita al 50%, ya que el enantiómero no deseado se deja como producto de desecho, salvo en el caso de utilización de resolución cinética dinámica como ya se demostró en la Fig. 1.2-4. En el caso de procesos a gran escala, esto podría dar lugar a residuos significativos si no se vuelve a utilizar el enantiómero no deseado, lo que daría lugar a procesos de menor economía atómica. A pesar de ello, a menudo siguen siendo los métodos de elección en la industria para la producción de moléculas quirales.^{36,37}

Por otro lado, las rutas sintéticas asimétricas son generalmente las preferidas ya que es alcanzable hasta el 100% del rendimiento teórico. Por ejemplo, los metales de transición son catalizadores que se emplean en la reducción asimétrica de iminas y enaminas, este enfoque se ha utilizado ampliamente en la industria.

Un catalizador quiral conocido para la hidrogenación asimétrica es un complejo de iridio, derivado de cloro(cicloocta-1,5-dieno)iridio(I) ($[\text{Ir}(\text{cod})\text{Cl}]_2$) junto al ligando quiral Xyliphos (Fig.1.2-5).^{38,39} Alternativamente, la hidrogenación de acil-enaminas con ligandos de fósforo quiral y la adición de carbaniones de sulfonilo, sulfínilo y fosforilo a las iminas se ha utilizado para producir aminas quirales enantioenriquecidas.^{40,41} En otro ejemplo, Feaster demostró el uso de un catalizador de rodio con un ligando de 1,2-bis-(fosfolano)benceno (Et-DuPHOS).⁴²

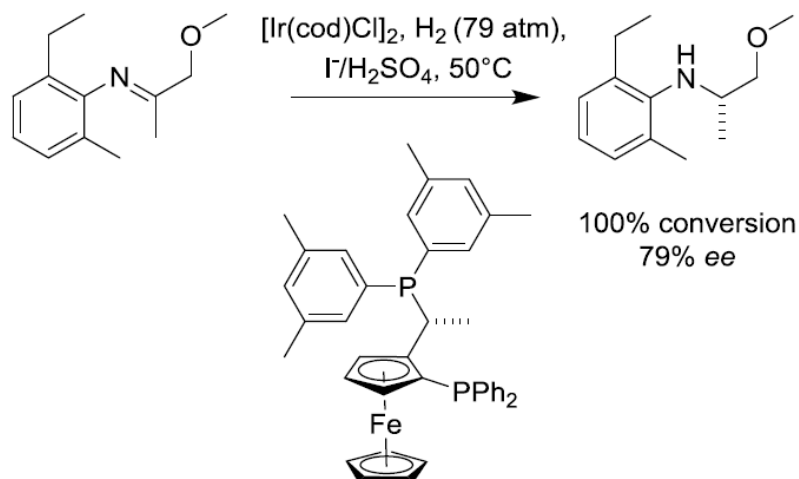


Figura 1.2-5: Hidrogenación asimétrica utilizando un complejo catalizador basado en iridio en combinación con el ligando quiral Xyliphos (estructura mostrada) para la producción del agroquímico (S)-metolactol.

El científico Ryoji Noyori, galardonado con el premio Nobel en Química en 2001, utilizó un catalizador de rutenio quiral para hidrogenar varias iminas, incluyendo derivados sustituidos de 6,7-dimetoxi-3,4-dihidroisoquinolina, dihidro- β -carbolinas e incluso iminas acíclicas, para proporcionar acceso a las aminas correspondientes hasta con un 97% de *ee* (Fig. 1.2-6).⁴³

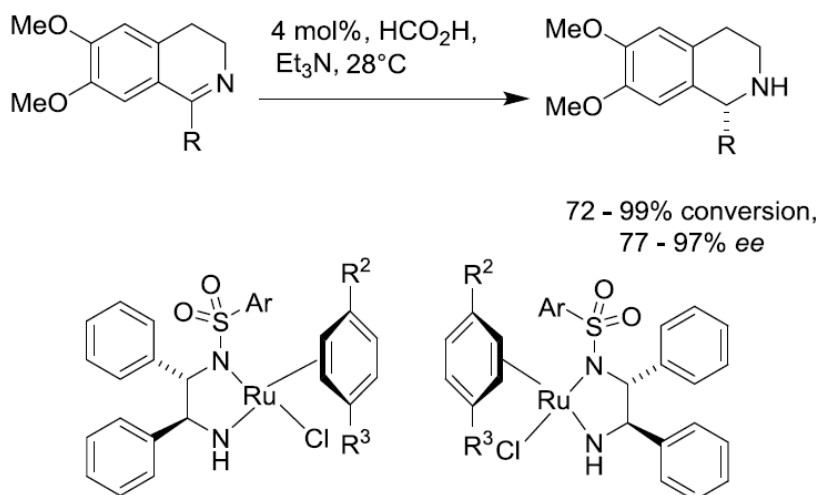


Figura 1.2-6: Hidrogenación por transferencia asimétrica de derivados de dihidroisoquinolina catalizados por complejos de Ru(II) quiral.

En resumen, se observa que estos son métodos que aportan muy buena conversión y exceso enantiomérico; no obstante, el uso de metales pesados como catalizadores resulta en un problema ambiental a ser tenido en cuenta.

1.2.3. Síntesis enzimática de aminas quirales

Por otro lado, las enzimas han jugado un papel cada vez más importante en la síntesis de aminas enantioméricamente puras. Impulsados por la necesidad de desarrollar procesos que sean económica y ambientalmente sostenibles, la industria química recurrirá cada vez más a materias primas renovables y a procesos basados en la biotecnología para la fabricación de una gama creciente de productos. El uso de enzimas para la síntesis de compuestos de importancia industrial es cada vez más popular como una alternativa a la metalo- y órgano-catálisis tradicional.⁴⁴

En la última década se ha visto el desarrollo de versiones biocatalíticas a muchas metodologías químicas sintéticas y en particular existe una creciente explotación de las rutas enzimáticas hacia la síntesis de aminas quirales.

En la actualidad, las rutas biocatalíticas hacia la síntesis de aminas quirales incluyen: resolución cinética mediante lipasas⁴⁵ bien establecidas en este área, desracemización de aminas mediante monoamino oxidasas (MAO)^{46,47}, síntesis asimétrica mediante transaminasas (TA)^{31,48}. Otras rutas biocatalíticas sintéticas en desarrollo para la producción de aminas quirales incluyen el uso de amonio deshidrogenasas⁴⁹, fenilalanina amonio liasas (PALs)⁵⁰, imino reductasas (IREDs)⁵¹ y un tipo de enzima muy reciente denominada aminasa reductiva⁵². La gama de herramientas disponibles para la síntesis de aminas quirales continúa expandiéndose a medida que se describen más biocatalizadores(Fig. 1.2-7).^{16,18,50,53-59}

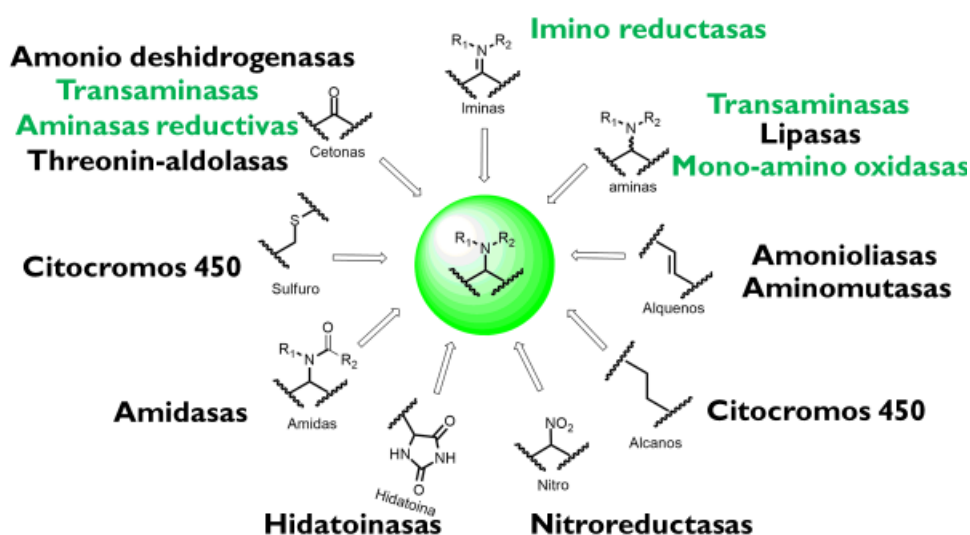


Figura 1.2-7: Caja de herramientas enzimática para la síntesis de aminas quirales^{16,18,50,53-62}

1.2.3.1. Monoaminoxidasas

Las amino oxidasas han sido utilizadas en la resolución de racematos de aminas, aunque han sido poco exploradas. Estas enzimas oxidan el enlace C-N, y están distribuidas en diferentes clases. Casi todas las enzimas conocidas pertenecen al grupo de las oxidasas dependientes de flavina (BRENDA 1.4.3.x) incluyendo las L-aminoxidasas, D-amino-oxidasas, ciclohexilamino-oxidasa (CHAO) y monoamino-oxidasas (MAO). Algunos ejemplos relevantes son la L-lisina-oxidasa utilizada para la producción de aminoácidos cíclicos no naturales; una ciclohexilamino-oxidasa (CHAO) de *Brevibacterium oxidans* recientemente caracterizada, utilizada en la síntesis de alquilaminas secundarias y aminas alicíclicas; y variantes de la CHAO de *B. oxidans*, con aplicación en la oxidación de aminas cíclicas quirales como la 2-metil 1,2,3,4-tetrahydroquinolina.⁶³⁻⁶⁷

A principios del 2000, el grupo del Prof. Turner comenzó a utilizar la monoamino oxidasa de *Aspergillus niger* (MAO-N) en biotransformaciones como una buena alternativa a las transaminasas para obtener aminas quirales. La mayor parte del trabajo realizado hasta la fecha en los sistemas de desracemización mediante este tipo de enzimas emplea la monoaminoxidasa (MAO-N) de *Aspergillus niger*.⁶⁸

En el transcurso de la última década, una combinación de evolución dirigida, diseño racional y métodos de selección de alto rendimiento fueron utilizados por este grupo para desarrollar una "caja de herramientas" de variantes de la MAO-N que muestran actividad complementaria y que son capaces de mediar la síntesis de aminas quirales enantioméricamente puras con distintas estructuras. En particular, después de encontrar nuevos mutantes con mayor actividad y selectividad, se desarrolló el proceso de desracemización: una biotransformación en la que MAO-N cataliza la oxidación enantioselectiva de aminas primarias, secundarias y terciarias seguido por una reducción química no selectiva de la imina aquiral permitiendo así una resolución cinética dinámica que acumula el producto deseado (Fig. 1.2-8).^{47,69,70,71}

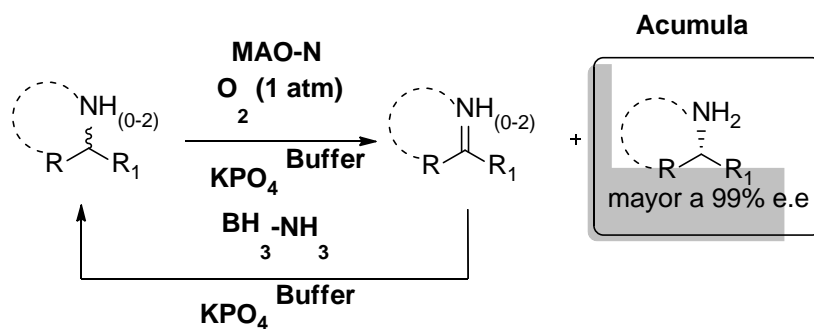


Figura 1.2-8: Esquema general de un proceso de desracemización: la MAO-N cataliza la oxidación enantioselectiva de aminas, seguida por una reducción química no selectiva de la imina aquiral.

Varias rondas de evolución dirigida llevaron a la identificación de un mutante MAO-D5 (N336S / I246M / M348L/T384N/D385S) con aumento de la actividad en comparación con el *wild-type*. Esta variante mostró una buena actividad hacia aminas terciarias. El mutante D5 fue utilizado para la desracemización de Crispina A, un alcaloide que se ha demostrado que posee cierta actividad contra el cáncer, dando (*R*)-crispina con un 97% de exceso enantiomérico. Este mutante MAO-N fue cristalizado con el fin de comprender mejor la relación estructura- actividad de la enzima y la planificación de nuevas rondas de mutagénesis usando un enfoque de diseño racional que llevó a la creación del mutante MAO-D9 que contiene cuatro mutaciones adicionales en el sitio activo de la enzima (F210L, L213T, M242Q, M246T) y presenta gran actividad con aminas cíclicas de gran tamaño.⁴⁷ En el 2013 se reportarían los mutantes D10 y D11 aplicados en reacciones de desracemización para la síntesis asimétrica de los principios activos farmacéuticos genéricos Solifenacina y Levocetirizina, así como de los productos naturales (*R*)-coniina, (*R*)-eleagnina y (*R*)-leptaflorina. (Fig. 1.2-9)^{47,68,72,73}

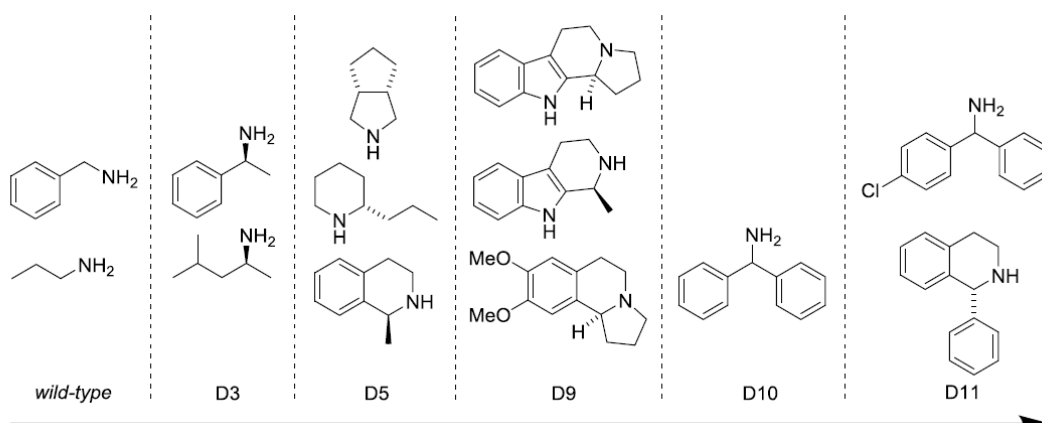


Figura 1.2-9: Una combinación de evolución dirigida y diseño racional ha llevado al desarrollo de variantes MAO-N con actividad en un amplio espectro de sustratos.

En estos últimos años en un trabajo independiente, investigadores de Codexis demostraron la aplicabilidad de MAO a escala industrial. Utilizando recombinación por PCR de genes de monoamino oxidasa de *A. niger* y *A. oryzae*, y rondas consecutivas de evolución, han logrado obtener un nuevo mutante (MAO-401) con un aumento de termostabilidad y actividad hacia pirrolidinas bicíclicas. Este nuevo mutante se utilizó para la desimetrización de 6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano para dar la imina quiral, sustrato para la adición y reacción de Strecker para posteriormente obtener el éster metílico, intermedio importante para terminar la síntesis de boceprevir (Fig. 1.2-10).⁷⁴ De manera similar, esta desimetrización también se aplicó con éxito en la síntesis de una pirrolidina quiral disustituída del inhibidor de proteasa conocido como Telaprevir.⁷⁵

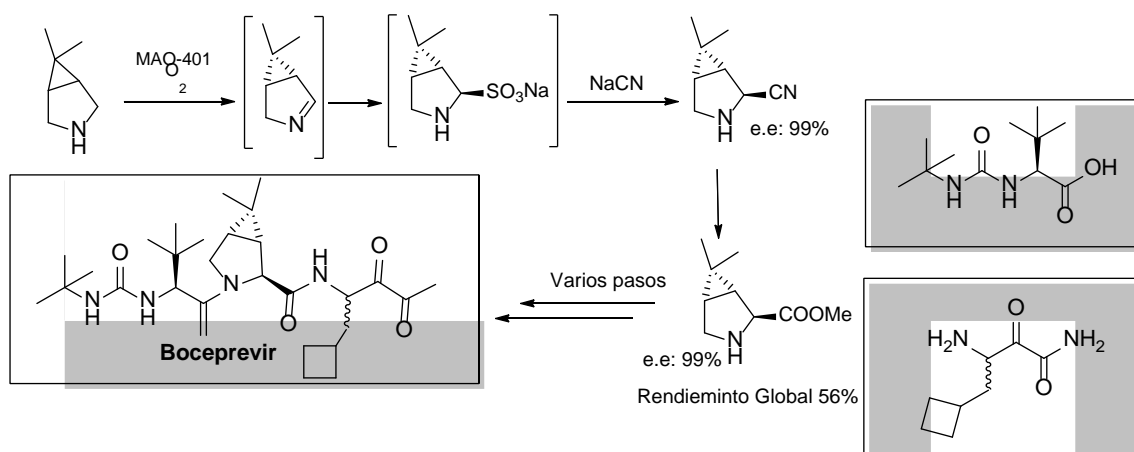


Figura 1.2-10: Reacción de desimetrización con MAO-401 para producir la imina, sustrato para la adición y reacción de Strecker y obtener de esta manera el bloque de construcción intermedio para la síntesis de boceprevir.

1.2.3.2. Transaminasas

Las transaminasas (TA) son una clase de enzimas dependientes de piridoxal-5'-fosfato (PLP), que catalizan la transferencia de un grupo amino entre una molécula llamada aminodonor y un grupo llamado aminoaceptor (un compuesto que contiene un grupo funcional carbonilo).

Las enzimas dependientes del piridoxal-5'-fosfato (PLP) están ampliamente diseminadas en los procesos celulares y se asocian con vías biosintéticas en el metabolismo de moléculas con grupos amino. Desde la participación en la biosíntesis de aminoácidos hasta la participación en la biosíntesis o degradación de aminoazúcares, poliaminas y alcaloides, las enzimas dependientes del PLP se caracterizan por la variedad de reacciones químicas que catalizan. Estas enzimas pueden actuar sobre cetonas alifáticas y pueden catalizar la aminación reductiva de grupos carbonilos para generar aminas quirales primarias, a expensas de un aminodonor como por ejemplo alanina o isopropilamina. Las transaminasas pueden ser utilizadas tanto para la síntesis asimétrica de aminas como para la resolución cinética de mezcla racémicas (Fig. 1.1-11).

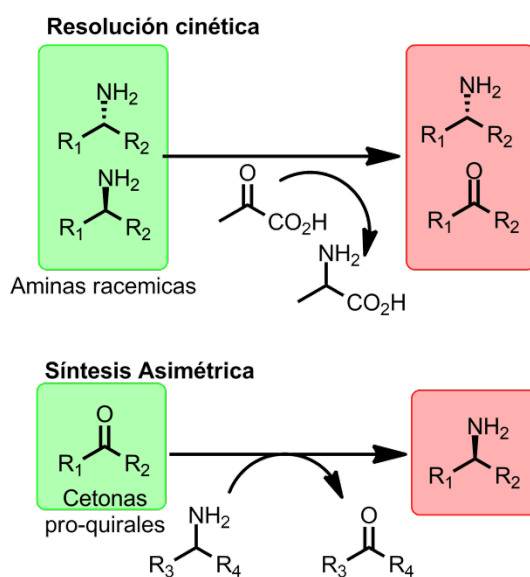


Figura 1.2-11 : Las Transaminasas pueden ser aplicadas tanto para la resolución de aminas racémicas (arriba) como en síntesis asimétrica a partir de la cetona (abajo)

1.2.3.2.1. Mecanismo catalítico de ω -transaminasas

Basándose en la posición del grupo amino transferido, las transaminasas han sido agrupadas en α -TAs (de escasa utilidad en síntesis dado que requieren que el grupo amino o carbonilo se encuentre en posición alfa a un grupo carboxílico) y ω -TAs (en las cuales el grupo amino o carbonilo no tienen porque encontrarse en posición alfa a un grupo carboxílico). Los primeros intentos de establecer una clasificación de las enzimas dependientes del PLP fueron reportados por Grishin *et al.*⁷⁶ y refinados posteriormente por Perracchi *et al.*⁷⁷ Clasificando las transaminasas en función de la similitud de secuencia, estructura, agrupándolas en seis subgrupos o clases.^{78,79}

El mecanismo de acción (Fig. 1.2-12) de estas enzimas se basa en una transferencia desde el piridoxal 5'-fosfato (PLP) a través de un mecanismo de ping-pong. En primer lugar, se forma una base de Schiff interna entre un residuo de lisina en el sitio activo (a través de su grupo ϵ -amino) y el grupo aldehído del PLP unido a la enzima (aldimina interna). Esta unión es luego reemplazada por una base de Schiff entre el donante de amino y el PLP, formando una aldimina externa. El residuo de lisina que es liberado por este proceso sirve como base para el siguiente paso y cataliza un cambio de hidrógeno, la abstracción del protón α desde la aldimina externa y la reprotonación a la imina de la coenzima. La reorganización interna procede a través de un intermediario quinoide que produce una ketimina. Este intermediario es estabilizado por una tirosina y una cadena lateral carboxilato de aspartato o glutamato que forma un puente con el piridinitrógeno del cofactor, esto causa una estabilización de la carga positiva en el anillo aromático. La hidrólisis del intermediario de ketimina produce piridoxamina 5'-fosfato (PMP) y libera el producto cetona. La formación de un complejo Michaelis entre el PMP unido a la enzima y un amino-aceptor diferente inicia la reacción inversa, y regenera el PLP unido a la enzima.

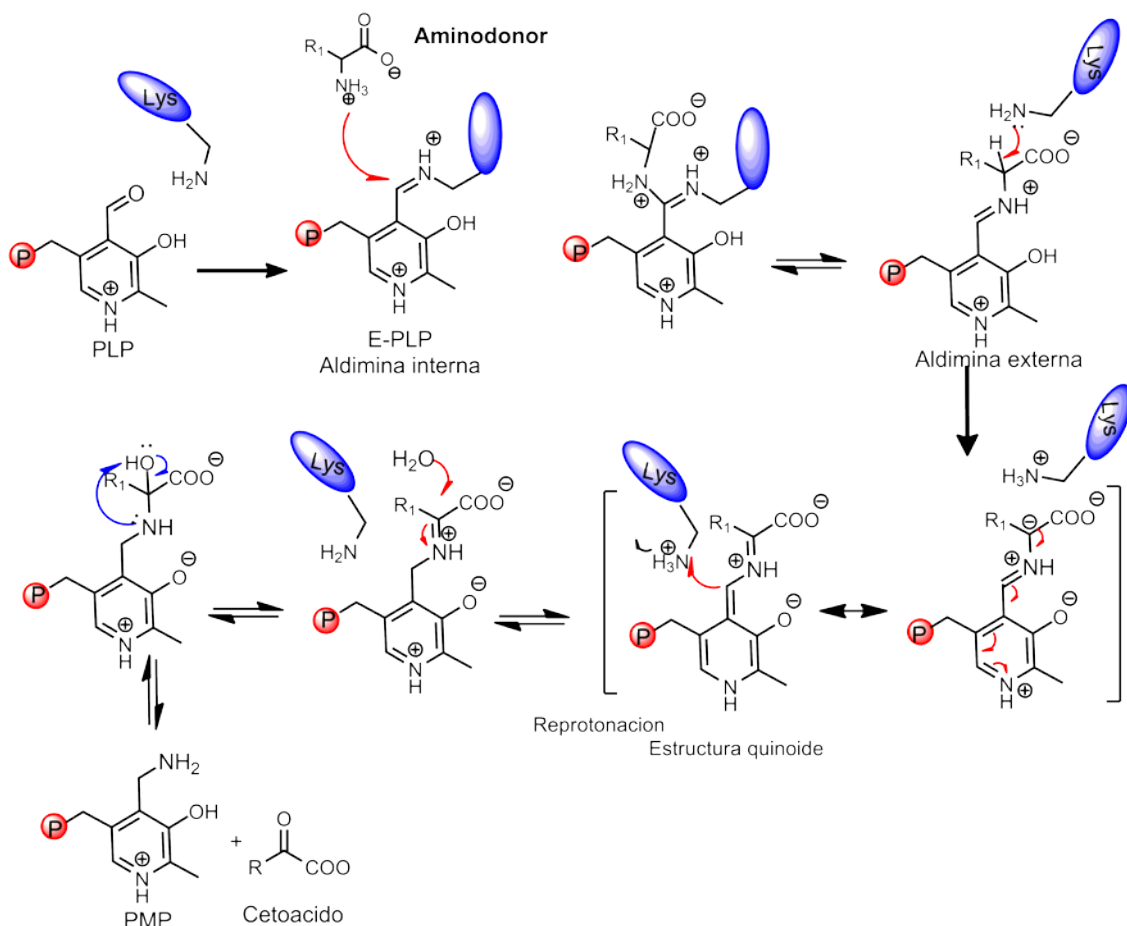


Figura 1.2-12: Mecanismo catalítico de α o ω -Transaminasas con alanina como grupo amino donador

1.2.3.2.2. Desplazando el equilibrio: síntesis asimétrica enzimática quiral en el siglo XXI

Las transaminasas se han utilizado durante mucho tiempo para la producción de aminoácidos, y un objetivo principal ha sido extender su uso a la producción de aminas simples. La primera transaminasa reportada capaz de transferir una amina a un sustrato sin un grupo ácido carboxílico fue una diamina-cetoglutarato transaminasa de *E.coli* (α,ω TA) identificada en 1964.^{80,81,82}

Sin embargo, a pesar de su gran potencial, no fue hasta principios de la década de 1990 que las transaminasas se convirtieron en una opción industrial viable para la síntesis de aminas quirales. Esto ocurrió principalmente debido a tres grandes limitaciones: inhibición por producto, aplicabilidad limitada sólo a la síntesis de aminas primarias y restringida especificidad de sustrato. Un obstáculo para la aplicación del TA en la síntesis de aminas quirales es la naturaleza reversible de la reacción enzimática.^{83,84}

Shin y Kim realizaron varias investigaciones desafiando estas limitaciones a principios de la década del 2000. Usando una (*S*)- ω -transaminasa aislada de *Vibrio fluvialis*, demostraron la síntesis de aminas alifáticas y aromáticas quirales usando *L*-alanina como molécula amino-donor. Se observó inhibición de la transaminasa por parte del piruvato producido, así como un equilibrio extremadamente pobre. Incluso con un gran exceso de sustrato amino-donor, las reacciones lograban una conversión < 2 %. La remoción continua *in situ* del piruvato a través de la reducción usando lactato deshidrogenasa (LDH) aumentó los rendimientos de la reacción a > 90%, sin embargo, inhibición por producto a escalas preparativas provocaba una baja productividad de la reacción.⁸⁵⁻⁸⁷ Años más tarde la enzima glucosa deshidrogenasa (GDH) se acopló al sistema y se utilizó para regenerar el cofactor NADH requerido por la LDH.⁸⁴

Los amino-donores más comunes empleados son la alanina y la isopropilamina, que producen piruvato y la acetona respectivamente. Aunque existen métodos bien establecidos para la eliminación de piruvato, se necesitan equivalentes altos de alanina en combinación con estrategias complejas y costosas de eliminación/reciclado de coproductos. La isopropilamina también debe emplearse en altas concentraciones y el coproducto acetona debe eliminarse *in situ* para lograr buenas conversiones con sustratos difíciles, lo que a menudo requiere el uso de enzimas diseñadas por ingeniería genética que puedan tolerar altas concentraciones de sustratos.⁸⁸ Como ninguna de estas estrategias puede considerarse ideal, ha habido una serie de estudios centrados en el desarrollo de una metodología novedosa para desplazar el equilibrio de reacción de forma efectiva.^{79,89}

El sistema de tres enzimas (TA-GDH-LDH) fue utilizado con éxito para la conversión de varias cetonas a sus correspondientes aminas quirales y en la síntesis quimio-enzimática de (*S*)-Rivastigmina.^{90,91} Enfoques similares emplearon una piruvato descarboxilasa (Fig. 1.2-13b).⁹²

Han y Shin diseñaron un cambio de equilibrio metabólico que utiliza el metabolismo nativo de la célula, cepas de *E. coli* hospedando el gen ω -TA de *Ochrobactrum anthropi*, fueron empleadas en medios sin fuente de carbono para la síntesis de (*S*)-*sec*-butilamina en una escala de 50 mM, con sólo 2 equiv de *L*-alanina, con una conversión del 75%.⁹³ El equilibrio es desplazado por el consumo de piruvato por parte de la célula (Fig. 1.2-13c).⁹⁴

Kroutil y su grupo de trabajo han descrito más recientemente un sistema de aminación reductiva de cetonas diferente, utilizando el amonio como amino-donor y en el que los cofactores son regenerados por oxidación de glucosa o formiato. De esta manera, desarrollaron una distinguida cascada enzimática para producir aminas

quirales puras en la que la L-alanina se utiliza como aminodonor de la cetona objetivo en una cantidad catalítica. La alanina se regenera a partir del piruvato resultante mediante el empleo de una L-aminoácido deshidrogenasa (L-AADH) la cual utiliza el amonio, el cual es clave del paso regenerativo, anulando así la necesidad de cantidades estequiométricas de aminodonor en el sistema inicial de reacción (Fig. 1.2-13e).^{95,96}

Este grupo además ha reportado la síntesis de ambos enantiómeros de un conjunto de aminas por células enteras de *E. coli* recombinantes expresando diferentes ω -transaminasas (Fig. 1.2-13f). La combinación de aminación reductiva para obtener un enantiómero, con resolución cinética para la obtención del opuesto, aporta una herramienta para acceder a ambos enantiómeros de un mismo compuesto.^{97,98} Otras enzimas con la misma estereoselectividad han sido reportadas y profundamente caracterizadas, como ser la ω -transaminasa de *Chromobacterium violaceum*.⁹⁹

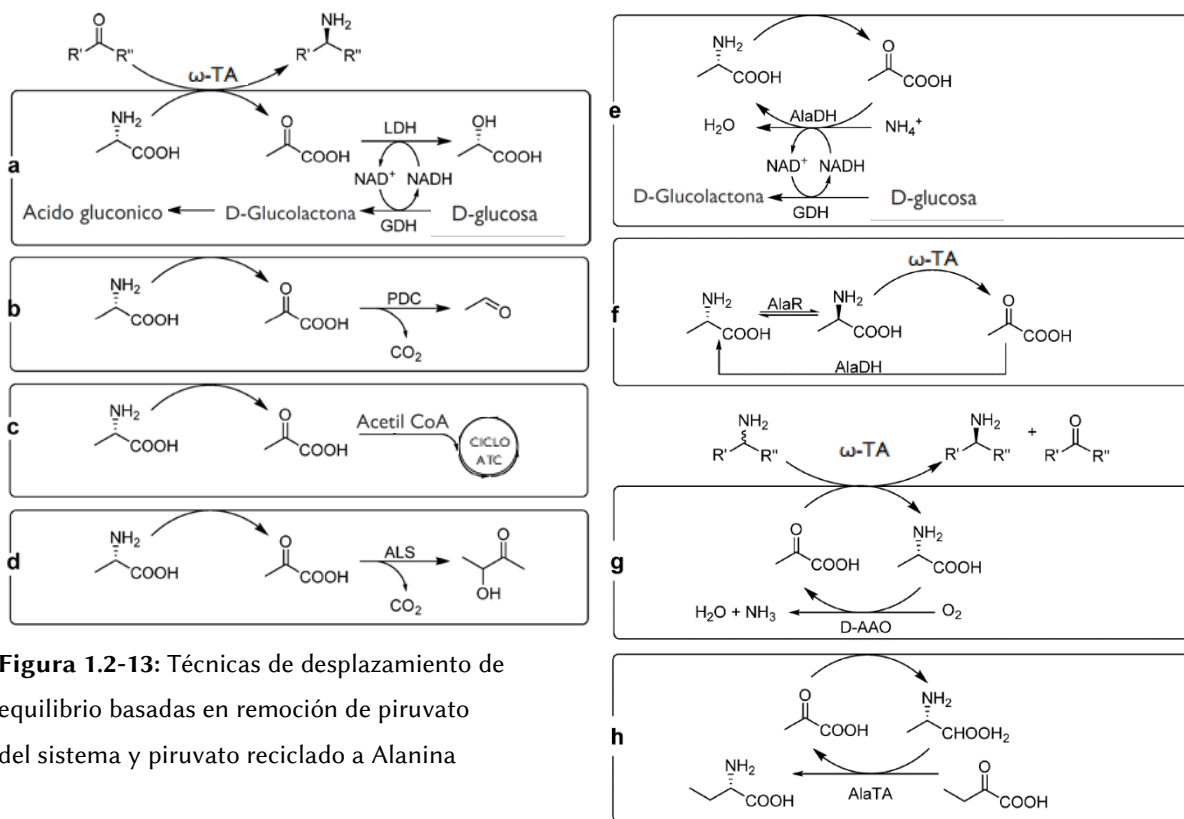


Figura 1.2-13: Técnicas de desplazamiento de equilibrio basadas en remoción de piruvato del sistema y piruvato reciclado a Alanina

Una de las primeras ω -TA comerciales fue la transaminasa de *Arthrobacter sp.* KNK168 descrita por Iwasaki *et al*, luego conocida como ATA117. La misma, fue el punto de partida de varios trabajos de (*R*)-transaminasas reportadas en la obtención de *R*-metilbencilamina y derivados de la misma.¹⁰⁰

Varias aplicaciones se han descrito hasta la fecha en la síntesis de una variedad de compuestos,^{29,79,101} siendo el desarrollo más importante uno de los primeros procesos biocatalíticos con este tipo de enzima aplicados para la síntesis de la sitagliptina, el ingrediente activo de Januvia (un medicamento líder en el tratamiento de la diabetes). Esto demuestra, que el progreso en la biocatálisis puede generar un proceso industrial más ecológico y sostenible. Merck y Codexis desarrollaron a partir de ATA117, una transaminasa que se aplicó a la síntesis quiral de sitagliptina. La mejor variante desarrollada de la enzima proporcionó el producto con >99,95% de *ee* y 92% de rendimiento (Fig. 1.2-14). El rendimiento global se incrementó en un 13% y la productividad en un 53% en comparación con el método tradicional basado en un catalizador quiral de Rhodio. A su vez, el nuevo proceso representa una reducción del 19% en el total de residuos. Este ejemplo, muestra el potencial que nuevas transaminasas, diferentes a las ω -TA en especificidad de sustrato, podrían tener en la industria farmacéutica y plantea un desafío en la búsqueda o desarrollo de nuevos biocatalizadores.^{102,103}

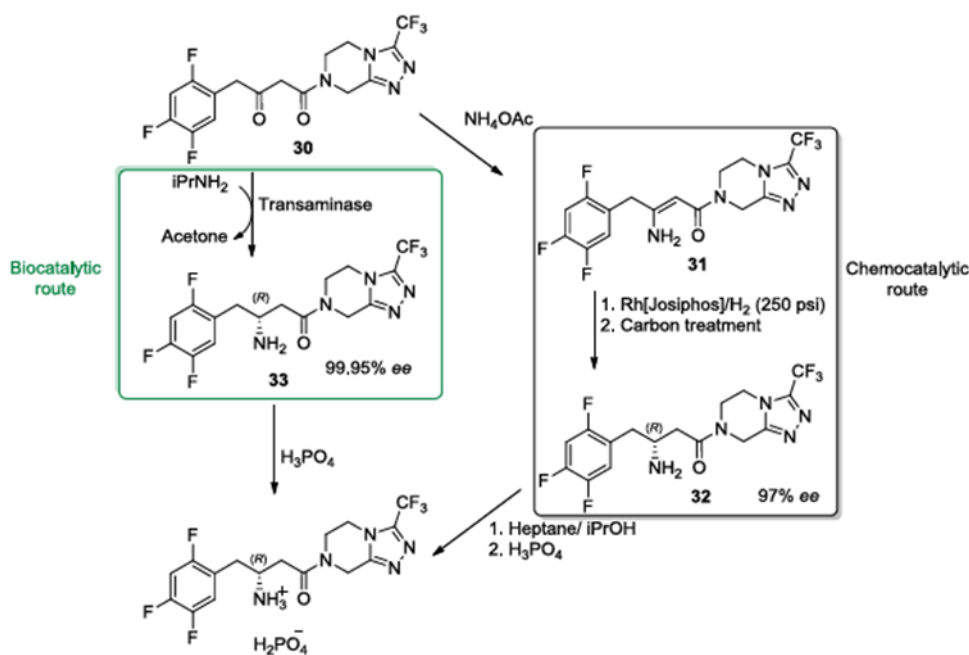


Figura 1.2-14: Diferentes rutas para la síntesis de sitagliptina, a la izquierda se observa la ruta biocatalítica con la cual se obtiene un 99% ee y a la derecha la ruta quimocatalítica que da como resultado 97% ee. (Extraído de C. K. Savile *et al.*¹⁰²)

Turner y sus colaboradores han reportado recientemente luego de 60 años desde su primera descripción, varias transaminasas que participan del metabolismo de putrescina capaces de catalizar la transferencia de grupos aminos desde diaminas biogénicas a cetoácidos como piruvato. Demostraron, la existencia de tres transaminasas de putrescina con preferencia por diaminoalcanos como sustratos y por lo tanto, generaban espontáneamente por desplazamiento del equilibrio iminas cíclicas intermediarias a partir del aminoaldehído. La adición de un agente reductor suave reduce rápidamente la imina intermedia *in situ* para proporcionar una gama de productos N-heterociclos. El sistema se empleó con éxito en la síntesis de la ficuseptina, un alcaloide bioactivo (Fig. 1.2-15).^{82,104}

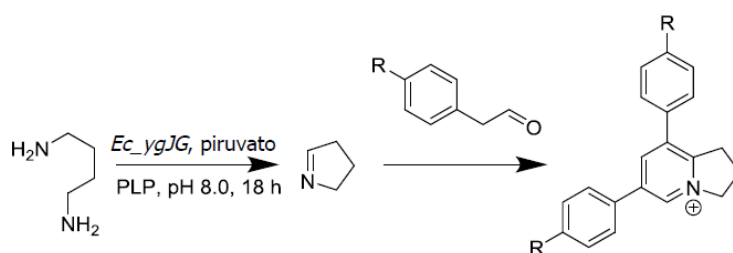


Figura 1.2-15: Transaminación con transaminasa de *E.coli* utilizando cadaverina como grupo aminodonor y piruvato como grupo aceptor para la síntesis de ficuseptina.

1.2.3.3. Iminoreductasas

Recientemente, las imino reductasas han surgido como una clase de enzimas que tienen un gran potencial para la producción biocatalítica de aminas quirales. A diferencia de las vías biocatalíticas existentes (TA) que proporcionan acceso sólo a las aminas primarias, la reducción biocatalítica asimétrica de las iminas, presenta una ruta atractiva hacia aminas secundarias y terciarias ópticamente activas.

Las iminorreductasas (IREDs) catalizan la reducción de iminas a aminas con preferencia del cofactor NAD(P)H, aunque el mecanismo de reacción no ha sido elucidado, es factible suponer una alta similitud con las oxido-reductasas que actúan en la reducción de carbonilos. Aunque su exploración desde el punto de vista biocatalítico ha sido muy reciente, la reducción enzimática de imina como tipo de reacción no es desconocida en la literatura. Una de las imino reductasas más estudiadas es la dihidrofolato reductasa (DHFR, EC 1.5.1.3), una enzima muy estudiada por su rol central en el metabolismo de muchos organismos.

1.2.3.3.1. Mecanismo catalítico

La estructura cristalina de la oxidoreductasa de *Streptomyces kanamyceticus* (código Uniprot: Q1EQE0, estructura apocristalina (3ZGY) y ligada a NADPH (3Z4B)) fue la primera caracterización estructural de una IRED.¹⁰⁵ Se ha demostrado que Q1EQE0 y otras IREDs forma dímeros, con cada monómero de Q1EQE0 compuesto por un motivo de pliegue Rossmann en el N-terminal, que se une a un dominio helicoidal C-terminal a través de una hélice alfa de 28 aminoácidos. El homólogo estructural más cercano de Q1EQE0 es una β -hidroxiácido deshidrogenasa, un alineamiento de secuencia de estas proteínas reveló que, en el sitio activo, una lisina requerida para la (des)protonación del alcohol naciente en las β -hidroxiácido deshidrogenasas, es ocupado por un Asp187 en Q1EQE0. Los mutantes Asp187Ala o Asp187Asn, mostraron ser inactivos y sobre esta base se planteó la hipótesis de que Asp en la posición 187 era un residuo catalítico esencial. Por lo tanto, se propuso que el mecanismo de catálisis IRED implica la protonación del sustrato imina por un residuo de sitio activo ácido como Asp187 en Q1EQ. El ión iminio formado es estabilizado por el mismo residuo para el suministro de hidruro, que proviene del cofactor NADPH. La reducción de la imina se efectúa y el producto es liberado. Estudios posteriores, tanto estructurales como de mutagénesis de otras IRED también destacaron la importancia de esta posición equivalente a Asp187, mutaciones en este aminoácido abolían la actividad IRED o causaban una reducción significativa de la actividad (Fig. 1.2-16).¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

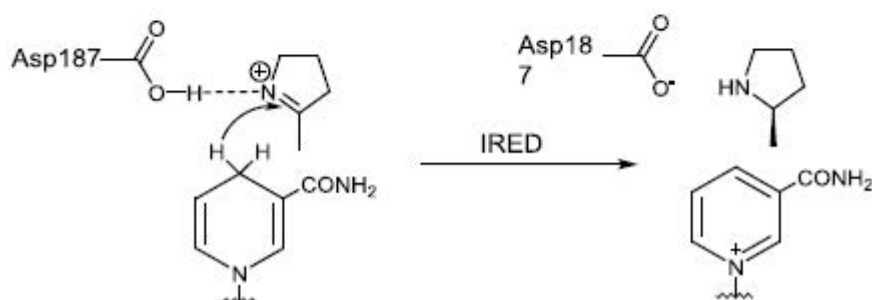
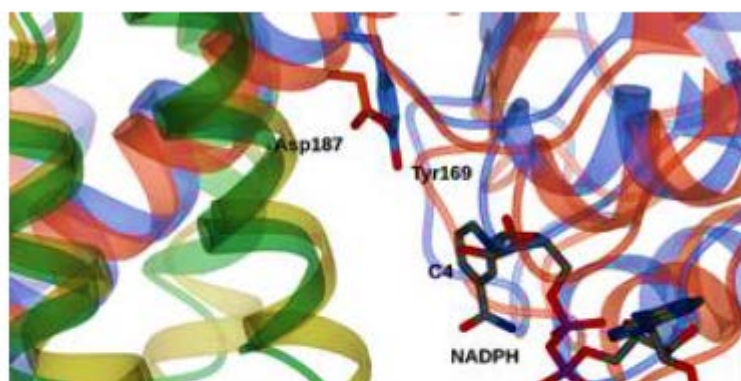


Figura 1.2-16: Esquema simplificado de mecanismo de IREDs (Figura tomada de Rodríguez-Mata, M. *et al.*)

1.2.3.3.2. Iminoreductasas de ayer y de hoy

Cabe destacar que, ya en 1957 se describieron enzimas capaces de reducir iminas; una enzima fue purificada proveniente del hígado de rata, la cual era capaz de reducir el ácido Δ -piperidina-2-carboxílico (Pip2C) a *L*-pipecolato^{109,110}. El homólogo estructural Δ -pirrolina-2-ácido carboxílico también fue reducido a *L*-prolina, un paso involucrado en el catabolismo de la ornitina. Además, una piperidina-2-carboxilato reductasa (Pip2CR, EC 1.5.1.21) descrita como una enzima capaz de reducir el Pip2C, fue aislada de *Pseudomonas putida*, donde su función era reducir la Pip2C a ácido *L*-pipecolico participando en el catabolismo de *L*-lisina en la vía del pipecolato (la *D*-lisina es degradada principalmente a través de la vía de δ -aminovalerato). Se encontró que la enzima aislada era muy inestable, limitando su uso como potencial biocatalizador¹¹¹.

Además de esos escasos antecedentes, pueden citarse algunos reportes de actividad iminoreductasa con célula entera. Esta actividad ha sido descrita en algunos biocatalizadores de célula entera como *Candida parapsilosis*, en condiciones acuosas suaves sin cofactores adicionales, se obtuvieron rendimientos del 55 - 80% del enantiómero *R* en un 95-99% de *ee*.¹¹² Otros ejemplos han sido descritos en células de *Saccharomyces bayanus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 1.1-17).¹¹³

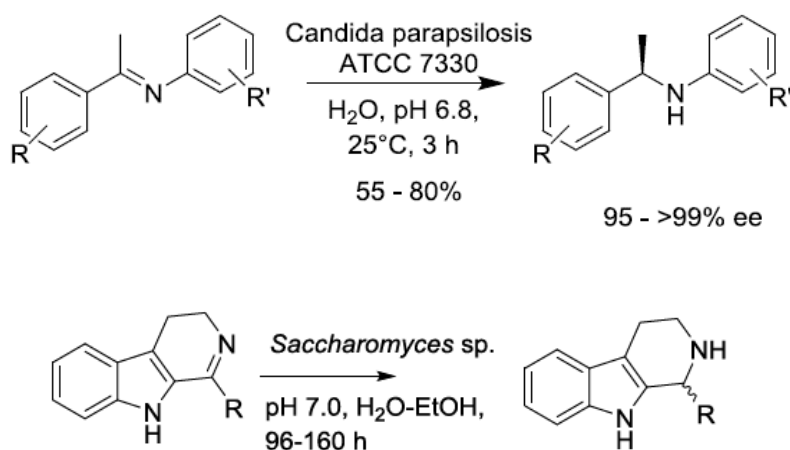


Figura 1.2-17: Reacciones catalizadas por células enteras aplicada a reducción de iminas.

Es en el año 2011 que se da el punto de inflexión para las imino-reductasas, cuando el grupo de Nagasawa informa el resultado de un *screening* de actividad iminoreductasa con la imina cíclica 2-metilpirrolina en una gran diversidad de microorganismos que incluían bacterias, levaduras y hongos. Se encontró actividad IRED en cepas de *Streptomyces*, describiendo de esta manera la primera imino-reductasa aislada de *Streptomyces*. Una segunda IRED con estereoselectividad complementaria fue descrita por el mismo grupo en el 2013 (Fig. 1.2-18).¹¹⁴¹¹⁵

La (*R*)-IRED de *Streptomyces* sp. *GF3587* [(*R*)-IRED] fue posteriormente aislada, caracterizada y ensayada con una serie de compuestos estructuralmente diversos que contienen grupos imina, pero no se detectó actividad adicional más allá del 2-metil-1-pirrolina.¹¹⁶

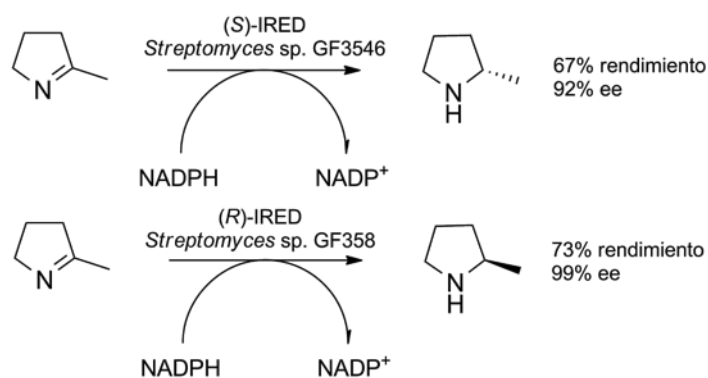


Figura 1.2-18: IREDs aisladas de *Streptomyces*

Turner y colaboradores estudiaron en detalle el espectro de sustratos de estas *R*-IRED y *S*-IRED de *Streptomyces* GF3587 y GF3546. Las enzimas fueron clonadas y expresadas en *E.coli* para construir dos sistemas biocatalítico de células enteras. Usando estos sistemas, tanto *R*-IRED como *S*-IRED mostraron actividad sobre un amplio espectro de sustratos con imina en su estructura. Se demostró que ambas enzimas mostraban una clara preferencia por iminas en anillos con seis miembros. El descubrimiento de estas enzimas proporcionó nuevas rutas eficientes de reducción enzimática enantioselectiva de iminas a aminas quirales y estimuló aún más el interés en las IRED. La reducción enantioselectiva de las iminas de cinco, seis y siete miembros, dihidroisoquinolinas y dihidro- β -carbolidinas sustituidas se logró con una alta conversión y enantioselectividad en la mayoría de los casos.^{117 118}

Otras IREDs han sido investigadas por otros grupos, Li *et al.* describieron una imino reductasa de *Paenibacillus lactis* (PIIR) que era capaz de reducir 2,3,3-trimetil-3H-indoles para dar las correspondientes indolinas y N-alquilo indolinas en alta conversión y *ee*.¹¹⁹ En general, la mayoría de las enzimas IRED bacterianas hasta ahora caracterizadas parecen poseer una especificidad de sustrato similar. Es importante destacar que la eficiencia catalítica de estas enzimas parece ser baja para la mayoría de los sustratos, lo que pone de manifiesto la necesidad de la utilización de técnicas de ingeniería para su mejoramiento (Fig. 1.2-19).

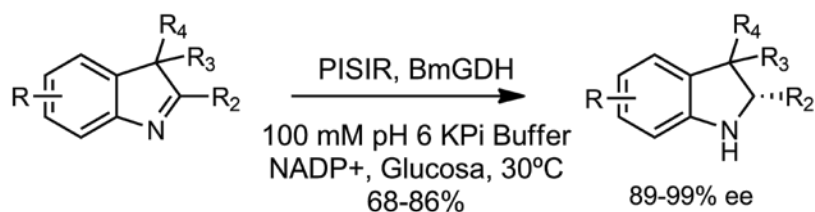


Figura 1.2-19: Reducción de los 2,3,3-trimetil-3H-indoles por (*S*)-IRED de *Paenibacillus lactis* (PIIR).¹²⁰

1.2.3.3.3. “Genome mining de imino reductasas”

Nuevos enfoques que aprovechan la masiva disponibilidad de datos genómicos para la predicción e identificación de posibles enzimas pueden aumentar el acceso a estos biocatalizadores. Tras el descubrimiento de las secuencias de genes y proteínas de las IRED de las especies de *Streptomyces*, la caracterización de nuevas IRED se ha basado en gran medida en análisis proteómicos y filogenéticos disponibles utilizando estas IRED conocidas como secuencias base. Dichos esfuerzos han explotado la relación secuencia-función para recuperar posibles homólogos que comparten cierto grado de identidad de secuencia con las IRED ya reportadas. Utilizando este enfoque, se han caracterizado más de 30 IREDs bacterianas y muchas otras IREDs han sido caracterizados por diferentes grupos.^{120,121}

Recientemente, se creó una base de datos con potenciales IRED seleccionadas por homología de secuencia con enzimas conocidas. Como prueba de concepto de que las enzimas albergadas en la base de datos corresponden a IRED, se verificó la actividad de tres enzimas por expresión heteróloga. Dos de las enzimas seleccionadas (derivadas de *Streptosporangium roseus* y *Streptomyces turgidiscabies*) pertenecen a la superfamilia 1 R-IRED y la tercera (*Paenibacillus elgii*) a la superfamilia 2 S-IRED.¹²²

Los IREDs comparten la similitud de la secuencia global con otras enzimas, especialmente β -hidroxiácido deshidrogenasas; sin embargo, las IREDs no muestran esta actividad. La base molecular para la especificidad catalítica de las IRED está aún por dilucidarse.

Recientemente, un análisis computacional de la base de datos Imine Reductase Engineering Database (www.IRED.BioCatNet.de) se llevó a cabo en un esfuerzo por obtener información sobre las relaciones secuencia-función de IRED. Elaborado con 530 IREDs el estudio identificó un motivo conservado de unión al cofactor NADPH (GLGxMGx5[ATS]x4Gx4[VIL]WNR[TS]x2[KR]), que proporciona una respuesta para la preferencia de las IRED al mismo. El estudio también propuso un sitio activo específico de las IRED, Gx[DE]x[GDA]x[APS]x3{K}x [ASL]x[LMVIAG], que era distinto a de las β -hidroxiácido deshidrogenasas. La identificación del motivo específico del sitio activo de las IRED permite distinguir entre IRED y otras deshidrogenasas y proporciona una guía para buscar nuevas IRED en el futuro.^{122,123}

1.2.4. Fábricas celulares vs cascadas enzimáticas libres de células

La síntesis de productos químicos generalmente involucra procesos de varios pasos; en este último tiempo, han existido grandes avances en lograr los mismos preferiblemente con biocatalizadores mediante un proceso en cascada en un solo recipiente, obviando así la necesidad de aislamiento y purificación de intermediarios que consume mucho tiempo y es costoso.^{20,124-128} Las cascadas enzimáticas pueden clasificarse en general como i) *in vitro*, ii) *in vivo* o iii) híbridas. La selección entre estas tres opciones para una aplicación particular depende de varios factores, incluyendo la disponibilidad de enzimas, requerimientos de cofactores, captación y liberación de sustrato y producto, y la estabilidad metabólica de los sustratos y productos.¹²⁹

El uso de células enteras tiene varias ventajas con respecto al uso del lisado celular o de las enzimas purificadas. Los procesos con células enteras resultan más económicos, estimándose un costo de alrededor del 10% respecto a los costos relacionados al uso de la enzima purificada, asociado al aporte *in situ* de costosos cofactores realizado por la célula así como a los costos de purificar la enzima.^{83,130}

En organismos vivos, las cascadas de múltiples pasos funcionan comúnmente sin separación de sustancias intermediarias; las concentraciones de todos los reactivos se mantienen bajas, lo que permite una alta selectividad y evita formación de subproductos. Tomando como modelo la naturaleza, la aplicación de las reacciones en cascada en síntesis orgánica ofrece muchas ventajas sobre el clásico enfoque paso a paso. Como no hay necesidad de purificación, se reduce el tiempo operativo, los costos y los residuos, existe una mayor economía atómica y el rendimiento general mejora. Además, el problema de los intermediarios inestables o tóxicos puede ser superado y la reactividad y la selectividad pueden mejorarse evadiendo reacciones de equilibrio por el efecto cooperativo de múltiples catalizadores.^{20,131-133}

Un ejemplo es la excepcional cascada artificial en célula entera para la biotransformación de alcanos descrita por Schmid y Bühler *et al.*¹³⁴ (Fig.1.2-20): *n*-octano fue oxidado a octanal y luego transaminado a octilamina con células de *E. coli* coexpresando una alcanomonooxigenasa (AlkBGT) de *Pseudomonas putida* GPo1 y una ω -transaminasa (CvTA) de *Chromobacterium violaceum*. Mediante este biocatalizador recombinante se obtuvo a partir de octano el compuesto octilamina con un 16% de conversión en 30 min.

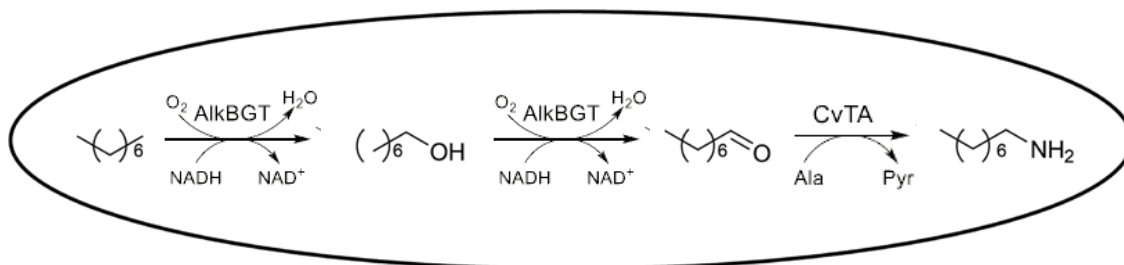


Figura 1.2-20: Cascada artificial en célula entera para la biotransformación de alcanos.

En otra interesante demostración, Li *et al.*¹²⁸ reportan una notable cascada con diez enzimas en ocho pasos mediante el acoplamiento de varios tipos de enzimas para la síntesis de (*S*)-fenilglicina con un 85% de conversión y *ee*>99% a partir de biomasa, ya que se utilizó como sustrato *L*-fenilalanina bioderivada (Fig. 1.2-21). Estas reacciones se realizaron en una mezcla bifásica utilizando como disolvente orgánico oleato de etilo bioderivado procedente de recursos renovables.

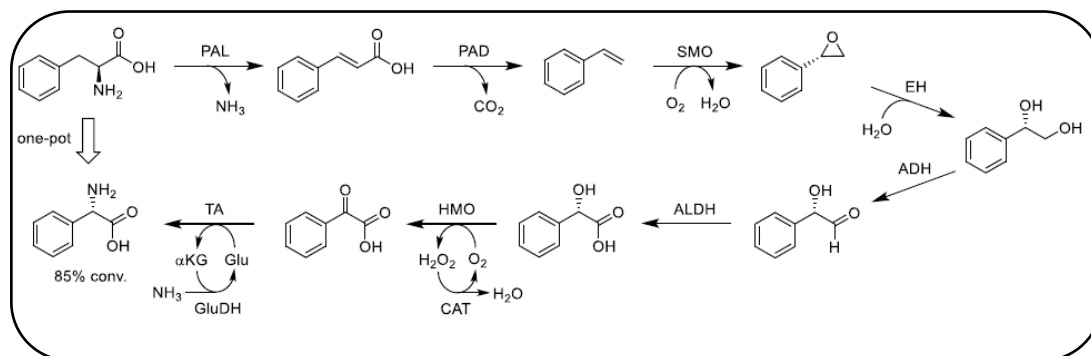


Figura 1.2-21: Cascada en célula entera PAL-PAD-SMO-EH-ALDH-HMO-TA

Por otra parte, las reacciones en cascada que utilizan enzimas purificadas, lisados celulares, extractos sin células o células enteras liofilizadas, ofrecen la facilidad de ajustar las cantidades de cada (bio)catalizador presente en el sistema para maximizar el flujo global y rendimiento de los productos. La aplicación de enzimas purificadas evita cualquier complicación que surja de las complejas vías metabólicas que operan en células vivas enteras, mientras que el uso de la enzima como lisado celular no elimina completamente estas posibles reacciones secundarias.^{29,31,129}

A lo largo de los últimos años, diferentes estilos de cascadas mediadas por enzimas que sintetizan aminas han sido descritas, ya sea participando en reacciones secuenciales en un solo recipiente, en cascadas ortogonales que utilizan simultáneamente otras reacciones enzimáticas para la eliminación o el reciclado de coproductos, en cascadas paralelas que combinan dos procesos enzimáticos distintos que utilizan el mismo cofactor o cosustrato y en cascadas cíclicas, que están diseñadas principalmente para procesos de resolución cinética dinámica.⁷⁹

Por ejemplo, France *et al.*¹³⁵ describió un sistema de cascada de tres enzimas para la síntesis de pirrolidinas y piperidinas quirales (Fig. 1.2-22), en el que los derivados cetoácidos se redujeron inicialmente a cetoaldehídos a través de una reacción mediada por una reductasa de ácido carboxílico, seguida de la transaminación y reducción del intermediario de imina utilizando una iminoreductasa (IRED).

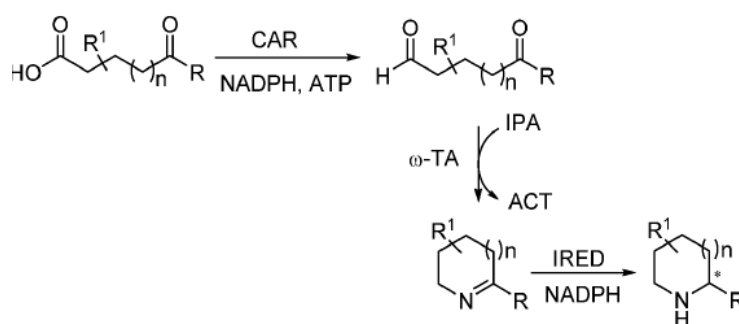


Figura 1.2-22: Cascada CAR- ω TA-IRED

Otro destacado ejemplo, es el reportado por Rother *et al.*^{136,137} dónde se describe el diseño de una cascada secuencial “one pot-two step” para la síntesis de (1*R*,2*R*)-norpseudoefedrina y (1*R*,2*R*)-norefedrina mediante la combinación de la difosfato tiamina-acetohidroxiácido sintasa I (AHAS-I) de *E. coli* con una (*S*)- o (*R*)-transaminasa, respectivamente. La cascada se diseñó de manera que permitiera reciclar el piruvato a través de una descarboxilación inicial del mismo y una reacción aldólica con benzaldehído para producir el intermedio (*R*)-fenilacetilcarbinol, seguido de una aminación reductora con una (*S*)- o (*R*)- transaminasa selectiva, utilizando *S*-metilbencilamina o alanina como grupo aminodonor (Fig. 1.2-23). La adición secuencial de las enzimas mejoró la eficiencia de la cascada; sin embargo, la integración metabólica del sistema mostró ciertas dificultades.

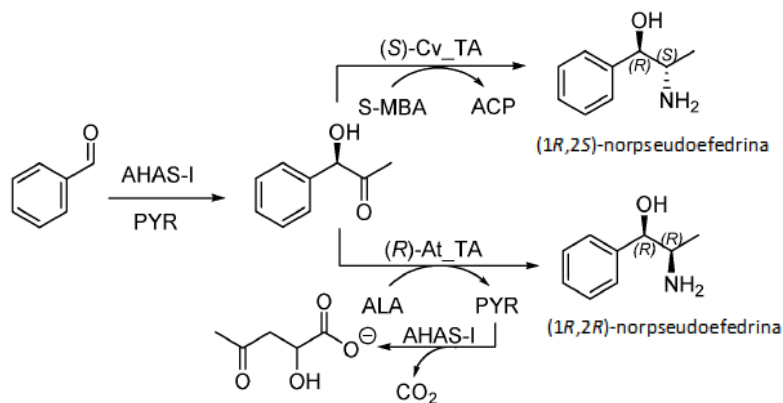


Figura 1.2-23: Cascada secuencial “one pot-two step” para la síntesis de (1*R*,2*R*)-norefedrina y (1*R*,2*R*)-norefedrina

Un desarrollo diferente fue reportado por Hailes *et al.*¹³⁸ a través el diseño de cascadas mediadas por transaminasas en combinación con enzimas derivadas de vías biosintéticas de alcaloides. Se describió una cascada triangular utilizando la transaminasa de *C. violaceum* Cv_2025 y la norcoclaurina sintasa NCS como una ruta de síntesis hacia alcaloides tipo (*S*)-bencilisoquinolinas y (*S*)-tetrahidroprotoberberinas (Fig. 1.2-24).

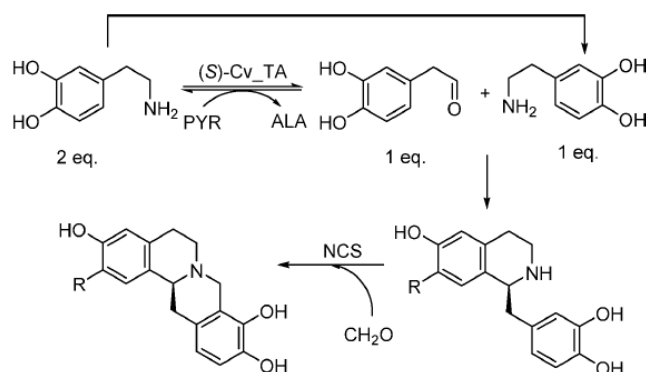


Figura 1.2-24: Cascada mediadas por transaminasas en combinación con enzima derivada de vía biosintética de alcaloides norcoclaurina sintasa

Otro ejemplo impactante de ingeniería metabólica es la producción del medicamento antipalúdico artemisinina,¹³⁹ aunque este trabajo se puede indicar dentro de los límites de la nueva área llamada biología sintética. Los avances realizados en este área, así como en el área de biocatálisis en este último tiempo tienen un ritmo vertiginoso, siendo por momentos diferencias ínfimas la que separa la asignación entre un trabajo u otro a una determinada área.^{133,140-143}

Los avances en biología sintética proveen una interesante herramienta para la biocatálisis y viceversa, por lo que el trabajo en conjunto puede aportar grandes avances a la producción de compuestos de interés industrial.

Muy recientemente, el área de ingeniería metabólica se ha estado preparando para hacer un importante salto mediante la aplicación y el uso de la tecnología (CRISPRi Cas9) para simplificar y acelerar los estudios de manipulación genética. Por ejemplo, el microorganismo de importancia industrial *Corynebacterium glutamicum*, que se utiliza en la producción de *L*-lisina y *L*-glutamato, se modificó en sólo 3 días para dar mejoras significativas en la producción de aminoácidos.¹⁴⁴ Es evidente que el futuro de las fábricas celulares incluirá más enzimas heterólogas o modificadas por CRISPRi Cas9 adaptadas para actuar, a través de evolución dirigida o de diseño racional, en sustratos no naturales.¹⁴⁵

1.3. ¿La cuarta ola de la biocatálisis?

Además del uso de enzimas individuales (aisladas), la combinación de varias enzimas en reacciones en cascada o cepas sometidas a ingeniería metabólica permite la síntesis de moléculas más complejas e incluso de productos químicos a gran escala. La primera ola (que comenzó hace más de un siglo) utilizaba simplemente extractos de tejido vegetal o animal, o células microbianas. La segunda ola, que surgió alrededor de la década de 1980, aprovechó los avances en biología molecular y permitió el clonado y expresión de las enzimas de interés en un hospedero adecuado. Lo más importante es que los investigadores podían someter a la enzima a una mutagénesis dirigida para mejorar sus propiedades. Varias empresas desde entonces se han dedicado a producir biocatalizadores inmovilizados en soportes adecuados a gran escala, sentando las bases para una amplia gama de procesos industriales. La tercera ola, comenzó con el desarrollo avanzado de métodos de ingeniería genética desarrollados en la década de los noventa, ahora comúnmente denominados "evolución dirigida".

Desde entonces, la biocatálisis se ha beneficiado enormemente de los avances de la biología molecular, de la secuenciación rápida y económica del genoma, y especialmente de la bioinformática con generación de modelos por computadora.^{92,124,129,146} Sin embargo, aunque la biocatálisis ha ganado una enorme atención en el contexto de las aplicaciones sintéticas, aún falta un largo camino para que reemplace a la síntesis química tradicional. En estos días, aprovechando la robustez de la catálisis química en conjunto con la elegancia de la catálisis enzimática, se pueden lograr nuevas rutas eficientes hacia moléculas altamente funcionalizadas a partir de

simples materiales de partida.^{7,29,129} Es de esperar que en el futuro, las combinaciones de enzimas ya sea en reacciones en cascada o a través de la ingeniería metabólica, lleguen a ser aún más importantes o incluso la estrategia de "primera elección". El descubrimiento de nuevas enzimas y su ingeniería puede considerarse maduro, especialmente fomentado por nuevas mejoras en las herramientas de análisis bioinformático y el diseño guiado por computadora de las enzimas deseadas.^{58,147-151}

Hoy en día, se han establecido vías muy complejas en hospederos microbianos comunes como *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, y otros. La cuarta ola tendrá como origen posiblemente la ingeniería metabólica. Ejemplos impresionantes lo avalan, como la producción del precursor del polímero 1,4-butanodio^{140,152} desarrollado por la empresa Genomatica (USA), o el desarrollo de DuPont (EE.UU.) la cual estableció la biosíntesis de la ácido graso poliinsaturado ácido eicosapentaenoico (EPA) en *Y. lipolytica*.¹⁵³ A pesar de estos logros, hoy en día siguen siendo muchos los retos en el área de la ingeniería metabólica. Uno de los cuellos de botella sin resolver es la expresión funcional de los genes que codifican las enzimas o proteínas de interés en el hospedero microbiano. Incluso con genes sintéticos adaptados al hospedero, a menudo se lucha con bajos niveles de expresión o incluso con la formación predominante de cuerpos de inclusión.

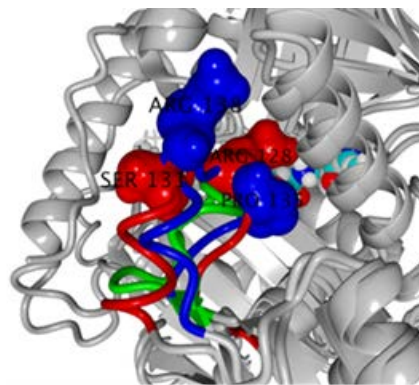
En resumen, la aplicación de métodos biocatalíticos en diversos sectores de la industria química y de las industrias cercanas sigue impulsando el camino hacia un futuro más sostenible. Aportes de todas las áreas siguen siendo necesarios, y un mayor análisis de la información ya disponible gracias a las tecnologías del siglo XXI debe tenerse en cuenta. Estos datos, generados por el área amiga más fiel de la biocatálisis llamada microbiología molecular, es una muestra de la necesidad de tratar a la biocatálisis como un área interdisciplinaria en la cual participan Biólogos, Bioquímicos, Bioinformáticos, Ingenieros, Químicos, etc.

1.4. Objetivo general

Esta tesis tiene como objetivo principal investigar nuevos biocatalizadores en síntesis para la producción de aminas quirales, utilizando tanto enzimas reportadas como nuevas enzimas aún no identificadas. Se plantea la búsqueda de nuevas iminorreductasas y transaminasas a partir de base de datos de genomas elucidados recientemente, la caracterización de estos nuevos biocatalizadores, el desarrollo de sistemas de expresión adecuados, así como el desarrollo de variantes por evolución dirigida de proteínas o diseño racional. Además, se planteó realizar nuevas aplicaciones de biocatalizadores comerciales ya utilizados en síntesis de aminas. Más allá de los progresos recientemente alcanzados, el desarrollo de procesos biocatalíticos para la obtención de aminas quirales es un área de mucho interés tanto para la academia como para la industria. Como se ha destacado en la introducción, las aminas quirales son grupos funcionales muy importantes en productos naturales y fármacos. Existen varias enzimas diferentes para la síntesis de aminas quirales, que proporcionan una invaluable caja de herramientas biocatalíticas que puede ser aprovechada dependiendo del objetivo sintético.

1.4.1. Objetivos específicos

- Clonado, caracterización y expresión de nuevas iminorreductasas identificadas mediante análisis de las elucidadas rutas metabólicas de productos naturales microbianos.
- Clonado, caracterización y expresión de nuevas transaminasas microbianas pertenecientes a la familia de proteínas dependientes de PLP clase IV identificadas mediante “*in silico screening*”. Modelado estructural de las transaminasas obtenidas en base a las estructuras cristalinas de enzimas de la misma clase.
- Desarrollo de variantes de transaminasas por mutagénesis sitio dirigida y mutagénesis de saturación para incremento de la actividad enzimática sobre sustratos más voluminosos.
- Desarrollo de nuevos procesos de cascada enzimática con biocatalizadores reportados para la síntesis enzimática de pirrolidinas 2,5-disustituidas y piperidinas quirales 2,6-disustituidas.
- Caracterización de nuevas TA bifuncionales α,ω -DTA/ ω -TA para desarrollo de nuevos sistemas de aminación enzimática de bajo costo.



2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 2.1

2.1. Búsqueda de nuevas iminoreductasas en rutas metabólicas

La revisión literaria realizada, así como un análisis de las bases de datos de enzimas, nos llevó a proponer como uno de los grupos de mayor interés en la síntesis de aminas quirales, las iminoreductasas. En el inicio de esta tesis, las bases de datos como KEGG y MetaCyc, especializadas en la elucidación de rutas metabólicas estaban en pleno auge. Además, las nuevas tecnologías de secuenciación masiva permitían acceder con mayor velocidad a genomas completos de diversas especies. Ambas estrategias fueron utilizadas como herramientas, en busca de la actividad deseada.

El estudio consistió en dos aproximaciones, por un lado, en analizar paso a paso la biosíntesis de metabolitos secundarios microbianos en busca de reacciones catalizadas por enzimas con actividad similar a la reportada, denominada iminoreductasa (Fig. 2.1-1). A partir de este análisis y realizando rastreo *in silico* de genomas depositados, se seleccionaron dos proteínas como candidatas a estudiar en búsqueda de actividad iminoreductasa novedosa. Por otro lado, se decidió el rastreo de genomas nativos, ya que nuestro laboratorio cuenta con una amplia colección de cepas de *Streptomyces* que han sido aisladas y caracterizadas como patógenos de papa (*Solanum tuberosum*) por el grupo de la Dra. María Julia Pianzzola. Cinco de estas cepas poseen su genoma secuenciado,¹⁵⁴ y han sido el otro punto de partida de este trabajo para la identificación de secuencias proteicas con potencial actividad IRED.

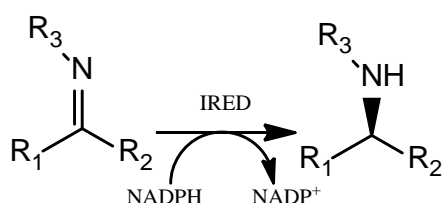


Figura 2.1-1: Reducción estereoselectiva de imina a amina catalizada por una IRED utilizando NADPH como cofactor.

2.1.1. Clonado y expresión de gen *EasG* de *Claviceps purpurea*.

En el análisis realizado de rutas metabólicas secundarias elucidadas en la base de datos MetaCyc, se destacó el trabajo publicado por Matuschek *et al.*^{155,156} que aborda la biosíntesis de agroclavina, el cual reporta la conversión de aldehído chanoclavina-I (1) a agroclavina-(2) por la enzima *EasG* de *Claviceps purpurea* (homóloga de la festuclavina sintasa FgaFS en *Aspergillus fumigatus*), en presencia de glutatión reducido y NADPH. Como se puede observar en la Figura 2.1-2, esta enzima interviene en la reducción de un ion iminio para dar la correspondiente amina. Este paso intermedio en la biosíntesis de alcaloides del ergot en *C. purpurea*, indicaba la presencia de una enzima con actividad sobre iminas en sustratos voluminosos, actividad interesante ya que hasta ese momento existían reportadas solo dos iminorreductasas con actividad restringida a sustratos pequeños.^{115,116}

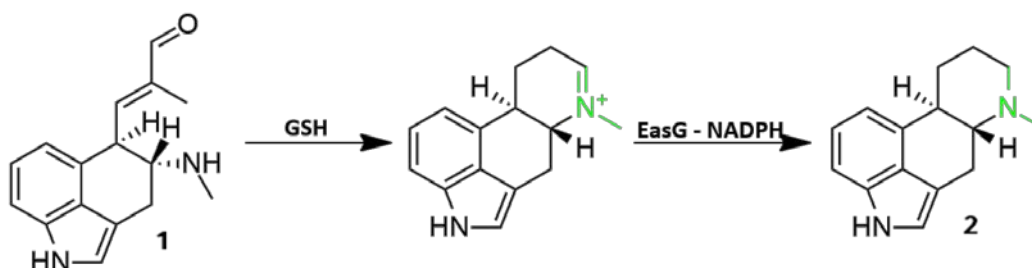


Figura 2.1-2: Mecanismo propuesto de la conversión de aldehído chanoclavina-I (1) en agroclavina (2) mediante **isomerización** no enzimática con la ayuda de GSH y **reducción de un iminio** por *EasG*.

La secuencia proteica de *EasG* denotaba un porcentaje de identidad y score de alineamiento muy bajo en comparación con las iminorreductasas reportadas (Fig. 2.1-3). Estas características, la tornaban una buena candidata para el descubrimiento de una nueva enzima con actividad iminorreductasa, actividad enzimática hasta ese momento muy poco conocida. Se decidió entonces, clonar y expresar esta enzima a partir de la información existente en bases de datos optimizando la secuencia codificante para su expresión en *E. coli*.

La figura 2.1-4 esquematiza el vector de expresión pET22b+-(*EasG*) diseñado para expresión de la proteína con potencial actividad IRED, su construcción fue encargada a la empresa Genescript. El mismo fue construido como derivado del vector comercial pET22b+, introduciendo la secuencia codificante de *EasG*,

optimizada para *E. coli*, mediante enzimas de restricción entre los sitios Nde I y Hind III.

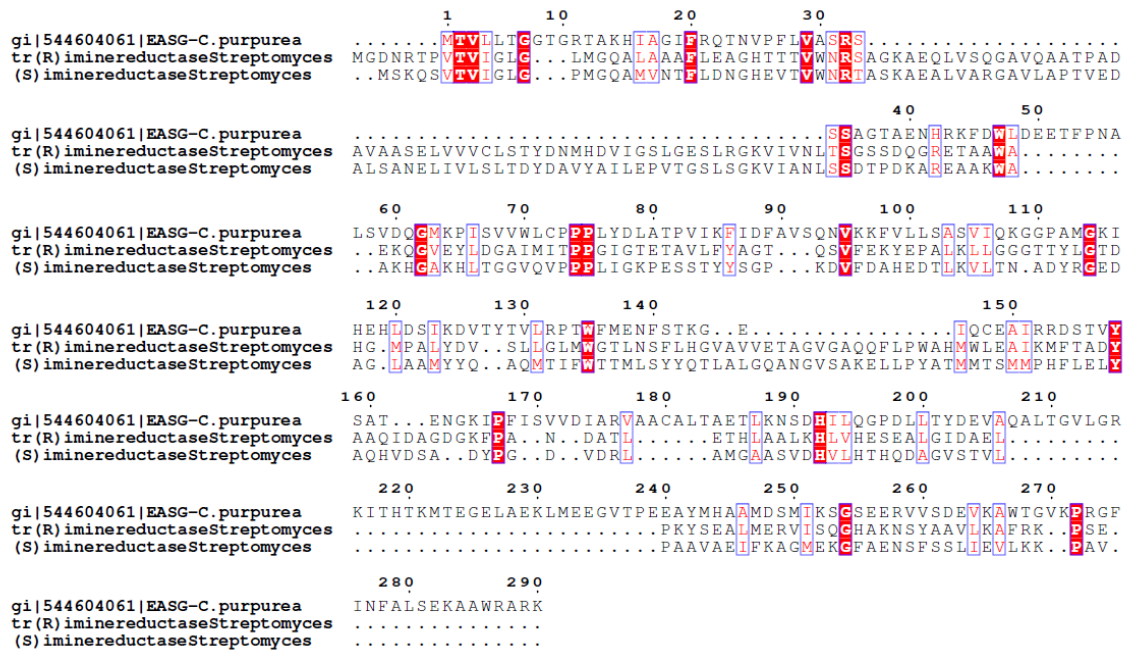


Figura 2.1-3: Alineamiento y comparación de secuencias de proteína EasG de *C. purpurea* con iminoreductasas de *Streptomyces*. (Fondo Rojo: Aminoácidos conservados en todas las secuencias)

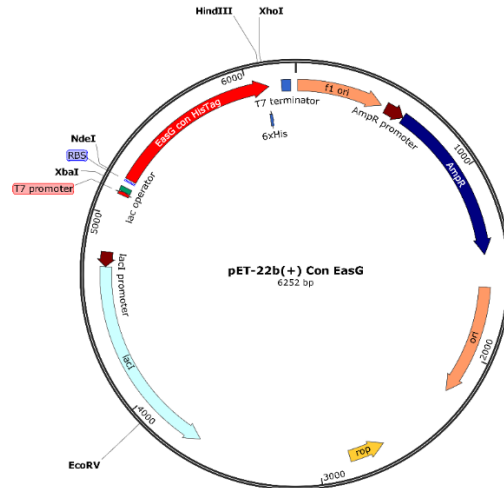


Figura 2.1-4: Vector de expresión pET22b(+) (EasG) diseñado para sobreexpresión de EasG en *E.coli*.

Una vez obtenida la cepa recombinante *E.coli* BL21(DE3) (pET22b+EasG), se procedió a realizar la expresión del gen *EasG*. Se implementó sobreexpresión en el medio cultivo tradicional Luria Bertani-Amp (LB-Amp), induciendo a una DO=0,6 con IPTG 1mM, a 26°C como indicaba la bibliografía.¹⁵⁵ Mediante gel de proteínas SDS-PAGE se observó un perfil de expresión con una moderada a baja cantidad de enzima soluble y, a su vez proteína agregada o en forma de cuerpos de inclusión en la fracción insoluble (Fig. 2.1-5).

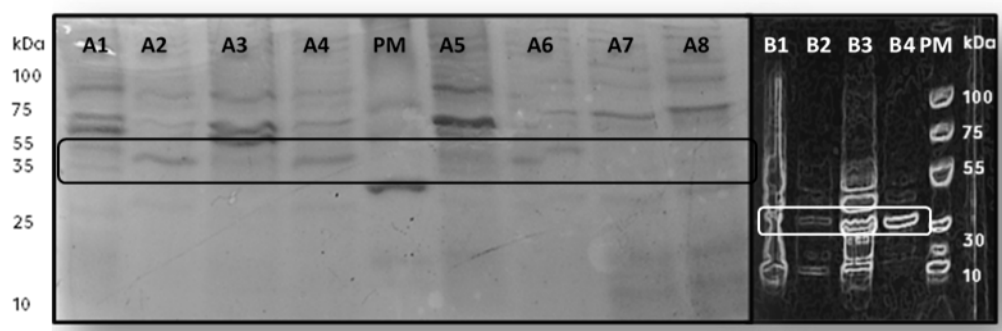


Figura 2.1-5: Análisis de la expresión proteica de *E.coli* BL21(DE3) (*pET22b+EasG*) en LB-Amp a 26°C mediante SDS-PAGE. **A1:** Fracción insoluble 12hs **A2:** Fracción soluble 12hs. **A3:** Fracción insoluble 24hs **A4:** Fracción soluble 24hs. **PM:** Marcador de peso molecular **A5:** Fracción insoluble 48hs. **A6:** Fracción soluble a las 48hs. **A7:** Fracción soluble control *E.coli* BL21(DE3)*pEt22b+* 24hs **A8:** Fracción soluble control *E.coli* BL21(DE3)*pET22b+* 48hs. Las fracciones **B1-B4** es el análisis SDS-Page en *Phast gel*[®] de *E.coli* BL21(DE3) (*pET22b+EasG*) **B1:** Fracción Insoluble 24hs **B2:** Fracción soluble 24hs **B3:** Fracción Insoluble 48hs **B4:** Fracción soluble 48hs.

Es de conocimiento, que en muchos casos los niveles de expresión de proteínas son bajos a pesar del uso de fuertes señales transcripcionales y traduccionales. Varios enfoques se pueden usar para optimizar los niveles de expresión, así como la cantidad de enzima soluble, por ejemplo:

- Optimizar el uso de codones de la proteína heteróloga.
- Variar las condiciones de inducción.
- Clonar la enzima como proteína de fusión

El primer punto, fue contemplado en un inicio al momento de sintetizar el gen, el segundo y nuestro principal enfoque fue variar las condiciones de inducción, mientras que el tercero nunca fue examinado. A partir de los resultados obtenidos (Fig. 2.1-5), se realizaron varios intentos de optimización de la expresión disminuyendo la temperatura de incubación a 26°C, 24°C y 21°C, parámetro importante a ser evaluado puesto que puede afectar la cantidad de enzima en la fracción soluble. En todos los ensayos realizados se observó una menor o igual cantidad de proteína soluble.

A pesar de estos resultados, teniendo en cuenta que la actividad podría ser subestimada por la poca cantidad de enzima soluble, se realizaron biotransformaciones de iminas mediante el uso de células enteras (Fig. 2.1-7) con las moléculas descritas en la figura 2.1-6. En una primer instancia, no se observó ninguna actividad iminoreductasa, resultado que puede ser explicado principalmente por dos factores, la baja cantidad de proteína soluble y/o la utilización de sustratos no adecuados para esta enzima.

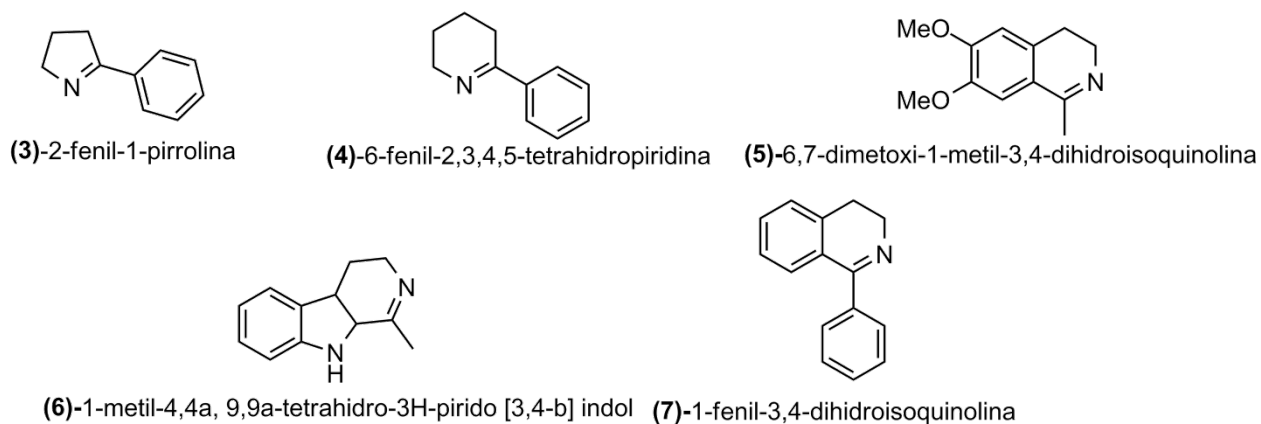


Figura 2.1-6: Sustratos de interés con enlaces imina utilizados en rastreo de actividad iminoreductasa de EasG

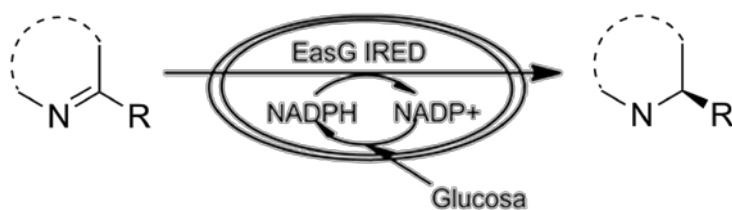


Figura 2.1-7: Biotransformaciones mediante células enteras *E.coli* BL21 DE3 (pET22b+EasG) en buffer con glucosa con los sustratos de Fig. 2.1-6

En una segunda instancia, la proteína EasG, clonada con seis residuos de histidina en su extremo C-terminal, se purificó mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC), detectándose una banda de proteína principal con una migración por encima del marcador de tamaño de 30 kDa, con una masa calculada de 31,3 kDa (Fig. 2.1-8).

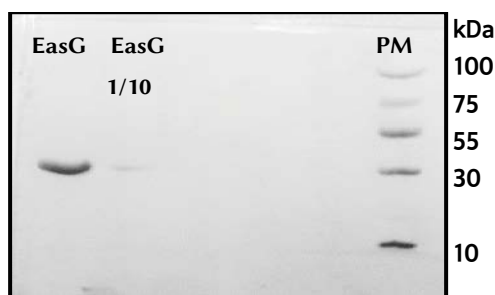


Figura 2.1-8: EasG purificada por IMAC

Con la enzima purificada, se realizaron ensayos de actividad utilizando los sustratos **3** y **4** con seguimiento de la reacción mediante el descenso de NADPH en solución, midiendo absorbancia a 340 nm. La enzima no demostró actividad medible con ninguno de los dos compuestos. Estos resultados podrían deberse a que la enzima no estuviera activa en las condiciones de ensayo, o a que los compuestos utilizados no fueran sustratos, ya que posiblemente la enzima actúe principalmente sobre grupos imino cargados positivamente lo cual implicaría la metilación de las iminas por métodos químicos para comprobar posteriormente la actividad enzimática. De esta manera el uso de esta enzima podría estar ligado y limitado a intermediarios de síntesis que contengan exclusivamente iminas cíclicas alquiladas.

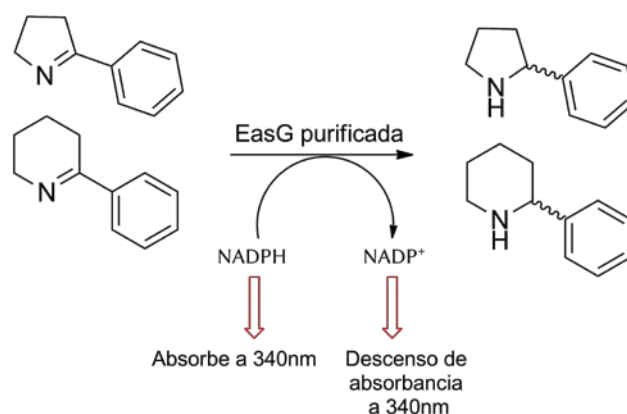


Figura 2.1-9: Esquema de ensayo de actividad imino-reductasa mediante descenso de absorbancia por consumo de NADPH

2.1.1.1. Clonado de EasG en vector de bajo número de copias pKK223-3 y estudio de expresión (Trabajo realizado con la estudiante de grado Giuliana Mazzariello)

Para comprobar si la baja cantidad de proteína soluble era consecuencia del sistema de expresión utilizado, se modificó el vector de expresión para la producción de la proteína EasG planteando como objetivo, disminuir la velocidad de producción de la proteína o disminuir la cantidad de proteína producida. Ambas estrategias buscan evitar y disminuir la formación de agregados insolubles de la proteína de interés. En este caso, se decidió insertar el gen *EasG* en el plásmido pKK223-3, vector de menor nivel de expresión que pET22b+. Este vector contiene un promotor *tac* inducible con IPTG y un terminador transcripcional *rrnB* para el control de la expresión proteica. Además, posee múltiples sitios de clonado y resistencia a la ampicilina (Fig. 2.1-10).

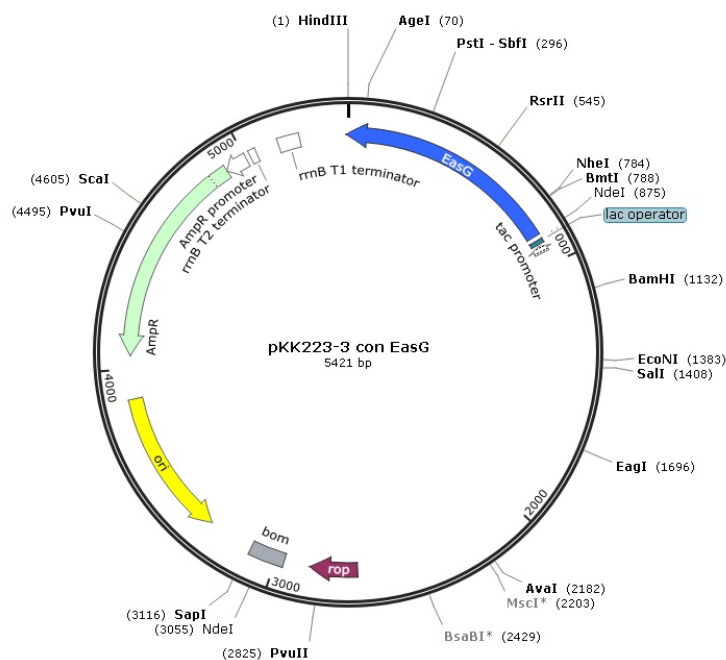


Figura 2.1-10: Vector de expresión pKK223-3 EasG diseñado para expresión controlada por promotor *tac* de EasG en *E.coli*.

El clonado se realizó utilizando la metodología de *Restriction Free Cloning* (RFC) de Van den Ent *et al.*¹⁵⁷ y Unger *et al.*¹⁵⁸ (Fig. 2.1-11), utilizando los primers IRagropKK RFC IF y IRagropKK RFC IR (Tabla 4.1-1). Luego, estos primers fueron utilizados para amplificar el inserto desde el vector de expresión pET22b+(EasG) utilizando condiciones de PCR de alta fidelidad (Ver experimental). El producto resultante, se purificó y se utilizó como “megaprimer” en una segunda reacción de PCR, con el plásmido pKK223-3 actuando como plantilla, logrando así la inserción del gen *EasG*. Las secuencias aminoacídicas y nucleotídicas se pueden observar en el capítulo 6.1. A continuación, se

utilizó Dpn I para degradar cualquier plásmido parental. El producto final se utilizó para transformar células competentes de *E.coli* JM109, para de esta manera, obtener los biocatalizadores recombinantes que expresan la enzima deseada. Se verificó la inserción de *EasG*, mediante una PCR con los primers IRagro-pkk_RFC_IF e IRagro-pkk_RFC_IR (Fig. 2.1-12). Los clones positivos fueron verificados mediante secuenciación.

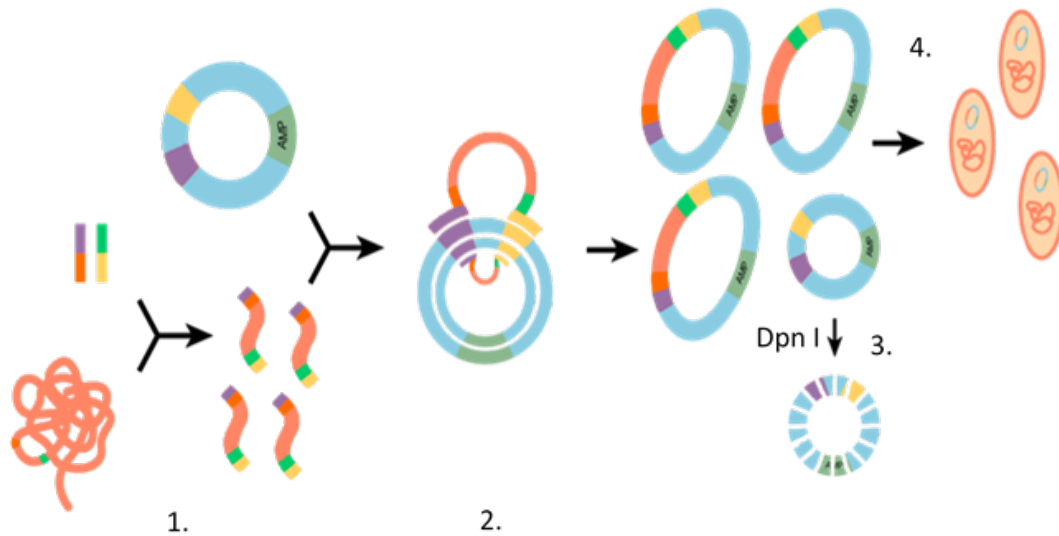


Figura 2.1-11: Esquema método RFC. 1. PCR para síntesis de megaprimers 2. PCR de alta fidelidad para clonado de *EasG* en vector 3. Digestión con Dpn I 4. Transformación en *E.coli* JM109.

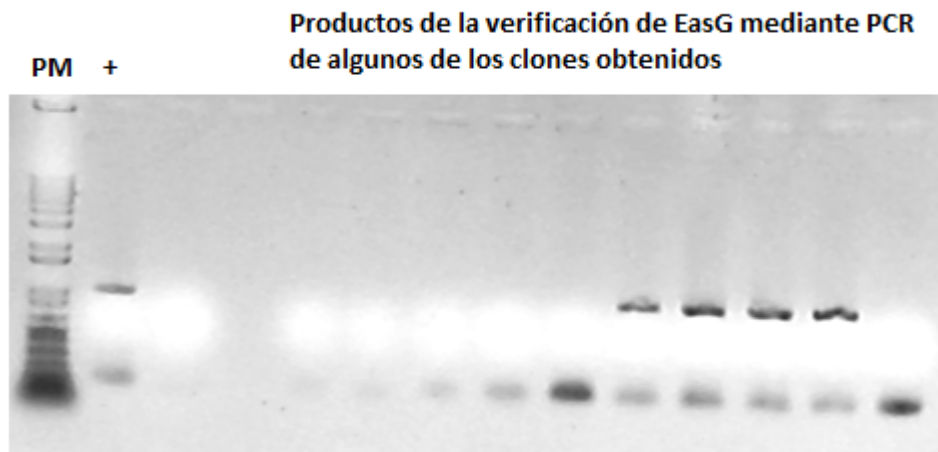


Figura 2.1-12. Gel de agarosa de productos de PCR para verificación de la inserción de *EasG* en pKK223-3. +: Control positivo. Se puede observar en los carriles 9-12 la presencia de una banda del tamaño esperado.

Posteriormente, la expresión de EasG, se indujo con el agregado de IPTG a una concentración final de 1mM. Se incubó la cepa *E. coli* JM109(pKK223-*EasG*) a 28°C y se tomaron muestras a 4, 20 y 24 horas. A continuación, se presenta el gel de proteínas SDS-PAGE con las fracciones solubles de las muestras tomadas (Fig. 2.1-13), donde no se observan diferencias significativas en las primeras 20 horas de incubación, pero sí se observa una baja expresión de la proteína a las 24 horas. Una leve banda con una migración por encima de los 25 kDa y por debajo de los 35 kDa es detectada y correspondería a EasG (31.3 kDa). De este gel de proteínas se puede deducir que la expresión de manera soluble de EasG sigue siendo relativamente baja.

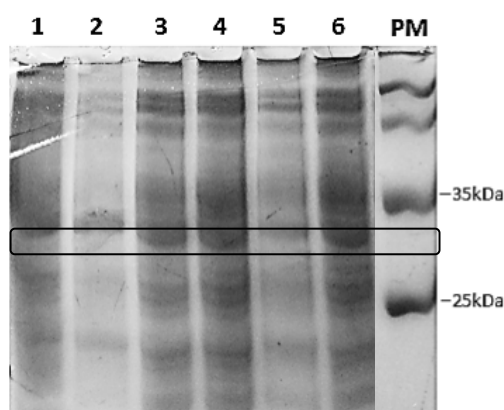


Figura 2.1-13: Análisis de la expresión proteica en fracción soluble. 1: *E. coli* JM109 (pKK223-3) control negativo, 4 hs de incubación. 2: *E. coli* JM109(pKK223-3-EasG), 4 hs de incubación. 3: *E. coli* JM109 (pKK223-3) control negativo, 20 hs de incubación. 4: *E. coli* JM109(pKK223-3-EasG), 20 hs de incubación. 5: *E. coli* JM109 (pKK223-3) control negativo, 24 hs de incubación. 6: *E. coli* JM109(pKK223-3-EasG), 24 hs de incubación. PM: marcador de peso molecular

Para evaluar la actividad de EasG a partir de este nuevo sistema, se ensayó actividad mediante el uso de lisado celular en ensayos espectrofotométricos por seguimiento de consumo de NADPH sobre distintos compuestos utilizados anteriormente (Fig. 2.1-6) y sustratos con iones iminio en su estructura, similares al sustrato natural de la enzima (Fig. 2.1-14). Finalmente, al evaluar la actividad iminoreductasa de este biocatalizador utilizando diferentes sustratos no se logró observar ninguna actividad.

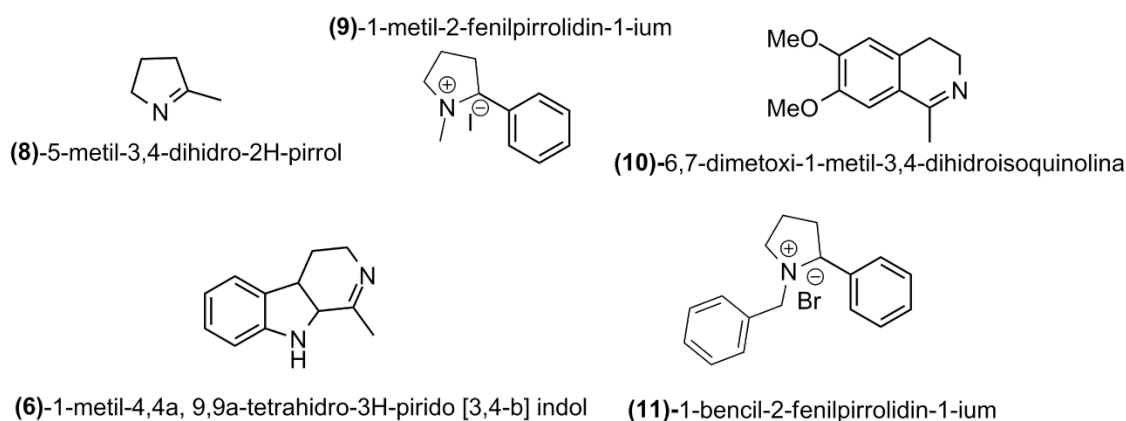


Figura 2.1-14: Sustratos utilizados para el rastreo de actividad de *E.coli* JM109 (pKK 223-3 *EasG*)

Se deberá continuar trabajando en la optimización de las condiciones de expresión para una mejor producción de la enzima en forma soluble. Hasta este momento, se logró clonar en el vector de expresión pKK223-3 el gen que codifica para la enzima *EasG* y obtener un biocatalizador recombinante con potencial actividad iminorreductasa que expresa dicha enzima. Este hecho ha sido confirmado por secuenciación. Finalmente, al evaluar la actividad iminorreductasa de este biocatalizador utilizando diferentes sustratos: β -dihidrocarbolina, 2-metil-1-pirrolina e iones iminio, no se logró observar ninguna actividad.

Hasta la fecha, esta enzima no ha sido reportada con actividad iminorreductasa sobre sustratos diferentes a los descritos por Matuschek.^{155,156} Una posible causa, es que, al ser el enlace iminio un enlace labil, in vivo no sea necesaria una energía de activación alta para provocar la reducción. Se deberá continuar trabajando en la optimización de las condiciones de expresión para la producción de la enzima en forma soluble y en la búsqueda de mejores estrategias para el estudio de la actividad iminorreductasa de esta particular enzima.

2.1.2. Clonado y expresión de gen *Irp3* de *Yersinia enterocolitica*.

Irp3 es una enzima que participa en la síntesis de sideróforos, uno de los sistemas de captación de hierro conocidos en bacterias. Los sideróforos, son quelantes de hierro de bajo peso molecular, los cuales las bacterias sintetizan, segregan, y luego toman selectivamente para adquirir hierro del ambiente. En *Yersinia* y *Pseudomonas sp.* se han encontrado sideróforos que contienen anillos tiazolina y tiazolidina, ambos derivados de cisteínas cicladas.

Según estudios recientes,¹⁵⁹ el anillo tiazolina unido al grupo aromático se reduce a la tiazolidina por una reductasa dependiente de NADPH en un mecanismo que ocurre unido a un brazo de fosfopanteteína (*Irp1*) hasta que el péptido maduro se separa por una reacción de transpeptidación cíclica, posiblemente para obtener la geometría apropiada para coordinar el ion férrico (Fig. 2.1-15). Esta enzima resulta interesante de estudiar desde el punto de vista biocatalítico por poseer especificidad de sustrato diferente a la reportada para otras IRED en *Streptomyces sp.*

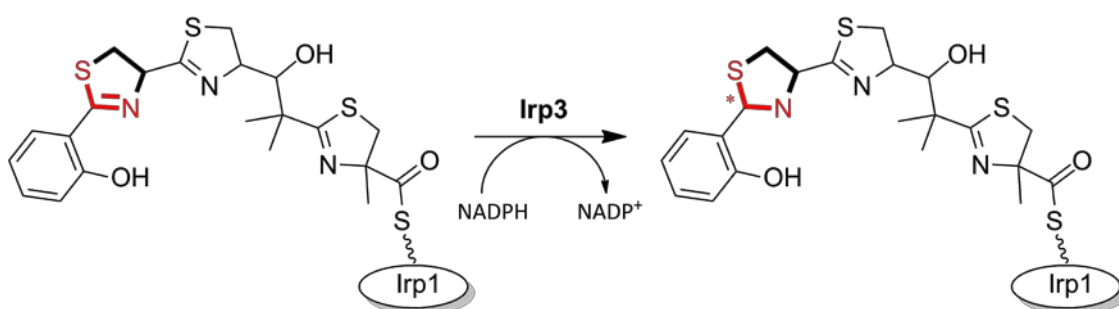


Figura 2.1-15: Yersiniabactin, el sideróforo producido por *Yersinia sp.*, es el producto de la biosíntesis en la que participa *Irp3*. *Irp3* reduce un doble enlace en el anillo central de la tiazolina para formar el anillo de tiazolidina del producto. El sustrato es reducido mientras se une covalentemente a una serina fosfopanteteinil modificada postraduccionalmente del dominio portador de peptidilo de la molécula (HMWP1-*Irp1*).

Los plásmidos pET28b-*Irp3*-C y pET28b-*Irp3*-N conteniendo el gen de interés, fueron gentilmente cedidos por la Prof. Audry Lamb de la Universidad de Kansas, los cuales se diferencian en la ubicación de los residuos de histidinas para su posterior purificación.¹⁵⁹ Se transformó la cepa *E. coli* BL21(DE3), obteniéndose las cepas recombinantes *E. coli* BL21(DE3) *Irp3*-N *Yersinia* y *E. coli* BL21(DE3) *Irp3*-C. cedidos por la Prof. Audry Lamb de la Universidad de Kansas, los mismos, se diferenciaban por la ubicación de los residuos de histidinas para su posterior purificación.¹⁵⁹ Se transformó la cepa *E. coli* BL21(DE3), obteniéndose las cepas recombinantes *E. coli* BL21(DE3) *Irp3*-N *Yersinia*, *E. coli* BL21(DE3) *Irp3*-C.

Posteriormente, se procedió a realizar la expresión de la proteína Irp3. Para las dos cepas (*E.coli BL21(DE3) Irp3-N Yersinia* y *E.coli BL21(DE3) Irp3-C Yersinia*) se observó expresión de proteína en forma insoluble en cultivos en LB-Kan, por esta causa se decidió cambiar de estrategia de expresión. Como alternativa se evaluó la optimización de expresión mediante cultivo de autoinducción¹⁶⁰ y paralelamente, mediante el clonado y expresión de la enzima en un plásmido de menor número de copia y con un promotor más débil, para de esta manera evitar posibles problemas de agregación comúnmente asociados a una alta producción de proteína.

2.1.1.2. Expresión mediante cultivo de autoinducción 4ZY-LAC-SUC:

Los sistemas de autoinducción tienen la particularidad de aumentar la densidad celular, en consecuencia, se aumenta el rendimiento de la proteína de interés en comparación con el medio de cultivo tradicional. Este método de crecimiento y de inducción, se basa en la existencia de una metabolización de los componentes del medio de manera diferencial en el tiempo, consumiéndose primero la glucosa y luego la lactosa. El IPTG entra en la célula por difusión pasiva y actúa como inductor independientemente de la fuente de carbono en el medio de cultivo, no será descompuesto ni utilizado por la célula mientras que el ingreso de lactosa y la inducción son inhibidos por la presencia de otros azúcares como la glucosa. Esto provoca una inducción concomitante de la expresión de todos los genes controlados por promotores *lac* al metabolizarse la lactosa.¹⁶⁰ En la Figura 2.1-16 se puede observar que a las 48 y 72 hs existe una banda de peso molecular a la altura de los 40 kDa tanto en la fracción insoluble como en la fracción soluble, que concuerda con el peso molecular de la proteína Irp3.

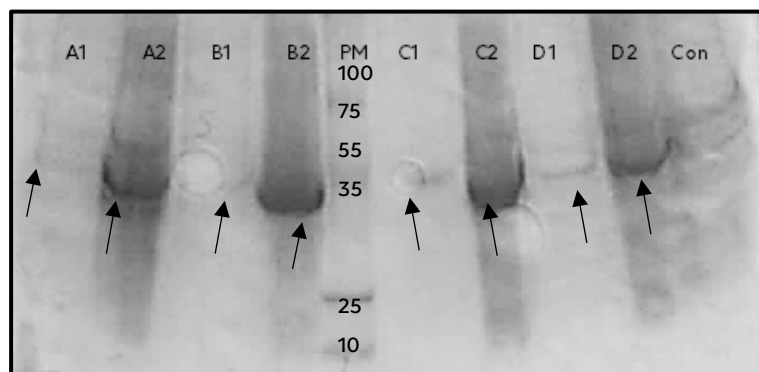


Figura 2.1-16: Análisis por SDS-Page de *E.coli BL21(DE3) Irp3-N Yersinia* y *E.coli BL21(DE3) Irp3-C Yersinia* en cultivo autoinducción. **A1:** FS Irp3-C 48hs. **A2:** FI Irp3-C 48hs. **B1:** FS Irp3-N 48hs. **B2:** FI Irp3-N 48hs. **C1:** FS Irp3-C 72hs. **C2:** FI Irp3-C 72hs. **D1:** FS Irp3-N 72hs. **D2:** FI Irp3-N 72hs. **Con:** FS *E.coli BL21(DE3) (pET28+)* 72hs. **NOTA:** FS: Fracción soluble, FI: Fracción insoluble.

Por cromatografía de afinidad por IMAC se obtuvo 5 mg de enzima purificada, se ensayó con los sustratos mostrados en la Fig. 2.1-6 a una concentración 5mM, para ninguno de estos compuestos ensayados se observó reducción de la imina a la amina. Por este motivo, se decidió utilizar una molécula más cercana al sustrato natural reportado en literatura de esta enzima. Se contó para esto, con la colaboración del Prof. Danilo Davyt, quien sintetizó el compuesto **12**. Este compuesto tiene la particularidad contener una estructura tiazolina en su estructura (Fig. 2.1-17).

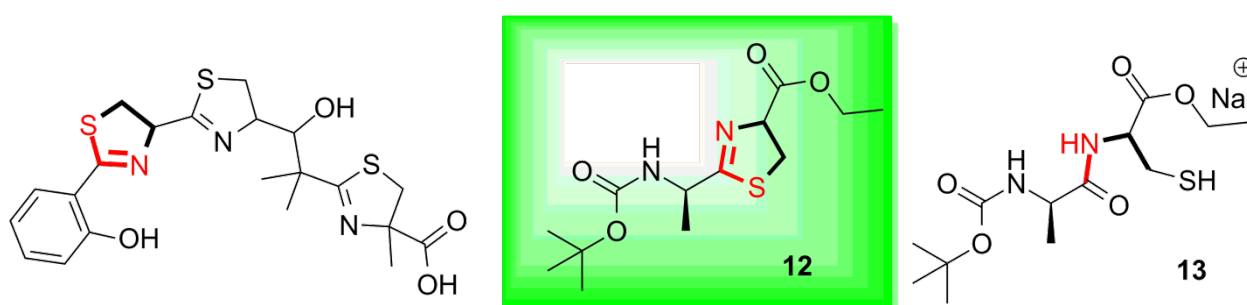


Figura 2.1-17: A la izquierda sustrato original de Irp3, en el centro compuesto sintetizado y ensayado para detectar actividad, a la derecha producto de hidrólisis de la tiazolina detectado en rastreo de actividad.

En este ensayo tampoco se observó actividad del biocatalizador. En los análisis realizados por HPLC se observó una disminución del sustrato y aparición de productos cuya identidad se determinó mediante HPLC-MS (ver anexo), mostrando que se trata del producto de hidrólisis de la tiazolina, que contiene la amida peptídica y el tiol libre. En el control de reacción, se observó el mismo resultado, el sustrato era inestable en las condiciones de reacción obteniéndose los productos de la hidrólisis espontánea del mismo.

Teniendo en cuenta, que el sustrato fisiológico para Irp3 está unido a la fosfopanteteína del dominio portador (Irp1), y por lo tanto no presentará un carboxilato interactuando con el sitio activo, sustituir el carboxilato por un éster de etilo en una de las ramificaciones de la tiazolina parecería ser una idea acertada. A pesar de no poseer la misma estructura, la idea planteada era verificar la actividad sobre el mismo tipo de enlaces tiazolina en sustratos intermediarios de síntesis farmacéutica.

En nuestro estudio, Irp3 no mostró indicios de actividad iminorreductasa sobre compuestos que son sustratos de IRED previamente reportadas. Las IREDs hasta ahora caracterizadas, son dímeros entrelazados que no comparten ninguna similitud estructural con Irp3.

Irp3 tiene la ventaja de tener un sustrato fisiológico conocido; sin embargo, la compleja naturaleza del sustrato ha limitado nuestra capacidad para estudiar su actividad sobre el mismo, realizando estudios solamente sobre el análogo del sustrato (12). La ausencia de actividad puede deberse a problemas de expresión de la enzima, ya que la misma forma mayoritariamente cuerpos de inclusión; otra posible causa es que no se hayan utilizado los sustratos adecuados, ya que el único ensayado con estructura similar es lábil en las condiciones de reacción.

Estudios de estructura cristalina de Irp3, realizados posteriormente por el grupo de la Dra. Lamb, mostraron que existe un túnel de entrada al sitio con tamaño adecuado para unir la cadena de fosfopanteteína del sustrato opuesto al sitio activo de unión del NADPH (Fig. 2.1-18). Esto puede indicar que Irp3 se encuentre asociada a la NRPS (nonribosomal peptide synthetasa), recibiendo el sustrato directamente de ésta y manteniéndose asociada para catalizar la reducción de la tiazolina. Este puede ser un requerimiento para su actividad, y el motivo por el cual no se haya detectado actividad.¹⁶¹

El no lograr un sistema de célula entera con expresión de la enzima soluble de manera adecuada, es un gran impedimento para realizar una conclusión acertada. Por otro lado, las características reportadas recientemente para esta enzima hacen pensar que tenga alta afinidad por sustratos acilados con cadenas largas que interactúen con el túnel de entrada de la proteína, o incluso que requieran de fosfopanteteína como motivo estructural.

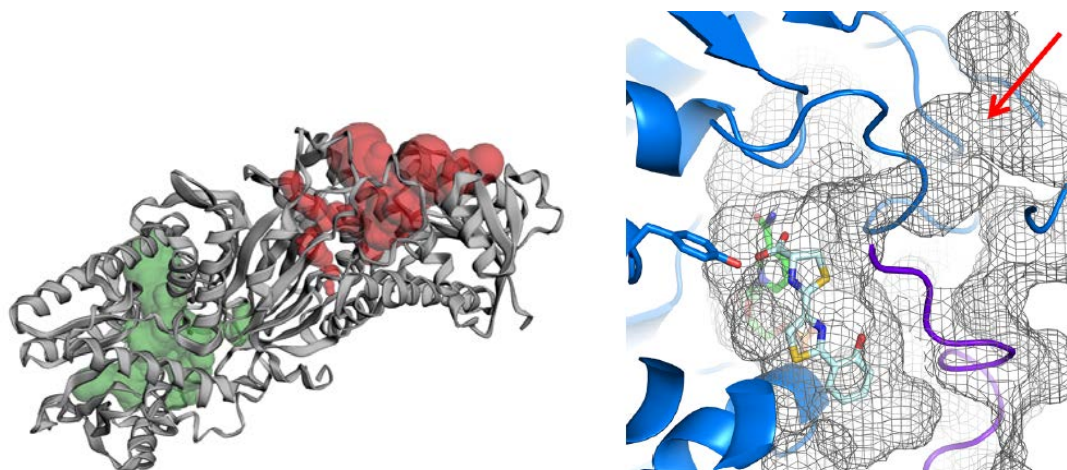


Figura 2.1-18: Visión del túnel al sitio activo. **En la foto superior** se observa el dímero de IRED Irp3 con el túnel del sitio activo sombreado en rojo y verde. **En la foto inferior** se observa el túnel desde la superficie de Irp3 que conduce a la cavidad del sitio activo (flecha roja). (Foto inferior tomada de

Meneely *et al.* 2016)

2.1.3. Identificación y clonado de nuevas iminorreductasas a partir de genomas de *Streptomyces* nativos (Trabajo realizado en conjunto con estudiante de grado Ariel Tijman)

Mediante el uso de la herramienta BLAST®¹⁶² para proteínas del NCBI fueron comparadas las secuencias aminoacídicas de las *Ry* SIREDS publicadas por el grupo de Nagasawa.^{114,116} En este análisis, se observó que existían 6 zonas conservadas de entre cuatro y siete aminoácidos, las cuales fueron seleccionadas como motivos aminoacídicos molde para la búsqueda en los genomas de *Streptomyces sp* nativos (Fig. 2.1-19).

2.1.3.1. Alineamiento *R*-iminorreductasa vs. *S*-iminorreductasa

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
206 bits(523)	8e-70	Compositional matrix adjust.	107/291(37%)	176/291(60%)	3/291(1%)

```

Query 4 N RTPVTVI GLGLMGQALAAAFLEAGHTTTVWNRSAGKAEQLVVSQGAVQAATPADAVAASE 63
++ VTVIGLG MGQA+ FL+ GH TVWNR+A KAE LV++GAV A T DA++A+E
Sbjct 2 SKQSVTVIGLGPMPGQAMVNTFLDNGHEVTVWNRTASKAEALVARGAVLAPTVEDALSANE 61
Query 64 L VVVCLSTYDNMHDVIGSLGESLRGKVI VNLTS GSSDQGRETAAWAEKQGVEYLDGAIMI 123
L+V+ L+ YD ++ ++ + SL GKVI NL+S + D+ RE A WA K G ++L G + +
Sbjct 62 L I V L S L T D Y D A V Y A I L E P V T G S L S G K V I A N L S S D T P D K A R E A A K W A A K H G A K H L T G G V Q V 121
Query 124 T P P G I G T E T A V L F Y A G T Q S V F E K Y E P A L K L L G G G T T Y L STDHGMPALYDVSLI GLMWGTL 183
PP IG + +Y+G + VF+ +E LK+L Y G D G+ A+Y + + + W T+
Sbjct 122 P P P L I G K P E S S T Y Y S G P K D V F D A H E D T L K V L T N A - D Y R G E D A G L A A M Y Y Q A Q M T I F W T T M 180
Query 184 N S F L H G V A V V E T A G V G A Q Q F L P W A H M W L E A I K M F T A D Y A A Q I D A G D G K F P A N D A T L E T H L 243
S+ +A+ + GV A++ LP+A M + F YA +D+ D +P + L
Sbjct 181 L S Y Y Q T L A L G Q A N G V S A K E L L P Y A T M M T S M P H F L E L Y A Q H V D S A D - - Y P G D V D R L A M G A 238
Query 244 A A L K H L V H E S E A L G I D A E L P K Y S E A L M E R V I S Q G H A K N S Y A A V L K A F R K P S 294
A++ H++H + G+ LP + + + +G A+NS+++++ +KP+
Sbjct 239 A S V D H V L H T H Q D A G V S T V L P A A V A E I F K A G M E K G F A E N S F S S L I E V L K K P A 289

```

Figura 2.1-19: En amarillo se resaltan los motivos conservados considerados para “genome mining” en genomas de *Streptomyces* nativos, en azul se resalta el sitio de unión al cofactor y en rojo el motivo del sitio activo específico propuesto para IRED. Estas dos últimas zonas son las utilizadas en algoritmo de identificación publicado por Fademrecht *et al.*

2.1.3.2. Búsqueda de IRED en genomas nativos

Mediante el software Artemis¹⁶³ y la ayuda técnica de la MSc. María Inés Lapaz se realizó la búsqueda de estos motivos en los genomas de *Streptomyces* sp. secuenciados por nuestro laboratorio. Como se observa en la Tabla 2.1-1, el único motivo que arrojó resultados concluyentes y coherentes fue el motivo TVWNR con un total de 10 secuencias en diferentes genomas. Por otro lado, el motivo TVIGLG arrojó como resultado solo una secuencia.

Tabla 2.1-1 Motivos aminoacídicos buscados	Genoma ST105	Genoma ST129	Genoma ST1015	Genoma ST1020	Genoma ST1229
	Secuencias detectadas				
VTVIGLG	X	X	x	x	x
TVIGLG	x	X	x	x	ST1229_07348
VTVIGL	x	X	x	x	x
MGQA	19	11	16	---	16
TVWNR	ST105_06069 ST105_00563	ST129_02583 ST129_05383	ST1015_00642 ST1015_07732 ST1015_08219	ST1020_04220 ST1020_07006 ST1020_07958	ST1229_06838
GKVI	36	39	29		37

Con los motivos VTVIGLG y VTVIGL no se detectó ninguna secuencia aminoacídica, mientras que, con los motivos de cuatro aminoácidos MGQA y GKVI se detectó un alto número de secuencias mostrados en la Tabla 2.1-1. Estas últimas fueron descartadas, ya que un alto número, indica que estas secuencias de cuatro aminoácidos no pueden ser utilizadas para discriminar por estar presentes en muchas proteínas. Finalmente, este algoritmo permitió seleccionar un total de once enzimas, de las cuales nueve presentaron un buen alineamiento al ser comparadas mediante BLAST® con las IREDs depositadas (Ver Tabla 2.1-2).

Tabla 2.1-2 : Análisis de secuencias con motivo conservado de IRED con más de 30% de identidad utilizando el programa Artemis

Cepa	Secuencia	Codifica	Score con IRED-R	% Identidad	Score con IRED-S	% Identidad
ST105	ST105_06069	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	186	38	185	36
	ST105_00563	putative dehydrogenase	124	37	132	37
ST129	ST129_02583	putative dehydrogenase	144	36	147	37
	ST129_05383	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	192	38	210	35
ST1015	ST1015_00642	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	182	39	176	37
	ST1015_07732	TPR domain protein	---	38	---	36
	ST1015_08219	putative dehydrogenase	132	36	126	37
ST1020	ST1020_04220	putative dehydrogenase	132	36	126	35
	ST1020_07006	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	182	39	176	36
	ST1020_07958	TPR domain protein	---	---	---	---
ST1229	ST1229_07348	Cys-tRNA(Pro) deacylase YbaK	---	---	---	---
	ST1229_06838	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	185	39	184	37

Las nueve potenciales IREDs de genomas nativos fueron analizadas mediante un algoritmo de identificación publicado por Fademrecht *et al.* (2016).¹²³ Este autor establece, en función de una amplia base de datos de iminoreductasas, los motivos correspondientes a la unión al cofactor (NADPH) y al sustrato. El análisis de conservación establece un motivo de unión al cofactor altamente conservado GLGxMGx5[ATS]x4Gx4[VIL]WNR[TS]x2[KR] (verde Fig. 2.1-19) y un sitio activo predominantemente hidrofóbico Gx[DE]x[GDA]x[APS]x3{K}x[ASL]x[LMVIAG] (rojo Fig. 2.1-19). Además, indica la importancia de dos posiciones, 139 y 194, que permitirían clasificar a las IRED en *S* o *R* dependiendo de la presencia de ciertos residuos críticos en estas posiciones. En función de lo anterior fueron seleccionadas dos IREDs estereocomplementarias para continuar con el desarrollo del trabajo (Tabla 2.1-3).

Tabla 2.1-3 – Potenciales IRED seleccionadas para clonado, expresión y estudio

<i>Estereoselectivida d</i>	Cepa	Nº de identificación del gen
<i>S</i>	<i>Streptomyces scabies</i> (ST129)	05383
<i>R</i>	<i>Streptomyces</i> sp. (ST1020)	04220

El gen de la *R*-IRED fue sintetizado por la firma GeneScript®, con codones optimizados para *E. coli*, y clonado en los vectores de expresión pKK223-3 y pET28b(+). Los vectores obtenidos fueron utilizados para transformar las cepas de *E. coli* JM109 y BL21(DE3) respectivamente, obteniéndose los biocatalizadores recombinantes. El análisis de expresión de proteínas de la cepa *E. coli* BL21(DE3) (*pET22b-R-IRED*) reveló que la IRED se encuentra mayoritariamente en la fracción insoluble (Fig. 2.1-20), formando cuerpos de inclusión, lo cual nos llevó a modificar las condiciones de incubación para obtener la proteína soluble. Resta analizar por electroforesis la producción de proteína recombinante en estos nuevos ensayos.

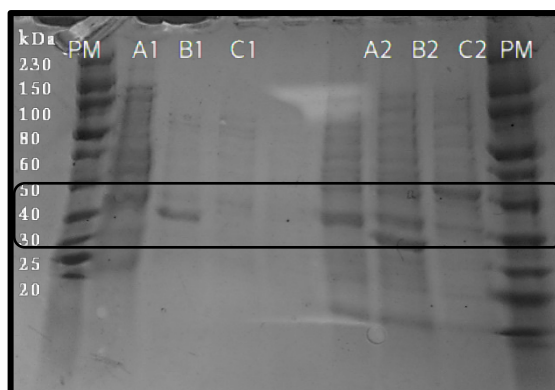
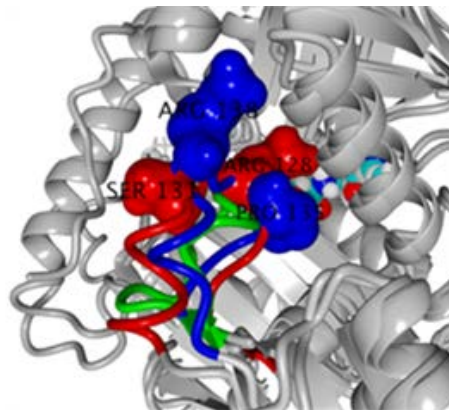


Figura 2.1-20: Análisis de expresión de proteínas por SDS-PAGE PM: marcador de peso molecular ; **FS:** fracción soluble, **FI:** fracción insoluble. **A1:** FS control negativo *E. coli* BL21(DE3) (pET22b); **B1:** FS control positivo *E. coli* (pET28b-IRED S); **C1:** FS *E. coli* BL21(DE3) (*pET22b-R-IRED*) **A2:** FI control negativo *E. coli* BL21(DE3) (pET22b) **B2:** (2): FI control positivo *E. coli* (pET28b-IRED S) **C2:** FI *E. coli* BL21(DE3) (pET22b-R-IRED)

En paralelo se trabajó para la obtención de una cepa recombinante que exprese la potencial *S*-IRED, para lo cual se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 4.1) para el clonado en los vectores de expresión pKK223-3-lacZ y pET22b (+) a partir de ADN genómico de la cepa *Streptomyces scabies* (ST129). Para la obtención del vector de expresión conteniendo el gen que codifica a la *S*-IRED se llevaron a cabo dos estrategias diferentes de clonado: una estrategia convencional, con abordaje clásico utilizando enzimas de restricción y otra de *Restriction Free Cloning*. Hasta el momento, no fue posible obtener un vector de expresión con el gen de la potencial *S*-IRED clonado correctamente. En un futuro próximo se continuará con la optimización de condiciones de clonado por RFC o por enzimas de restricción.

Además, para la cepa *E.coli* BL21(DE3) (pET22b-R-IRED) se debe continuar con la optimización de las condiciones de expresión. En caso de no observar actividad se procederá a construir cepas recombinantes que expresen alguna de las otras nueve enzimas restantes con potencial actividad iminorreductasa.

En conclusión, hasta el momento mediante análisis bioinformático se logró identificar un total de nueve potenciales iminorreductasas a partir del genoma de cinco cepas de *Streptomyces* nativas. A cada una de estas potenciales IREDs se le asignó una estereoselectividad preferencial de acuerdo con los criterios referenciados. Se seleccionaron dos enzimas para su clonado, expresión y caracterización. Esto denota el enorme potencial de estas cepas, por lo que el grupo de trabajo en conjunto con la Prof. María Julia Pianzzola continuará analizando nuevos genomas de otras cepas de *Streptomyces* aisladas.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 2.2

2.2. Explorando bases de datos genómicas microbianas en busca de nuevas transaminasas.

2.2.1. Identificación *in-silico* de nuevas *R*-transaminasas a partir de bases de datos genómicas.

Existen múltiples alternativas para obtener biocatalizadores novedosos, desde el *screening* de microorganismos hasta la evolución dirigida de proteínas. Los grandes avances de la última década en el área de secuenciación masiva de genomas han puesto a disposición de la comunidad científica una gran cantidad de información que sin duda alberga un sin número de novedosos biocatalizadores.

En el inicio de este trabajo, los reportes científicos indicaban que la mayoría de las transaminasas reportadas presentaban la misma enantioselectividad, aportando la amina con configuración *S*.^{98,164} En la actualidad, nuevos biocatalizadores para síntesis enzimática de aminas (Fig. 2.2-1) han sido identificados,^{79,165} manteniéndose dicha tendencia de enantioselectividad *S*.

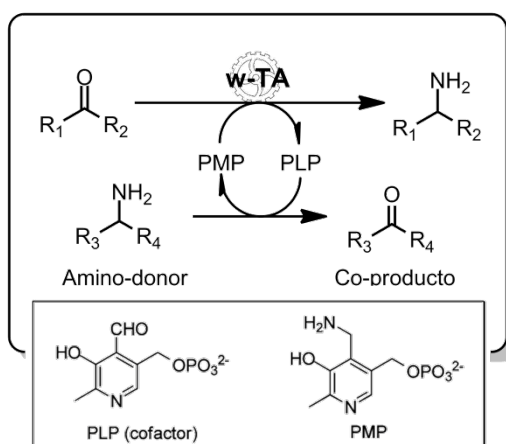


Figura 2.2-1: Esquema de reacción catalizado por transaminasas dependientes de PLP.

Sin embargo, el estudio realizado por *Höhne et al.*¹⁶⁶ en el año 2010 abrió las puertas para el descubrimiento de nuevas *R*-transaminasas. Un análisis cuidadoso de los motivos típicos de transaminasas dependientes de PLP tipo IV que participan en la síntesis de aminoácidos, incluidas las transaminasas de cadena ramificada (BCAT), las D-aminoácido transaminasas (DATA) y ciertas liasas de la misma clase, condujo a un algoritmo confiable que permitió identificar nuevas *R*- ω -transaminasas.

Este método, se divide en dos grandes etapas, la primera consiste en identificar y predecir los aminoácidos claves determinantes de la estereoselectividad, basándose en secuencias de enzimas disponibles que contengan la actividad deseada o relacionada. El segundo paso, requiere hacer un rastreo de dichos motivos proteicos en la base de datos, depurar la misma y seleccionar las posibles secuencias candidatas.

En la Fig. 2.2-2 se observan los aminoácidos claves para la actividad de transaminasas dependientes de PLP tipo IV, así como una comparación de los residuos participantes de la coordinación del sustrato entre D-transaminasas (D-TA), transaminasas de cadena ramificada (BCAT) y 4-amino-4- desoxicoristamato liasas (ADCL).

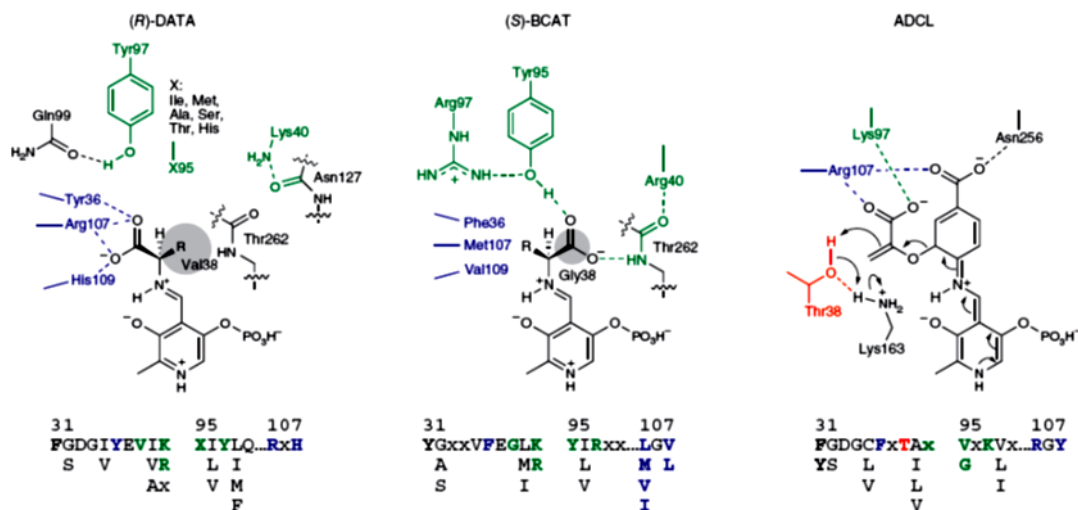


Figura 2.2-2 : Principales motivos aminoácidos que permiten predecir la función de las proteínas de PLP clase IV (Tomado de Hohne *et al.* 2010).

Conociendo el constante aumento exponencial de las bases de datos de genomas, teniendo en cuenta que este aumento presenta nuevos genomas que han sido anotados por estudios simples de homología, y que el análisis indicó nula asignación de *R*-transaminasas, se decidió realizar una búsqueda de nuevas *R*-transaminasas PLP-dependientes tipo IV registradas en bases de datos entre los años 2010 y 2015.

Para ello, se analizó en detalle la base de datos utilizando como molde cuatro secuencias: una secuencia de una BCAT(PDB ID: 1IYD), una secuencia de una D-TA(PDB ID: 3DAA) y dos secuencias de *R*-TA cristalizadas(PDB ID: 4CMD y 4CE5), publicadas entre los años 2010-2015.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ Con las secuencias seleccionadas, se utilizó la base de datos de NCBI para la búsqueda de secuencias de proteínas mediante BLAST. Se realizó una selección por porcentaje de identidad y e-Score, todas las secuencias con un mínimo de 30% de identidad fueron seleccionadas, posteriormente, se realizó el estudio de

homología de secuencias utilizando la opción de alineamiento en Jalview del programa Clustal-Omega.¹⁷¹

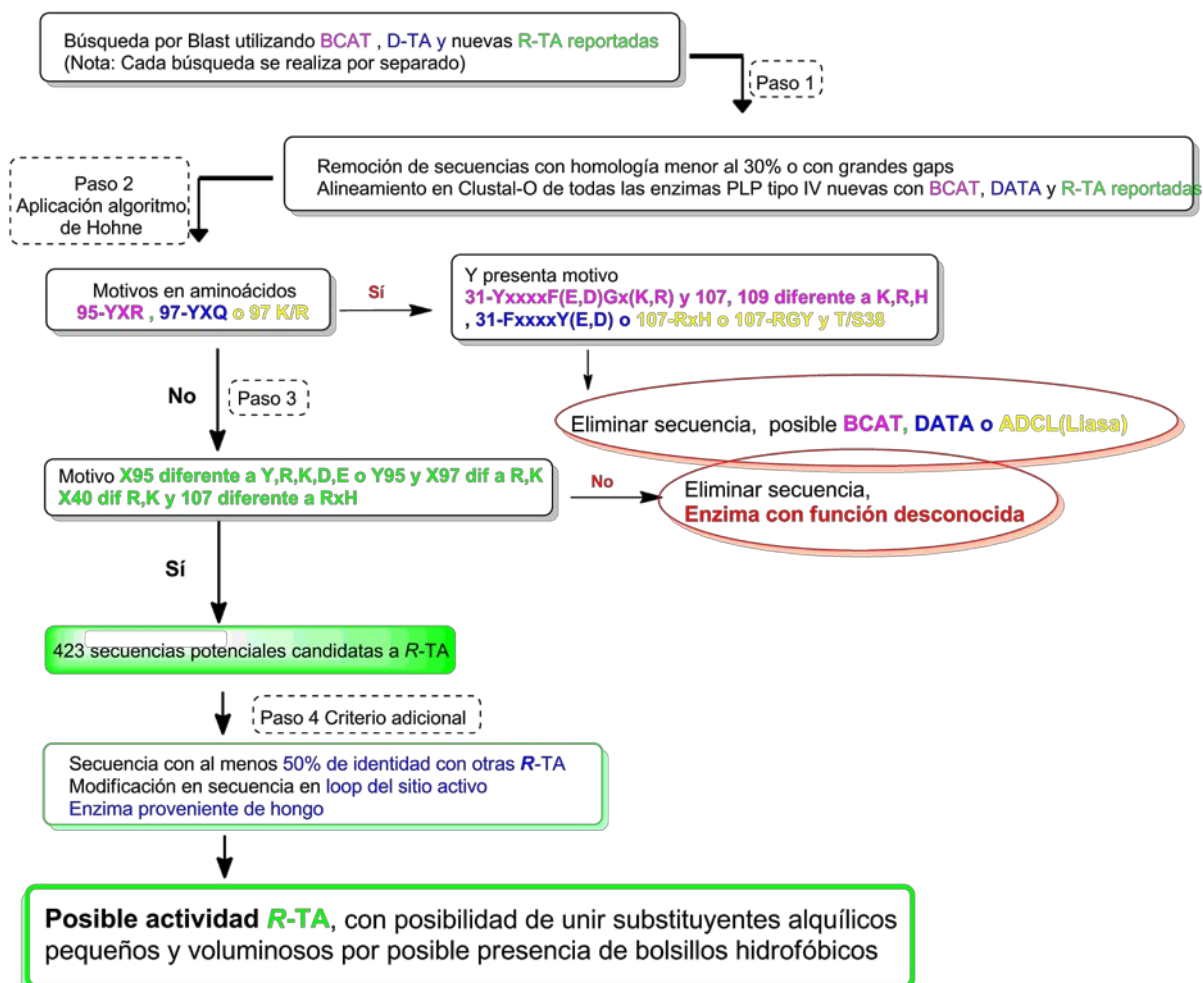


Figura 2.2-3: Representación esquemática del proceso bioinformático aplicado para identificar R-TA Cap. Las posiciones de aminoácidos se refieren a la Fig. 2.2-2 y siguen la asignación hecha por Höhne *et al.*¹⁶⁶

A las secuencias alineadas por el programa Clustal-Omega¹⁷² se aplicó el algoritmo diseñado por Höhne con ciertas modificaciones, este método se basa en un análisis racional de los motivos estructurales presentes y característicos que pueden ser utilizados como guía para determinar la actividad enzimática (BCAT, DATA, ADCL o RTA) asociada a la secuencia (Fig. 2.2-3).

Como resultado primario se observó que en base de datos existen al menos 10000 nuevas secuencias que presentan más de 30 % de identidad con las enzimas utilizadas en la búsqueda. Estas enzimas que podrían ser anotadas como transaminasas dependientes de PLP tipo IV se encuentran la mayoría de ellas asignadas con funcionalidad BCAT o D-TA, el resto se describían como proteínas hipotéticas.

Las secuencias obtenidas en BLAST fueron alineadas en Clustal-Omega en series de 1000 secuencias, se aplicó el algoritmo de Höhne y se observó que, aún tras dicha depuración, 423 secuencias presentaban motivos aminoacídicos que indicaban alta probabilidad de tener actividad *R*-TA. Cabe destacar el aumento en secuencias obtenidas aplicando el mismo algoritmo 5 años después, lo cual indica el alto potencial oculto en las bases de datos de genomas exponencialmente creciente y la utilidad de este tipo de enfoques bioinformáticos para detectar fácilmente nuevos biocatalizadores. Además, es importante mencionar que la mayoría de estas secuencias se encontraban anotadas como BCAT o D-TA lo cual confirmó nuestra hipótesis que las *R*-TA no han sido tenidas en cuenta al realizar anotación de genomas.

Estas 423 secuencias fueron analizadas con tres criterios adicionales establecidos por nuestro grupo de trabajo:

- Descartar secuencias con menor a 40% y mayor a 55% de identidad con *R*-TAs PLP tipo IV de actividad conocida.
- Elegir secuencias que pertenezcan al reino Fungi, considerando que los hongos presentan una mayor diversidad enzimática y que han sido menos explorados.
- Realizar un análisis más profundo del motivo de aminoácidos específicos vinculados al sitio activo dentro de las secuencias restantes.

La aplicación de estos criterios permitió seleccionar una secuencia proteica promisoría perteneciente al hongo *Capronia semiimera*. La fig. 2.2-4 describe la secuencia aminoacídica de dicha proteína.

>Secuencia CAP TA

MTTMEKIFSAYQARVSTLTASRASNPFDGIAWVQGRVTPHEAQIPMLDQGFLHSDLTVDVPSVWDGRF
 FRLDDHLERLERSCAKMRLRCPLPRAQVRHTLCAMLARSGIRDAFVELIVTRGLRGVRLSAAEVDALP
 NSLYMWIVPYVWVMEPAVQLAGSGSAIVARTVHRTPPVCMPTVKNLQWGDLTRGMFEANDRGAGYPF
 LTDRSISEETADANITEGSGFNIVVVKDGLHTPKRGVLEGVTTRESVFECCRRLGVPYALDTPVRLALED
 MCTTAGGIMPITLDGKPVGDGAVGPITRQIWDVYVRLHYEDGFSFAVDYEDETGLEGVANGNANGTVSA

Figura 2.2-4: Secuencia aminoacídica de transaminasa seleccionada. En amarillo se marcan los motivos analizados.

En la Fig. 2.2-5 puede observarse que, el sitio activo presenta los motivos característicos de una *R*-TA con una sustitución de arginina por serina en la posición 40 y de tirosina por fenilalanina en la posición 95, acompañado del motivo FVE típico de la mayoría de las *R*-TA. Resultó particularmente interesante una inserción de dos aminoácidos en la región del *loop* o bucle cercano al sitio activo (posiciones 110-111 del alineamiento, Fig 2.2-5). Cabe destacar que, el trabajo de Höhne et al. no tuvo en cuenta la presencia de inserciones en este *loop*, ya que consideraron que este *loop* era una estructura altamente variable.¹⁶⁶ Sin embargo, un trabajo reciente realizado por Tanokura y su grupo reveló que la orientación de este *loop* puede tener una gran influencia en la especificidad del sustrato, y puede alterar en forma muy importante la conformación y volumen del túnel de acceso del sustrato al sitio activo.¹⁷³

	Sequence motif 1	Sequence motif 2
	31 36 40	95 99 107
DATA Bacillus subtilis	F G D G I Y E V I R V Y K G -	A V Y I Q T T R G V A P R K H - - Q - -
BCAT 2E1Y:A PDBID	Y G T S V F E G I R A Y E T A	Y I R P L A W M G A K A L G V - - N P -
ADCL gi 129534	F G D G C F T T A R V I D G -	V L K V V I S R G S G G R G Y - - S T -
Capronia semiimmersa gi 759291104	H S D L T Y D V P S V W D G -	F V E L I V T R G L R G V R G L S A A E
Aspergillus oryzae RIB40 gi 317141394	H S D L T Y D V P S V W D G -	F V E L I V T R G L K G V R G - - N K P
Aspergillus fumigatus Af293 gi 70986662	H S D L T Y D V I S V W D G -	F V E V I V T R G L T G V R G - - S K P
Neosartorya fischeri NRRL 181 gi 119483224	H G D L T Y D V T F V W D G -	F V E V I V T R G L T G V R G - - S K P
Mycobacterium gi 500105663	H S D L T Y T V A H V W H G -	F V N L T I T R G Y G K R K G - - E K D
Nectria 4CMD:A PDBID	H S D L T Y D V P S V W D G -	F V E L I V T R G L T G V R G - - A K P
Arthrobacter 3WWH:A PDBID	H S D V T Y T V F H V W N G -	F V S V S I T R G Y S T P G - - E R D

Figura 2.2-5: Alineación de posible *R*-TA de *Capronia semiimmersa* y *R*- ω -transaminasas previamente reportadas. Se resaltan las posiciones importantes para los algoritmos descritos por Höhne. Los residuos 130 y 131, corresponden a una inserción en el bucle de sitio activo y se indican en negrita.

Se realizó un análisis filogenético de *R*-TA Cap comparándola con las transaminasas anteriormente reportadas. Como puede observarse en la Figura 2.2-6, aunque *R*-TA Cap se agrupó junto con el resto de las ω -TA fúngicas, se encuentra filogenéticamente alejada de aquellas previamente caracterizadas. Esto es esperable ya que *Capronia* es un género de la familia Herpotrichiellaceae de ascomycotas, lejanamente relacionado con *Aspergillus*, *Fusarium* y otros géneros para los que ya se han descrito transaminasas.^{10,166}

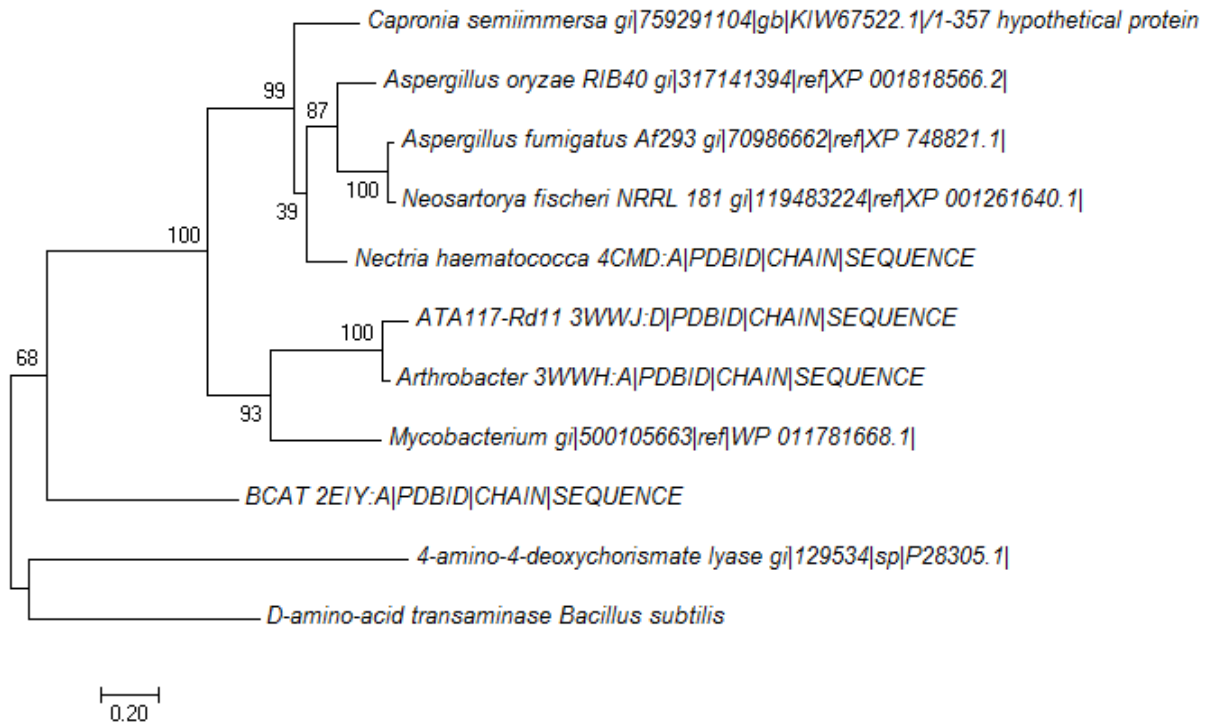


Figura 2.2-6: Árbol filogenético obtenido de *R*-TA Cap y otras transaminasas reportadas.

2.1.1. Clonado, expresión y caracterización de R-TA de *Capronia semiimmersa*

El gen de la R-TA seleccionado fue sintetizado por la firma GeneScript®, con codones optimizados para *E. coli*, y clonado en el vector de expresión pKK223-3 y el vector de clonado pUC-57. Los vectores obtenidos fueron utilizados para transformar las cepas *E. coli* JM109 y *E. coli* Top 10 respectivamente, obteniéndose los biocatalizadores recombinantes (Tabla 2.2-1).

Tabla 2.2-1: Cepas diseñadas y vectores utilizados

Cepa recombinante	Vector
<i>E. coli</i> JM109 (pKK223-R-TA Cap)	pKK 223-3-R-TA Cap
<i>E. coli</i> Top 10 (pKK223-R-TA Cap)	pKK 223-3 R-TA Cap
<i>E. coli</i> Top 10 (pUC-R-TA Cap)	pUC 57-kan R-TA Cap

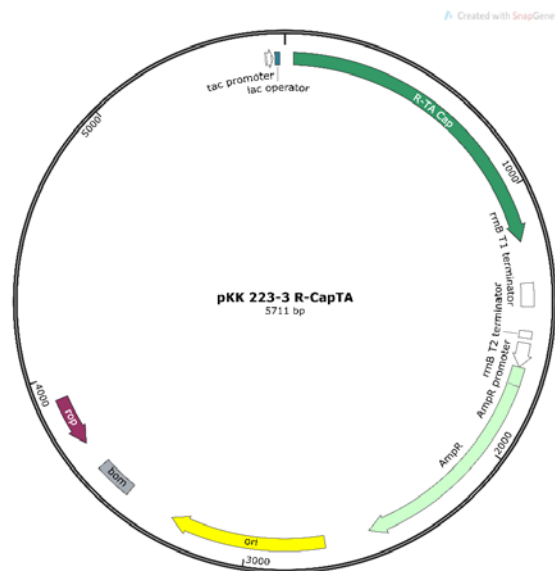


Figura 2.2-7: Plásmido construido pKK223-3 R-TA Cap.

Con la cepa recombinante *E. coli* JM109 (pKK223-R-TA Cap) se realizó el estudio de expresión correspondiente en condiciones utilizadas previamente con otras cepas en nuestro laboratorio. Se evaluó la expresión en LB-Amp a 20°C y 30°C, y en medio de autoinducción *Terrific Broth Base* sin elementos traza (AIM-TB) a 28°C. Como se observa en la Figura 2.2-8, existe expresión mayoritariamente insoluble a las 48hs de inducción a 20°C, mientras que a 30°C se observa una leve expresión soluble a las 24hs que desaparece a las 48hs de inducción. En cambio, en AIM-TB a 28°C se observa producción de proteína mayoritariamente soluble. En conclusión, estas últimas condiciones aportan un nivel aceptable de proteína soluble en los ensayos de expresión de la cepa *E.coli* JM 109 (pKK223-3 R-TA Cap) para ser usado en ensayos de actividad.

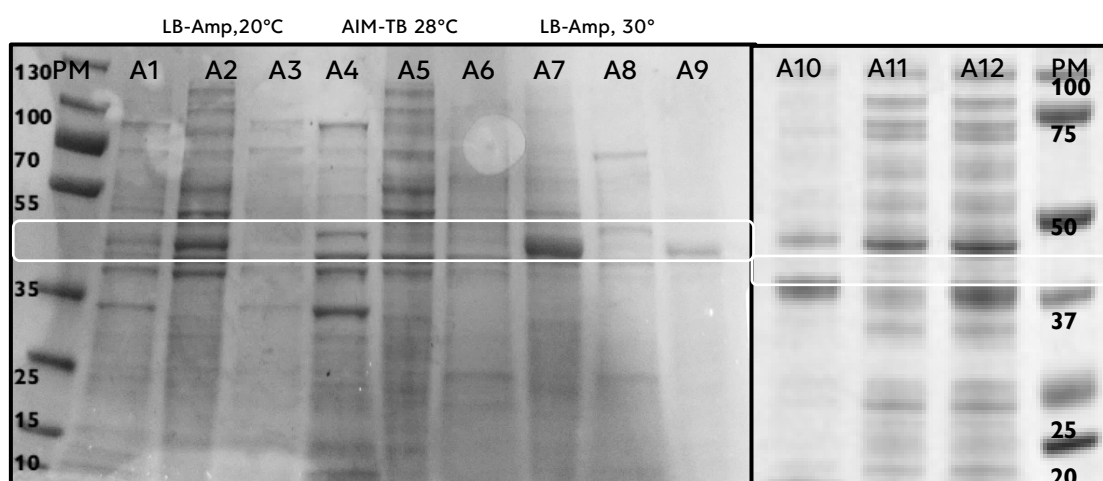


Figura 2.2-8: SDS-PAGE TA de R-TA Cap expresada en *E.coli* en diferentes condiciones: **A1:** LB-Amp Fracción soluble 20°C, 48hs **A2:** LB-Amp Fracción insoluble 20°C,48hs **A3:** LB-Amp Fracción soluble 20°C, 24hs **A4:** Fracción soluble AIM-TB 28°C, 48hs, **A5:** Fracción insoluble AIM-TB, 28°C, 48hs. **A6:** LB-Amp Fracción soluble 30°C, 48hs **A7:** LB-Amp Fracción insoluble 30°C, 48hs, **A8:** LB-Amp Fracción soluble 30°C, 24hs, **A9:** LB-Amp Fracción insoluble 30°C 24hs Controles: **A10:** LB-Amp Fracción soluble 20°C, 48hs *E.coli* JM 109 (pKK223-3) **A11:** LB-Amp Fracción soluble 30°C, 48hs *E.coli* JM 109 (pKK223-3), **A12:** AIM-TB Fracción soluble 20°C, 48hs *E.coli* JM 109 (pKK223-3) Nota: PM proteína 43 kDa.

2.2.1.1. Caracterización y estudio de actividad de *R*-transaminasa

En primera instancia, se analizó la estereoselectividad del biocatalizador mediante ensayos de actividad de desracemización con un panel variado de aminas racémicas (Fig. 2.2-9). Estas reacciones se llevaron a cabo en presencia de piruvato como grupo amino-aceptor mediante biotransformaciones con células en reposo del biocatalizador recombinante. Como se observa en la Tabla 2.2-1, mediante este ensayo se pudo determinar que la cepa *E.coli* JM 109 (pKK223-3 *R*-TA Cap) presenta excelente especificidad por el enantiómero *R* de la amina **15**, confirmando de esta manera, que la secuencia seleccionada es una *R*-TA PLP dependiente de tipo IV. Esto es de destacar ya que esta enzima se encuentra mal clasificada en la base de datos NCBI como proteína hipotética o sea no clasificada como una TA.

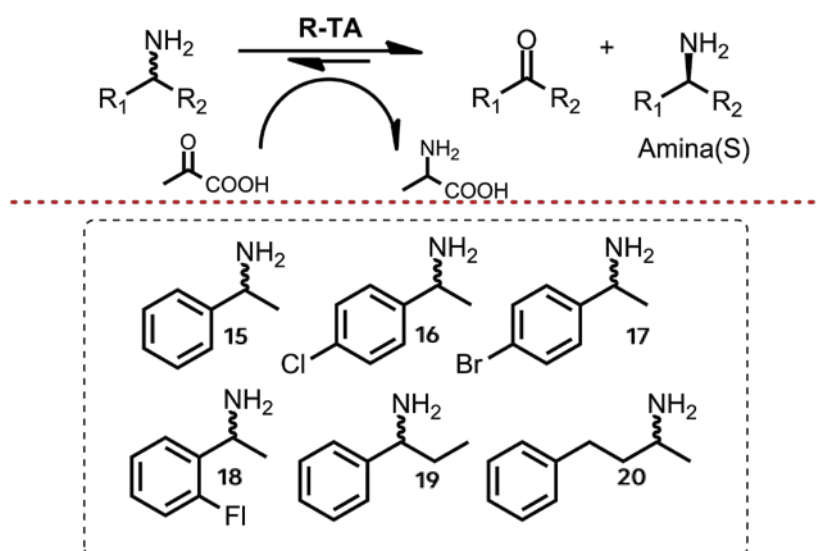
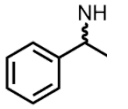
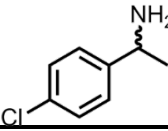
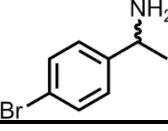
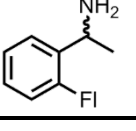
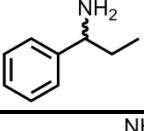
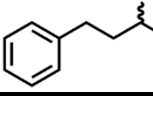


Figura 2.2-9 : Caracterización de especificidad de sustratos de *R*-TA Cap usando D-Alanina como grupo amino-donor

Además, se observó buena actividad con varias aminas derivadas del sustrato **15** sustituidas en el anillo aromático. Con el sustrato **20** (4-fenil 2 butilamina), el cual presenta una estructura alquílica de 2 carbonos entre el anillo y la amina se observa una buena actividad, demostrando que esta variante estructural no afecta la actividad enzimática, mientras que con el sustrato **19** se detectó la menor actividad en este primer rastreo.

De la tabla se puede deducir que la cepa *E.coli* JM 109 (pKK223-3 R-TA Cap) presenta una muy interesante actividad con un amplio rango de aminas quirales. Claramente se observa que la enzima presenta un bolsillo hidrofóbico pequeño el cual limita su uso a metil aminas.

Tabla 2.2-2 : Desracemización de mezclas racémicas utilizando células en reposo de <i>E.coli</i> JM 109 (pKK223-3 R-TA Cap)			
Sustrato	Amino-aceptor	Conversión de Amina-R%	e.e % de enantiómero-(S)
	Piruvato	100	99
	Piruvato	24	14
	Piruvato	20	10
	Piruvato	70	44
	Piruvato	14	9
	Piruvato	22	27

La causa de la diferencia de actividad entre metilbencilamina (15) y etilbencilamina (19) se puede visualizar en la Figura 2.2-10 mediante un docking molecular del intermediario PLP-etilbencilamina realizado en el sitio activo de *R-TA Cap*. El sitio activo presenta un bolsillo pequeño en el cual participan los residuos en las posiciones V62, F115, A286, T250 donde se acomoda el grupo metilo, y un bolsillo grande que interactúa con el anillo aromático.

Verificada la actividad de la proteína y su estereoselectividad se procedió a realizar ensayos de síntesis asimétrica utilizando D-alanina como aminodonor a partir de la cetona proquiral (Fig. 2.2-11 y Tabla 2.2.-2), esta reacción es la de mayor interés a nivel industrial como se describió en la introducción.

En estos ensayos, se desplazó el equilibrio de reacción mediante el acoplamiento de la reacción enzimática con lactato deshidrogenasa (LDH) que reduce el piruvato formado a ácido láctico durante el proceso de transaminación. El NADH requerido se recicló mediante la adición de glucosa y glucosa deshidrogenasa (GDH), que mediante la formación de gluconolactona permitió el consumo de NAD^+ regenerando el NADH (Fig. 2.2-11).

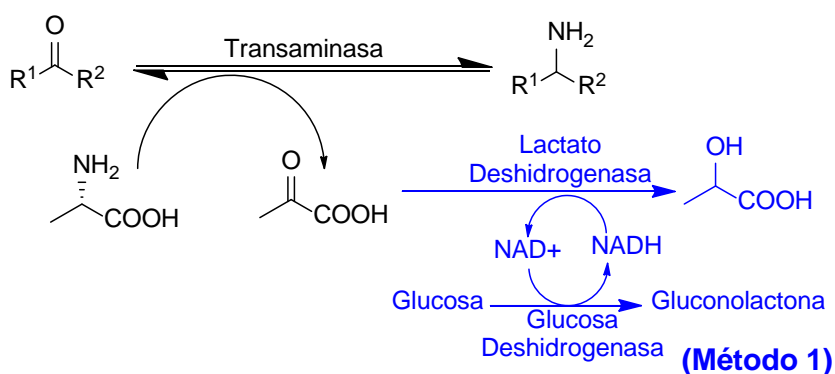
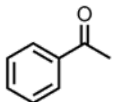
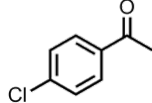
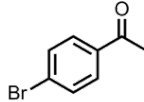
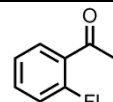
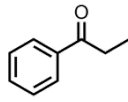
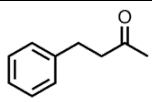


Figura 2.2-11: Sistema de reacción TA-GDH-LDH

Tabla 2.2-3: Síntesis asimétrica de aminas quirales con extracto celular de <i>E.coli</i> JM 109 (pKK223-3 R-TA Cap) con D-alanina como amino-donor		
Sustrato	Conversión %	e.e de enantiómero-(R)
	45	99
	12	99
	9	99
	23	99
	5	99
	41	99

Como se observa en la Tabla 2.2-2, fue posible obtener la amina enantioméricamente pura para todas las cetonas estudiadas, con rendimientos medios a bajos, distando del rendimiento que demanda este tipo de reacción para su aplicación en síntesis a mayor escala.

La disminución de la conversión en la síntesis asimétrica respecto a la desracemización puede estar influenciada por varios factores, entre ellos los más importantes son:

- a. cantidad de enzima utilizada provenientes de los extractos
- b. cantidad de LDH o GDH utilizada
- c. existencia de lactato o piruvato en exceso provenientes de los lisados que alteren el equilibrio del sistema planteado

Las opciones a y b fueron evaluadas por medio de realización de ensayos con lisados más concentrados, en estos ensayos se obtuvieron igual o menores rendimientos.

Normalmente, y en trabajos previos publicados de esta tesis, se utiliza GDH y LDH comerciales.^{84,174} Este sistema resulta de muy alto costo por lo cual se decidió

utilizar extracto clarificado para dos de tres de las enzimas del sistema. La utilización de clarificados puede acarrear compuestos presentes en el metabolismo celular, entre ellos piruvato o lactato. La presencia de cualquiera de los dos va a incidir directamente en el equilibrio del sistema, haciendo la reacción más lenta o logrando que el sistema GDH-LDH se sature antes de la conversión total del sustrato. Este resultado indicaba que para obtener reacciones con conversiones aceptables requeríamos utilizar *R-TA Cap* y GDH como enzimas aisladas.

La cantidad de *R-TA Cap* presente en el extracto de lisado celular es un parámetro muy importante, varios trabajos recientes indican el uso de 2-3 mg/mL de reacción como la cantidad de enzima óptima para este tipo de proceso, en nuestro caso, para realizar este estudio con al menos 6 sustratos requerimos al menos 12-18 mg de enzima para llevar a cabo reacciones a escala analítica de 1mL. A pesar de varios intentos, mediante la concentración de los lisados celulares por medio de filtros de corte, no fue posible obtener mayores conversiones en la síntesis asimétrica de aminas. Estimar la cantidad de enzima utilizada no fue posible.

Teniendo en cuenta que, los lisados no son efectivos y que se necesitan cantidades considerables de enzima purificada para realizar las reacciones de síntesis asimétrica, se decidió clonar el gen de la *R-TA* en el vector de expresión pET22b+, el cual se caracteriza por ser un vector de alto número de copia y contener un promotor fuerte T7, lo que garantiza una mayor producción de enzima. A su vez, permite el clonado de la enzima con residuos de histidina, lo que facilita su posterior purificación por cromatografía de afinidad IMAC.

2.2.1. Clonado y expresión en pET22b+ de *R-TA* de *Capronia semiimera*

El gen de la *R-TA* fue sintetizado por la firma GeneScript®, con codones optimizados para *E. coli*, y clonado en el vector de expresión pET22b+. El vector obtenido fue utilizado para transformar las cepa *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* Top10 respectivamente, obteniéndose las cepas recombinantes. Con la cepa recombinante *E. coli* BL21(DE3) (pET22-*R-TA* Cap) se realizó el estudio de expresión correspondiente. Este estudio se acotó a las condiciones de expresión óptimas utilizadas previamente para la cepa *E. coli* JM109 (pKK223-*R-TA* Cap). Con el medio AIM-TB se analizó expresión a 37°C a las 16 horas y 28°C a las 48 hs. Se observó que existe un nivel óptimo de proteína soluble en la cepa *E. coli* BL21(DE3) (pET22-*R-TA* Cap) en AIM-TB a las 48 hs a 28°C.

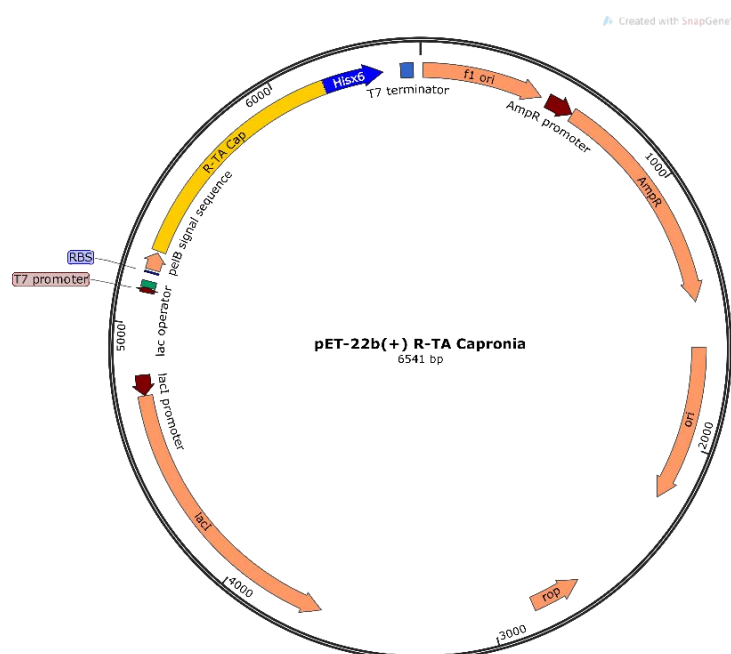


Figura 2.2-12: Plásmido pET22b(+) *R-TA* Cap construido. El gen de la *R-TA* se clono en fase a la cola de 6 histidinas para posterior purificación de la enzima.

El análisis de expresión demostró que la proteína *R-TA Cap* se expresaba de manera insoluble en AIM TB a 37°C mientras que, en AIM TB a 28°C la cepa *E. coli* BL21(DE3) (pET22-*R-TA Cap*) produce *R-TA* en forma mayoritariamente soluble. En comparación al sistema de expresión anterior utilizado, este sistema muestra mayor expresión y además tiene la ventaja de que la proteína contiene una cola de histidinas en su zona N-Terminal, permitiendo purificación por cromatografía de afinidad. Esta cepa se utilizó entonces para obtener la enzima mediante purificación por cromatografía de afinidad con Ni-NTA. A partir de 800mL de AIM-TB inoculado con *E. coli* BL21(DE3) (pET22-*R-TA Cap*) se logró obtener 38 mg de *R-TA* purificada (Fig. 2.2-13).

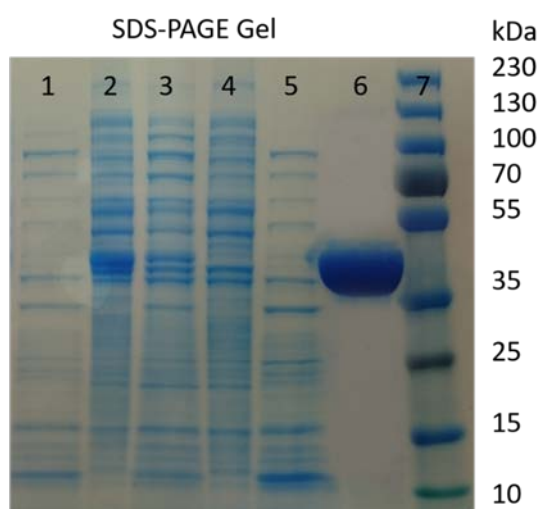


Figura 2.2-13: SDS-PAGE de *R-TA Cap* sobrepresada y purificada por IMAC; **Carril 1:** AIM TB 37°C 16hs Soluble; **Carril 2:** AIM TB 37°C 16hs Insoluble; **Carril 3:** AIM TB 28°C 24hs soluble; **Carril 4:** AIM TB 28°C 24hs Insoluble; **Carril 5:** Percolado crudo de extracto durante la carga de la columna; **Carril 6:** fracciones de proteína *R-TA Cap* después de la purificación IMAC. **Carril 7:** Marcador de peso molecular. (AIM TB = Autoinduction *Terrific Broth Base*)

Con la enzima purificada en cantidades suficientes para evaluación de varios sustratos, se procedió a realizar síntesis asimétrica utilizando el método ilustrado en la Figura 2.2-14; los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 2.2-4.

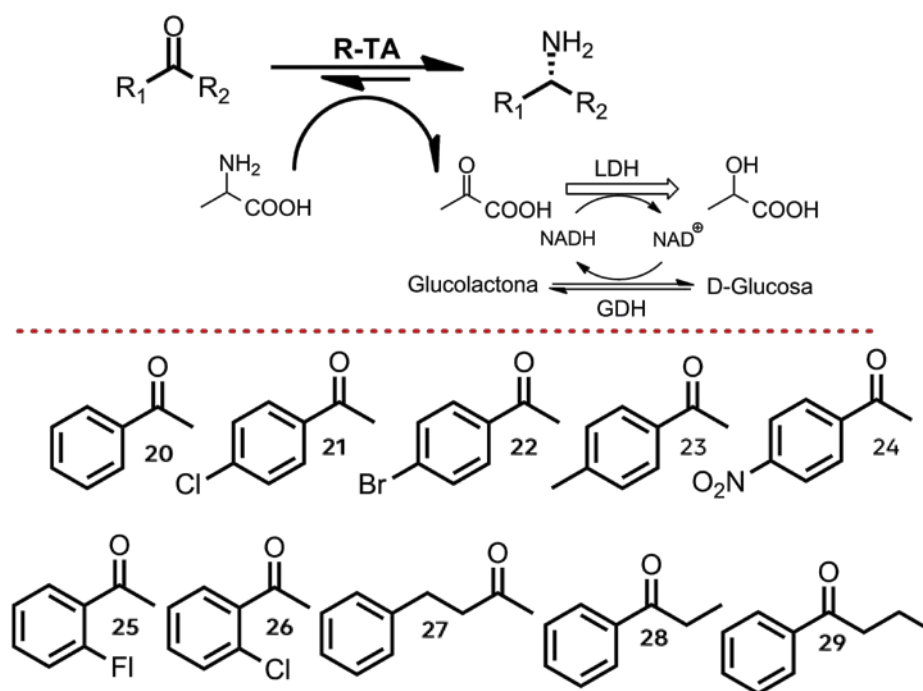
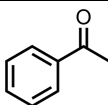
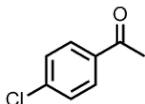
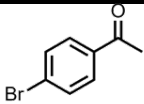
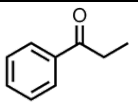
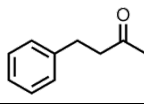
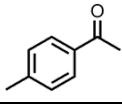
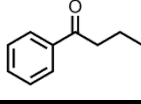
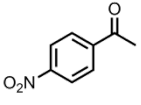
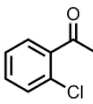


Figura 2.2-14: Caracterización de la especificidad de sustrato de R-TA Cap usando D-alanina como aminodonor.

En estas condiciones de ensayo, el mejor sustrato fue 4-fenil 2-butanona (**27**), para el cual la conversión completa se logró en 24 horas, seguido por *p*-metilacetofenona (**23**) con una conversión del 95 %. Con los sustratos *o*-Cl-acetofenona (**26**) y acetofenona (**20**) se obtuvo el enantiómero *R* de las aminas correspondientes con muy buenos rendimientos. La única metilcetona que presentó baja conversión fue *p*-Br-acetofenona (**22**). Para el caso de sustratos más voluminosos como **28** y **29** se observó baja o nula conversión. Cabe destacar en todos los casos se obtuvo el enantiómero *R* con un exceso enantiomérico > 99%.

La complejidad del sistema multienzimático requerido para favorecer la transaminación, sumado al gasto económico realizado por reacción, ha impedido el uso de ω -transaminasas a nivel industrial. Para ello las industrias han buscado alternativas acordes a lo que requiere una reacción realizada a gran escala, es por esto de vital importancia buscar alternativas al sistema multienzimático utilizado, descubriendo nuevos sustratos aminodadores que disminuyan el costo global de la reacción. Como se describió en la introducción, en el ejemplo de la síntesis enzimática industrial de sitagliptina, la isopropilamina ha sido aplicada con éxito como grupo aminodonor en la industria farmacéutica.

Tabla 2.2-4 : Síntesis asimétrica de aminas quirales con R-TA Cap purificada utilizando D-alanina como aminodonor		
Sustrato	Conversión %	e.e de enantiómero-(R)
	80	99
	60	99
	10	99
	5	99
	100	99
	95	99
	0	nd
	40	99
	90	99

En paralelo a este trabajo, nuevos aminodonores aparecían en la escena científica como buenos candidatos a ser utilizados. El trabajo publicado por Slabu *et al.* presenta como novedoso el uso de las diaminas cadaverina y putrescina como nuevos sustratos aminodonores sin necesidad de enzimas secundarias.¹⁰⁴ Estas diaminas se presentan como sustratos alternativos atractivos para las transaminasas por su costo relativamente bajo y porque tras la transaminación, las diaminas se convierten en aminoaldehídos reactivos, que ciclan espontáneamente a iminas cíclicas, lo que impulsa la reacción hacia la formación del producto.

En base a esto, decidimos realizar un rastreo de los aminodonores isopropilamina, butilamina, cadaverina y putrescina con *R*-TA Cap (Fig. 2.2-15). Los resultados se presentan en la Tabla 2.2-5, la conversión es buena para isopropilamina y muy baja para butilamina como aminodonor, mientras que con ninguna de las diaminas se observó conversión. Aunque las conversiones con isopropilamina obtenidas son menores que las obtenidas cuando se usa D-alanina, las conversiones son buenas y el sistema puede ser optimizado aún más, representando una ventaja muy alta en simplicidad y costos asociados.

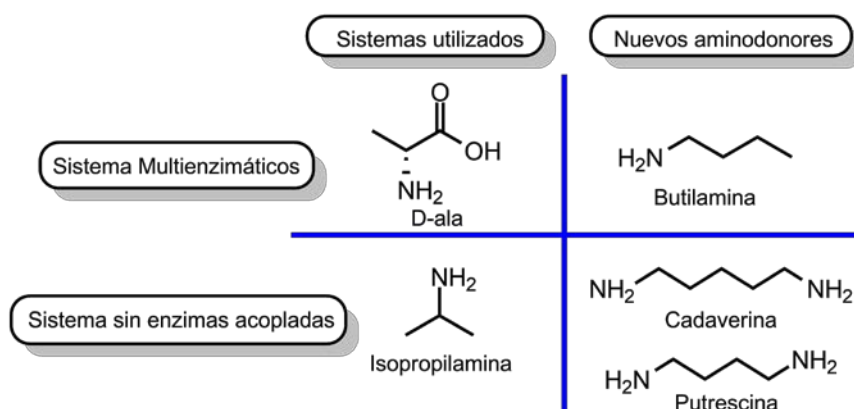
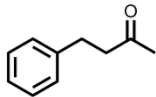
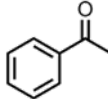
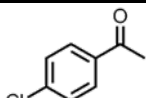
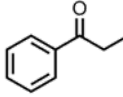


Figura 2.2-15: Esquema con diferentes aminodonores aplicados a la síntesis asimétrica de aminas

Tabla 2.2-5 : Síntesis asimétrica de aminas quirales <i>R</i> -TA purificadas de <i>C. semimerssa</i> con diferentes aminodonores.			
Sustrato	Aminodonor	Conversión %	e.e de enantiómero-(<i>R</i>)
	 Isopropilamina	60	99
	 Butilamina	5	99
	 Cadaverina	0	99
	 Putrescina	0	99

La falta de actividad de las ω -TA normalmente utilizadas hacia las diaminas alifáticas tales como putrescina (1,4-diaminobutano) y cadaverina (1,5-diaminopentano) ha sido reportada previamente.^{104,175} De hecho, el único ejemplo encontrado recientemente es una transaminasa comercial (ATA256) a través de una extensa selección de biocatalizadores de Codexis, demostrando la rareza de tal actividad.¹⁷⁶ En base a los resultados obtenidos se ensayó isopropilamina con diferentes sustratos como se observa en la Tabla 2.2-6. En todos los casos las conversiones fueron menores a las obtenidas utilizando D-Alanina acoplado al complejo multienzimático GDH-LDH.

Tabla 2.2-6: Síntesis asimétrica de aminas quirales <i>R</i> -TA purificadas de <i>C. semiimmersa</i> con isopropilamina como aminodonor.		
Sustrato	Conversión %	e.e % del enantiómero-(R)
	60	99
	45	99
	23	99
	0	99

Para ser una proteína natural es notable que *R*-TA-Cap acepte isopropilamina como donador de amina, ya que muchas transaminasas reportadas no aceptan isopropilamina como sustrato.¹⁷⁷ Estas conversiones son aceptables, aunque deberán ser optimizadas aún más mediante diferentes estrategias como, por ejemplo, la evolución dirigida de proteínas.

2.2.1.1. Determinación de parámetros cinéticos y temperatura óptima.

Posteriormente, con la enzima purificada, se determinaron los parámetros cinéticos para la conversión de *R*-MBA (**15**) a acetofenona (**20**). Para la *R*-TA Cap se determinó un K_m aparente de 0,30 mM (Ver Experimental). El K_m es un orden menor que la K_m reportada para la *R*-TA de *Arthrobacter* (Iwasaki *et al.*),¹⁷⁸ indicando que *R*-TA Cap presenta una mayor afinidad por este sustrato. También es un orden menor para la *S*-TA de *Halomonas elongate* (Cerioli *et al.*)¹⁷⁹ el cual se determinó con S-MBA. Además, fueron determinadas la V_{max} y la k_{cat} , *R*-TA Cap presenta una V_{max} aparente de $8,7 \times 10^{-5}$ mM/s y un k_{cat} aparente de $0,156 \text{ s}^{-1}$ (Ver Experimental).

Otra característica determinada fue la temperatura óptima, los resultados indicaron que se sitúa a una temperatura cercana a 35°C (Fig. 2.2-16) comparable a la descrita anteriormente para *R*- ω -TA caracterizadas a partir de otros hongos.¹⁷⁷

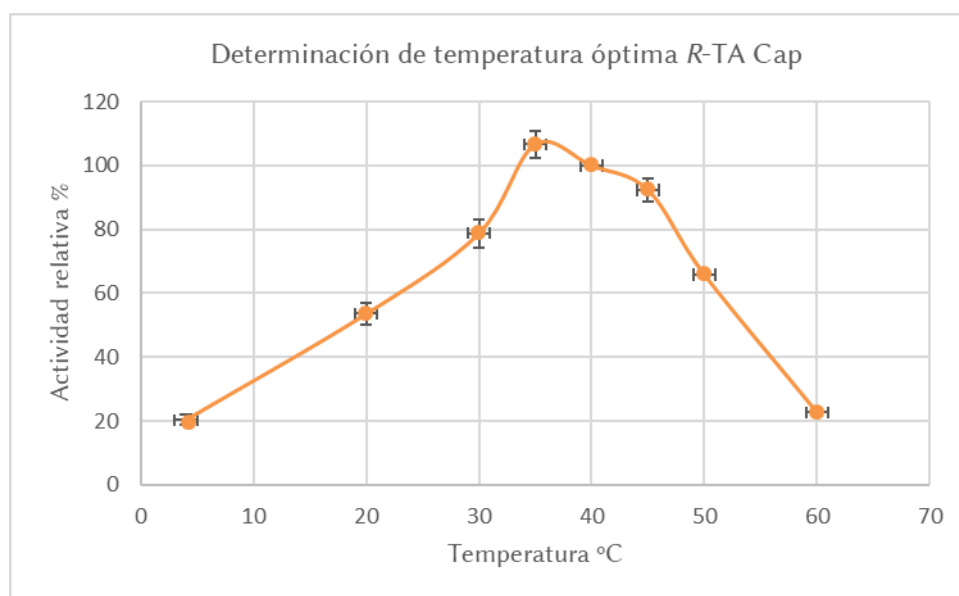


Figura 2.2-16: Determinación de temperatura óptima.

2.2.1.2. Análisis bioinformático de *R*-TA Cap

Finalmente, teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos y para evaluar la influencia de las diferencias estructurales entre *R*-TA Cap y *R*-TAs fúngicas previamente reportadas, evidenciadas en el árbol filogenético por la lejanía de nuestra secuencia a otras *R*-TAs y la inserción en el *loop* cercano al sitio activo, realizamos un análisis bioinformático utilizando el programa YASARA. La predicción de la estructura de *R*-TA Cap se realizó mediante modelado por homología¹⁸⁰ basado en las estructuras cristalinas reportadas de cinco *R*-TAs, las mismas fueron *R*-TA de *Nectria hematococa* (PDB4CMD), *R*-TA de *A. fumigatus* (PDB 4CHI), *R*-TA de *A. terreus* (PDB 4CE5), *R*-TA de *Arthrobacter* (PDB 3WWH) y su mutante G136F (PDB 3WWI).^{169,170,173,181}

Por otro parte, para ayudar al modelado de los *loops*, se obtuvo una predicción de estructura secundaria para la secuencia objetivo. Esto se logró ejecutando PSI-BLAST para crear un perfil de secuencia objetivo y alimentando al algoritmo de predicción de estructura secundaria de PSI-Pred.¹⁸² Se crearon un total de 24 modelos independientes y YASARA combinó las mejores partes de los 24 modelos para obtener un modelo híbrido. En general, se observó que las estructuras de las cinco *R*-TA son muy similares. Sin embargo, existe una diferencia importante en el *loop* cercano al sitio activo. Una alineación estructural de *Arthrobacter R*-TA (PDB 3WWH), su mutante G136F (AP 3WWI) y *R*-TA Cap muestra que este último *loop* está muy relacionado con el *loop* del mutante G136F y no con el *loop* original de *Arthrobacter R*-TA (Fig. 2.2-17).

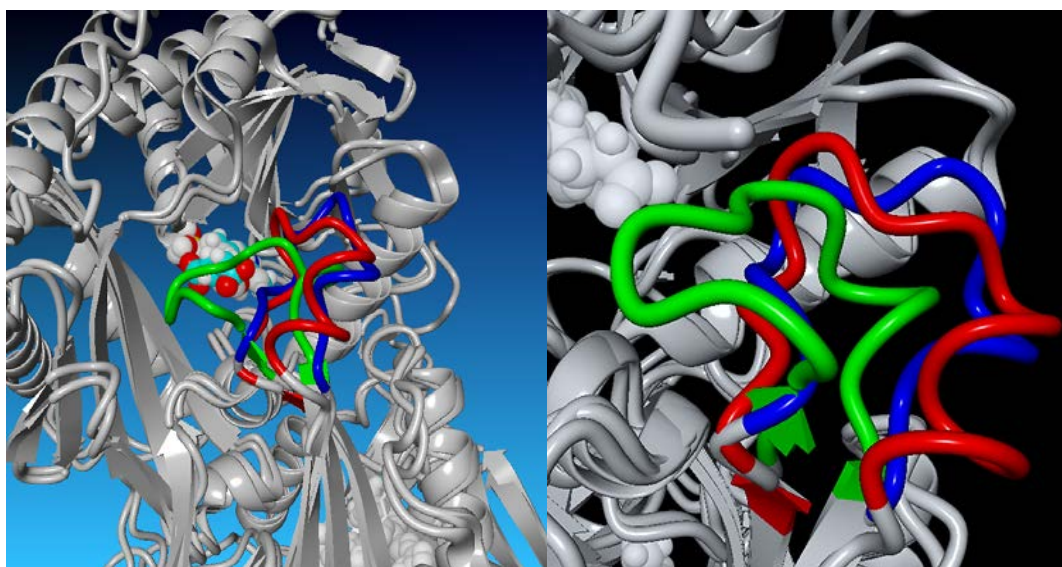


Figura 2.2-17: Modelo de superposición estructural de *R*-TA Cap (rojo), *Arthrobacter R*-TA (verde) y su mutante G136F (azul). Se observa la diferencia en el bucle cercano al sitio activo.

Dentro del análisis realizado por Guan, la posición 136 se consideró como la principal causa de la alteración estructural del *loop* en la ω -TA-117-Rd11, la enzima utilizada en la síntesis de la Sitagliptina.¹⁸³ Esta mutación fue sugerida como la causa de la alteración de especificidad de sustrato de esta enzima. La similitud entre el mutante G136F y *R*-TA Cap haría pensar en primera instancia, que al analizar sustratos más voluminosos existiría actividad; sin embargo, se detectó nula actividad con valerofenona mientras que propiofenona dio solo 5% de conversión. Esto indica probablemente que otras mutaciones son necesarias para favorecer la aceptación de sustratos más voluminosos por esta enzima, como previamente se ha demostrado para el mutante ATA-117-Rd11.

2.2.1.3. Discusión final

En la Tabla 2.2-7 se realiza una comparación de los resultados obtenidos con *R*-TA-Cap con datos reportados previamente en la literatura para los mismos sustratos. Como se describe para otras *R*- ω -TA, el compuesto (**20**) 4-fenil 2-butanona fue el mejor sustrato entre los probados.^{184,185} Los resultados obtenidos con los sustratos **20**, **25** y **27** son bastante similares a las obtenidas por Schatzle *et al.* para las *R*- ω -TA de *Aspergillus fumigatus* y *Neosartorya fischeri*, que eran los mejores biocatalizadores entre las descritas anteriormente. Las *R*- ω -TAs de *Aspergillus oryzae* y *Mycobacterium vanbaalenii* también presentaron buena actividad biocatalítica hacia estos sustratos; aunque fueron inferiores a los obtenidos con *R*-TA Cap. Este comportamiento no puede correlacionarse con la distancia filogenética, ya que *R*-TA Cap se encuentra más distante de cualquiera de las enzimas fúngicas, mientras que las enzimas bacterianas están todas agrupadas (Fig 2.2-6).

Sustrato	<i>R</i> -TA-Cap		<i>A. fumigatus</i>		<i>N. fischeri</i>		<i>A. oryzae</i>		<i>M. vanbaal.</i>		<i>Arthrobacter</i>		ATA-025		ATA-033	
	% c	% ee	% c	% ee	% c	% ee	% c	% ee	% c	% ee	% c	% ee	% c	% ee	% c	% ee
20	80	>99	>99	>99	87	>99	39	>99	42	>99	49	>99				
21	60	>99											67	>99	60	>99
22	10	>99											63	>99	58	>99
23	95	>99														
24	40	>99	68	>99	74	>99	8	>99	6	>99						
25	23a	>99											95	>99	94	>99
26	90	>99											98	>99	98	>99
27	100	>99	>99	>99	>99	>99	92	>99	89	>99	82	>99				
28	5	Nd														

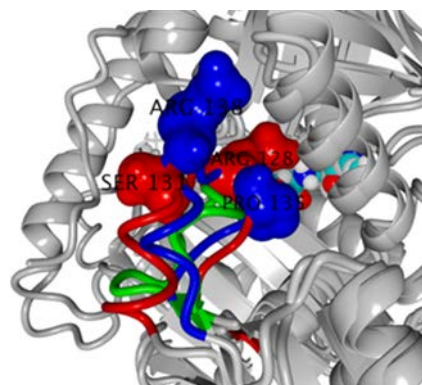
Tabla 2.2-76: Comparación de la especificidad de sustrato y estereoselectividad de *R*-TA-Cap con *R*-TA de literatura.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶

Entre los compuestos para-sustituidos, la *p*-metilacetofenona (**23**) fue el mejor sustrato, obteniéndose la amina quiral correspondiente con un rendimiento del 95%. La comparación con otras transaminasas no es posible, ya que no existen datos disponibles en la literatura. La baja actividad observada con (**22**) *p*-Bromoacetofenona es interesante, ya que otras *R*- ω -TA comerciales han demostrado actividad similar con los sustratos **21** y **22**; esto podría estar asociado a una *K_m* diferente para ambos sustratos.

Una característica común observada para *R*-TA Cap y las transaminasas comerciales es la preferencia por los compuestos *o*-halogenados en comparación con los *p*-sustituidos por la formación de una interacción estabilizadora entre la amina y el átomo halógeno en la posición orto.¹⁸⁶

En conclusión, con los resultados obtenidos se podría argumentar que la arquitectura del sitio activo es probablemente más importante que la distancia filogenética general. Además, se confirma que las anotaciones por homología no son 100% confiables, y que un estudio más profundo de la secuencia *in-silico*, puede ser una herramienta sumamente útil en la búsqueda de nuevos biocatalizadores. La estrategia bioinformática seguida en este capítulo permitió identificar varios candidatos *R*-TA, de los cuales se clonó, expresó y caracterizó una sola por restricciones presupuestales y de tiempo. La enzima identificada mostró ser una *R*-TA con muy buena actividad sobre los sustratos ensayados y excelente enantioselectividad.

El descubrimiento de ω -TAs con amplia especificidad de sustrato puede resultar en muchas aplicaciones industriales. Sin embargo, de acuerdo con Jiang *et al.*,¹⁷⁷ el rastreo de *R*- ω TAs está muy obstaculizado por incorrectas anotaciones debido principalmente a la alta identidad de secuencia entre potenciales *R*- ω -TAs y BCAT o D-TA. Por lo tanto, la identificación de diferentes *R*- ω -TAs alejadas filogenéticamente es de gran importancia porque las mismas pueden ser utilizadas como secuencias molde para identificar otras *R*- ω -TAs utilizando diferentes métodos *in silico*. Para estimar la función de una enzima desconocida el análisis estructural es siempre más preciso que el análisis de secuencia, pero a pesar de esto y de la falta de información espacial de los residuos del sitio activo con respecto a la catálisis y el reconocimiento del sustrato, este último es más fácil y rápido que el análisis estructural. En este capítulo se demuestra que la aplicación de un método mixto de identificación de *R*- ω -TAs basada en un análisis de secuencia construido a partir de una investigación estructural es una herramienta poderosa a tener en cuenta.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 2.3

2.3. Diseño racional de variantes de *R*-TA de *Capronia semiimmersa*

En todos los trabajos de ingeniería de proteínas de esta época, una pregunta a realizarse es "¿Es nuestro modelo el adecuado para evolucionar?"

En este punto hay que remarcar que los investigadores a menudo diseñan sus esfuerzos de ingeniería de proteínas alrededor de una enzima que es altamente activa hacia sustratos de referencia como la acetofenona. En el anterior capítulo, se demostró que el análisis previo de la información disponible mediante diferentes métodos puede dar como resultado una enzima con actividades biocatalíticas deseadas. Para este capítulo el objetivo de nuestra investigación fue desarrollar variantes de TAs que sean activas hacia aminas quirales más voluminosas, tomando como modelo la enzima *R*-TA de *Capronia semiimmersa*.

Los métodos de evolución dirigida de proteínas, así como de diseño racional, han sido varias veces utilizados para modificar las propiedades de las transaminasas. El ejemplo más popular es la ingeniería aplicada en la (*R*)-transaminasa selectiva ATA-117 (homólogo de *R*-TA de *Arthrobacter*^{100,178,187}) desarrollada por Merck & Co y Codexis, que contiene 27 mutaciones para permitir la producción biocatalítica del fármaco Sitagliptina.^{180,188} Éste además de ser el más popular, es el único realizado a una *R*-TA hasta el momento. Los trabajos más recientes se han enfocado en ingeniería de *S*-TAs,^{148,149,189,190} y esto puede deberse a varias razones, siendo quizás la patente asociada a la ATA-117 de Codexis (muy abarcativa) y los excelentes resultados obtenidos con la *R*-TA de *Arthrobacter* (Ab-*R*-ATA), lo que más influencia puede tener a la hora de no incentivar a la academia a investigar en esta área.

Como se describió anteriormente, las transaminasas son enzimas dependientes del piridoxal-5'-fosfato (PLP),⁷⁹ en particular las *R*-TA son transaminasas PLP tipo-IV.¹⁹¹ Se conoce que la forma activa de las transaminasas es un homodímero con el sitio activo en la interfaz del dímero construido a partir de residuos de ambos monómeros. El sitio de unión al sustrato está rodeado por la cavidad entre las dos subunidades, el cofactor PLP, y el *loop* que consiste en residuos del otro protómero. El sitio de unión al sustrato puede dividirse en dos partes, la cavidad G y la cavidad P, lo cual es consistente con el mecanismo propuesto para la especificidad del sustrato de TAs en el cual los grupos estructurales más pequeños y más grandes de sustratos son reconocidos por los bolsillos P y G, respectivamente (Fig. 2.3-1).

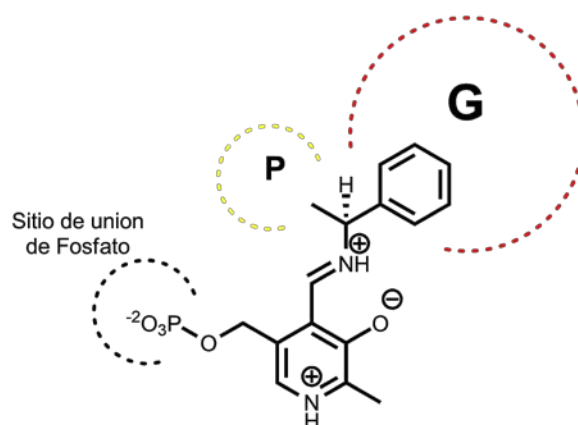


Figura 2.3-1: Esquema de sitio de unión al sustrato indicando la cavidad G y la cavidad P.

El bolsillo pequeño proporciona espacio para la cadena alquílica del sustrato hidrofóbico o, alternativamente, para el grupo ácido presente en aminoácidos como la alanina, que comúnmente sirve como sustrato amino-donor uniéndose en el mismo bolsillo. Se ha observado que en *S* como en *R*-TAs, ambos bolsillos del sitio activo son capaces de acomodar grupos hidrofóbicos tanto como hidrofílicos, estableciéndose un reconocimiento dual de sustratos. En las *S*-TA se ha demostrado que el reconocimiento doble de sustratos se logra mediante el cambio conformacional de un residuo de arginina "flipping" en un *loop* cerca del sitio activo. De manera similar a H55 y V62 en *R*-TAs, se propuso que un residuo de arginina cercano al sitio activo podía cumplir la misma función; la cual podría asociarse a la posición 126 en la *R*-TA de *Nectria haematococca* o *Aspergillus fumigatus* y 128 en la *R*-ATA de *Aspergillus terreus*. Aunque el residuo de arginina correspondiente no se conserva en la *R*-TA de *Arthrobacter*, en los modelos de superposición de las estructuras cristalinas, el grupo guanidinio de Arg138 se localizó cercanamente a los grupos guanidinio de los residuos de arginina de las otras *R*-TAs.^{170,173,181,192} El reconocimiento de sustratos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos en el sitio activo se denomina "reconocimiento dual de sustrato" una característica de estas enzimas llamadas también aminotransferasas.¹⁹³ Hasta ahora, se han determinado varias estructuras de *S*-TA¹⁹⁴⁻¹⁹⁷ y *R*-TA^{102,169,183,192,198-200}, lo que proporciona información válida sobre este reconocimiento dual de sustratos de las TAs, capacidad única de este tipo de enzima para aceptar ambos tipos de sustrato en el mismo sitio activo. Como se dijo anteriormente, la secuencia aminoacídica de la *R*-TA de *Capronia* presenta una baja homología con otras *R*-TA reportadas. El análisis filogenético comprobó que la misma estaba alejada de todas las *R*-TA reportadas hasta la fecha, sin embargo, en el alineamiento aminoacídico (Fig. 2.3-2) y en el análisis estructural (Fig. 2.3-4) se observa que en *R*-TA Cap esta arginina también es un residuo conservado y se encuentra en la posición 128 cercana al sitio activo y en la entrada del túnel de ingreso de sustratos.

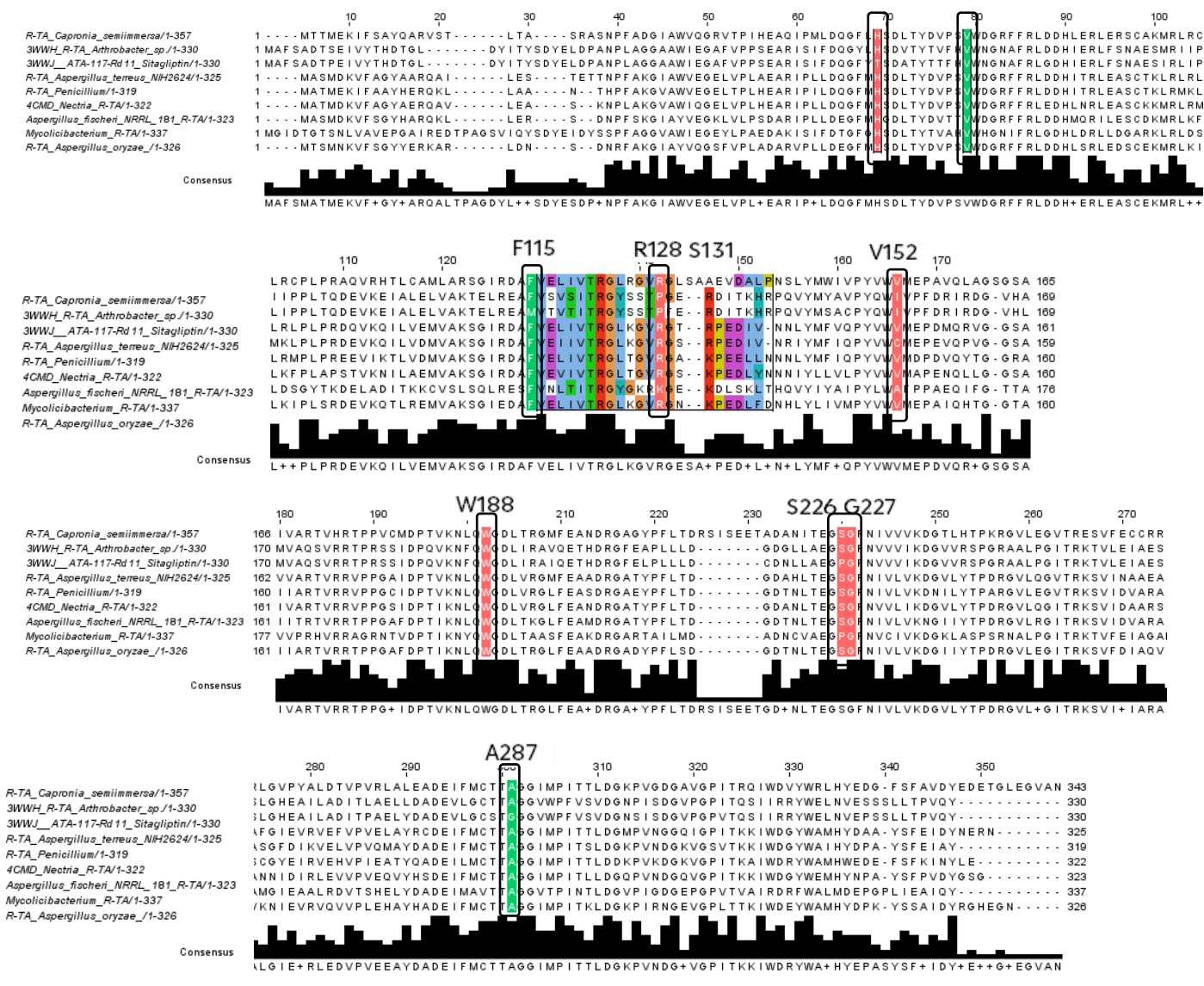


Figura 2.3-2: Alineamiento de R-TAs con actividad reportada y estructura cristalizada, en salmón se resaltan aminoácidos presentes en cavidad G y en verde en cavidad P.

Según un análisis previo realizado en la estructura de ATA-117-Rd11,¹⁸³ los aminoácidos V69, F122, A284 marcados en color verde (Fig. 2.3-3) son los pertenecientes a la cavidad hidrofóbica pequeña del sitio activo, mientras que H62, R138, I157, W192, S223 y G224 resaltados en color salmón pertenecen a la cavidad grande.

Un análisis dual, combinando información obtenida mediante alineamiento de secuencias aminoacídicas (*R*-TA de *Capronia*, *Ab-R*-ATA y el mutante ATA-117-RD11) (Fig. 2.3-3), y análisis bioinformático de la estructura en el modelo realizado por homología (que incorpora además *docking* molecular en el sitio activo del intermediario PMP-etilbencilamina con mejor energía de unión (Fig. 2.3-5)), parece indicar que el sitio activo de nuestra enzima está influenciado mayoritariamente por los mismo aminoácidos que los descritos por Guan *et al.*¹⁷³

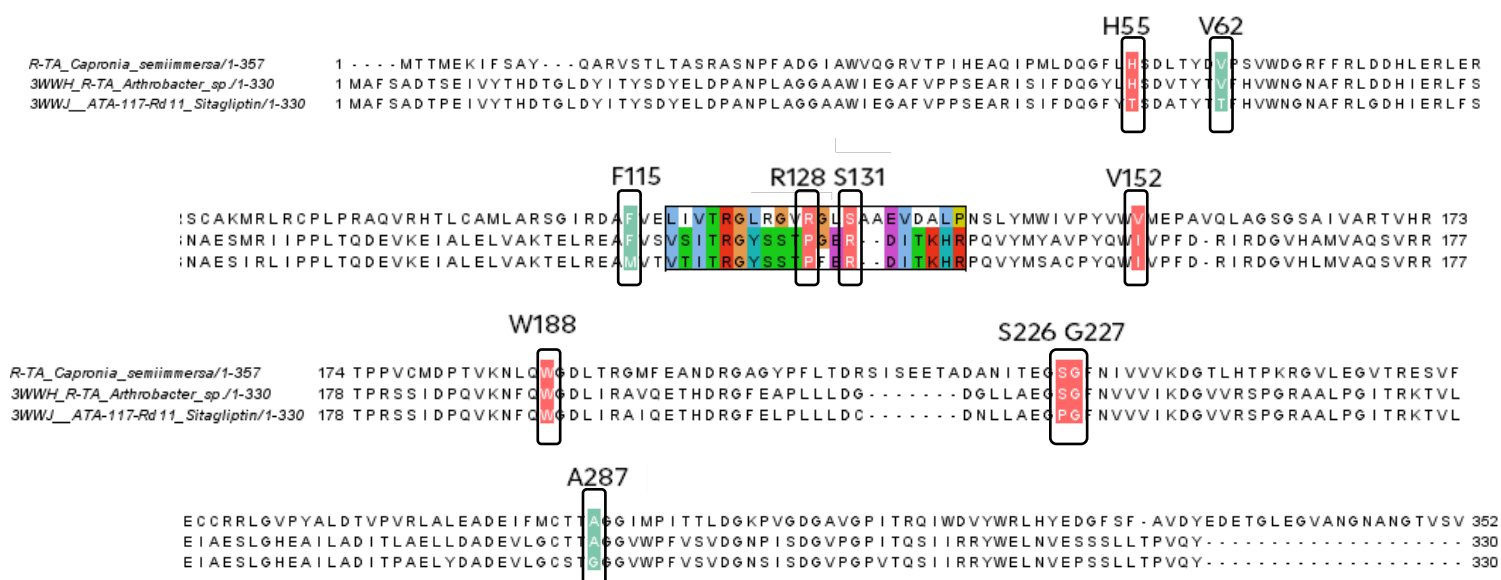


Figura 2.3-3: Alineamiento de *R*-TA Cap con *R*-TA de *Athrobacter* y mutante ATA-117-Rd11 en salmón se resaltan aminoácidos de la cavidad G y en verde Cavidad P. La posición es numerada tomando en cuenta posición en *R*-TA Cap. El *loop* se resalta según esquema de colores por defecto usado para alineaciones en Clustal X. A cada residuo de la alineación se le asigna un color si el perfil de aminoácidos de la alineación en esa posición cumple algunos criterios mínimos específicos para el tipo de residuo.

El bolsillo grande del sitio activo está rodeado por los aminoácidos H55 (H62 en ATA-117-RD11), W188 (W192), S226 (S223) y G227 (G224). La diferencia se observa en la presencia de dos aminoácidos adicionales en la zona que da lugar al *loop* de entrada al sitio activo. Cabe aclarar que se observa una serina en la posición 131 (tomando referencia posición en secuencia de *R*-TA Cap) en vez de una arginina (R138 tomando referencia posición en secuencia de ATA-117-Rd11) y mediante el análisis del modelo

estructural se pudo determinar que esta arginina, como se discute previamente, se encuentra en *R*-TA en la posición 128 en la entrada del sitio activo (Fig. 2.3-4). La otra variación se presenta en la posición 152 donde se encuentra una valina en vez de una isoleucina como se observa en la secuencia de *Arthrobacter*. Por otro lado, el bolsillo pequeño se encuentra influenciado de igual manera que en la estructura de la *R*-TA de *Arthrobacter* por V62(V69), F115(F122) y A287(A284). (Fig. 2.3-4 y Fig. 2.3-5)

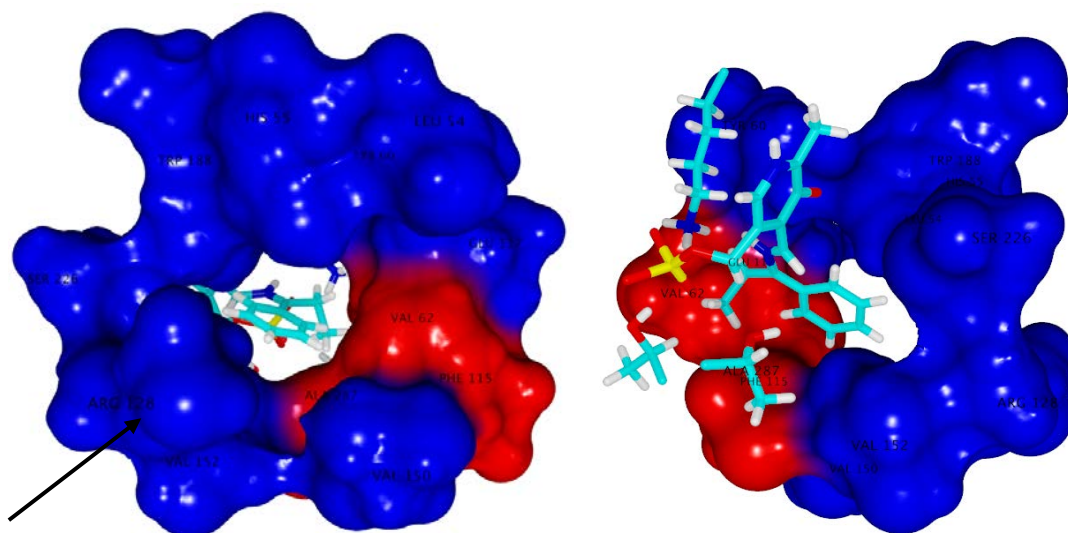


Figura 2.3-4: Modelo estructural de *R*-TA Cap con *docking* de PLP-etilbencilamina en el sitio activo realizado con programa YASARA. En rojo se resaltan residuos de la cavidad P y en azul residuos de la cavidad G.

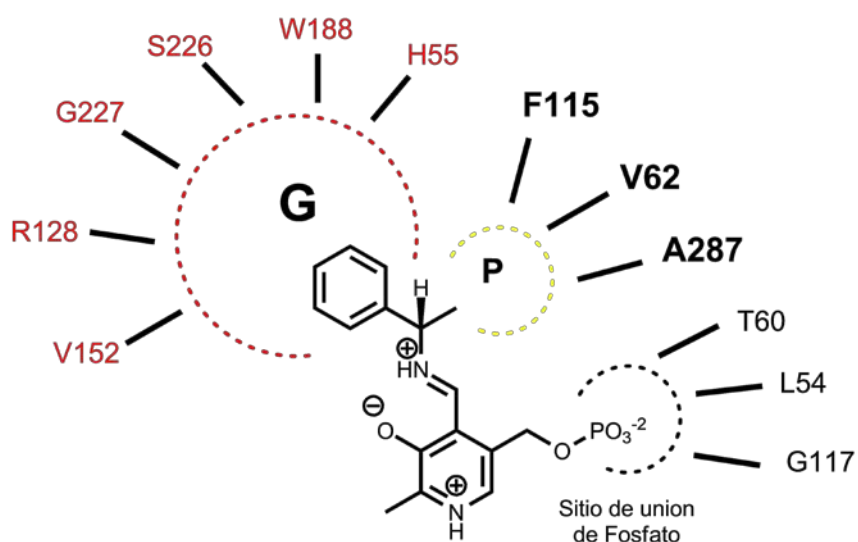


Figura 2.3-5: Sitio de unión del sustrato de *R*-TA Cap

Cabe destacar que la mayoría de los residuos que componen el sitio de unión al sustrato se conservan en las otras siete enzimas reportadas hasta el momento, con excepción del mutante *R-TA* ATA-117-RD11 (Fig. 2.3-2), mientras que los residuos en el *loop* 129-145 en la entrada del sitio activo de la secuencia de *Arthobacter* no son conservados. Guan *et al.*¹⁷³ consideran razonable asumir que la diversidad de la secuencia de aminoácidos del *loop* provoca la diferente especificidad de sustratos entre estas enzimas, ya que éste es el principal determinante de esto en la enzima *R-TA* ATA-117-RD11. Además, en estas estructuras cristalinas, la incorporación de una sola mutación G136F en Ab-*R-ATA* conduce a la generación de un *loop* similar al observado en el mutante *R-TA* ATA-117-RD11.

Como se discutió previamente, mediante modelos de homología de *R-TA* y análisis de superposición tridimensional de las estructuras Ab-*R-ATA*, Ab-*R-ATA* G136F, y ATA-117-RD11, se observó que en *R-TA* Cap, el *loop* parece estar compuesto por dos aminoácidos más, sin embargo, se asemeja al observado en *R-TA* ATA-117-RD11 como se describió en el capítulo 2.2. (Fig. 2.3-6 y Fig. 2.3-3).

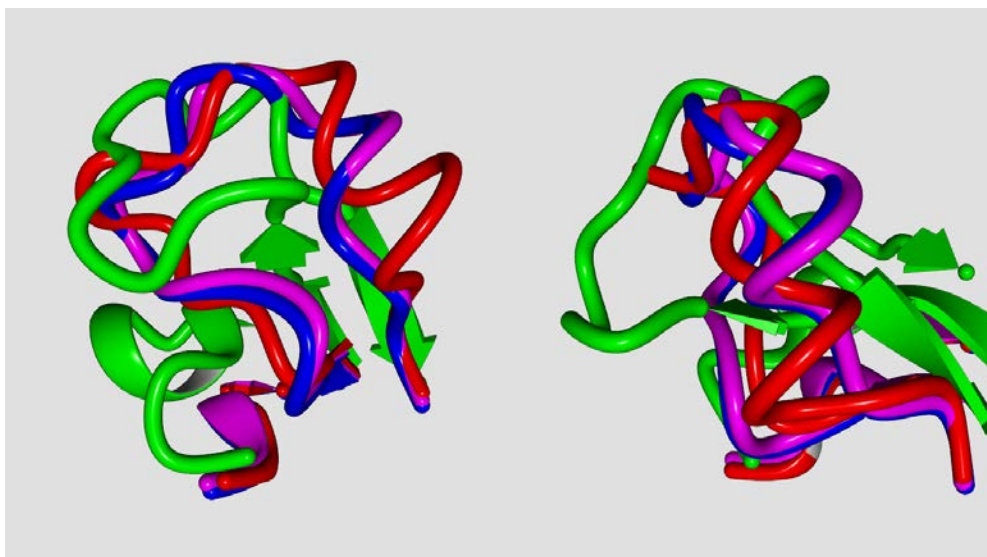


Figura 2.3-6: Modelo de superposición estructural de *R*-TA Cap (rojo), Ab-*R*-ATA (verde), su mutante Ab-*R*-ATA G136F (azul) y ATA-117-RD11 (magenta). Se observa la diferencia en el *loop* cercano al sitio activo.

El análisis del modelo de la enzima sugiere cuatro residuos que podrían interactuar potencialmente en el bolsillo pequeño [V69, F122, W286, y A284] (Fig. 2.3-4 y 2.3-5). Cabe destacar que estos cuatro residuos fueron los mismos elucidados en el mutante utilizado en la síntesis de la Sitagliptina, en los cuales no se detectó actividad en ninguna de las variantes de las bibliotecas de saturación en un solo sitio. Fue una variante que contenía cuatro mutaciones, tres en la cavidad pequeña y una en la cavidad grande, la primera en presentar actividad transaminasa detectable en la cetona de la pro-sitagliptina. Los estudios de acoplamiento indicaron que estas mutaciones pueden aliviar la interferencia estérica en la pequeña cavidad de unión.¹⁰²

Basándose en el estudio de ingeniería realizado en *R*-TA ATA-117-RD11 y en las estructuras cristalinas estudiadas,¹⁷³ las mutaciones para generar variantes con nuevas especificidades de sustrato pueden dividirse en tres tipos de modificaciones estructurales: i) alteración de la conformación del *loop* en la entrada del sitio activo, ii) eliminación o sustitución de las cadenas laterales de los residuos que componen el sitio de unión del sustrato (incluidas las cavidades G y P), iii) modificaciones de los residuos fuera de sitio activo, particularmente en la superficie que afecten la estructura de homodímero.

Con el objetivo de ampliar el bolsillo hidrofóbico pequeño, se planteó la realización de mutaciones puntuales sustituyendo los aminoácidos nativos por los presentes en el mutante *R*-TA ATA-117-RD11, los cuales han demostrado una efectiva capacidad de aumentar el tamaño de este bolsillo y generar variantes con actividad sobre nuevos sustratos con sustituyentes más voluminosos. Las mutaciones seleccionadas fueron **V62T**, **F115M** y **A287G**. **W286** fue descartada ya que dicho residuo se encuentra muy cercano al fosfato del cofactor PLP y podría influir en su posicionamiento (Fig. 2.3-8 y 2.3-9).

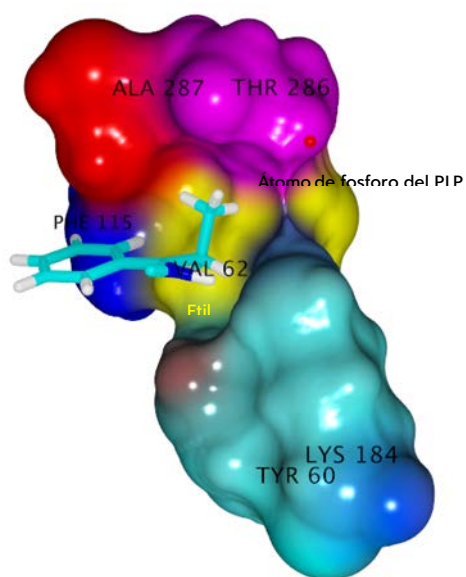


Figura 2.3-7: Modelo estructural de *R*-TA Cap con *docking* de PLP-etilbencilamina en el sitio activo simplificado para mejor visualización. V62T(amarillo), F115M(Azul), A287G(Rojo), W286(Violeta) realizado con YASARA.

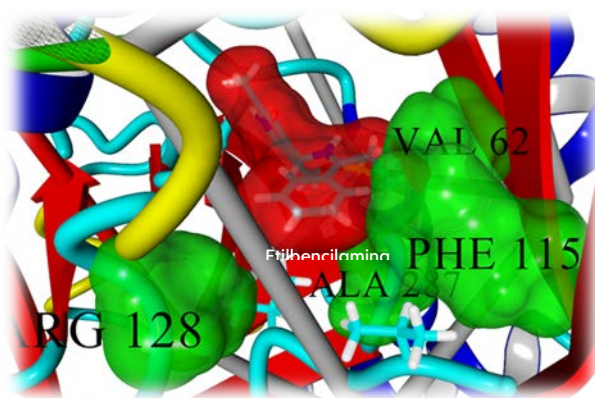


Figura 2.3-8: Modelo estructural de *R*-TA Cap con *docking* de PLP-etilbencilamina en el sitio activo. En verde se resaltan residuos en contacto con la porción alquílica de la etilbencilamina y la Arg128 del *loop* en la entrada del sitio activo

Además, observando el modelo por superposición de las estructuras cristalinas de *R-TA*, *Ab-R-ATA*, *Ab-R-ATA G136F* y *ATA-117-RD11* se decidió modificar puntualmente la posición 128 (**R128P**) y un doble mutante **R128P/ S131R** en el *loop* del túnel de entrada del sitio activo. Nuestra hipótesis plantea que estas mutaciones podrían provocar una nueva conformación del *loop*, en el cual la R131 pasará a cumplir la función de la R128, en una disposición estructural más semejante a la R138 de *Arthrobacter*.

El objetivo sería crear un *loop* que simule al mutante *ATA-117-RD11* como se puede observar en la Fig. 2.3-10. No obstante, en el modelo la mutación **S131R** forzaría una posición en el espacio diferente en comparación a la arginina 138 de *ATA-117-RD11*; pero conociendo que la alteración del *loop* puede variar la especificidad de sustrato de manera drástica modificando el volumen del sitio de unión al sustrato, y que el mismo es una estructura flexible, el estudio bioinformático no es condición suficiente para indicar que la arginina no va a cumplir su función en el reconocimiento dual de sustratos.

Cabe mencionar que, a excepción del trabajo de Savile *et al.*¹⁰² y Guan *et al.*¹⁸³, no se cuenta con más información sobre el efecto de las mutaciones seleccionadas, y por tanto no existe información suficiente para calcular con certeza cual será el efecto real de los cambios a realizar.

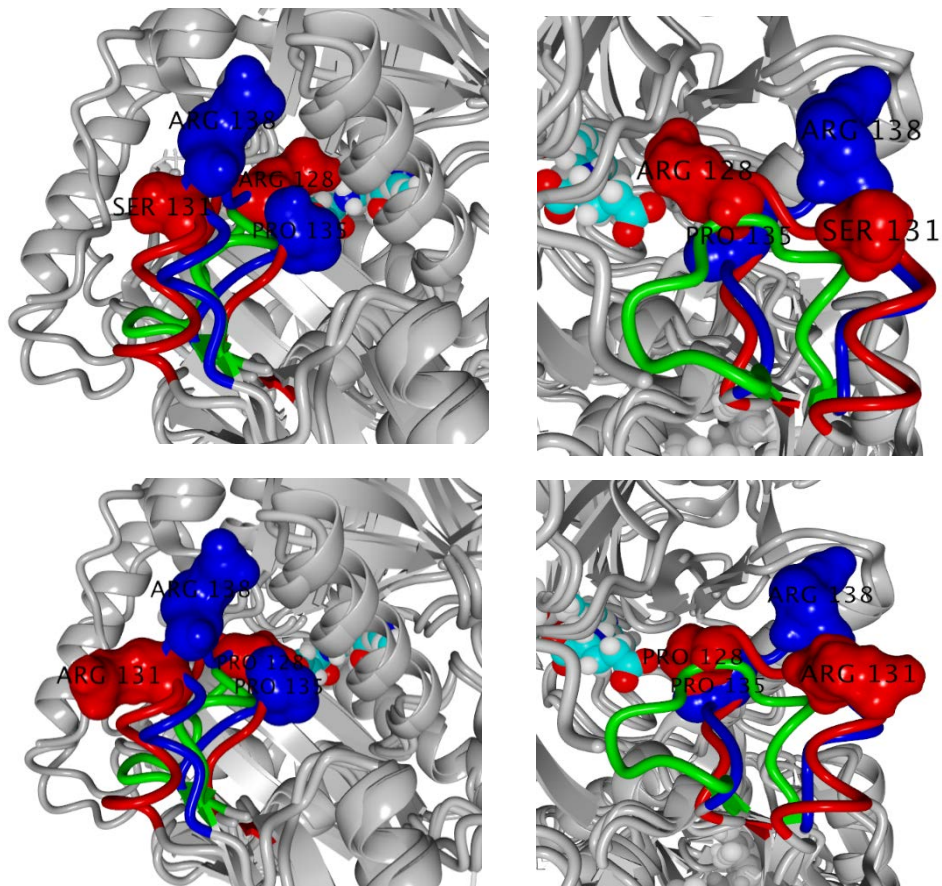


Figura 2.3-9: Modelo de superimposición estructural de *R-TA Cap* (rojo), *Arthrobacter R-TA* (verde) y su mutante G136F (azul). Arriba: Se resaltan superficies de residuos: en rojo a mutar y en azul superficie de residuos de mutante G136F Abajo : Modelo estructural *R-TA Doble Mutante S131R/R128P*.

2.3.1. Mutaciones sitio dirigidas V62T, A287G en cavidad P y R128P en el *loop* de entrada del sitio activo de *R*-TA Cap

Utilizando como molde el plásmido pET22b+ (*R*-TA Cap TA) se aplicó un método de mutagénesis basado en método QuickChange para generar las variantes modificadas en las posiciones seleccionadas. Este método consiste en la amplificación completa del plásmido utilizando oligonucleótidos que contienen la mutación a incorporar. Los oligos utilizados se describen en la Tabla 4.1-1 (Metodología experimental). Una vez realizada la amplificación, el plásmido original fue digerido con la enzima Dpn I para eliminar las moléculas de vector que no incorporaron la modificación. Una vez realizada la amplificación y digestión con Dpn I se transformó la cepa de *E.coli* TOP10. Los plásmidos obtenidos fueron verificados por secuenciación para determinar la correcta incorporación de las mutaciones. Una vez confirmada las secuencias, los plásmidos conteniendo las mutaciones fueron utilizados para transformar la cepa *E.coli* BL21 (DE3) para expresión de los distintos mutantes.

La evaluación de los mutantes fue realizada de acuerdo con el método reportado por Schätzle *et al.*²⁰¹ Los mismos fueron estudiados en el modo de resolución cinética, favorecido termodinámicamente, utilizando las aminas de interés (Fig. 2.3-10) como aminodonores y el piruvato como aminoaceptor.

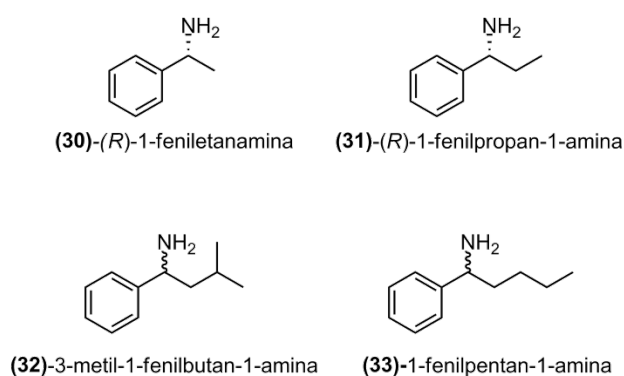
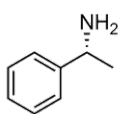
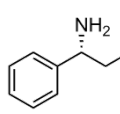
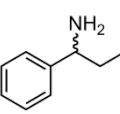
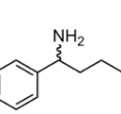


Figura 2.3-10: Sustratos utilizados para evaluación de variantes de *R*-TA generadas

Tabla 2.3-1: Actividad específica (U mg⁻¹) de proteína purificada, para la resolución cinética del sustrato, usando piruvato como amino-aceptor

				
R-TA Cap silvestre	165±8	25.4±3.2	Sin Act.	Sin Act.
R-TA Cap V62T	nd	Sin Act.	Sin Act.	Sin Act.
R-TA Cap A287G	57.4±4.5	13.1±1.22	12.8±1,8	2.7±0.3
R-TA Cap R128P	nd	Sin Act.	Sin Act.	Sin Act.

U: 1µM min⁻¹ nd: no determinado

En los resultados en la Tabla 2.3-1 se observa que los mutantes **V62T** y **R128P** no mostraron actividad sobre sustratos hidrofóbicos de mayor volumen, pero tampoco presentan actividad sobre etilbencilamina (**31**), sustrato de *R-TA* Cap silvestre, indicando que estos residuos son fundamentales para la actividad. En el caso de la arginina, la carga positiva significa que puede interactuar con estructuras cargadas negativamente como carboxilatos. Según el modelo (Fig. 2.3-11) la arginina está a una distancia de aproximadamente 4 Å del centro de la cavidad G donde se acomodan grupos aminodonores/aminoaceptores unidos al PLP. Posiblemente esto ocurra por su rol en el reconocimiento dual de sustratos, tomando en cuenta que la misma se encuentra en un *loop* flexible esta distancia puede variar, haciendo posible que este grupo guanidinio tenga importancia para la actividad *R-TA*, coordinando el carboxilato del compuesto aminoaceptor, en este caso piruvato. En base a este resultado, un estudio a realizar sería ensayar aminoaceptores hidrofóbicos como la acetofenona. No obstante, restaría analizar si la incorporación de una arginina más alejada en el *loop* (hipótesis que fuera planteada para el doble mutante **R128P/ S131R**) regenera la actividad perdida.

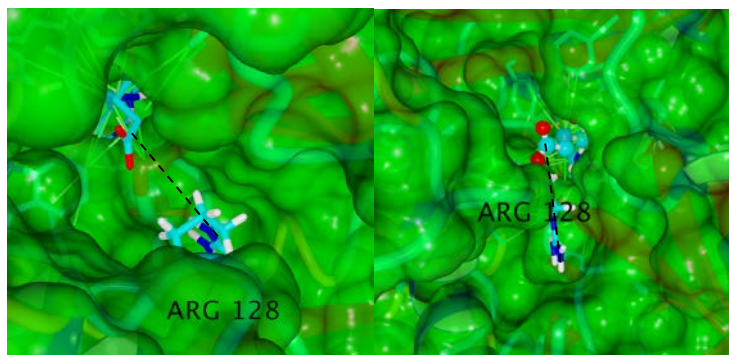


Figura 2.3-11: Modelo R-TA: Distancia Arg128 a ácido carboxílico de grupo aminodonor.

Para la mutación **V62T**, el volumen de los aminoácidos es casi el mismo, pero la treonina tiene capacidad de formar puente de hidrógeno. Quizás por su disposición en el sitio activo interactúa con otros aminoácidos y cambia la forma del mismo, o causa una estabilización del sustrato o producto.

Por otro lado, se puede observar que la variante **A287G** mostró actividad sobre sustratos más voluminosos como la 3-metil-1-fenilbutan-1-amina-(**32**) y 1-fenilopentan-1-amina-(**33**), con una actividad específica de 12.8 y 2.7 UE/mg de proteína respectivamente. Una particularidad, es que se observa una disminución de la actividad específica para dos sustratos en comparación con la proteína silvestre. En este caso se sustituyó un aminoácido por otro de menor tamaño y la eliminación del metilo de la alanina puede estar provocando un pequeño aumento de volumen del sitio activo, lo que justificaría la aparición de actividad sobre nuevos sustratos. También puede estar generando una diferente disposición del cofactor PLP afectando por ende la actividad lo que explicaría la disminución de la actividad específica con metilbencilamina-(**30**) y etilbencilamina-(**31**). Esta posición 287 demuestra tener gran influencia en la actividad por lo que la misma puede ser acoplada a la generación de un doble o triple mutante. Cabe destacar que se requirieron introducir 27 mutaciones para evolucionar la TA de *Arthrobacter* sp. de forma que fuera útil para la producción de la Sitagliptina, y por lo menos cuatro mutaciones para lograr la aceptación de los sustratos utilizados en este capítulo.¹⁰² Los datos obtenidos muestran que con una única mutación sobre R-TA Cap se logró actividad sobre sustratos más voluminosos, lo cual resulta muy auspicioso, aunque resta por ensayar su utilidad en el proceso de síntesis de las respectivas aminas.

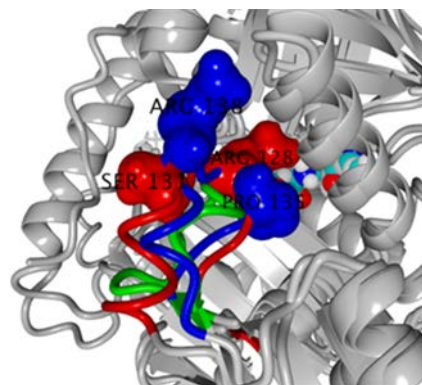
Por consiguiente, se podría indicar que el concepto utilizado en esta tesis de búsqueda de nuevas transaminasas utilizando base de datos de secuencias para analizar una amplia variedad de estas, con especial énfasis en el descubrimiento de motivos distintos y un exhaustivo análisis bioinformático previo, también puede guiar a la

generación de nuevas variantes que desarrollen grandes cambios mediante mínimos esfuerzos.

Mediante mutagénesis sitio dirigida fue posible desarrollar una variante mejorada que presenta actividad hacia dos nuevos sustratos, resultados que abren camino para nuevas modificaciones. Ensayos de síntesis asimétrica con este mutante serán realizados para un estudio más profundo de sus propiedades.

Además, se está en camino de la construcción del doble mutante **R128P/ S131R** y el análisis del mutante **F115M**. Estudios de mutagénesis por saturación serán realizados en las posiciones en las cuales se registró pérdida de actividad, a fin de buscar mutaciones restauradoras de función que a su vez aporten para la aceptación de sustratos más voluminosos, para luego combinar con la mutación **A287G**. Por último, se analizará la utilidad biocatalítica de todas las variantes generadas en diversas aplicaciones sintéticas, enfocadas en la producción de intermediarios farmacéuticos que presenten un reto para las TAs comerciales.

En base a los resultados obtenidos ¿Fue nuestro modelo el adecuado para evolucionar? ¿Fue *R*-TA Cap un buen modelo para evolucionar y generar una TA con mejores propiedades? Estas preguntas aún no podrán ser contestadas, para ello será necesario realizar más variantes y estudios adicionales teniendo en cuenta que los resultados preliminares obtenidos resultaron auspiciosos.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 2.4

2.4. Aplicaciones en síntesis de aminas quirales

2.4.1 Cascada ω -TA / MAO para la síntesis de 2,5 pirrolidinas y 2,6 piperidinas disustituidas.

Las pirrolidinas 2,5-disustituidas son moléculas intermediarias importantes en la síntesis de compuestos farmacéuticos,²⁰²⁻²⁰⁴ y productos naturales.²⁰⁵⁻²⁰⁹ Considerables esfuerzos se han dedicado al desarrollo de rutas de síntesis asimétrica para la obtención de los derivados disustituidos *cis* y *trans* que muestran una estereoselectividad de moderada a buena.²¹⁰⁻²¹³ La falta de influencia estereofacial inducida por el estereocentro C2 preexistente, implica que la obtención de los diasterómeros *trans* en alto exceso diastereomérico a través de la reducción de la imina correspondiente no sea sencilla.

Nuestra hipótesis de aproximación implicó la transaminación enzimática del más pequeño de los dos centros estereogénicos (ya sea metilo o etilo en este estudio) definido por la transaminasa (*S*) o (*R*)-selectiva para generar pirrolinas y piperinas ópticamente activas. Luego, con variantes de monoaminoxidasas (MAO-N) que muestran una completa regio- y estereoselectividad para evitar la estereorandomización del estereocentro C2 generado por la selectiva ω -TA, se acopla una reacción quimioenzimática diaestereoselectiva. En este paso, el estereocentro con el sustituyente más grande (fenilo o bencilo) será definido por la reacción catalizada por una MAO-N mediante resolución cinética dinámica con el agente reductor NH_3BH_3 . En esta reacción, las piperinas y las pirrolinas formadas se reducen por el NH_3BH_3 de forma no selectiva para dar lugar a los correspondientes ciclos saturados racémicos. Posteriormente, la MAO re-oxida selectivamente al diasterómero 5*S* (pirrolidina) o 6*S* (piperidina). La repetición de este ciclo lleva a la acumulación del diasterómero 5*R* o 6*R* (Fig.2.4-1).

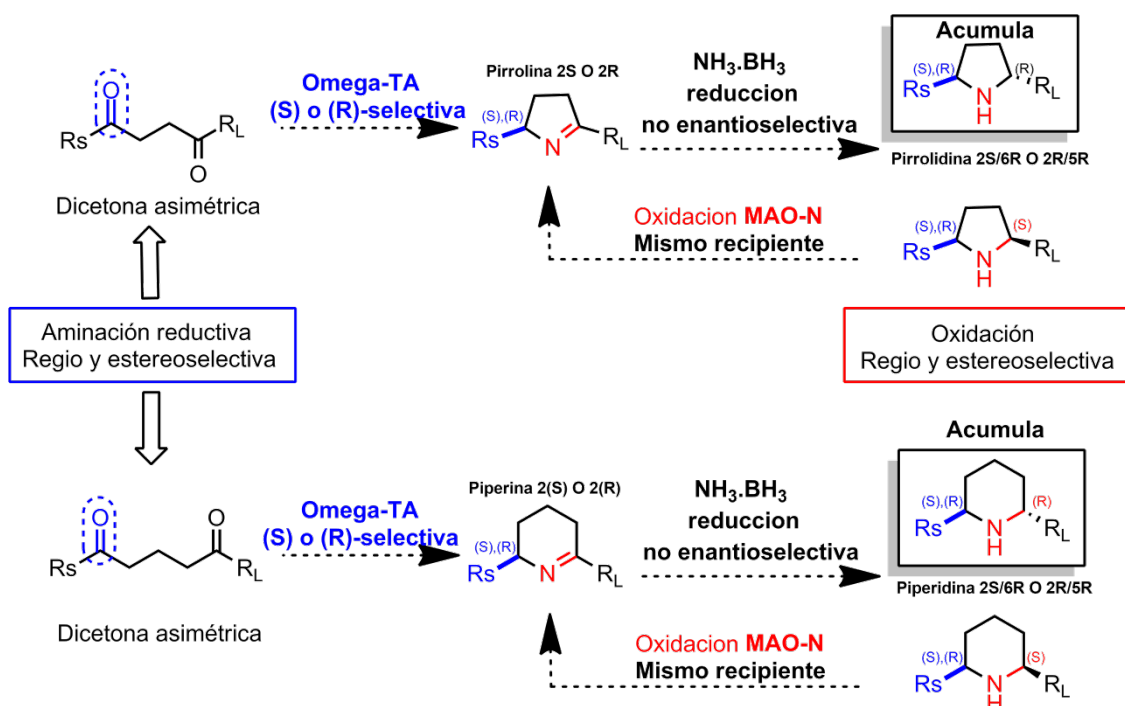
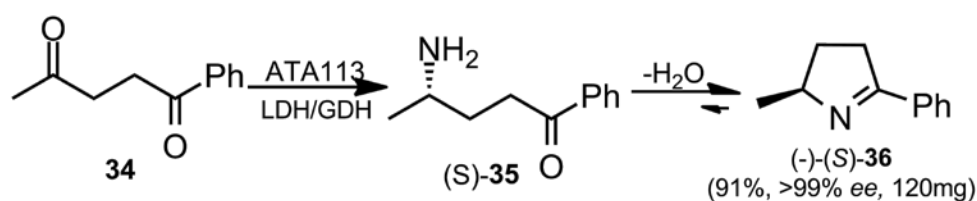


Figura 2.4-1: Propuesta quimioenzimática para la síntesis de 2,5-pirrolidinas y 2-6 piperidinas disustituidas mediante el empleo de S o R ω -transaminasas (TA) y monoaminoxidasa (MAO-N).

Inicialmente, examinamos la monoaminación selectiva mediada por las ω -TA comerciales ATA113 y ATA117 del sustrato comercial tipo 1,4-dicetona, 1-fenil-2,4-pentanodiona-(**34**) que contiene un pequeño sustituyente metilo y un sustituyente fenilo para la producción de una pirrolidina **2S/5R**. ATA113 se caracteriza por ser una ω -TA que muestra actividad para dar como producto mayoritario aminas quirales con configuración-(S), mientras que ATA117 presenta actividad para dar producto mayoritario aminas quirales con configuración *R*. Se observó que la ω -TA *S*-selectiva ATA113 era altamente regioselectiva en la aminación reductiva actuando exclusivamente en la metilcetona hasta una concentración de sustrato de 25 mM con L-alanina como aminodonor (Fig.2.4-2). La (*S*)-1,4-amino cetona-(**35**) resultante cicló espontáneamente para proporcionar pirrolina (*S*)-**36** con un 91% de rendimiento y un *ee* >99%. El sistema lactato-deshidrogenasa (LDH)/glucosa deshidrogenasa (GDH) se utilizó para desplazar el equilibrio hacia el producto y reciclar el cofactor NAD^+ . La (*R*)-transaminasa selectiva ATA117 catalizó la monoaminación regio- y estereoselectiva para producir pirrolina (*R*)-**36** con un 65% de rendimiento y >99% de *ee*. Por consiguiente, habiendo establecido una manera eficaz de acceso a pirrolinas ópticamente puras a escala preparativa, posteriormente exploramos una ruta para la síntesis diastereoselectiva de las pirrolidinas 2,5-disustituidas.

a) Aminación reductiva con transaminasas (S)-selectivas



b) Aminación reductiva con transaminasas (R)-selectivas

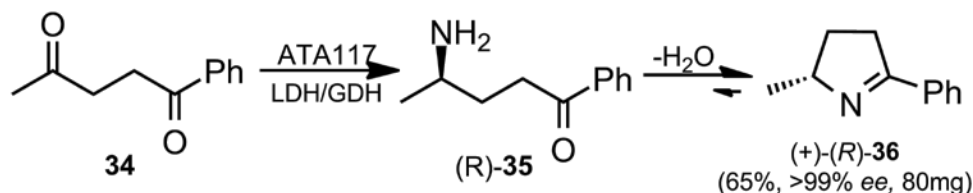


Figura 2.4-2: Aminación reductiva a escala preparativa (25 mM) de la cetona **34** mediada por las TA (S)-ATA113 o (R)-ATA117, seguida de ciclización espontánea.

Las enzimas MAO-N (D5 y D9) se seleccionaron sobre la base de su actividad previamente reportada y su excelente selectividad hacia aminas estructuralmente relacionadas, incluidas las pirrolidinas y las piperidinas.⁷⁰⁻⁷² Tras sucesivas rondas de oxidación selectiva con la variante MAO-N D5 y reducción no selectiva con NH_3BH_3 , (2*S*,5*R*)-**37** fue aislado con un 99% de exceso diastereomérico. A pesar de una tendencia hacia la formación del diastereoisómero *cis*, al reducirse con NH_3BH_3 , la combinación con MAO-N- NH_3BH_3 dio como resultado únicamente el producto *trans* (2*S*,5*R*)-**4e**. La regioselectividad complementaria mostrada por las variantes ω-TA y MAO-N evita la epimerización del centro (S)-C2 proporcionando un método para acceder a 2,5-pirrolidinas ópticamente puras. La generalidad del proceso de cascada TA/MAO-N fue investigado mediante reacciones con una serie de dicetonas sintetizadas a tales efectos.

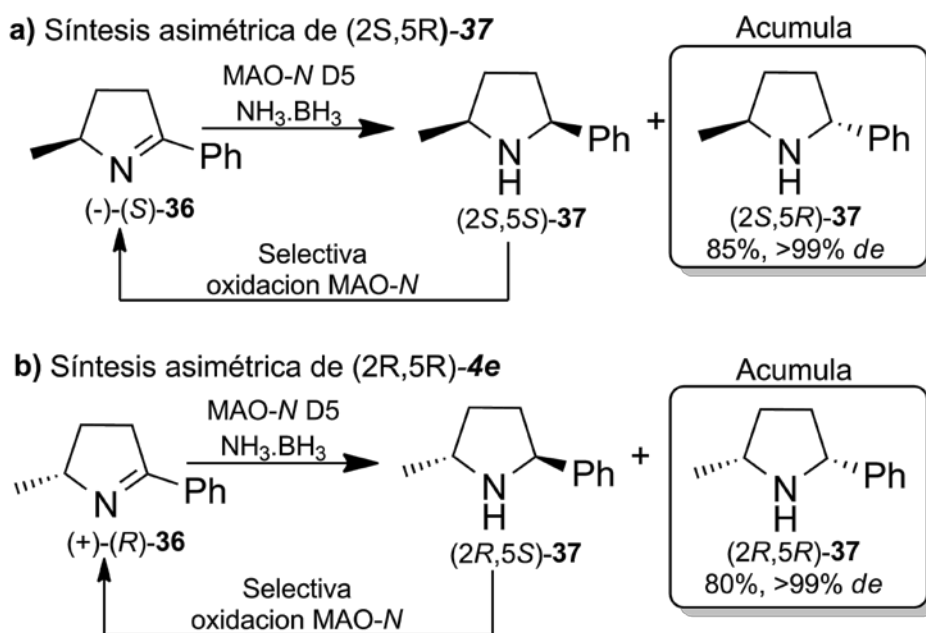


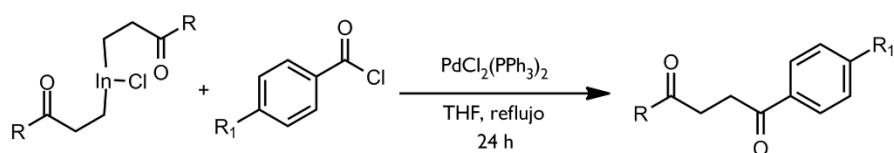
Figura 2.4-3: Síntesis a escala analítica de (2S,5R)- y (2R,5R) pirrolidinas mediada por MAO-N D5

2.4.1.1. Síntesis de los sustratos utilizados: 1,4 y 1,5 dicetonas

Las dicetonas asimétricas necesarias para el presente estudio son compuestos relativamente simples, pese a esto se ha continuado la innovación de su síntesis de manera continua en los últimos años ya que son moléculas difíciles de sintetizar por métodos convencionales.

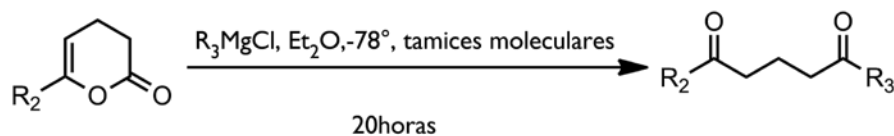
Se optó por sintetizar las mismas con métodos prácticos, eficientes y que, en el mejor de los casos, no implicaran más de dos pasos de síntesis. Por esto se utilizaron las síntesis planteadas en las Fig. 2.4-4 y 2.4-5 desarrolladas por Shen *et al.*²¹⁴ y Harrowen *et al.*²¹⁵

El primero implica un método novedoso mediante el uso de un homoenolato de Indio el cual puede ser acoplado a un cloruro de acilo mediante catálisis por un compuesto de Paladio para dar el compuesto 1,4-dicarbonílico correspondiente, mientras que el segundo implica la adición de reactivos de Grignard a 3,4-dihidropirranonas para dar el compuesto 1,5-dicarbonílico de interés. Los rendimientos de la síntesis de las 1,4- y 1,5-dicetonas se pueden observar en las Fig. 2.4-4 y 2.4-5. Los compuestos sintetizados utilizados en la cascada enzimática se observan en Fig. 2.4-6.



(38) -R=Me, R ₁ =Me	Rendimiento	72%
(39) -R=Me, R ₁ =Cl	Rendimiento	76%
(40) -R=Me, R ₁ =F	Rendimiento	58%
(41) -R=Et, R ₁ =H	Rendimiento	84%
(42) -R=Et, R ₁ =Me	Rendimiento	72%
(43) -R=Me, R ₁ =OMe	Rendimiento	40%

Figura 2.4-4: Síntesis de 1,4-dicetonas de acuerdo a procedimiento elaborado por Shen *et al.* y rendimiento del producto aislado.



(44) -R ₂ = Me, R ₃ = Ph	Rendimiento	64%
(45) -R ₂ = Me, R ₃ = Bn	Rendimiento	59%
(46) -R ₂ = Me, R ₃ = Pr	Rendimiento	69%

Figura 2.4-5: Síntesis de 1,5-dicetonas de acuerdo a procedimiento elaborado por Harrowen *et al.*²¹⁵ y rendimiento del producto aislado.

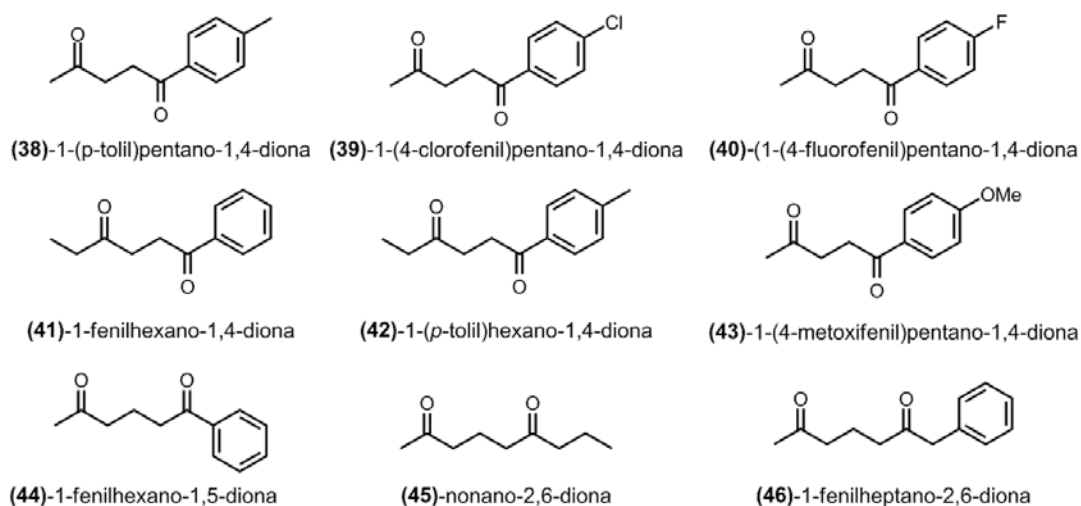


Figura 2.4-6: Dicetonas sintetizadas para estudio de la generalidad del proceso TA-MAO

2.4.1.2. Síntesis enzimática de pirrolinas y piperinas mediante ω -TAs

En esta primera etapa, para la cascada enzimática propuesta se utilizaron dos ω -TA comerciales donadas por Codexis conocidas como ATA113 y ATA117. En primera instancia, se realizaron los ensayos de aminación enzimática con las ω -transaminasas ATA113 y ATA117 para síntesis biocatalítica de las pirrolinas y piperinas a escala analítica (5mM).

Para la obtención de altos rendimientos como los descritos en el segundo capítulo, se han desarrollado varios métodos que desplazan el equilibrio hacia la síntesis de la amina tal como se observa en la Fig. 2.4-7.⁹ Para nuestro trabajo, se decidió utilizar el método 1, utilizado previamente con estas enzimas, en el cual se utiliza un sistema con D o L-alanina como donador del grupo amino y se acopla a un sistema de regeneración de cofactores. En este sistema, con el uso de alanina se produce en la bioaminación piruvato, el cual inhibe la reacción enzimática y por ello es acoplada a la reacción la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), la cual actúa sobre el piruvato produciendo ácido láctico. A esta enzima a su vez se le acopló una GDH para la regeneración del NADH utilizado en la producción de ácido láctico.

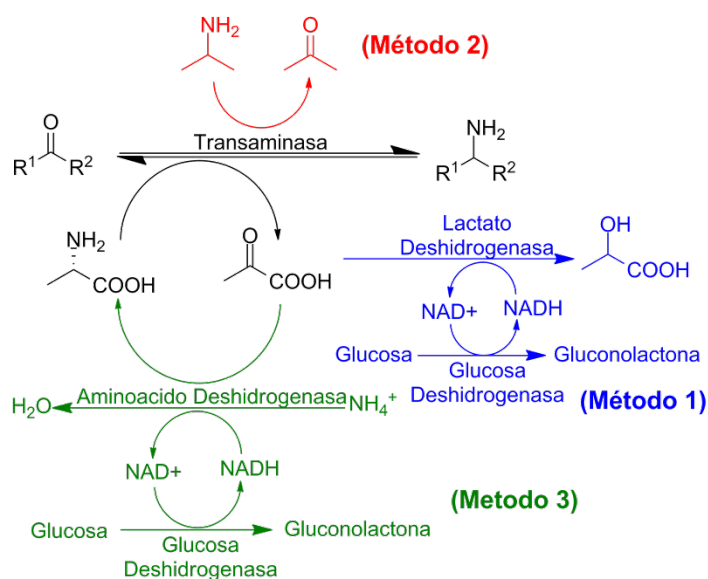


Figura 2.4-7: Procesos desarrollados para reacciones de transaminación que desplazan el equilibrio de la reacción y evitan inhibición por sustratos y productos.

A escala analítica 5mM se observó una excelente conversión y % *ee* para las dos enzimas ensayadas (ver Tabla 2.4-1). En todos los casos se observó que una vez formada la aminocetona se producía una reacción de ciclación termodinámicamente favorable (Fig 2.4-8), dando como producto las pirrolinas y piperinas correspondientes en un alto

rendimiento y excelente exceso enantiomérico. Mediante estos resultados, se verificó que las monoaminaciones son altamente regioselectivas, mediando exclusivamente la aminación de la metil-cetona o el grupo menos impedido ubicado a uno de los extremos de la molécula.

Tabla 2.4-1: Síntesis asimétrica de aminas quirales mediadas por ω -TA ATA113 y ATA117 a escala 5mM-24hs con <i>D</i> -alanina como aminodonor			
Sustrato	ω -TA	% Conversión	% ee
34	ATA 113	≥99	≥99 (<i>S</i>)
	ATA 117	≥99	≥99 (<i>R</i>)
38	ATA 113	≥99	≥99 (<i>S</i>)
	ATA 117	≥99	≥99 (<i>R</i>)
39	ATA 113	≥99	≥99 (<i>S</i>)
	ATA 117	≥99	≥99 (<i>R</i>)
40	ATA 113	≥99	≥99 (<i>S</i>)
	ATA 117	≥99	≥99 (<i>R</i>)
41	ATA 113	70	97 (<i>S</i>)
	ATA 117	n.r	n.r
42	ATA 113	65	95 (<i>S</i>)
	ATA 117	n.r	n.r
43	ATA 113	≥99	≥99 (<i>S</i>)
	ATA 117	≥99	≥99(<i>R</i>)
44	ATA 113	55	≥99 (<i>S</i>)
	ATA 117	35	≥99 (<i>R</i>)
45	ATA 113	≥99	≥99 (<i>S</i>)
	ATA 117	≥99	≥99 (<i>R</i>)
46	ATA 113	≥99	≥99 (<i>S</i>)
	ATA 117	≥99	≥99 (<i>R</i>)

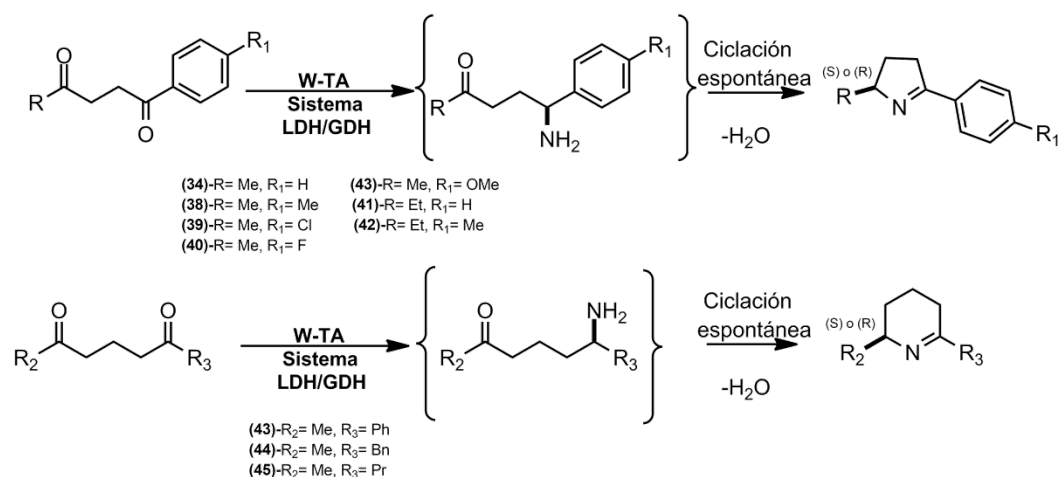
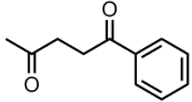
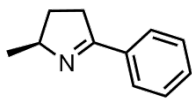
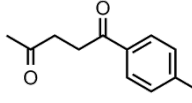
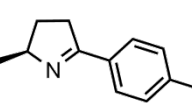
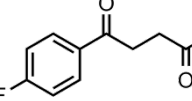
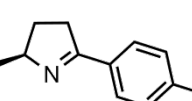
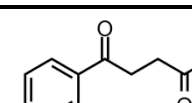
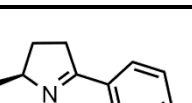
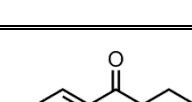
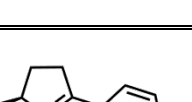
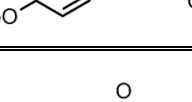

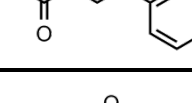
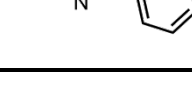
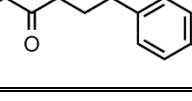
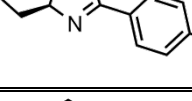
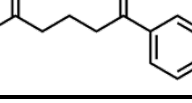
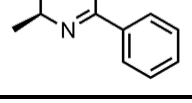
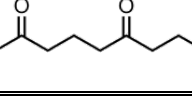
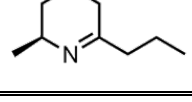


Figura 2.4-8: Aminación reductiva mediada por ω -TAs de 1,4 y 1,5-dicetonas

En los ensayos a escala preparativa en primera instancia (25 mM-datos no mostrados) se observó una disminución de la conversión en todos los casos, en particular en las reacciones con ATA117 (datos no mostrados). Únicamente en los casos de transaminación utilizando ATA113, la baja conversión pudo ser contrarrestada alargando el tiempo de incubación de la reacción de 24 a 48hs. Los resultados obtenidos en las reacciones de aminación a escala preparativa 25 mM con ATA 113 de las 1,4- y 1,5-dicetonas se muestran en la Tabla 2.4-2.

En la Tabla 2.4-2 se pueden observar excelentes resultados en la aminación estereoselectiva obtenidos mediante el uso de ATA113 para los sustratos que contenían el grupo metilo, mientras que para sustituyentes etilo se puede observar una pequeña pérdida de enantioselectividad esperable, causada posiblemente por una diferente disposición del sustrato en el sitio activo de la enzima.

Tabla 2.4-2: Síntesis asimétrica de aminas quirales mediadas por ω -TA ATA113 a escala 25mM-24hs con *L*-alanina como aminodonor

	Sustrato	% Conversión	Exceso enantiomérico	Producto
34		≥99	≥99 (5)	
38		≥99	≥99 (5)	
40		≥99	≥99 (5)	
39		≥99	≥99 (5)	
43		≥99	≥99 (5)	
41		60	96 (5)	
42		≥99	94 (5)	
44		≥99	≥99 (5)	
45		≥99	96 (5)	
46		≥99	≥99 (5)	

2.4.1.3. Resolución Cinética Dinámica quimioenzimática MAO-N/ NH_3BH_3 con 2(*S*)-pirrolinas y 2(*S*)-piperinas

Con los productos purificados obtenidos en el escalado a 25mM de todas las reacciones catalizadas por ATA 113, se procedió a realizar el segundo paso de síntesis para la obtención del segundo centro quiral mediante el uso de monoaminoxidasas (MAO). En esta etapa se decidió utilizar tanto MAO D-5 (ensayos realizados por Elaine O'Reilly) como MAO D-9 ya que ambas están reportadas con actividad en una amplia variedad de aminas.^{47,71,72}

En este paso se sometió el producto obtenido de la primera reacción a un proceso de resolución cinética dinámica quimioenzimática, en el cual se utiliza el agente reductor NH_3BH_3 y las variantes de MAO-N obtenidas por ingeniería genética.^{47,71} Se establece así, el segundo centro quiral de las pirrolidinas a través de un procedimiento que implica desracemización en rondas secuenciales de oxidación enantioselectiva y reducción química no selectiva. El centro asimétrico inicial formado por la ω -TA no se ve afectado en esta segunda etapa quimioenzimática. (Fig. 2.4-9).

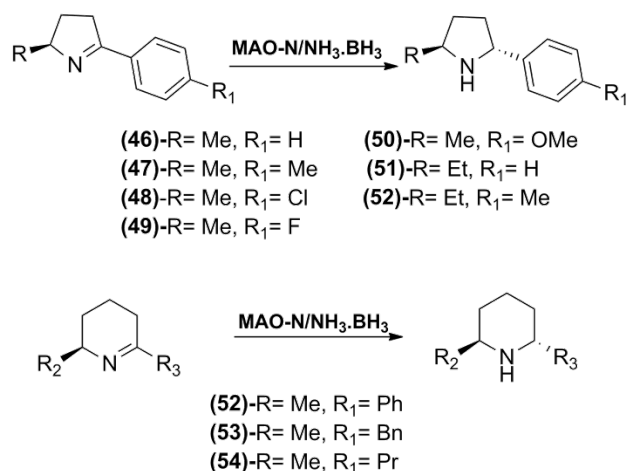


Figura 2.4-9: Esquema de reacción de la resolución cinética dinámica realizada con las *S*-pirrolinas y *S*-piperinas para obtener aminas con los dos carbonos quirales de interés.

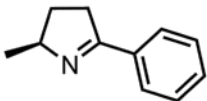
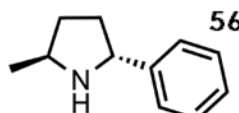
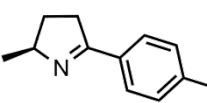
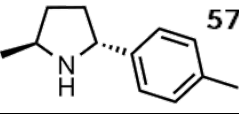
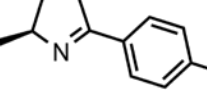
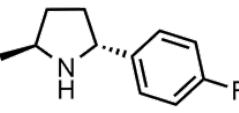
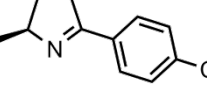
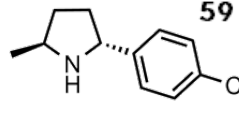
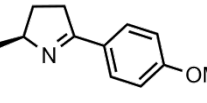
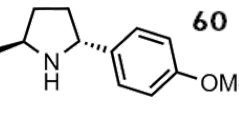
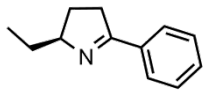
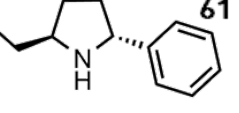
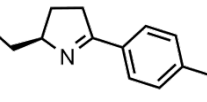
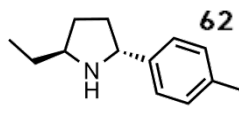
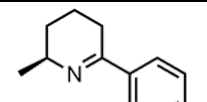
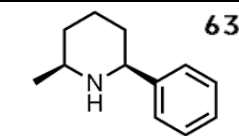
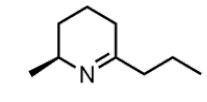
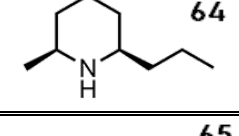
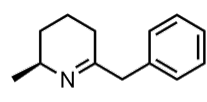
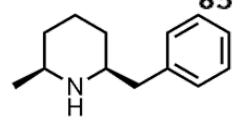
A escala analítica se observó una excelente conversión y alto exceso diastérico para los anillos de 5 miembros (*S*-pirrolinas) sintetizados previamente con ATA113. En general, la variante MAO-D9 mostró una mayor selectividad y el empleo de esta variante MAO-N D9 permitió el acceso a todas las pirrolidinas 2,5-disustituidas Me/Ar y Et/Ar en excelente exceso diastérico (Tabla 2.4-3).

Debido a que las pirrolinas están en equilibrio imina-amino cetona se realizó una optimización de la reacción MAO-N/ NH_3BH_3 (ciclos oxidación/reducción) para prevenir la formación del no deseado aminoalcohol como producto secundario. La reducción de la cetona fue minimizada utilizando la menor cantidad de enzima posible con la mayor cantidad de agente reductor que soporte la misma. Bajo estas condiciones ocurre una rápida reducción de la imina asegurando que existe una mínima concentración de amino cetona durante la biotransformación. De esta manera se llegó en tres pasos a la síntesis de 2*S*,5*R* pirrolidinas con dos centros quirales (Tabla 2.4-3).

El primer ejemplo de bioaminación con ω -TA asimétrica de 1,5-dicetonas con excelente regio y estereoselectividad fue descrito paralelamente a la realización de este trabajo. El mismo se llevó a cabo utilizando el mismo tipo de reacción, sin embargo, las piperidinas 2,6-sustituidas fueron preparadas por vía quimioenzimática empleando hidrogenación diastereoselectiva utilizando Pd/C.²¹⁶ La misma estrategia no es aplicable a la síntesis diastereoselectiva de pirrolidinas 2,5-disustituidas debido a una diastereoselectividad deficiente en la fase de reducción.

En los ensayos de resoluciones cinéticas dinámicas aplicadas a los anillos de 6 miembros sintetizados (piperinas 2,6-disustituidas), se observó que la estrategia MAO/ NH_3BH_3 no era aplicable. Esto en primer momento resultó inesperado ya que esta enzima mostraba actividad con Coniína, un anillo de 6 miembros sin sustituyente en la posición 6.⁷² En todas las biotransformaciones realizadas se observó la producción de las aminas 2*S*,6*S* como compuesto mayoritario (lo cual no era esperado ya que la enzima utilizada puede oxidar selectivamente dicho enantiómero). Esto llevó a proponer la hipótesis posteriormente confirmada, de que estaba existiendo una reducción química diastereoselectiva dando el producto *cis* 2*S*,5*S* en la reducción de la imina con NH_3BH_3 en medio acuoso. Este comportamiento resultó novedoso, ya que existían reportes con varios antecedentes de resolución de piperinas en los cuales se lograba inducción *cis* o *anti* de la diastereoselectividad mediante el uso de H_2 o LiAlH_4 en THF utilizando un ácido de Lewis, pero no en medio acuoso.²⁰⁻²¹

Tabla 2.4-3: Síntesis asimétrica de pirrolidinas y piperidinas mediante resolución cinética dinámica con la enzima MAO D-9 y NH₃BH₃

Sustrato	% Conversión	Exceso diastereomérico	Producto
	≥99	≥99	 56
	≥99	≥99	 57
	≥99	≥99	
	≥99	≥99	 59
	≥99	≥99	 60
	≥99	≥99	 61
	≥99	94	 62
	≥99	8	 63
	≥99	15	 64
	≥99	12	 65

2.4.1.4. Síntesis asimétrica en un solo paso de (2*S*,5*R*)-37 a escala preparativa

El método de producción de 2*S*-5*R* pirrolidinas fue finalmente acoplado en un sistema “one-pot-two-steps” para el compuesto 5-fenil-2,5-pentanodiona como se observa en la Fig. 2.4-10, obteniendo excelentes resultados. Esto abre una puerta para la síntesis de nuevas moléculas, las cuales puedan ser precursores de síntesis de otras moléculas más complejas.

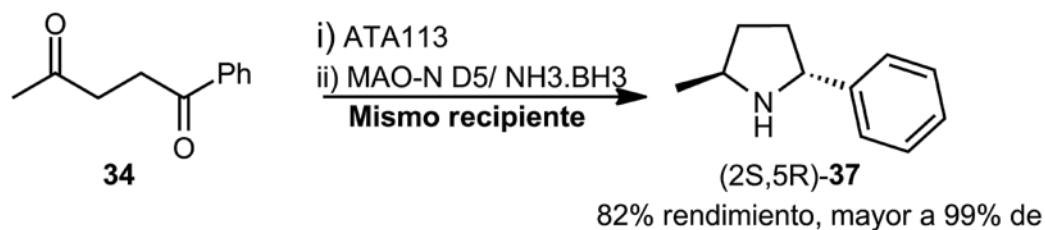


Figura 2.4-10: Cascada TA/MAO-N en dos pasos en mismo recipiente para la síntesis asimétrica a escala preparativa de (2*S*,5*R*)-37.

En resumen, se puede concluir que ω -TA ATA 113 es altamente selectiva para la porción metilcetona, la cual es estéricamente menos exigente, mientras que la MAO-N muestra una abrumadora preferencia por la parte más voluminosa de la correspondiente pirrolidina. La compatibilidad de ambos biocatalizadores significa que la reacción se puede realizar en un sólo paso, sin la necesidad de pasos intermedios de purificación. La reducción de la dicetona inicial con NH₃BH₃ impidió la adición de todos los reactivos al mismo tiempo. El enfoque quimioenzimático planteado explota tres biocatalizadores distintos y se beneficia de la regioselectividad complementaria mostrada por ω -TA y variantes de la MAO para el establecimiento de dos centros estereogénicos.

2.4.2. Cascada MAO-N/ ω -TA para la desracemización de aminas quirales

Aunque la simplicidad de la resolución cinética mediada por enzimas significa que es uno de los métodos más comunes para acceder a las aminas ópticamente enriquecidas o sus derivados a partir de racematos, la mayor limitación de este enfoque es el rendimiento máximo del 50%. Como se describió anteriormente, las MAO-N de *A. niger* han sido utilizadas en la obtención de aminas cíclicas quirales, por oxidación selectiva de la (*S*)-amina componente de la mezcla racémica, seguida por la reducción no selectiva con NH_3BH_3 , lo que resulta en la acumulación del enantiómero *R* en el tiempo.^{47,68-72} Si bien este enfoque ha sido aplicado con éxito para la desracemización de aminas cíclicas, su utilidad con estructuras acíclicas está limitada por la hidrólisis de la imina en condiciones acuosas.

En esta sección, se supera esta limitación mediante la explotación de la rápida hidrólisis de iminas para dar la cetona correspondiente y, posteriormente, el empleo de una ω -TA para regenerar la amina quiral en un proceso de estereoinversión, dando como producto el enantiómero opuesto. Nuestro enfoque se basó en la oxidación selectiva de la MAO-N de la (*S*)-amina, la imina resultante se hidroliza espontáneamente a la cetona correspondiente y luego la acción de una ω -TA selectiva produce la amina *R* a partir de la cetona obtenida. De esta forma, el proceso global resulta en la acumulación de la amina quiral *R*, logrando la desracemización de la mezcla racémica, en un solo paso, sin la necesidad de tratamiento térmico. En la Figura 2.4-11 se pueden observar las estrategias implementadas para las desracemizaciones.

La metilbencilamina (MBA) se utilizó como compuesto modelo para evaluar la eficacia del método de desracemización (Fig. 2.4-11). Anteriormente, la resolución cinética de un panel similar de derivados MBA usando ω -TA ATA-117 ha sido reportada.^{84,217}

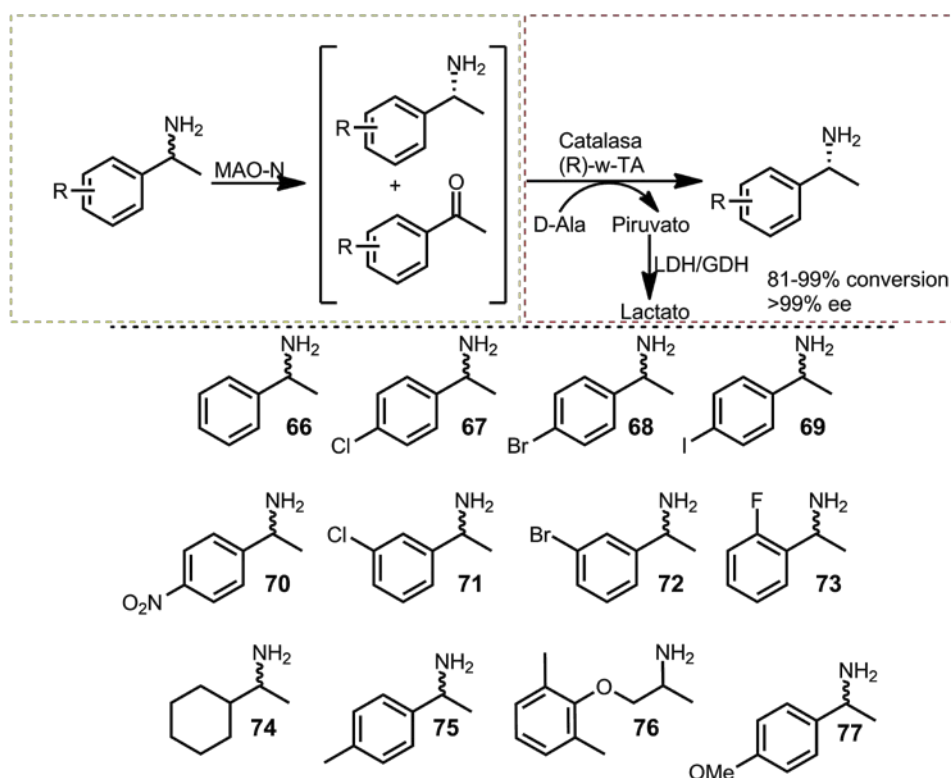


Figura 2.4-11: Esquema de reacción implementado para la síntesis de aminas quirales partiendo de mezclas racémicas utilizando sistema “one pot-two steps” con 5 enzimas.

La metilbencilamina-(66) fue sometida a la variante MAO-N D9 purificada en buffer fosfato, proporcionando una mezcla 50:50 de acetofenona y (*R*)-metilbencilamina después de 16 horas. A pesar de la alta conversión de acetofenona a (*R*)-MBA catalizada por la transaminasa ATA117 reportada en diferentes publicaciones,⁸⁴ la aminación reductiva subsecuente por la TA en el mismo recipiente produjo inicialmente una baja conversión de acetofenona a (*R*)-MBA (70%), con un 30% de la cetona restante. Al ser acetofenona el sustrato modelo utilizado con el cual la transaminasa ATA117 presenta excelente actividad, era una condición necesaria optimizar la reacción para asegurarnos la mayor conversión posible con los derivados de acetofenona a ser evaluados.

Debido a ello, se hipotetizó que el subproducto H₂O₂ obtenido en la reacción de oxidación mediada por la MAO estaba afectando negativamente la reacción de la *R*-TA. Por lo tanto, la cascada se repitió en presencia de catalasa, enzima que descompone el peróxido de hidrógeno. La adición conjunta de catalasa con el sistema TA-lactato deshidrogenasa/glucosa deshidrogenasa (LDH/ GDH) después de la oxidación e hidrólisis de MAO-N proporcionó (*R*)-**34** con >99% de conversión y un >99% de *ee*.

En la tabla 2.4-4 se pueden observar los resultados obtenidos en la desracemización para la formación de *R*-aminas de diferentes sustratos. Se observaron muy buenos resultados en la mayoría de los sustratos ensayados, mientras que para los sustratos **76** y **77** la conversión o el *ee*% no es muy bueno o no fue posible lograr el funcionamiento del sistema “*one pot*”. Esto se debe a que para que se obtenga la amina deseada con alto *ee*% y alta conversión las enzimas utilizadas deben aceptar ambas el sustrato con alta regio- y enantioselectividad.

En resumen, se logró establecer un sistema de desracemización en una misma reacción, con cinco biocatalizadores y reactivos actuando paralelamente de manera simple y práctica. De esta forma se logran obtener las aminas enantiomericamente puras a partir de una mezcla racémica o a partir de la amina con estereoquímica opuesta.

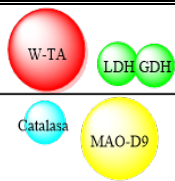


Tabla 2.4-4: Resultados de reacciones de desracemización a escala 5mM

Sustrato	% Conversión Nota: respecto a la cetona producida por MAO	Exceso enantiomérico de enantiómero- <i>R</i>
	≥99	≥99
	87	≥99
	91	≥99
	90	≥99
	99	≥99
	90	≥99
	90	≥99
	81	≥99
	64	≥99
	0	≥99
	0	0

2.4.3. Cascada MAO-N/ ω -TA para la dealquilación general de aminas secundarias.

Muchas aminas y sus correspondientes derivados alquilados, incluidos los miembros de la familia de los opiáceos, tienen una potente actividad biológica y como tal, la N-dealquilación es una transformación importante en la industria farmacéutica. Se han reportado varios enfoques químicos para la dealquilación de aminas, a menudo requiriendo condiciones de reacción severas.^{218,219}

La N- y O-desmetilación es una transformación fundamental en el metabolismo de fármacos y se sabe que las vías biosintéticas naturales mediadas por citocromos P450 catalizan esta reacción con una selectividad excelente, pero muchas veces actúan sobre un espectro limitado de sustratos.^{220,221} Hemos demostrado previamente que las variantes de MAO-N oxidan selectivamente las aminas sustituidas por grupos alquilo voluminosos en preferencia a aquellos con grupos más pequeños. Por lo tanto, expusimos aminas secundarias a la combinación MAO-N/ ω -TA con el objetivo de acceder al producto dealquilado, la benzilamina (Fig. 2.4-12).

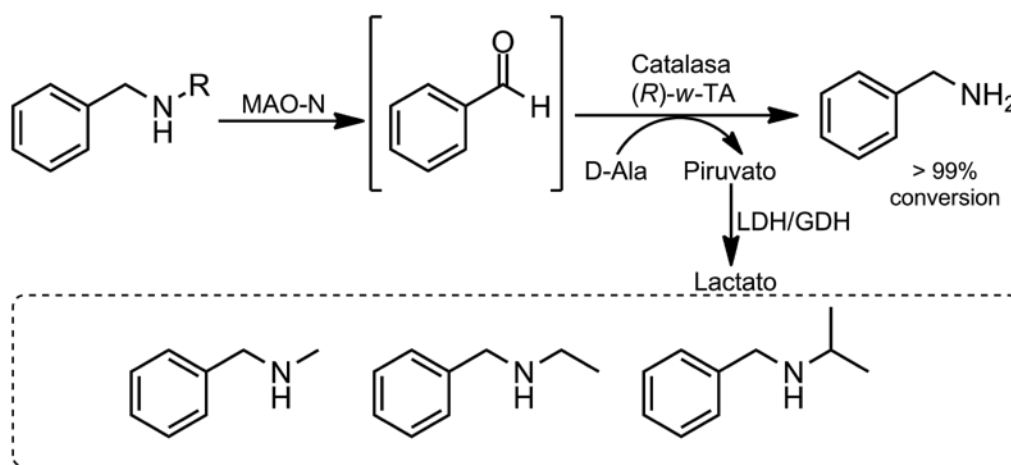
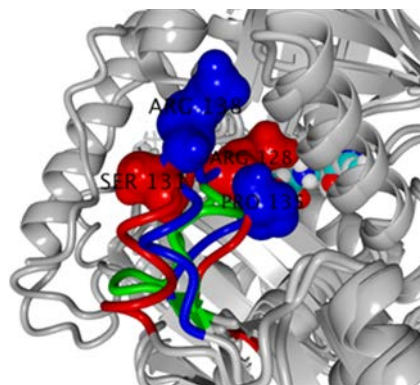


Figura 2.4-12: Cascada MAO-N/ ω -TA para la dealquilación enzimática de aminas. En el recuadro se encuentran los sustratos ensayados.

Como era de esperar, MAO-N D9 mediaba la dealquilación oxidativa de la amina regioselectivamente, produciendo benzaldehído, que se convirtió en benzilamina usando ATA117 y un exceso de D-alanina, después de la eliminación de peróxido producido en la primera reacción. La secuencia dealquilación-aminación se llevó a cabo con un 99% de conversión para los tres sustratos ensayados de la fig. 2.4-14, lo que representa formalmente un método de conversión selectiva de aminas en medios acuosos y condiciones suaves.

La regioselectividad descrita en trabajos previos para las variantes de MAO-N, diseñadas por evolución dirigida de proteínas para la oxidación de aminas voluminosas y lipofílicas (MAO-N D11)⁴⁶ o alquil sustituidas o estéricamente menos exigentes (MAO-N D5 o D9)⁷² sugiere que esta metodología no se limita a los sistemas ariloalquílicos, sino que puede ser eficaz para mediar dealquilaciones regioselectivas de aminas secundarias dialquílicas asimétricas.

Se requiere una mayor optimización para reducir la cantidad de los costosos donadores de aminas empleados, lo que incluye la posibilidad de reciclar los subproductos de metil-, etil- e isopropilamina formados durante la alquilación como alternativa de donadores de aminas.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 2.5

2.5. Explorando nuevas estrategias biocatalíticas en síntesis enzimática de aminas

2.5.1. Transaminación biocatalítica con donantes de aminas de bajo costo mediada por transaminasas bifuncionales.

La aminación asimétrica de cetonas a aminas quirales enantioméricamente puras mediada por ω -amino transaminasas (ω -ATAs) es sin duda una de las biotransformaciones más estudiadas y explotadas que se ha integrado en la práctica industrial en esta última década. La amplia tolerancia de sustratos de esta clase de enzimas es una de sus características más atractivas en aplicaciones sintéticas. Un ejemplo prominente de esto es la fabricación comercial de Sitagliptina, probablemente una de las historias de éxito más citadas de la biocatálisis industrial moderna.¹⁰² Como se ha demostrado en esta tesis, para estas reacciones los equilibrios termodinámicos son a menudo desfavorables y, por lo tanto, se han buscado diferentes métodos para cambiar el equilibrio a fin de abordar este desafío (ver Fig 2.5-1).^{84,102,175}

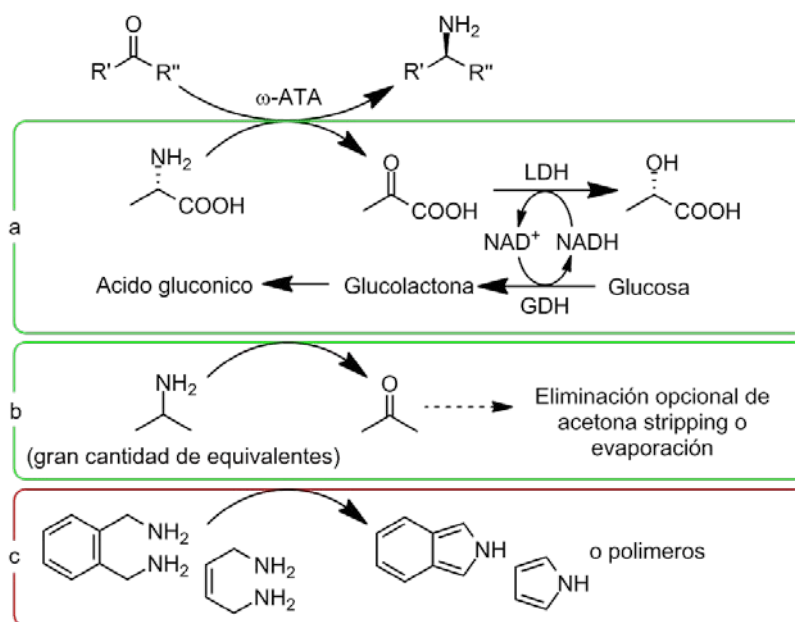


Figura 2.5-1: Sistemas de reacción para la utilización de TAs

Uno de los primeros enfoques, el cual ha sido utilizado en los primeros capítulos y aún de confianza, es el acoplamiento de la reacción enzimática con una reacción secundaria irreversible al mismo tiempo que produce compuestos degradables como subproductos, (Fig. 2.5-1a), método que tiene la desventaja de requerir dos enzimas adicionales para lograr una alta conversión de la cetona inicial. Por otro lado, para aplicaciones a escala industrial, se prefiere el uso de un donante de amina en grandes

excesos para conducir el equilibrio (Fig. 2.5-1b), siendo La isopropilamina utilizada ampliamente con este fin, debido a su eficacia y disponibilidad.

Más recientemente, el uso de diaminas sintéticas ha sido el punto de referencia para desplazar los equilibrios de las reacciones de ω -ATA por ciclación espontánea y posterior aromatización en el anillo del amino carbonilo (Fig. 2.5-1c). Sin embargo, estos grupos donantes de aminas suelen ser caros, altamente tóxicos y a menudo forman polímeros difíciles de eliminar tras la aromatización, añadiendo a los costos el tratamiento posterior.

Por el contrario, las diaminas biogénicas se presentan como donantes alternativos de aminas generados a partir de fuentes renovables. Además de su simple producción basada en biotecnología y su costo relativamente bajo, al transaminarlos se obtienen aminoaldehídos reactivos que se convierten espontáneamente en iminas cíclicas, impulsando así el equilibrio hacia la aminación de cetonas. Las enzimas activas en tales compuestos, conocidas como α,ω -diamino transaminasas (α,ω -DTAs), han explotado estas ventajas para la síntesis de precursores de N-heterociclos.^{104,222}

Sin embargo, hasta ahora se encontró que estas enzimas tienen una estricta preferencia por el piruvato sobre otras cetonas, haciéndolas inadecuadas para la síntesis de un amplio rango de aminas. Si se pudieran abordar estos problemas de especificidad del sustrato, las diaminas biogénicas ofrecerían un enfoque distinto a las cuestiones de equilibrio, mediante mecanismos intrínsecamente más "verdes" que las anteriores, ya que, en principio, podrían aplicarse cantidades casi estequiométricas de donante de amina.

De hecho, el único ejemplo hasta ahora, es una transaminasa comercial (ATA256) que se ha encontrado recientemente a través de un examen exhaustivo de un gran panel de biocatalizadores de la empresa Codexis, lo que pone de relieve la rareza de esa actividad.¹⁷⁶ Se demostró que esta transaminasa tiene actividad con un rango acotado de cetonas, su naturaleza comercial nos limita la posibilidad de analizar la secuencia proteica para realizar análisis filogenéticos en base de datos, así como bioinformáticos para estudiar estructura tridimensional de la proteína.

Para abordar esta brecha, junto al grupo de trabajo formado por el Dr. James Galman, Dr. Iustina Slabu, Dr. Nicholas J. Weise y Prof. Nicholas Turner, el cual integré en mis instancias de pasantía en Manchester, se realizó una búsqueda de nuevas enzimas candidatas capaces de aceptar donantes de diamina con un rango de sustratos más amplio.

En primera instancia identificaron el gen *spuC*, que codifica para una putrescina transaminasa participante de la vía de absorción y utilización de las poliaminas en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. El operón *Spu*, que consta de 9 genes, se caracterizó previamente como responsable del transporte de espermidina y de la ruta catabólica de la putrescina en la vía de la arginina decarboxilasa. En *E. coli* se encuentran genes homólogos, como el gen complementario *ygjG* que codifica la putrescina transaminasa y que sugiere una vía común entre los dos microorganismos.²²³ Para investigar las relaciones evolutivas entre las transaminasas dependientes de putrescina y las caracterizadas ω -TAs, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias, a partir de la cual se pudo construir una cladograma (Fig 2.5-2). Interesantemente, se encontraron que las secuencias con reportada actividad diamina transaminasa se agruparon dentro de las secuencias de ω -ATA como un grupo. Sin embargo, el gen *SpuC* de *P. aeruginosa* (Pa-SpuC) tiene una identidad de secuencia muy alta con la muy estudiada $S\omega$ -TA de *Chromobacterium violaceum* (54%) y sólo un 24% de identidad con la α, ω -DTAs de *E. coli* YgjG en teoría, funcionalmente similar.

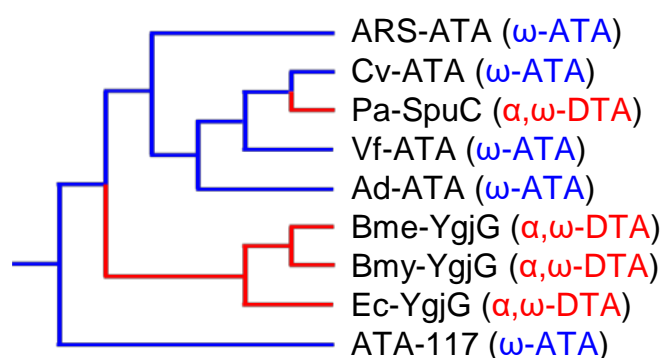


Figura 2.5-2: Cladograma a partir de la secuencia de aminoácidos que muestra las relaciones evolutivas entre varias enzimas transaminasas.

Debido a la mayor similitud de secuencia entre el gen *Pa-SpuC* y los biocatalizadores caracterizados de ω -TAs, esta enzima fue elegida para la investigación de la potencial actividad ω -TAs. Un análisis BLAST del gen *spuC* de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 reveló otros genes homólogos de otras especies de *Pseudomonas*, en particular *P. putida* (Pp-spuC), *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* (Pc-spuC) y *P. fluorescens* (Pf-

La determinación de la aplicabilidad de estas enzimas en diferentes sustratos se probó mediante un panel de cetonas proquirales que proporcionan aminas de interés sintético para química fina (Fig 2.5-4). Como se señala en la figura, la imina formada como subproducto de reacción polimeriza. No obstante, el producto correspondiente es soluble en agua y no interfiere, por lo tanto, los productos de transaminación pueden ser fácilmente recuperados por extracción (junto con la cetona residual) para el análisis por HPLC. Las conversiones más altas obtenidas para cada sustrato entre las tres enzimas SpuC se enumeran en la Tabla 2.5-1.

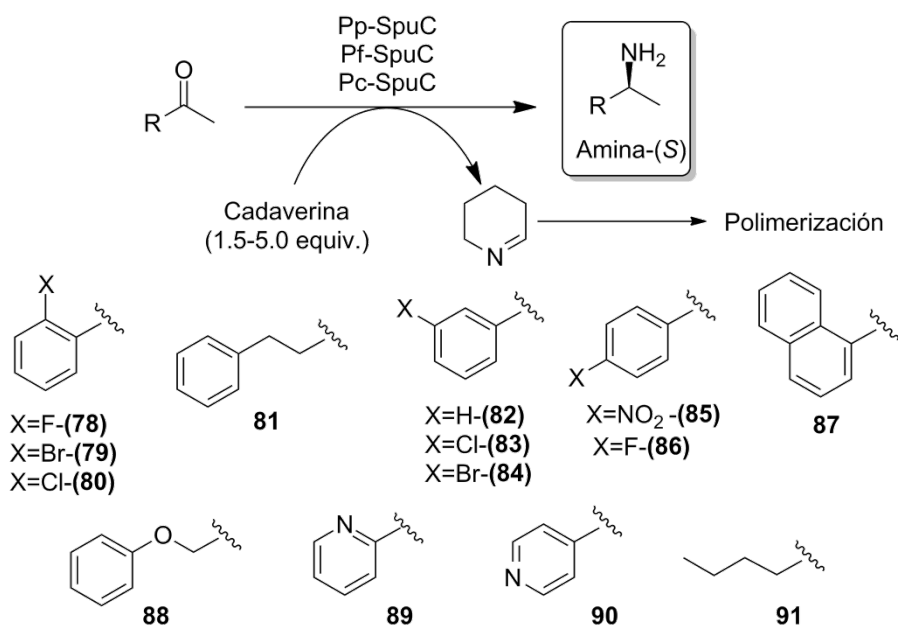


Figura 2.5-4: Panel de cetonas aromáticas y alifáticas ensayadas con enzimas SpuC.

Tabla 2.5-1: Aminación de cetonas con enzimas SpuC con 3 equivalentes de cadaverina como grupo aminodonor						
Aminodonor: Cadaverina						
Substratos	Pp-SpuC		Pf-SpuC		Pc-SpuC	
	conversion (%)	ee (%)	conversion (%)	ee (%)	conversion (%)	ee (%)
78	95	>99	95	>99	97	>99
79	68	>99	65	>99	93	>99
80	88	>99	83	>99	91	>99
81	64 ^b	>99	59 ^b	90	72	74
82	42 ^b	>99	25 ^b	>99	34	>99
83	16 ^b	>99	44 ^b	>99	62	>99
84	80 ^b	>99	46 ^b	>99	56	>99
85	59	>99	63	>99	93	>99
86	28	80	13	>99	35	>99
87	59 ^b	>99	10	>99	80	>99
88	99	96	98	>99	87	>99
89	96	>99	58	>99	5	>99
90	95 ^b	>99	73	>99	57	>99
91	99	90	99	>99	99	84

b: 5 equivalentes de aminodonor fueron utilizados.

El enantiómero *S* de la amina se formó en todas las reacciones, la mayoría de las veces con una enantioselectividad mayor a 99%. Sólo con los sustratos **81**, **86**, **88** y **91** se observan valores de excesos enantioméricos ligeramente inferiores, sin embargo, al menos una de las tres enzimas SpuC probadas proporcionó el producto *S* con un 99% *ee*. Esto pone de manifiesto la importancia de examinar a varios miembros diferentes de una misma familia de proteínas a los efectos de contar con biocatalizadores para diferentes aplicaciones. En el caso de las cetonas *orto*-sustituidas **78**, **79** y **80**, las cuales están impedidas estéricamente se han conseguido elevadas conversiones con alta enantioselectividad (>99%). Estas altas conversiones se deben presumiblemente a una interacción estabilizadora entre la amina formada y el átomo halógeno en la posición *orto*, que impulsa la reacción de transaminación con mayor facilidad, en lugar de basarse únicamente en la activación electrostática del sustituto halógeno.¹⁸⁶

Asimismo, se ha sugerido un efecto estabilizador similar del enlace H intramolecular con el nuevo grupo amino y el oxígeno del sustrato **24** lo que explicaría la buena conversión (81-92%) de este sustrato.¹⁸⁴ Para los sustratos cetonas no activadas (**81-83**, **86** y **90**) las conversiones fueron considerablemente más bajas, por lo que se probó una carga mayor de cadaverina (aminodonor) en las reacciones (5 equiv.), lo que llevo de modestas a excelentes conversiones (trabajo realizado por Dr. James Galman y Lic. César Iglesias).

2.5.2. *n*-Butilamina como donante alternativo de aminas para la transaminación biocatalítica estereoselectiva de cetonas

Anteriormente se han realizado varios intentos de estrategias rentables y ambientalmente amigables para reemplazar la isopropilamina o alanina por *n*-butilamina como donante de grupos amino con transaminasas disponibles comercialmente, pero en todos los casos se detectó una formación de producto muy baja. Posiblemente, el aldehído producido puede unirse irreversiblemente a la enzima afectando la actividad catalítica general.^{186,224} En este caso, eludimos las limitaciones e implementamos una novedosa cascada enzimática que aprovecha la alta actividad de la transaminasa Pp-SpuC recientemente publicada en tándem con una aldehído reductasa YqhD de *E.coli*.^{225,226}

La proteína yqhD se describe como un secuestrador de aldehídos reactivos en vías no metabólicas y tiene actividad reductasa dependiente de NADPH hacia aldehídos simples con un alto número de recambio para el *n*-butanal, y también demostró ser efectiva en la producción industrial de isobutanol.²²⁷ La aldehído reductasa (YqhD) requiere NADPH como cofactor para reducir el aldehído eficientemente, por lo que se buscó un sistema alternativo de reciclaje de cofactores después de que la experiencia previa con la glucosa deshidrogenasa condujera a una reducción de las cetonas sustrato. Nuestra atención se centró en la enzima fosfito deshidrogenasa (PtxD) como parte de una cascada de reciclaje de NAD(P)⁺ que raramente ha sido explotada y se presenta con varias ventajas sobre los sistemas explotados hoy en día.²²⁸

Los sistemas utilizados tienen actividades específicas bajas y costos de producción altos y la generación de subproductos ácidos (ácido glucónico o carbónico) que requieren una adición controlada de base no adecuada para reacciones sensibles al pH. PtxD se presenta como una alternativa atractiva que cataliza una reacción casi irreversible con una constante de equilibrio termodinámicamente favorable para reducir

nicotinamida NAD(P)⁺, con la generación de fosfato, inocuo como subproducto y con efectos insignificantes sobre el pH.^{229,230}

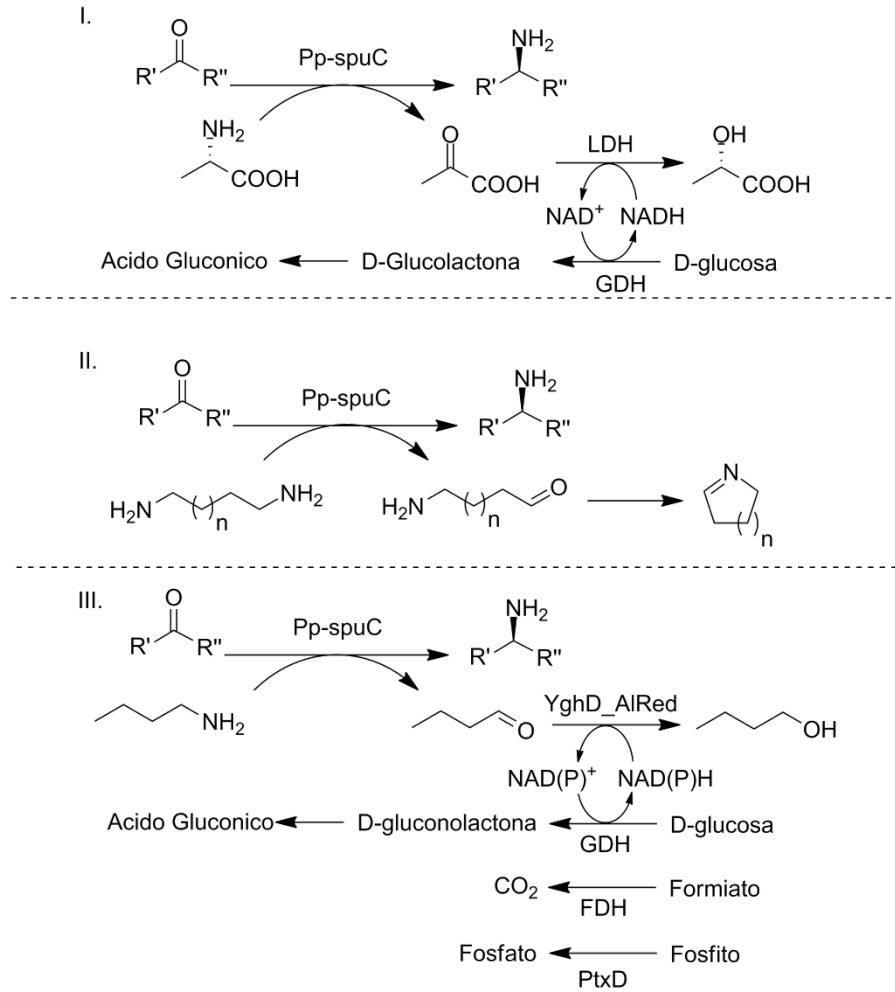
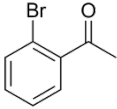


Figura 2.5-5: Resumen de las estrategias de desplazamiento del equilibrio de la transaminación con la transaminasa bifuncional SpuC. Cada aminodonor presenta un método específico de reciclaje/extracción a coproductos.

Tabla 2.5-2 Exploración de las condiciones seleccionadas para la aminación de la cetona

Sustrato	ATA	Sistema AlRed/PtxD NAD(P) ⁺	Equiv. de1	Conv. (%)	ee (%)
	Pp_spuC	No	1.5	23	>99
	Pp_spuC	No	5	10	>99
	Pp_spuC	No	20	10	>99
	Pp_spuC	Si – NADP ⁺	1.5	92	>99

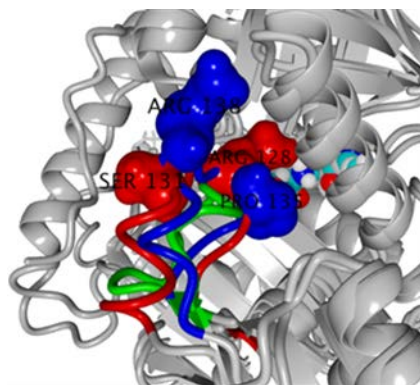
Para analizar el sistema idealizado se realizaron biotransformaciones utilizando Pp-spuC con concentraciones variables de *n*-butilamina utilizando acetofenona. Al aumentar los equivalentes del grupo aminodonor se obtuvieron conversiones bajas, sugiriendo un efecto inhibitor asociado a la formación del producto. Este problema se resolvió acoplando la reacción con la aldehído reductasa YqhD de *E.coli* que requiere NADP⁺. A la luz de los altos costos del cofactor, se utilizó un sistema de reciclaje *in situ* con NADP⁺ y la fosfito deshidrogenasa PtxD de *P. stutzeri*. La enzima nativa PtxD no acepta NADP⁺, en su lugar utilizamos una variante diseñada por ingeniería genética que contiene mutaciones puntuales: E175A y A176R, que se ha reportado provocan un aumento de 3,6 y 1000 veces en la eficiencia catalítica para NAD⁺ y NADP⁺ respectivamente.

Notablemente, 1,5 equivalentes de *n*-butil-amina con cantidades catalíticas de NADP⁺ fueron capaces de conducir eficientemente la reacción mientras se obtenía la amina quiral como producto (92% de conversión, Tabla 2.5-2) y se producía *n*-butanol, un subproducto que tiene un considerable interés como combustible alternativo a la gasolina, debido a su alta hidrofobicidad.

Las transaminasas comerciales ATA-113 y ATA-117 de Codexis también fueron probadas con la cascada AlRed/PtxD usando cantidades catalíticas de NAD⁺. En estas reacciones se observó una conversión de 55% y 27% respectivamente. Estas conversiones pueden atribuirse a la escasa aceptación de la *n*-butilamina como donador de amino, en comparación con la Pp-spuC, que demostró tener un perfil de aceptación de donantes de amina más expandido.

Animado por estos resultados, el equipo de trabajo continuó con el estudio de las otras proteínas SpuC de las especies de *Pseudomonas*, Pf-spuC y Pp-spuC. Nuestros estudios previos han demostrado que estas enzimas tienen una actividad comparable con esta clase de sustratos; sólo se observaron pequeñas diferencias entre las tres transaminasas. Las reacciones se realizaron utilizando exclusivamente NAD^+ como cofactor en el sistema de extracción de butanal AlRed/PtxD, ya que se encontró que era un excelente sustituto del costoso NADP^+ .

En este capítulo se demostró que el uso de enzimas de la clase SpuC permite el uso de la *n*-butilamina, un aminodonor alternativo mal aceptado por otras TAs. Los problemas relacionados con el equilibrio desfavorable y el coproducto reactivo generado en esta transformación se abordaron mediante la combinación con la enzima tipo aldehído reductasa, que impulsó la reacción a grandes conversiones y dio butanol como un producto secundario benigno. Para eliminar la interacción enzimática entre la reductasa y los sistemas de reciclaje de cofactores utilizados, como la glucosa deshidrogenasa (GDH), se empleó una enzima metabolizadora de fosfito de doble especificidad para la regeneración de NADPH o NADH . Se demostró la utilidad de esta estrategia para una serie de transformaciones químicas relevantes para la industria farmacéutica, incluida la producción de (*S*)-orto-bromofeniletanamina.



3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Capítulo 3

Conclusiones y perspectivas a futuro

El objetivo del proyecto de investigación era evaluar y desarrollar nuevas rutas biocatalíticas para la producción de aminas quirales. Esta tesis ha aportado un mejor entendimiento de lo valiosas que pueden resultar en síntesis biocatalítica las monoaminooxidasas y transaminasas ya sea comerciales o producidas en el laboratorio mediante la búsqueda de nuevas secuencias disponibles en la vasta base de datos de genomas existente que puedan reportar esta actividad. Mediante esta última técnica se ha clonado y caracterizado una nueva *R*-TA proveniente de *Capronia semiimmersa*. Además, se han estudiado dos enzimas con actividad iminoreductasa reportadas previamente, y se han seleccionado varias secuencias con posible potencial de actividad iminoreductasa. Se ha logrado con éxito la síntesis de un variado espectro de aminas quirales con potencial uso como intermediarios farmacéuticos. Los resultados obtenidos han aportado significativamente al conocimiento sobre la síntesis asimétrica enzimática de aminas quirales, utilizando tanto células enteras como enzimas purificadas.

Las iminoreductasas y el concepto de reducción biocatalítica de iminas no eran desconocidos en la naturaleza. La transformación en sí misma, sin embargo, era relativamente inexplorada para el propósito de la biocatálisis. En el primer capítulo, dos enzimas (EasG y Ipr3) con actividad iminoreductasa reportada han sido estudiadas, las mismas eran descritas como participantes en la reducción de iminas en diferentes caminos metabólicos de diferentes microorganismos. Hasta el momento los estudios realizados han demostrado que no se ha podido determinar una especificidad de sustrato diferente de la que fue reportada originalmente en la naturaleza. Un problema reportado en este trabajo es la baja cantidad de enzima en estado soluble generada en los sistemas de expresión utilizados, a pesar de los varios intentos de optimización realizados. Una mejor optimización de estos sistemas debe ser realizada a futuro, el uso de bajas cantidades de enzima puede haber generado resultados falso negativos de estas enzimas que en primera instancia resultaban ser candidatos prometedores para reducción de enlaces imina.

Además, mediante análisis de motivos conservados detectados y análisis de motivos de IRED reportados en paralelo a nuestro trabajo¹²³, se realizó una búsqueda de nuevas IRED en genomas nativos de *Streptomyces*. Como resultado, se han encontrado varias secuencias que cumplen con las características para ser potenciales enzimas reductoras de iminas. Las mismas deberán ser expresadas en sistemas adecuados, y además ser caracterizadas en su especificidad de sustrato para analizar su potencial utilización en la síntesis de aminas quirales. En estas secuencias elegidas, se evaluará además la capacidad de catalizar aminación reductiva a partir de cetonas y aminas en el medio de reacción dando como resultado la amina formada a partir de la reducción de la pequeña cantidad de imina generada de forma natural por equilibrio químico. Esta novedosa reacción ha sido reportado recientemente provocando una nueva e interesante aplicación de IREDS.^{52,231}

Entre las estrategias biocatalíticas que habían sido desarrolladas para síntesis, el uso de ω -transaminasas (ω -TA) aparecía como una alternativa atractiva que permitía la aminación estereoselectiva de cetonas proquirales. Sin embargo, los problemas asociados con la especificidad del sustrato, el desfavorable equilibrio de reacción y los costosos aminodadores eran una marcada dificultad a superar en primera instancia.

En el segundo capítulo de este manuscrito se demostró que la búsqueda de enzimas en la naturaleza puede contribuir para ampliar el repertorio catalítico de ω -TA y ayudar a sortear algunos de estos problemas. Se aplicó un enfoque de "genome mining and motif analysis", basado en el trabajo descrito por Höhne *et al.*¹⁶⁶ utilizando criterios adicionales para la selección de potenciales secuencias R - ω -TA que difieran de las descritas en literatura previamente. A partir de 423 candidatos, la secuencia R - ω -TA de *Capronia semiimmersa* fue seleccionada, clonada y expresada en *Escherichia coli*. Interesantemente, la alineación de esta enzima con secuencias de TA previamente reportadas^{102,169,170,173,178,181} reveló la presencia de dos residuos adicionales de aminoácidos en un *loop* cerca del sitio activo. El impacto de este cambio fue analizado con un modelo estructural basado en R - ω -TAs cristalizadas, en este modelo se observó que esta enzima contenía un *loop* similar al observado en la TA diseñada por evolución dirigida, utilizada en la síntesis de la Sitagliptina.¹⁰² La enzima expresada demostró aceptar D-alanina así como también isopropilamina como grupo aminodador y tener actividad sobre una variedad importante de cetonas. Se realizó una caracterización parcial de la misma, la temperatura óptima es de 35 °C, manteniendo actividad entre 20 y 40 °C. Para la reacción de resolución cinética de metilbencilamina se obtuvo una V_{\max}

aparente de $8.7 \cdot 10^{-5}$ mM/s, una K_m 0.30 mM y una k_{cat} de 0.156 s^{-1} , constantes cinéticas cercanas a las descritas para otras R-TA.^{100,179}

Una caracterización bioquímica más profunda deberá ser realizada, determinando pH óptimo, estabilidad en el tiempo, así como efectos de los iones metálicos sobre la actividad enzimática; recientemente ha sido reportado que el ion Zn^{+2} puede provocar un aumento de cinco veces en la actividad en condiciones óptimas.²³² Además, nuevos sistemas de reacción reportados recientemente deberán ser evaluados para esta enzima.²³³

Durante los ensayos realizados sobre diferentes sustratos, se observó que *R-TA Cap* no era capaz de aminor sustratos conteniendo cadenas alquílicas largas en la porción destinada a alojarse en la cavidad pequeña del sitio activo, algo esperado para este tipo de enzima. Dado que esta característica no es la adecuada para determinadas aplicaciones biocatalíticas, como por ejemplo la síntesis de aminas quirales precursores de diferentes fármacos,³¹ nos planteamos la utilización de métodos de ingeniería genética para extender el rango de sustratos aceptados por *R-TA Cap*. En base al modelo tridimensional realizado, se seleccionaron cinco aminoácidos que podían afectar el posicionamiento del sustrato en la cavidad pequeña del sitio activo: V62, F115, R128 y A287 y un doble mutante R128/S131. Mediante alineamiento de secuencia con mutante ATA-117-RD11 y análisis estructural se decidió realizar en primera instancia mutagénesis sitio dirigida V62T, F115M, R128P, A287G y doble mutante R128P/S131R. Hasta el momento han sido analizados V62T, R128P, A287G; para todos ellos fue posible obtener variantes con la actividad biocatalítica afectada, destacándose el mutante A287G el cual demuestra tener actividad sobre sustratos más voluminosos que los aceptados por la enzima silvestre. Además, se está en camino de la construcción del doble mutante R128P/S131R y el análisis del mutante F115M. Estudios de mutagénesis por saturación serán realizados en las posiciones en las cuales se registró pérdida de actividad, a fin de buscar mutaciones restauradoras de función que a su vez aporten para la aceptación de sustratos más voluminosos, para luego combinar con la mutación A287G. Se deberán continuar realizando estudios más profundos con el modelo tridimensional para entender más en profundidad los resultados observados.

En el cuarto capítulo, con el objetivo de ampliar la utilidad de biocatalizadores disponibles, se realizó el estudio de síntesis de 2,5 pirrolidinas y 2,6 piperidinas mediante la combinación de dos biocatalizadores complementarios. La compatibilidad de los dos biocatalizadores permite realizar la reacción en un solo paso sin necesidad de purificaciones intermedias. El enfoque quimioenzimático aprovecha la

complementariedad y regioselectividad mostrada por las variantes ω -TAs y MAO para establecer dos centros estereogénicos.

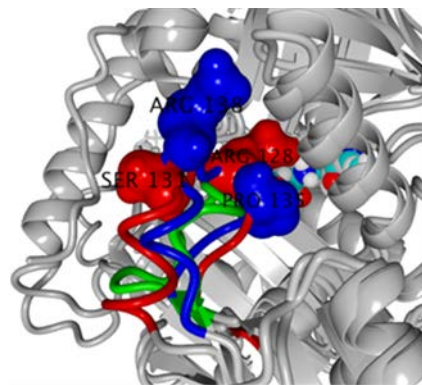
Ha sido demostrada con éxito la aplicación de una cascada quimioenzimática novedosa para la síntesis regio y estereoselectiva de un panel de pirrolidinas 2,5-disustituidas a partir de las correspondientes 1,4-dicetonas. Por el contrario, no se pudo lograr con éxito la síntesis de piperidinas 2,6 disustituidas. Para este caso, se logró con muy buenos resultados la síntesis de los compuestos intermedios (piperinas), el desarrollo de la síntesis de piperidinas 2,6-disustituidas con nuevos pasos de reducción de imina compatibles con la enzima MAO deberían ser analizados. Se demostró que las ω -TA utilizadas son altamente selectivas para la porción estéricamente menos exigente metilcetona, mientras que las monoaminoxidasas MAO-N muestran una marcada preferencia por la porción más voluminosa de las 2,5 pirrolidinas y 2,6 piperidinas.

Con el objetivo de ampliar los sistemas enzimáticos aplicados a la síntesis de aminas quirales se trabajó en la búsqueda y caracterización de nuevas enzimas que permiten de manera única la conversión de numerosos sustratos a costa de diaminas naturales como la cadaverina. Para ello se utilizó un nuevo tipo de transaminasa bifuncional denominada α,ω -DTAs, perteneciente a la metabolización de la putrescina en el género *Pseudomonas* nombrada como SpuC en este trabajo. Estas enzimas demostraron codificar un sitio activo donde se pueda combinar la especificidad de sustrato de las ω -TA, con el uso de aminodonores económicos como la cadaverina, mitigando la necesidad de costosos y complejos sistemas multienzimáticos empleados en otros sistemas, ya que existe un desplazamiento del equilibrio natural por ciclación del amino-aldehído generado. Este nuevo sistema, requiere solamente 3-5 equivalentes de aminodonor en el medio de reacción en contraste a los 50-500 equivalentes de grupo aminodonor utilizados normalmente en estos sistemas de reacción de síntesis de aminas quirales.

Por consiguiente, se puede concluir que se desarrolló una estrategia sintética de aminas quirales "verde" y efectiva. Por otro lado, explotando la inusual tolerancia a aminodonores de cadena alquílica de estas enzimas, se reportó una cascada de tres enzimas que permite la aminación de cetonas proquirales utilizando concentraciones casi estequiométricas de co-sustrato aminodonor. Se demostró que el uso de enzimas de la clase SpuC permite el uso de n-butilamina, aminodonor alternativo y no aceptado por la mayoría de la TAs. Los problemas relacionados con el equilibrio desfavorable y el coproducto reactivo de esta transformación se abordaron mediante la combinación con una reductasa de efedrina, lo que impulsó la reacción a una conversión casi completa.

Los resultados obtenidos permitieron profundizar más en el conocimiento de estas enzimas, aportando una base de conocimiento para el futuro desarrollo del área.

En conjunto, los resultados documentados en esta tesis contribuyen a aumentar el conocimiento sobre la biocatálisis aplicada a la síntesis de aminos, un área que ha crecido de manera exponencial en los últimos años y ha evidenciado el aporte que a la misma se puede hacer a partir de la exploración de la naturaleza en la búsqueda de nuevos biocatalizadores. Los futuros trabajos en el área de la biocatálisis en general se centrarán sin duda en sistemas de reacción multienzimática como los descritos en esta tesis. Las enzimas de diferentes clases son capaces de funcionar muchas veces en ambientes de reacción compatibles. La vinculación de distintas enzimas dentro de un solo recipiente o dentro de una célula puede facilitar no sólo el equilibrio de la reacción (como se demuestra en esta tesis), sino también la síntesis de varios pasos, llegando incluso en el futuro, al desarrollo de microorganismos que sean capaces de completar todo un proceso sintético.



4. MATERIALES Y METÓDOS

Capítulo 4

4.1. Métodos microbiológicos y moleculares

4.1.1. Medios de cultivo y reactivos

La Bacto-triptona, extracto de levadura, peptona, y agar para la preparación de medios de cultivo fueron adquiridos de Difco. Ampicilina y kanamicina se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Las sales, glucosa y lactosa para los medios de cultivo se adquirieron de Fluka, Sigma-Aldrich y Droguería industrial.

Las enzimas de restricción, la ligasa T4, la Taq polimerasa, Phusion High Fidelity DNA Polymerase, los dNTP y los marcadores de proteína se compraron a New England Biolabs o Thermo utilizándose los buffers suministrados por proveedor. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de las secuencias genómicas y su secuenciación fueron sintetizados por la empresa Macrogen. Se utilizó agarosa (Sigma-Aldrich) para las corridas electroforéticas y se empleó buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X. Lo geles se tiñeron con gel-red. Se utilizó gene Ruler 1Kb DNA Ladder (Fermentas) como marcador de peso molecular y como estándar de cuantificación de ADN. Otras enzimas empleadas fueron RNasa, Lisozima y proteinasa K adquiridas de Sigma-Aldrich y New England Biolabs

Las células de *Escherichia coli* DH5 α y BL21 (DE3) fueron compradas a New England Biolabs (Ipswich, MA, EUA). El vector de expresión pET-28b se compró a Novagen (Darmstadt, Alemania) y se utilizó para la expresión génica. *Pseudomonas fluorescens* (Asc no. 13500), *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* 30-84, (Asc. no 9392), *Pseudomonas putida* NBRC 14161 (Asc no. 9494) y *Bacillus megaterium* (Asc. no 9376) se adquirieron a la colección de cultivos del NCIMB (Aberdeen, Reino Unido).

4.1.2. Vectores y cepas

Vectores utilizados en *E.coli* pUC18, pKK 223-3, pET22b+ y pET 28b+ fueron obtenidos de Pharmacia y Novagen, respectivamente. Las cepas de *E. coli* JM109 , BL21 (DE3), Top 10 fueron utilizadas para los procedimiento de rutina de clonado y expresión de proteínas.

Cepa	Genotipo
<i>E. coli</i> JM109	F' <i>traD36 lac^F Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺/e14⁻ (McrA⁻) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Na^F) recA1 endA1 hsdR17 (rk mk⁺) supE44 relA1</i>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <i>ompT [lon] hsdS_B(r_Bm_B)</i> ; una cepa de <i>E. coli</i> B con DE3, un profago λ que posee el gen de la ARN polimerasa de T7
<i>E. coli</i> TOP10	[F- <i>mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> φ80 <i>lacZΔM15 ΔlacX74 recAaraD139 Δ(ara-leu)7697 galUgalKrrpsLendA1 nupG</i>]

4.1.2.1. Mantenimiento de cepas de *E. coli*

Se utilizaron técnicas estándar de microbiología para el manejo de todas las cepas. Para el crecimiento de rutina de las cepas se utilizó el medio Luria Bertani ²³⁴, con agregado de antibióticos cuando era necesario (ampicilina o kanamicina eran agregadas en una concentración 50μg/ml o 100μg/). Para la preparación de un litro de medio de cultivo LB eran utilizados: Bacto triptona (10g), Extracto de levadura (5g), NaCl (10g). Para medio solido 15 gramos de agar eran agregados.

Para el mantenimiento a corto plazo se utilizaron placas del medio de cultivo LB-agar adecuado selladas con Parafilm y almacenadas a 4°C. respectivamente. Para el mantenimiento a largo plazo las cepas se guardaron en freezer a -70°C en medio de conteniendo glicerol al 15 %.

4.1.3. Técnicas moleculares

En todos los procedimientos, salvo en los casos que se indica, fueron utilizados técnicas estándar de métodos moleculares descritos por Sambrook *et al.*²³⁴ para la manipulación de ADN y proteínas. Las digestiones con enzimas de restricción se llevaron a cabo según protocolo indicado por el proveedor. Las amplificaciones por PCR se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer. Las transformaciones fueron realizadas por electroporación con un equipo BIORAD MicroPulser. La preparación de células competentes de cada una de las cepas a transformar se realizó según el protocolo sugerido por el fabricante del equipo,²³⁵ repartiendo la suspensión de células en alícuotas de 40 μL y guardando inmediatamente en freezer a -70° C. La transformación fue realizada por electroporación o por heat-shock según procedimientos descritos a continuación. Las bandas de ADN amplificadas fueron purificadas por electroforesis en gel utilizando el *kit* Freeze 'n squeeze (Bio-Rad, CA, EE.UU.). Enzimas de restricción y polimerasas termoestables se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones PCR se realizaron en un sistema GeneAMP PCR 2400 (Perkin Elmer)

utilizando períodos de ciclos adecuados. La concentración y pureza del ácido nucleico se midió utilizando un Espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

Tabla 4.1-1: Primers utilizados

Objetivo	Secuencia primer Fwd	Secuencia primer Rev
EasG Agroclavina	CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGAATT <u>CATATGACGGTCTGCTGACGG</u>	AAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGAAAGCTTTTTACGGGCACGCC
Mutante R128P	CTGCGCGGTGTCCCGGCCTGTCAGC	GCTGACAGGCCCGGGACACCGCGCAG
Mutante A287G	CTTTATGTCCACGGGCGGCGGTATTATGC	GCATAATACCGCCGCCCGTGGTGACATAAAG
Mutante F122M	CTTTATGTGCACCACGATGGGCGGTATTATGC	GCATAATACCGCCCATCGTGGTGACATAAAG
Mutante V62T	CTGACCTACGACACCCCGTCCGTTTGG	CCAAACGGACGGGGTGTCTAGGTGAC

4.1.3.1. Transformación por electroporación.

Para cada muestra de ADN a transformar fue descongelada una alícuota de 40 µL de células competentes, manteniendo las células continuamente en baño de hielo. Se agregó a cada alícuota 1 µL de la muestra de ADN correspondiente, mezclando suavemente e incubando luego en hielo por aproximadamente 1 minuto. La mezcla fue transferida a una celda de electroporación de 0.2 cm. previamente enfriada en hielo. La electroporación fue efectuada mediante un pulso de 2.5 kV con una duración de 5 mseg. Luego de la electroporación, 1 mL de SOC fue agregado a las células en forma inmediata, resuspendiéndolas suavemente por inversión. La mezcla fue incubada por 1 hr. a 37° C. Dependiendo de la muestra de ADN utilizada fueron realizadas las diluciones correspondientes, inoculando luego las células transformadas en un medio selectivo adecuado. Se realizaron en todos los casos transformaciones con un control positivo (vector puro con adecuada resistencia a antibióticos) y con un control negativo (agua o TE).

4.1.3.2. Transformación por Heat shock.

Las células competentes mantenidas a -80°C fueron descongeladas en hielo (aprox. 20-30 min.). Se mezclaron 1 - 5 µl de ADN (generalmente 10 pg - 100 ng) con 20-50 µL de células competentes en tubo de 1,5mL. SE mezcló suavemente golpeando el fondo del tubo con el dedo unas cuantas veces. Se incubó la mezcla de células/ADN competente en hielo durante 20-30 minutos. Luego se colocó la parte inferior del tubo en un baño de agua a 42°C durante 30-60 segundos (lo ideal es 45 segundos, pero esto varía dependiendo de las células competentes que esté utilizando). se volvieron los tubos en hielo durante 2 minutos. Se agregó 1,000 µl LB o medio SOC (sin antibiótico) y se incubó a 37°C durante 45 min. Se sembró parte o toda la transformación en una placa de agar LB conteniendo el antibiótico apropiado. SE incubaron las placas a 37°C durante la noche.

4.1.3.3. Manipulación de ADN y clonado R-TA Cap e IRED EasG de *Claviceps purpurea*

El ADN del plásmido fue purificado utilizando *kits* de cromatografía comerciales (Thermo Fisher Científico). Las secuencias de R-TA Cap (ID: BankIt1979473 Synthetic KY419567, suplementario) y IRED EasG de *Claviceps purpurea* fueron optimizadas para *E. coli* y la síntesis del gen fue realizada por GeneScript (Piscataway, NJ, EE.UU.). El gen R-TA Cap sintetizado fue clonado en pKK223-3 y transformado en *E. coli* JM109. El gen IRED EasG sintetizado fue clonado en pET22b(+) y transformado en *E. coli* BL21(DE3) para la expresión de proteínas.

4.1.3.4. Manipulación de ADN y clonado R-TA Cap en pET22b (+)

Se amplificó el gen inserto en pKK223-3 por PCR con primers CI R-TACap Fw y CI R-TACap Rv, seguido de digestión con Hind III y EcoR I, y subclonación del gen R-TA Cap en pET22b+ (Novagen, Darmstadt, Alemania) que contiene un N-terminal His6 tag. El vector obtenido se transformó en *E. coli* BL21(DE3).

4.1.3.5. Manipulación de ADN y subclonado IRED EasG en pKK223-3

Para el clonado se utilizó la técnica de *Restriction Free Cloning*. Mediante siguiente protocolo.

1) Amplificación y purificación del gen EasG.

Se amplificó el gen optimizado para *E. coli* a partir del vector pET22b (*EasG*) por PCR con los primers IRagro-pkk_RFC_IFw y IRagro-pkk_RFC_IRev. Las reacciones se realizaron en un volumen total de 50 μ L conteniendo 5X de Phusion Buffer HF, 200 μ M de cada dNTP, 0.5 μ M del primer forward y del reverse, 50 ng de molde de ADN genómico (*EasG* en vector pET22), 0.02U/ μ L ADN polimerasa Phusion High-Fidelity, ThermoScientific y H₂O MQ hasta el volumen.

Restriction Free PCR

Se realizó una segunda amplificación para obtener el gen *EasG* insertado en el vector pkk223-3. Las reacciones se realizaron en un volumen total de 50 μ L conteniendo 5X de Phusion Buffer HF, 200 μ M de cada dNTP, 30 ng de ADN molde (vector pkk223-3), 120 ng de megaprimer (producto obtenido en 1), 0.02 U/ μ L ADN polimerasa Phusion High-Fidelity, ThermoScientific y H₂O MQ hasta el volumen. Se digirió el producto obtenido en RF PCR y el control negativo con enzima Dpn I Thermo Scientific según especificaciones del proveedor. Se incubó por 2 horas a 37°C y luego se inactiva la enzima a 80°C por 20 minutos. Se precipitó el ADN de la muestra y del control negativo con tRNA en las siguientes condiciones: a 50 μ L de solución agregar 50 μ L de solución YeasttRNA, 100 μ L de H₂O MQ y 500 μ L de etanol absoluto. Se deja por 1 hora a -20°C. Luego se centrifuga a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C, se descarta el sobrenadante y se agrega 100 μ L de etanol 70%, se centrifuga nuevamente por 20 minutos a 4°C, se descarta sobrenadante y se deja secar al aire. Se recupera el pellet en 5 mL de H₂O MQ.

4.1.3.6. Sobreexpresión de Iminoreductasas EasG o Irp3 en *E. coli*

A partir de placas de LB-Amp o LB-Kan según cepa utilizada, incubada a 37°C por 24 horas, se inoculó 5 mL de caldo LB-Amp y o de caldo LB-Kan según corresponda con una colonia aislada de la cepa correspondiente, se incubó en shaker a 37 °C a 150 rpm toda la noche. Se inoculó 1 ml de precultivo crecido en Erlenmeyer dentado con 100 mL de LB-Amp y LB-Kan respectivamente. Se incubó el cultivo en shaker a 37 °C y a 150 rpm hasta un crecimiento de OD₆₀₀=0.5. Se induce el cultivo agregando IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Se incubó en shaker a 250 rpm a 28 °C por 48 horas.

Se centrifugó los cultivos de 48 horas a 4 °C a 5000 rpm. En ensayos de medio de auto inducción (LB-auto 4ZY-LAC-SUC) se siguió protocolo y recomendaciones descritas por Studier, F. W. (2005).y Schrittwieser *et al.*²²⁻²³

4.1.3.7. Sobreexpresión de *R-TA Cap* en *E. coli* JM109(pKK 223-3-*R-TA Cap*)

La cepa de *E. coli* JM 109 conteniendo el vector con la transaminasa en estudio es crecida en 5ml por 16 hs para inocular un medio de 200 mL de LB suplementado con 100 mg/mL de ampicilina, el mismo se incubó a 37 °C a 200 rpm hasta una DO600 de 0,5-0,6. La expresión de la proteína recombinante se indujo mediante la adición IPTG (1mM) y posterior incubación a 28°C durante 20h a 150rpm. En ensayos de medio de auto inducción (LB-auto 4ZY-LAC-SUC) se siguió protocolo y recomendaciones descritas por Studier, F. W. (2005) y Schrittwieser *et al.*²²⁻²³ Las células se recogieron por centrifugación a 4 °C, y se resuspendieron en 10 mL de buffer de lisis (buffer 100 mM de fosfato de potasio de pH 7,0, con 0,1 mM de PLP). En reacciones de síntesis asimétrica los sedimentos celulares se lisaron en baño de hielo por ultrasonido con un Soniprep (10 ciclos de 10 s on/10 s off.). Se centrifugó la suspensión sonicada a 12.000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante (proteínas solubles) este se utilizó como 'extracto celular'.

4.1.3.8. Sobreexpresión de *R-TA Cap* en *E. coli* BL21(DE3) (pET22b-*R-TA Cap*)

A partir de una placa fresca de *E. coli* BL21(DE3) (pET22b-*R-TA Cap*) en LB-Amp replicada de los stocks congelados, una colonia aislada fue usada para inocular 5 mL de LB-Amp. El cultivo se incubó en un agitador orbital durante 16 hs. (200 rpm, 37 °C), 1 mL de este cultivo se utilizó para inocular 100 mL de LB-ampicilina fresca en matraz Erlenmeyer de 500 mL. El cultivo en fresco se incubó bajo las mismas condiciones hasta que alcanzó un OD600 de 0.5 (aproximadamente 2.5 hs), luego se le agregó IPTG a una concentración final de 1 mM. Después de 48hs de inducción a 28 °C, Las células recombinantes de *E. coli* fueron recolectadas por centrifugación y lisadas por sonicación (pulsos de 10 s al 20% de la amplitud durante 20 s, repetido 20 veces).

Alternativamente, se utilizó medio de cultivo de autoinducción para la producción de proteína. En este caso, se utilizó 1 mL de este cultivo para inocular 100 mL del medio de autoinducción Terrific Broth Base con oligoelementos en Erlenmeyer de 500 mL dentados; el cultivo se incubó durante 48 horas a 28 °C.

Para propósitos de purificación, el pellet celular fue suspendido (1 g de pasta celular húmeda/10 mL) en buffer HEPES 1 (100 mM, 1 mM PLP, 5 mM imidazol, pH 8).

El pellet celular fue lisado en un baño de hielo mediante el agregado de lisozima 1mg/ml de lisado por 60 minutos, luego se agregó 5 µg/mL de DNasa y ARNasa, y 0.1 mL de [Tritón X-100] 10 %/mL. Mezclar suavemente cada algunos minutos, durante 15 min. Luego se centrifugó (4 °C, 16.000×g, 20 min), el sobrenadante fue cargado en una columna HisTrap de 1 ml. La purificación se realizó manualmente. La columna fue inicialmente lavada con cinco volúmenes de columna HEPES buffer1, seguido de la elución con buffer HEPES 2 (100 mM, 1 mMPLP, 30 mM imidazol, pH 8,0). La proteína se eluyó utilizando 10 volúmenes de columna de buffer HEPES 3 (100 mM, 1 mM PLP, 300 mM imidazol, pH 8,0). Se recogieron fracciones de un mililitro durante el proceso de elución y la concentración de proteínas fue evaluada por UV280. Las fracciones que contenían R-TA Cap se agruparon. La proteína se concentró mediante filtros de corte Amicon® Ultra-15 10K y la enzima purificada se desaló con una columna de desalinización PD10.

4.1.3.9. Sobreexpresión de monoaminooxidasas D5 y D9 en *E.coli*

Se inocularon 5 mL de medio LB (que contienen 100 µg/mL de ampicilina) con una sola colonia de *E. coli* C43(DE3) que alberga plásmido [pET16b MAO-N (D9) o pET16b MAO-N (D5)] el cultivo se incubó durante la noche a 30 °C y 120 rpm. Este cultivo se utilizó para inocular 600 ml de medio de autoinducción (4ZY-LAC-SUC; 100 µg/mL de ampicilina) este cultivo se incubó a 25 °C y 150 rpm durante 72 h. Las células se recolectaron por centrifugación (8000 rpm, 20 min), fueron resuspendidas en buffer de fosfato (100 mM K-Pi, pH 7,7) y centrifugadas de nuevo (4000 rpm, 20 min). Los pellet celulares se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

4.1.3.10. Purificación de MAO-N.

Se descongelaron 5 g de pasta celular en hielo y se resuspendieron en 25 mL de buffer fosfato (100 mM K-Pi, pH 7,7; conteniendo 1 mg/mL de lisozima), se incubó a 30 °C durante 30 minutos. La suspensión se enfrió a 4 °C y las células se lisaron por ultrasonido (30 s encendido, 30 s apagado; 20 ciclos). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (15000 g, 40 min). Posteriormente, los extractos libres de células se filtraron a través de un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0,22 µm. Los extractos sin células después de la filtración, se cargaron en una columna de HisTrap Ni-sefarosa (1 mL, GE Healthcare) pre-equilibrada con buffer A (100 mM K-Pi, pH 7,7, 300 mM NaCl). La proteína fue eluída usando un gradiente escalonado en un sistema Akta de GE Healthcare. Las fracciones que contienen MAO-N fueron agrupadas y concentradas usando una columna de centrifugado Vivaspin 6 de Sartorius (corte de masa 30 kDa), y

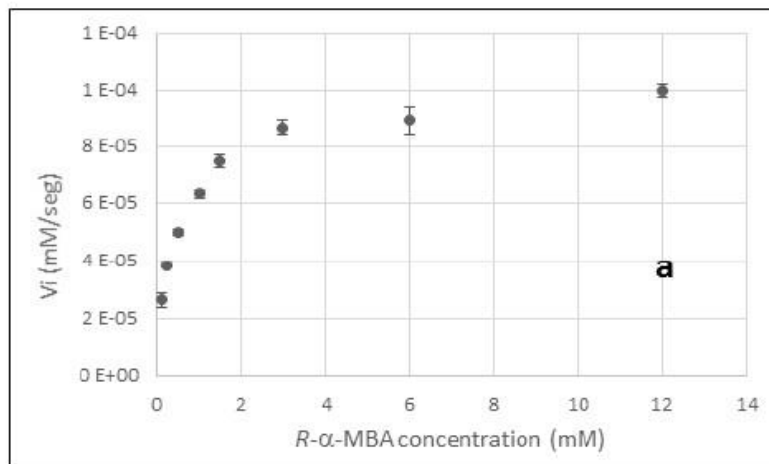
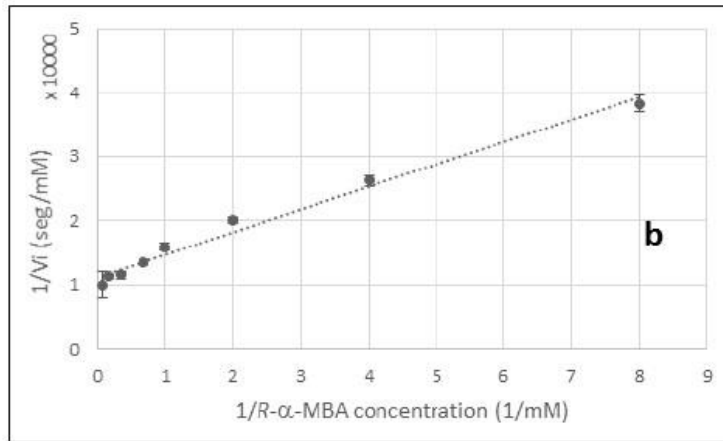
el volumen ajustado a 2,5 mL. Las fracciones concentradas se desalinizaron utilizando una columna Sephadex PD-10.

4.1.4. Determinación de parámetros cinéticos de R-TA cap

La actividad transaminasa se determinó según el método reportado por Schätzle *et al.*²⁰¹ Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en placas de microtitulación UV-Star® de 96 pocillos (Greiner, Monroe, EE.UU.), a 30 °C y 250 nm con un fotómetro Infinite® M200 PRO (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza).

Para la determinación de K_m y k_{cat} , la mezcla de reacción contenía buffer HEPES 50 mM pH 8, 2.5 mM piruvato, 0.055 mM PLP, 1% DMSO y 22,5 µg/mL de la enzima purificada, con diferentes cantidades de R- α - metilbencilamina (R-MBA) desde 0.12 a 12 mM en un volumen total de 200 µL. Se realizaron triplicados para cada concentración de R-MBA, tomándose medidas espectrofotométricas cada 40s durante 20 min. Se utilizó una curva de calibración de absorbancia a 250 nm vs concentración de acetofenona en la mezcla de reacción para calcular la concentración de acetofenona. Con las medidas obtenidas se calcularon las velocidades de reacción iniciales para cada concentración de R-MBA para luego graficar V_i vs $[R-MBA]$. Los parámetros cinéticos fueron determinados mediante ajuste a ecuación de Michaelis Menten y linealización de Lineweaver-Burk.²³⁶

Para la determinación de la temperatura óptima, la mezcla de reacción contenía buffer HEPES de 50 mM pH 8, 2.5 mM piruvato, 3 mM R-MBA, 0.055 mM PLP, 1% DMSO y 22,5 µg/mL de la enzima purificada en un total de volumen de 300 µL, a diferentes temperaturas, de 4 a 60 °C durante 15 min. Las reacciones se detuvieron enfriando a 0 °C. Se transfirieron 200 µL de cada reacción a una placa de microtitulación UV-Star® de 96 pocillos y fueron medidas a una absorbancia de 250 nm.



4.1.5. Análisis de muestras para expresión de proteínas.

Se agregó a las muestras recolectadas 100 μL de Buffer de lisis 50 mM, pH 8, 0.5M NaCl. Se sónico las muestras con el programa (15 segundos de pulso 2,5 y 30 segundos de reposo, se repite 3 veces). Se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se separó la fracción soluble e insoluble. La fracción insoluble se resuspendió en tritón 2% y se deja 15 minutos en frío. Se centrifuga a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en Buffer fosfato-sodio 50mM, pH 7. Se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se tomaron 20 μL de cada fracción y se le agregó 6.4 μL de Sample Buffer. Se hivió las muestras por 5 minutos. El gel de proteínas se corrió según especificaciones de fabricante.

4.1.6. Análisis bioinformático para la búsqueda de nuevas R-TA

La búsqueda BLAST se realizó en página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).²³⁷ La Alineación de secuencias de proteínas se realizó utilizando Clustal Omega.^{238,239} Análisis evolutivos se realizaron en MEGA7: Molecular Evolutionary Análisis Genético versión 7.0. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Probabilidad Máxima basado en el modelo basado en matrices de JTT.²⁴⁰ El bootstrap consenso del árbol fue calculado a partir de 1000 repeticiones para representar la historia evolutiva de los taxones analizados.²⁴¹ Las ramas correspondientes a particiones reproducidas en menos del 50 % de réplicas bootstrap son colapsadas. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 replicados) se muestra junto a las ramas.²⁴¹ Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbour-join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas usando un modelo JTT, y luego seleccionando la topología con un valor de verosimilitud de registro superior. El análisis incluyó 11 secuencias de aminoácidos y se eliminaron todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes. Hubo un total de 246 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en el programa MEGA 7.²⁴²

4.1.7. Elucidación de modelo estructural de R-TA Cap

La predicción de la estructura de R-TA Cap se llevó a cabo mediante modelado por homología con el programa YASARA, versión 16.9.23.W. 64 con configuración predeterminada.¹⁸⁰ R- ω -TAs de *Nectria hematococa* (PDB 4CMF) (Sayer *et al.*¹⁷⁰), *A. fumigatus* (PDB 4CHI) (Thomsen *et al.*¹⁸¹), *A. terreus* (AP 4CE5) (Lyskowski *et al.*¹⁶⁹) y *Arthrobacter* (PDB 3WWH) y el mutante *Arthrobacter* G136F (AP 3WWI) (Guan *et al.*¹⁸³) se utilizaron como estructuras de referencia. Para facilitar la corrección de alineaciones y el modelado de bucles, una predicción de estructura secundaria para la secuencia objetivo fue obtenida. Esto se logró ejecutando PSI-BLAST para crear un perfil de secuencia de destino y alimentarlo al algoritmo PSI-Pred de predicción de estructura secundarias.¹⁸² Un total de 24 modelos independientes se crearon y YASARA combinó las mejores partes de los 24 modelos para obtener un modelo híbrido. La puntuación final en Z fue -0,379.

4.2. Síntesis orgánica y biotransformaciones

4.2.1. Reactivos y procedimientos generales

Los reactivos disponibles en el mercado se utilizaron sin purificación adicional. Todos los reactivos se compraron a Sigma Aldrich (St Louis, MO, EE.UU.) o Acros, incluidos los disolventes anhidros. La caracterización de productos fue realizada por GC-MS, NMR ^1H y ^{13}C , GC o HPLC.

En los capítulos 2.1, 2.2 y 3.3 los espectros de masas (MS) se obtuvieron en un equipo Shimadzu GC-MS QP 1100 EX utilizando modo de impacto electrónico (70 eV). (discos KBr). Los espectros de RMN se obtuvieron en CDCl_3 en un instrumento Bruker Avance DPX-400. Los desplazamientos químicos de protones (δ) se reportan en ppm por debajo del valor de TMS como referencia interna, y en carbono los desplazamientos químicos se informan en ppm en relación con la línea central del triplete CDCl_3 (77,0 ppm). El análisis a través de HPLC se realizó utilizando un Shimadzu CTO-20AC con una columna Agilent eclipse XDB-C18 Zorbax 4.6x250mmx5 μm . TLC Analítico se realizó sobre placas de gel de sílice 60F-254 y se visualizó con luz UV (254 nm) y/o en ninhidrina. La cromatografía en columna de flash se realizó utilizando gel de sílica (Kieselgel 60, reactivo EM, malla 230-400)

En los capítulos 2.4 y 2.5 los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Avance 400 (400,1 MHz para ^1H y 100,6 MHz para ^{13}C) en CDCl_3 . Los desplazamientos químicos se registraron en ppm con la señal residual CHCl_3 referida a 7,26 ppm y 77,23 ppm para ^1H y ^{13}C respectivamente. Las constantes de acoplamiento (J) se informan en Hz y se refieren a las multiplicidades de pico aparentes. El análisis de TLC se realizó utilizando placas TLC con respaldo de lámina de aluminio y sílice de 0,2 mm. La cromatografía en columna flash se realizó sobre gel de sílice (60Å). Los espectros GC-MS fueron registrados en un Hewlett Packard HP 6890 equipado con una columna HP-1MS, un Detector Selectivo de Masas HP 5973 y un robot de muestreo ATLAS GL FOCUS. El análisis GC-FID se realizó en el Agilent 6850 equipado con un muestreador multipropósito Gerstel MPS2L y una columna Varian CP CHIRASIL-DEX CB de 25 m x 0,25 mm DF=0,25 mm. Las configuraciones absolutas se asignaron por comparación con los valores de la literatura.

4.2.2. Biotransformaciones

A no ser que se especifique lo contrario las reacciones fueron realizadas de la siguiente manera.

4.2.2.1. Ensayos de reducción de iminas con Irp3 y EasG

A partir de células centrifugadas con enzimas sobreexpresada mediante técnica descrita anteriormente. Se descartó sobrenadante y se lavó las células dos veces con 50 mL de Buffer fosfato de sodio, pH 7, 100mM. Se centrifugó a 4 °C a 5000 rpm. Se descartó sobrenadante y se resuspenden las células en buffer fosfato de sodio – glucosa (50mM). Se preparó soluciones stock de sustrato con una concentración de 250 mM en DMF. Se agregaron los sustratos en 3 mL de la mezcla de biotransformación obteniendo una concentración final de 5 mM. Se incubó en shaker a 250rpm, 28°C, por 24-48 horas.

4.2.2.2. Ensayo espectrofotométrico de consumo de NADPH con enzima purificada EasG.

La actividad enzimática fue determinada mediante ensayo espectrofotométrico a 30 °C siguiendo el descenso de la absorbancia de NADPH a 340 nm. A un 1 mL de Buffer 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 y de 3.0 % glicerol, NADPH 100 µM, se agregan 20 µL de enzima purificada y sustrato en DMF para tener una concentración final 1 mM. Una unidad enzimática es definida como la cantidad de enzima en consumir 1 µmol de NADPH por minuto en las condiciones de ensayo.

4.2.2.3. Resolución cinética de aminas racémicas con sistemas de células enteras sobrepresando R-TA de *Capronia semiimmersa*

Los ensayos se realizaron con células enteras de *E. coli* (pKK223- R-TA Cap). Las células fueron cultivadas como se describió anteriormente (4.x.x). Las células fueron centrifugadas y lavadas dos veces con buffer HEPES (100 mM, pH 7,5). Finalmente, las células fueron suspendidas en buffer de reacción, buffer HEPES (100 mM, pH 7.5) conteniendo 1 mM PLP, hasta una concentración final de 0,1 g células/mL. Se añadió sustrato en una concentración final de 5 mM a partir de una solución 200 mM de la amina racémica en DMSO. La reacción se incubó a 30 °C, 200 rpm, 24 hs. Las reacciones se basificaron mediante la adición de 10 M NaOH(100 µL). Luego, la mezcla fue extraída

dos veces con etilacetato (0.5 mL), la capa orgánica fue separada por centrifugación (2 min, 13.000 rpm). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄.

4.2.2.4. Síntesis asimétrica de aminas ópticamente puras con lisado celular con *R*-TA Cap sobreexpresada, utilizando D-alanina como aminodonor

En buffer HEPES (2 mL, 100 mM, pH 7,5) conteniendo PLP (2.02 mM), NAD⁺ (1,5 mM), glucosa (10 mg / ml, 55,5 mM), GDH (50 U), LDH (113 U)-L-alanina (CV-ATA) y D-alanina (CapTA) (45 mg / mL, 500 mM). utilizándose 250 µL/mL de 'extracto celular sonificado con Cap TA se expresada como se describió anteriormente, Se ajustó el pH de la solución a 7,5, se añadió el sustrato (5 mM de un stock de 200 mM en DMSO) y la reacción se incubó a 30 ° C, 200 rpm. La reacción se controló después de 16 y 24 h por GC-FID. Para la extracción, la solución se basificó primero (pH 12 ajustado con NaOH 5 M) y se extrajo (400 µL) con EtOAc (1 x 800 µL).¹⁸

4.2.2.5. Síntesis asimétrica de aminas ópticamente puras con enzima purificada, utilizando D-alanina como aminodonor

En un tubo Eppendorf de 1,5 ml, en 0,5 ml de volumen de reacción, el sustrato correspondiente (5 mM concentración final de un stock de 200 mM en DMSO) se disolvió en buffer HEPES 100 mM. pH 7,5, 2 mM PLP, NAD⁺ (1,5 mM), glucosa (10 mg/mL, 55,5 mM), GDH (50 U), LDH (113 U) y L-alanina (ATA-113) o D-alanina (*R*-TA Cap o ATA-117) (45 mg/mL, 500 mM). La solución enzimática fue añadida en concentración 2 mg/mL de enzima purificada. Las reacciones se colocaron en un agitador orbital (200 rpm, 37 °C, 24 h). Las reacciones se detienen agregando NaOH (100 µL). La mezcla fue extraída dos veces con etilacetato (0,5 mL), la capa orgánica se separó por centrifugación (2 min, 13.000 rpm). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄.

4.2.2.6. Síntesis asimétrica de aminas ópticamente puras con enzima purificada, utilizando isopropilamina como aminodonor

En un tubo Eppendorf de 1,5 ml, se llevan a cabo las reacciones con 0,5 ml de volumen de reacción, con sustrato (5 mM concentración final a partir de 200 mM en DMSO) disuelto en buffer HEPES de 100 mM. tampón pH 7.5, 2mM PLP, 0.5M isopropilamina. La solución enzimática se le agrego en concentración (3 mg/mL). Las reacciones se colocaron en un agitador orbital (200 rpm, 37 °C, 24 h), se detuvieron mediante la adición de 10 M NaOH (100 µL). Luego, la mezcla fue extraída dos veces con

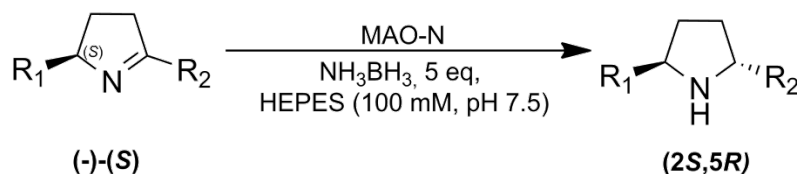
etil acetato (0,5 mL); la capa orgánica se separó por centrifugación (2 min, 13.000 rpm). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄.

4.2.2.7. Síntesis de aminas con transaminasas comerciales ATA 113 y ATA 117

Escala analítica: Las enzimas comercialmente disponibles ATA113 o ATA117 (2,5 mg / ml) se rehidrataron en buffer HEPES (2 mL, 100 mM, pH 7,5) conteniendo PLP (2.02 mM), NAD⁺ (1,5 mM), glucosa (10 mg / ml, 55,5 mM), GDH (50 u), LDH (113 u)-L-alanina (ATA113) y D-alanina (para ATA117) (45 mg / mL, 500 mM). Se ajustó el pH de la solución a 7,5, se añadió el sustrato (5 mM de un stock de 200 mM en DMSO) y la reacción se incubó a 30 ° C, 250 rpm. La reacción se controló después de 16 y 24 h por GC-MS y GC-FID. Para la extracción, la solución se basificó primero (pH 12 ajustado con NaOH 5 M) y se extrajo (100 µL) con EtOAc (1 x 300µL).

Escala preparativa: Las enzimas comercialmente disponibles ATA113 o ATA117 (2,5 mg / ml) se rehidrataron en Buffer HEPES (50 ml, 100 mM, pH 7,5) conteniendo PLP (2,02 mM), NAD⁺ (1,5 mM), glucosa (10 mg / ml, 55,5 mM), GDH (50 U), LDH (113 U), L-alanina para ATA113 (45 mg / ml, 500 mM) o D-alanina para ATA117 (45 mg / ml, 500mM). El pH de la mezcla se ajustó a pH 7,5. Se adicionó Sustrato (25 mM a partir de stock 1 M en DMSO), la mezcla se incubó a 30 ° C, 250 rpm durante 48 h y se controló por GC-MS y GC-FID. Al término de la reacción, la solución se centrifugó a 6.000 rpm durante 10 minutos. El pH del sobrenadante se ajustó a 2 y se extrajo con acetato de etilo (1 x 150 ml) para eliminar dicetona de partida restante. El pH de la solución se ajustó a 12 y se extrajo con EtOAc (3 x 150 ml). Se eliminó el disolvente por rotavaporación al vacío, se disolvió en Et₂O y se lavó con solución NaOH 10M (pH 14) para eliminar DMSO residual. La capa orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó al vacío.

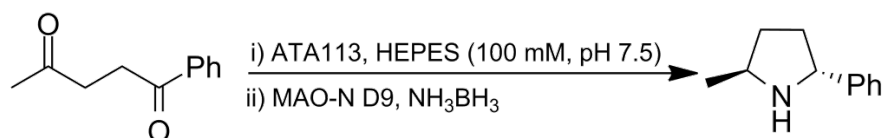
4.2.2.8. Deracemizaciones a escala analítica con variantes MAO-N



Las proteínas MAO-N correspondientes a las variantes D5 y D9 se expresaron como se informó anteriormente. Las células que expresan la variante MAO-N D5 o D9 (50 mg/mL) fueron re-suspendidas en buffer HEPES (100 mM, pH 7.5). El sustrato (5 mM de un stock de 200 mM en DMSO) fue añadido junto con NH₃BH₃ (25 mM, 5eq) y la

mezcla fue incubada a 30 °C, 250 rpm. La reacción fue monitoreada a lo largo del tiempo, por GC-MS y GC-FID previa extracción de la solución basificada (pH 12 ajustado con 5 M NaOH) (100 uL) con EtOAc (1 x 300 uL).

4.2.2.9. Cascada one-pot transaminasa ATA113/MAO-N D9 para la síntesis de (*S*)-2-metil-5-fenilpirrolidina



ATA113 (125 mg) fue rehidratada en buffer HEPES (50 mL, 100 mM, pH 7.5) conteniendo PLP (2.02 mM), NAD⁺ (1.5 mM), glucosa (500 mg, 55.5 mM), GDH (50 U), LDH (113 U), L-alanina (4.5 g, 500 mM). El pH de la mezcla se ajustó a 7.5. Se agregó la dicetona (220 mg, 1.25 mmol, 25 mM) en DMSO (1.25 mL de un stock de 1 M en DMSO) y se incubó la mezcla a 30 °C, 250 rpm. La reacción fue monitoreada por GC-MS y GC-FID, una vez completada la reacción, se agregó NH₃BH₃ (25 mM, 5eq) y la variante MAO-N D9 (50 mg/mL), la mezcla fue incubada a 30 °C, 250 rpm. Después de 24 horas, la solución se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se ajustó a pH 2 y se extrajo con EtOAc (1 x 150 mL) para eliminar cualquier material de partida remanente. La solución se ajustó a pH 12 y se extrajo con EtOAc (3 x 150 mL). El disolvente se eliminó en vacío, se disolvió en Et₂O y se lavó con agua basificada (pH 12) para eliminar el DMSO residual. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó en vacío. La pirrolidina resultante fue filtrada a través de una pequeña capa de sílica, se eluyó en ciclohexano/EtOAc (90/10).

4.2.2.10. Síntesis asimétrica de aminas ópticamente puras mediante ωTAs con cadaverina como sustrato aminodonador

Todas las biotransformaciones se realizaron en tubos de Eppendorf de 2 mL, en un volumen de 0,5 mL. A una mezcla de sustrato (25 mM a partir de solución 500 mM en un buffer HEPES 50 mM, 1 mM PLP, pH 9) y cetona (5 mM a partir de una solución madre de 500 mM en DMSO o MeOH), se agregó la enzima (2 mg/mL, purificado o como lisado sin células, preparado como se describe anteriormente). Las reacciones se colocaron en shaker con agitación a 30 °C y 250 rpm durante 12 horas. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de NaOH 10 M (100 μL), seguida de una extracción con metil tert-butil éter (300 μL). La fase orgánica se secó en MgSO₄ y se analizó en HPLC quiral de fase

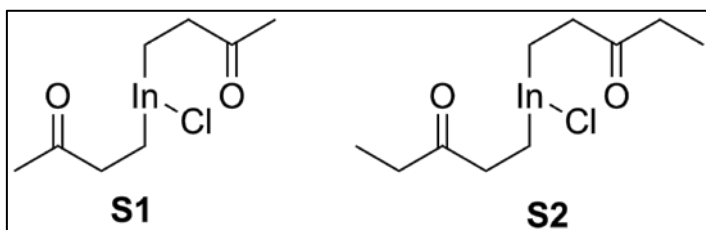
normal o GC-FID. Para el análisis GC-FID, las muestras se derivatizaron a las acetamidas correspondientes mediante la adición de 30 μL de Et_3N y 20 μL $(\text{AcO})_2\text{O}$.

4.2.2.11. Cascada enzimática para la síntesis de aminas utilizando ω TAs, aldehido reductasa (AlRed) y fosfito deshidrogenasa (PtxD)

La aminación de cetonas mediante el sistema en cascada AlRed/PtxD se realizó en tubos Eppendorf de 2 mL en un volumen final de 0,5 mL. A una mezcla que contenía 50 mM de buffer HEPES, 1 mM PLP se le agregó 7.5 mM de n-butilamina, 5 mM de sustrato en DMSO, 1 mM de NAD(P)⁺, 100 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, con Ec-YghD (1 mg/mL), PtxD (1 mg/mL) y 2mg/mL de enzima SpuC purificada. Las reacciones se colocaron en shaker con agitación a 37 °C y 250 rpm durante 16 horas. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 2 M NaOH (50 μL), seguida de una extracción con metil tert-butil éter (300 μL). La fase orgánica se secó en MgSO_4 y se analizó en HPLC quiral en fase normal.

4.2.3. Síntesis de sustratos

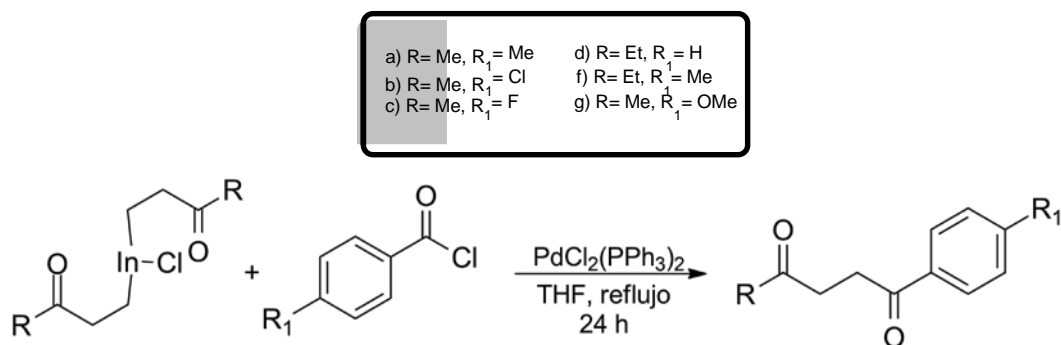
4.2.3.1. Síntesis de complejos de homoenolato de indio (Shen)



Bajo agitación vigorosa, a una solución de Butenona o 1-Penten-3-ona (20 mmol) en una mezcla 1:1 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (100 mL) se le agregó indio (1.84 g, 16 mmol) e InCl_3 (1.77 g, 8 mmol). Después de 24 horas, la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 20 mL) y se secó sobre MgSO_4 . A continuación, la fase orgánica se concentró al vacío para obtener los compuesto S1 (15.3mM, 76.5% de rendimiento) y S2 (17,8 mmol, 89% de rendimiento).

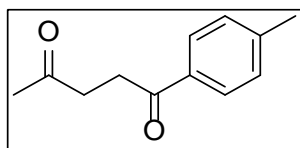
4.2.3.2. Síntesis de 1-4 dicetonas

Las 1,4-dicetonas fueron sintetizadas siguiendo un procedimiento reportado por Shen *et al.* como se describe en la figura.



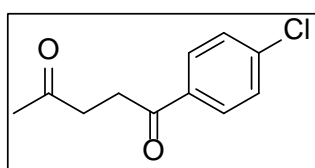
En todos los casos las reacciones fueron realizadas bajo atmósfera de nitrógeno, a una solución de S1 o S2 (0.6 mmol) en THF anhidro (6 mL), se agregó el correspondiente cloruro de benzoilo (1.0 mmol) y $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (36 mg, 0.25 mmol). La mezcla de reacción se agitó en reflujo durante 18 horas. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílica utilizando ciclohexano/EtOAc como fase móvil.

1- (p-tolil) pentano-1,4-diona



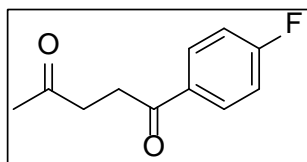
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.87 – 7.83 (m, 2H), 7.25 – 7.20 (m, 2H), 3.25-3.21 (m, 2H), 2.85 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.23 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 207.7, 198.4, 144.2, 134.4, 129.5, 128.4, 37.3, 32.5, 30.4, 21.9.

1-(4 clorofenil) pentano-1,4-diona



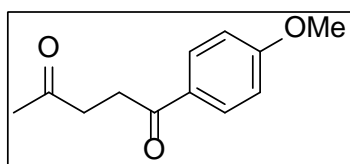
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.94 – 7.90 (m, 2H), 7.46 – 7.41 (m, 2H), 3.26-3.21 (m, 2H), 2.91-2.87 (m, 2H), 2.26 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 207.4, 197.5, 139.8, 135.2, 129.7, 129.1, 37.2, 32.6, 30.3.

1-(4-fluorofenil) pentano-1,4-diona



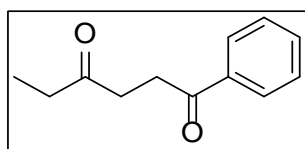
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.03 – 7.96 (m, 2H), 7.16 – 7.08 (m, 2H), 3.25-3.22 (m, 2H), 2.88 (t, $J = 6.3$, 2H), 2.25 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 207.4, 197.1, 166.0 (d, $J_{\text{C-F}} = 254.7$ Hz), 133.3 (d, $J_{\text{C-F}} = 3$ Hz), 130.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 9.4$ Hz), 115.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 21.9$ Hz), 37.2, 32.5, 30.3.

1-(4-metoxifenil) pentano-1,4-diona



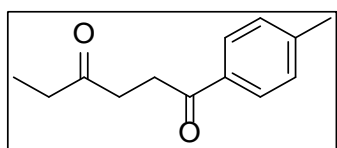
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.98 – 7.92 (m, 2H), 6.96 – 6.89 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.25-3.20 (m, 2H), 2.86 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.25 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 207.8, 197.2, 163.7, 130.5, 129.9, 113.9, 55.7, 37.3, 32.3, 30.3.

1-fenilhexano-1,4-diona



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.01 – 7.94 (m, 2H), 7.58 – 7.53 (m, 1H), 7.49 – 7.42 (m, 2H), 3.31-3.36 (m, 2H), 2.85 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.56 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.09 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 210.3, 198.9, 136.9, 133.3, 128.8, 128.2, 36.3, 36.0, 32.6, 8.0.

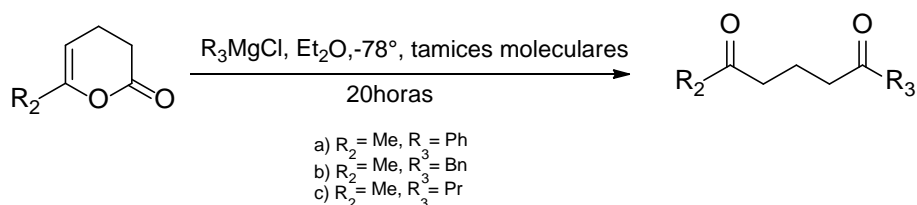
1-(p-tolil) hexano-1,4-diona



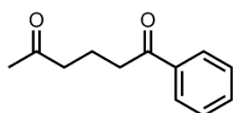
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.29 – 7.24 (m, 2H), 3.31 – 3.24 (m, 2H), 2.86 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.58 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.11 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 210.5, 198.6, 144.1, 134.4, 129.5, 128.4, 36.3, 36.0, 32.5, 21.9, 8.1.

4.2.3.3. Síntesis de 1-5 dicetonas

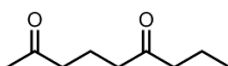
Las 1,5 dicetonas fueron sintetizadas de acuerdo con el procedimiento de Harrowen, D *et al.*²¹⁵



En todos los casos, Piran-2-ona (0,89 g, 7,94 mmol) se diluyó en 15 mL de Et₂O seco y se enfrió a 78 °C. A esta solución se agregó R₃MgCl (4.0 mL [2 N en Et₂O]) en un lapso de 20 minutos. La reacción se agitó a bajas temperaturas hasta que el material de partida se convirtiera completamente (control tlc); cada 16 horas, luego la reacción se detuvo con 10 mL de una solución de HCl aq. 1 N. Se llevó a temperatura ambiente y la mezcla fue extraída tres veces con EtOAc (4 × 15 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron mediante bomba de vacío. La reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando (Hexano/EtOAc 85:15) en todos los casos.

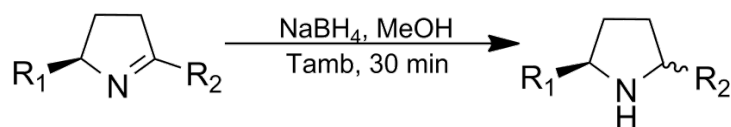


(44)-1-fenilhexano-1,5-diona $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δH [ppm] = 0.87 (t, 3 $J_{9,8}$ = 7.4 Hz, 3 H, 9-H), 1.56 (tq, 3 $J_{8,9}$ = 7.4 Hz, 3 $J_{8,7}$ = 7.4 Hz, 2 H, 8-H), 1.80 (tt, 3 $J_{4,5}$ = 7.0 Hz, 3 $J_{4,3}$ = 7.2 Hz, 2 H, 4-H), 2.10 (s, 3 H, 1-H), 2.33 (t, 3 $J_{7,8}$ = 7.3 Hz, 2 H, 7-H), 2.40 (t, 3 $J_{3,4}$ = 7.2 Hz, 2 H, 3-H), 2.43 (t, 3 $J_{5,4}$ = 7.0 Hz, 2 H, 5-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δC [ppm] = 13.6 (C-9), 17.2 (C-8), 17.6 (C-4), 29.8 (C-1), 41.4 (C-5), 42.5 (C-3), 44.6 (C-7), 208.3 (C-2), 210.6 (C-6).



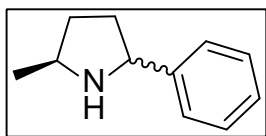
(45)-nonano-2,6-diona $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δH [ppm] = 2.00 (tt, 3 $J_{4,5}$ = 7.0 Hz, 3 $J_{4,3}$ = 7.2 Hz, 2 H, 4-H), 2.13 (s, 3 H, 6-H), 2.56 (t, 3 $J_{5,4}$ = 7.0 Hz, 2 H, 5-H), 3.00 (t, 3 $J_{3,4}$ = 7.1 Hz, 2 H, 3-H), 7.44 (t, 3 J = 7.5 Hz, 2 H, arom.-H), 7.53 (t, 3 J = 7.0 Hz, 1 H, arom.-H), 7.94 (d, 3 J = 7.5 Hz, arom.-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δC [ppm] = 18.3 (C-3), 30.0 (C-6), 37.5 (C-2), 42.7 (C-4), 128.1 (arom.-CH), 128.7 (arom.-CH), 133.2 (arom.-CH), 136.9 (arom.-Cipso), 199.8 (C-1), 208.6 (C-5).

4.2.3.4. Preparación de (2*S*,5*S*)-y (2*S*,5*R*)-2,5-pirrolidinas como estándares.



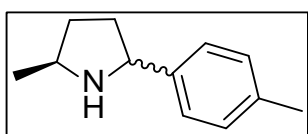
Las pirrolinas sintetizadas enzimáticamente (0.625 mmol) se disolvieron en MeOH (7 mL) y NaBH_4 (95 mg, 2.5 mmol) a 0°C . La solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se añadieron 7 ml de H_2O y se sometió a vacío para eliminar el disolvente orgánico. El pH de la solución se ajustó a 12 y se extrajo con EtOAc (2 x 10 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y el disolvente se evaporó en vacío. Las aminas resultantes no se purificaron.

(S)-2-metil-5-fenilpirrolidina



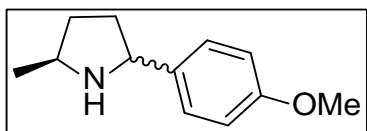
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.44 – 7.15 (m, 10H), 4.37 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.16 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.57 – 3.46 (m, 1H), 3.36 – 3.25 (m, 1H), 2.67 (br. s, 2H), 2.34 – 2.24 (m, 1H), 2.23 – 2.05 (m, 2H), 2.05 – 1.92 (m, 1H), 1.85 – 1.70 (m, 2H), 1.52 – 1.39 (m, 2H), 1.25 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.21 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 145.6, 144.7, 128.6, 128.5, 127.0, 126.9, 126.8, 126.6, 63.4, 61.8, 55.0, 54.4, 35.6, 34.9, 34.2, 33.7, 22.3, 21.7.

(S)-2-metil-5-(p-tolil)pirrolidina



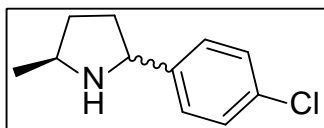
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.29 – 7.10 (m, 8H), 4.33 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.11 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.57 – 3.47 (m, 1H), 3.34 – 3.23 (m, 1H), 2.34 – 2.21 (m, 9H), 2.20 – 2.04 (m, 2H), 1.98 (ddd, $J = 13.0, 10.6, 6.6$ Hz, 1H), 1.75 (m, 2H), 1.51 – 1.38 (m, 2H), 1.24 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.20 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 142.6, 141.7, 136.6, 136.4, 129.3, 129.2, 126.8, 126.5, 63.0, 61.5, 55.0, 54.3, 35.6, 34.9, 34.3, 33.8, 22.4, 21.7, 21.3, 21.2.

(S)-2-(4-metoxifenil)-5-metilpirrolidina



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.32 – 7.23 (m, 4H), 6.88 – 6.82 (m, 4H), 4.33 – 4.28 (m, 1H), 4.10 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.56 – 3.46 (m, 1H), 3.33 – 3.22 (m, 1H), 2.62 (br. s, 2H), 2.28 – 2.19 (m, 1H), 2.18 – 2.05 (m, 2H), 2.03 – 1.93 (m, 1H), 1.82 – 1.68 (m, 2H), 1.50 – 1.39 (m, 2H), 1.24 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.20 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 158.7, 158.7, 137.3, 136.6, 127.9, 127.8, 114.0, 113.9, 62.7, 62.0, 55.5 (2 x C), 54.9, 54.2, 35.4, 34.8, 34.1, 33.7, 22.2, 21.7.

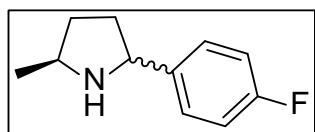
(S)-2-(4-clorofenil)-5-metilpirrolidina



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.34 – 7.21 (m, 8H), 4.33 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.12 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.53 – 3.43 (m, 1H), 3.34 – 3.25 (m, 1H), 2.33 – 2.22 (m, 1H), 2.20 – 2.02 (m, 4H), 1.97 (dddd, $J = 12.7, 8.7, 7.1, 5.9$ Hz, 1H), 1.75 – 1.60 (m, 2H), 1.50 – 1.36 (m, 2H), 1.23 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.21 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 144.5,

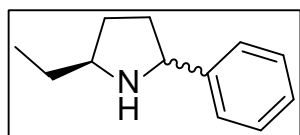
143.7, 132.5, 132.4, 128.6, 128.6, 128.2, 128.0, 62.3, 61.1, 54.8, 54.4, 35.8, 35.0, 34.4, 33.5, 22.3, 21.9.

(S)-2-(4-fluorofenil)-5-metilpirrolidina



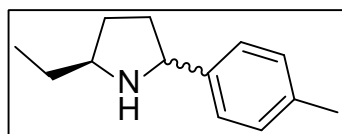
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.37 – 7.27 (m, 4H), 7.02 – 6.94 (m, 4H), 4.33 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.11 (t, 8 Hz, 1H), 3.53 – 3.43 (m, 1H), 3.34 – 3.23 (m, 1H), 2.31 – 2.20 (m, 1H), 2.20 – 2.03 (m, 2H), 1.97 (dddd, $J = 12.7, 8.7, 7.1, 5.9$ Hz, 1H), 1.78 – 1.62 (m, 2H), 1.50 – 1.35 (m, 2H), 1.23 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.20 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 163.1 (d, $J = 8.6$ Hz), 160.7 (d, $J = 8.5$ Hz), 141.7 (d, $J = 3$ Hz), 140.7 (d, $J = 3$ Hz), 128.3 (d, $J = 7.8$ Hz), 128.0 (d, $J = 7.9$ Hz), 115.2 (d, $J = 21$ Hz), 115.2 (d, $J = 21$ Hz), 62.4, 61.1, 54.8, 54.3, 35.9, 35.0, 34.4, 33.5, 22.4, 21.9.

(S)-2-etil-5-fenilpirrolidina



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.41 – 7.28 (m, 8H), 7.25 – 7.19 (m, 2H), 4.31 (dd, $J = 8.0, 7.0$ Hz, 1H), 4.18 – 4.11 (t, 4.13, $J = 8$ Hz, 1H), 3.35 – 3.25 (m, 1H), 3.15 – 3.03 (m, 1H), 2.30 – 2.21 (m, 4H), 2.20 – 2.03 (m, 1H), 1.97 (m, 2H), 1.83 – 1.63 (m, 1H), 1.63 – 1.41 (m, 6H), 0.97 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H), 0.95 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 146.0, 145.1, 128.6, 129.0, 127.0, 126.9, 126.9, 126.6, 62.8, 61.7, 61.2, 60.7, 35.4, 34.0, 32.7, 31.4, 30.2, 29.8, 11.8, 11.7.

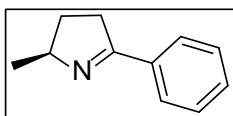
(S)-2-etil-5-(p-tolil)pirrolidina



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.26 (m, 4H), 7.13 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H), 4.32 – 4.24 (m, 1H), 4.12 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.35 – 3.25 (m, 1H), 3.15 – 3.05 (m, 1H), 2.83 (br. s, 2H), 2.33 (s, 6H), 2.27 – 2.19 (m, 1H), 2.18 – 2.06 (m, 2H), 2.02 – 1.92 (m, 1H), 1.83 – 1.65 (m, 2H), 1.65 – 1.40 (m, 6H), 0.97 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H), 0.93 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 142.2, 141.5, 136.6, 129.3, 129.2, 126.8, 126.6, 62.6, 61.5, 61.2, 60.7, 35.1, 33.9, 32.5, 31.4, 29.9, 29.6, 21.3, 11.8, 11.7.

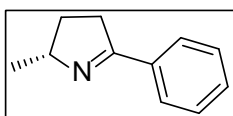
4.2.4. Datos de RMN de pirrolidinas y piperidinas sintetizadas
enzimáticamente a escala preparativa

(S)-5-Metil-2-fenil-1-pirrolina



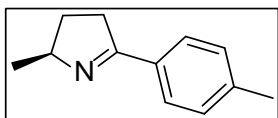
Aceite amarillo (230 mg, 91% yield, >99% *ee*)¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90 – 7.80 (m, 2H), 7.47 – 7.35 (m, 3H), 4.36 – 4.25 (m, 1H), 3.08 (dddd, *J* = 17.0, 9.9, 4.8, 2.1 Hz, 1H), 2.91 (dddd, *J* = 17.0, 9.6, 7.7, 1.8 Hz, 1H), 2.26 (dddd, *J* = 12.6, 9.8, 7.7, 4.8 Hz, 1H), 1.57 (dddd, *J* = 12.6, 9.9, 7.7, 6.7 Hz, 1H), 1.38 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 134.5, 130.8, 128.7, 128.0, 68.4, 35.4, 30.7, 22.3; [α]_D²⁰ = -110.5 (*c* = 2.0, CHCl₃).

(R)-5-Metil-2-fenil-1-pirrolina



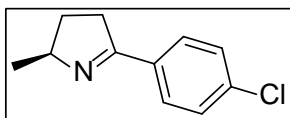
Aceite amarillo (155 mg, 65% yield, >99% *ee*); [α]_D²⁰ = -106.2 (*c* = 1.5, CHCl₃).

(S)-5-Metil-2- (4-metilfenil) -1-pirrolina



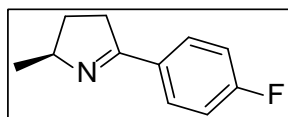
Aceite amarillo (223 mg, 86% yield).¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.32 – 4.21 (m, 1H), 3.04 (dddd, *J* = 17.2, 9.9, 4.8, 2.1 Hz, 1H), 2.86 (dddd, *J* = 17.2, 9.7, 7.9, 2.0 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.23 (dddd, *J* = 12.6, 9.8, 7.6, 4.8 Hz, 1H), 1.54 (dddd, *J* = 12.6, 9.8, 7.9, 6.7 Hz, 1H), 1.36 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.9, 140.7, 132.1, 129.3, 127.8, 68.5, 35.4, 30.8, 22.4, 21.6; [α]_D²⁰ = -77.4 (*c* = 0.8, CHCl₃)

(S)-5-Metil-2- (4-clorofenil)-1-pirrolina



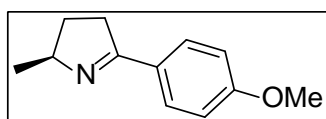
Aceite amarillo (243 mg, 84% yield).¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.79 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.41 – 7.34 (m, 2H), 4.36 – 4.22 (m, 1H), 3.04 (dddd, *J* = 17.0, 9.9, 4.7, 2.1 Hz, 1H), 2.87 (dddd, *J* = 17.0, 9.7, 7.7, 1.8 Hz, 1H), 2.27 (dddd, *J* = 12.6, 9.9, 7.7, 4.7 Hz, 1H), 1.66 – 1.50 (m, 1H), 1.37 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.0, 136.5, 133.3, 129.2, 128.8, 68.7, 35.4, 30.9, 22.3.

(S)-5-Metil-2- (4-fluorofenil)-1-pirrolina



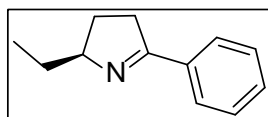
Aceite amarillo (215 mg, 81% yield). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.87 – 7.79 (m, 2H), 7.12 – 7.03 (m, 2H), 4.32 – 4.21 (m, 1H), 3.03 (dddd, $J = 17.0, 9.8, 4.7, 2.1$ Hz, 1H), 2.86 (dddd, $J = 17.0, 9.6, 7.6, 1.6$, 1H), 2.25 (dddd, $J = 12.5, 9.8, 7.6, 4.7$ Hz, 1H), 1.61 – 1.51 (m, 1H), 1.36 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170.9, 164.3 (d, $J = 248.7$ Hz), 131.2 (d, $J = 3$ Hz), 130.0 (d, $J = 8.6$ Hz), 115.6 (d, $J = 21.7$ Hz), 68.6, 35.5, 30.9, 22.3.

(S)-5-Metil-2- (4-metoxifenil)-1-pirrolina



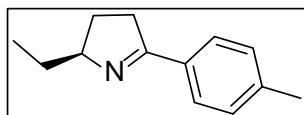
Aceite amarillo (250 mg, 88% yield). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.83 – 7.76 (m, 2H), 6.94 – 6.87 (m, 2H), 4.31 – 4.20 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.03 (dddd, $J = 17.0, 9.8, 4.7, 2.0$ Hz, 1H), 2.85 (dddd, $J = 17.0, 9.8, 7.6, 1.6$, 1H), 2.23 (dddd, $J = 12.5, 9.8, 7.6, 4.8$ Hz, 1H), 1.59 – 1.48 (m, 1H), 1.35 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 171.4, 161.6, 129.5, 113.9, 68.3, 55.5, 35.3, 30.9, 22.

(S)-5-Etil-2-fenil-1-pirrolina



Aceite amarillo (130 mg, 50% yield). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.88 – 7.83 (m, 2H), 7.46 – 7.37 (m, 3H), 4.19 – 4.08 (m, 1H), 3.02 (dddd, $J = 17.0, 10.0, 4.9, 2.2$ Hz, 1H), 2.89 (dddd, $J = 17.0, 9.7, 7.6, 1.8$ Hz, 1H), 2.20 (dddd, $J = 12.8, 9.7, 7.8, 4.9$ Hz, 1H), 1.95 – 1.82 (m, 1H), 1.62 (dddd, $J = 12.8, 10.0, 7.6, 6.8$ Hz, 1H), 1.59–1.48 (m, 1H), 1.02 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 172.0, 134.7, 130.3, 128.4, 127.7, 74.6, 35.0, 29.4, 28.0, 10.9. $[\alpha]_D^{20} = -67.59$ ($c = 0.5$, CHCl_3).

(S)-5-Etil-2- (4-metilfenil) -1-pirrolina



Aceite amarillo (225 mg, 80% yield). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.17 – 4.07 (m, 1H), 3.00 (dddd, $J = 17.0, 10.0, 4.9, 2.2$ Hz, 1H), 2.86 (dddd, $J = 17.0, 9.6, 7.6, 2.0$ Hz, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.18 (dddd, $J = 12.7, 10.0, 7.8, 4.9$ Hz, 1H), 1.94 – 1.82 (m, 1H), 1.60 (dddd, $J = 12.7, 10.0, 7.6, 6.8$ Hz, 1H), 1.58 – 1.47 (m, 1H), 1.01 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 172.1, 140.7, 132.1, 129.3, 127.9, 74.6, 35.2, 29.6, 28.1, 21.7, 11.1.

4.3. Métodos analíticos

En los capítulos 2.1, 2.2 y 2.3 los grados de avance de reacción, los porcentajes de conversión, los rendimientos fueron determinados por TLC, GC quiral, HPLC Quiral o HPLC-MS.

En el capítulo 2.1 las reacciones fueron controladas por TLC mayoritariamente. Se congelaron las muestras a -70°C y se liofilizaron toda la noche. Se resuspendieron en $100\ \mu\text{L}$ de acetato de etilo. Se utilizó como fase estacionaria una placa para TLC y como fase móvil una mezcla 9:1 diclorometano: metanol con 1% de hidróxido de amonio o 8:2 diclorometano: metanol con 1% de hidróxido de amonio. Se revelaron con ninhidrina y calor. El análisis por GC en capítulo 2.2 fue realizado con Cromatógrafo Shimadzu 2010 equipado con un Megadex Columna DET-TBS (25 m, 0,25 mm) (MEGA, Italia) y un Detector de FID.

Para el análisis de aminas en capítulo 2.2 el programa de temperatura utilizado es el siguiente: $80\ ^{\circ}\text{C}$ (2 min) / $1,25\ ^{\circ}\text{C}/\text{min}$ / $125\ ^{\circ}\text{C}/40\ ^{\circ}\text{C}/\text{min}$ / $210\ ^{\circ}\text{C}$ (5 min). TSPLIT 230 $^{\circ}\text{C}$, TFID 230 $^{\circ}\text{C}$. La asignación de la configuración absoluta de las aminas en capítulo 2.2 se basó en la comparación con el producto obtenido de la transaminación correspondiente con ATA 117.

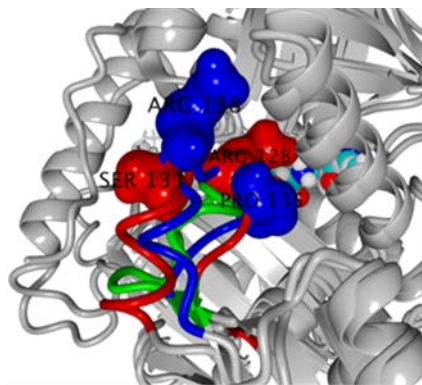
Los análisis por HPLC quiral del capítulo 2.2 fueron realizados en fase normal en un sistema Agilent (Santa Clara, CA, EUA) equipado con un desgasificador G1379A, una bomba binaria G1312A, una unidad de automuestreador de placa de pozo G1367A, un compartimento de columna de temperatura controlada G1316A y un detector de matriz de diodos G1315C. Se utilizó la columna CHIRALCEL®OD-H Analytical (Daicel (Osaka, Japón), 250 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro, 5 μm tamaño de partícula). El volumen típico de inyección fue de $15\ \mu\text{L}$ y los cromatogramas se monitorearon a 265 nm. Las condiciones analíticas para la separación de los posibles isómeros ópticos se establecieron mediante el análisis de la mezcla racémica de la amina correspondiente. La asignación de la configuración absoluta se basó en la comparación con el producto obtenido de la transaminación correspondiente con ATA 117.

Sustrato	Método	Columna	Rt cetona	Rt producto
20	GC	MEGA DET-TBS	10.19	11.60
21	HPLC	ODH 95:5 ¹	6.53	7.79
22	GC	MEGA DET-TBS	36.75	38.40
23	GC	MEGA DET-TBS	12.20	13.50
24	HPLC	ODH 90:10	11.76	12.69
25	HPLC	ODH 95:5	5.82	7.30
26	GC	MEGA DET-TBS	8.65	9.70
27	HPLC	ODH 95:5	8.36	13.60

En los capítulos 2.4 y 2.5 los espectros de GC-MS fueron registrados en un Hewlett Packard HP 6890 equipado con una columna HP-1MS, un Detector Selectivo de Masas HP 5973 y un robot de muestreo ATLAS GL FOCUS. El análisis GC-FID se realizó en el Agilent 6850 equipado con un muestreador multipropósito Gerstel MPS2L y una columna Varian CP CHIRASIL-DEX CB de 25 m x 0,25 mm DF=0,25 mm método: 90°C - 160°C, velocidad 2°C/min. Las configuraciones absolutas se asignaron por comparación con los valores de la literatura.

Tabla 4.3-1: Tiempos de retención de sustratos y productos capítulo 2.4

Cetona	Amina	Columna Mezcla <i>n</i> -Hex/ <i>i</i> -PrOH
78 (4.66 min)	(<i>R</i>) - 7.3 min (<i>S</i>) -9.01 min	ODH 95:5
79(6.91 min)	(<i>S</i>)-9.79 min	ODH 95:5
80 (5.82 min)	(<i>R</i>)- 7.3 min, (<i>S</i>)-9.01 min	ODH 95:5
81 (8.36 min)	(<i>R</i>)- 13.6 min, (<i>S</i>)-19.3 min	ODH 95:5
82(5.93)	(<i>S</i>)- 10.88 min	ODH 95:5
83(5.57)	(<i>S</i>)- 9.32 mn	ODH 95:5
84 (5.79)	(<i>S</i>)- 9.94 min	ODH 95:5
85 (11.76)	(<i>S</i>)- 14.69 min	ODH 90:10
86 (5.53)	(<i>S</i>)- 8.79 min	ODH 95:5
87 (8.86)	(<i>S</i>)- 15.3 min	ODH 95:5
88 (10.5)	(<i>R</i>)- 11.6 min (<i>S</i>)- 17.6 min	ODH 90:10
89 (5.23)	(<i>S</i>)- 7.79 min	ODH 95:5
90 (5.43)	(<i>S</i>)- 8.67 min	ODH 95:5



5. BIBLIOGRAFIA

Capítulo 5

- (1) Anastas, P. T.; Crabtree, R. H. Handbook of Green Chemistry Volume 1: Homogenous Catalysis. 2013, p 416.
- (2) P. Anastas and J. C. Warner. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, 1998.
- (3) Woodley, J. M.; Breuer, M.; Mink, D. A Future Perspective on the Role of Industrial Biotechnology for Chemicals Production. *Chem. Eng. Res. Des.* **2013**, *91* (10), 2029–2036.
- (4) Sheldon, R. A. The: E Factor 25 Years on: The Rise of Green Chemistry and Sustainability. *Green Chem.* **2017**, *19*(1), 18–43.
- (5) Hughes, G.; Lewis, J. C. Introduction: Biocatalysis in Industry. *Chem. Rev.* **2018**, *118*(1), 1–3.
- (6) *Biocatalysis*.
- (7) Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* **2018**, *118*(2), 801–838.
- (8) Sheldon, R. A.; Pereira, P. C. Biocatalysis Engineering: The Big Picture. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*(10), 2678–2691.
- (9) Turner, N. J. Directed Evolution Drives the next Generation of Biocatalysts. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*(8), 567–573.
- (10) Behrens, G. a.; Hummel, A.; Padhi, S. K.; Schätzle, S.; Bornscheuer, U. T. Discovery and Protein Engineering of Biocatalysts for Organic Synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*(13), 2191–2215.
- (11) Agamiyama, H. I. K. Directed Evolution of an Aspartate Aminotransferase with New Substrate Specificities. **1998**, *95*(May), 5511–5515.
- (12) Hwang, B. Y.; Kim, B. G. High-Throughput Screening Method for the Identification of Active and Enantioselective ω -Transaminases. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *34*(5), 429–436.
- (13) Reetz, M. T.; Jaeger, K. Enantioselective Enzymes for Organic Synthesis Created by Directed. **2000**, No. 3, 407–412.
- (14) Metzgar, D.; We, M. B. [21] Changing the Enantioselectivity of Enzymes by Directed Evolution. **2004**, *388*(1982).
- (15) Reetz, M. T. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology : Past , Present , and Future. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480–12496.
- (16) Li, R.; Wijma, H. J.; Song, L.; Cui, Y.; Otzen, M.; Tian, Y.; Du, J.; Li, T.; Niu, D.; Chen, Y.; et al. Computational Redesign of Enzymes for Regio- and Enantioselective Hydroamination. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *1*, 1–7.
- (17) Kries, H.; Blomberg, R.; Hilvert, D. De Novo Enzymes by Computational Design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*(2), 221–228.
- (18) Pike, L. J.; Viciani, E.; Kumar, N. Microbial Diversity Knows No Borders. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*(2), 66.
- (19) Baker Dockrey, S. A.; Lukowski, A. L.; Becker, M. R.; Narayan, A. R. H. Biocatalytic Site- and Enantioselective Oxidative Dearomatization of Phenols. *Nat. Chem.* **2018**, *10*(2), 119–125.
- (20) Sheldon, R. A.; Brady, D. The Limits to Biocatalysis: Pushing the Envelope. *ChemComm* **2018**.

- (21) Turner, N. J.; O'reilly, E. Biocatalytic Retrosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*(5), 285–288.
- (22) Patel, R. N. Biocatalysis: Synthesis of Key Intermediates for Development of Pharmaceuticals. *ACS Catal.* **2011**, *1* (9), 1056–1074.
- (23) ROUHI, A. M. CUSTOM CHEMICALS. *Chem. Eng. News Arch.* **2003**, *81* (7), 55–73.
- (24) Miotto, K.; Cho, A. K.; Khalil, M. A.; Blanco, K.; Sasaki, J. D.; Rawson, R. Trends in Tramadol: Pharmacology, Metabolism, and Misuse. *Anesth. Analg.* **2017**, *124* (1), 44–51.
- (25) Kim, J. H.; Scialli, A. R. Thalidomide: The Tragedy of Birth Defects and the Effective Treatment of Disease. *Toxicol. Sci.* **2011**, *122* (1), 1–6.
- (26) FDA. Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs. *Chirality* **1992**, *340*, 1–5.
- (27) Agranat, I.; Caner, H.; Caldwell, J. Putting Chirality to Work: The Strategy of Chiral Switches. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (10), 753–768.
- (28) Welsch, M. E.; Snyder, S. A.; Stockwell, B. R. Privileged Scaffolds for Library Design and Drug Discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14* (3), 347–361.
- (29) Kelly, S. A.; Pohle, S.; Wharry, S.; Mix, S.; Allen, C. C. R.; Moody, T. S.; Gilmore, B. F. Application of ω -Transaminases in the Pharmaceutical Industry. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (1), 349–367.
- (30) Patel, R. N. Synthesis of Chiral Pharmaceutical Intermediates by Biocatalysis. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252* (5–7), 659–701.
- (31) D. Patil, M.; Grogan, G.; Bommarius, A.; Yun, H. Recent Advances in ω - Transaminase-Mediated Biocatalysis for the Enantioselective Synthesis of Chiral Amines. *Catalysts* **2018**, *8* (7), 2073–4344.
- (32) Patel, R. N. Biocatalysis for Synthesis of Pharmaceuticals. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26* (7), 1252–1274.
- (33) Ran, N.; Zhao, L.; Chen, Z.; Tao, J. Recent Applications of Biocatalysis in Developing Green Chemistry for Chemical Synthesis at the Industrial Scale. *Green Chem.* **2008**, *10* (4), 361–372.
- (34) Truppo, M. D. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry – The Need for Speed. **2017**.
- (35) YALING WANG AND ALEX CHEN. Crystallization-Based Separation of Enantiomers. **2013**, 1663–1682.
- (36) Fujima, Y.; Ikunaka, M.; Inoue, T.; Matsumoto, J. Synthesis of (S) -3- (N-Methylamino) -1- (2-Thienyl) Propan-1-Ol : Revisiting Eli Lilly ' s Resolution - Racemization - Recycle Synthesis of Duloxetine for Its Abstract : *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10* (5), 905–913.
- (37) Breuer, M.; Ditrach, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Kefßeler, M.; Stürmer, R.; Zelinski, T. Industrial Methods for the Production of Optically Active Intermediates. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43* (7), 788–824.
- (38) Nugent, T. C.; Negru, D. E.; El-Shazly, M.; Hu, D.; Sadiq, A.; Bibi, A.; Umar, M. N. Sequential Reductive Amination-Hydrogenolysis: A One-Pot Synthesis of Challenging Chiral Primary Amines. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353* (11–12), 2085–2092.
- (39) Blaser*, H. U.; Buser, H. P.; Häusel, R.; Jalett, H. P.; Spindler, F. Tunable

- Ferrocenyl Diphosphine Ligands for the Ir-Catalyzed Enantioselective Hydrogenation of N-Aryl Imines. *J. Organomet. Chem.* **2001**, *621* (1–2), 34–38.
- (40) Liu, D.; Zhang, X. Practical P-Chiral Phosphane Ligand for Rh-Catalyzed Asymmetric Hydrogenation. *European J. Org. Chem.* **2005**, No. 4, 646–649.
- (41) Lin, G. Q.; Xu, M. H.; Zhong, Y. W.; Sun, X. W. An Advance on Exploring N-Tert-Butanesulfinyl Imines in Asymmetric Synthesis of Chiral Amines. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (7), 831–840.
- (42) Burk, M. J.; Feaster, J. E. Enantioselective Hydrogenation of the C=N Group. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (15), 6266–6267.
- (43) Uematsu, N.; Fujii, A.; Hashiguchi, S.; Ikariya, T.; Noyori, R. Asymmetric Transfer Hydrogenation of Imines. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (Ii), 4916–4917.
- (44) Turner, N. J. Biocatalysis. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2* (8), 1523.
- (45) Vicente Gotor-Fernandez, Rosario Brieva, V. G. Lipasas2006gotor.Pdf. **2006**, *40* (3–4), 111–120.
- (46) Herter, S.; Medina, F.; Wagschal, S.; Benhaïm, C.; Leipold, F.; Turner, N. J. Mapping the Substrate Scope of Monoamine Oxidase (MAO-N) as a Synthetic Tool for the Enantioselective Synthesis of Chiral Amines. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26* (7), 1338–1346.
- (47) Rowles, I.; Malone, K. J.; Etchells, L. L.; Willies, S. C.; Turner, N. J. Directed Evolution of the Enzyme Monoamine Oxidase (Mao-n): Highly Efficient Chemo-Enzymatic Deracemisation of the Alkaloid (±)-Crispinea. *ChemCatChem* **2012**, *4* (9), 1259–1261.
- (48) Han, S. W.; Park, E. S.; Dong, J. Y.; Shin, J. S. Expanding Substrate Specificity of ??-Transaminase by Rational Remodeling of a Large Substrate-Binding Pocket. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357* (12), 2712–2720.
- (49) Mutti, F. G.; Breuer, M.; Turner, N. J. Re s Ear Ch | r e p o r t S. **2015**, *224015* (2013).
- (50) Parmeggiani, F.; Weise, N. J.; Ahmed, S. T.; Turner, N. J. Synthetic and Therapeutic Applications of Ammonia-Lyases and Aminomutases. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (1), 73–118.
- (51) Sharma, M.; Mangas-Sanchez, J.; Turner, N. J.; Grogan, G. NAD(P)H-Dependent Dehydrogenases for the Asymmetric Reductive Amination of Ketones: Structure, Mechanism, Evolution and Application. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359* (12), 2011–2025.
- (52) Aleku, G. A.; France, S. P.; Man, H.; Mangas-Sanchez, J.; Montgomery, S. L.; Sharma, M.; Leipold, F.; Hussain, S.; Grogan, G.; Turner, N. J. A Reductive Aminase from *Aspergillus Oryzae*. *Nat. Chem.* **2017**, *9* (10), 961–969.
- (53) Rebelein, J. G.; Ward, T. R. In Vivo Catalyzed New-to-Nature Reactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *53* (ii), 106–114.
- (54) Gainza-Cirauqui, P.; Correia, B. E. Computational Protein Design — the next Generation Tool to Expand Synthetic Biology Applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *52*, 145–152.
- (55) Jeschek, M.; Panke, S.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes on the Verge of New-to-Nature Metabolism. *Trends Biotechnol.* **2018**, *36* (1), 60–72.
- (56) Rudroff, F.; Mihovilovic, M. D.; Gröger, H.; Snajdrova, R.; Iding, H.; Bornscheuer, U. T. Opportunities and Challenges for Combining Chemo- and Biocatalysis. *Nat. Catal.* **2018**, *1* (1), 12–22.

- (57) Harris, N. C.; Born, D. A.; Cai, W.; Huang, Y.; Martin, J.; Khalaf, R.; Drennan, C. L.; Zhang, W. Isonitrile Formation by a Non-Heme Iron(II)-Dependent Oxidase/Decarboxylase. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2018**, *02139*, 1–5.
- (58) Arnold, F. H. Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57*(16), 4143–4148.
- (59) Vila, M. A.; Pazos, M.; Iglesias, C.; Veiga, N.; Seoane, G.; Carrera, I. Toluene Dioxygenase-Catalysed Oxidation of Benzyl Azide to Benzonitrile: Mechanistic Insights for an Unprecedented Enzymatic Transformation. *ChemBioChem* **2016**, *17*(4), 291–295.
- (60) Carvalho, C. C. C. R. De. Minireview Whole Cell Biocatalysts : Essential Workers from Nature to the Industry. **2017**, No. 634486.
- (61) France, S. P.; Aleku, G. A.; Sharma, M.; Mangas-Sanchez, J.; Howard, R. M.; Steflik, J.; Kumar, R.; Adams, R. W.; Slabu, I.; Crook, R.; et al. Biocatalytic Routes to Enantiomerically Enriched Dibenz[c,e]Azepines. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56*(49), 15589–15593.
- (62) Ducharme, J.; Auclair, K. Enzymes Beat Chemists in the Formation of an Unnatural Bond. *ChemBioChem* **2017**, *18*(5), 432–434.
- (63) Li, G.; Ren, J.; Yao, P.; Duan, Y.; Zhang, H.; Wu, Q.; Feng, J.; Lau, P. C. K.; Zhu, D. Deracemization of 2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroquinoline Using Mutant Cyclohexylamine Oxidase Obtained by Iterative Saturation Mutagenesis. *ACS Catal.* **2014**, *4*(3), 903–908.
- (64) Leisch, H.; Grosse, S.; Iwaki, H.; Hasegawa, Y.; Lau, P. C. K. Cyclohexylamine Oxidase as a Useful Biocatalyst for the Kinetic Resolution and Dereacemization of Amines. *Can. J. Chem.* **2012**, *90*(1), 39–45.
- (65) Heath, R. S.; Pontini, M.; Bechi, B.; Turner, N. J. Development of an *R*-Selective Amine Oxidase with Broad Substrate Specificity and High Enantioselectivity. *ChemCatChem* **2014**, *6*(4), 996–1002.
- (66) Turner, N. J. Deracemisation Methods. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*(2), 115–121.
- (67) Kachalova, G. S.; Bourenkov, G. P.; Mengesdorf, T.; Schenk, S.; Maun, H. R.; Burghammer, M.; Riek, C.; Decker, K.; Bartunik, H. D. Crystal Structure Analysis of Free and Substrate-Bound 6-Hydroxy-l-Nicotine Oxidase from *Arthrobacter Nicotinovorans*. *J. Mol. Biol.* **2010**, *396*(3), 785–799.
- (68) Ghislieri, D.; Houghton, D.; Green, A. P.; Willies, S. C.; Turner, N. J. Monoamine Oxidase (MAO-N) Catalysed Deracemisation of Tetrahydro- β -Carbolines: Substrate Dependent Switch in Enantioselectivity. *ACS Catal.* **2013**, 131021115242005.
- (69) Carr, R.; Alexeeva, M.; Enright, A.; Eve, T. S. C.; Dawson, M. J.; Turner, N. J. Directed Evolution of an Amine Oxidase Possessing Both Broad Substrate Specificity and High Enantioselectivity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42*(39), 4807–4810.
- (70) Carr, R.; Alexeeva, M.; Dawson, M. J.; Gotor-Fernández, V.; Humphrey, C. E.; Turner, N. J. Directed Evolution of an Amine Oxidase for the Preparative Deracemisation of Cyclic Secondary Amines. *ChemBioChem* **2005**, *6*(4), 637–639.
- (71) Dunsmore, C. J.; Carr, R.; Fleming, T.; Turner, N. J. A Chemo-Enzymatic Route to Enantiomerically Pure Cyclic Tertiary Amines. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*(7), 2224–2225.

- (72) Ghislieri, D.; Green, A. P.; Pontini, M.; Willies, S. C.; Rowles, I.; Frank, A.; Grogan, G.; Turner, N. J. Engineering an Enantioselective Amine Oxidase for the Synthesis of Pharmaceutical Building Blocks and Alkaloid Natural Products. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (29), 10863–10869.
- (73) Atkin, K. E.; Reiss, R.; Koehler, V.; Bailey, K. R.; Hart, S.; Turkenburg, J. P.; Turner, N. J.; Brzozowski, A. M.; Grogan, G. The Structure of Monoamine Oxidase from *Aspergillus Niger* Provides a Molecular Context for Improvements in Activity Obtained by Directed Evolution. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384* (5), 1218–1231.
- (74) Li, T.; Liang, J.; Ambrogelly, A.; Brennan, T.; Gloor, G.; Huisman, G.; Lalonde, J.; Lekhal, A.; Mijts, B.; Muley, S.; et al. Efficient, Chemoenzymatic Process for Manufacture of the Boceprevir Bicyclic [3.1.0]Proline Intermediate Based on Amine Oxidase-Catalyzed Desymmetrization. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (14), 6467–6472.
- (75) Znabet, A.; Polak, M. M.; Janssen, E.; De Kanter, F. J. J.; Turner, N. J.; Orru, R. V. A.; Ruijter, E. A Highly Efficient Synthesis of Telaprevir by Strategic Use of Biocatalysis and Multicomponent Reactions. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (42), 7918–7920.
- (76) Grishin, N. V; Phillips, M. A.; Elizabeth, J.; Goldsmith, E. J. Modeling of the Spatial Structure of Eukaryotic Ornithine Decarboxylases. *Protein Sci.* *4* (7), 1291–1304.
- (77) Percudani, R.; Peracchi, A. The B6 Database: A Tool for the Description and Classification of Vitamin B6-Dependent Enzymatic Activities and of the Corresponding Protein Families. *BMC Bioinformatics* **2009**, *10*, 273.
- (78) Mehta, P. K.; Hale, T. I.; Christen, P. Aminotransferases Demonstration of Homology and Division Into Evolutionary Subgroups. Pdf. **1993**, *561*, 549–561.
- (79) Slabu, I.; Galman, J. L.; Lloyd, R. C.; Turner, N. J. Discovery, Engineering, and Synthetic Application of Transaminase Biocatalysts. *ACS Catal.* **2017**, *7*(12), 8263–8284.
- (80) Turner, N.; Fotheringham, I.; Speight, R. Novel Biocatalyst Technology for the Preparation of Chiral Amines. *Innov. Pharm. Technol.* **2004**, 114–122.
- (81) Stewart, J. D. Dehydrogenases and Transaminases in Asymmetric Synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5* (2), 120–129.
- (82) Journal, T. H. E. Purification and Properties of a Transaminase from *Escherichia Cy = Ketoglutarate CoZi **. *Most* **1964**, *239* (3), 2–5.
- (83) Tufvesson, P.; Lima-Ramos, J.; Jensen, J. S.; Al-Haque, N.; Neto, W.; Woodley, J. M. Process Considerations for the Asymmetric Synthesis of Chiral Amines Using Transaminases. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108* (7), 1479–1493.
- (84) Truppo, M. D.; Rozzell, J. D.; Turner, N. J. Efficient Production of Enantiomerically Pure Chiral Amines at Concentrations of 50 g / L Using Transaminases Abstract : **2010**, *14* (1), 234–237.
- (85) Shin, J. S.; Kim, B. G. Asymmetric Synthesis of Chiral Amines with Omega-Transaminase. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65* (2), 206–211.
- (86) Shin, J. S.; Yun, H.; Jang, J. W.; Park, I.; Kim, B. G. Purification, Characterization, and Molecular Cloning of a Novel Amine:Pyruvate Transaminase from *Vibrio Fluvialis JS17*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61* (5–6), 463–471.
- (87) Shin, J. S.; Kim, B. G. Substrate Inhibition Mode of ??-Transaminase from *Vibrio Fluvialis JS17* Is Dependent on the Chirality of Substrate. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *77* (7), 832–837.

- (88) Malik, M. S.; Park, E.-S.; Shin, J.-S. Features and Technical Applications of ω -Transaminases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*(5), 1163–1171.
- (89) Gomm, A.; O'Reilly, E. Transaminases for Chiral Amine Synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *43*(Figure 1), 106–112.
- (90) Fuchs, M.; Koszelewski, D.; Tauber, K.; Sattler, J.; Banko, W.; Holzer, A. K.; Pickl, M.; Kroutil, W.; Faber, K. Improved Chemoenzymatic Asymmetric Synthesis of (S)-Rivastigmine. *Tetrahedron* **2012**, *68*(37), 7691–7694.
- (91) Koszelewski, D.; Lavandera, I.; Clay, D.; Rozzell, D.; Kroutil, W. Asymmetric Synthesis of Optically Pure Pharmacologically Relevant Amines Employing ω -Transaminases. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*(17), 2761–2766.
- (92) Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. Biocatalytic Routes to Optically Active Amines. *ChemCatChem* **2009**, *1*(1), 42–51.
- (93) Han, S. W.; Park, E. S.; Dong, J. Y.; Shin, J. S. Mechanism-Guided Engineering of ω -Transaminase to Accelerate Reductive Amination of Ketones. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*(8), 1732–1740.
- (94) Han, S. W.; Shin, J. S. Metabolically Driven Equilibrium Shift of Asymmetric Amination of Ketones by ω -Transaminase Using Alanine as an Amino Donor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, *78*(10), 1788–1790.
- (95) Koszelewski, D.; Lavandera, I.; Clay, D.; Guebitz, G. M.; Rozzell, D.; Kroutil, W. Formal Asymmetric Biocatalytic Reductive Amination. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*(48), 9337–9340.
- (96) Koszelewski, D.; Pressnitz, D.; Clay, D.; Kroutil, W. Deracemization of Mexiletine Biocatalyzed by Omega-Transaminases. *Org. Lett.* **2009**, *11*(21), 4810–4812.
- (97) Koszelewski, D.; Gäßler, M.; Clay, D.; Seisser, B.; Kroutil, W. Synthesis of Optically Active Amines Employing Recombinant ω -Transaminases in *E. coli* Cells. *ChemCatChem* **2010**, *2*(1), 73–77.
- (98) Koszelewski, D.; Tauber, K.; Faber, K.; Kroutil, W. Omega-Transaminases for the Synthesis of Non-Racemic Alpha-Chiral Primary Amines. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*(6), 324–332.
- (99) Kaulmann, U.; Smithies, K.; Smith, M. E. B.; Hailes, H. C.; Ward, J. M. Substrate Spectrum of ω -Transaminase from *Chromobacterium violaceum* DSM30191 and Its Potential for Biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*(5), 628–637.
- (100) Iwasaki, A.; Yamada, Y.; Kizaki, N.; Ikenaka, Y.; Hasegawa, J. Microbial Synthesis of Chiral Amines by (R)-Specific Transamination with *Arthrobacter* Sp. KNK168. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *69*(5), 499–505.
- (101) Ferrandi, E. E.; Monti, D. Amine Transaminases in Chiral Amines Synthesis: Recent Advances and Challenges. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *34*(1), 0.
- (102) Savile, C. K.; Janey, J. M.; Mundorff, E. C.; Moore, J. C.; Tam, S.; Jarvis, W. R.; Colbeck, J. C.; Krebber, A.; Fleitz, F. J.; Brands, J.; et al. Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. *Science* **2010**, *329*(5989), 305–309.
- (103) Desai, A. A. Sitagliptin Manufacture: A Compelling Tale of Green Chemistry, Process Intensification, and Industrial Asymmetric Catalysis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*(9), 1974–1976.
- (104) Slabu, I.; Galman, J. L.; Weise, N. J.; Lloyd, R. C.; Turner, N. J. Putrescine Transaminases for the Synthesis of Saturated Nitrogen Heterocycles from

- Polyamines. *ChemCatChem* **2016**, *8*(6), 1038–1042.
- (105) Rodríguez-Mata, M.; Frank, A.; Wells, E.; Leipold, F.; Turner, N. J.; Hart, S.; Turkenburg, J. P.; Grogan, G. Structure and Activity of NADPH-Dependent Reductase Q1EQE0 from *Streptomyces Kanamyceticus*, Which Catalyses the R-Selective Reduction of an Imine Substrate. *ChemBioChem* **2013**, *14* (11), 1372–1379.
- (106) Huber, T.; Schneider, L.; Präg, A.; Gerhardt, S.; Einsle, O.; Müller, M. Direct Reductive Amination of Ketones: Structure and Activity of S-Selective Imine Reductases from *Streptomyces*. *ChemCatChem* **2014**, *6*(8), 2248–2252.
- (107) Man, H.; Wells, E.; Hussain, S.; Leipold, F.; Hart, S.; Turkenburg, J. P.; Turner, N. J.; Grogan, G. Structure, Activity and Stereoselectivity of NADPH-Dependent Oxidoreductases Catalysing the S-Selective Reduction of the Imine Substrate 2-Methylpyrroline. *ChemBioChem* **2015**, *16* (7), 1052–1059.
- (108) Aleku, G. A.; Man, H.; France, S. P.; Leipold, F.; Hussain, S.; Toca-Gonzalez, L.; Marchington, R.; Hart, S.; Turkenburg, J. P.; Grogan, G.; et al. Stereoselectivity and Structural Characterization of an Imine Reductase (IRED) from *Amycolatopsis Orientalis*. *ACS Catal.* **2016**, *6*(6), 3880–3889.
- (109) Hallen, A.; Jamie, J. F.; Cooper, A. J. L. Lysine Metabolism in Mammalian Brain: An Update on the Importance of Recent Discoveries. *Amino Acids* **2013**, *45* (6), 1249–1272.
- (110) Broquist, H. P. Lysine-Pipecolic Acid Metabolic Relationships in Microbes and Mammals. *Annu. Rev. Nutr.* **1991**, *11*, 435–448.
- (111) MURAMATSU, H.; MIHARA, H.; YASUDA, M.; UEDA, M.; KURIHARA, T.; ESAKI, N. Enzymatic Synthesis of L-Pipecolic Acid by Δ^1 -Piperidine-2-Carboxylate Reductase from *Pseudomonas Putida*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*(9), 2296–2298.
- (112) Vaijayanthi, T.; Chadha, A. Asymmetric Reduction of Aryl Imines Using *Candida Parapsilosis* ATCC 7330. *Tetrahedron Asymmetry* **2008**, *19*(1), 93–96.
- (113) Espinoza-Moraga, M.; Petta, T.; Vasquez-Vasquez, M.; Laurie, V. F.; Moraes, L. A. B.; Santos, L. S. Bioreduction of β -Carboline Imines to Amines Employing *Saccharomyces Bayanus*. *Tetrahedron Asymmetry* **2010**, *21*(16), 1988–1992.
- (114) Mitsukura, K.; Kuramoto, T.; Yoshida, T.; Kimoto, N.; Yamamoto, H.; Nagasawa, T. A NADPH-Dependent (S)-Imine Reductase (SIR) from *Streptomyces* Sp. GF3546 for Asymmetric Synthesis of Optically Active Amines: Purification, Characterization, Gene Cloning, and Expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*(18), 8079–8086.
- (115) Mitsukura, K.; Suzuki, M.; Tada, K.; Yoshida, T.; Nagasawa, T. Asymmetric Synthesis of Chiral Cyclic Amine from Cyclic Imine by Bacterial Whole-Cell Catalyst of Enantioselective Imine Reductase. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*(20), 4533–4535.
- (116) MITSUKURA, K.; SUZUKI, M.; SHINODA, S.; KURAMOTO, T.; YOSHIDA, T.; NAGASAWA, T. Purification and Characterization of a Novel (R)-Imine Reductase from *Streptomyces* Sp. GF3587. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75* (9), 1778–1782.
- (117) Leipold, F.; Hussain, S.; Ghislieri, D.; Turner, N. J. Asymmetric Reduction of Cyclic Imines Catalyzed by a Whole-Cell Biocatalyst Containing an (S)-Imine Reductase. **2013**, 1–5.

- (118) Hussain, S.; Leipold, F.; Man, H.; Wells, E.; France, S. P.; Mulholland, K. R.; Grogan, G.; Turner, N. J. An (R)-Imine Reductase Biocatalyst for the Asymmetric Reduction of Cyclic Imines. *ChemCatChem* **2015**, *7*(4), 579–583.
- (119) Li, H.; Luan, Z. J.; Zheng, G. W.; Xu, J. H. Efficient Synthesis of Chiral Indolines Using an Imine Reductase from *Paenibacillus Lactis*. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*(8), 1692–1696.
- (120) Gand, M.; Müller, H.; Wardenga, R.; Höhne, M. Characterization of Three Novel Enzymes with Imine Reductase Activity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *110*, 126–132.
- (121) Wetzl, D.; Berrera, M.; Sandon, N.; Fishlock, D.; Ebeling, M.; Müller, M.; Hanlon, S.; Wirz, B.; Iding, H. Expanding the Imine Reductase Toolbox by Exploring the Bacterial Protein-Sequence Space. *ChemBioChem* **2015**, *16*(12), 1749–1756.
- (122) Scheller, P. N.; Fademrecht, S.; Hofelzer, S.; Pleiss, J.; Leipold, F.; Turner, N. J.; Nestl, B. M.; Hauer, B. Enzyme Toolbox: Novel Enantiocomplementary Imine Reductases. *ChemBioChem* **2014**, *15*(15), 2201–2204.
- (123) Fademrecht, S.; Scheller, P. N.; Nestl, B. M.; Hauer, B.; Pleiss, J. Identification of Imine Reductase-Specific Sequence Motifs. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2016**, *84*(5), 600–610.
- (124) Muschiol, J.; Peters, C.; Oberleitner, N.; Mihovilovic, M. D.; Bornscheuer, U. T.; Rudroff, F. Cascade Catalysis-Strategies and Challenges En Route to Preparative Synthetic Biology. *Chem. Commun.* **2015**, *51*(27), 5798–5811.
- (125) Hepworth, L. J.; France, S. P.; Hussain, S.; Both, P.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L. Enzyme Cascades in Whole Cells for the Synthesis of Chiral Cyclic Amines. *ACS Catal.* **2017**, *7*(4), 2920–2925.
- (126) Ricca, E.; Brucher, B.; Schrittwieser, J. H. Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*(13), 2239–2262.
- (127) Otte, K. B.; Hauer, B. Enzyme Engineering in the Context of Novel Pathways and Products. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *35*, 16–22.
- (128) Zhou, Y.; Wu, S.; Li, Z. Cascade Biocatalysis for Sustainable Asymmetric Synthesis: From Biobased l-Phenylalanine to High-Value Chiral Chemicals. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55*(38), 11647–11650.
- (129) France, S. P.; Hepworth, L. J.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L. Constructing Biocatalytic Cascades: In Vitro and in Vivo Approaches to de Novo Multi-Enzyme Pathways. *ACS Catal.* **2017**, *7*(1), 710–724.
- (130) Wachtmeister, J. ScienceDirect Recent Advances in Whole Cell Biocatalysis Techniques Bridging from Investigative to Industrial Scale “ Rte Rother. **2016**, 169–177.
- (131) Wu, S.; Li, Z. Whole-Cell Cascade Biotransformations for One-Pot Multistep Organic Synthesis. *ChemCatChem* **2018**.
- (132) Marr, A. C.; Liu, S. Combining Bio- and Chemo-Catalysis: From Enzymes to Cells, from Petroleum to Biomass. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*(5), 199–204.
- (133) Bittihn, P.; Din, M. O.; Tsimring, L. S.; Hasty, J. Rational Engineering of Synthetic Microbial Systems: From Single Cells to Consortia. *Curr. Opin. Microbiol.* **2018**, *45*, 92–99.
- (134) Schrewe, M.; Ladkau, N.; Bühler, B.; Schmid, A. Direct Terminal Alkylamino-Functionalization via Multistep Biocatalysis in One Recombinant Whole-Cell

- Catalyst. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355* (9), 1693–1697.
- (135) France, S. P.; Hussain, S.; Hill, A. M.; Hepworth, L. J.; Howard, R. M.; Mulholland, K. R.; Flitsch, S. L.; Turner, N. J. One-Pot Cascade Synthesis of Mono- and Disubstituted Piperidines and Pyrrolidines Using Carboxylic Acid Reductase (CAR), ω -Transaminase (ω -TA), and Imine Reductase (IRED) Biocatalysts. *ACS Catal.* **2016**, *6* (6), 3753–3759.
- (136) Sehl, T.; Hailes, H. C.; Ward, J. M.; Wardenga, R.; von Lieres, E.; Offermann, H.; Westphal, R.; Pohl, M.; Rother, D. Two Steps in One Pot: Enzyme Cascade for the Synthesis of nor(Pseudo)Ephedrine from Inexpensive Starting Materials. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52* (26), 6772–6775.
- (137) Sehl, T.; Hailes, H. C.; Ward, J. M.; Menyes, U.; Pohl, M.; Rother, D. Efficient 2-Step Biocatalytic Strategies for the Synthesis of All nor(Pseudo)Ephedrine Isomers. *Green Chem.* **2014**, *16* (6), 3341–3348.
- (138) Lichman, B. R.; Lamming, E. D.; Pesnot, T.; Smith, J. M.; Hailes, H. C.; Ward, J. M. One-Pot Triangular Chemoenzymatic Cascades for the Syntheses of Chiral Alkaloids from Dopamine. *Green Chem.* **2015**, *17* (2), 852–855.
- (139) Paddon, C. J.; Westfall, P. J.; Pitera, D. J.; Benjamin, K.; Fisher, K.; McPhee, D.; Leavell, M. D.; Tai, A.; Main, A.; Eng, D.; et al. High-Level Semi-Synthetic Production of the Potent Antimalarial Artemisinin. *Nature* **2013**, *496* (7446), 528–532.
- (140) Czajka, J.; Wang, Q.; Wang, Y.; Tang, Y. J. Synthetic Biology for Manufacturing Chemicals: Constraints Drive the Use of Non-Conventional Microbial Platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101* (20), 7427–7434.
- (141) Zhao, H. *Synthetic Biology: Tools and Applications*; 2013.
- (142) Bornscheuer, U. T. The First Artificial Cell - A Revolutionary Step in Synthetic Biology? *Angew Chem Int Ed.* **2010**, *9999* (2), NA.
- (143) Eriksen, D. T.; Li, S.; Zhao, H. *Pathway Engineering as an Enabling Synthetic Biology Tool*, First Edit.; Elsevier Inc., 2013.
- (144) Cleto, S.; Jensen, J. V. K.; Wendisch, V. F.; Lu, T. K. Corynebacterium Glutamicum Metabolic Engineering with CRISPR Interference (CRISPRi). *ACS Synth. Biol.* **2016**, *5* (5), 375–385.
- (145) Zhu, X.; Zhao, D.; Qiu, H.; Fan, F.; Man, S.; Bi, C.; Zhang, X. The CRISPR/Cas9-Facilitated Multiplex Pathway Optimization (CFPO) Technique and Its Application to Improve the Escherichia Coli Xylose Utilization Pathway. *Metab. Eng.* **2017**, *43*, 37–45.
- (146) Davids, T.; Schmidt, M.; Böttcher, D.; Bornscheuer, U. T. Strategies for the Discovery and Engineering of Enzymes for Biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17* (2), 215–220.
- (147) Weiß, M. S.; Pavlidis, I. V.; Spurr, P.; Hanlon, S. P.; Wirz, B.; Iding, H.; Bornscheuer, U. T. Protein-Engineering of an Amine Transaminase for the Stereoselective Synthesis of a Pharmaceutically Relevant Bicyclic Amine. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (43), 10249–10254.
- (148) Pavlidis, I. V.; Weiß, M. S.; Genz, M.; Spurr, P.; Hanlon, S. P.; Wirz, B.; Iding, H.; Bornscheuer, U. T. Identification of (S)-Selective Transaminases for the Asymmetric Synthesis of Bulky Chiral Amines. *Nat. Chem.* **2016**, *8* (11), 1076–1082.
- (149) Weiß, M. S.; Pavlidis, I. V.; Spurr, P.; Hanlon, S. P.; Wirz, B.; Iding, H.;

- Bornscheuer, U. T. Amine Transaminase Engineering for Spatially Bulky Substrate Acceptance. *ChemBioChem* **2017**, *18*(11), 1022–1026.
- (150) Prier, C. K.; Zhang, R. K.; Buller, A. R.; Brinkmann-Chen, S.; Arnold, F. H. Enantioselective, Intermolecular Benzylic C-H Amination Catalysed by an Engineered Iron-Haem Enzyme. *Nat. Chem.* **2017**, *9*(7), 629–634.
- (151) Hammer, S. C.; Knight, A. M.; Arnold, F. H. Design and Evolution of Enzymes for Non-Natural Chemistry. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2017**, *7*, 23–30.
- (152) Yim, H.; Haselbeck, R.; Niu, W.; Pujol-Baxley, C.; Burgard, A.; Boldt, J.; Khandurina, J.; Trawick, J. D.; Osterhout, R. E.; Stephen, R.; et al. Metabolic Engineering of Escherichia Coli for Direct Production of 1,4-Butanediol. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*(7), 445–452.
- (153) Xue, Z.; Sharpe, P. L.; Hong, S.-P.; Yadav, N. S.; Xie, D.; Short, D. R.; Damude, H. G.; Rupert, R. A.; Seip, J. E.; Wang, J.; et al. Production of Omega-3 Eicosapentaenoic Acid by Metabolic Engineering of Yarrowia Lipolytica. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*(8), 734–740.
- (154) Lapaz, M. I.; Huguet-Tapia, J. C.; Siri, M. I.; Verdier, E.; Loria, R.; Pianzola, M. J. Genotypic and Phenotypic Characterization of Streptomyces Species Causing Potato Common Scab in Uruguay. *Plant Dis.* **2017**, *101*(8), 1362–1372.
- (155) Matuschek, M.; Wallwey, C.; Xie, X.; Li, S.-M. New Insights into Ergot Alkaloid Biosynthesis in Claviceps Purpurea: An Agroclavine Synthase EasG Catalyses, via a Non-Enzymatic Adduct with Reduced Glutathione, the Conversion of Chanoclavine-I Aldehyde to Agroclavine. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*(11), 4328.
- (156) Matuschek, M.; Wallwey, C.; Wollinsky, B.; Xie, X.; Li, S.-M. In Vitro Conversion of Chanoclavine-I Aldehyde to the Stereoisomers Festuclavine and Pyroclavine Controlled by the Second Reduction Step. *RSC Adv.* **2012**, *2*(9), 3662.
- (157) Van Den Ent, F.; Löwe, J. RF Cloning: A Restriction-Free Method for Inserting Target Genes into Plasmids. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2006**, *67*(1), 67–74.
- (158) Unger, T.; Jacobovitch, Y.; Dantes, A.; Bernheim, R.; Peleg, Y. Applications of the Restriction Free (RF) Cloning Procedure for Molecular Manipulations and Protein Expression. *J. Struct. Biol.* **2010**, *172*(1), 34–44.
- (159) Meneely, K. M.; Lamb, A. L. Two Structures of a Thiazolinylnyl Imine Reductase from Yersinia Enterocolitica Provide Insight into Catalysis and Binding to the Nonribosomal Peptide Synthetase Module of HMWP1. *Biochemistry* **2012**, *51*(44), 9002–9013.
- (160) Studier, F. W. Protein Production by Auto-Induction in High Density Shaking Cultures. *Protein Expr. Purif.* **2005**, *41*(1), 207–234.
- (161) Meneely, K. M.; Ronnebaum, T. A.; Riley, A. P.; Prisinzano, T. E.; Lamb, A. L. Holo Structure and Steady State Kinetics of the Thiazolinylnyl Imine Reductases for Siderophore Biosynthesis. *Biochemistry* **2016**, *55*(38), 5423–5433.
- (162) Ostell, J.; McEntyre, J. The NCBI Handbook. *NCBI Bookshelf* **2007**, No. Md, 1–8.
- (163) Carver, T.; Harris, S. R.; Berriman, M.; Parkhill, J.; McQuillan, J. A. Artemis: An Integrated Platform for Visualization and Analysis of High-Throughput Sequence-Based Experimental Data. *Bioinformatics* **2012**, *28*(4), 464–469.
- (164) Clay, D.; Koszelewski, D.; Grischek, B.; Gross, J.; Lavandera, I.; Kroutil, W. Tetrahedron : Asymmetry Testing of Microorganisms for x-Transaminase Activity. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*(16), 2005–2009.

- (165) Baud, D.; Jeffries, J. W. E.; Moody, T. S.; Ward, J. M.; Hailes, H. C. A Metagenomics Approach for New Biocatalyst Discovery: Application to Transaminases and the Synthesis of Allylic Amines. *Green Chem.* **2017**, *19*(4), 1134–1143.
- (166) Höhne, M.; Schätzle, S.; Jochens, H.; Robins, K.; Bornscheuer, U. T. Rational Assignment of Key Motifs for Function Guides in Silico Enzyme Identification. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*(11), 807–813.
- (167) Sugio, S.; Petsko, G. A.; Manning, J. M.; Soda, K.; Ringe, D. Crystal Structure of a D-Amino Acid Aminotransferase: How the Protein Controls Stereoselectivity. *Biochemistry* **1995**, *34*(30), 9661–9669.
- (168) Acid, A.; Okada, K.; Hirotsu, K.; Sato, M.; Hayashi, H. Three-Dimensional Structure of Escherichia Coli Branched-Chain. **1997**, *121*(4), 637–641.
- (169) Łyskowski, A.; Gruber, C.; Steinkellner, G.; Schürmann, M.; Schwab, H.; Gruber, K.; Steiner, K. Crystal Structure of an (R)-Selective ω -Transaminase from Aspergillus Terreus. *PLoS One* **2014**, *9*(1), e87350.
- (170) Sayer, C.; Martinez-torres, R. J.; Richter, N.; Isupov, M. N.; Helen, C.; Littlechild, J. A.; Ward, J. M. The Substrate Specificity, Enantioselectivity and Structure of the (R)-Selective Amine : Pyruvate Transaminase from Nectria Haematococca. **2014**, *281*, 2240–2253.
- (171) Waterhouse, A. M.; Procter, J. B.; Martin, D. M. A.; Clamp, M.; Barton, G. J. Jalview Version 2-A Multiple Sequence Alignment Editor and Analysis Workbench. *Bioinformatics* **2009**, *25*(9), 1189–1191.
- (172) Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; et al. Fast, Scalable Generation of High-Quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*(539).
- (173) Guan, L.-J.; Ohtsuka, J.; Okai, M.; Miyakawa, T.; Mase, T.; Zhi, Y.; Hou, F.; Ito, N.; Iwasaki, A.; Yasohara, Y.; et al. A New Target Region for Changing the Substrate Specificity of Amine Transaminases. *Sci. Rep.* **2015**, *5*(1), 10753.
- (174) O'Reilly, E.; Iglesias, C.; Ghislieri, D.; Hopwood, J.; Galman, J. L.; Lloyd, R. C.; Turner, N. J. A Regio- and Stereoselective ω -Transaminase/Monoamine Oxidase Cascade for the Synthesis of Chiral 2,5-Disubstituted Pyrrolidines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2447–2450.
- (175) Green, A. P.; Turner, N. J.; O'Reilly, E. Chiral Amine Synthesis Using ω -Transaminases: An Amine Donor That Displaces Equilibria and Enables High-Throughput Screening. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*(40), 10714–10717.
- (176) Gomm, A.; Lewis, W.; Green, A. P.; O'Reilly, E. A New Generation of Smart Amine Donors for Transaminase-Mediated Biotransformations. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22*(36), 12692–12695.
- (177) Jiang, J.; Chen, X.; Zhang, D.; Wu, Q.; Zhu, D. Characterization of (R)-Selective Amine Transaminases Identified by in Silico Motif Sequence Blast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*(6), 2613–2621.
- (178) Iwasaki, A.; Matsumoto, K.; Hasegawa, J. A Novel Transaminase, (R)-Amine : Pyruvate Aminotransferase, from Arthrobacter Sp. KNK168 (FERM BP-5228): Purification, Characterization, and Gene Cloning. **2012**, *168*, 1563–1573.
- (179) Cerioli, L.; Planchestainer, M.; Cassidy, J.; Tessaro, D.; Paradisi, F. Characterization of a Novel Amine Transaminase from Halomonas Elongata. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2015**, *120*, 141–150.

- (180) Krieger, E.; Vriend, G. YASARA View - Molecular Graphics for All Devices - from Smartphones to Workstations. *Bioinformatics* **2014**, *30* (20), 2981–2982.
- (181) Thomsen, M.; Skalden, L.; Palm, G. J.; Höhne, M.; Bornscheuer, U. T.; Hinrichs, W. Crystallographic Characterization of the (R)-Selective Amine Transaminase from *Aspergillus Fumigatus*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2014**, *70* (4), 1086–1093.
- (182) Jones, D. T. Protein Secondary Structure Prediction Based on Position-Specific Scoring Matrices. *J. Mol. Biol.* **1999**, *292*, 195–202.
- (183) Guan, L. J.; Ohtsuka, J.; Okai, M.; Miyakawa, T.; Mase, T.; Zhi, Y.; Hou, F.; Ito, N.; Iwasaki, A.; Yasohara, Y.; et al. A New Target Region for Changing the Substrate Specificity of Amine Transaminases. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–14.
- (184) Mutti, F. G.; Fuchs, C. S.; Pressnitz, D.; Sattler, J. H.; Kroutil, W. Stereoselectivity of Four (R)-Selective Transaminases for the Asymmetric Amination of Ketones. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353* (17), 3227–3233.
- (185) Schätzle, S.; Steffen-Munsberg, F.; Thontowi, A.; Höhne, M.; Robins, K.; Bornscheuer, U. T. Enzymatic Asymmetric Synthesis of Enantiomerically Pure Aliphatic, Aromatic and Arylaliphatic Amines with (R)-Selective Amine Transaminases. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353* (13), 2439–2445.
- (186) Paul, C. E.; Busto, E.; Gotor-ferna, V.; Gotor, V.; Garc, S.; Mendiola, J.; Frutos, O. De. Transaminases Applied to the Synthesis of High Added-Value Enantiopure Amines. *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*.
- (187) Iwasaki, A.; Yamada, Y.; Ikenaka, Y.; Hasegawa, J. Microbial Synthesis of (R)- and (S)-3,4-Dimethoxyamphetamines through Stereoselective Transamination. *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25* (21), 1843–1846.
- (188) Savile, C., Mundorff, E., Moore, J. C., Devine, P. N. & Janey, J. M. Transaminase Biocatalysts. WO 2010/099501, 2010.
- (189) Genz, M.; Melse, O.; Schmidt, S.; Vickers, C.; Dörr, M.; van den Bergh, T.; Joosten, H. J.; Bornscheuer, U. T. Engineering the Amine Transaminase from *Vibrio Fluvialis* towards Branched-Chain Substrates. *ChemCatChem* **2016**, *8* (20), 3199–3202.
- (190) Nobili, A.; Steffen-Munsberg, F.; Kohls, H.; Trentin, I.; Schulzke, C.; Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. Engineering the Active Site of the Amine Transaminase from *Vibrio Fluvialis* for the Asymmetric Synthesis of Aryl-Alkyl Amines and Amino Alcohols. *ChemCatChem* **2015**, *7* (5), 757–760.
- (191) Steffen-Munsberg, F.; Vickers, C.; Kohls, H.; Land, H.; Mallin, H.; Nobili, A.; Skalden, L.; van den Bergh, T.; Joosten, H. J.; Berglund, P.; et al. Bioinformatic Analysis of a PLP-Dependent Enzyme Superfamily Suitable for Biocatalytic Applications. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33* (5), 566–604.
- (192) Schwab, H.; Gruber, K.; Steiner, K. Crystal Structure of an (R) -Selective v - Transaminase from *Aspergillus Terreus*. **2014**, *9* (1).
- (193) Hirotsu, K. E. N.; Goto, M.; Okamoto, A.; Miyahara, I. Dual Substrate Recognition Of. **2005**, *5*, 160–172.
- (194) Steffen-Munsberg, F.; Vickers, C.; Thontowi, A.; Schätzle, S.; Meinhardt, T.; SvedendahlHumble, M.; Land, H.; Berglund, P.; Bornscheuer, U. T.; Höhne, M. Revealing the Structural Basis of Promiscuous Amine Transaminase Activity. *ChemCatChem* **2013**, *5* (1), 154–157.
- (195) Humble, M. S.; Cassimjee, K. E.; Håkansson, M.; Kimbung, Y. R.; Walse, B.; Abedi,

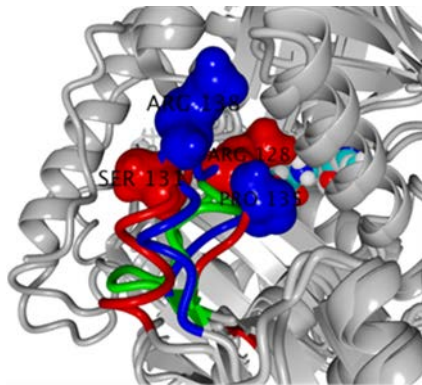
- V.; Federsel, H. J.; Berglund, P.; Logan, D. T. Crystal Structures of the Chromobacterium Violaceum ω -Transaminase Reveal Major Structural Rearrangements upon Binding of Coenzyme PLP. *FEBS J.* **2012**, *279*(5), 779–792.
- (196) Midelfort, K. S.; Kumar, R.; Han, S.; Karmilowicz, M. J.; McConnell, K.; Gehlhaar, D. K.; Mistry, A.; Chang, J. S.; Anderson, M.; Villalobos, A.; et al. Redesigning and Characterizing the Substrate Specificity and Activity of Vibrio Fluvialis Aminotransferase for the Synthesis of Imagabalin. *Protein Eng. Des. Sel.* **2013**, *26*(1), 25–33.
- (197) Sayer, C.; Isupov, M. N.; Westlake, A.; Littlechild, J. a. Structural Studies of Pseudomonas and Chromobacterium ω -Aminotransferases Provide Insights into Their Differing Substrate Specificity. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2013**, *69*(Pt 4), 564–576.
- (198) Park, E. S.; Dong, J. Y.; Shin, J. S. Active Site Model of (R)-Selective ω -Transaminase and Its Application to the Production of d-Amino Acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*(2), 651–660.
- (199) Huang, J.; Xie, D. F.; Feng, Y. Engineering Thermostable (R)-Selective Amine Transaminase from Aspergillus Terreus through in Silico Design Employing B-Factor and Folding Free Energy Calculations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *483*(1), 397–402.
- (200) Skalden, L.; Thomsen, M.; Höhne, M.; Bornscheuer, U. T.; Hinrichs, W. Structural and Biochemical Characterization of the Dual Substrate Recognition of the (R)-Selective Amine Transaminase from Aspergillus Fumigatus. *FEBS J.* **2015**, *282*(2), 407–415.
- (201) Schätzle, S.; Höhne, M.; Redestad, E.; Robins, K.; Bornscheuer, U. T. Rapid and Sensitive Kinetic Assay for Characterization of ω -Transaminases. *Anal. Chem.* **2009**, *81*(19), 8244–8248.
- (202) Brenneman, J. B.; Martin, S. F. Application of Intramolecular Enyne Metathesis to the Synthesis of Aza[4.2.1]Bicyclics: Enantiospecific Total Synthesis of (+)-Anatoxin-A. *Org. Lett.* **2004**, *6*(8), 1329–1331.
- (203) Hanessian, S.; Bayrakdarian, M.; Luo, X. Total Synthesis of A-315675: A Potent Inhibitor of Influenza Neuraminidase. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(17), 4716–4721.
- (204) Xu, G. C.; Yu, H. L.; Zhang, X. Y.; Xu, J. H. Access to Optically Active Aryl Halohydrins Using a Substrate-Tolerant Carbonyl Reductase Discovered from Kluyveromyces Thermotolerans. *ACS Catal.* **2012**, *2*(12), 2566–2571.
- (205) Aggarwal, V. K.; Astle, C. J.; Rogers-Evans, M. A Concise Asymmetric Route to the Bridged Bicyclic Tropane Alkaloid Ferruginine Using Enyne Ring-Closing Metathesis. *Org. Lett.* **2004**, *6*(9), 1469–1471.
- (206) Zhang, S.; Xu, L.; Miao, L.; Shu, H.; Trudell, M. L. General Strategy for the Construction of Enantiopure Pyrrolidine-Based Alkaloids . Total Synthesis of (-)-Monomorine Alkaloids 2 . In Lieu of These Structural Similarities , It Was of Interest to Develop a General and Enantioselective Synthetic Method. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3133–3136.
- (207) Goti, A.; Cicchi, S.; Mannucci, V.; Cardona, F.; Guarna, F.; Merino, P.; Tejero, T. Iterative Organometallic Addition to Chiral Hydroxylated Cyclic Nitrones: Highly Stereoselective Syntheses of α, α' - and α, α -Substituted Hydroxypyrrolidines. *Org. Lett.* **2003**, *5*(22), 4235–4238.
- (208) Trost, B. M.; Horne, D. B.; Woltering, M. J. Palladium-Catalyzed DYKAT of Vinyl

- Epoxides: Enantioselective Total Synthesis and Assignment of the Configuration of (+)-Broussonetine G. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42* (48), 5987–5990.
- (209) Severino, E. A.; Correia, C. R. D. Heck Arylation of Endocyclic Enecarbamates with Diazonium Salts. Improvements and a Concise Enantioselective Synthesis of (-)-Codonopsinine. *Org. Lett.* **2000**, *2* (20), 3039–3042.
- (210) Davis, F. A.; Song, M.; Augustine, A. Asymmetric Synthesis of Trans-2,5-Disubstituted Pyrrolidines from Enantiopure Homoallylic Amines. Synthesis of Pyrrolidine (-)-197B. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (7), 2779–2786.
- (211) Lemen, G. S.; Wolfe, J. P. Pd-Catalyzed Carboamination of Oxazolidin-2-Ones: A Stereoselective Route to Trans -2,5-Disubstituted Pyrrolidines. *Org. Lett.* **2010**, *12* (10), 2322–2325.
- (212) Campos, K. R.; Klapars, A.; Waldman, J. H.; Dormer, P. G.; Chen, C. Enantioselective, Palladium-Catalyzed Alpha-Arylation of N-Boc-Pyrrolidine. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (11), 3538–3539.
- (213) Davis, F. A.; Zhang, J.; Qiu, H.; Wu, Y. Asymmetric Synthesis of Cis- and Trans-2,5-Disubstituted Pyrrolidines from 3-Oxo Pyrrolidine 2-Phosphonates: Synthesis of (+)-Preussin and Analogs. *Org. Lett.* **2008**, *10* (7), 1433–1436.
- (214) Wang, H.; Liu, Y.; Li, M.; Huang, H.; Xu, H. M.; Hong, R. J.; Shen, H. Multifunctional TiO₂nanowires-Modified Nanoparticles Bilayer Film for 3D Dye-Sensitized Solar Cells. *Optoelectron. Adv. Mater. Rapid Commun.* **2010**, *4* (8), 1166–1169.
- (215) Harrowven, D. C.; Hannam, J. C. An Application in the Synthesis of (f) -a-Herbertenol. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 9333–9340.
- (216) Simon, R. C.; Grischek, B.; Zepeck, F.; Steinreiber, A.; Belaj, F.; Kroutil, W. Regio- and Stereoselective Monoamination of Diketones without Protecting Groups. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51* (27), 6713–6716.
- (217) Truppo, M. D.; Rozzell, J. D.; Moore, J. C.; Turner, N. J. Rapid Screening and Scale-up of Transaminase Catalysed Reactions. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (2), 395–398.
- (218) Emond, P.; Helfenbein, J.; Chalon, S.; Garreau, L.; Vercouillie, J.; Frangin, Y.; Claude Besnard, J.; Guilloteau, D. Synthesis of Tropane and Nortropine Analogues with Phenyl Substitutions as Serotonin Transporter Ligands. *Bioorganic Med. Chem.* **2001**, *9* (7), 1849–1855.
- (219) McCamley, K.; Ripper, J. A.; Singer, R. D.; Scammells, P. J. Efficient N-Demethylation of Opiate Alkaloids Using a Modified Nonclassical Polonovski Reaction. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (25), 9847–9850.
- (220) Isin, E. M.; Guengerich, F. P. Complex Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2007**, *1770* (3), 314–329.
- (221) Cryle, M. J.; Stok, J. E.; De Voss, J. J. Reactions Catalyzed by Bacterial Cytochromes P 450. *Aust. J. Chem. F. Full J. TitleAustralian J. Chem.* **2003**, *56* (8), 749–762.
- (222) Cha, H. J.; Jeong, J.; Rojviriyaya, C.; Kim, Y. Structure of Putrescine Aminotransferase from Escherichia Coli Provides Insights into the Substrate Specificity among Class III Aminotransferases. **2014**, 1–15.
- (223) Samsonova, N. N.; Smirnov, S. V.; Novikova, A. E.; Ptitsyn, L. R. Identification of Escherichia Coli K12 YdcW Protein as a γ -Aminobutyraldehyde Dehydrogenase. *FEBS Lett.* **2005**, *579* (19), 4107–4112.

- (224) Fesko, K.; Steiner, K.; Breinbauer, R.; Schwab, H.; Schürmann, M.; Strohmeier, G. A. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Investigation of One-Enzyme Systems in the α -Transaminase-Catalyzed Synthesis of Chiral Amines. *Journal Mol. Catal. B, Enzym.* **2013**, *96*, 103–110.
- (225) Sulzenbacher, G.; Alvarez, K.; Van Den Heuvel, R. H. H.; Versluis, C.; Spinelli, S.; Campanacci, V.; Valencia, C.; Cambillau, C.; Eklund, H.; Tegoni, M. Crystal Structure of E. Coli Alcohol Dehydrogenase YqhD: Evidence of a Covalently Modified NADP Coenzyme. *J. Mol. Biol.* **2004**, *342* (2), 489–502.
- (226) Atsumi, S.; Wu, T. Y.; Eckl, E. M.; Hawkins, S. D.; Buelter, T.; Liao, J. C. Engineering the Isobutanol Biosynthetic Pathway in Escherichia Coli by Comparison of Three Aldehyde Reductase/Alcohol Dehydrogenase Genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85* (3), 651–657.
- (227) Jarboe, L. R. YqhD: A Broad-Substrate Range Aldehyde Reductase with Various Applications in Production of Biorenewable Fuels and Chemicals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89* (2), 249–257.
- (228) Costas, A. M. G.; White, A. K.; Metcalf, W. W. Purification and Characterization of a Novel Phosphorus-Oxidizing Enzyme from *Pseudomonas Stutzeri* WM88. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (20), 17429–17436.
- (229) Kragl, U.; Kruse, W.; Hummel, W.; Wandrey, C. Enzyme Engineering Aspects of Biocatalysis: Cofactor Regeneration as Example. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *52* (2), 309–319.
- (230) Slusarczyk, H.; Felber, S.; Kula, M. R.; Pohl, M. Stabilization of NAD-Dependent Formate Dehydrogenase from *Candida Boidinii* by Site-Directed Mutagenesis of Cysteine Residues. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267* (5), 1280–1289.
- (231) Cosgrove, S. C.; Brzezniak, A.; France, S. P.; Ramsden, J. I.; Mangas-Sanchez, J.; Montgomery, S. L.; Heath, R. S.; Turner, N. J. *Imine Reductases, Reductive Aminases, and Amine Oxidases for the Synthesis of Chiral Amines: Discovery, Characterization, and Synthetic Applications*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2018.
- (232) Gao, S.; Su, Y.; Zhao, L.; Li, G.; Zheng, G. Characterization of a (R)-Selective Amine Transaminase from *Fusarium Oxysporum*. *Process Biochem.* **2017**, *63* (September), 130–136.
- (233) Cheng, Y.; Shan, Q.; Zhang, Y.; Quan, Z.; Zhang, K.; Wang, B. ORGANIC CHEMISTRY FRONTIERS ω -Transaminase and an Amino Donor Enabling. **2018**, 1633–1638.
- (234) Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ed.; Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.
- (235) *Methods in Molecular Biology-Electroporation Protocols for Microorganisms*; Nickoloff, J. A., Ed.; Humana Press, 1995.
- (236) Cornish-Bowden, A. Chapter 10 - Estimation of Kinetic Constants. In *Fundamentals of Enzyme Kinetics*; Cornish-Bowden, A., Ed.; Butterworth-Heinemann, 1979; pp 200–211.
- (237) Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research*. September 1997, pp 3389–3402.
- (238) Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence

Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*. November 1994, pp 4673–4680.

- (239) Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; et al. Clustal W and Clustal X Version 2.0. *Bioinformatics* **2007**, *23* (21), 2947–2948.
- (240) Jones, D. T.; Taylor, W. R.; Thornton, J. M. The Rapid Generation of Mutation Data Matrices from Protein Sequences. *Bioinformatics* **1992**, *8* (3), 275–282.
- (241) Felsenstein, J. Phylogenies and the Comparative Method. *Am. Nat.* **1985**, *125* (1), 1–15.
- (242) Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33* (7), 1870–1874.



6. ANEXO

Capítulo 6

6.1. Secuencias aminoacídicas y nucleotídicas

>ENA|AY836771|AY836771.1 Claviceps purpurea ergot alkaloid biosynthetic protein A gene, complete cds.

```
ATGACGGTCTTACTGACAGGAGGGACCGGGAGGACTGCGAAGCACATCGCTGGCATCTTC
CGTCAGACCAATGTTCCCTTTTTTGGTCGCATCGCGTTCACGACGCGCAGGAACAGCTGAA
AACCATCGCAAATTTGATTGGCTGGACGAAGAGACGTTTTCCGAATGCCCTGTCAGTCGAT
CAAGGCATGAAGCCTATTTCCGTGGTCTGGCTATGTCCCTCCGCCACTTTACGACTTGGCC
ACGCCAGTCATCAAATTCATCGACTTTGCCGTATCCCAAAACGTCAAGAAATTTGTTCTG
CTGAGTGCAAGCGTGATACAGAAAGGTGGACCTGCCATGGGAAAAGATTTCATGGGCATTTA
GATTCATCAAGGACGTCACATATACTGTACTGCGACCGACCTGGTTTCATGGGTAAGATG
ATTTGCATGCTTTTTTTTTCTCGCGTCTAGAGGGGGGGGGTGTGTGTGGAATTTGTCGTG
CTTAAATCTGACACGATTCATAGAAAACTTTTCGACTAAAGGTGAAATACAATGTGAAGC
GATCAGGCGTGACAGCACAGTCTACTCCGCTACCGAAAATGGCAAGATTCCGTTTCATTTT
CGTGGTTGACATTGCACGTGTTGCGGCTTGCGCACTCACGGCAGAAAACCTGAAAAACTC
GGACCACATTTCTCAGGGTCCAGACTTGTGACTTACGACGAGGTAAGGAAGTTCAGTGC
GAGTGTGCAAACTCTATAACTGAGACTCCAATGATGGCTGTGATACAGAATCTGAATGA
CCGACACGAAAATTCACGACTAACAAGATAATCGTAGGTGGCACAGGCGCTTACCGGAG
TACTGGGCAGGAAAATCACCCATACGAAAATGACAGAGGGTGAGCTTGCAGAGAAGCTGA
TGGAAGAGGGCGTGACTCCCGAAGAAGCATATATGCATGCTGCAATGGACTCGATGATAA
AGTCAGGGTCCGAGGAAAGGGTGGTTAGTGATGAAGTAAAAGAGTGGACTGGCGTCAAAC
CCCGAGGCTTCATCAATTTGCAATTGAGCGAAAAAGCAGCCTGGCGTGCAAGAAAGTGA
```

Claviceps purpurea ergot alkaloid biosynthetic protein A gene, complete cds.(Optimizada para *E.coli*)

```
CATATGACGGTCTGCTGACGGGTGGCACGGGTCGCACGGCTAAACACATCGCTGGCATCTTTCGTCAA
CCAATGTTCCGTTCTGGTGGCTAGCCGTAGCTCTAGTGCAGGCACCGCTGAAAACCATCGCAAATTTGA
TTGGCTGGACGAAGAAACGTTCCCGAATGCGCTGTCCGTTGATCAGGGTATGAAACCGATTTTCAGTGGTT
TGGCTGTGCCCGCCCGCTGTATGATCTGGCAACCCCGTCAATTAATTTATCGACTTCGCCGTGAGTC
AGAACGTTAAAAAATTTGTCTGTGTCGCATCAGTGATCCAAAAGGCGGTCCGGCTATGGGCAAAAT
TCATGAACACCTGGATTCTATCAAAGACGTGACCTATACGGTTCGCGTCCGACCTGGTTTTATGGAAAAC
TTCAGTACGAAAGGCGAAAATTCATGCGAAGCAATCCGTCGCGATTCTACCGTGTACAGTGTACGGAAA
ATGGTAAAAATTCGTTTCATCTCCGTCGTGGATATTGACAGTGTGTCAGCATGTGCACTGACCGCAGAAAAC
GCTGAAAAATTTGACCACATCCTGCAGGGTCCGGATCTGCTGACCTATGACGAAGTTGCACAAGCCCTG
ACGGGTGTCTGGTTCGTAAAAATTACCCATACGAAAATGACCGAAGGCGAACTGGCCGAAAAACTGATGG
AAGAAGGTGTGACCCCGAAGAAGCATAATGCACGCAGCTATGGATTTCGATGATCAAATCGGGCAGCGA
AGAACGCGTTGTGACGACGAAGTCAAAGCCTGGACCGGTGTGAAACCGCGTGGCTTCATCAACTTTGCC
CTGTCAGAAAAAGCAGCGTGGCGTGCCCGTAAAAGCTT
```

>gi|759291104 R-TA Capronia semiimmersa

```
MTTMEKIFSAVQARVSTLTASRASNPFDGIAVWQGRVTPIHEAQIPMLDQGFLLHSDLT
YDVPSVWDGRFFRLDDHLERLERSCAKMLRLCPLPRAQVRHTLCAMLARSGIRDAFVELIVTRG
LRGVRGLSAAEVDALPNSLYMWIVPYVWVMEPAVQLAGSGSAIVARTVHRTTPVCMPTVKNLQ
WDLTRGMFEANDRGAGYPFLTDRSISEETADANITEGSGFNIVVVKDGLHTPKRGVLEGVTR
ESVFECRRRLGVPYALDTPVRLALEADEIFMCTTAGGIMPITTLDGKPVGDGAVGPITRQIWD
VYWRLHYEDGFSFAVDYEDETGLEGVANGNANGTVSVNGKAH
```

>R-TA Aspergillus terreus NIH2624

MASMDKVFAGYAARQAIILESTETTNPFAKGIAWVEGELVPLAEARIPLLDQGMHSDLT
YDVPSVWDGRFFRLDDHITRLEASCTKLRLRLPLPRDQVKQILVEMVAKSGIRDAFVELIVTRG
LKGVRGTRPEDIVNNLYMFVQPYVWVMEPDMQRVGGSAVVARTVRRVPPGAIDPTVKNLQWGD
VRGMFEAADRGATYPFLTDGDAHLTEGSGFNIVLVKDGVLVTPDRGVLQGVTRKSVINAAEAFG
IEVRVEFVPELAYRCDEIFMCTTAGGIMPITTLDGMPVNGGQIGPITKKIWDGYWAMHYDAA
SFEIDYNERN

>R-TA Penicillium

MATMEKIFAAYHERQKLLAANTHPFAKGVAVVEGELTPLHEARIPILDQGMHSDLT
YDVPSVWDGRFFRLDDHITRLEASCTKLRLMLPLPRDEVKQILVDMVAKSGIRDAFVEIIVTRGLK
GVRGSRPEDIVNRIYMFIQPYVWCMEPEVQPVGGSAAIARTVRRVPPGCIDPTVKNLQWGD
LVRGLFEASDRGAEYFPLTDGDTNLTEGSGFNIVLVKDNILYTPARGVLEGVTRKSVIDVARASG
FDIKVELVPVQMAFDADEIFMCTTAGGIMPITSLDGKPVNDGKVGSVTKKIWDGYWAIHYDPAYS
FEIAY

>4UUG:A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE

MASMDKVFSGYYARQKLLERSDNPFSGKIAYVEGKLVLPDARIPLLDQGMHSDLT
YDVPSVWDGRFFRLDDHLQRILESCDKMRLKFPALSSVKNILAEMVAKSGIRDAFVEIIVTRGLT
GVRGSKPEDLYNNNIYLLVLPYIWMAPENQLHGGEAIITRTVRRTPPGAFDPTIKNLQWGD
LTKGLFEAMDRGATYPFLTDGDTNLTEGSGFNIVLVKNGIITYTPDRGVLRGITRKSVIDVARANSI
DIRLEVVPVEQAYHSDEIFMCTTAGGIMPITLLDGQPVNDGQVGPITKKIWDGYWEMHYNPAYS
FPVDYGS GSGSHHHHHH

>4CMD Nectria R-TA

MATMDKVFAGYAERQAVLEASKNPLAKGVAWIQGELVPLHEARIPLLDQGMHSDLT
YDVPSVWDGRFFRLEDHLNRLEASCKMRLRMPLPREEVIKTLVDMVAKSGIRDAFVELIVTRGLT
GVRGAKPEELLNNNLYMFIQPYVWMDPDVQYTGGRAIVARTVRRVPPGSIDPTIKNLQWGD
LVRGLFEANDRGATYPFLTDGDANLTEGSGFNIVLVKDGVLVTPDRGVLQGITRKSVIDAARSCGY
EIRVEHVPIEATYQADEILMCTTAGGIMPITLLDDKPKVDGKVGPIITKAIWDRYWAMHWEDEF
SFKINYLE

>3WWI:A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE

MAFSADTSEIVYTHDTGLDYITYSDYELDPANPLAGGAAWIEGAFVPPSEARISIFDQ
G YLHSDVTYTVFHVWNGNAFRLLDHIERLFSNAESMRIIPPLTQDEVKEIALELVAKTELREAFV
SVSITRGYSSTPFERDITKHRPQVYMYAVPYQWIVPFDRIRDGVHAMVAQSVRRTPRSSIDPQV
KNFQWGD LIRAVQETHDRGF EAPLLLDG DGLLAEGSGFNVVV KDG VVRSPGRAALPGITRKT
V LEIAESLGHEAILADITLAE LLD ADEV LGCTTAGGVWPFVSV DGNPISDGVPGPITQSIIRRYW
ELNVESSSL LTPVQY

>XP_001261640.1 Aspergillus fischeri NRRL 181 R-TA

MASMDKVFSGYHARQKLLERSDNPFSGKIAYVEGKLVLPDARIPLLDEGFMHGDLTYD
VTTVWDGRFFRLDDHMQRILESCDKMRLKFPLAPSTVKNILAEMVAKSGIRDAFVEVIVTRGLT
GVRGSKPEDLYNNNIYLLVLPYVWVMAPENQLLGGSAIITRTVRRTPPGAFDPTIKNLQWGDLT
KGLFEAMDRGATYPFLTDGDTNLTEGSGFNIVLVKNGIIYTPDRGVLRGITRKSVIDVARANNI
DIRLEVVPVEQVYHSDEIFMCTTAGGIMPITLLDGQPVNDGQVGPITKKIWDGYWEMHYNPAYS
FPVDYGSG

**>WP_011781668.1 MULTISPECIES: aminotransferase IV
[Mycolicibacterium]**

MGIDTGTSNLVAVEPGAIREDTPAGSVIQYSDYEIDYSSPFAGGVAWIEGEYLPAEDAK
ISIFDTGFGHSDLTYTVAHVWHGNIFRLGDHLDRLLDGARKLRLDSGYTKDELADITKKCVSLS
QLRESFVNLTITRGYGKRKGEKDLSKLT HQVYIYAIPYLWAFPPAEQIFGTTAVVPRHVRRAGR
NTVDPTIKNYQWGLTAASFEAKDRGARTAILMDADNCVAEGPGFNVCIVKDGKLASPSRNALP
GITRKT VFEIAGAMGIEAALRDVTSHELYDADEIMAVTTAGGVTPINTLDGVP IGDGEPGPVTV
AIRDRFWALMDEPGPLIEAIQY

**>EWZ43325.1 hypothetical protein FOZG_08024 [Fusarium
oxysporum Fo47]**

MATMQEIFKGFEEERQAKLVEDGLKNPLAHGAALIEGQITPLLDAKIPVLDQGF LHSDLT
YDVPVAVWDGKLF RFNDHLDRLE RSCAKLRLKPPMSRNEIEQATINLISKSGIRDAYVQIIVTRG
FRFVREPLPTSDAPENHFIIYLVPYI WVMPPQM QPVGGEAVVTRTVRRIPPGAIDPTIKNLQW
GDLIRGLLEAQDRGSQYPFLTDGDGNITEGAGYNIVFVKDGALYTAKKGVLEGITRQSVFDVAE
KAKILVYLDDVPASLAYVADEIFLCTTAGGIMPITKLDGESKGEVGPITKLIWDGYWAMHYDPR
YTTKISYEP

>3WWH R-TA Arthrobacter sp.

MAFSADTSEIVYTHDTGLDYITYSDYELDPANPLAGGAAWIEGAFVPPSEARISIFDQG
YLHSDVTYTVFHVWNGNAFRLDDHIERLFSNAESMRIIPPLTQDEVKEIALELVAKTELREAFV
SVSITRGYSSTPGERDITKHRPQVYMYAVPYQWIVPFDRIRDGVHAMVAQSVRRTPRSSIDPQV
KNFQWGLIRAVQETHDRGF EAPLLLDGDGLLAEGSGFNVVV IKDGVVRS PGRAALPGITRKT V
LEIAESLGHEAILADITLAE LLDADEV LGCTTAGGVWPFVSV DGNPISDGVPGPITQSIIRRYW
ELNVESSLLTPVQY

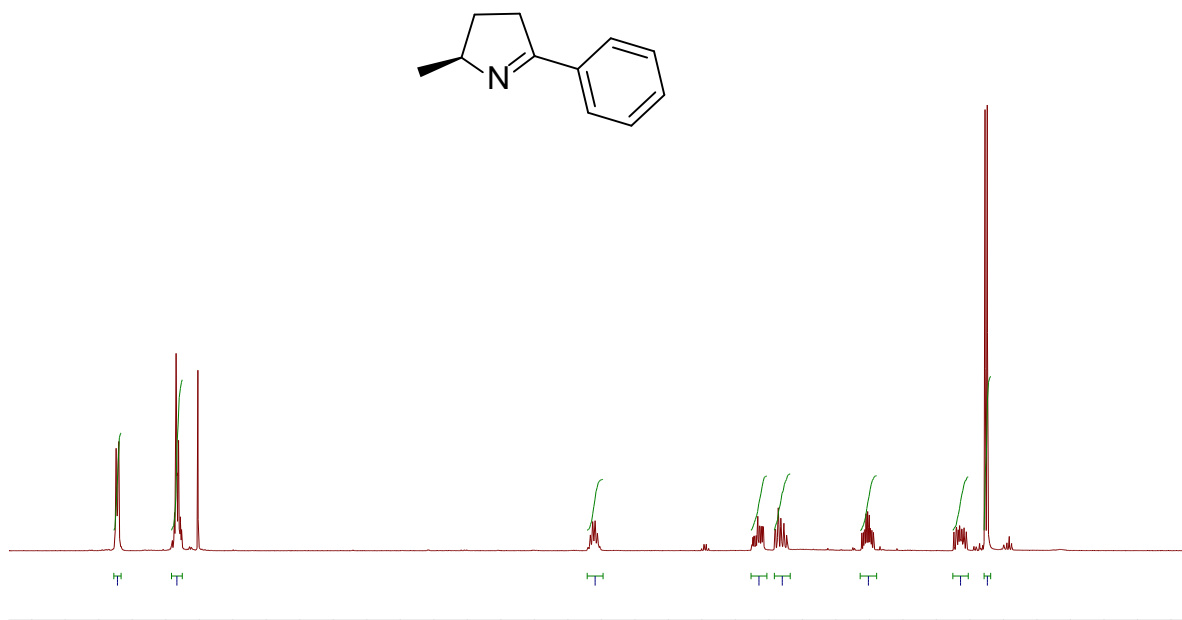
>3WWJ ATA-117-Rd11 Sitagliptin

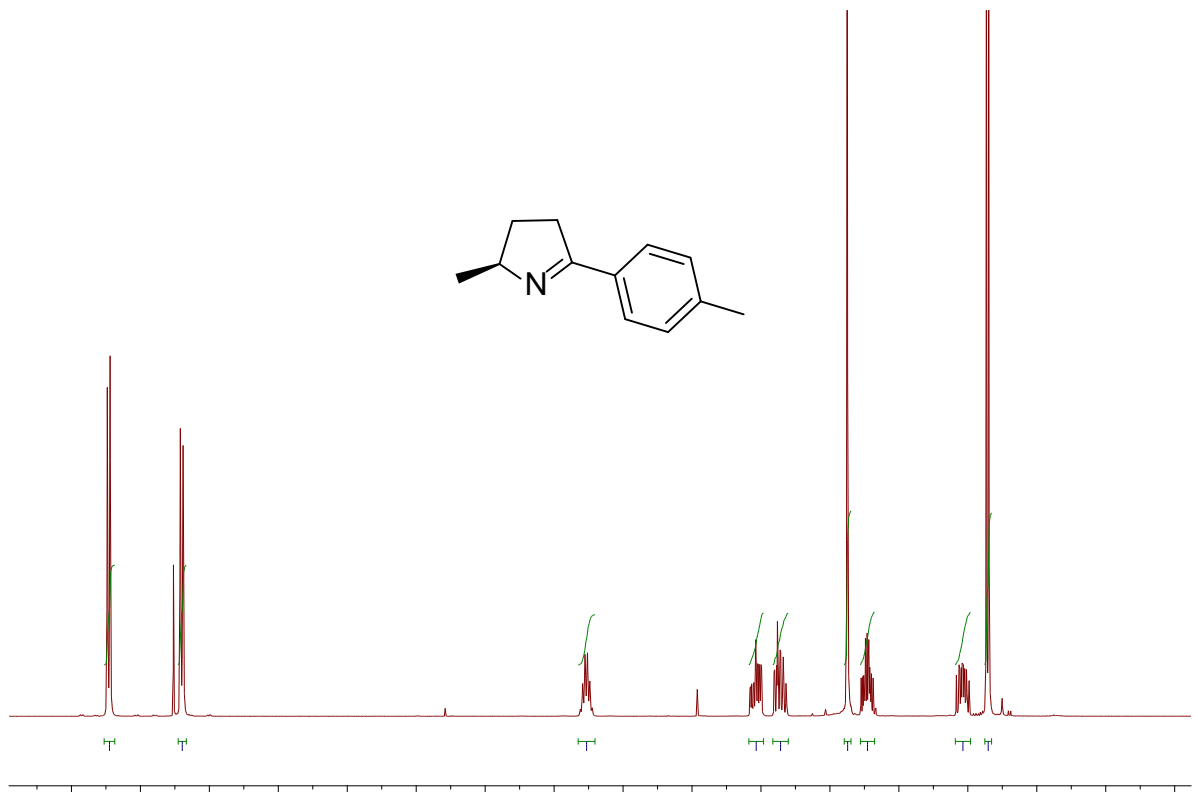
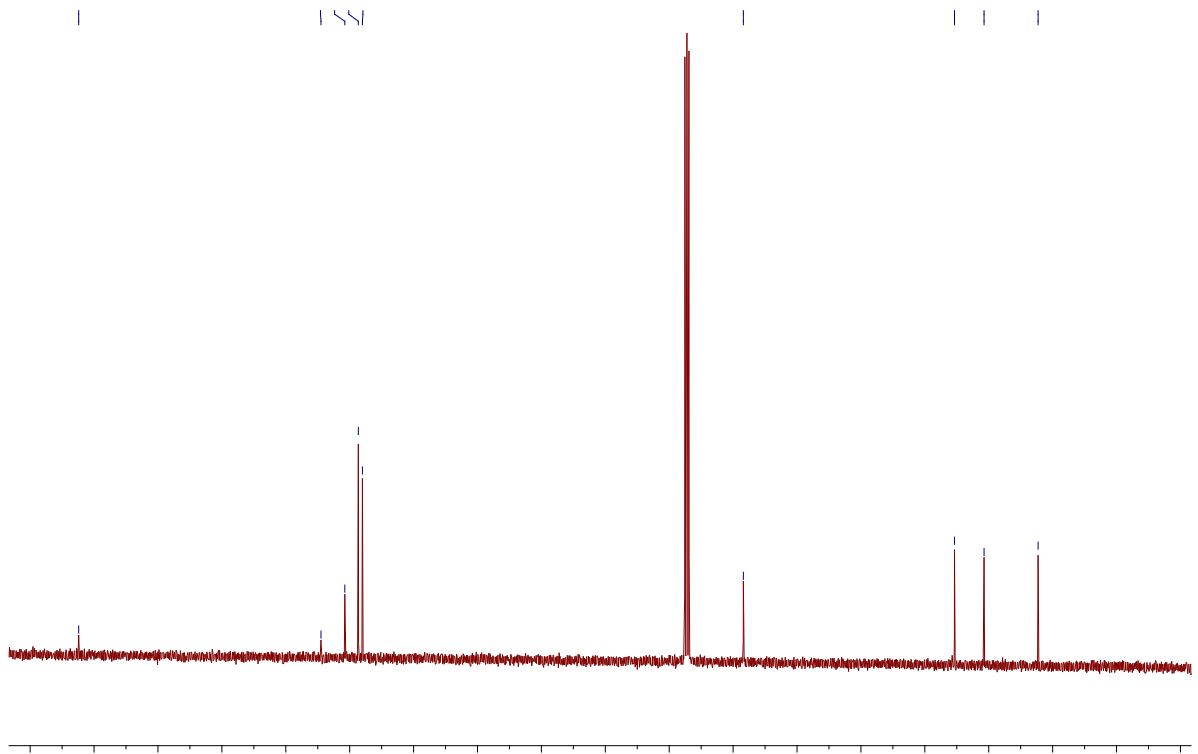
MAFSADTPEIVYTHDTGLDYITYSDYELDPANPLAGGAAWIEGAFVPPSEARISIFDQG
FYTSDATYTTFFHVWNGNAFRLGDHIERLFSNAESIRLIPPLTQDEVKEIALELVAKTELREAMV
TVTITRGYSSTPFERDITKHRPQVYMSACPYQWIVPFDRIRDGVHLMVAQSVRRTPRSSIDPQV
KNFQWGLIRAIQETHDRGFELPLLLDCDNLLAEGPGFNVVVVKDGVVRSPPGRAALPGITRKT
LEIAESLGHEAILADITPAELYDADEVLCSTGGGVWPFVSVDGNSISDGVPGPVTQSIIRRYW
ELNVEPSSLLTPVQY

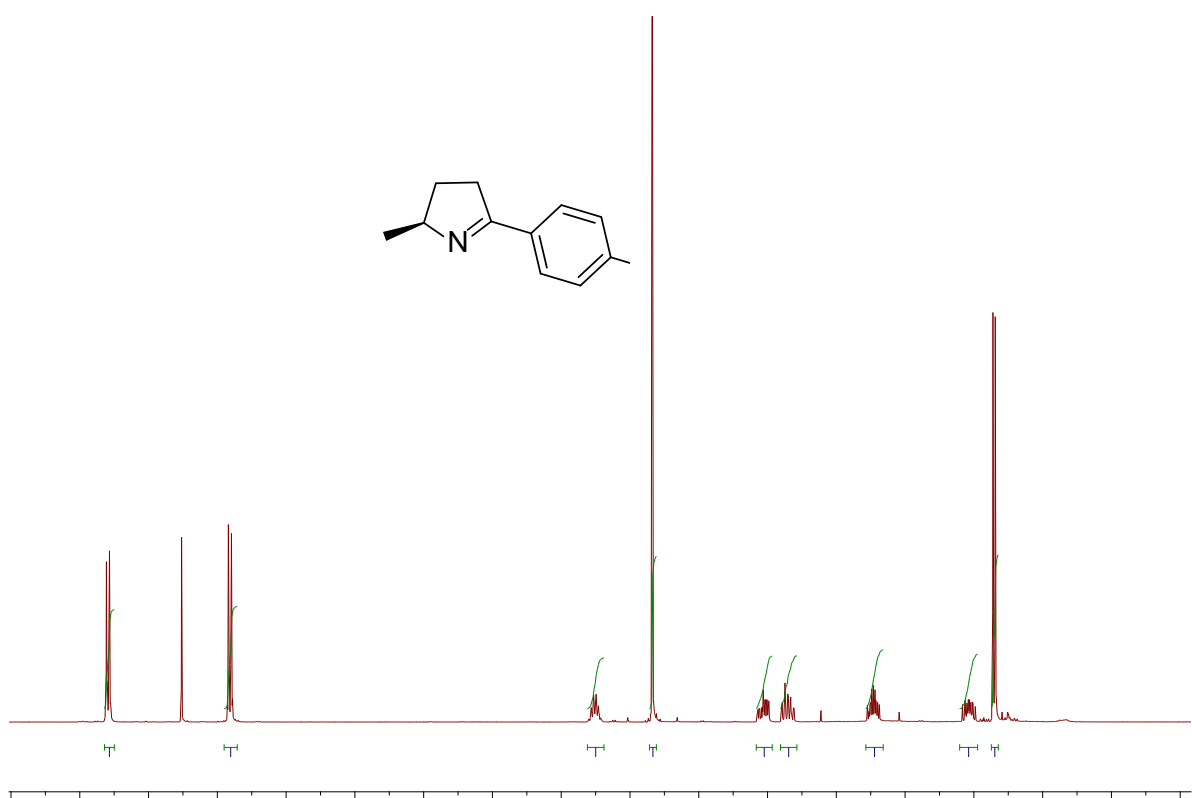
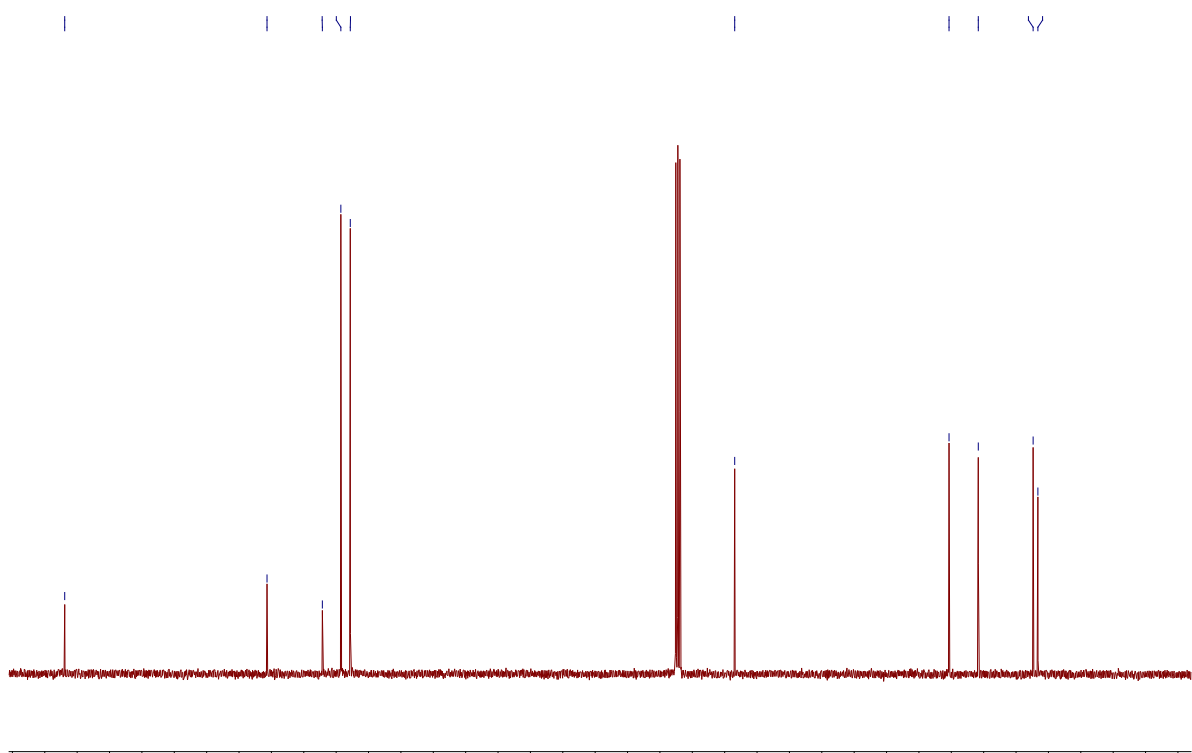
>XP_001818566.1 hypothetical protein [Aspergillus oryzae RIB40]

MTSMNKVFSGYERKARLDNSDNRFAKGIAYVQGSFVPLADARVPLLDEGFMHSDLTYD
VPSVWDGRFFRLDDHLSRLEDSCEKMRLKIPLSRDEVKQTLREMVAKSGIEDAFVELIVTRGLK
GVRGNKPEDLFDNHLYLIVMPYVWVMEPAIQHTGGTAI IARTVRRTPPGAFDPTIKNLQWGLT
RGLFEAADRGADYPFLSDGDTNLTEGSGFNIVLVKDGI IYTPDRGVLEGITRKSVDIAQVKNI
EVRVQVVPLEHAYHADEIFMCTTAGGIMPITKLDGKPIRNGEVGPLTTKIWDEYWAMHYDPKYS
SAIDYRGHEGN

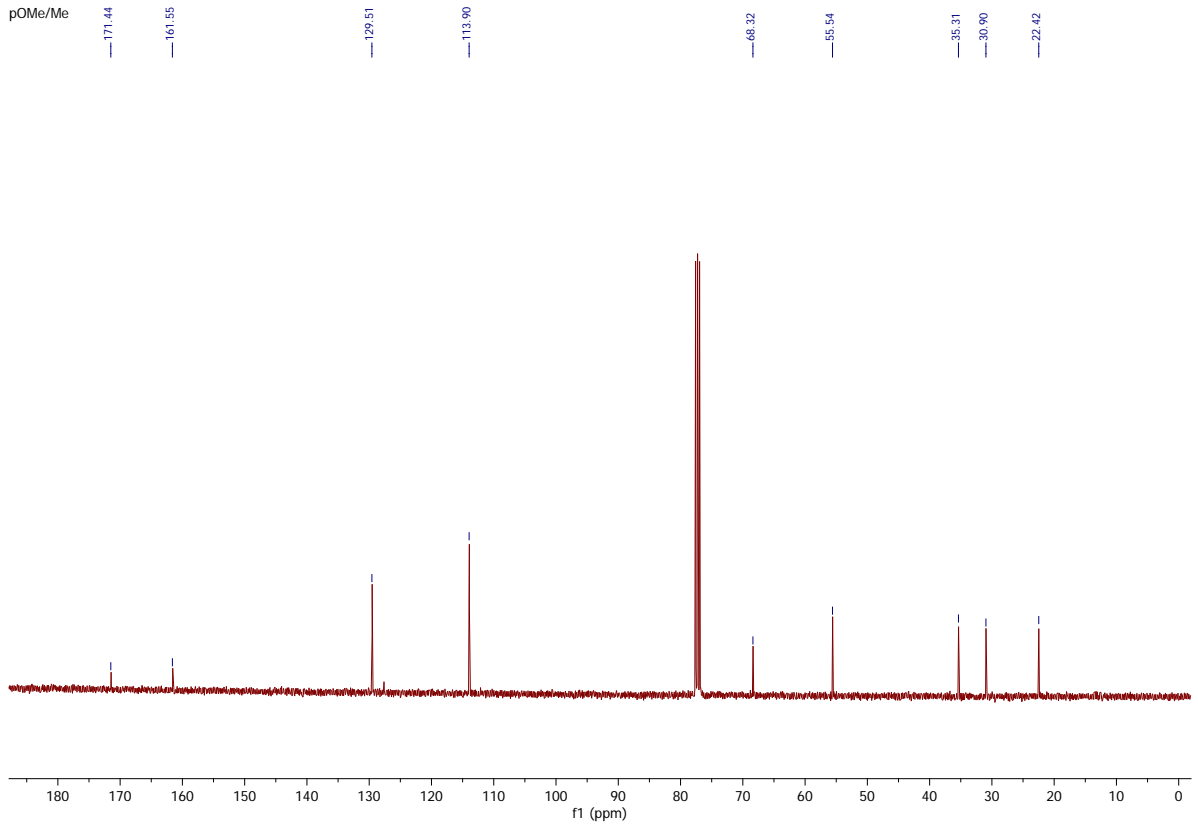
6.2. Espectros RMN y GC Capitulo 2.4



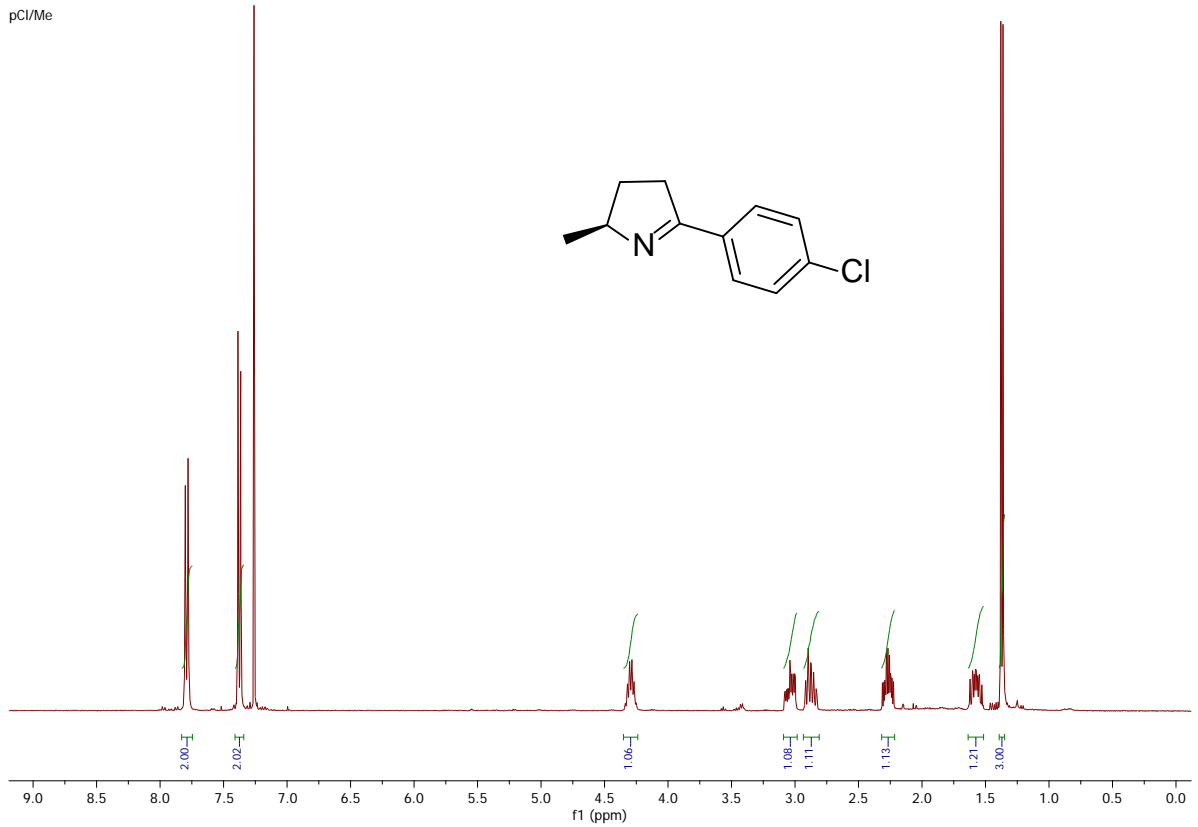


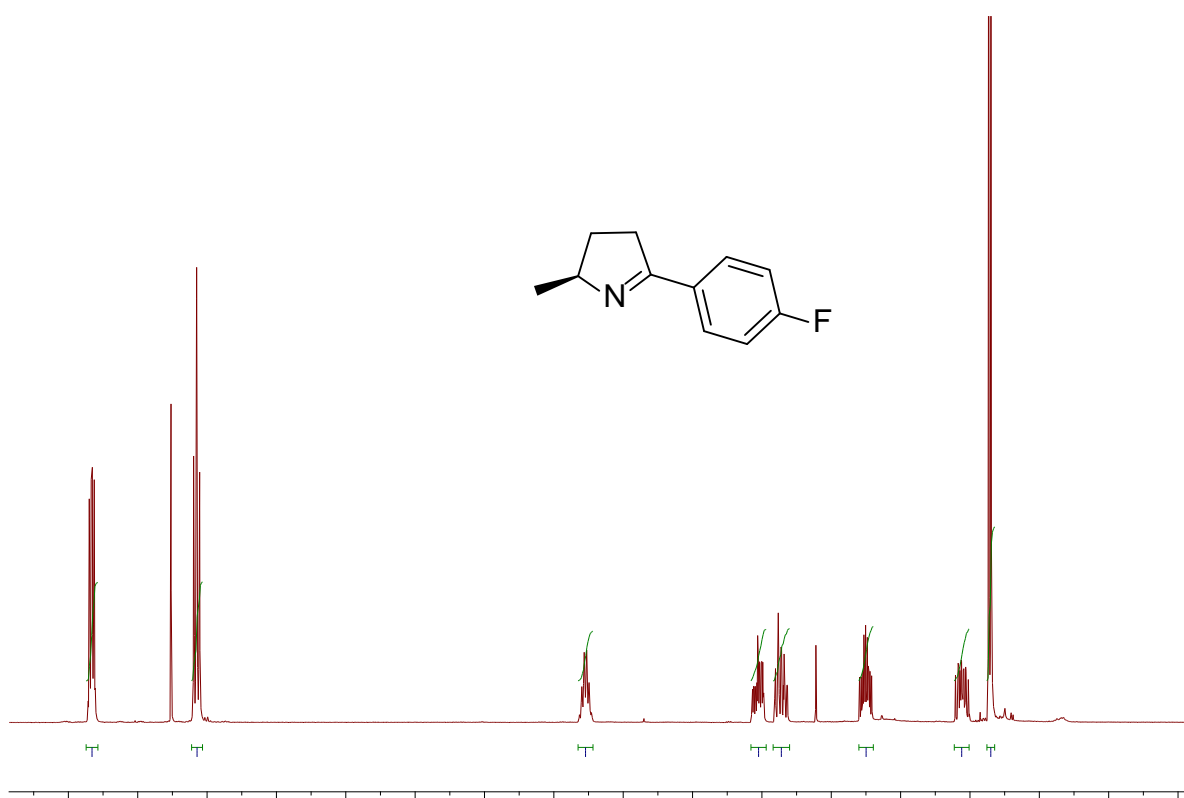
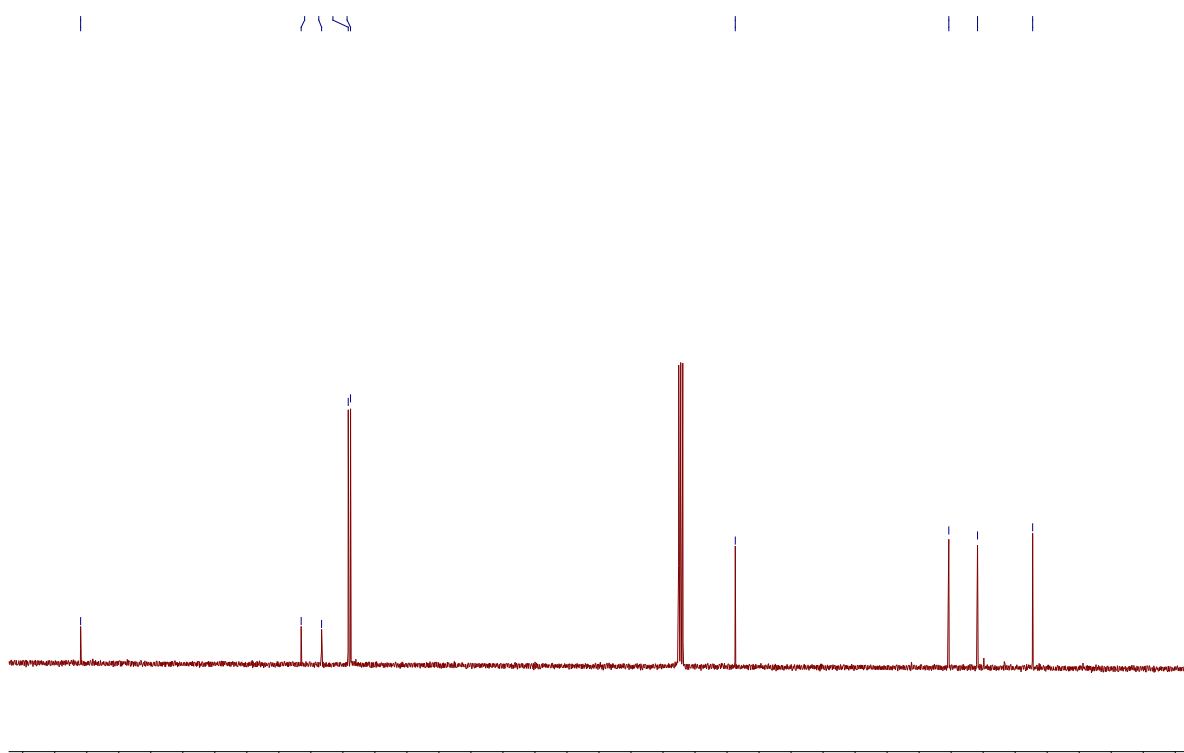


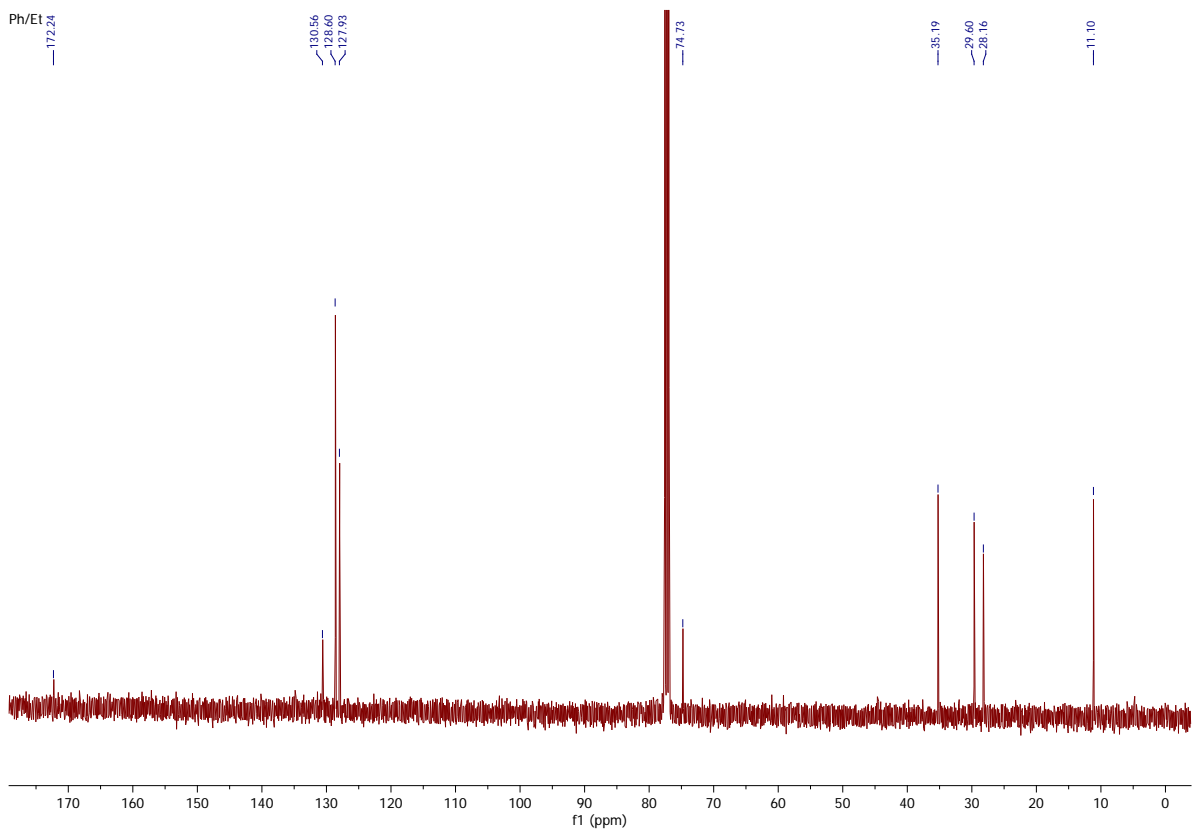
pOMe/Me



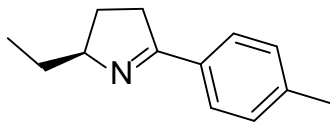
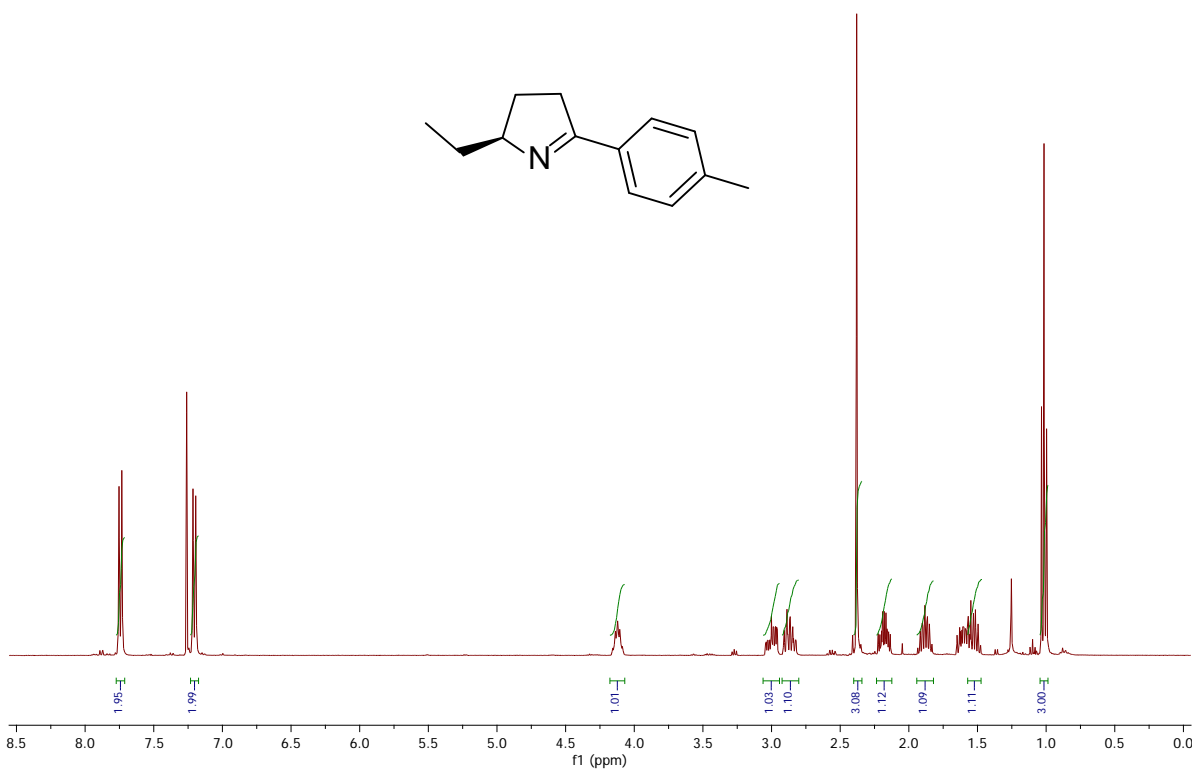
pCl/Me

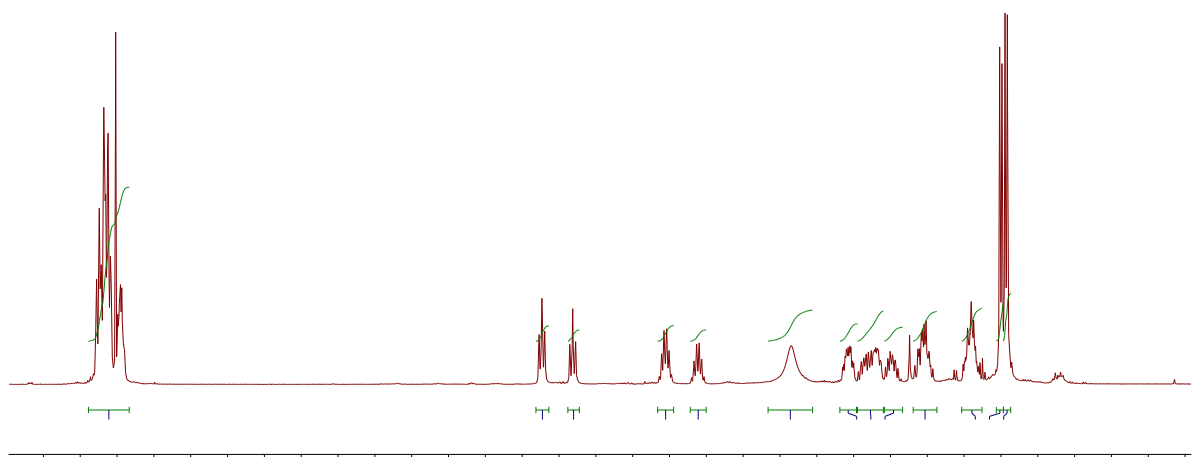
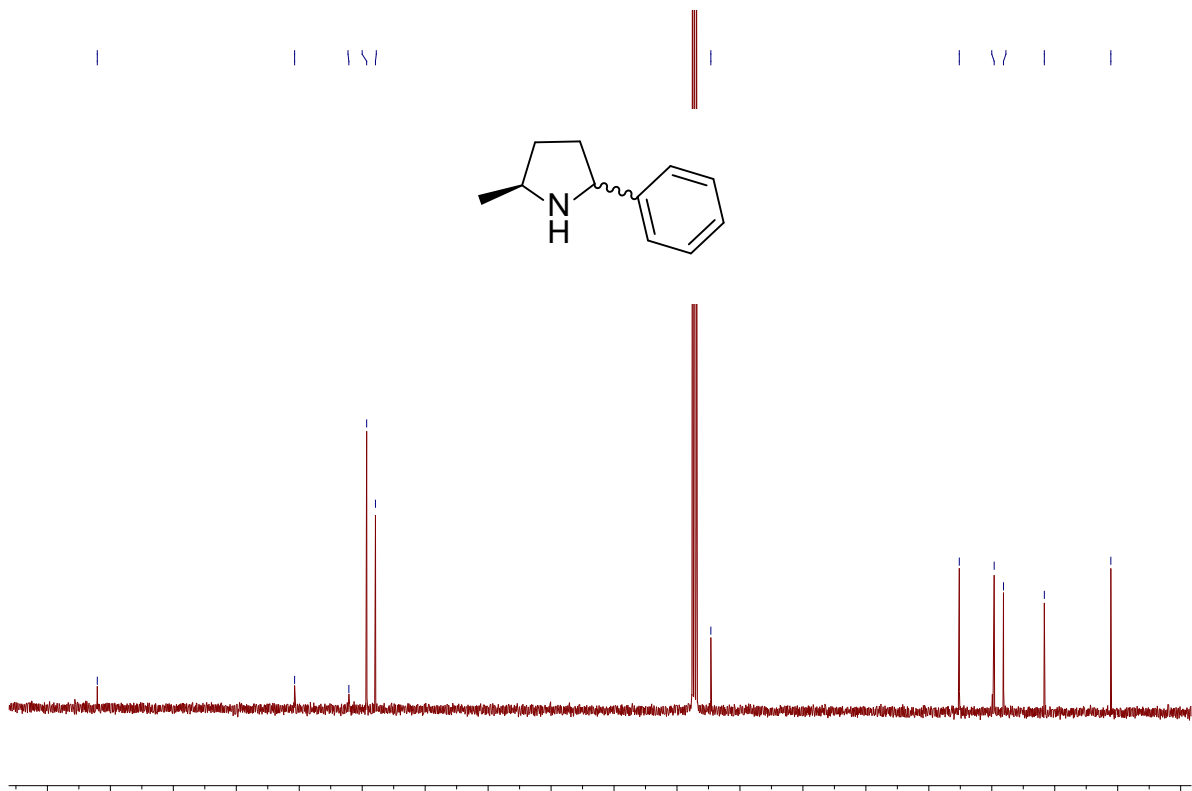






pTol/Et





S Ph/Me pyrrolidine

145
144

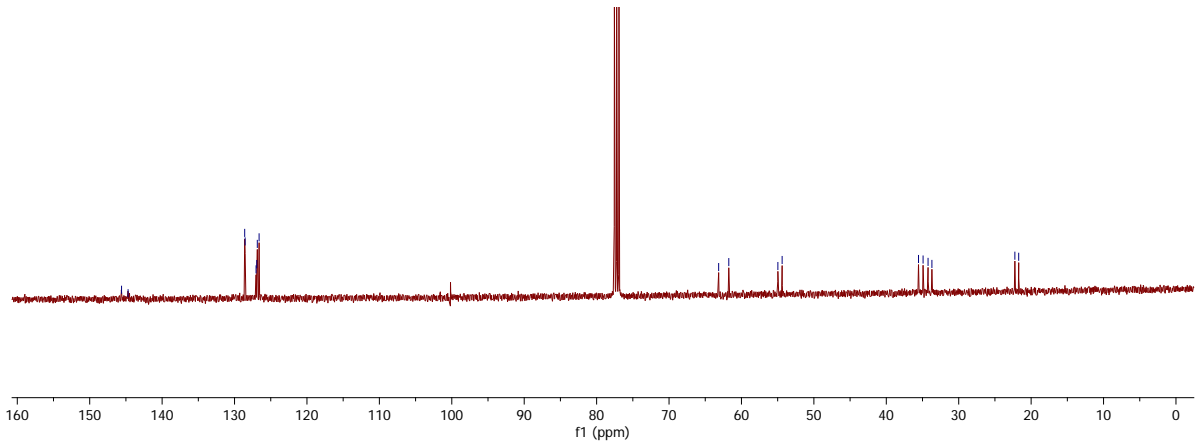
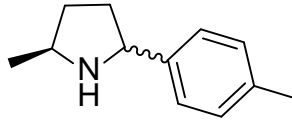
128.60
128.54
127.03
126.93
126.86
126.61

63.15
61.75

54.97
54.38

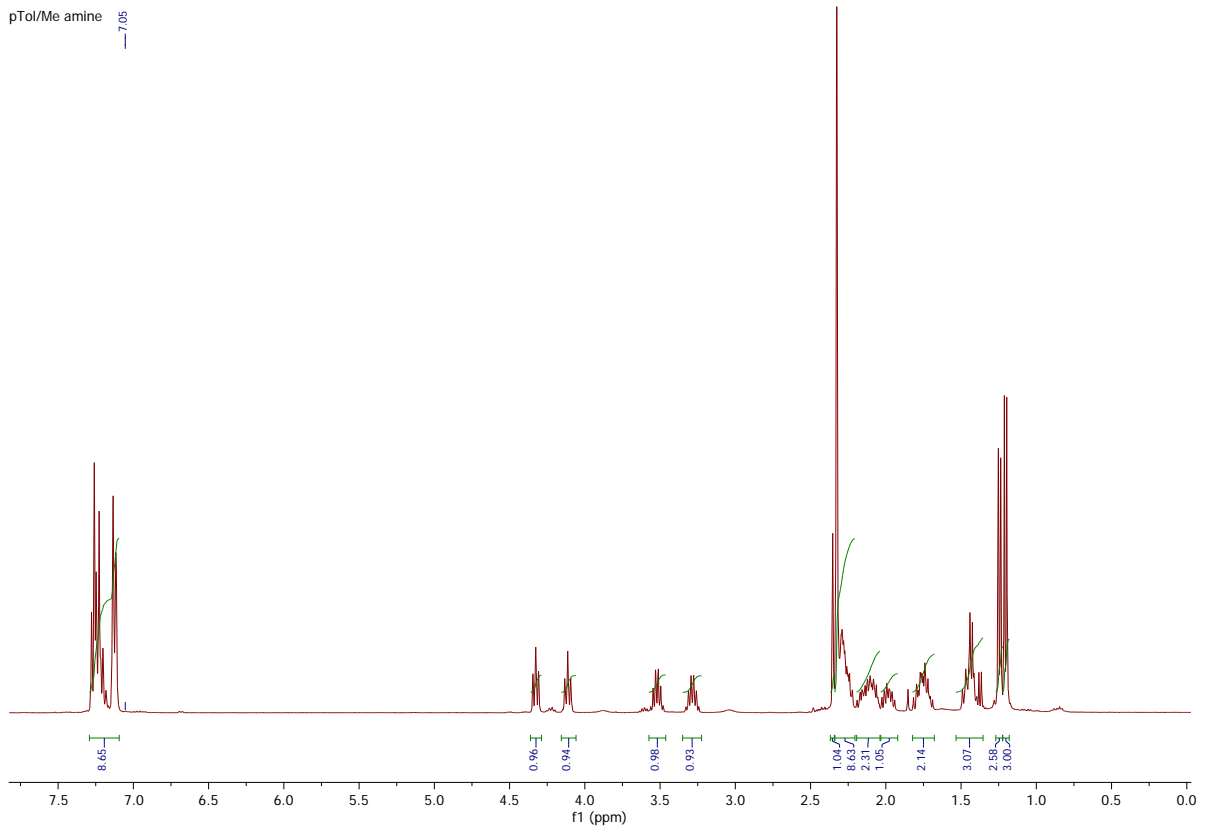
35.65
34.92
34.23
33.70

22.25
21.72



pTol/Me amine

7.05



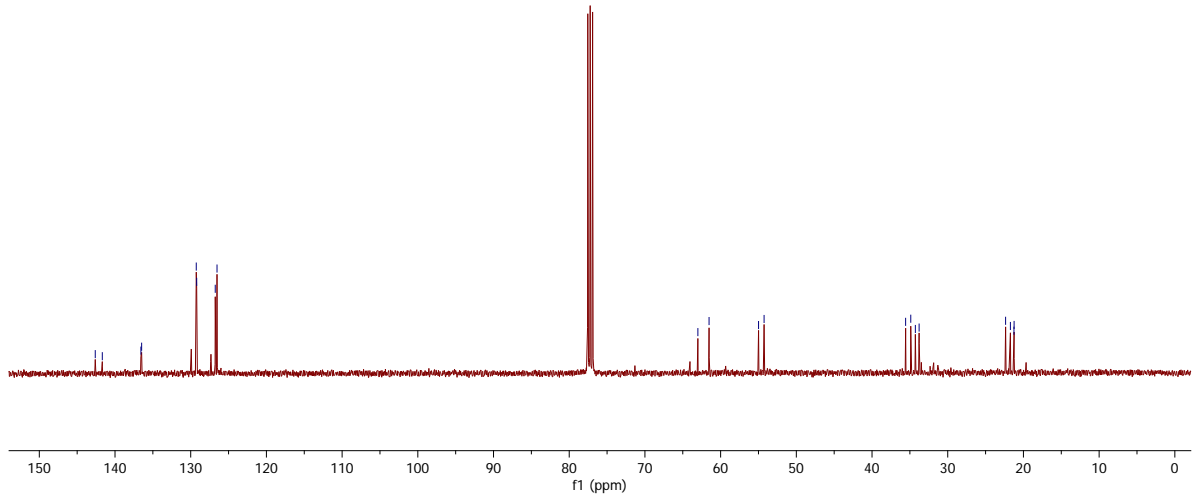
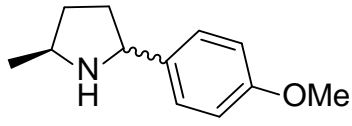
pTol/Me amib

141.88
141.88
136.58
136.48
129.27
129.21
126.76
126.53

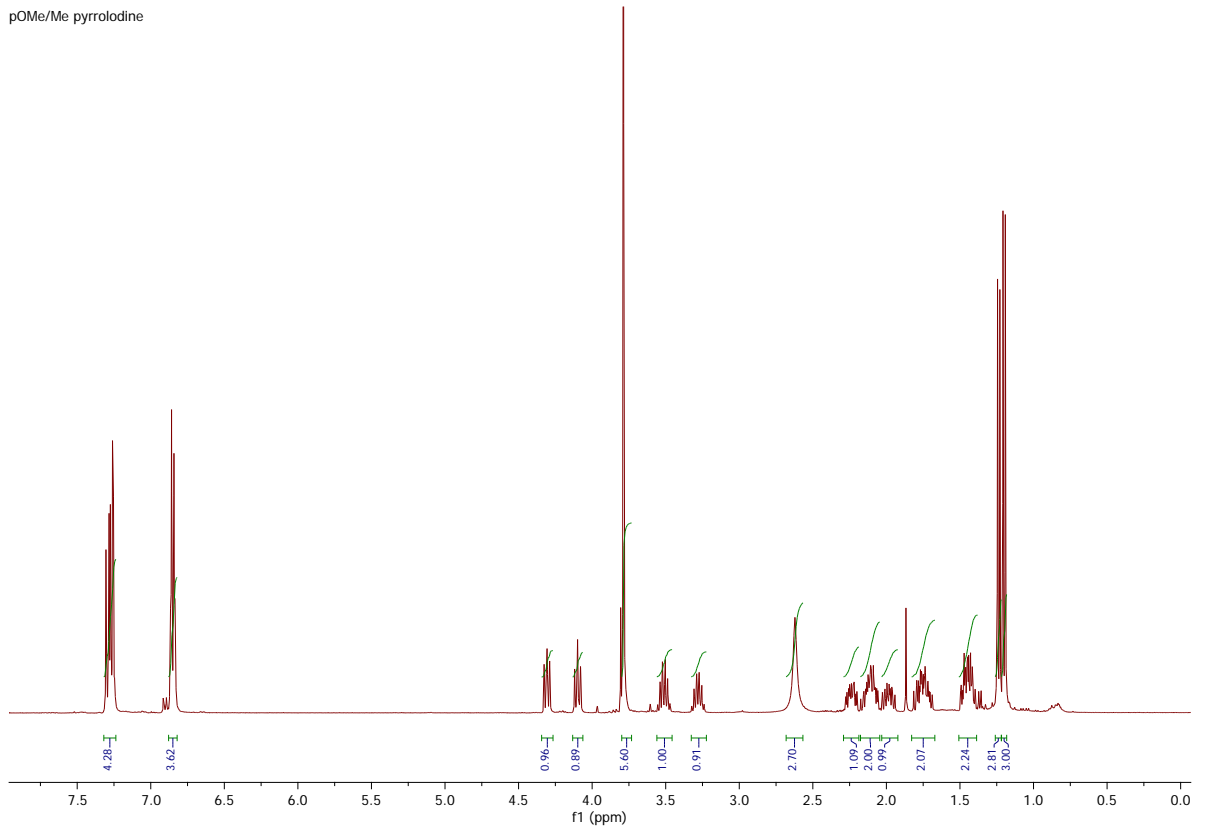
63.00
61.53
54.99
54.26

35.56
34.88
34.28
33.78

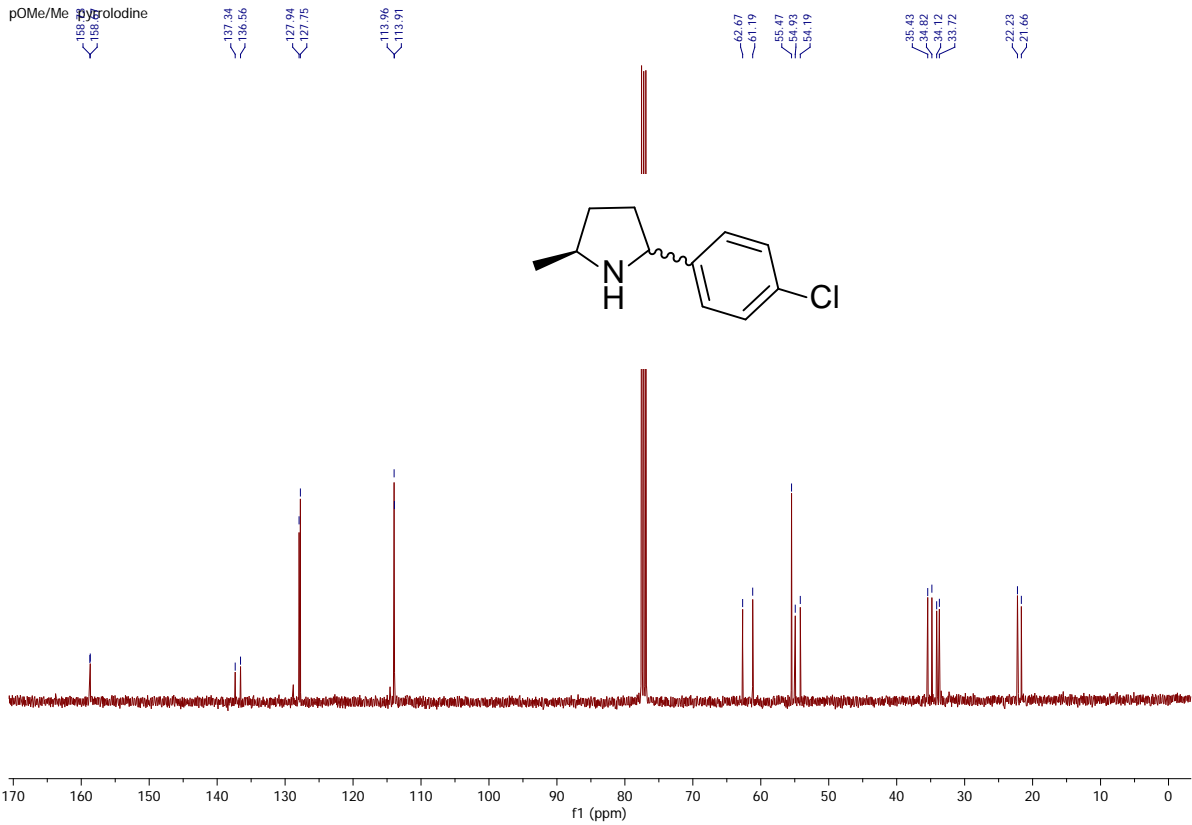
22.36
21.72
21.25
21.23



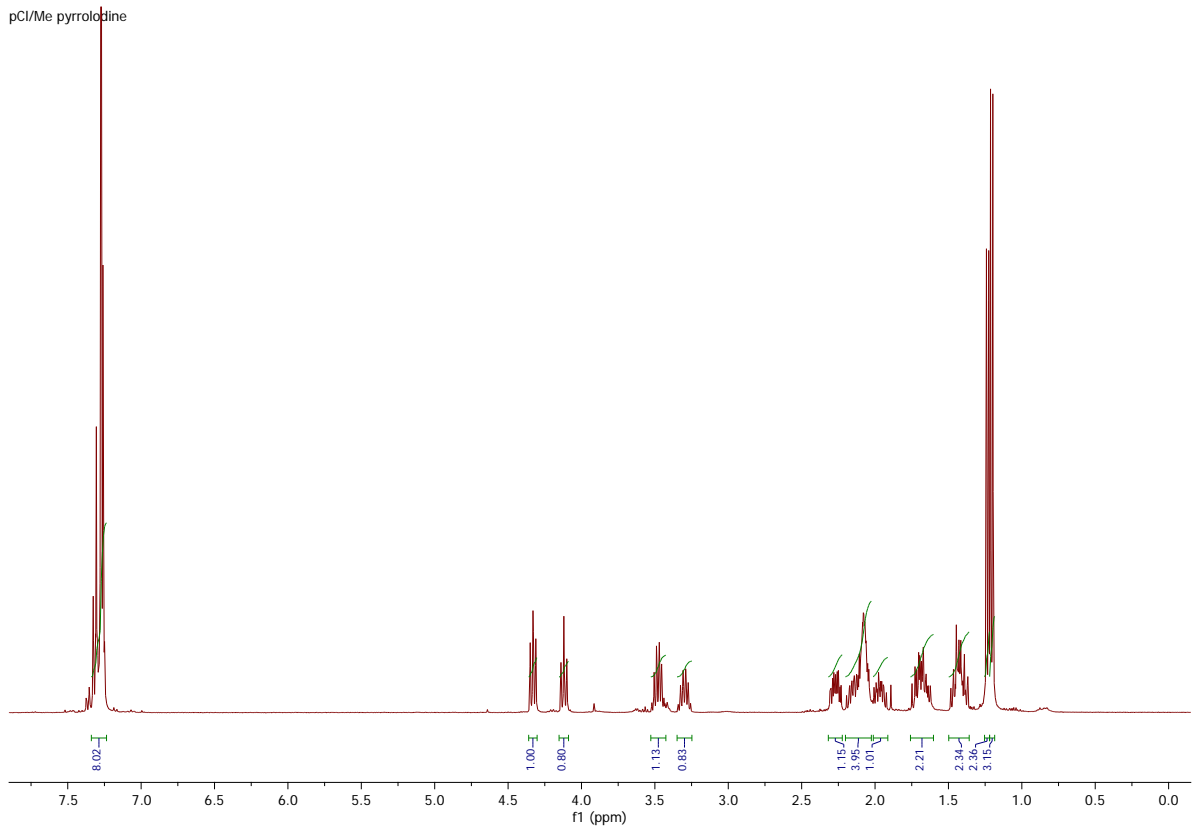
pOMe/Me pyrrolidine



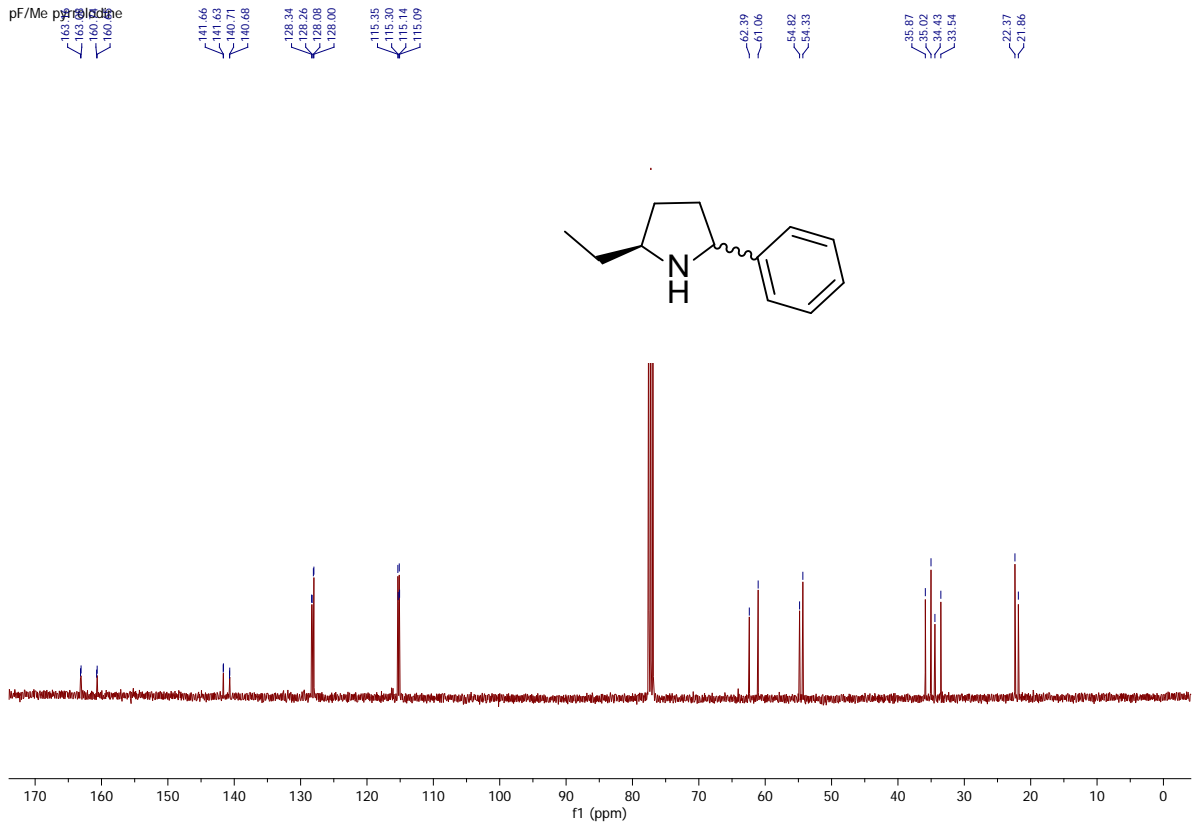
pOMe/Me pyrrolidine



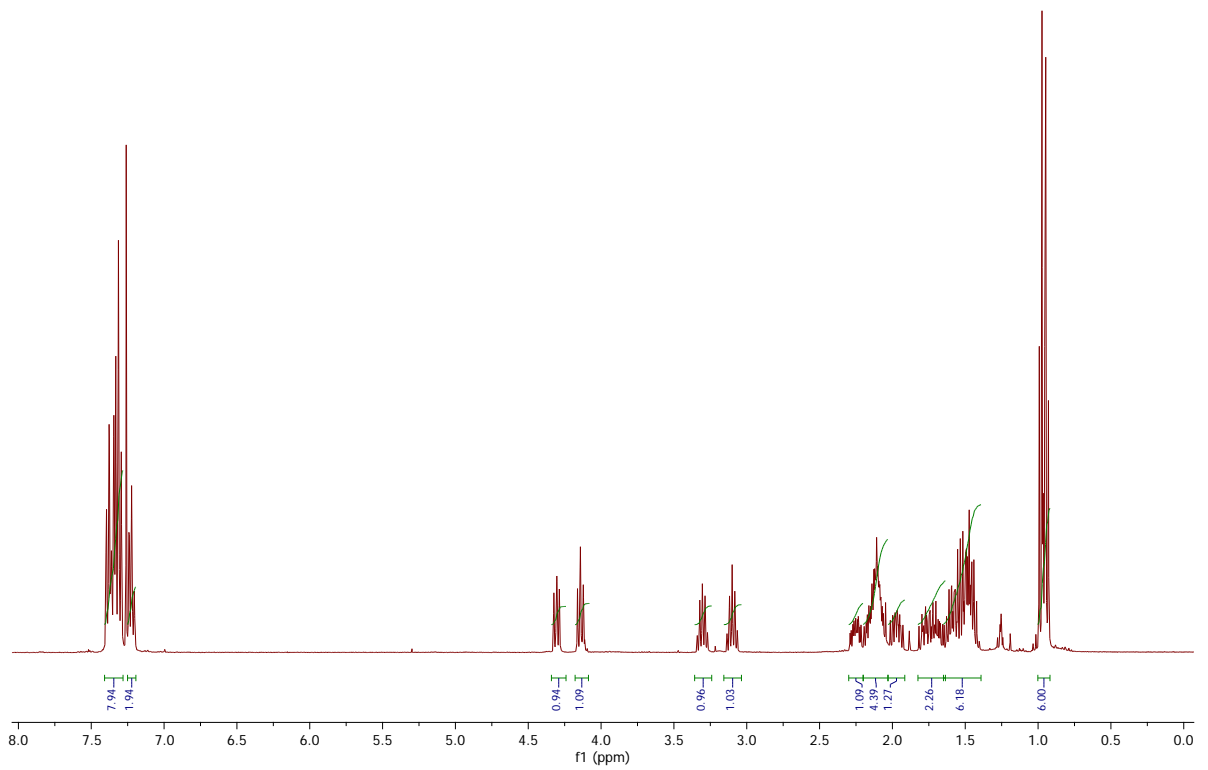
pCl/Me pyrrolidine



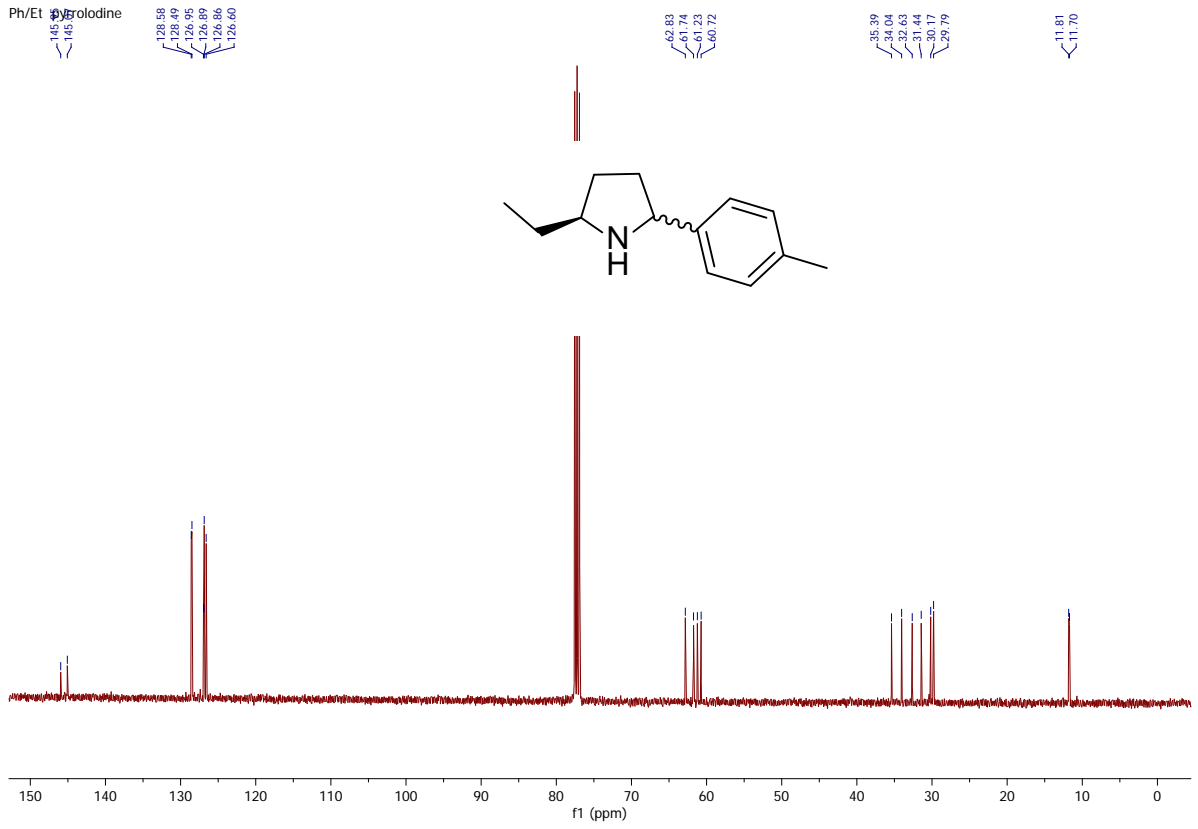
pF/Me pyrrolidine



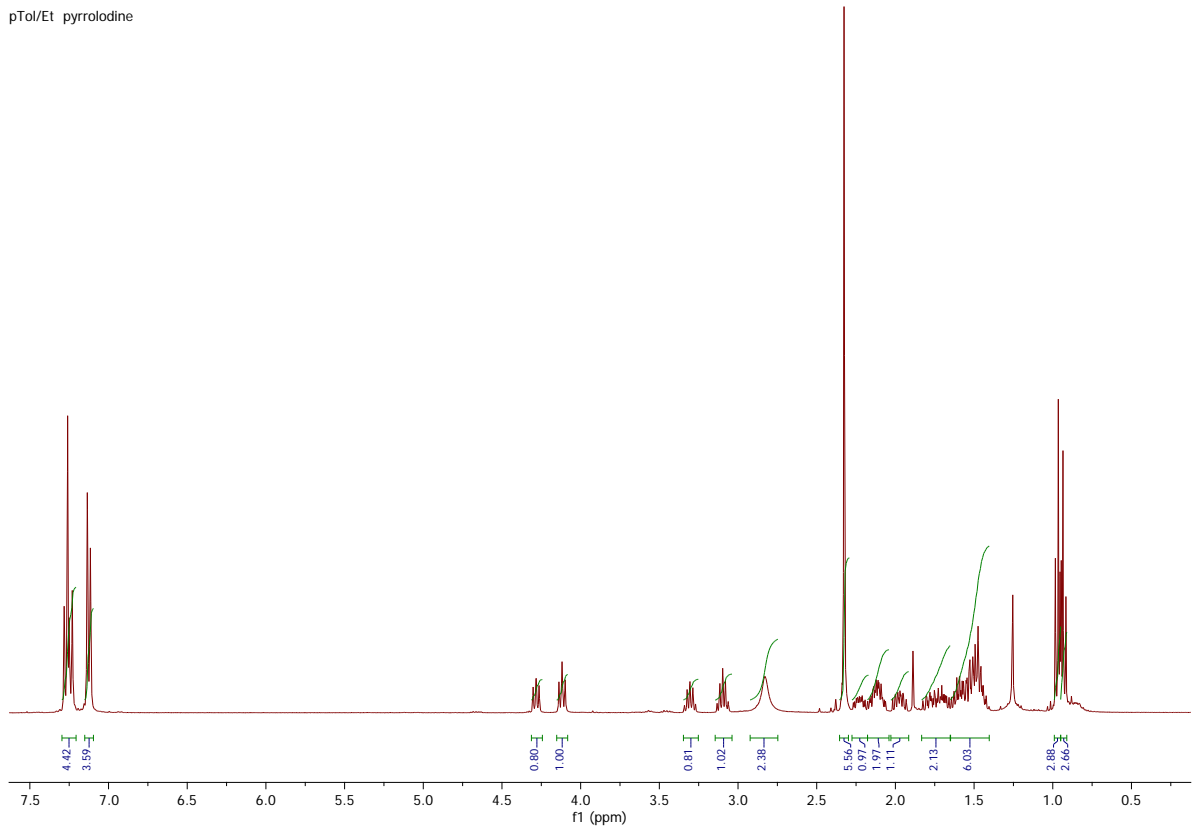
Ph/Et pyrrolidine

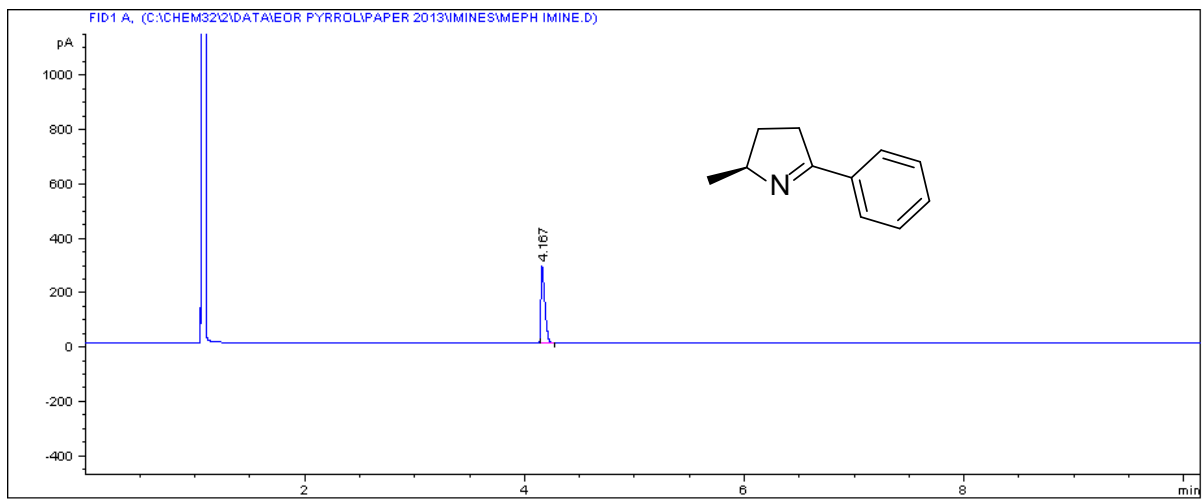
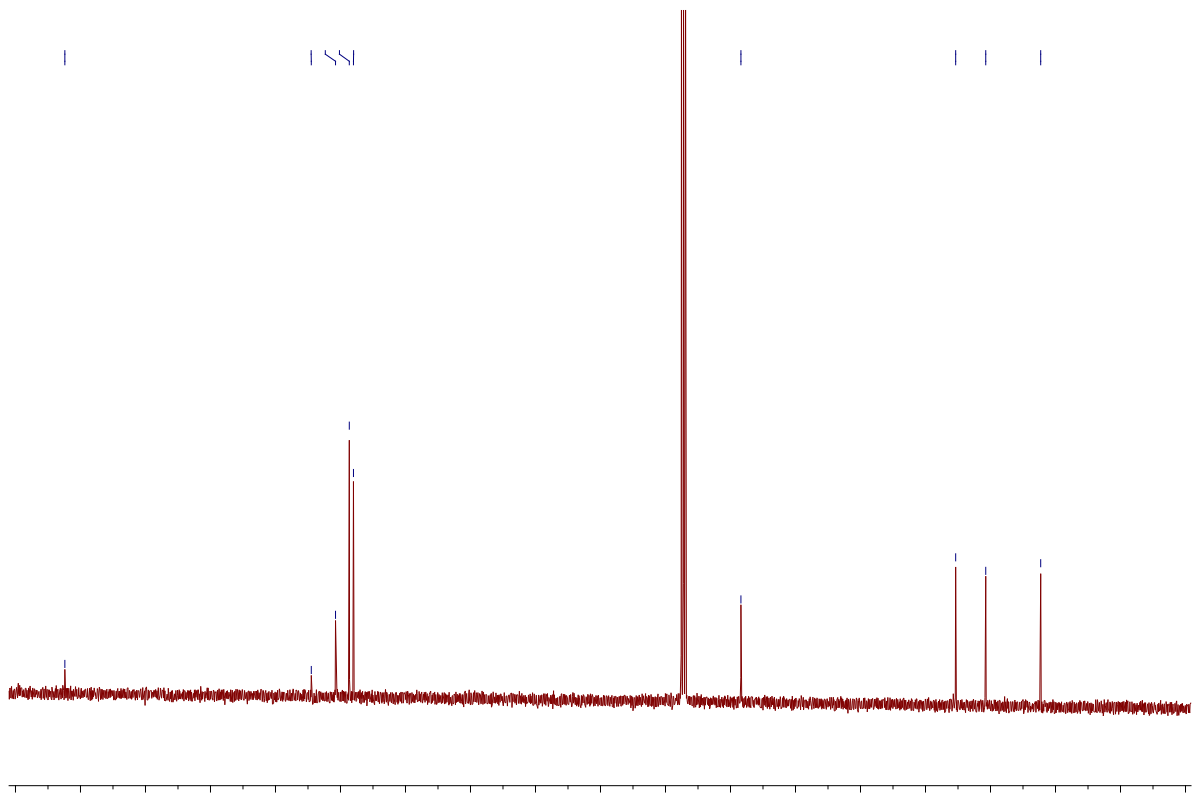


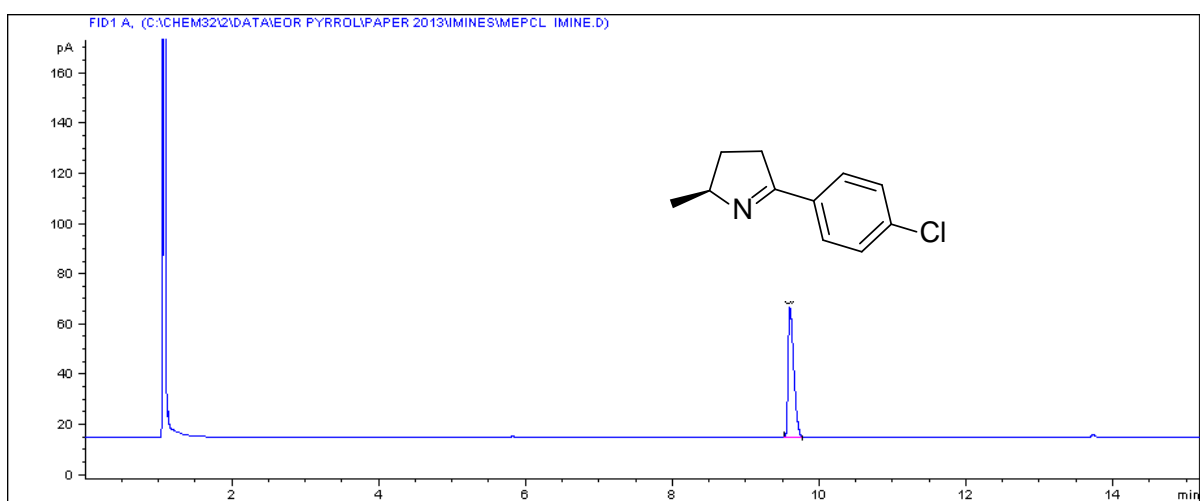
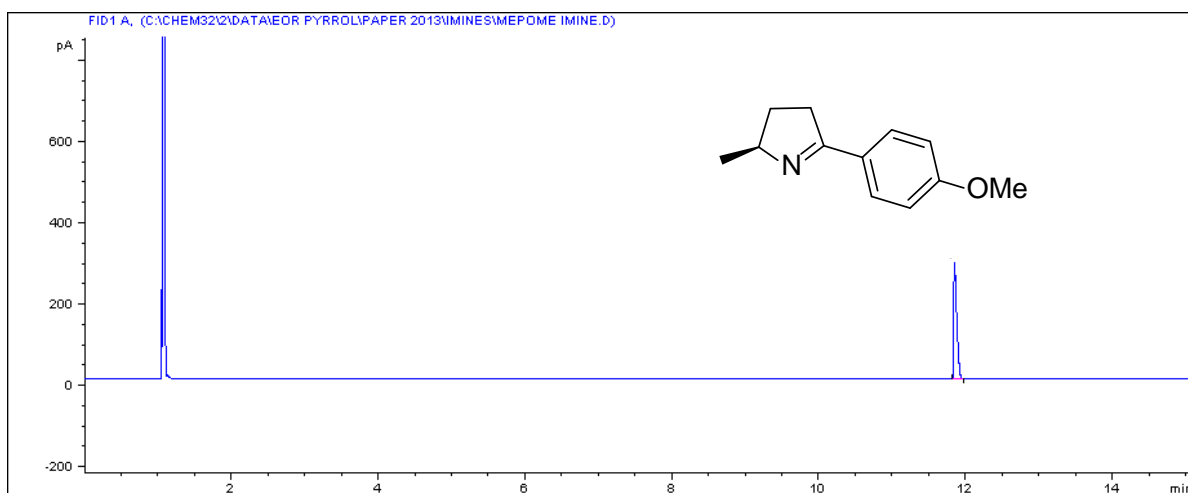
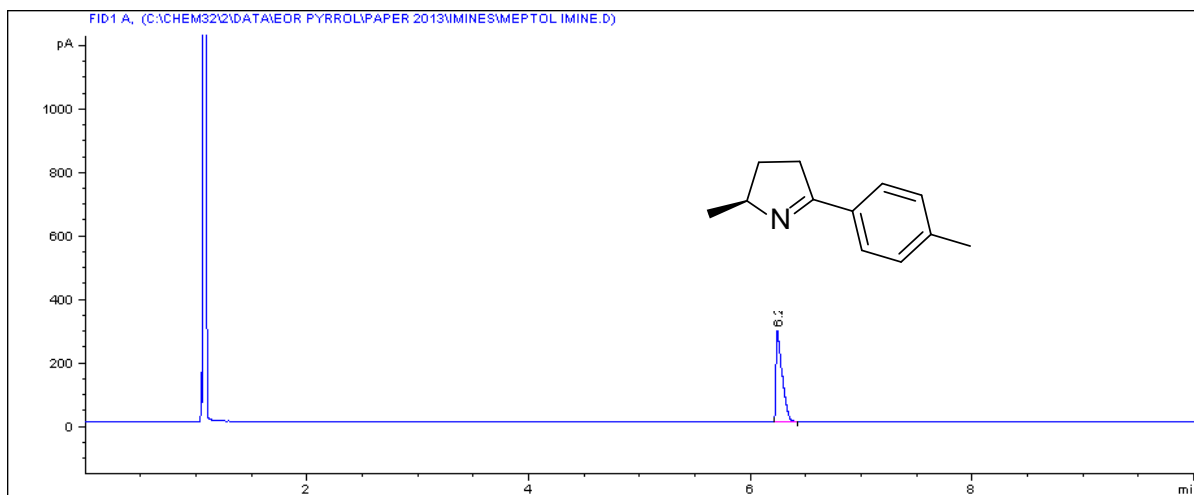
Ph/Et pyrrolidine

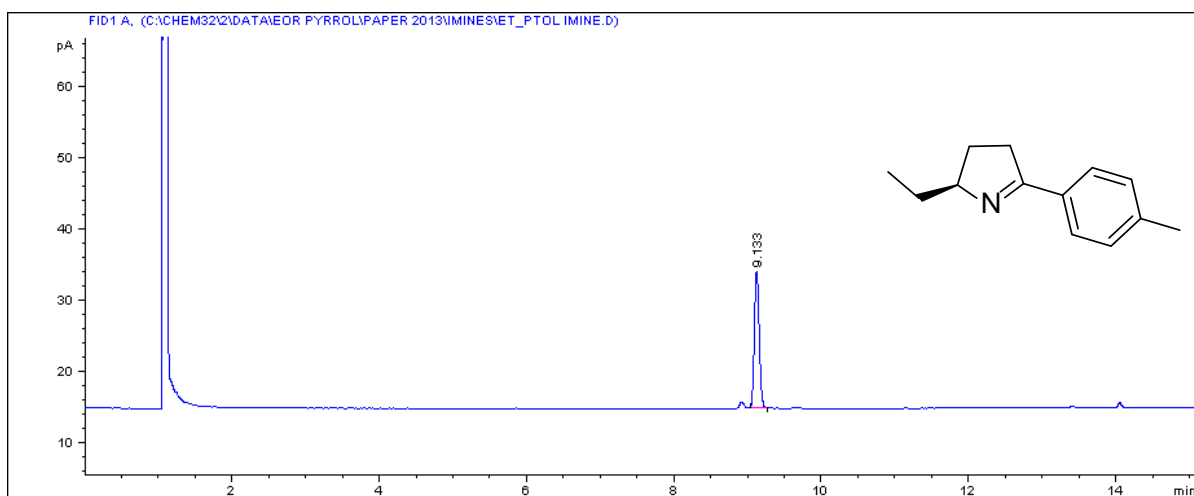
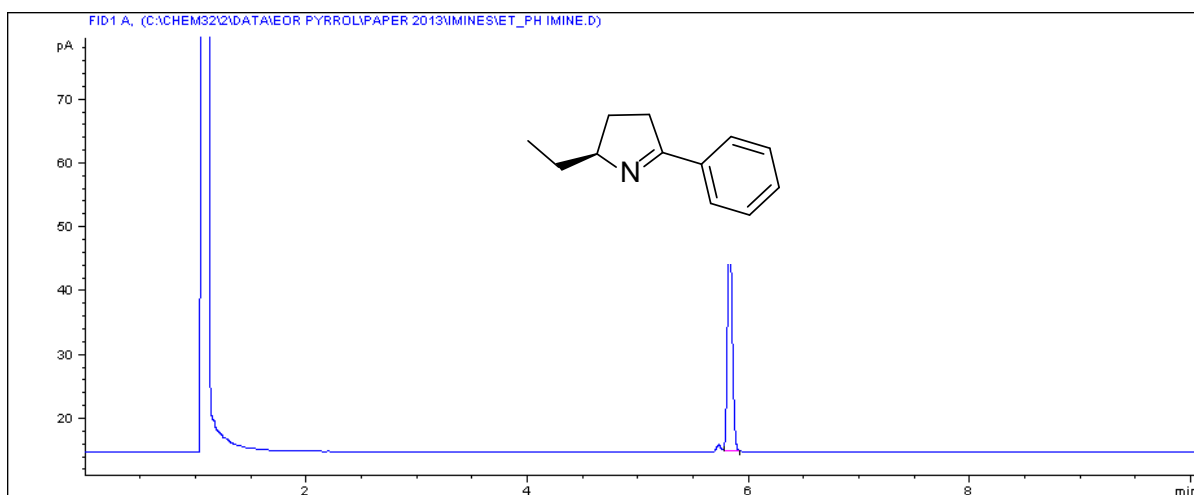
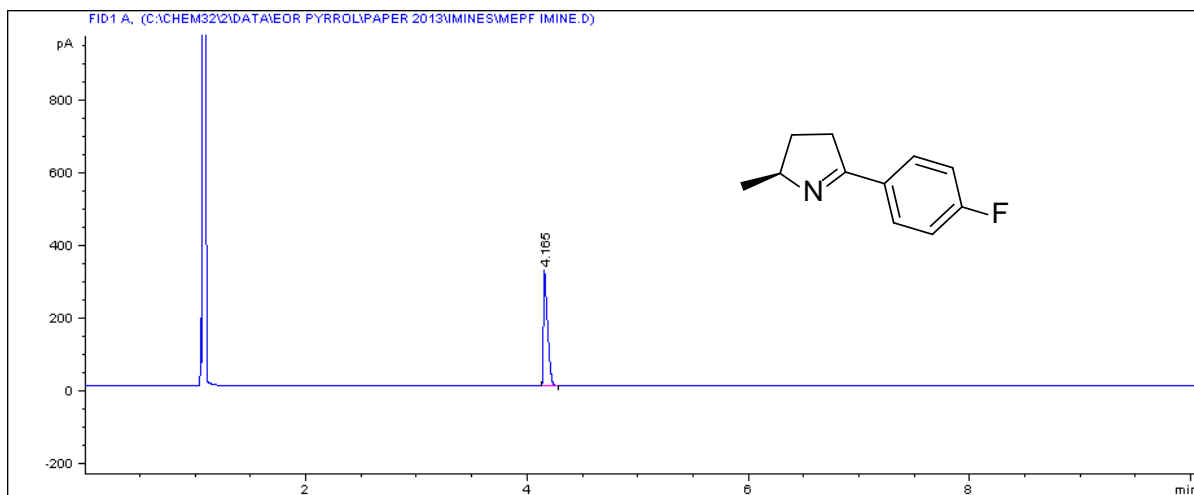


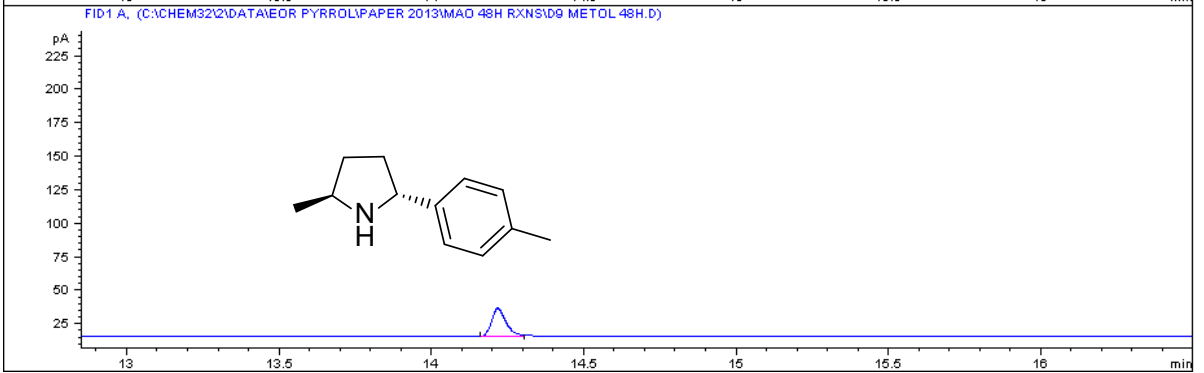
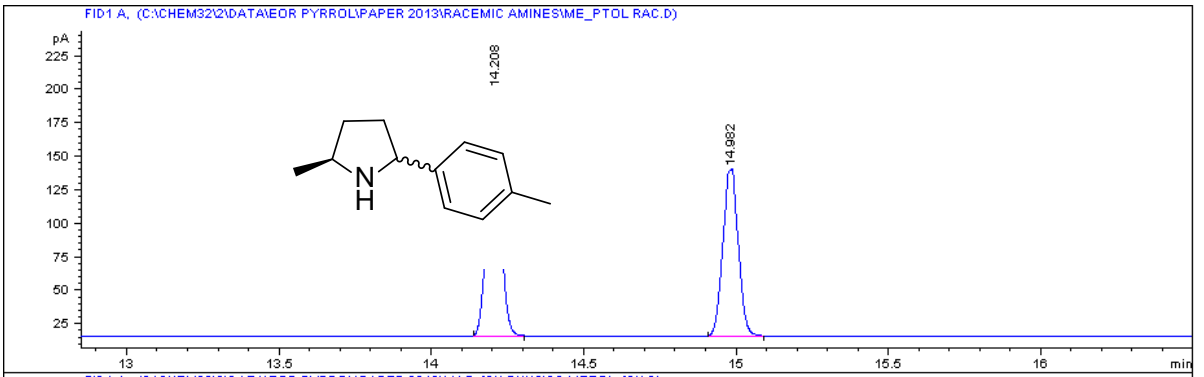
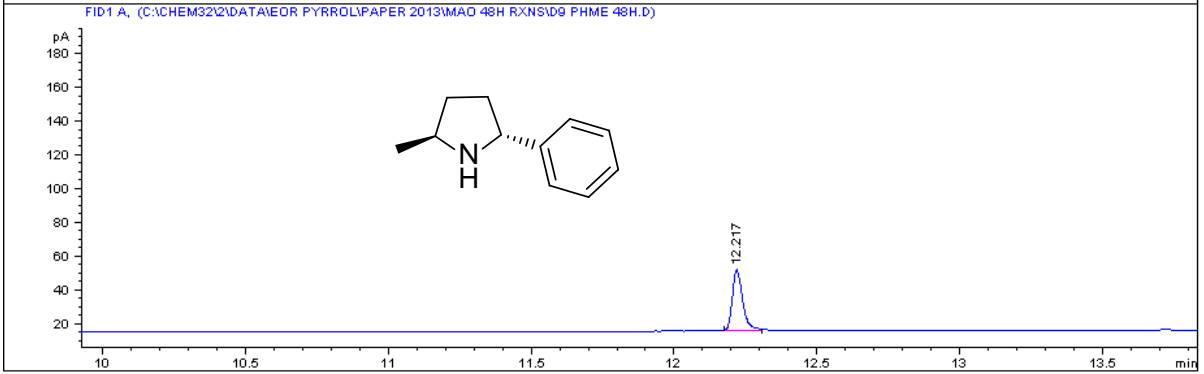
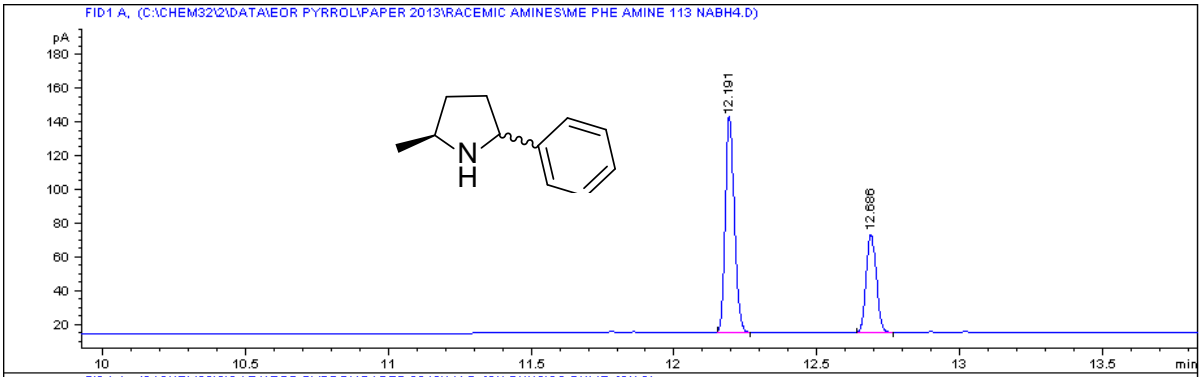
pTol/Et pyrrolidine

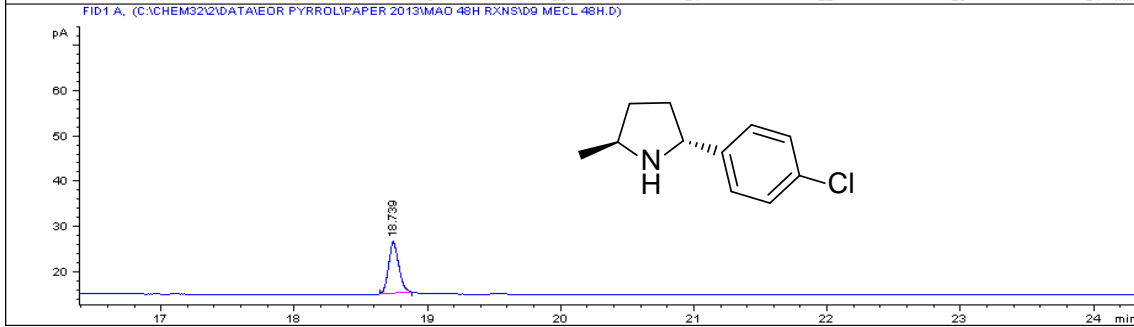
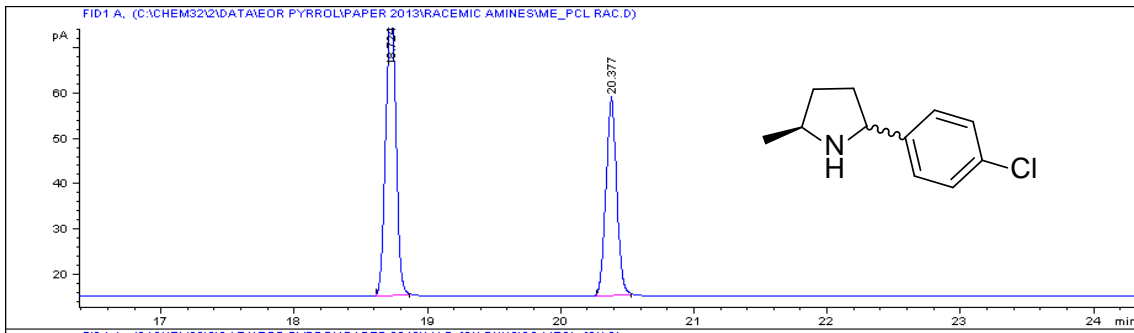
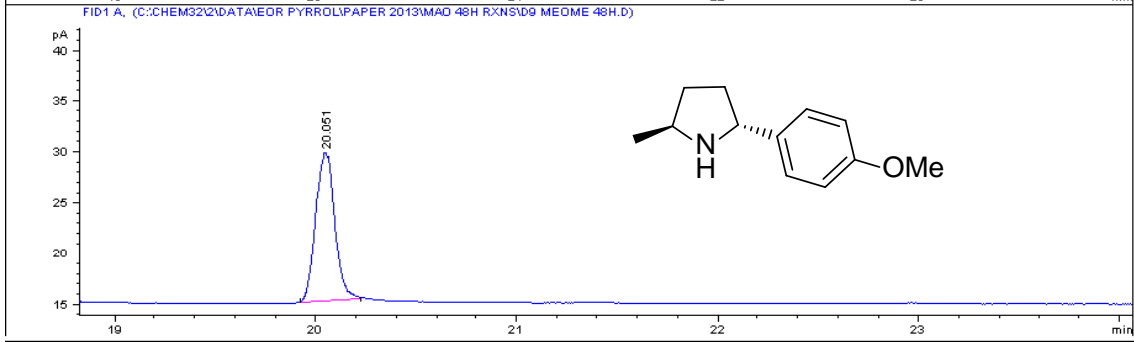
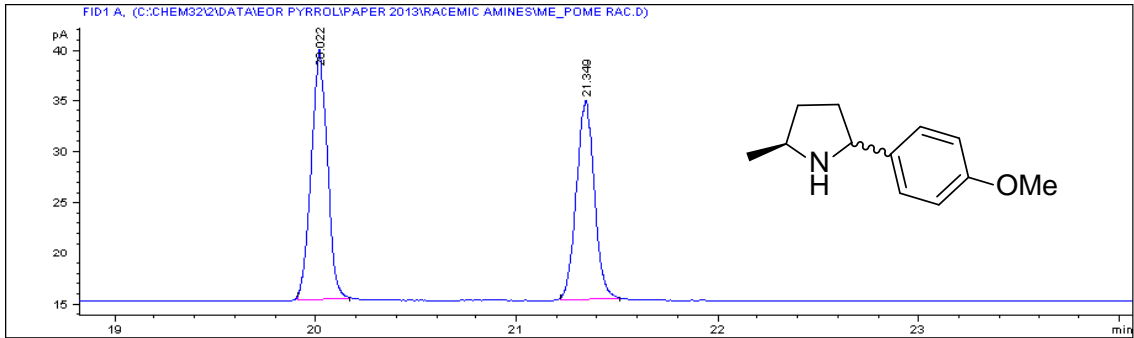


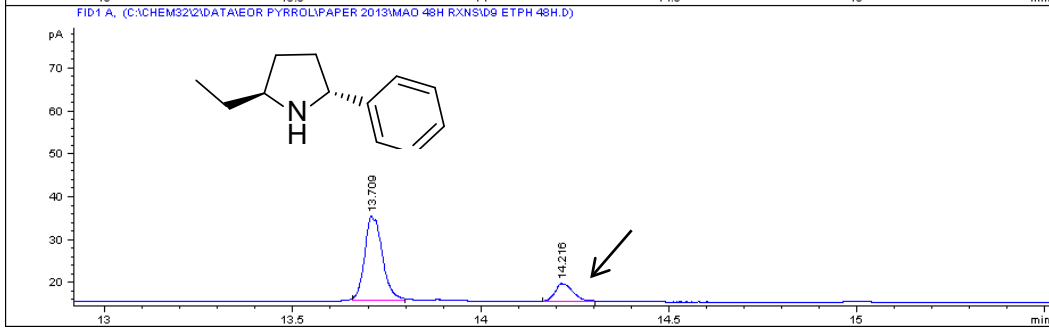
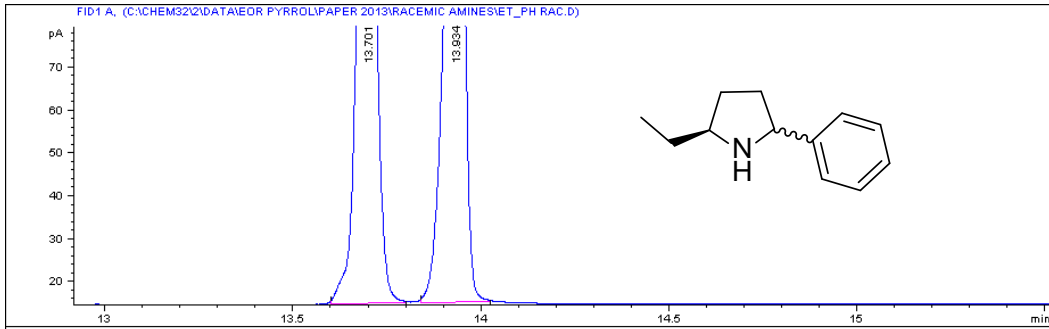
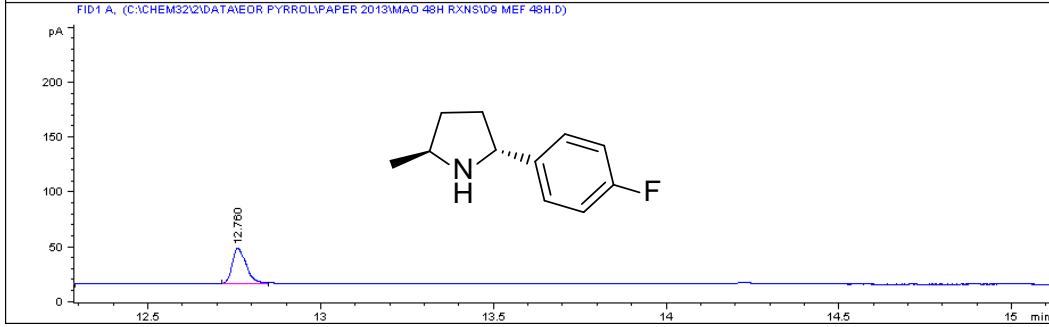
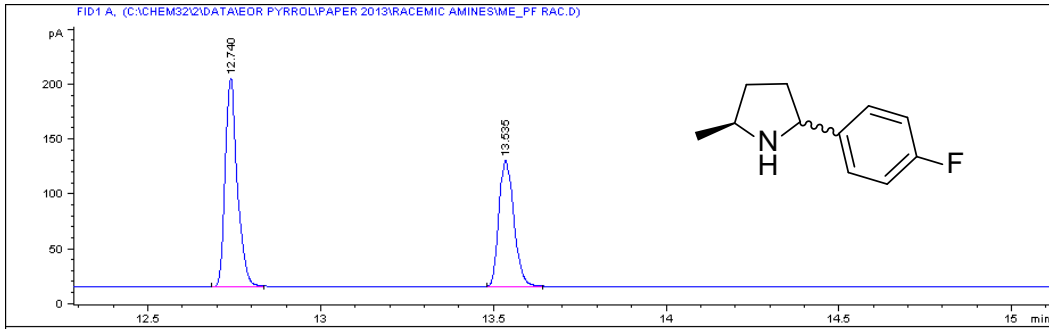


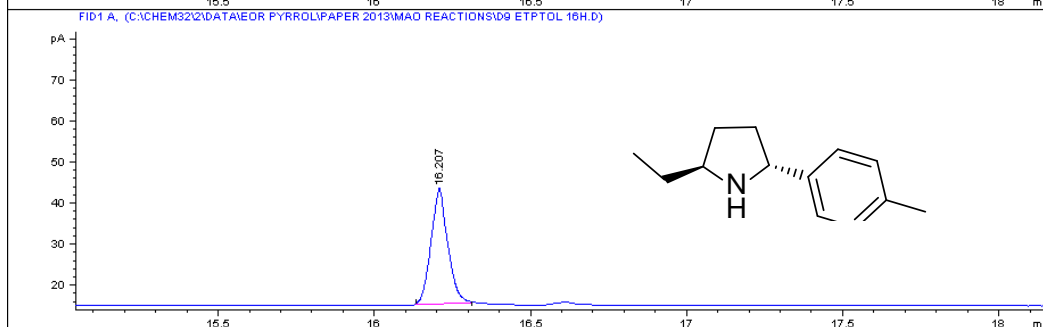
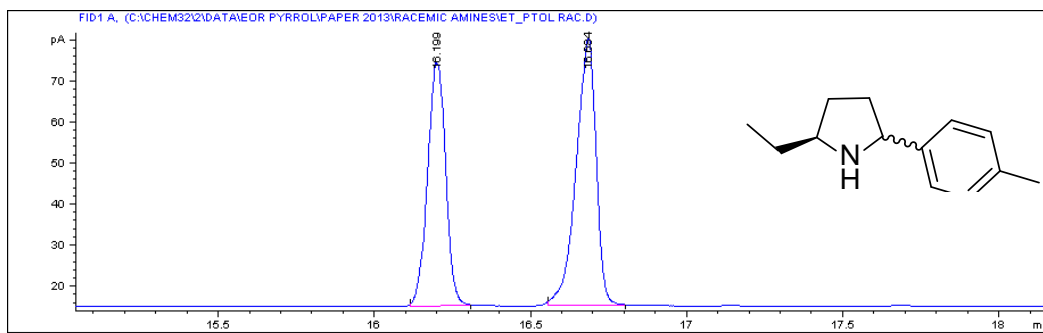












6.3 Publicaciones

A Regio- and Stereoselective ω -Transaminase/Monoamine Oxidase Cascade for the Synthesis of Chiral 2,5-Disubstituted Pyrrolidines**

Elaine O'Reilly, Cesar Iglesias, Diego Ghislieri, Jennifer Hopwood, James L. Galman, Richard C. Lloyd, and Nicholas J. Turner*

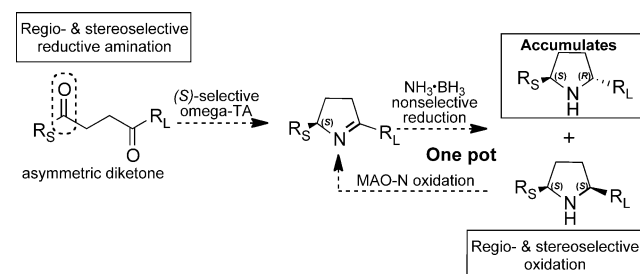
Abstract: Biocatalytic approaches to the synthesis of optically pure chiral amines, starting from simple achiral building blocks, are highly desirable because such motifs are present in a wide variety of important natural products and pharmaceutical compounds. Herein, a novel one-pot ω -transaminase (TA)/monoamine oxidase (MAO-N) cascade process for the synthesis of chiral 2,5-disubstituted pyrrolidines is reported. The reactions proceeded with excellent enantio- and diastereoselectivity (>94% ee; >98% de) and can be performed on a preparative scale. This methodology exploits the complementary regio- and stereoselectivity displayed by both enzymes, which ensures that the stereogenic center established by the transaminase is not affected by the monoamine oxidase, and highlights the potential of this multienzyme cascade for the efficient synthesis of chiral building blocks.

The exquisite chemo-, regio- and stereoselectivity displayed by enzymes has led to their widespread application as catalysts for stereocontrolled organic synthesis.^[1] These properties, coupled with their ability to catalyze reactions under similar conditions, has enabled the development of elegant multienzyme cascade processes, in which the product formed by the action of the first enzyme becomes the starting material for the subsequent biotransformation.^[2] Such tandem processes alleviate the need for protecting-group manipulations and intermediate purification steps, thus providing cost-effective routes to target molecules.

Among the most synthetically useful biocatalysts for the synthesis of chiral amines are the ω -transaminase (TA) family and variants of monoamine oxidase from *Aspergillus niger* (MAO-N).^[3] TAs are capable of mediating the selective

reductive amination of prochiral ketones, thereby providing the corresponding chiral amines.^[3a-e] MAO-N catalyzes the oxygen-dependent conversion of amines into imines and is typically selective for the (*S*)-enantiomer.^[3f-i] Variants of MAO-N have been exploited for the deracemization of primary, secondary, and tertiary amines with diverse structural motifs.^[3a,f-j] The development of several chemoenzymatic routes^[3c,4] to industrially important target molecules by employing these two enzyme classes is testament to the advances in protein engineering^[1a,5] that have resulted in the development of biocatalysts with the desired substrate scope, selectivity, and stability.

2,5-Disubstituted pyrrolidines are important scaffolds in pharmaceutical compounds^[6] and natural products,^[7] and considerable efforts have been devoted to developing asymmetric routes to both *cis*- and *trans*-disubstituted derivatives that show moderate to good stereoselectivity.^[8] The lack of stereofacial bias induced by the preexisting C2-stereocenter means that obtaining the *trans*-diastereomers through reduction of the corresponding imine in high *de* is not straightforward. Our approach (Scheme 1) features a highly selective



Scheme 1. A chemoenzymatic approach for the synthesis of 2,5-disubstituted pyrrolidines by employing an ω -transaminase (TA) and a monoamine oxidase (MAO-N).

TA-mediated reductive amination of an achiral 1,4-diketone to generate an optically active pyrroline followed by diastereoselective chemoenzymatic conversion into the corresponding pyrrolidine by MAO-N/ $\text{NH}_3\cdot\text{BH}_3$.

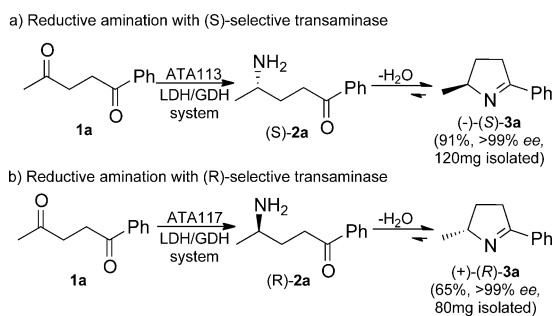
Initially, we examined the ω -TA-mediated selective monoamination of commercially available 1,4-diketone **1a**, which bears a small methyl substituent and a large phenyl substituent (Scheme 2). The first example of the asymmetric bioamination of 1,5-diketones was recently reported with excellent regio- and stereoselectivity achieved.^[9] We found the commercially available (*S*)-selective transaminase ATA113 to be highly regioselective in mediating the reductive

[*] Dr. E. O'Reilly, Dr. D. Ghislieri, Dr. J. Hopwood, Dr. J. L. Galman, Prof. N. J. Turner
School of Chemistry, University of Manchester
Manchester Institute of Biotechnology
131 Princess Street, Manchester, M1 7DN (UK)
E-mail: nicholas.turner@manchester.ac.uk

C. Iglesias
Facultad de Química, Universidad de la República (Uruguay)
Dr. R. C. Lloyd
Chirotech Technology Ltd, 410 Cambridge Science Park
Milton Road, Cambridge, CB40PE (UK)

[**] The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreements n° 266025 (BIONEXGEN) and n° 245144 (AMBIOCAS). Funding also provided by BBSRC (CASE award to JH) and ANII MOV_CA_2012_1_7759 and CSIC-UdelaR-Uruguay.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201309208>.



Scheme 2. Preparative-scale (25 mM **1a**) reductive amination of diketone **1a** mediated by (*S*)-selective ATA113 or (*R*)-selective ATA117, followed by spontaneous cyclization.

amination of **1a** exclusively on the methyl ketone at a substrate concentration of 25 mM with *L*-alanine as the amine donor. The resulting 1,4-amino ketone (*S*)-**2a** subsequently underwent spontaneous cyclization to provide pyrroline (*S*)-**3a** in high yield (91 %) and excellent *ee* (> 99 %). The lactate dehydrogenase (LDH)/glucose dehydrogenase (GDH) system was used to drive the equilibrium towards the product and recycle the NAD⁺ cofactor (see the Supporting Information). The (*R*)-selective transaminase ATA117 also catalyzed the regio- and stereoselective mono-amination of **1a** to afford pyrroline (*R*)-**3a** in 65 % yield and > 99 % *ee*.

Having established an effective means of accessing optically pure pyrrolines on a preparative scale, we subsequently explored a route for the diastereoselective synthesis of 2,5-disubstituted pyrrolidine **4a** starting from **3a** (Scheme 3). 2,6-Disubstituted piperidines have been prepared through a chemoenzymatic route employing an ω -transaminase followed by diastereoselective hydrogenation using Pd/C.^[9] However, the same strategy is not applicable to the diastereoselective synthesis of 2,5-disubstituted pyrrol-

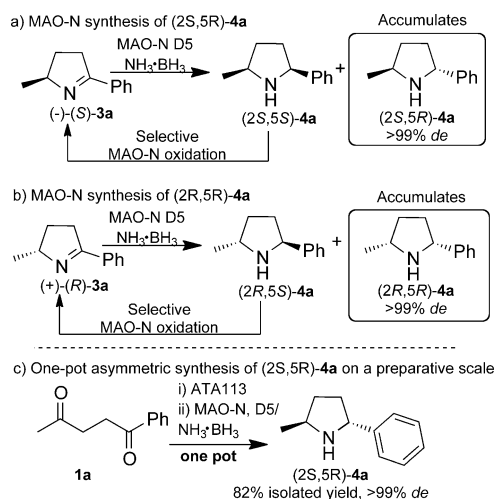
idines owing to poor diastereoselectivity in the reduction step. We envisaged using MAO-N variants in combination with NH₃·BH₃ for the asymmetric synthesis of **4a**. Two MAO-N variants (D5 and D9) were selected based on their known activity and excellent selectivity towards structurally related amine frameworks, including pyrrolidines and piperidines.^[3h,k] Our strategy relies upon MAO-N variants displaying complete regio- and stereoselectivity to avoid stereorandomization of the C2-stereocenter generated by the (*S*)-selective ω -TA. Imine **3a** is in equilibrium with the open-chain amino ketone (*S*)-**2a** and hence optimization of the MAO-N/NH₃·BH₃ oxidation/reduction cycle was necessary in order to prevent the formation of undesired amino alcohol as a side product. Ketone reduction was minimized by lowering the concentration of the MAO-N biocatalyst during the reaction while maintaining a high concentration of NH₃·BH₃. Under these conditions, rapid reduction of pyrroline **3a** occurred, thus ensuring that a minimal concentration of the amino ketone was present during the biotransformation.

Treatment of (*S*)-**3a** with NH₃·BH₃ afforded **4a** initially as a mixture of diastereoisomers with a slight excess of the (2*S*,5*S*)-isomer (*de* ≈ 10 %; Scheme 3a). Both MAO-N variants mediated the oxidation of the (2*S*,5*S*)-**4a** diastereoisomer exclusively and displayed complete regioselectivity for the more bulky phenyl side of the pyrrolidine. Following successive rounds of selective oxidation with the MAO-N D5 variant and nonselective reduction with NH₃·BH₃, (2*S*,5*R*)-**4a** was isolated in greater than 99 % *de*. Despite a bias towards the formation of the *cis* diastereoisomer upon reduction with NH₃·BH₃, the combination with MAO-N yielded solely the *trans* reduction product (2*S*,5*R*)-**4a**. The complementary regioselectivity displayed by the ω -TA and MAO-N variants circumvents epimerization of the (*S*)-C2-center and provides a method for accessing optically pure 2,5-pyrrolidines.

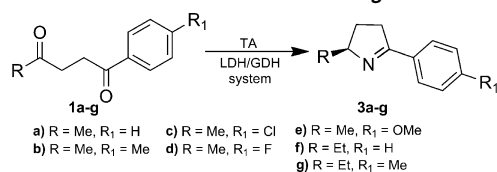
Having developed efficient individual biocatalytic routes for the synthesis of optically pure pyrroline **3a** and the target chiral 2,5-pyrrolidine **4a**, we next sought to combine the ω -TA and MAO-N biocatalysts in a one-pot cascade (Scheme 3c). Diketone **1a** was exposed to ATA 113 followed by MAO-N and NH₃·BH₃, and the target (2*S*,5*R*)-**4a** was obtained in 82 % yield and > 99 % *de*.

To allow access to the (2*R*,5*R*)-**4a** diastereoisomer, the (*R*)-**3a** enantiomer, derived from the use of ATA117, was treated with the NH₃·BH₃/MAO-N combination (Scheme 3b). Following nonselective reduction to give a mixture of (2*R*,5*S*)-**4a** and (2*R*,5*R*)-**4a**, both MAO-N variants mediated the selective oxidation of the (2*R*,5*S*)-isomer to provide (2*R*,5*R*)-**4a** exclusively after successive rounds of oxidation/reduction. The stereochemistry at C2 has a minimal effect on the activity of the MAO-N enzyme and no effect on the stereoselectivity; the target (2*R*,5*R*)-**3a** was isolated in > 99 % *de*.

The generality of the TA/MAO-N cascade process was investigated by examining a series of diketones (**1b–g**) using ATA113, as well as a novel transaminase (*pf*-ATA) from *Pseudogulbenkiania ferrooxidans*^[10] (Table 1). *Pf*-ATA shares 95 % sequence identity with the transaminase from *Chromobacterium violaceum* (*cv*-ATA; ATCC 12472).^[11] ATA113 mediated the reductive amination of diketones **1b–g**, the



Scheme 3. a, b) Analytical-scale synthesis of (2*S*,5*R*)- and (2*R*,5*R*)-**4a** mediated by MAO-N D5. c) One-pot TA/MAO-N cascade for the preparative-scale asymmetric synthesis of (2*S*,5*R*)-**4a**. Reduction of the starting diketone by NH₃·BH₃ prevented the addition of all of the reagents concurrently.

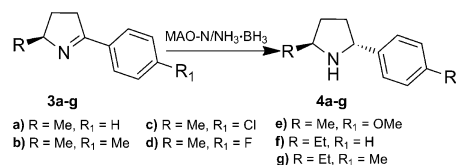
Table 1: TA-mediated reductive amination of **1a–g**.


Entry	Substrate	ω -TA	Conv. [%]	<i>ee</i> [%]
1	1a	ATA113	> 99	> 99 (<i>S</i>)
2		<i>P. ferrooxidans</i>	> 99	75 (<i>S</i>)
3	1b	ATA113	> 99	> 99 (<i>S</i>)
4		<i>P. ferrooxidans</i>	> 99	> 78 (<i>S</i>)
5	1c	ATA113	> 99	> 99 (<i>S</i>)
6		<i>P. ferrooxidans</i>	> 99	68 (<i>S</i>)
7	1d	ATA113	> 99	> 99 (<i>S</i>)
8		<i>P. ferrooxidans</i>	> 99	76 (<i>S</i>)
9	1e	ATA113	> 99	> 99 (<i>S</i>)
10		<i>P. ferrooxidans</i>	> 99	78 (<i>S</i>)
11	1f	ATA113	60	96 (<i>S</i>)
12		<i>P. ferrooxidans</i>	> 99	76 (<i>R</i>)
13	1g	ATA113	> 99	94 (<i>S</i>)
14		<i>P. ferrooxidans</i>	75	46 (<i>R</i>)

products of which spontaneously cyclized to yield pyrrolines **3b–g** as the sole regioisomers with excellent conversion and high *ee* values. Unsurprisingly, replacement of the small methyl group by a larger ethyl substituent resulted in a slightly reduced *ee* (entries 11 and 13). The biotransformations performed with *Pf*-ATA proceeded with reduced selectivity, with *ee* values lower than those achieved with ATA113. Interestingly, replacing the methyl substituent by an ethyl group resulted in a switch in stereoselectivity to give (*R*)-**3f,g** as the predominant enantiomers (entries 12 and 14, see the Supporting Information for absolute configuration and *ee* determination). We also compared the selectivity observed with *pf*-ATA to that of the related *cv*-ATA against diketones **1a** and **1d,e** and noted comparable conversion and selectivity (see the Supporting Information). The (*R*)-selective ATA117 also mediated the reductive amination of diketones **1a** and **1d,e** in > 99% conversion and *ee* (see the Supporting Information).

The efficiency of the MAO-N/NH₃·BH₃ step with the isolated pyrrolines **3b–g** was next examined (Table 2). In general, the D9 variant showed higher selectivity and employing either the D5 or D9 MAO-N variants allowed access to all of the Me/Ar and Et/Ar substituted pyrrolidines in excellent *de*. We have also extended the one-pot TA/MAO-N cascade for the synthesis of (2*S*,5*R*)-**4b**, (2*S*,5*R*)-**4d**, and (2*S*,5*R*)-**4e** in > 99% conversion and > 99% *de* when starting from the corresponding diketones (Table 3), thus demonstrating the generality of this one-pot approach.

In summary, the combination of two complementary biocatalysts has been demonstrated in a novel one-pot chemoenzymatic cascade for the regio- and stereoselective synthesis of a panel of 2,5-disubstituted pyrrolidines from the corresponding 1,4-diketones. The transaminase ω -TA is highly selective for the sterically less demanding methyl ketone while the monoamine oxidase MAO-N shows an overwhelming preference for the more bulky portion of the

Table 2: MAO/NH₃·BH₃-mediated asymmetric synthesis of (2*S*,5*R*)-**4a–g**.


Entry	Substrate	MAO-N variant	<i>de</i> [%] (2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)
1	3a	D5	> 99
2		D9	96
3	3b	D5	88
4		D9	98
5	3c	D5	> 99
6		D9	> 99
7	3d	D5	> 99
8		D9	> 99
9	3e	D5	68
10		D9	> 99
11	3f	D5	64
12		D9	> 99
13	3g	D5	56
14		D9	96

Table 3: ATA113/MAO-N one-pot cascade for the synthesis of (2*S*,5*R*)-**4a**, (2*S*,5*R*)-**4b**, (2*S*,5*R*)-**4d**, and (2*S*,5*R*)-**4e**.

Ketone	ω -TA	MAO-N	Conv. [%]	<i>de</i> [%]
1a ^[a]	ATA113	D5	> 99	> 99 (2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 4a
1b ^[b]	ATA113	D9	> 99	> 99 (2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 4b
1d ^[b]	ATA113	D9	> 99	> 99 (2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 4d
1e ^[b]	ATA113	D9	> 99	> 99 (2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 4e

[a] 25 mM substrate; [b] 5 mM substrate.

corresponding pyrrolidine. The compatibility of the two biocatalysts means that the reaction can be performed in one pot without the need for costly intermediate purification steps. The chemoenzymatic approach exploits four distinct biocatalytic operations and takes advantage of the complementary regioselectivity displayed by the ω -TA and MAO variants to establish two stereogenic centers. All of the biocatalysts described herein are commercially available^[12] and hence readily accessible for practical application.

Received: October 22, 2013

Revised: December 11, 2013

Published online: ■■■■■, ■■■■■

Keywords: biocatalysis · cascade reactions · monoamine oxidase · pyrrolidines · transaminase

[1] a) M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480–12496; b) N. J. Turner, E. O' Reilly, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 285–288.





[2] a) J. H. Schrittwieser, J. Sattler, V. Resch, F. G. Mutti, W. Kroutil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 249–256; b) I. Oroz-Guinea, E. García -Junceda, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 236–249; c) E. Ricca, B. Brucher, J. H. Schrittwieser, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2239–2262; d) J. H. Sattler, M. Fuchs, K. Tauber, F. G.

- Mutti, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 9290–9293; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9156–9159.
- [3] a) M. Höhne, U. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42–51; b) S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993–1001; c) C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305–309; d) D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324–332; e) L. Frodsham, M. Golden, S. Hard, M. N. Kenworthy, D. J. Klauber, K. Leslie, C. Macleod, R. E. Meadows, K. R. Mulholland, J. Reilly, C. Squire, S. Tomasi, D. Watt, A. S. Wells, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 1123–1130; f) M. Alexeeva, A. Enright, M. J. Dawson, M. Mahmoudian, N. J. Turner, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3309–3312; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3177–3180; g) R. Carr, M. Alexeeva, A. Enright, T. S. C. Eve, M. J. Dawson, N. J. Turner, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4955–4958; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4807–4810; h) C. J. Dunsmore, R. Carr, T. Fleming, N. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2224–2225; i) I. Rowles, K. J. Malone, L. L. Etchells, S. C. Willies, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 1259–1261; j) A. Znabet, M. M. Polak, E. Janssen, F. J. J. de Kanter, N. J. Turner, R. V. A. Orru, E. Ruijter, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7918–7920; k) D. Ghislieri, A. P. Green, M. Pontini, S. C. Willies, I. Rowles, A. Frank, G. Grogan, N. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10863–10869; l) D. Ghislieri, D. Houghton, A. P. Green, S. C. Willies, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2869–2872.
- [4] a) T. Li, J. Liang, A. Ambrogelly, T. Brennan, G. Gloor, G. Huisman, J. Lalonde, A. Lekhal, B. Mijts, S. Muley, L. Newman, M. Tobin, G. Wong, A. Zaks, X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6467–6472; b) B. de Lange, D. J. Hyett, P. J. D. Maas, D. Mink, F. B. J. van Assema, N. Sereinig, A. H. M. de Vries, J. G. de Vries, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 289–292.
- [5] a) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194; b) N. J. Turner, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 567–573.
- [6] a) J. B. Brenneman, S. F. Martin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1329–1331; b) F. Xu, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1324–1345; c) S. Hanessian, M. Bayraktarian, X. Luo, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4716–4721.
- [7] a) V. K. Aggarwal, C. J. Astle, M. Rogers-Evans, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1469–1471; b) S. Zhang, L. Xu, L. Miao, H. Shu, M. L. Trudell, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3133–3136; c) A. Goti, S. Cicchi, V. Mannucci, F. Cardona, F. Guarna, P. Marino, T. Tejero, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4235–4238; d) B. M. Trost, D. B. Horne, M. J. Woltering, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6169–6172; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5987–5990; e) E. A. Severino, C. R. D. Correia, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3039–3042.
- [8] a) F. A. Davis, M. Song, A. Augustine, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2779–2786; b) G. S. Lemen, J. P. Wolfe, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2322–2325; c) M. G. Moloney, T. Panchal, R. Pike, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3894–3897; d) C. Enkisch, C. Schneider, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5549–5564; e) K. R. Campos, A. Kalpars, J. H. Waldman, P. G. Dormer, C.-y. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3538–3539; f) F. A. Davis, J. Zhang, H. Qui, Y. Wu, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1433–1436.
- [9] R. C. Simon, B. Grischek, F. Zepeck, A. Steinreiber, F. Belaj, W. Kroutil, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6817–6820; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6713–6716.
- [10] K. G. Byrne-Bailey, K. A. Weber, J. D. Coates, *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 2400–2401.
- [11] U. Kaulmann, K. Smithies, M. E. B. Smith, H. C. Hailes, J. M. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 628–637.
- [12] a) MAO-N Screening Kits: <http://www.discovery-bc.co.uk/monoamineoxidase.php> (**2013**); b) Transaminases: <http://www.codexis.com>.

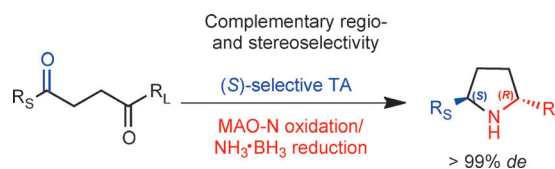
Communications



Biocatalysis

E. O'Reilly, C. Iglesias, D. Ghislieri,
J. Hopwood, J. L. Galman, R. C. Lloyd,
N. J. Turner*    

A Regio- and Stereoselective ω -
Transaminase/Monoamine Oxidase
Cascade for the Synthesis of Chiral 2,5-
Disubstituted Pyrrolidines



Mirror mirror on the wall: A ω -transaminase (ω -TA)/monoamine oxidase (MAO-N) cascade process for the asymmetric synthesis of chiral 2,5-disubstituted pyrrolidines is reported. The methodology exploits the complementary

regio- and stereoselectivity displayed by both enzymes, which ensures that the stereogenic center established by the TA reaction is not affected by the MAO-N catalyzed step.

DOI: 10.1002/cctc.201300990



Monoamine Oxidase- ω -Transaminase Cascade for the Deracemisation and Dealkylation of Amines

Cesar Iglesias,^{[b][+]} Elaine O'Reilly,^{[a][+]} and Nicholas J. Turner*^[a]

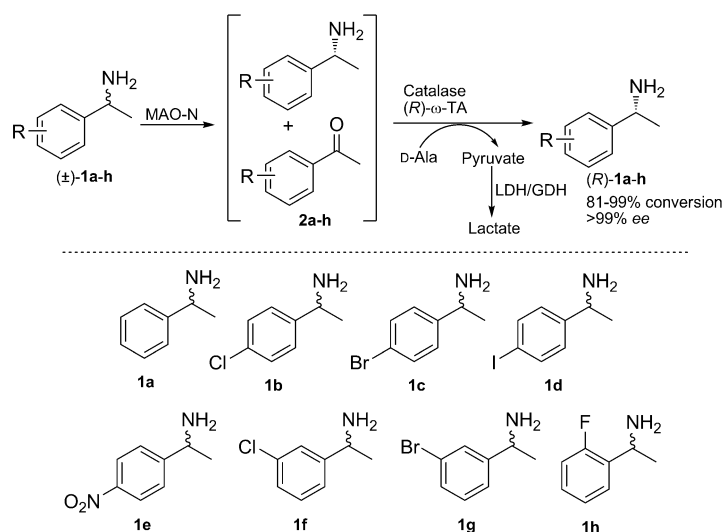
Herein we report a one-pot protocol for the deracemisation of chiral benzylic amines employing a novel monoamine oxidase- ω -transaminase cascade, allowing access to enantiopure compounds in $>99\%$ ee. We also demonstrate that the same enzymatic cascade can be employed for the dealkylation of secondary amines with $>99\%$ conversion.

Chiral amines are prevalent in bioactive natural products and active pharmaceutical ingredients (APIs), leading to a demand for simple and cost-effective methods for their production in optically pure form. Although the chemical industry has traditionally relied on established chemical methods for the synthesis of optically pure amines, there is growing interest in the development of biocatalytic routes for their preparation.^[1] The exceptional selectivity of enzymes and their compatibility under similar reaction conditions has allowed multi-enzyme cascade processes to be designed, avoiding the use of protecting groups and costly intermediate purification steps. Although the simplicity of enzyme-mediated kinetic resolution means that it is one of the most common methods for accessing optically enriched amines or their derivatives from racemates, the major limitation of this approach is the maximum 50% yield achievable. Dynamic kinetic resolution (DKR) approaches remain of limited use for the production of optically pure amines and few examples have been reported.^[2] Additionally, a number of elegant enzymatic and chemo-enzymatic routes for the deracemisation of amines have been developed.^[3]

Recent advancements in protein engineering have led to a significant increase in the number of enzymes with suitable properties for industrial biocatalytic applications.^[4] This was highlighted by the recent development and application of engineered transaminase (TA) and monoamine oxidase (MAO-N) variants for the asymmetric syntheses of APIs sitagliptin and boceprevir.^[4c,d] ω -TAs have been shown to

catalyse the reversible aminations of carbonyl compounds such as aldehydes and ketones, providing an attractive route for the preparation of chiral primary amines.^[1,5] A number of reports describing the deracemisation of amines employing ω -TAs have also emerged.^[3,5] Kroutil and co-workers reported a two-step procedure for the deracemisation of a range of primary amines by exploiting enantiocomplementary TAs to achieve an initial resolution followed by an asymmetric synthesis.^[6] Yun and co-workers recently developed a one-pot, one-step deracemisation method by using enantiocomplementary ω -TAs in which the (*R*)-TA had negligible activity towards the amine acceptor.^[7]

MAO-N from *Aspergillus niger*, in combination with the non-selective chemical reducing agent ammonia borane ($\text{NH}_3\cdot\text{BH}_3$), has been exploited for the chemoenzymatic deracemisation of a range of structurally diverse amines.^[8] The approach relies on selective oxidation of the (*S*)-amine by MAO-N followed by



Scheme 1. MAO-N/ ω -TA cascade for the deracemisation of primary amines 1a-h.

non-selective reduction with $\text{NH}_3\cdot\text{BH}_3$, resulting in accumulation of the (*R*)-enantiomer over time. Although this approach has been successfully applied for the deracemisation of cyclic amines, its utility with acyclic structures is limited by competing hydrolysis of the imine under aqueous conditions.^[8e]

In this Communication, we overcome this limitation by exploiting the rapid hydrolysis of imines to give the corresponding ketone and, subsequently, employing an ω -TA to regenerate the chiral amine. Our approach (Scheme 1) relies on selective MAO-N mediated oxidation of the (*S*)-enantiomer of the

[a] Dr. E. O'Reilly,[†] Prof. N. J. Turner
School of Chemistry, University of Manchester
Manchester Institute of Biotechnology
131 Princess Street, Manchester, M1 7DN (UK)
Fax: (+44) 0161-275-1311
E-mail: nicholas.turner@manchester.ac.uk
Homepage: <http://www.coebio3.manchester.ac.uk/>

[b] C. Iglesias[†]
Facultad de Química
Universidad de la República
(Uruguay)

[†] Both authors contributed equally to this work.

amine to the imine which undergoes spontaneous hydrolysis to the corresponding ketone (**2a–h**). Subsequent reductive amination mediated by an ω -TA provides access to the optically pure (*R*)-amines. The application of this one-pot MAO-N/ ω -TA cascade for the selective *N*-dealkylation of secondary amines is also described.

α -Methylbenzyl amine (α -MBA) **1a** was used as a model compound to assess the efficiency of the deracemisation method (Scheme 1). We have previously reported the kinetic resolution of a similar panel of MBA derivatives by using commercially available ω -TA, ATA117.^[9]

Optically pure MBA analogues have been employed as chiral auxiliaries,^[10] for chiral derivatisation^[11] and for the synthesis of peptides.^[12] Amine *rac*-**1a** was subjected to the purified MAO-N D9 variant in phosphate buffer, providing a 50:50 mixture of **2a** and (*R*)-**1a** after 16 h. Despite the high conversion of acetophenone to (*R*)- α -MBA catalysed by ATA117, subsequent reductive amination by the TA in the same pot initially resulted in poor conversion of **2a** to (*R*)-**1a** ($\approx 70\%$), with 30% of the ketone remaining. We hypothesised that the H₂O₂ by-product from the MAO-N reaction was negatively affecting the TA reaction, thus, the cascade was repeated in the presence of a biocatalytic peroxide scavenger. Co-addition of catalase with the TA and lactate dehydrogenase/glucose dehydrogenase (LDH/GDH) system following MAO-N oxidation and hydrolysis provided (*R*)-**1a** in $>99\%$ conversion and $>99\%$ *ee*. Exposure of racemic α -MBA derivatives **1b–h** to the same deracemisation protocol provided the (*R*)-enantiomers in good conversion and excellent *ee* (Table 1). We have also used MBA derivative **1e** to

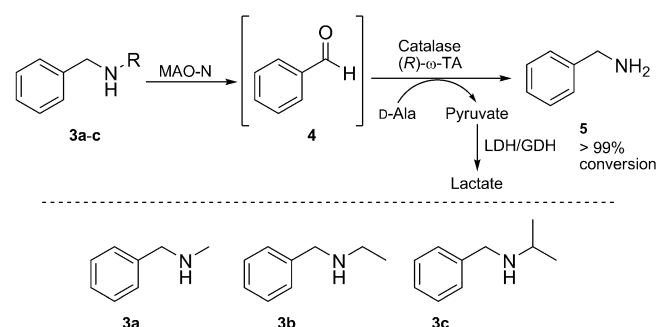
Rac-1	Conversion ^[a] [%]	(<i>R</i>)-enantiomer <i>ee</i> [%]
1a	99	>99
1b	87	>99
1c	91	>99
1d	90	>99
1e	99	>99
1f	90	>99
1g	90	>99
1h	81	>99

[a] Based on conversion of the ketone.

demonstrate that the deracemisation can be performed in one pot with all five biocatalysts and reagents present from the beginning of the biotransformation without compromising conversion or *ee*.

Many *N*-alkylamines and their corresponding dealkylated derivatives, including members of the opioid family, have potent biological activity and as such, *N*-dealkylation is an important transformation in the pharmaceutical industry. A number of chemical approaches for the dealkylation of amines have been reported, often requiring harsh reaction conditions.^[13] *N*- and *O*-demethylation is a pivotal transformation in drug metabolism and natural biosynthetic pathways and enzymes such as

cytochromes P450 are known to catalyse this reaction with excellent selectivity^[14] but often display limited substrate scope. We have previously demonstrated that MAO-N variants selectively oxidise amines substituted with bulky alkyl groups in preference to those with smaller groups.^[8b,e–g] Hence, we exposed secondary amines **3a–c** to the MAO-N/ ω -TA combination with the aim of accessing the dealkylated product, benzylamine (Scheme 2). As expected, MAO-N D9 mediated the oxi-



Scheme 2. MAO-N/ ω -TA cascade for the overall dealkylation of amines **3a–c**.

native *N*-debenzylation of **3a–c** selectively, leading to the synthesis of benzaldehyde **4**, which was converted to benzylamine **5** by using ATA117 and an excess of *D*-alanine, following peroxide scavenging. The overall transformation proceeded with $>99\%$ conversion, formally representing a method for selective amine dealkylation in aqueous media under benign conditions.

The selectivity displayed by engineered MAO-N variants in the oxidation of either bulky, lipophilic (MAO-N D11) or sterically less demanding, alkyl substituted amines (MAO-N D5 or D9)^[8e,f] suggests that this methodology is not limited to aryl-alkyl systems but may be effective for mediating regioselective *N*-dealkylations of unsymmetrical dialkyl secondary amines. Further optimisation is required to reduce the quantity of expensive alanine donor employed, which includes the possibility of recycling the methyl-, ethyl- and isopropylamine by-products formed during the dealkylation of **3a–c** as alternative amine donor sources, representing an atom efficient and mild approach to the dealkylation of secondary amines.

In summary, we have developed a one-pot enzymatic cascade process for the deracemisation of chiral amines, providing the (*R*)-amines in $>99\%$ *ee*. This one-pot protocol exploits five commercially available biocatalysts for selective amine oxidation (MAO-N), peroxide scavenging (catalase), asymmetric reductive amination (ω -TA), pyruvate removal (LDH) and cofactor recycling (GDH). Significantly, all five biocatalysts can be added together without affecting conversion or selectivity. This approach has potential to enhance the *ee* of poorly selective TA biotransformations by recycling the undesired (*S*)-enantiomer. We have also demonstrated that the MAO-N/ ω -TA combination can be applied to the selective oxidation and hydrolysis of secondary amines followed by reductive amination, formally representing a biocatalytic route for *N*-dealkylation. The broad substrate spectrum of MAO-N and increasing substrate scope

of ω -TAs means that this approach has the potential to become an efficient route to a diverse range of optically active amines.

Experimental Section

General

GC flame ionization detector (FID) analysis was performed on Agilent 6850 equipped with a Gerstel MultiPurpose Sampler MPS2L and a Varian CP CHIRASIL-DEX CB column (25 m \times 0.25 mm, d_f = 0.25 μ m). Amines were acetylated by using acetic anhydride and triethylamine at RT prior to GC-FID analysis. HPLC analysis was performed on an Agilent system equipped with a G1379A degasser, G1312A binary pump, G1329 auto sampler unit, G1315B diode array detector and G1316A temperature-controlled column compartment with a CHIRALPAK IC analytical column (250 mm length, 4.6 mm diameter, 5 μ m particle size).

Materials

Commercially available reagents were used throughout without further purification. All reagents and solvents were purchased from Sigma Aldrich or Alfa Aesar. *Escherichia coli* BL21(DE3) were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Cells were grown routinely in baffled flasks and harvested at 8000 rpm at 4 °C for 20 min. Commercially available ATA117, LDH-103 and GDH (CDX-9012) were purchased from Codexis in the form of lyophilised cell extracts. Catalase (from bovine liver) was purchased from Sigma Aldrich (C9322). The gene encoding for the MAO-N D9 variant was expressed and the protein purified according to a previously reported procedure.^[8e]

Biotransformations

One-pot sequential procedure

Purified MAO-N D9 (25 μ L, 0.52 mg mL⁻¹) was added to 1 mL of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer (100 mM, pH 7.5) containing the racemic amine substrate (5 mM, from a 200 mM stock in DMSO) and incubated at 37 °C for 20 h. Following complete conversion of the (*S*)-enantiomer to the corresponding ketone (monitored by chiral GC-FID), catalase (5 mg mL⁻¹) was added and the reaction incubated for 5 min at RT. Commercially available ATA117 (2.5 mg mL⁻¹), pyridoxal phosphate (2.02 mM), NAD⁺ (1.5 mM), glucose (10 mg mL⁻¹, 55.5 mM), GDH (50 U), LDH (113 U) and *D*-alanine (45 mg mL⁻¹, 500 mM) were then added to the biotransformation and the pH of the mixture was adjusted to 7.5. Following incubation at 37 °C for a further 16 h, the mixture was basified by adjusting it to pH 12 with 5 M NaOH and extracted with EtOAc (1 \times 300 μ L) prior to derivatisation.

One-pot procedure

Commercially available ATA117 (2.5 mg mL⁻¹) was rehydrated in HEPES buffer (1 mL, 100 mM, pH 7.5) containing PLP (2.02 mM), NAD⁺ (1.5 mM), glucose (10 mg mL⁻¹, 55.5 mM), GDH (50 U), LDH (113 U) and *D*-alanine (45 mg mL⁻¹, 500 mM). Purified MAO-N D9 (25 μ L, 0.52 mg mL⁻¹) and catalase (5 mg mL⁻¹) were added with racemic **1e** (5 mM from a 200 mM stock in DMSO) and the mixture incubated at 37 °C, 250 rpm for 24 h. The mixture was basified by

adjusting it to pH 12 with 5 M NaOH, extracted with EtOAc (1 \times 300 μ L) and analysed by chiral HPLC without derivatisation.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement n^o 266025 BIONEXGEN and grant agreement n^o 245144 AMBIOCAS. The authors also acknowledge funding from ANII MOV_CA_2012_1_7759 and CSIC-UdelaR-Uru-guay.

Keywords: biotransformations • chiral amines • dealkylation • deracemisation • enzyme catalysis

- [1] a) H.-P. Meyer, N. J. Turner, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2009**, *6*, 300–306; b) R. C. Simon, F. G. Mutti, W. Kroutil, *Drug Discovery Today Technol.* **2013**, *10*, e37–44; c) M. M. Heberling, B. Wu, S. Bartsch, D. B. Janssen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 250–260; d) G. W. Huisman, S. J. Collier, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 284–292; e) D. Muñoz Solano, P. Hoyos, M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, J. M. Sánchez-Montero, *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 196–207; f) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42–51.
- [2] a) J. Paetzold, J. E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17620–17621; b) A. N. Parvulescu, P. A. Jacobs, D. E. De Vos, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2034–2043; c) M. Stirling, J. Blacker, M. I. Page, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1247–1250; d) S. Gastaldi, S. Escoubet, N. Vanthuyne, G. Gil, M. P. Bertrand, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 837–839; e) Y. Ahn, S.-B. Ko, M.-J. Kim, J. Park, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 647–658.
- [3] N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115–121.
- [4] a) N. J. Turner, E. O'Reilly, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 285–288; b) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194; c) C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305–309; d) T. Li, J. Liang, A. Ambrogelly, T. Brennan, G. Gloor, G. Huisman, J. Lalonde, A. Lekhal, B. Mijts, S. Muley, L. Newman, M. Tobin, G. Wong, A. Zaks, X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6467–6472.
- [5] a) S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993–1001; b) D. Koszelewski, K. Yauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324–332; c) L. Frodsham, M. Golden, S. Hard, M. N. Kenworthy, D. J. Klauber, K. Leslie, C. Macleod, R. E. Meadows, K. R. Mulholland, J. Reilly, C. Squire, S. Tomasi, D. Watt, A. S. Wells, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 1123–1130.
- [6] D. Koszelewski, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2289–2292.
- [7] G. Shin, S. Mathew, M. Shon, B.-G. Kim, H. Yun, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 8629–8631.
- [8] a) M. Alexeeva, A. Enright, M. J. Dawson, M. Mahmoudian, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3177–3180; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3309–3312; b) R. Carr, M. Alexeeva, A. Enright, T. S. C. Eve, M. J. Dawson, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4807–4810; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4955–4958; c) C. J. Dunsmore, R. Carr, T. Fleming, N. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2224–2225; d) I. Rowles, K. J. Malone, L. L. Etchells, S. C. Willies, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 1259–1261; e) D. Ghislieri, A. P. Green, M. Pontini, S. C. Willies, I. Rowles, A. Frank, G. Grogan, N. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10863–10869; f) D. Ghislieri, D. Houghton, A. P. Green, S. C. Willies, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2869–2872; g) E. O'Reilly, C. Iglesias, D. Ghislieri, J. Hopwood, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, DOI: 10.1002/anie.201309208; *Angew. Chem.* **2014**, 10.1002/ange.201309208.
- [9] J. Hopwood, M. Truppo, N. J. Turner, R. C. Lloyd, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 773–775.
- [10] E. O'Reilly, D. Balducci, F. Paradisi, *Amino Acids* **2010**, *39*, 849–858.
- [11] S. R. Chaudhari, N. Suryaprakash, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6410–6419.

- [12] a) E. O'Reilly, E. Lestini, D. Balducci, F. Paradisi, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1748–1750; b) E. O'Reilly, L. Pes, F. Paradisi, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1696–1697.
- [13] a) P. Emond, J. Helfenbein, S. Chalon, L. Garreau, J. Vercouillie, Y. Frangin, J. C. Besnard, D. Guilloteau, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1849–1855; b) S. Thavaneswaran, K. McCamley, P. J. Scammells, *Nat. Prod. Commun.* **2006**, *1*, 885–897; c) L. S. Schwab, *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 698–702; d) J. A. Ripper, E. R. T. Tiekink, P. J. Scammells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 443–445.
- [14] a) E. M. Isin, F. P. Guengerich, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2007**, *1770*, 314–329; b) M. J. Cryle, J. E. Stok, J. J. De Voss, *Aust. J. Chem.* **2003**, *56*, 749–762; c) F. P. Guengerich, *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 611; d) B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947–3980; e) E. O'Reilly, M. Corbett, S. Hussain, P. P. Kelly, D. Richardson, S. L. Flitsch, N. J. Turner, *Catal. Sci. Technol.* **2013**, *3*, 1490–1492.

Received: November 19, 2013

Revised: December 19, 2013

Published online on February 12, 2014

Identification, expression and characterization of an *R*- ω -transaminase from *Capronia semiimmersa*

César Iglesias^{1,2} · Paola Panizza^{1,2} · Sonia Rodríguez Giordano^{1,2}

Received: 28 December 2016 / Revised: 22 April 2017 / Accepted: 26 April 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract Chiral amines are essential precursors in the production of biologically active compounds, including several important drugs. Among the biocatalytic strategies that have been developed for their synthesis, the use of ω -transaminases (ω -TA) appears as an attractive alternative allowing the stereoselective amination of prochiral ketones. However, the problems associated with narrow substrate specificity, unfavourable reaction equilibrium and expensive amine donors still hamper its industrial application. The search for novel enzymes from nature can contribute to expand the catalytic repertoire of ω -TA and help to circumvent some of these problems. A genome mining approach, based on the work described by Höhne et al., was applied for selection of potential *R*- ω -TA. Additional criteria were used to select an enzyme that differs from previously described ones. A candidate *R*- ω -TA from *Capronia semiimmersa* was selected, cloned and expressed in *Escherichia coli*. Interestingly, alignment of this enzyme with previously reported TA sequences revealed the presence of two additional amino acid residues in a loop close to the active site. The impact of this change was analysed with a structural model based on crystallized *R*- ω -TAs. Analysis of the substrate specificity of *R*- ω -TA from *C. semiimmersa* indicates that it accepts a diversity of ketones as

substrates yielding the corresponding amine with good yields and excellent enantioselectivity. The expressed enzyme accepts isopropylamine as amine donor what makes it suitable for industrial processes.

Keywords *R*- ω -transaminase · Chiral amines · Biocatalysis · *Capronia semiimmersa*

Introduction

Optically pure amines are important building blocks in the synthesis of many natural products and pharmaceuticals (Cassiano 2010; Welsch et al. 2010; Newman and Cragg 2012). During the last decade, many efforts have been directed to the development of biocatalytic procedures for their synthesis, encompassing the use of lipases, monoamine oxidases, ammonia lyases, imine reductases and transaminases (Turner 2011; Kroutil et al. 2013; Kohls et al. 2014; Schrittwieser et al. 2015; Angajala et al. 2016). ω -transaminases provides the appealing possibility of synthesizing enantiomerically pure amines from the corresponding prochiral ketone with excellent enantioselectivity. Furthermore, both enantiomers of a given amine can be obtained with a particular transaminase. One of the enantiomers can be prepared directly by transamination of the prosterogenic ketone, while the opposite one can be obtained by kinetic resolution of the corresponding racemic amine. This strategy was applied several times for the synthesis of amines with *R* configuration using *S*- ω -transaminases, since *R*-selective transaminases were scarce (Koszelewski et al. 2010a, b). However, this procedure has the disadvantage associated with every kinetic resolution; the maximum theoretical yield is 50% while if an *R*- ω -TA was available, a 100% yield could be achieved. This prompted research in the area, and several *R*- ω -TA

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-017-8309-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Sonia Rodríguez Giordano
soniar@fq.edu.uy

¹ Cátedra de Microbiología, DEPBIO, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay

² Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, DEPBIO-DQO, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay

have been described, although much work remains to be done in order to have an adequate repertoire of biocatalysts (Höhne et al. 2010; Iwasaki et al. 2011; Jiang et al. 2015).

Most transaminases described up to date have (*S*) selectivity, as can be seen from the results obtained on the screening for ω -TA activity among bacterial strain collections (Clay et al. 2010; Koszelewski et al. 2010a, b). Among commercial ω -TA, there are mostly *S*-selective enzymes; thus, the search for new enzymes with opposite enantioselectivity has been a major goal over the last years.

The first reported *R*-selective transaminase biocatalyst based on *Arthrobacter* was described by Iwasaki in 2006 (Iwasaki et al. 2006, 2011), although complete characterization was not reported until later (Iwasaki et al. 2011). In 2010, the work by Höhne and coworkers open doors to uncover novel *R*- ω -TA (Höhne et al. 2010). They developed an in silico strategy to find enzymes with complementary enantiopreference by searching in protein databases. Among the two classes of transaminases, they analysed that all the known enzymes belonging to fold class I are *S*-selective, while *D*-amino acid aminotransferases (DATAs) (Sugio et al. 1995) are members of fold class IV. In addition, *L*-branched chain amino acid aminotransferases (BCATs) (Goto et al. 2003) belong to the same fold class, demonstrating that this group of enzymes presents certain flexibility in the architecture of the active site. This indicated that natural *R*-transaminases will likely be part of class IV dependant PLP enzymes. A comparison of the active site structure for *D*-ATA, BCAT and 4-amino-4-deoxychorismate lyase (ADCL), and a careful analysis of important, conserved residues on the active site of each type of enzyme, were the basis to develop an algorithm that easily discarded all BCAT, *D*-ATA and ADCL from a protein database. The application of the developed algorithm to protein data gathered from public databases resulted in the identification of 20 potential *R*-transaminases, seven of which were further characterized in a paper by Schätzle (Höhne et al. 2010; Schätzle et al. 2011). Indeed, they all presented *R*- ω -TA activity. In that way, they validated the power of the developed bioinformatic strategy. Following their work, Jiang and coworkers described the use of a simplified procedure, a short motif sequence blast, to identify five different *R*- ω -TA (Jiang et al. 2015). However, the best substrates for the identified enzymes were α -amino acids and not methyl ketones as expected.

An additional limitation of available *R*- ω -transaminases is the restricted substrate specificity, since they all require methyl ketones to attain good biotransformation yields. This restriction has been overcome by protein engineering and directed evolution. This strategy was applied to the development of the *R*-selective transaminase ATA-117-Rd.-11 (Savile et al. 2010). This modified enzyme has 27 amino acid substitutions, and it has activity

on larger substrates. The developed enzyme has been applied to the industrial manufacture of the diabetes medication drug Janubia (Sitagliptin). Furthermore, this enzyme has the advantage that it accepts isopropylamine as an amine donor, what facilitates industrial application of this biocatalyst. The *Arthrobacter* wild-type enzyme, as well as many other described ω -TA do not accept isopropylamine as amine donor, and the more expensive *L*- or *D*-alanine-based multienzymatic system must be used instead (Paul et al. 2014).

The above-mentioned limitations have prompted research in the area oriented to uncover novel enzymes with expanded substrate specificity as well as expanding the repertoire of enzymes with *R*-stereoselectivity. In this paper, we describe the identification, cloning, expression and characterization of a novel *R*- ω -transaminase from *Capronia semiimmersa*.

Experimental

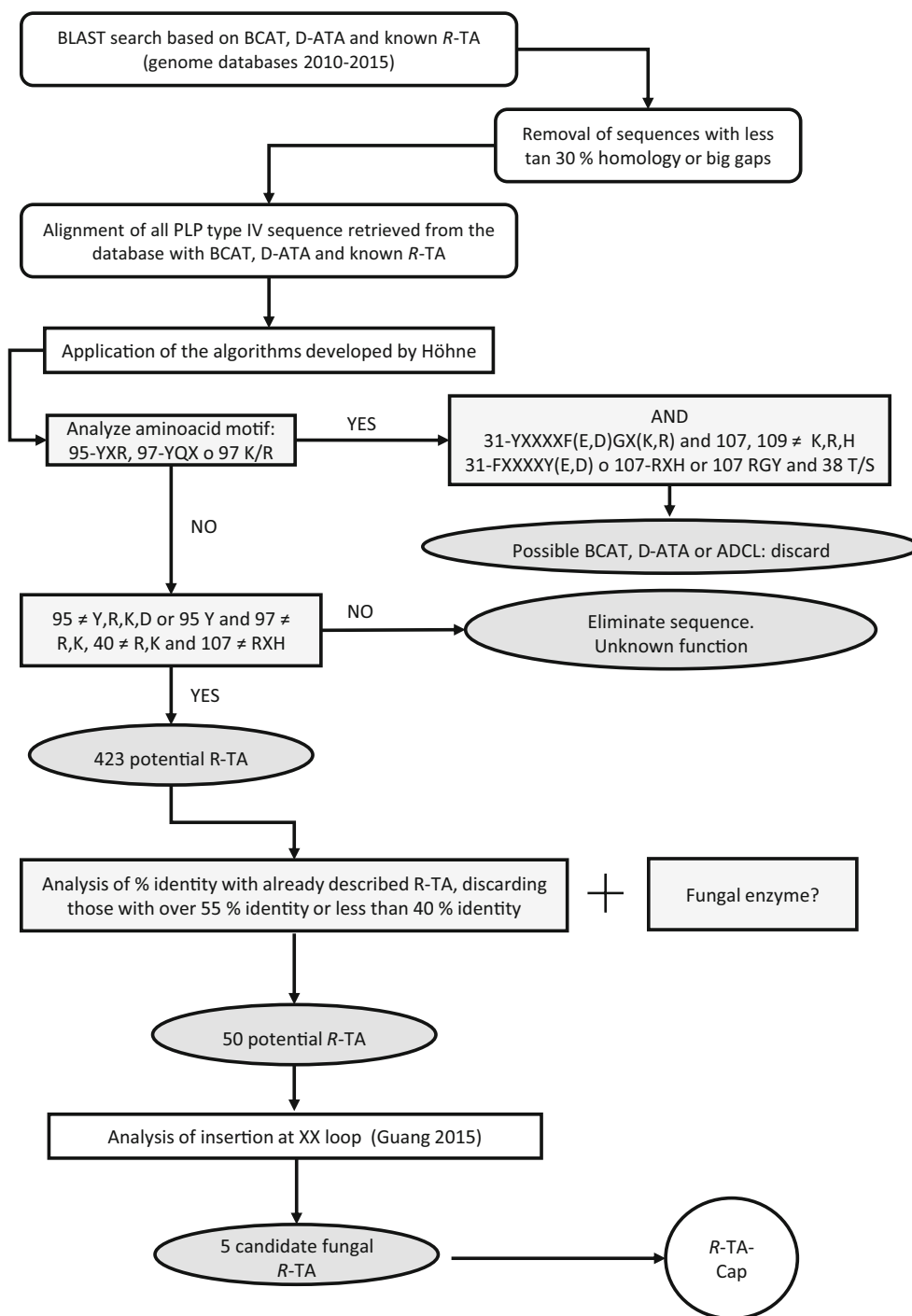
Strains and growth conditions

Escherichia coli JM109 and *E. coli* BL21(DE3) were routinely cultivated in Luria–Bertani (LB) broth or on LB agar plates at 37 °C. Recombinant strains *E. coli* JM109 (pKK223-*R*-TA Cap) and *E. coli* BL21(DE3) (pET28-*R*-TA Cap) were grown in LB agar plates or LB broth, supplemented with the appropriate antibiotic (ampicillin 200 μ g/mL or kanamycin 50 μ g/mL) and IPTG when needed. Autoinduction media AIM-Terrific Broth Base including trace element was used for *R*-TA Cap protein production from *E. coli* BL21(DE3) (pET22b-*R*-TA Cap).

Chemicals and molecular biology reagents

Biotransformation substrates were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) and were used without further purification. Racemic amines used as analytical standards were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), while chiral amines were produced from the prochiral ketones through transamination with *Chromobacterium violaceum* ATA (cv-ATA, ATCC 12472, NCIMB 9178) and ATA 117 from Codexis. Molecular biology reagents were purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). *E. coli* JM109 and *E. coli* BL21 (DE3) cells were obtained from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Expression vector pET-22b was purchased from Novagen (Darmstadt, Germany) and was used for gene expression.

Fig. 1 Schematic representation of the bioinformatic process followed to identify *R*-TA Cap. Aminoacid positions refer to Fig. 2 and followed the assignment made by Höhne and coworkers



In silico identification of *R*- ω -TA

Four independent BLAST searches were performed using two *R*- ω -TA (UniProtKB Q0C8G1 and C7YVL8), P19938 (BCAT) and P0AB80 (D-ATA) (Lyskowski et al. 2014; Sayer et al. 2014). BLAST searches (Altschul et al. 1997) were performed at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) webpage (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The

obtained sequences were aligned in pools of 1000 sequences, using Clustal Omega (Thompson et al. 1994; Larkin et al. 2007). The algorithm established by Höhne and coworkers was manually applied in order to discard all BCAT, D-ATA or ADCL (Fig. 1) (Höhne et al. 2010). The remaining sequences were analysed for sequence identity compared to ATA 117 from *Arthrobacter* known *R*- ω -TA, discarding all those that presented more than 55% or less than 40% identity.

Additionally, the search was restricted to fungal enzymes. Finally, an analysis of the structural differences in the 107–109 loop (Guan et al. 2015), followed by an analysis of the rest of the protein sequence space, was performed (Fig. S2).

DNA manipulation and *R*-TA Cap cloning

Standard procedures were used for DNA manipulation (Sambrook and Russell 2001). Plasmid DNA was purified using commercial chromatography kits (Thermo Fisher Scientific). Restriction enzymes and thermostable polymerases were used according to the manufacturers' instructions. PCR amplifications were performed in a GeneAMP PCR system 2400 (Perkin Elmer) using adequate cycling periods. Nucleic acid concentration and purity was measured using a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer.

R-TA Cap sequence was optimized for *E. coli* (accession number: BankIt1979473 Synthetic KY419567, [supplementary information](#)) and gene synthesis was performed by GeneScript (Piscataway, NJ, USA). The synthesized gene was cloned in pKK223-3 and transformed into *E. coli* JM109 for moderate protein expression. PCR amplification with primers CI *R*-TACap Fw and CI *R*-TACap Rv, followed by digestion with *Hind*III and *Eco*RI, allowed subcloning of the *R*-TA Cap gene into pET 22b+ (Novagen, Darmstadt, Germany) containing an *N*-terminal His₆ tag. Amplified DNA bands were purified by gel electrophoresis using the Freeze 'n squeeze kit (Bio-Rad, CA, USA). The obtained vector was transformed into *E. coli* BL21(DE3).

Primers CI *R*-TACap Fw: AAGCTTATGACCAC GATGGAAAAATTT

CI *R*-TA Cap Rv: ACGGTTTCTGTCAATGGCAA AGCA

Bioinformatic analysis

BLAST search (Altschul et al. 1997) was performed at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) webpage (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Alignment of protein sequences was performed using Clustal Omega (Thompson et al. 1994; Larkin et al. 2007). Evolutionary analyses were conducted in MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the JTT matrix-based model (Jones et al. 1992). The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analysed (Felsenstein 1985). Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches (Felsenstein 1985). Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbour-

Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using a JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The analysis involved 11 amino acid sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There was a total of 246 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (Kumar et al. 2016).

Structure prediction of *R*-TA Cap was conducted by YASARA's homology modelling experiment, version 16.9.23.W. 64 with default settings (Krieger and Vriend 2014). *R*- ω -TAs from *Nectria hematococa* (PDB 4CMF) (Sayer et al. 2014), *A. fumigatus* (PDB 4CHI) (Thomsen et al. 2014), *A. terreus* (PDB 4CE5) (Lyskowski et al. 2014) and *Arthrobacter* (PDB 3WWH) and the *Arthrobacter* mutant G136F (PDB 3WWI) (Guan et al. 2015) were used as structural templates. To aid alignment correction and loop modelling, a secondary structure prediction for the target sequence was obtained. This was achieved by running PSI-BLAST to create a target sequence profile and feeding it to the PSI-Pred secondary structure prediction algorithm (Jones 1999). A total of 24 independent models were created and YASARA combined the best parts of the 24 models to obtain a hybrid model. The final Z score was -0.379 .

Overexpression and purification of the *R*-TA Cap

Fresh plates of *E. coli* BL21(DE3) (pET22b-*R*-TA Cap) were streaked from frozen stocks, and a single colony was used to inoculate 5 mL of LB-Amp. The culture was incubated in a rotary shaker overnight (200 rpm, 37 °C), and 1 mL of this culture was used to inoculate 100 mL of fresh LB-ampicillin in a 500 mL Erlenmeyer flask. The fresh culture was grown under the same conditions until it reached an OD₆₀₀ of 0.5 (approximately 2.5 h), and then IPTG was added to a final concentration of 1 mM. After 24-h induction at 28 °C, recombinant *E. coli* cells were harvested by centrifugation and disrupted by sonication (10 s pulses at 20% of amplitude during 20 s, repeated 20 times). Alternatively, autoinduction media was used for protein production. In this case, 1 mL of this culture was used to inoculate 100 mL of Autoinduction media Terrific Broth Base including trace elements in a 500-mL Erlenmeyer flask; the fresh culture was grown for 24 h at 28 °C.

For purification purposes, the cell pellet was suspended (1 g of wet cell paste/10 mL) in HEPES buffer 1 (100 mM, 1 mM PLP, 5 mM imidazole, pH 8). The cell pellet was lysed in an iced bath by ultra-sonication with a Soniprep 150 (20 cycles of 20 s on/20 s off). After centrifugation (4 °C, 16,000×g, 20 min), the supernatant was loaded onto a 1-mL HisTrap column. Purification was achieved manually. The column was initially washed with five column volumes HEPES buffer 1, followed by elution with HEPES buffer 2 (100 mM, 1 mM PLP, 300 mM imidazole, pH 8.0). The protein was eluted

using 10 column volumes of 100% elution buffer. One-milliliter fractions were collected during the elution process and protein concentration was evaluated by UV280. Those fractions containing *R*-TA Cap were pooled together. The protein solution was concentrated in an Amicon® Ultra-15 10K Centrifugal Filter device and the purified enzyme was desalted with a PD10 desalting column.

Kinetic resolution of racemic amines with whole cell systems

Assays were performed with whole cells of *E. coli* (pKK223-*R*-TA Cap). Cells were grown as described above. The cells were centrifuged and washed twice with HEPES buffer (100 mM, pH 7.5). Finally, cells were suspended in the reaction buffer, HEPES buffer (100 mM, pH 7.5) containing 1 mM PLP, to a final concentration of 0.1 g cells/mL. The substrate was added to a 5 mM final concentration from a 200 mM stock of the racemic amine in DMSO. The reaction was incubated at 30 °C, 200 rpm, 24 h.

Reactions were quenched by addition of 10 M NaOH (100 μ L). Then, the mixture was extracted twice with ethyl acetate (0.5 mL), the organic layer was separated by centrifugation (2 min, 13,000 rpm). The organic phase was dried with Na₂SO₄. Percent conversion and enantiomeric excess was determined as establish in analytical methods.

Determination of *R*-TA Cap kinetic parameters

Transaminase activity was determined according to the method reported by Schätzle et al. (Schätzle et al. 2009). Spectrophotometric measurements were conducted in UV-Star® 96 well microtiter plates (Greiner, Monroe, USA) at 30 °C and 250 nm using an Infinite® M200 PRO photometer (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). For determination of *K_m* and *K_{cat}* the reaction mixture contained HEPES buffer 50 mM pH 8, 2.5 mM pyruvate, 0.055 mM PLP, 1% DMSO and 22.5 μ g/mL of the purified enzyme, with varying amounts of *R*- α -methylbenzylamine (*R*-MBA 2a) from 0.12 to 12 mM in a total volume of 200 μ L. Triplicates for each *R*-MBA concentration were used, and kinetic spectrophotometric measures were taken every 40 s for 20 min. A calibration curve of absorbance at 250 nm vs acetophenone concentration in the reaction mixture was used to calculate acetophenone concentration. Initial reaction rates were calculated for each *R*-MBA concentration and *V_i* vs *R*-MBA concentration was plotted. Kinetic parameters were determined by Lineweaver-Burk linearization of the Michaelis Menten equation (Cornish-Bowden 1995). For optimal temperature determination, the reaction mixture contained HEPES buffer 50 mM pH 8, 2.5 mM pyruvate, 3 mM *R*-MBA, 0.055 mM PLP, 1% DMSO and 22.5 μ g/mL of the purified enzyme in a total volume of 300 μ L. Triplicates of the reaction were incubated

at different temperatures ranging from 4 to 60 °C for 15 min. Reactions were stopped by cooling to 0 °C. Two hundred-microliter samples of each reaction were transferred to a UV-Star® 96 well microtiter plates and absorbance at 250 nm was measured in the spectrophotometer.

Asymmetric synthesis of optically pure amines using *D*-alanine as amine donor

In a 1.5-mL Eppendorf tube, reaction volume 0.5 mL, substrate 1a to 1j (5 mM final concentration from a 200 mM stock solution in DMSO) was dissolved in 100 mM HEPES buffer pH 7.5, 2 mM PLP, NAD⁺ (1.5 mM), glucosa (10 mg/mL, 55.5 mM), GDH (50 U), LDH (113 U) and *L*-alanine (Cv-ATA) or *D*-alanine (*R*-TA Cap) (45 mg/mL, 500 mM). The enzyme solution was added (2 mg/mL purified enzyme). The reactions were placed in a rotary shaker (200 rpm, 37 °C, 24 h). Reactions were quenched by addition of 10 M NaOH (100 μ L). The mixture was extracted twice with ethyl acetate (0.5 mL) and the organic layer was separated by centrifugation (2 min, 13,000 rpm). The organic phase was dried with Na₂SO₄. Percent conversion and enantiomeric excess was determined as establish in analytical methods.

Asymmetric synthesis of optically pure amines using isopropylamine as amine donor

In a 1.5-mL Eppendorf tube, reaction volume 0.5 mL, substrate 1a, 1b, 1h–i (5 mM final concentration from a 200 mM stock solution in DMSO) was dissolved in 100 mM HEPES buffer pH 7.5, 2 mM PLP, 0.5 M isopropylamine. The enzyme solution was added (3 mg/mL purified enzyme). The reactions were placed in a rotary shaker (200 rpm, 37 °C, 24 h). Reactions were quenched by addition of 10 M NaOH (100 μ L). Then, the mixture was extracted twice with ethyl acetate (0.5 mL); the organic layer was separated by centrifugation (2 min, 13,000 rpm). The organic phase was dried with Na₂SO₄. Percent conversion and enantiomeric excess was determined as establish in analytical methods.

Analytical methods

GC analysis

Enantiomeric excess values were determined by chiral GC on Shimadzu 2010 chromatograph equipped with a Megadex DET-TBS (25 m, 0.25 mm) column (MEGA, Italy) and a FID detector. Temperature program is as follows: 80 °C (2 min)/1.25 °C/min/125 °C/40 °C/min/210 °C (5 min). TSPLIT 230 °C, TFID 230 °C.

Analytical conditions for separation of 1a-1c-1d-1g possible optical isomers were established by analysis of the racemic mixture of the corresponding amine 2a-2c-2d-2g (see

supplementary material Table S2). Assignment of the absolute configuration was based on comparison with the product obtained from the corresponding transamination with ATA 117.

HPLC analysis

Chiral normal phase HPLC was performed on an Agilent system (Santa Clara, CA, USA) equipped with a G1379A degasser, G1312A binary pump, a G1367A well plate autosampler unit, a G1316A temperature controlled column compartment and a G1315C diode array detector. CHIRALCEL®OD-H Analytical (Daicel (Osaka, Japan), 250 mm length, 4.6 mm diameter, 5 µm particle size) column was used. The typical injection volume was 15 µL and chromatograms were monitored at 265 nm. Analytical conditions for separation of 1b-1e-1f-1h possible optical isomers were established by analysis of the racemic mixture of the corresponding amine 2b-2e-2f-2h (see supplementary material Table S2). Assignment of the absolute configuration was based on comparison with the product obtained from the corresponding transamination with ATA 117.

Results

In silico identification of new R - ω -TAs from genomic databases

The identification of R -TA Cap from *Capronia semiimmersa* was based on the previous work by Höhne and coworkers (Höhne et al. 2010). Four independent BLAST searches were performed using P19938 (BCAT-Branched Chain Amino Transferase) and P0AB80 (D-ATA—D-aminotransferase) and two crystallized R - ω -TAs from *Nectria hematococa* and *Aspergillus terreus* (UniProtKB C7YVL8 and Q0C8G1, respectively) (Lyskowski et al. 2014; Sayer et al. 2014). A cut-off based on 30% identity with the above-mentioned sequences was applied to each subset and close to 10,000 sequences were retrieved. The obtained sequences were aligned in pools of 1000 sequences, using Clustal Omega (Thompson et al. 1994; Larkin et al. 2007). A rational analysis of the

aligned sequences was performed following the criteria previously established by Höhne and coworkers (Fig. 1). After discarding all potential BCAT, D-ATA and ADCL (4-amino-4-deoxychorismate lyase), the potential R - ω -TAs were narrowed to 423. To select among those candidate enzymes, additional criteria were applied. Firstly, those showing between 40 and 55% identity with R -TA 117 from *Arthrobacter* were selected as the most promising candidates to have different substrate specificity. Among those, our search was restricted to fungal enzymes encompassing 50 potential R - ω -TA. Secondly, a closer look to specific amino acid motif within the studied sequences was performed in order to study the presence of insertions at the 107-109 loop. The presence of insertion at this loop has been suggested as important for extended substrate specificity in a study performed by Guan and coworkers (2015). This last criterion restricted our search to five candidate enzymes. R -TA Cap was then selected because it presented an insertion of two amino acids, L130 and S131, in the loop close to the active site (positions 110-111 of the alignment, Fig. 2) and a second insertion in the region 213-219 (Figure S2 Supporting information). A phylogenetic analysis was made to compare R -TA Cap with previously reported transaminases, and the results are presented in Fig. 3. Although R -TA Cap grouped together with the rest of the fungal ω -transaminases, it is distantly related to those previously characterized.

Characterization of R -TA Cap enantioselectivity and substrate specificity

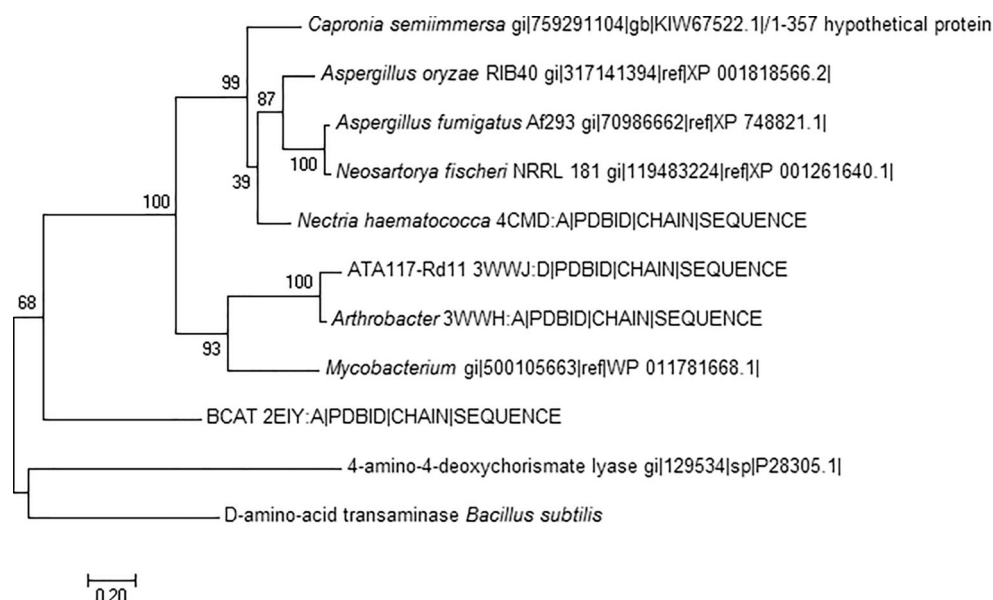
A R -TA Cap coding sequence optimized for expression in *E. coli* was synthesized, cloned into pET 22b+ and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The protein was produced mainly as soluble protein, which was purified by Ni-NTA affinity chromatography (for SDS-PAGE see Supporting Information Fig. S1).

The stereopreference of the new biocatalyst was analysed by performing biotransformations with racemic amines. A whole cell extract of *E. coli* BL21(DE3) expressing R -TA Cap was assayed with several racemic amines (Fig. 4 2a–c, 2g–h), in the presence of pyruvic acid as an amine acceptor.

	Sequence motif 1			Sequence motif 2											
	31	36	40	95	99	107									
DATA <i>Bacillus subtilis</i>	F	G	D	G	I	Y	E	V	I	R	V	Y	K	G	-
BCAT 2E1Y:A PDBID	Y	G	T	S	V	F	E	G	I	R	A	Y	E	T	A
ADCL gi 129534	F	G	D	G	C	F	T	T	A	R	V	I	D	G	-
<i>Capronia semiimmersa</i> gi 759291104	H	S	D	L	T	Y	D	V	P	S	V	W	D	G	-
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 gi 317141394	H	S	D	L	T	Y	D	V	P	S	V	W	D	G	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 gi 70986662	H	S	D	L	T	Y	D	V	I	S	V	W	D	G	-
<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 gi 119483224	H	G	D	L	T	Y	D	V	T	T	V	W	D	G	-
<i>Mycobacterium</i> gi 500105663	H	S	D	L	T	Y	T	V	A	H	V	W	H	G	-
<i>Nectria</i> 4CMD:A PDBID	H	S	D	L	T	Y	D	V	P	S	V	W	D	G	-
<i>Arthrobacter</i> 3WWH:A PDBID	H	S	D	V	T	Y	T	V	F	H	V	W	N	G	-
	A	V	Y	I	Q	T	T	R	G	V	A	P	R	K	H
	Y	I	R	P	L	A	W	M	G	A	K	A	L	G	V
	V	L	K	V	V	I	S	R	G	S	G	G	R	G	Y
	F	V	E	L	I	V	T	R	G	L	R	G	V	R	G
	F	V	E	L	I	V	T	R	G	L	K	G	V	R	G
	F	V	E	V	I	V	T	R	G	L	T	G	V	R	G
	F	V	E	V	I	V	T	R	G	L	T	G	V	R	G
	F	V	N	L	T	I	T	R	G	Y	G	K	R	K	G
	F	V	E	L	I	V	T	R	G	L	T	G	V	R	G
	F	V	S	V	S	I	T	R	G	Y	S	S	T	P	G

Fig. 2 Alignment of R -TA Cap and previously reported R -selective ω -transaminases. Important positions for the algorithms described by Höhne are highlighted. Residues 130 and 131, corresponding to an insertion in the active site loop are indicated in **bold**

Fig. 3 Phylogenetic tree obtained for *R*-TA Cap and previously reported transaminases



Racemic methyl benzyl amine **2a** was completely converted to the ketone, leaving the pure *S*-enantiomer behind. The rest of the assayed amines were converted to a lesser extent, but only the *R*-enantiomer was accepted as substrate. These results indicate that *R*-TA Cap is indeed a *R*- ω -TA.

Kinetic parameters were determined for the conversion of *R*-MBA **2a** to acetophenone **1a**, presenting an apparent K_m of 0.30 mM (Fig. S3 supporting information). The K_m is one order smaller than the reported K_m for *R*-TA from *Arthrobacter* (Iwasaki et al. 2011), indicating that *R*-TA Cap presents a larger affinity for this substrate. It is also an order smaller than K_m for the *S*-TA from *Halomonas elongate* (Cerioli et al. 2015) as determined with *S*-MBA. Additionally, *R*-TA Cap presents an

apparent V_{max} of $8.7 \cdot 10^{-5}$ mM/s and an apparent k_{cat} of 0.156 s^{-1} (Table S1). The optimal temperature was determined to be close to 35 °C, comparable to previously reported fungal *R*- ω -TA (Fig. S4 Supporting Information) (Jiang et al. 2015).

As previously stated, the major interest in finding novel *R*-transaminases is the possibility of synthesizing the chiral amine from the prochiral ketone, so we focused our work on the characterization of *R*-TA Cap for this reaction. Substrate specificity was analysed with a set of methyl ketones (**1a**-**1h**) and two larger substrates (**1i**-**1j**) using D-alanine as amine donor (Fig. 4). Unfavourable reaction equilibrium was displaced by coupling the enzymatic reaction with lactate dehydrogenase (LDH) that reduces the pyruvate formed during the

Fig. 4 Characterization of the substrate specificity of *R*-TA Cap using D-alanine as the amine donor

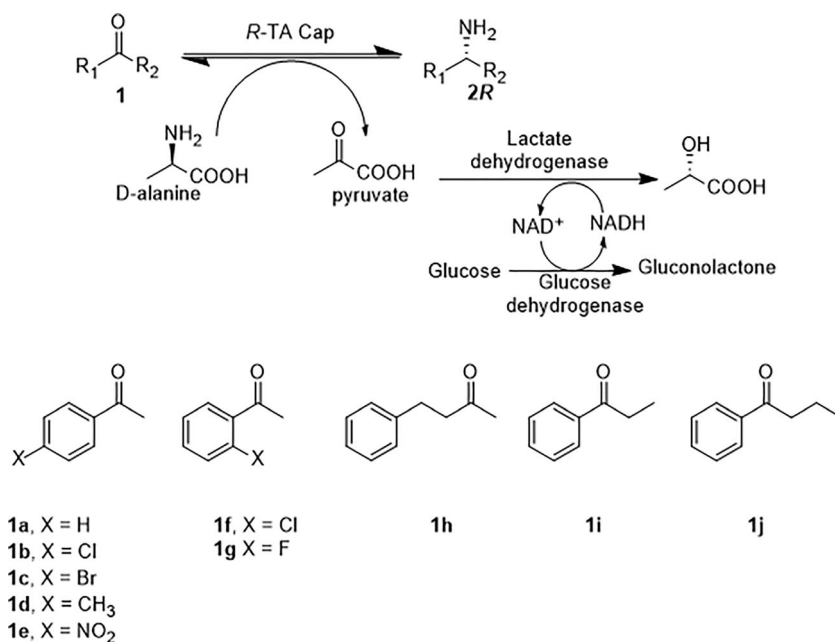


Table 1 Synthesis of chiral amines from the corresponding ketone with *R*-TA Cap using *D*-alanine as the amine donor

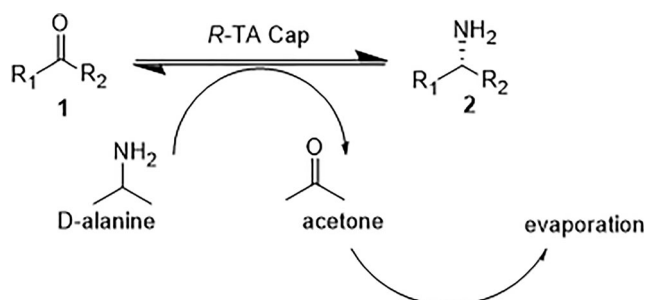
Substrate	Whole cell system		Isolated <i>R</i> -TA Cap	
	% Conv	% ee	% Conv	% ee
1a	45	99	80	99
1b	12	99	60	99
1c	9	99	10	99
1d	nd	nd	95	99
1e	nd	nd	40	99
1f	nd	nd	90	99
1g	23	99	nd	nd
1h	41	99	100	99
1i	5	99	5	99
1j	nd	nd	0	nd

nd not determined

transamination reaction yielding lactate (Shin and Kim 1999). The required NADH was recycled by addition of glucose and glucose dehydrogenase (GDH), formation of gluconolactone allowed consumption of NAD⁺ regenerating the NADH (Fig. 4) (O'Reilly et al. 2014).

The results for substrates 1a–1j are shown in Table 1. Reactions were performed with whole cell system and with isolated *R*-TA Cap as described in the “Experimental” section. The best substrate was 4-phenyl 2-butanone 1h, for which complete conversion was achieved in 24 h. Next was *p*-methylacetophenone 1d with 95% conversion. This substrate has not been assayed previously with other transaminases, indeed, this is the first report for the biocatalytic preparation of (*R*) *p*-methyl-methylbenzylamine 2d. *o*-Cl-acetophenone 1f and acetophenone 1a also yielded the corresponding *R* amine with very good yields. The only methyl ketone that presented low conversion was *p*-Br-acetophenone 1c, while the bulkier substrate 1i and 1j gave poor and no conversion, respectively. In all cases, the *R*-enantiomer was obtained with >99% enantiomeric excess.

The complexity of the multienzymatic system required to carry on transamination, somehow precludes the use of ω -

**Fig. 5** Synthesis of chiral amines with *R*-TA Cap using isopropylamine as amine donor

transaminases at industrial scale. It is then important to identify alternative amine donors (Martinez-Montero et al. 2016; Slabu et al. 2016). Isopropylamine has been successfully applied as amine donor in the pharmaceutical industry, for the preparation of sitagliptin, the active ingredient of Januvia (Savile et al. 2010). We decided to test isopropylamine with *R*-TA Cap (Fig. 5) and the results are presented in Table 2. Although the obtained conversions are lower than those obtained when using *D*-alanine, conversions are good and can be further optimized.

Discussion

The algorithm developed by Höhne and coworkers in 2010 was applied on the search for novel ω -*R*-TA and a total of 423 sequences were retrieved from 10,000 initial hits. The initial BLAST search was restricted to those sequences that have been deposited on the database in the 2010–2015 period. The original paper started from close to 6000 sequences and retrieved 21 sequences. The increase in positive hits when the same algorithm was applied 5 years later indicates the high potential hidden in the exponentially increasing genome databases and the utility of this type of bioinformatic approaches to easily detect novel biocatalysts.

The choice of *R*-TA-Cap among all potential candidates was based on several criteria. First, to avoid a high similarity with already reported *R*- ω -TA, those enzymes showing more than 55% identity with *R*-TA 117 from *Arthrobacter* were discarded. Additionally, fungi are a well-known source of secondary metabolites, what is associated with a huge diversity of enzymatic activities. An option was made for a fungal enzyme, based on this concept, since the feasibility of discovering an enzyme with different substrate specificity is larger. *Capronia* is a genus about which little is known, some of the species are obligate lichenicolous while others have been isolated from rocks or plants. It belongs to the *Herpotrichiellaceae* family of ascomycotas, distantly related from *Aspergillus*, *Fusarium* and other genus for which transaminases have already been described (Höhne et al. 2010; Schätzle et al. 2011). Finally, a study of the 107–109 loop

Table 2 Synthesis of chiral amines from the corresponding ketone with *R*-TA Cap using isopropylamine as the amine donor

Substrate	Isolated <i>R</i> -TA Cap	
	% Conv	% ee
1a	45	99
1b	23	99
1h	60	99
1i	0	nd

nd not determined

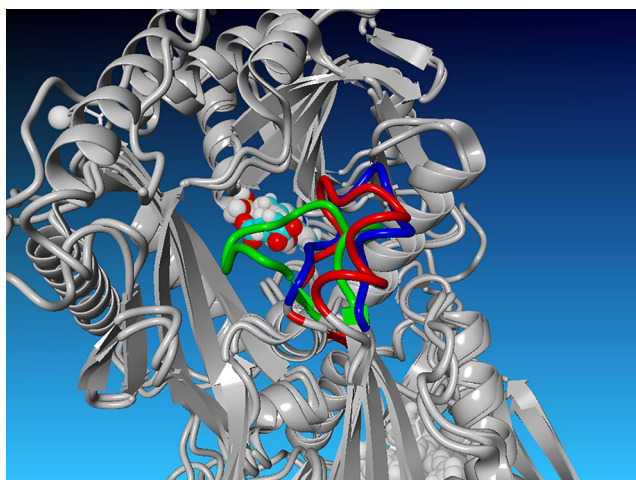


Fig. 6 *R*-TA Cap (red) structural alignment with *Arthrobacter R*-TA (green) and its G136F mutant (blue). Difference in the active site loop

region was performed on the search for enzymes that present amino acid insertions on this region. This criterion reduced the number of potential *R*- ω -TA candidates to five (Fig. S2a). The presence of insertions on that loop was disregarded by Höhne and coworkers since they considered that the loop was a highly variable structure (Höhne et al. 2010). However, a recent work performed by Tanokura and his group revealed that the orientation of this loop can have a strong influence on substrate specificity (Guan et al. 2015). They described the crystal structure of a wild-type *R*- ω -TA, the evolved ATA-117-Rd11 variant and a G136F mutant of the wild-type enzyme. Based on a comparison among the three structures, and the difference on biocatalytic activity, they propose that the loop near the active site has a strong influence in substrate specificity and can be an interesting target for rational design of new mutants with altered substrate specificity (Guan et al. 2015). No

transaminase with an insertion in this loop has been characterized, what made these five candidates excellent targets for this study. Among them, *R*-TA Cap was selected because it presented an additional insertion on the region 213-219.

R-TA Cap was deposited in the database as hypothetical protein (gi|759291104|gb|K1W67522.1|). An analysis of the amino acid sequence revealed, as expected, a substitution of Arg at position 40 (Fig. 2) corresponding to Ser 64 in *R*-TA Cap sequence. The Tyr residue in position 95 is substituted by Phe 115, with the typical FVE motif as in most true *R*- ω -TA (Höhne et al. 2010). A model for *R*-TA Cap was constructed using the software YASARA (Krieger and Vriend 2014) based on the crystal structure of five reported *R*-TA *Nectria hematococa* (PDB 4CMD) (Sayer et al. 2014), *A. fumigatus* (PDB 4CHI) (Thomsen et al. 2014), *A. terreus* (PDB 4CE5) (Lyskowski et al. 2014), *Arthrobacter* (PDB 3WWH) and the *Arthrobacter* mutant G136F (PDB 3WWI) (Guan et al. 2015). Overall, the structures of the five *R*- ω -TA are highly similar. However, a major difference is seen in the loop. A structural alignment of *Arthrobacter R*-TA (PDB 3WWH), its G136F mutant (PDB 3WWI) and *R*-TA Cap shows that the loop of the later is closely related to the loop of the G136F mutant and not to the original *Arthrobacter R*-TA loop (Fig. 6). Residue 136 was considered as the main cause of the structural alteration of the loop in ATA-117-Rd11 mutant and was suggested to be the cause of the altered substrate specificity of this enzyme. The similarity between G136F mutant and *R*-TA Cap prompted us to assay bulkier substrates with this enzyme; however, null activity was detected with 1j while 1i gave only 5% conversion. This probably indicates that other mutations are also necessary to increase acceptance of bulkier substrates by this enzyme, as has been demonstrated previously for the ATA-117-Rd11 mutant (Savile et al. 2010). Interestingly, *R*-TA Cap accepts isopropylamine as an amine donor similarly to the ATA-117-Rd11 mutant, while the original

Table 3 Comparison of *R*-TA-Cap substrate specificity and stereoselectivity with some *R*-TA from the literature (Mutti et al. 2011; Schätzle et al. 2011; Paul et al. 2014)

Substrate	<i>R</i> -TA-Cap		<i>A. fumigatus</i>		<i>N. fischeri</i>		<i>A. oryzae</i>		<i>M. vanbaal.</i>		<i>Arthrobacter</i>		ATA-025		ATA-033	
	% c	% ee	% c	% ee	% c	% ee	% c	% ee	% c	% ee	% c	% ee	% c	% ee	% c	% ee
1a	80	>99	>99	>99	87	>99	39	>99	42	>99	49	>99				
1b	60	>99											67	>99	60	>99
1c	10	>99											63	>99	58	>99
1d	95	>99														
1e	40	>99	68	>99	74	>99	8	>99	6	>99						
1f	90	>99											98	>99	98	>99
1g	23 ^a	>99											95	>99	94	>99
1h	100	>99	>99	>99	>99	>99	92	>99	89	>99	82	>99				
1i	5	Nd														

Nd not determined

^a Biotransformation yield obtained with whole cell not with purified enzyme

Arthrobacter R-TA does not. The structural similarities observed between *R-TA Cap* and *Arthrobacter R-TA* mutants could be associated with this similar behaviour.

Table 3 compares the results obtained with *R-TA-Cap* with those previously reported in the literature for the same substrates. As described for other *R- ω -TA*, 4-phenyl 2-butanone 1h was the best substrate among the tested ones (Mutti et al. 2011; Schätzle et al. 2011). The results obtained with substrates 1a, 1e and 1h are quite similar to those obtained by Schätzle for the *R- ω -TA* from *Aspergillus fumigatus* and *Neosartorya fischeri* that were the best biocatalysts among the previously described ones. The *R- ω -TA* from *Aspergillus oryzae* and *Mycobacterium vanbaalenii* also presented good biocatalytic activity towards these substrates; albeit yields were lower than those obtained with *R-TA Cap*. This behaviour cannot be correlated with the phylogenetic distance, since *R-TA Cap* is more distantly related to either of the fungal enzymes, while bacterial enzymes are all grouped together (Fig. 3). Thus, architecture of the active site is probably more important than the overall phylogenetic distance. Among *para* substituted substrates, the *p*-methylacetophenone 1d was the best substrate yielding the corresponding chiral amine with 95% yield. Comparison with other transaminases is not possible since there was no available data on the literature. Indeed, this will constitute the first report for the biocatalytic preparation of (*R*) *p*-methylmethylbenzylamine 2d. The low activity observed with substrate 1c is intriguing, since commercial *R- ω -TA* have shown similar activity with 1b and 1c; this could be associated with a different K_m for both substrates. Docking experiments with 1c and the *R-TA Cap* constructed model predicts a poor accommodation of this substrate in the active site and could explain the registered low activity. A common feature observed for *R-TA Cap* and commercial transaminases is the preference for *o*-halogenated compounds compared to *p*-substituted ones (Paul et al. 2014).

Finally, it is noticeable that *R-TA-Cap* accepts isopropylamine as the amine donor. This is an excellent characteristic of this enzyme since many transaminases will not accept isopropylamine as a substrate (Paul et al. 2014; Jiang et al. 2015).

Acknowledgments The authors would like to acknowledge de Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (L/ICA/ICB/187531/13); PEDECIBA Química; CSIC I+D 611; UdelaR; Agencia Nacional de Investigación e Innovación (FMV-3-2013-1-100776). César Iglesias acknowledges CAP UdelaR Graduate Scholarship.

The authors would like to acknowledge Dr. Nicholas Turner and his lab for academic support, and MSc Valentina Croce for help with phylogenetic tree construction.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

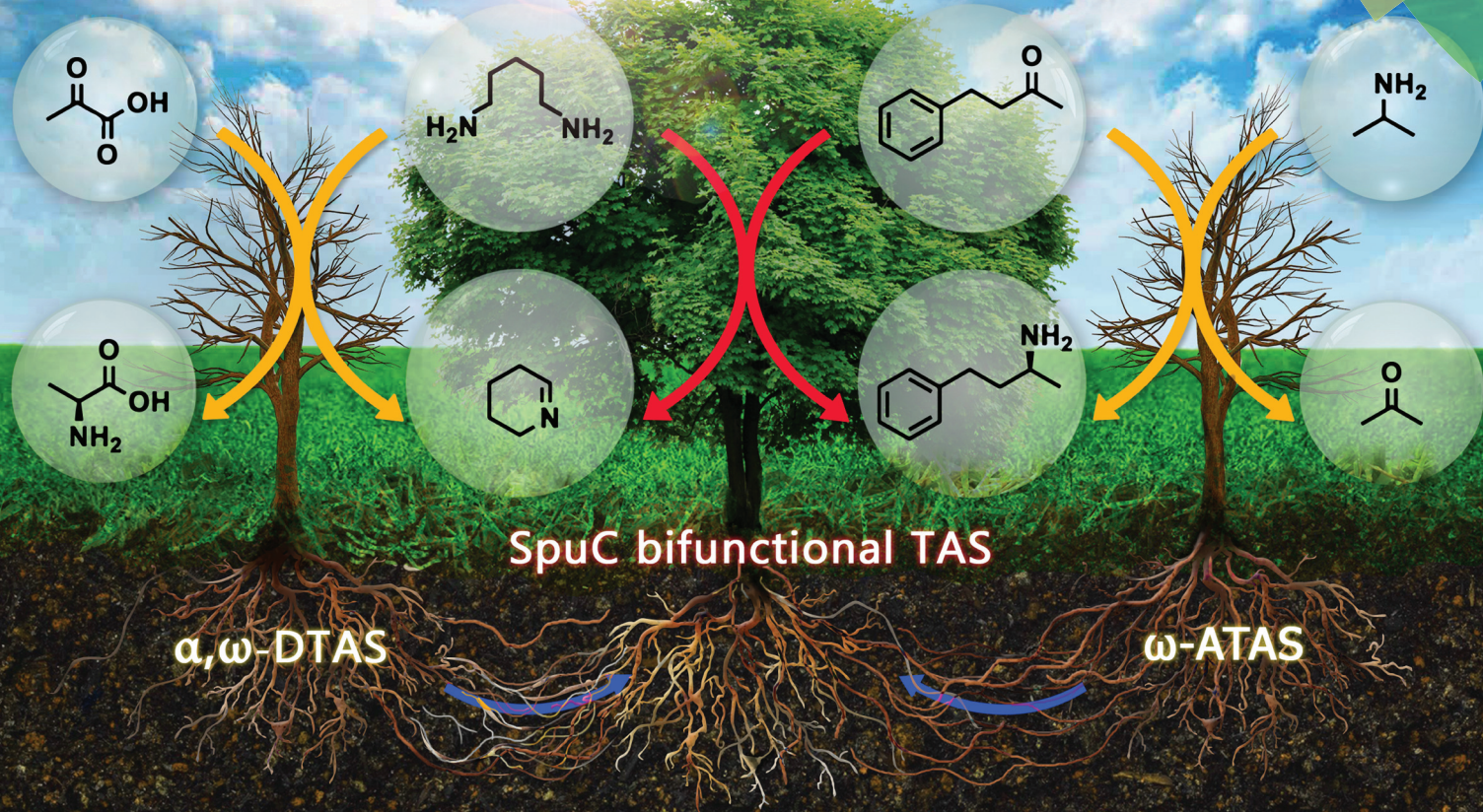
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402
- Angajala G, Pavan P, Subashini R (2016) Lipases: an overview of its current challenges and perspectives in the revolution of biocatalysis. *Biocatal Agric Biotechnol* 7:257–270
- Cassiano NM (2010) Alkaloids: properties, applications and pharmacological effect. Nova Science Pub. Inc., New York
- Ceroli L, Planchestainer M, Cassidy J, Tessaro D, Paradisi F (2015) Characterization of a novel amine transaminase from *Halomonas elongate*. *J Mol Catal B Enzym* 120:141–150
- Clay D, Koszelewski D, Grischek B, Gross J, Lavandera I, Kroutil W (2010) Testing of microorganisms for ω -transaminase activity. *Tetrahedron Asymmetry* 21(16):2005–2009
- Cornish-Bowden AT (1995) Fundamentals of enzyme kinetics. Portland Press, London
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Goto M, Miyahara I, Hayashi H, Kagamiyama H, Hirotsu K (2003) Crystal structures of branched-chain amino acid aminotransferase complexed with glutamate and glutarate: true reaction intermediate and double substrate recognition of the enzyme. *Biochemistry* 42: 3725–3733
- Guan LJ, Ohtsuka J, Okai M, Miyakawa T, Mase T, Zhi Y, Hou F, Ito N, Iwasaki A, Yasohara Y, Tanokura M (2015) A new target region for changing the substrate specificity of amine transaminases. *Sci Rep* 5:10753. doi:10.1038/srep10753
- Höhne M, Schätzle S, Jochens H, Robins K, Bornscheuer UT (2010) Rational assignment of key motifs for function guides *in silico* enzyme identification. *Nat Chem Biol* 6:807–813
- Iwasaki A, Yamada Y, Kizaki N, Ikenaka Y, Hasegawa J (2006) Microbial synthesis of chiral amines by (*R*)-specific transamination with *Arthrobacter* sp. KNK168. *Appl Microbiol Biotechnol* 69(5):499–505
- Iwasaki A, Matsumoto K, Hasegawa J, Yasohara Y (2011) A novel transaminase, (*R*)-amine:pyruvate aminotransferase, from *Arthrobacter* sp. KNK168 (FERM BP-5228): purification, characterization, and gene cloning. *Appl Microbiol Biotechnol* 93(4):1563–1573
- Jiang J, Chen X, Zhang D, Wu Q, Zhu D (2015) Characterization of (*R*)-selective amine transaminases identified by *in silico* motif sequence blast. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(6):2613–2621
- Jones DT (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292(2):195–202
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8:275–282
- Kohls H, Steffen-Munsberg F, Höhne M (2014) Recent achievements in developing the biocatalytic toolbox for chiral amine synthesis. *Curr Opin Chem Biol* 19(1):180–192
- Koszelewski D, Goritzer M, Clay D, Seisser B, Kroutil W (2010a) Synthesis of optically active amines employing recombinant ω -transaminases in *E. coli* cells. *ChemCatChem* 2(1):73–77

- Koszelewski D, Tauber K, Faber K, Kroutil W (2010b) ω -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines. *Trends Biotechnol* 28(6):324–332
- Krieger E, Vriend G (2014) YASARA view—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations. *Bioinformatics* 30(20):2981–2982
- Kroutil W, Fischereder EM, Fuchs CS, Lechner H, Mutti FG, Pressnitz D, Rajagopalan A, Sattler JH, Simon RC, Siirola E (2013) Asymmetric preparation of prim -, sec -, and tert-amines employing selected biocatalysts. *Org Process Res Dev* 17(5):751–759
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870–1874
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947–2948
- Lyskowski A, Gruber C, Steinkellner G, Schürmann M, Schwab H, Gruber K, Steiner K (2014) Crystal structure of an (*R*)-selective ω -transaminase from *Aspergillus terreus*. *PLoS ONE* 9(1):e87350. doi:10.1371/journal.pone.0087350
- Martinez-Montero L, Gotor V, Gotor-Fernandez V, Lavandera I (2016) But-2-ene-1,4-diamine and But-2-ene-1,4-diol as donors for thermodynamically favored transaminase- and alcohol dehydrogenase-catalyzed processes. *Adv Synth Catal* 358:1618–1624
- Mutti FG, Fuchs CS, Pressnitz D, Sattler JH, Kroutil W (2011) Stereoselectivity of four (*R*)-selective transaminases for the asymmetric amination of ketones. *Adv Synth Catal* 353(17):3227–3233
- Newman DJ, Cragg GM (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 75:311–335
- O'Reilly E, Iglesias C, Ghislieri D, Hopwood J, Galman JL, Lloyd RC, Turner NJ (2014) A regio- and stereoselective ω -transaminase/monoamine oxidase cascade for the synthesis of chiral 2,5-disubstituted pyrrolidines. *Angew Chem* 53:2447–2450
- Paul CE, Rodríguez-Mata M, Busto E, Lavandera I, Gotor-Fernández V, Gotor V, García-Cerrada S, Mendiola J, De Frutos O, Collado I (2014) Transaminases applied to the synthesis of high added-value enantiopure amines. *Org Process Res Dev* 18(6):788–792
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Savile CK, Janey JM, Mundorff EC, Moore JC, Tam S, Jarvis WR, Colbeck JC, Krebber A, Fleitz FJ, Brands J, Devine PN, Huisman GW, Hughes GJ (2010) Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. *Science* 329(5989):305–309
- Sayer C, Martinez-Torres RJ, Richter N, Isupov MN, Hailes HC, Littlechild JA, Ward JM (2014) The substrate specificity, enantioselectivity and structure of the (*R*)-selective amine: pyruvate transaminase from *Nectria haematococca*. *FEBS J* 281(9):2240–2253
- Schätzle S, Höhne M, Redestad E, Robins K, Bornscheuer UT (2009) Rapid and sensitive kinetic assay for characterization of ω -transaminases. *Anal Chem* 81(19):8244–8248
- Schätzle S, Steffen-Munsberg F, Thontowi A, Höhne M, Robins K, Bornscheuer UT (2011) Enzymatic asymmetric synthesis of enantiomerically pure aliphatic, aromatic and arylaliphatic amines with (*R*)-selective amine transaminases. *Adv Synth Catal* 353(13):2439–2445
- Schrittwieser JH, Velikogne S, Kroutil W (2015) Biocatalytic imine reduction and reductive amination of ketones. *Adv Synth Catal* 357(8):1655–1685
- Shin JS, Kim BG (1999) Asymmetric synthesis of chiral amines with ω -transaminase. *Biotechnol Bioeng* 65(2):206–211
- Slabu I, Galman JL, Weise NJ, Lloyd RC, Turner NJ (2016) Putrescine transaminases for the synthesis of saturated nitrogen heterocycles from polyamines. *ChemCatChem* 8(6):1038–1042
- Sugio S, Petsko GA, Manning JM, Soda K, Ringe D (1995) Crystal structure of a d-amino acid aminotransferase: how the protein controls stereoselectivity. *Biochemistry* 34:9661–9669
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22):4673–4680
- Thomsen M, Skalden L, Palm GJ, Höhne M, Bornscheuer UT, Hinrichs W (2014) Crystallographic characterization of the (*R*)-selective amine transaminase from *Aspergillus fumigatus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70:1086–1093
- Turner NJ (2011) Deracemisation methods. *Curr Op Chem Biol* 14(2):115–121
- Welsch ME, Snyder SA, Stockwell BR (2010) Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Curr Op Chem Biol* 14(3):347–361

Green Chemistry

Cutting-edge research for a greener sustainable future

rsc.li/greenchem



Themed issue: Enzyme catalysis in organic synthesis

ISSN 1463-9262



COMMUNICATION

Nicholas J. Turner *et al.*

Biocatalytic transamination with near-stoichiometric inexpensive amine donors mediated by bifunctional mono- and di-amine transaminases

Cite this: *Green Chem.*, 2017, **19**, 361Received 29th July 2016,
Accepted 12th August 2016

DOI: 10.1039/c6gc02102f

www.rsc.org/greenchem

Biocatalytic transamination with near-stoichiometric inexpensive amine donors mediated by bifunctional mono- and di-amine transaminases†‡

James L. Galman,^a Iustina Slabu,^a Nicholas J. Weise,^a Cesar Iglesias,^b Fabio Parmeggiani,^a Richard C. Lloyd^c and Nicholas J. Turner*^a

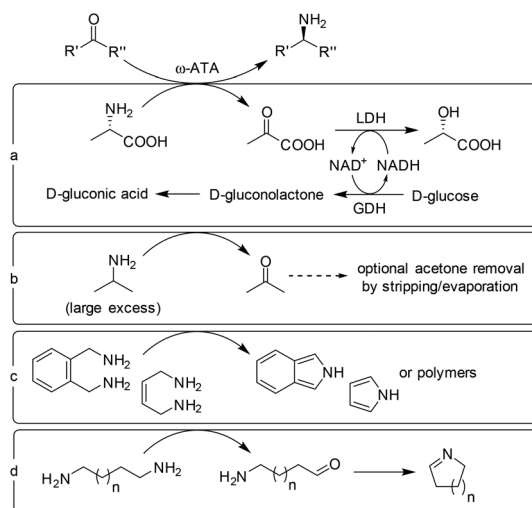
The discovery and characterisation of enzymes with both mono-amine and diamine transaminase activity is reported, allowing conversion of a wide range of target ketone substrates with just a small excess of amine donor. The diamine co-substrates (putrescine, cadaverine or spermidine) are bio-derived and the enzyme system results in very little waste, making it a greener strategy for the production of valuable amine fine chemicals and pharmaceuticals.

Biocatalytic strategies for the synthesis of high added-value optically pure chiral intermediates provide extraordinary benefits to the pharmaceutical and agrochemical industries, due to the excellent activity, stereo-/regioselectivity and stability of many biocatalysts, often unmatched by their corresponding chemical equivalents.¹ There are obvious sustainability benefits to such approaches, including renewable resourcing of recombinant biocatalysts, solvent- and metal-free chemical transformations and ambient temperature/pressure of operation. In spite of this highly cited “greenness”, the concept of any given biocatalytic transformation being effectively environmentally benign has been questioned in several instances.² Many widely used biotransformation protocols require, for example, expensive cofactor supplementation and/or large excesses of co-substrate to combat poor atom efficiency and unfavourable equilibria.

The asymmetric amination of ketones to enantiomerically enriched amines mediated by ω -amine transaminases (ω -ATAs, E.C. 2.6.1.18) is undoubtedly one of the most studied and exploited biotransformations which has become integrated

into modern industrial practice. The broad substrate tolerance of this class of enzymes is one of their most appealing features in synthetic applications. A prominent example of this is the commercial manufacture of sitagliptin – probably one of the most cited success stories of industrial biocatalysis.³

For these reactions, the thermodynamic equilibria are often unfavourable and hence different methods for shifting the equilibrium have been sought to address this long-standing challenge (Scheme 1).⁴ One of the earliest approaches, still heavily relied on, was the coupling of the enzymatic reaction with a secondary concomitant irreversible reaction (*e.g.*, conversion of pyruvate by-product to L-lactate with lactate dehydrogenase, paired with an oxidoreductase to recycle NAD(P)H, Scheme 1a).^{5,6} Whilst producing naturally-degradable biochemicals as by-products, this method has the obvious disadvantage of requiring two additional enzymes and an expensive cofactor to achieve high conversion of the starting ketone.



Scheme 1 Different approaches to shifting the thermodynamic equilibrium of ω -ATA transaminations.

^aManchester Institute of Biotechnology (MIB), School of Chemistry, The University of Manchester, Manchester, UK. E-mail: nicholas.turner@manchester.ac.uk

^bFacultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^cDr. Reddy's Laboratories, Chirotech Technology Centre, Cambridge, UK

†This manuscript is dedicated to Professor Romas Kazlauskas on the occasion of his 60th birthday.

‡Electronic supplementary information (ESI) available: Complete Experimental section, molecular biology protocols, analytical methods, product characterisation. See DOI: 10.1039/c6gc02102f

On the other hand, for industrial scale application, the approach of choice is the use of a sacrificial amine donor in large excess to drive the equilibrium towards the desired product (Scheme 1b). Isopropylamine is widely used for this purpose, because of its effectiveness and availability.⁷ This approach has proven very cost-efficient in many cases, however, a 100-fold excess (or higher) is required to drive equilibrium. Also, in order to improve the yields, the removal of the volatile acetone waste product by evaporation or stripping needs to be implemented using specialised temperature platforms and heat-stable enzymes.⁸

More recently, the use of synthetic diamines such as *o*-xylylenediamine⁹ and but-2-ene-1,4-diamine¹⁰ has been the focal point to displace the equilibria of ω -ATA reactions by spontaneous cyclisation and subsequent ring aromatisation of the aminocarbonyl by-product (Scheme 1c). However, these donors are usually expensive, highly toxic and often form difficult to remove polymers following aromatisation, adding to downstream processing costs.

In contrast, biogenic terminal diamines present themselves as renewably-sourced alternative amino donors. In addition to their simple bio-based production and relative low cost, upon transamination they are converted into reactive amino aldehydes which spontaneously convert to cyclic imines, thus driving the equilibrium towards amination of ketones. Enzymes active on such compounds, known as α,ω -diamine transaminases (α,ω -DTAs), have exploited these advantages for the synthesis of N-heterocycles precursors.¹¹ However, these enzymes were found to have strict preference for pyruvate over other ketones, making them unsuitable for the synthesis of a broad range of amines. Nevertheless, if the substrate specificity could be addressed, biogenic diamines would offer a distinct approach to equilibrium issues (Scheme 1d), intrinsically “greener” than previous ones, since near-stoichiometric loadings of sacrificial diamines could be applied, in principle.

Herein, we report the discovery and characterisation of a panel of bifunctional α,ω -DTA/ ω -ATA enzymes that readily accept cheap and easily-accessible mono-/diamine donors as well as possessing broad ketone acceptor scope, allowing an equilibrium shift to reach theoretical yield of 100% aminated product with almost stoichiometric donor loadings.

Results and discussion

The lack of activity of commonly used ω -ATAs towards simple aliphatic diamines such as putrescine (1,4-diaminobutane, **1a**), cadaverine (1,5-diaminopentane, **1b**) and spermidine (1,8-diamino-4-azaoctane, **1c**) has been previously reported.^{10,11} Indeed, the only relevant example is a single commercial transaminase (ATA256) recently found through extensive screening of a large biocatalyst panel from Codexis, highlighting the rarity of such activity.¹² This transaminase was shown to have activity with a narrow range of ketone acceptors, and its commercial nature precludes evolutionary, sequence and structural insight into its substrate scope or optimisation through engi-

neering. To address this gap in the transaminase toolbox, we undertook a search for new candidate enzymes able to accept diamine donors.

As a promising starting point for the development of an enzyme with broader substrate range we identified the putrescine transaminase gene *spuC*, part of the polyamine uptake and utilization pathway in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.¹³ The *spu* (spermidine utilisation) operon, consisting of 9 genes, was previously characterised as responsible for spermidine transport and the catabolic route of putrescine in the arginine decarboxylase pathway. Genes with analogous functions are found in *E. coli* such as the complementary *ygjG* gene encoding for putrescine transaminase that suggests a common pathway between the two microorganisms.¹⁴

To probe the evolutionary relationships between known putrescine transaminases and well-characterised ω -ATAs, a multiple sequence alignment was performed, from which a cladogram could be constructed to infer the order of divergence events (Fig. 1). Interestingly, it was found that sequences with reported diamine transaminase activity clustered within the ω -ATA sequences as polyphyletic groups. *SpuC* from *P. aeruginosa* (Pa-SpuC) was revealed to have high sequence identity with the well-studied Cv-ATA from *Chromobacterium violaceum* (60%)^{15,16} and only 28% identity with the more functionally similar *E. coli* YgjG protein.¹⁴ This indicated two separate acquisitions of such activity in this family, with one convergence (Pa-SpuC) occurring relatively recently in evolutionary history compared to the other. As previous reports with the more ancient putrescine transaminases (Ec-, Bme- and Bmy-YgjG) revealed minimal acceptance of monoamine substrates,¹¹ it is probable that any ancestral ω -ATA function of these enzyme has been lost. Due to the higher sequence similarity between the Pa-SpuC and characterised ω -ATA biocatalysts, this enzyme was chosen for investigation of potential latent ω -ATA side-activity. Previous experiments carried out with Pa-SpuC revealed that, although it was likely to be involved in the catabolism of diamines,¹³ minimal activity was observed with putrescine and derived amides.¹⁷ In light of this, a selection of predicted orthologues were mined from publically-available sequence data, cloned and expressed to access the natural diversity of *SpuC* enzymes with respect to activity and potential monoamine/diamine acceptance.

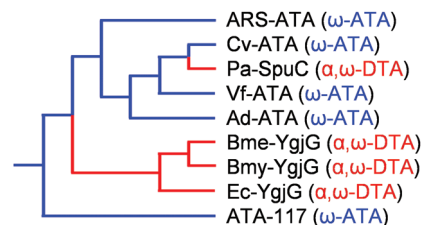
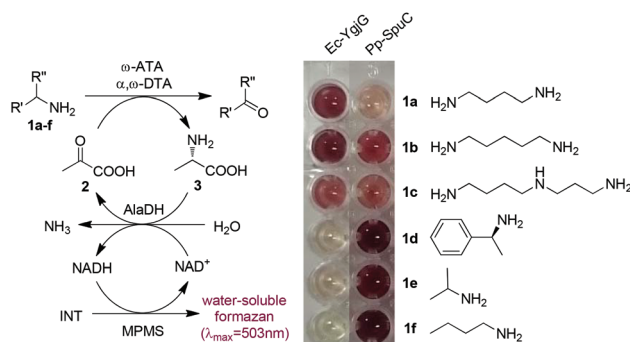


Fig. 1 Cladogram showing evolutionary relationships between various wild-type transaminase enzymes as inferred from amino acid sequence identity.

A Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis of the characterised *spuC* gene from the pathogenic *P. aeruginosa* PAO1 strain revealed other homologous genes from *Pseudomonas* species, in particular *P. putida* (Pp-*spuC*), *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (Pc-*spuC*) and *P. fluorescens* (Pf-*spuC*) all with an aligned protein sequence identity of 69% (UNIPROT). The three putative *spuC* genes were cloned from our in-house NCIMB culture collection and subcloned into a pET-28b vector followed by overexpression in *E. coli* BL21(DE3) cells. All three enzymes were successfully overproduced and purified as recombinant N-terminal His₆-tagged protein for screening against a representative panel of diamine and monoamine donors.

In order to determine the activity of the SpuC enzymes, an adapted version of the previously described L-amino acid dehydrogenase colorimetric assay¹⁸ was employed, using pyruvate as the amino acceptor, L-alanine dehydrogenase from *Bacillus megaterium* to regenerate pyruvate with concomitant reduction of NAD⁺, and the phenazine-tetrazolium system (MPMS + INT) for colour development (Scheme 2). The results for amines **1a–f** are summarised in Table 1 (additional mono- and diamines were tested, and kinetic constants were determined, see ESI†).

Our initial findings showed that all the recombinant SpuC proteins displayed high activity with the biogenic diamine



Scheme 2 Activity assay used for the characterisation of ω -ATAs and α,ω -DTAs.

Table 1 Specific activities of the novel SpuC enzymes against amine donors **1a–f**, compared with Ec-YgjG and Cv-ATA

Subs.	Specific activity ^a (U mg ⁻¹)				
	Pp-SpuC	Pf-SpuC	Pc-SpuC	Ec-YgjG	Cv-ATA
1a	1.3	0.4	1.4	2.7	n.d.
1b	27.3	16.5	15.1	2.7	7.7
1c	15.7	16.5	21.5	2.1	n.d.
1d	23.2	25.7	30.4	n.d.	28.9
1e	20.4	18.5	18.7	0.05	5.6
1f	16.5	19.3	13.5	n.d.	14.1

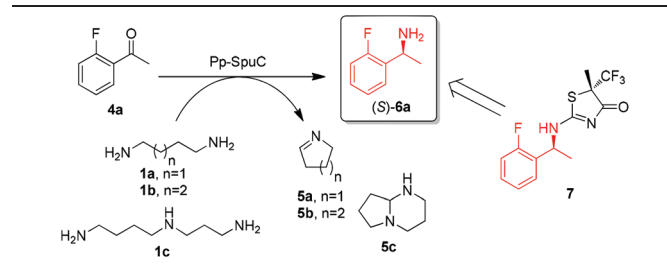
Expt. Cond.: 5 mM **1a–1f**, 1 mM **2**, 1 mM PLP, 0.2 mg mL⁻¹ purified ATA, 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, 30 °C. ^a One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that produced 1 μ mol of alanine per min at 30 °C. n.d.: not determined (too low activity).

donors **1a–1c** of interest with comparable specific activities within the different *Pseudomonas* species. Despite a 2-fold increase in activity of Ec-YgjG with putrescine **1a**, Pp-SpuC exhibited a 10-fold greater activity with cadaverine **1b**, Pc-SpuC with spermidine **1c**, with little or no activity displayed with Cv-ATA. Surprisingly, the SpuC enzymes also gave promiscuous activity with industrially relevant monoamines (*S*)-methylbenzylamine **1d**, isopropylamine **1e** and butylamine **1f**, which have been extensively studied with ω -ATAs, but none has been reported to have high activity with biogenic amines. Further studies on the diaminoalkane series were in close agreement with Cv-ATA as the carbon backbone increased in size (>C₆), in contrast to the diminished activity presented in Ec-YgjG (see ESI†). This pattern is in part due to the narrow hydrophobic channel approaching the enzyme active site elucidated from recent crystal structures.¹⁹

Encouraged by these preliminary studies, we turned to the investigation of non-keto acid prochiral acceptors for preparative applications. As a model keto acceptor for reaction optimisation we chose *o*-fluoroacetophenone **4a**, since the chiral amine (*S*)-**6a** produced after transamination can be coupled to rhodanine scaffolds resulting in heterocycle analogues (*e.g.*, **7**) with a range of pharmacological activities such as the clinical treatment of type II diabetes mellitus.^{20,21} Biotransformations were conducted using our SpuC enzymes using different amounts of the diamine donors **1a–c**. The best conversions (Table 2) were obtained with Pp-SpuC (that also showed the highest specific activity for **1a–b** before), although the values for Pf-SpuC and Pc-SpuC were very similar.

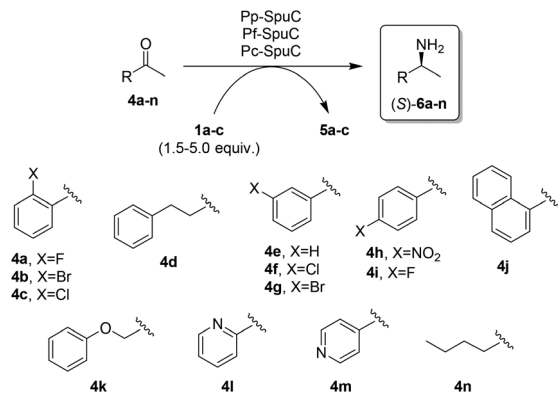
Remarkably, high conversions were observed at near-stoichiometric amounts of diamine donors **1a–1c**, indicating an efficient displacement of the equilibrium *via in situ* cyclisation,

Table 2 Testing of different diamine loadings in the transamination of **4a** mediated by Pp-SpuC



Diamine, equiv.	1a		1b		1c	
	C ^a (%)	ee ^a (%)	C ^a (%)	ee ^a (%)	C ^a (%)	ee ^a (%)
1.5	84	>99	95	>99	83	>99
5	91	>99	96	>99	78	>99
10	87	>99	95	>99	73	>99
25	77	>99	83	>99	63	86

Expt. Cond.: 5 mM **4a**, 1 mM PLP, 1% v/v DMSO, 2 mg mL⁻¹ purified SpuC, 50 mM HEPES buffer, pH 9.0, 40 °C, 250 rpm, 24 h. ^a Measured by HPLC on a chiral stationary phase. C = conversion. ee = enantiomeric excess.



Scheme 3 Panel of aromatic and aliphatic ketones tested with SpuC enzymes.

providing a greener substitute than 50 equivalents of volatile isopropylamine. The transamination of **1a–b** gave ω -aminoaldehydes which underwent spontaneous cyclisation to 1-pyrroline **5a** and 1-piperidine **5b**, respectively (as confirmed by GC-MS). Biotransformations were conducted at pH 9.0 and it was previously shown *via* ^1H NMR that the imine monomers are stable at conditions between pH 7–13.²² Amino donor **1c**, instead, afforded the corresponding amino-imine that spontaneously cyclises a second time to yield the fused bicyclic structure **5c** under biotransformation conditions. Interestingly, increasing the concentration of **1c** not only did not improve the conversion to **6a**, it was even detrimental, possibly due to inhibition by the N-heterocycle side-product. The optical purity of the product was almost invariably >99% with all three enzymes tested.

In order to test the feasibility of larger scale processes we also performed a preparative biotransformation with **4a** and 2 equivalents of **1b**, purifying the product by column chromatography

after extraction. The procedure afforded (*S*)-**6a** with an isolated yield of 79% and >99% ee.

Finally, to prove the wide applicability of this procedure, we also tested a panel of prochiral ketones **4a–n** that afford synthetically useful chiral amines of interest for the production of fine chemicals and pharmaceuticals (Scheme 3). Even though the monomeric imines **5a** and **5b** are known to oligomerise in aqueous environment,¹² the corresponding products (as well as the bicyclic product **5c**) are water soluble and do not interfere with the standard work-up. Therefore, the chiral amine products of the transamination **6a–n** can be easily recovered by extraction (together with residual ketone) for HPLC analysis. The highest conversions obtained for each substrate among the three SpuC enzymes are listed in Table 3. The (*S*)-enantiomer of the product was formed with all substrate/enzyme pairs, most often with perfect enantioselectivity. Only substrates **4d**, **i**, **k** and **n** afforded in some cases slightly lower ee values (56–96%), however, at least one of the three SpuC enzymes tested provided >99% ee. This emphasises the importance of screening several different members of the family for each application.

The sterically hindered *ortho*-substituted ketone substrates **4a–c** afforded high conversions with high enantioselectivities (>99%). This high conversion is presumably due to a stabilising interaction between the amine formed and the halogen atom at the *ortho*-position, that drives the transamination reaction more readily,²³ than solely based on the electrostatic activation of the halogen substituent (as evident from the contrasting low conversion attained for the *para*-fluoro derivative **4i** and the high conversion for the *para*-nitro derivative **4h**). Likewise, a similar stabilising effect of the intramolecular H-bond with the newly formed amine and vicinal oxygen atom of **4k** has been suggested,²⁴ that would account for the good conversion (81–92%) of this substrate.

Table 3 Amination of ketones **4a–n** with diamine donors **1a–c** (only the best conversion obtained among the three SpuC enzymes is shown)

Subs.	Diamine 1a			Diamine 1b			Diamine 1c		
	SpuC	C^a (%)	ee ^a (%)	SpuC	C^a (%)	ee ^a (%)	SpuC	C^a (%)	ee ^a (%)
4a	Pf	92	>99	Pc	97	>99	Pc	97	>99
4b	Pc	89 ^b	>99	Pc	93	>99	Pc	93	>99
4c	Pf	75	>99	Pc	91	>99	Pc	96	>99
4d	Pf	34 ^b	75	Pc	72 ^b	74	Pp	47	>99
4e	Pf	12 ^b	>99	Pp	42 ^b	>99	Pc	30	>99
4f	Pc	35 ^b	>99	Pc	62 ^b	>99	Pc	74	>99
4g	Pp	63 ^b	>99	Pp	80 ^b	>99	Pc	86	>99
4h	Pc	99 ^b	>99	Pc	93	>99	Pc	99	>99
4i	Pp	12	>99	Pc	35	>99	Pf	14	>99
4j	Pc	37 ^b	>99	Pc	80 ^b	>99	Pc	38	>99
4k	Pp	92	>99	Pc	87	>99	Pf	81	>99
4l	Pp	79	>99	Pp	96	>99	Pf	91	>99
4m	Pp	62 ^b	>99	Pp	95	>99	Pp	55	>99
4n	Pp	99 ^b	92	Pf	99 ^b	>99	Pp	91	95

Expt. Cond.: 5 mM **4a–n**, 1.5 equiv. **1a–c**, 1 mM PLP, 1% v/v DMSO, 2 mg mL⁻¹ purified SpuC, 50 mM HEPES buffer, pH 9.0, 40 °C, 250 rpm, 24 h. ^a Determined by HPLC on a chiral stationary phase. ^b In these cases 5 equiv. of amine donor were used to increase the conversion values. C = conversion. ee = enantiomeric excess.

For non-activated ketone substrates (**4d-g, j** and **n**) the conversions appeared considerably lower, therefore we tested also a slightly higher loading of amine donors **1a-b** (5 equiv.), leading to modest to excellent conversions. Interestingly, however, with spermidine **1c** comparable conversions were reliably obtained at near-stoichiometric amounts (1.5 equiv.) compared to the better amino donor **1b** (5 equiv.). This effect can be rationalised by the higher stability of the bicyclic amine product **5c**.

A few examples of the pharmaceutical relevance of the chiral amine products thus obtained are several *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) glycine-site antagonists used in the treatment neuropathic pain (*i.e.*, Parkinson's disease), synthesised from (*S*)-**6l-m**,²⁵ or the analogues of the antiarrhythmic mexiletine obtained from (*S*)-**6k**.²⁶ All these compounds were obtained in almost quantitative conversion and excellent enantioselectivity (Table 3).

Conclusions

In summary, we report the identification, heterologous production and characterisation of SpuC orthologues, a class of transaminases that uniquely allow the conversion of numerous ketone substrates at the expense of natural diamines. The enzymes were found to afford high conversion of a broad range of substrates with a modest excess of amine donor, giving good to excellent enantiomeric excess values for pharmaceutically relevant chiral amines.

The application of these bifunctional SpuC enzymes effectively combines the appealing substrate breadth of traditional ω -ATAs with the equilibrium shifting potential of diamine donor acceptance by α,ω -DTAs. This shift, requiring just 1.5–5.0 equivalents of bio-derived putrescine or cadaverine, represents a clean, 'green' and effective synthetic strategy, as opposed to the widespread use of a 50-fold excess of conventional, often poorly-accepted monoamines. The method also mitigates the need for expensive cofactor supplementation and complex regeneration systems often employed in conjunction.

The approaches developed in this work are particularly relevant to recent advances in metabolic engineering of host strains for enhanced fermentation of putrescine,²⁷ potentially enabling the creation of an integrated microbial cell catalyst for chiral amine synthesis.

Acknowledgements

J. L. G. acknowledges the support of the BIOINTENSE project, financed through the European Union 7th Framework Programme (Grant agreement no. 312148). I. S. acknowledges a CASE award from BBSRC and Dr Reddy's (Grant code BB/K013076/1). N. J. W. was funded by the European Union's 7th Framework program FP7/2007–2013 under grant agreement no. 289646 (KYROBIO). N. J. T thanks the Royal Society for a Wolfson Research Merit Award.

Notes and references

- 1 N. J. Turner and E. O'Reilly, *Nat. Chem. Biol.*, 2013, **9**, 285–288.
- 2 Y. Ni, D. Holtmann and F. Hollmann, *ChemCatChem*, 2014, **6**, 930–943.
- 3 C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman and G. J. Hughes, *Science*, 2010, **329**, 305–309.
- 4 P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, J. S. Jensen, N. Al-Haque, W. Neto and J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, **108**, 1479–1493.
- 5 M. D. Truppo, J. D. Rozzell, J. C. Moore and N. J. Turner, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 395–398.
- 6 V. Prachayasittikul, S. Ljung, C. Isarankura-Na-Ayudhya and L. Bülow, *Int. J. Biol. Sci.*, 2006, **2**, 10–16.
- 7 K. E. Cassimjee, C. Branneby, V. Abedi, A. Wells and P. Berglund, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 5569–5571.
- 8 G. Matcham, M. Bhatia, W. Lang, C. Lewis, R. Nelson, A. Wang and W. Wu, *Chimia*, 1999, **53**, 584.
- 9 A. P. Green, N. J. Turner and E. O'Reilly, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 10714–10717.
- 10 L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández and I. Lavandera, *Adv. Synth. Catal.*, 2016, **358**, 1618–1624.
- 11 I. Slabu, J. L. Galman, N. J. Weise, R. C. Lloyd and N. J. Turner, *ChemCatChem*, 2016, **8**, 1038–1042.
- 12 A. Gomm, W. Lewis, A. P. Green and E. O'Reilly, *Chem. – Eur. J.*, 2016, DOI: 10.1002/chem.201603188.
- 13 C.-D. Lu, Y. Itoh, Y. Nakada and Y. Jiang, *J. Bacteriol.*, 2002, **184**, 3765–3773.
- 14 N. N. Samsonova, S. V. Smirnov, A. E. Novikova and L. R. Ptitsyn, *FEBS Lett.*, 2005, **579**, 4107–4112.
- 15 U. Kaulmann, K. Smithies, M. E. B. Smith, H. C. Hailes and J. M. Ward, *Enzyme Microb. Technol.*, 2007, **41**, 628–637.
- 16 M. E. B. Smith, B. H. Chen, E. G. Hibbert, U. Kaulmann, K. Smithies, J. L. Galman, F. Baganz, P. A. Dalby, H. C. Hailes, G. J. Lye, J. M. Ward, J. M. Woodley and M. Micheletti, *Org. Process Res. Dev.*, 2010, **14**, 99–107.
- 17 F. Steffen-Munsberg, C. Vickers, H. Kohls, H. Land, H. Mallin, A. Nobili, L. Skalden, T. van den Bergh, H. J. Joosten, P. Berglund, M. Höhne and U. T. Bornscheuer, *Biotechnol. Adv.*, 2015, **33**, 566–604.
- 18 M. Bommer and J. M. Ward, *Enzyme Microb. Technol.*, 2013, **52**, 218–225.
- 19 H. J. Cha, J. Jeong, C. Rojviriyaya and Y. Kim, *PLoS One*, 2014, **9**, e113212.
- 20 D. J. S. Jean, C. Yuan, E. a. Bercot, R. Cupples, M. Chen, J. Fretland, C. Hale, R. W. Hungate, R. Komorowski, M. Veniant, M. Wang, X. Zhang and C. Fotsch, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 429–432.
- 21 V. R. Solomon and H. Lee, *Curr. Med. Chem.*, 2011, **18**, 1488–1508.
- 22 C. Christophersen and C. Struve, *Heterocycles*, 2003, **60**, 1907.

- 23 C. E. Paul, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, S. García-Cerrada, J. Mendiola, Ó. de Frutos and I. Collado, *Org. Process Res. Dev.*, 2014, **18**, 788–792.
- 24 F. G. Mutti, C. S. Fuchs, D. Pressnitz, J. H. Sattler and W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.*, 2011, **353**, 3227–3233.
- 25 D. G. Brown, R. A. Urbanek, T. M. Bare, F. M. McLaren, C. L. Horchler, M. Murphy, G. B. Steelman, J. R. Empfield, J. M. Forst, K. J. Herzog, W. Xiao, M. C. Dyroff, C. M. C. Lee, S. Trivedi, K. L. Neilson and R. A. Keith, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 3553–3556.
- 26 A. Carrieri, M. Muraglia, F. Corbo and C. Pacifico, *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, **44**, 1477–1485.
- 27 Z. G. Qian, X. X. Xia and S. Y. Lee, *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, **104**, 651–662.



Contents lists available at ScienceDirect

Catalysis Today

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cattod



n-Butylamine as an alternative amine donor for the stereoselective biocatalytic transamination of ketones

Iustina Slabu^a, James L. Galman^a, Cesar Iglesias^b, Nicholas J. Weise^a, Richard C. Lloyd^c, Nicholas J. Turner^{a,*}

^a School of Chemistry, University of Manchester, Manchester Institute of Biotechnology (MIB), 131 Princess Street, Manchester, M1 7DN, United Kingdom

^b Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^c Dr. Reddy's Laboratories, Chirotech Technology Centre, 410 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0PE, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 October 2016

Received in revised form

20 December 2016

Accepted 16 January 2017

Available online xxx

Keywords:

Biocatalysis

Transaminases

n-Butylamine

Diamines

Stereoselective synthesis

Enzyme cascades

ABSTRACT

Formal reductive amination has been a main focus of biocatalysis research in recent times. Among the enzymes able to perform this transformation, pyridoxal-5'-phosphate-dependent transaminases have shown the greatest promise in terms of extensive substrate scope and industrial application. Despite concerted research efforts in this area, there exist relatively few options regarding efficient amino donor co-substrates capable of allowing high conversion and atom efficiency with stable enzyme systems. Herein we describe the implementation of the recently described *spuC* gene, coding for a putrescine transaminase, exploiting its unusual amine donor tolerance to allow use of inexpensive and readily-available *n*-butylamine as an alternative to traditional methods. *Via* the integration of *SpuC* homologues with tandem co-product removal and cofactor regeneration enzymes, high conversion could be achieved with just 1.5 equivalents of the amine with products displaying excellent enantiopurity.

Crown Copyright © 2017 Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

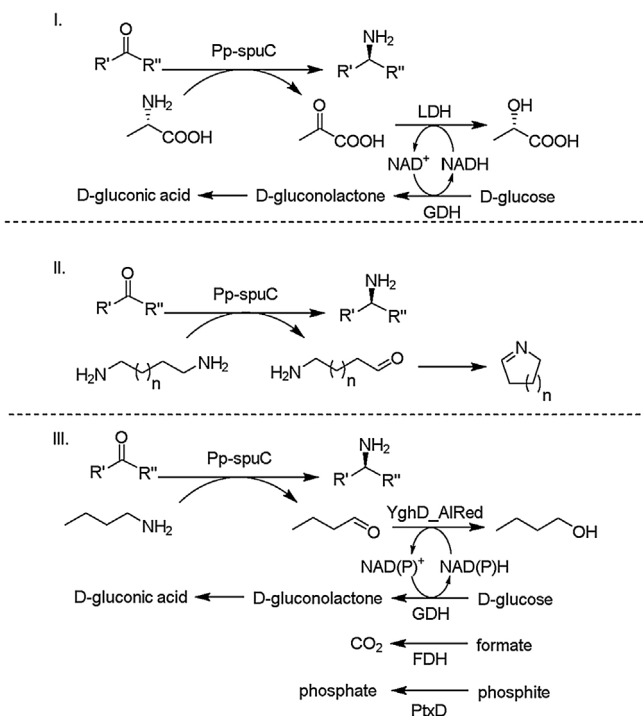
Chiral amine motifs are rapidly becoming common in both pharmaceutical and agrochemical industries and almost half of the active pharmaceutical ingredients (APIs) contain at least one chiral centre with a chiral amine unit. Approximately 95% of all drugs are predicted to be chiral by 2020 and share a market of almost \$5bn together with agrochemical, flavour and fragrance industries [1]. Special emphasis is now placed on the development of safe and efficient chiral amine synthetic methods. Complementing the traditional chemical synthetic methods, biocatalysis offers a distinct approach to the synthesis of high-value enantiopure amines, often using small, low-cost achiral starting materials. Biocatalytic routes to chiral amines have evolved significantly during the past decade, from kinetic resolution of amines using lipases, to the successful use of transaminases, imine reductases and ammonia lyases, amongst others [2].

Transaminases (EC 2.6.1.18) perform the transfer of an amino group from an amino donor to a prochiral ketone or aldehyde acceptor, employing pyridoxal-5'-phosphate PLP as a cofactor in this process. Asymmetric chiral amine synthesis catalysed by transaminases is a robust and simple method, but it has specific challenges in becoming a green and cost effective approach.

Particular attention has been drawn to overcome problems in the synthesis reaction; in which, transamination of prochiral ketones using alanine as the amino donor is hindered by a poor equilibrium constant and the occurrence of an inhibitory co-product [3]. In the last decade, several *in situ* pyruvate product removal strategies have been devised to displace the equilibrium, such as coupling the enzymatic reaction with a secondary concomitant irreversible reaction with oxidoreductases that recycles cofactor NAD(P)H. The most well-known method involves the use of lactate dehydrogenase (LDH) or formate dehydrogenase (FDH) in the presence of excess alanine and a sacrificial reducing agent (formate or glucose) to generate faster reaction rates (Scheme 1, I) [3,4]. Recently the use of diamine donors has been the focal point to displace the equilibria *via* ring aromatisation/cyclisation (Scheme 1, II) [5]. Although still in its infancy these diamine donors have proven to be successful in the transamination reaction, even though their

* Corresponding author.

E-mail address: nicholas.turner@manchester.ac.uk (N.J. Turner).



Scheme 1. Summary of transamination equilibrium-driving strategies involving the novel SpuC bifunctional transaminases. Each class of amino donor presents a specific method of co-product recycling/removal. **I. Amino acids**- alanine is used together with the LDH/GDH system for the removal of pyruvate; **II. Short-chain aliphatic diamines**- the spontaneous cyclization of the reactive amino-aldehyde intermediate provides the driving force of the reaction; **III. n-Butylamine**- the inhibitory butanal is removed via enzymatic reduction coupled with various NAD(P)⁺ recycling systems.

full potential has yet to be achieved [5,6]. Other amino donors such as isopropylamine are the preferred industrial choice since the amine is readily available and economically efficient; however, a 50–100 fold amine donor excess is required with further downstream processing required utilising specialised temperature platforms to remove highly soluble volatile coproducts via evaporation [7]. The selection of the amine donor is crucial and ideally must satisfy requirements of both atom (near-stoichiometric amounts to be used) and economic efficiency (low cost). In addition, the co-product has to be easy to remove or recycle and should not complicate the main product purification step.

Previous cost effective and environmentally benign strategies were attempted to replace isopropylamine or alanine with *n*-butylamine **1** as amino donor with commercially available transaminases but only negligible product formation was detected. Presumably, the reactive aldehyde product (butanal **2**) can bind irreversibly to the enzyme affecting the overall catalytic activity [8]. Herein we circumvented the limitations and implemented a novel enzyme cascade that harnesses the high activity of recently published Pp-spuC transaminase in tandem with a well-studied aldehyde reductase YqhD from *E. coli* [9,10].

The *yqhD* gene product is described as a scavenger of reactive aldehydes in non-metabolic pathways and has NADPH-dependent reductase activity towards simple aldehydes with a high turnover number for *n*-butanal **2** and was also shown to be effective in the industrial production of isobutanol [11]. Aldehyde reductase (YqhD) requires NADPH as cofactor to reduce the aldehyde efficiently; however, an alternative cofactor recycling system was sought after previous experience with glucose dehydrogenase led to some reduction of the ketone substrates. Our attention was focused on the phosphite dehydrogenase (PtxD) enzyme [12] as

part of an NAD(P)⁺ recycling cascade that has rarely been exploited and presents itself with several advantages over the ubiquitous formate dehydrogenase and/or glucose dehydrogenase systems. Such difficulties include low specific activities and high production costs of FDHs [13,14], and the generation of acidic byproducts (gluconic or carbonic acid) that require a controlled addition of base not suitable for pH sensitive reactions. PtxD presents an attractive alternative that catalyzes a near irreversible reaction with a thermodynamically favorable equilibrium constant in order to reduce nicotinamide cofactors NAD(P)⁺, with the generation of innocuous phosphate as the byproduct and with negligible effects on pH.

The present work describes the implementation of a novel enzyme cascade transaminase/aldehyde reductase/phosphite dehydrogenase, which explores the use of *n*-butylamine as an alternative and inexpensive amino donor. The toxic co-product butanal is converted to the environmentally benign *n*-butanol by the YqhD aldehyde reductase and phosphite dehydrogenase PtxD is used as part of NAD(P)H recycling system. The novel enzyme system is tested on a diverse panel of ketones substrates and the substitution of NADP⁺ with more the more economically affordable NAD⁺ is also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The ketones (**4a-1**), amines (**5a-1**) and buffers were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) or Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA) and were used throughout without further purification. The HPLC solvents were purchased from Sigma Aldrich. Restriction enzymes, T4 ligase, *Taq* polymerase, dNTPs and broad protein marker (2–212 kDa) were purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). *Escherichia coli* DH5α and BL21 (DE3) cells were purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Phusion polymerase were purchased from Thermo Fisher (Waltham, MA, USA). Expression vector pET-28b was purchased from Novagen (Darmstadt, Germany) and was used for gene expression. *Pseudomonas fluorescens* (KX954133), *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* 30–84, (KX954134), *Pseudomonas putida* NBRC 14161 (T2HES1) were obtained from NCIMB culture collection. The phosphite dehydrogenase (PtxD) gene from *P. stutzeri* was previously subcloned into a pBAD expression vector and was gratefully received from Professor Nigel Scrutton of University of Manchester. Commercially available transaminases ATA-113 and ATA-117 were purchased from Codexis in the form of lyophilised cell extract.

2.2. Cloning of the *yqhD* gene from *E. coli* K-12

The coding region of the *yqhD* gene (UNIPROT acc. no. Q46856) was amplified using Phusion polymerase via colony PCR from *E. coli* K-12 using the oligonucleotide primers as follows: (i) Forward 5'-ATATGGCTAGCATGAACAAC-TTAATCTGCACACCC-3' and (ii) Reverse complementary 5'-TGGTGCTCGAGTTAGCG-GCGGCTTCGTATATACGG-3' with *NheI* and *XhoI* restriction sites underlined respectively. The following PCR protocol was used: 5 min denaturation at 95 °C and then 30 cycles of 30 s denaturation at 95 °C, 30 s annealing at 58 °C and 90 s elongation at 68 °C with a 5 min final extension time at 68 °C. The PCR product was cloned into ZERO Blunt TOPO PCR cloning vector (K2830-20) following the manufacturer's protocol. The *yqhD* gene was subcloned into pET-28b expression vector containing a *N*-terminal His₆-tag with a thrombin linker. The inserted gene was in frame and downstream from the ribosome binding site as confirmed via DNA sequencing (Eurofins) and gave plasmid pET-28b-*yqhD*. The pET-

28b-yqhD plasmid was transformed in *E. coli* BL21 (DE3) and grown on 50 µg/mL kanamycin LB agar plates.

2.3. Protein expression and purification of *yqhD* gene

The *N*-His₆-tag recombinant SpuC proteins Pp-spuC, Pf-spuC and Pc-spuC were expressed and purified as described elsewhere [5]. The freshly prepared pET-28b-yqhD strains were cultivated in 600 mL of LB medium supplemented with 50 µg/mL kanamycin in 1 L baffled flask at a rotary shaking rate of 220 rpm at 37 °C. The recombinant protein expression was induced by adding isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (0.2 mM, final) when OD₆₀₀ reached 0.6–0.8. The cell cultures were incubated at 18 °C for 16 h and the cell pellets were harvested by centrifugation and lysed by ultra-sonication (Soniprep 150, 20 cycles of 20 s on/20 s off). The His₆-tag recombinant proteins were purified manually on a Ni-NTA agarose column using 50 mM HEPES, 1 mM PLP, 30 mM imidazole at pH 8.0 and an elution buffer of 50 mM HEPES, 1 mM PLP, 300 mM imidazole at pH 8.0. The collected fractions were washed twice with 50 mM HEPES containing 1 mM PLP and concentrated on an Amicon® Ultra-15 10K centrifugal filter device. The purity was analysed by SDS-PAGE with isolated protein more than 95% pure. The purified enzymes were flash-frozen and stored at –80 °C.

2.4. Biotransformations using an aldehyde reductase (AlRed) and phosphite dehydrogenase (PtxD) cascade

The reductive amination of ketones using the AlRed/PtxD cascade system were carried out in 2 mL Eppendorf tubes in a final volume of 0.5 mL. To a mixture containing 50 mM HEPES buffer and 1 mM PLP was added 7.5 mM *n*-butylamine and 5 mM ketone in DMSO, 1 mM NAD(P)⁺, 100 mM Na₂HPO₃·5H₂O, with Ec-YghD (1 mg/mL), PtxD (1 mg/mL) and 2 mg/mL of purified SpuC enzyme. The reactions were placed in a shaking incubator at 37 °C and 250 rpm for 16 h. The reactions were quenched by addition of 2 M NaOH (50 µL), followed by extraction with methyl *tert*-butyl ether (300 µL). The organic phase was dried on MgSO₄ and analysed on normal phase chiral HPLC, using analytical methods previously described [5].

3. Results and discussion

3.1. An enzyme cascade to displace the equilibrium towards chiral amine products

We have recently described and characterized a group of SpuC enzymes from *Pseudomonas* species: *P. putida* (Pp-spuC), *P. chlororaphis* subsp. *Aureofaciens* (Pc-spuC), and *P. fluorescens* (Pf-spuC), which accept a wide range of amine donors and facilitate the reductive amination of ketones using near stoichiometric amounts of diamine donors [5].

The three SpuC enzymes were purified as recombinant His₆-tagged proteins and screened against a panel of potential mono- and di-amino donors using our modified L-amino acid dehydrogenase colorimetric screen using pyruvate as the amino acceptor [15]. Due to the high activity of the newly characterised SpuC enzymes against *n*-butylamine **1**, we directed our investigations to a non-ketoacid prochiral acceptor with potential bioactive motifs.

The keto acceptor of choice was *o*-bromoacetophenone **4a**, as the chiral amine product **5a** can be coupled to biphenylmethylindole scaffolds (Table 1) reported to exhibit antidiabetic properties with the potential to clinically treat type II diabetes **6** [16].

Biotransformations were conducted using Pp-spuC with varying concentration of *n*-butylamine **1**. Not surprisingly low conversions of 10–14% were achieved with increased amine loading suggesting an inhibitory effect on product formation. This problem was

addressed by coupling the reaction with an aldehyde reductase YqhD from *E. coli* requiring NADP⁺ for the biotransformation to proceed. In the light of the high costs of the reduced cofactor our attention was drawn to an *in situ* recycling system using NADP⁺ and a phosphite dehydrogenase PtxD from *P. stutzeri*. The wildtype PtxD poorly accepts NADP⁺, instead we utilised an engineered variant with relaxed nicotinamide specificity containing point mutations at E175A and A176R that has been reported to have a 3.6-fold and 1000-fold increase in catalytic efficiency for NAD⁺ and NADP⁺ respectively [17].

Remarkably near-stoichiometric amounts of *n*-butylamine **1** with catalytic amounts of NADP⁺ were able to efficiently drive the reaction whilst procuring the chiral amine product (92% conversion, Table 1, entry 5) and producing *n*-butanol **3**, a byproduct which has considerable interests as an alternative fuel to gasoline, due to its high hydrophobicity.

A further cost efficient strategy using NAD⁺ was sought with substrate **4a** afforded a slightly lower conversion to the amine product **5a**, on the grounds of the strong affinity for NADP⁺/NADPH. Nevertheless, the aldehyde reductase *yqhD* can utilize NAD(P)H towards a synthetically viable route for generating chiral amines with high conversions and excellent *ees*. Commercially available aminotransferases ATA-113 and (*R*)-selective ATA-117 from Codexis were tested with the AlRed/PtxD cascade using catalytic amounts of NAD⁺ and gave 55% and 27% conversion respectively. The modest conversions can be attributed to the poor acceptance of *n*-butylamine as the amino donor, in comparison to Pp-spuC which was shown to have a relaxed donor amine profile.

3.2. Biocatalytic conversions of non-ketoacid prochiral acceptor substrates

A second set of experiments employed a panel of prochiral methyl ketones that can generate synthetically useful motifs. Initially, these ketone substrates (Fig. 1) were tested against the novel NAD(P)H recycling cascade using Pp-spuC as biocatalyst and a very small excess of *n*-butylamine **1** (1.5 eq.) as the amine donor.

For many of the substrates (4a-c, 4f-g, 4k-l) negligible variations in the conversions were noticed when using catalytic amounts of NAD⁺ as a more economically affordable substitute for NADP⁺, both cascades performing equally well in removing the butanal **2** co-product (Fig. 2). The remaining substrates show a noticeably higher conversion with NADP⁺. The system allowed for conversions of over 80% for *ortho*-substituted acetophenones **4a-c**, whilst the *meta*-substituted acetophenones **4f-g** have performed rather modestly, with conversions in the range of 60–70%. However, a decrease of approximately 30% in the conversion values, between the two cascade systems, has been noted when using ketones containing mono-substituted aromatic rings; relatively low conversions of 20–30% were recorded in this case. Without exceptions, the enantiomeric excess for the amines **5a-l** were consistent between complementary approaches.

Encouraged by these results, we investigated other SpuC proteins from *Pseudomonas* species, Pf-spuC and Pc-spuC. Our previous studies have shown that these enzymes have comparable activity on these classes of substrates; only small differences were observed between the three transaminases. The reactions were performed using exclusively NAD⁺ as cofactor in the AlRed/PtxD butanal removing system, as it was found to be an excellent replacement for the costly NADP⁺.

Remarkably, using only a small excess of amino donor *n*-butylamine **1** (1.5 eq.) it was possible to convert activated *ortho*-substituted acetophenones **4a-c** to the corresponding amines **5a-c** in very good conversions (>84%) and excellent *ees* (>99%) (Table 2). Furthermore, *n*-butylamine **1** proved to be a better amino donor than previously reported diamine, 1,4-diaminobutane [5b],

Table 1
Exploring selected conditions for the amination of the ketone **4a**. **Entries 1–4**: increasing concentrations of *n*-butylamine **1**, no butanal removing system; **Entries 5–6**: comparison between NADP⁺ and NAD⁺, when the AlRed/PtxD system is employed; **Entries 7–8**: use of the butanal **2** removing system with commercially available transaminases ATA-117 and ATA-113.

Entry	ATA	AlRed/PtxD NAD(P) ⁺ recycling	Equiv. of 1	Conv. (%)	ee (%)
1	Pp_spuC	No	1.5	23	>99
2	Pp_spuC	No	3	14	>99
3	Pp_spuC	No	5	10	>99
4	Pp_spuC	No	20	10	>99
5	Pp_spuC	Yes – NADP ⁺	1.5	92	>99
6	Pp_spuC	Yes – NAD ⁺	1.5	84	>99
7	ATA-117	Yes – NAD ⁺	1.5	27	>99
8	ATA-113	Yes – NAD ⁺	1.5	55	>99

Experimental conditions: 5 mM **4a**, 100 mM Na₃PO₃, 1 mM NAD⁺, AlRed 1 mg/mL, PtxD 1 mg/mL, TA 2 mg/mL, 50 mM HEPES buffer, 1 mM PLP, pH 9, 37 °C, 16 h.

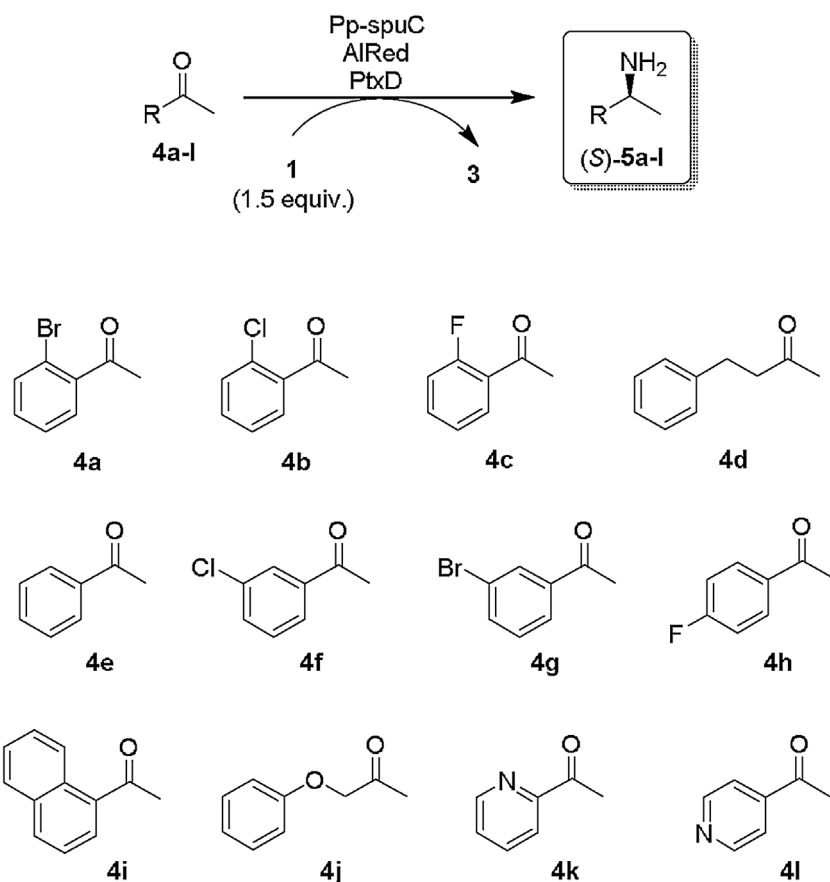


Fig. 1. Panel of prochiral ketone substrates employed in this study.

resulting in higher conversion to the majority of the chiral amines **5a-l**.

The effect of the arene substitution on the conversion and enantioselectivity of the enzymes is consistent to what was previously described with this class of transaminase biocatalysts [5b].

3.3. Time course of the transamination of 2-bromoacetophenone **4a**

The transamination of 2-bromoacetophenone **4a** to the corresponding amine **5a** was performed at time courses over 20–25 h using 1 mg/mL of purified Pp-spuC enzyme and using 1.5 equivalents *n*-butylamine **1** donor and catalytic amount of NAD⁺ cofactor

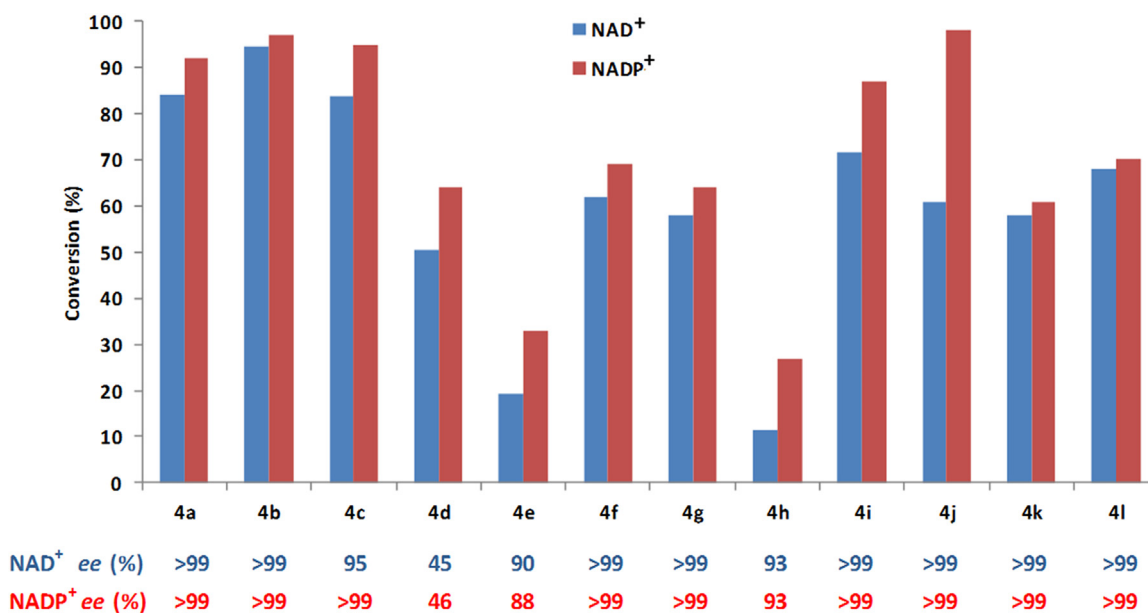


Fig. 2. Comparison of the amination of substrates **4a–j** using *n*-butylamine **1** as amino donor and the Pp-spuC/AIRed/PtxD cascade, employing the NADP⁺ cofactor and NAD⁺, respectively.

Table 2

Amination of ketones **4a–l** using *n*-butylamine **1** as amino donor.

Substrate	Pp-spuC		Pf-spuC		Pc-spuC	
	Conv. (%)	ee (%)	Conv. (%)	ee (%)	Conv. (%)	ee (%)
4a	84	>99	62	>99	76	>99
4b	95	>99	86	96	85	97
4c	84	>99	55	>99	85	>99
4d	51	46	30	51	42	23
4e	19	88	11	>99	7	>99
4f	62	>99	24	>99	20	>99
4g	58	>99	19	>99	23	>99
4h	11	93	8	>99	16	>99
4i	72	>99	32	>99	29	>99
4j	61	>99	62	12	87	35
4k	71	>99	31	>99	39	>99
4l	87	>99	57	>99	68	>99

Experimental conditions: 5 mM **4a–l**, 7.5 mM *n*-butylamine, 100 mM Na₃PO₃, 1 mM NAD⁺, AIRed 1 mg/mL, PtxD 1 mg/mL, ATA 2 mg/mL, 50 mM HEPES buffer, 1 mM PLP, pH 9, 37 °C, 16 h.

(Fig. 3). The temperature was maintained at 30 °C and optimum pH 9 during our investigations. The substrate concentration was kept low due to the insolubility of the substrates, as well as the substrate and product inhibitions are known for several omega-transaminases sharing comparable sequence identity. Conversions to the amine product were obtained after 30 min initiation of the 3 enzyme cascade. After 5 h the reaction had reached 50% conversion to the amine product with >99% *ees*. After 25 h the reaction reached 84% product conversion and did not progress any further, presumably due to the inactivation of the three-enzyme system.

4. Conclusions

We have reported the development and demonstration of a three-enzyme cascade enabling the amination of prochiral ketones with near-stoichiometric concentrations of co-substrate. The use of enzymes of the SpuC class of transaminase biocatalysts was shown to enable use of the alternative and otherwise poorly accepted amine donor *n*-butylamine. Issues surrounding the unfavourable equilibrium and reactive coproduct of this transformation were addressed through combination with an efficient aldehyde reductase, driving the reaction to near-completion and

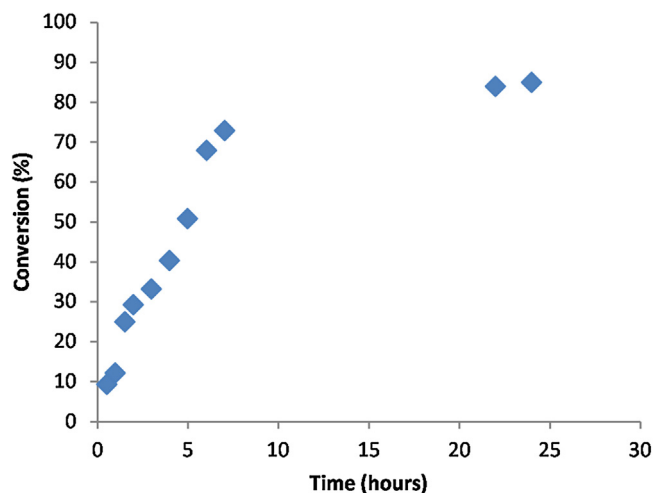


Fig. 3. Kinetics of the transamination of 2-bromoacetophenone **4a** (5 mM) by Pp-spuC, using *n*-butylamine **1** as amino donor (7.5 mM, 1.5 eq) and the AIRed/PtxD cofactor recycling system.

giving butanol as a benign side-product. To eliminate enzymatic cross-talk between the reductase and widely-used cofactor recycling systems, such as glucose dehydrogenase, an engineered dual-specificity phosphite-metabolising enzyme was employed with for either NADPH or NADH regeneration. The utility of this strategy was demonstrated for a range of pharmaceutically-relevant chemical transformations, including the production of enantiopure (*S*)-*ortho*-bromophenylethanamine **5a**.

Acknowledgements

S. acknowledges a CASE award from BBSRC and Dr. Reddy's (Grant code BB/K013076/1). J.L.G. acknowledges the support of the BIOINTENSE project, financed through the European Union 7th Framework Programme (Grant agreement no. 312148). N.J.W. was funded by the European Union's 7th Framework program FP7/2007-2013 under grant agreement no. 289646 (KYROBIO). C.I. acknowledges funding from CSIC-CAP, PEDECIBA and ANII – UK_RH_2015_1.6. N.J.T thanks the Royal Society for a Wolfson Research Merit Award.

References

- [1] C. Challener, Expanding the chiral toolbox, *Pharm. Technol.* 40 (2016).
- [2] (a) D. Ghislieri, N.J. Turner, *Top. Catal.* 57 (2014) 285–300; (b) S. Ahmed, F. Parmeggiani, N. Weise, S. Flitsch, N. Turner, *ACS Catal.* 5 (2015) 5410–5413.
- [3] (a) P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, J.S. Jensen, N. Al-Haque, W. Neto, J.M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 1479–1493; (b) M.D. Truppo, J.D. Rozzell, J.C. Moore, N.J. Turner, *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 395–398.
- [4] (a) R.C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *Acs Catal.* (2014) 129–143; (b) E. O'Reilly, C. Iglesias, D. Ghislieri, J. Hopwood, J.L. Galman, R.C. Lloyd, N.J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 2447–2450.
- [5] (a) I. Slabu, J. Galman, N. Weise, R. Lloyd, N. Turner, *Chemcatchem* 8 (2016) 1038–1042; (b) J.L. Galman, I. Slabu, N.J. Weise, C. Iglesias, F. Parmeggiani, R.C. Lloyd, N.J. Turner, *Green Chem.* 9 (2017), <http://dx.doi.org/10.1039/c6gc02102f>; (c) A. Gomm, W. Lewis, A. Green, E. O'Reilly, *Chem. Eur. J.* 22 (2016) 12692–12695.
- [6] (a) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Adv. Syn. Catal.* 358 (2016) 1618–1624; (b) A. Green, N. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem.* 126 (2014) 10890–10893.
- [7] W. Matcham, M. Bhatia, W. Lang, C. Lewis, R. Nelson, A. Wang, W. Lu, *Chimia* 53 (1999) 584–589.
- [8] (a) K. Fesko, K. Steiner, R. Breinbauer, H. Schwab, M. Schürmann, G.A. Strohmeier, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 96 (2013) 103–110; (b) C. Paul, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, et al., *Org. Process Res. Dev.* 18 (2014) 788–792.
- [9] G. Sulzenbacher, K. Alvarez, R.H.H. Van Den Heuvel, C. Versluis, S. Spinelli, V. Campanacci, C. Valencia, C. Cambillau, H. Eklund, M. Tegoni, *J. Mol. Biol.* 342 (2004) 489–502.
- [10] S. Atsumi, T.Y. Wu, E.M. Eckl, S.D. Hawkins, T. Buelter, J.C. Liao, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85 (2010) 651–657.
- [11] L.R. Jarboe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (2011) 249–257.
- [12] A.M.G. Costas, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 17429–17436.
- [13] U. Kragl, W. Kruse, W. Hummel, C. Wandrey, *Biotechnol. Bioeng.* 52 (1996) 309–319.
- [14] H. Slusarczyk, S. Felber, M.R. Kula, M. Pohl, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 1280–1289.
- [15] M. Bommer, J.M. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* 52 (2013) 218–225.
- [16] A. Asteian, A.L. Blayo, Y. He, M. Koenig, Y. Shin, D.S. Kuruvilla, C.A. Corzo, M.D. Cameron, L. Lin, C. Ruiz, S. Khan, N. Kumar, S. Busby, D.P. Marciano, R.D. Garcia-Ordóñez, P.R. Griffin, T.M. Kamenecka, *ACS Med. Chem. Lett.* 6 (2015) 998–1003.
- [17] R. Woodyer, W. a van der Donk, H. Zhao, *Biochemistry* 42 (2003) 11604–11614.