



Síntesi quimioenzimàtica d'iminociclitols mitjançant aldolases natives i modificades genèticament

Anna Soler Casaponsa

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Síntesi quimioenzimàtica d'iminociclitolos mitjançant aldolases natives i modificades genèticament

Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC)
Consell Superior d' Investigacions Científiques (CSIC)

Facultat de Química, Universitat de Barcelona,
Departament de Química Orgànica,
Programa de Química Orgànica

Anna Soler Casaponsa, 2015

CONSELL SUPERIOR D'INVESTIGACIONS CIENTÍFIQUES (CSIC)
INSTITUT DE QUÍMICA AVANÇADA DE CATALUNYA (IQAC)

UNIVERSITAT DE BARCELONA
Facultat de Química

Departament de Química Orgànica
Programa de Doctorat de Química Orgànica

**Síntesi quimioenzimàtica
d'iminociclitols mitjançant aldolases
natives i modificades genèticament**

Memòria presentada per Anna Soler Casaponsa per optar al
Títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Dirigida per:
Dr. Pere Clapés Saborit
Dr. Jesús Joglar Tamargo

Tutor:
Dr. Francesc Rabanal Anglada

Doctoranda:
Anna Soler Casaponsa

*"Whatever you do in life will be insignificant,
but it's very important that you do it.
Because nobody else will"*

Mahatma Gandhi

*Als meus pares i germana,
per estar sempre al meu costat.*

AGRAÏMENTS

En primer lloc, voldria agrair al meu director de tesi, Prof. Pere Clapés per haver-me donat la oportunitat de treballar en el seu grup de recerca. Vull agrair-li la confiança, suport, paciència que m'ha mostrat tots aquests anys, així com tots els coneixements que he après. També, i no menys, al meu co-director Prof. Jesús Joglar, qui fou la primera persona amb qui vaig contactar del centre i em va obrir les portes a tot el grup.

En tots aquests anys he pogut compartit moltes estones amb molta gent del CSIC, sigui per temporades llargues o períodes curts de setmanes... A tots i cada un de vosaltres, moltes gràcies. Per introduir-me en el laboratori, Mariana i Xavi . Tots els consells i ajuda de l'Alda, l'Anna Sz, Karel, Aris i Dani. Per moments i estones especials, cafès, festes, sopars, viatges....a tots els anteriors, Carles, Sara R., Sara B., Anna C., Marisa, Maria, Rafa, Livia, Elvira, Cristinne, Ramón...i un llarg etc. En especial, en aquesta última etapa, vull agrair el suport i amiatat de la Raquel i l'Àlex. De tots m'emporto un gran record i el plaer d'haver compartit moltes estones al vostre costat.

A tot el grup, ja que sense aquest, cap dels fruits del treball hagués estat possible.

A la Laura i Alba. Aprecio molt la vostra amiatat i tot el temps compartit dins i fora del CSIC.

A les meves nenes...per estar sempre amb mi, escoltar-me i ajudar-me tan en bons i no tant bons moments...per compartir el viatge de la vida i per ser les meves arrels. Al Juli, pel teu amor i comprensió.

Als meus pares i ma germana, per donar-me tan de suport en tot i infinita paciència. A la meva família present i futura.

SUMARI

Capítol 1 (**Introducció**) es fa una revisió del tema d'interès de la present tesi: biocatàlisi, processos quimioenzimàtics, aldolases i iminociclitols. Es dedica gran part de la introducció a la descripció de les aldolases emprades en el present treball: aldolases dependents de glicina, de DHAP i la D-fructosa-6-fosfat aldolasa (FSA), les seves aplicacions sintètiques i optimització per enginyeria de reacció i/o per enginyeria de proteïnes. Es focalitza la revisió en la síntesi d'imino-ciclitols, compostos amb potencials aplicacions farmacèutiques, per mitjà de l'ús d'aldolases com a etapa clau en estratègies quimioenzimàtiques.

Capítol 2 (**Objectius**) s'enuncien els propòsits d'aquesta tesi.

Capítol 3 (**Resultats i discussió**) es descriuen els estudis realitzats en aquesta tesi. En cada capítol s'adjunta una breu introducció del tema concret d'estudi.

- **Capítol 3.1** s'exposa l'estudi realitzat sobre la producció de l'aldolasa dependent de glicina D-treonina aldolasa d'*Achromobacter xylosoxidans* i la seva aplicabilitat com biocatalitzador per obtenir β -hidroxi- α -D-aminoàcids.

- **Capítol 3.2** es presenta una estratègia quimioenzimàtica emprant aldolases dependents de glicina, de DHAP i de la D-fructosa-6-fosfat aldolasa (FSA) per obtenir una col·lecció de derivats polihidroxilats de l'àcid piperòlic, homioiminociclitols piperidínics i pirrolidínics a partir de substrats simples i aquirals en tres passos sintètics i creant fins a cinc centres estereogènics.

- **Capítol 3.3** tracta de la generació d'una col·lecció de variants de FSA per redisseny del centre catalític a fi d'incrementar les conversions aldòliques dels donadors α -hidroxicarboníl·lics dihidroxiacetona (DHA), hidroxiacetona (HA) i glicolaldehid (GO) a N-Cbz-aminoaldehids d'àmplia varietat estructural. Les noves variants de FSA es produïren a partir de les plataformes FSA A129S/A165G per DHA i HA i FSA L107Y/A129G/A165G per GO. Les variants FSA A129S/R134X/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G on X: P, R, S i V generaren conversions més elevades en les addicions aldòliques d'interès.

- **Capítol 3.4** es presenta la síntesi d'una col·lecció de 47 iminociclitols mono i bicíclics de tipus pirrolidines, piperidines, pirrolizidines, indolizidines i quinolizidines. L'etapa clau en aquesta síntesi fou l'addició aldòlica de DHA, HA i

GO a *N*-Cbz-aminoaldehids catalitzades per les noves variants de FSA obtingudes (**Capítol 3.3**).

Capítol 4 (**Conclusions**) s'enumeren les conclusions de la present tesi.

Capítol 5 (**Secció experimentals**) es detalla el material biològic i químic utilitzat, així com els procediments i tècniques emprades en el treball experimental.

Material suplementari de cada un dels capítols de resultats i discussió (**Capítols S3.1-S3.4**), la descripció dels productes finals (**Capítol S.5**) i les publicacions originades de la present tesi (**Capítol S.6**), es troben en el CD adjunt.

ÍNDIX

Agraïments	VII
Sumari	IX
Abreviacions freqüentment utilitzades	XVII
1. INTRODUCCIÓ	19
1.1 Biocatàlisi i processos quimioenzimàtics.....	21
1.1.1 Enzims en síntesi asimètrica	21
1.1.2 Reaccions aldòliques enzimàtiques	22
1.1.3 Optimització de processos biocatalítics	23
1.1.3.1 Enginyeria de reaccions	23
1.1.3.2 Enginyeria de proteïnes.....	24
1.2 Iminociclitols: estructura, aplicacions i síntesi	26
1.2.1 Propietats biològiques i farmacològiques	27
1.2.2 Síntesi d'imino-ciclitols	29
1.3 Aldolases natives i modificades genèticament.....	31
1.3.1 Mecanisme d'acció i classificació	32
1.3.2 Aldolases dependents de glicina	34
1.3.2.1 L-treonina aldolases.....	35
1.3.2.2 D-treonina aldolases	36
1.3.2.3 Optimització de les aldolases dependents de glicina	37
1.3.2.4 Aplicacions sintètiques d'aldolases dependents de glicina	39
1.3.3 Aldolases dependents de dihidroxiacetona fosfat (DHAP)	40
1.3.3.1 Optimització d'aldolases dependents de DHAP.....	43
1.3.3.1.1 Optimització en la dependència de DHAP	44
1.3.3.1.2 Redisseny del centre actiu de la FucA	46
1.3.3.2 Aplicacions sintètiques d'aldolases dependents de DHAP	47
1.3.4 Aldolases dependents de DHA i anàlegs no fosforilats.....	49
1.3.4.1 Optimització de FSA.....	54
1.3.4.1.1 Optimització en l'especificitat pels donadors DHA i GO.....	54
1.3.4.1.2 Ampliació de la flexibilitat per a donadors inèdits	57
1.3.4.1.3 Ampliació i millora en la tolerància de N-Cbz-aminoaldehids	57
1.3.4.1.4 Modificació de l'estereoselectivitat de la FSA.....	58

1.3.4.2 Aplicacions sintètiques de FSA	59
1.4 Aldolases en estratègies de cascada enzimàtica	60
1.4.1 Reaccions cascada tipus "one pot" emprant una aldolasa	61
1.4.2 Reaccions "tàndem" multi-enzimàtiques amb aldolases	62
1.4.3 Reaccions "tàndem" quimioenzimàtiques amb aldolases.....	64
2. OBJECTIUS	67
2.1 Objectius generals	69
2.2 Objectius específics	69
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	71
3.1 Estudi de la D-treonina aldolasa d'<i>Achromobacter xylosoxidans</i> per a l'obtenció de β-hidroxi-α-aminoàcids.....	73
3.1.1 Estudis previs.....	75
3.1.1.1 Estudis previs de la producció de D-TA _{oxy}	76
3.1.1.2 Estudis previs de síntesi asimètrica directa de D- β -hidroxi- α -aminoàcids amb D-TA _{oxy}	76
3.1.2 Obtenció de l'enzim D-treonina aldolasa d' <i>Achromobacter xylosoxidans</i> adequat per aplicacions sintètiques.....	77
3.1.2.1 Purificació per columna d'afinitat de metalls immobilitzats (IMAC)	78
3.1.2.2 Tractament de D-TA _{oxy} sense IMAC.....	81
3.1.2.3 Activitat enzimàtica específica L- i D-treonina aldolasa de D-TA _{oxy} segons el mètode de purificació emprat	85
3.1.3 Síntesi asimètrica de D- β -hidroxi- α -aminoàcids amb D-TA _{oxy}	86
3.1.3.1 Estudi d'addicions aldòliques amb aldehids acceptors seleccionats i de la influència del medi de reacció en les conversions i diastereoselectivitats...86	
3.1.3.1.1 Assignació de la estereoquímica relativa dels productes D- <i>sin</i> /D- <i>anti</i> :	90
3.1.3.2 Optimització dels paràmetres de la reacció per a l'obtenció (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-amino-3-hidroxi-4,4-dimetoxibutanoic (D- <i>sin</i> 3a)	91
3.1.4 Conclusions.....	93
3.2 Aldolases en estratègies tàndem quimioenzimàtiques: Síntesi de derivats polihidroxilats de l'àcid pìpecòlic i iminociclitols piperidínics i pirrolidínics	95
3.2.1 Estratègies tàndem quimioenzimàtiques per a la síntesi d'iminociclitols polihidroxilats	98
3.2.2 Primera etapa biocatalítica: Síntesi diastereoselectiva de β -hidroxi- α -aminoàcids mitjançant aldolases dependents de glicina	100
3.2.3 Síntesi de derivats polihidroxilats de l'àcid pìpecòlic	103

3.2.3.1	Obtenció dels aldehids substrat de la segona etapa biocatalítica.....	104
3.2.3.2	Estudi a nivell analític de les addicions aldòliques catalitzades per aldolases dependents de DHAP.....	105
3.2.3.3	Estudi a nivell analític de les addicions aldòliques catalitzades per D-fructosa-6-fosfat aldolasa (FSA).....	107
3.2.3.4	Escalats i caracterització dels derivats polihidroxilats de l'àcid pìpecòlic.....	109
3.2.4	Síntesi de derivats polihidroxilats d'homoiminoclitols piperidínics.....	112
3.2.4.1	Obtenció dels aldehids substrat de la segona etapa biocatalítica.....	113
3.2.4.2	Estudi a nivell analític de les addicions aldòliques catalitzades per aldolases dependents de DHAP.....	114
3.2.4.3	Estudi a nivell analític de les addicions aldòliques catalitzades per D-fructosa-6-fosfat aldolasa (FSA).....	117
3.2.4.4	Escalat i caracterització dels derivats polihidroxilats d'homoiminoclitols piperidínics.....	118
3.2.5	Síntesi de derivats polihidroxilats pirrolidínics.....	122
3.2.6	Conclusions.....	124
3.3	Redisseny del centre actiu de la FSA per a incrementar l'afinitat per acceptors N-Cbz-aminoaldehids.....	125
3.3.1	Estratègia d'avaluació de noves variants de FSA per a la síntesi d'iminoclitols polihidroxilats mono i bicíclics.....	128
3.3.2	Generació de noves variants de FSA amb modificació S166G, FSA A129S/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/A165G/S166G i la seva avaluació front N-Cbz-aminoaldehids seleccionats.....	130
3.3.3	Generació de noves variants de FSA amb activitat incrementada per GO i N-Cbz-amino aldehids voluminosos.....	134
3.3.4	Estudi de noves modificacions en el centre catalític de la FSA per enginyeria de proteïnes per a incrementar l'activitat front N-Cbz-aminoaldehids voluminosos.....	136
3.3.5	Estudi de la posició R134 de FSA en les plataformes FSA A129S/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/A165G/S166G.....	140
3.3.5.1	Generació racional de noves variants de FSA en R134 per mutagènesi de lloc dirigit.....	141
3.3.5.1.1	FSA A129S/R134X/A165G/S166G on X= A, G, S i E.....	141
3.3.5.1.2	FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G on X= S i E.....	141
3.3.5.2	Generació de noves variants de FSA per mutagènesi de saturació de lloc en R134.....	142

3.3.5.2.1 Construcció de la genoteca FSA A129S/R134X/A165G/S166G ...	142
3.3.5.2.2 Generació de les variants FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G on X= P i H.....	144
3.3.5.3 Avaluació de les capacitats sintètiques de les variants A129S/R134X/A165G/S166G en les addicions de DHA o HA a N-Cbz-aminoaldehyds seleccionats.....	144
3.3.5.4 Avaluació de les capacitats sintètiques de les variants L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G en les addicions de GO a N-Cbz-aminoaldehyds seleccionats.....	149
3.3.6 Conclusions.....	150
3.4 Síntesi de nous iminociclitols mono i bicíclics polihidroxilats mitjançant variants de FSA. Estudi de la configuració estructural dels nous compostos i de la estereoselectivitat de la FSA	151
3.4.1 Síntesi quimioenzimàtica i caracterització d'iminoiciclitols polihidroxilats catalitzades per variants de FSA.....	154
3.4.1.1 Síntesi a escala preparativa d'iminoiciclitols a partir de compostos α -hidroxicarbonílics i N-Cbz-aminoaldehyds voluminosos	154
3.4.1.2 Estereoquímica esperada dels iminoiciclitols mono i bicíclics	158
3.4.1.3 Elucidació estructural i estereoquímica dels iminoiciclitols sintetitzats	160
3.4.2 Estudis sobre la racemització de N-Cbz-aminoaldehyds en addicions aldòliques catalitzades per variants de FSA	170
3.4.2.1 Estudi de la racemització dels N-Cbz-aminoaldehyds en presència de FSA.....	170
3.4.2.2 Estudi de la epimerització dels adductes aldòlics catalitzats per variants de FSA.....	171
3.4.3 Conclusions.....	175
4. CONCLUSIONS	177
5. SECCIÓ EXPERIMENTAL.....	183
5.1 Equip general.....	185
5.2 Reactius químics i altres	186
5.3 Material biològic.....	186
5.3.1 Soques bacterianes.....	186
5.3.2 Vectors.....	187
5.3.3 Oligonucleòtids.....	189
5.4 Medis i solucions	192
5.5 Tècniques de biologia molecular	193

5.5.1 Extracció i aïllament d'ADN plasmídic	193
5.5.2 Electroforesi d'ADN en gel d'agarosa	193
5.5.3 Extracció i purificació d'ADN en gel d'agarosa	194
5.5.4 Quantificació d'àcids nucleics en solució.....	194
5.5.5 Transformació de plasmidis en <i>E.coli</i> per mètode químic	194
5.5.6 Amplificació d'ADN mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	195
5.5.7 Subclonatge en vectors d'expressió: Construcció del nou plasmidi pQE60-DHThrA _{oxy}	196
5.5.8 Mutagènesi dirigida i de saturació de lloc.....	199
5.6 Anàlisi bioinformàtica de seqüències d'ADN	203
5.7 Tècniques microbiològiques per a l'estudi de proteïnes	203
5.7.1 Sistemes de cultiu de <i>E.coli</i> : Expressió de proteïnes	203
5.7.2 Extracció de proteïnes de cèl·lules de <i>E. coli</i>	204
5.7.3 Purificació i conservació de proteïnes recombinants.....	204
5.7.4 Quantificació de proteïnes	207
5.7.5 Electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida	207
5.7.6 Assajos d'activitat enzimàtica.....	195
5.7.7 Construcció de la genoteca FSA A129S/R134X/A165G/S166G	212
5.7.8 Mètodes computacionals: Modelatge molecular.....	214
5.8 Tècniques químiques i analítiques	214
5.8.1 Preparació de <i>N</i> -Cbz-aminoaldehids	214
5.8.2 Síntesi de dihidroxiacetona fosfat (DHAP)	217
5.8.3 Anàlisi de substrats i productes per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC, <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)	218
5.8.4 Anàlisi de compostos per ressonància magnètica nuclear (RMN)	219
5.8.5 Síntesi de derivats de 2-oxazolidinones	220
5.8.6 Determinació de rotacions òptiques específiques (α_D^{20})	220
5.8.7 Determinació de la massa molecular	220
5.9 Addicions aldòliques catalitzades per aldolases a escala analítica.....	221
5.9.1 Addicions aldòliques amb aldolases dependents de glicina.....	221
5.9.2 Addicions aldòliques catalitzades per aldolases dependents de DHAP	222
5.9.3 Addicions aldòliques catalitzades per FSA _{wt} i variants	223

5.10 Síntesi de derivats polihidroxilats de l'àcid piperòlic i iminociclitols piperidínics	226
5.10.1 Síntesi dels intermedis obtinguts amb treonina aldolases.....	226
5.10.2 Purificació dels àcids <i>N</i> -Cbz-3-hidroxi-4,4-dimetoxi-butanoic (2a , 3a-b) per la caracterització estructural.....	227
5.10.3 Obtenció dels àcids (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)- (3d) i (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2-(benziloxicarbonilamino)-3-hidroxi-4-oxobutanoic (2d).....	228
5.10.4 Obtenció dels aldehyds (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)- (3e) i (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)- <i>N</i> -Cbz-3-amino-2,4-dihidroxibutanal (2e).....	228
5.10.5 Síntesi dels adductes aldòlics catalitzats per FucA F131A i RhuA _{wt} (4 , 5 , 9a-b i 10a).....	229
5.10.6 Síntesi dels adductes aldòlics catalitzats per FSA _{wt} i variants (6a-c , 7a-c , 11a-c).....	230
5.10.7 Purificació dels adductes aldòlics	230
5.10.8 Obtenció de derivats d'àcid piperòlic i iminociclitols piperidínics finals	231
5.10.9 Purificació de derivats de l'àcid piperòlic per cromatografia de bescanvi catiònic forta	231
5.11 Síntesi d'iminociclitols a partir de <i>N</i> -Cbz-aminoaldehyds catalitzades per variants de FSA	232
5.11.1 Síntesi dels adductes aldòlics a partir <i>N</i> -Cbz-aminoaldehyds i DHA, HA i GO.....	232
5.11.2 Purificació dels adductes aldòlics	232
5.11.3 Obtenció dels iminociclitols finals	233
5.11.4 Purificació dels iminociclitols per cromatografia de bescanvi catiònic feble.....	234
5.12 Estudi de la racemització dels <i>N</i> -Cbz-aminoaldehyds en presència de FSA.....	234
5.12.1 Preparació de mostres.....	234
5.12.2 Anàlisi i separació de <i>N</i> -Cbz-aminoalcohols per columna quiral	235
6. BIBLIOGRAFIA	237

ABREVIACIONS FREQUËTMENT UTILITZADES

axy: *Acrhomobacter xylosoxidans*

AcOEt: Acetat d'etil

Cbz: Benziloxicarbonil

DHA: Dihidroxiacetona

DHAP: Dihidroxiacetona fosfat

DMF: *N,N*-dimetilformamida

DO₆₀₀: Densitat òptica a 600 nm

d.r.: Relació diastereomèrica

DTT: 1,4-ditiotreitol

EC: Número de la Comissió d'Enzim (*Enzyme Commission Number*)

E.Coli o *eco*: *Escherichia coli*

e.d.: Excés diastereomèric

e.e.: Excés enantiomèric

FSA: D-Fructosa-6-fosfat aldolasa

FucA: L-Fuculosa-1-fosfat aldolasa

GO: Glicolaldehid

HA: Hidroxiacetona

HPLC: Cromatografia Líquida d'Alta Eficàcia (*High performance liquid chromatography*)

IBX: Àcid 2-iodoxibenzoic

IMAC: Purificació de proteïnes per Columna d' Afinitat de Metalls Immobilitzats (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*)

PCR: Reacció en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

pde: *Paracoccus denitrificans*

PLP: Piridoxal-5-fosfat

RhuA: L-Rhamnulosa-1-fosfat aldolasa

RMN: Ressonància Magnètica Nuclear

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (*Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis*)

TA: Treonina aldolasa

TEA: Trietanolamina

Tris: Tris (hidroximetil) aminometà

wt (referit a l'enzim): Enzim natural, natiu, salvatge (*wild-type*)

1

INTRODUCCIÓ

1.1 BIOCATÀLISI I PROCESSOS QUIMIOENZIMÀTICS

La biocatàlisi és l'ús d'enzims o microorganismes per a catalitzar reaccions químiques. El camp de la biocatàlisi començà a guanyar importància en la segona meitat del segle XX pel seu potencial d'aplicació en la indústria farmacèutica, agroalimentària o de combustibles, i segueix creixent en l'actualitat.^{1,2}

L'ús d'enzims en combinació amb la síntesi química ha permès optimitzar molts processos a gran escala, tant des del punt de vista mediambiental com econòmic o sintètic.³ Un exemple clar fou l'optimització de la fabricació de l'acetat de cortisona amb la introducció de biotransformacions en el procés. El procés es reduí de 31 a 5 passos i el cost del producte, de 200\$ a 6\$ per gram.⁴

Els processos quimioenzimàtics són especialment útils per a la síntesi de compostos quirals altament funcionalitzats, demanda dels quals està en continu augment des que es produeix millora en la interpretació química dels fenòmens biològics. Un exemple són les vendes estimades globals d'alcaloides aplicats en medicina, les quals ascendiren a 4.000 milions de US\$ en el 2002.⁵ Per tant, el disseny de noves rutes biocatalítiques eficients per a la síntesi de molècules bioactives és un camp en progrés i de gran interès tan científic com industrial.^{1,3,6,7}

1.1.1 ENZIMS EN SÍNTESI ASIMÈTRICA

Els enzims són biocatalitzadors que la naturalesa ha evolucionat per facilitar les transformacions químiques necessàries en la vida. El fet que els enzims aïllats catalitzin reaccions i acceptin substrats no naturals permet la seva aplicació dins la síntesi química.

Les propietats més destacades en síntesi asimètrica són l'elevada eficiència i selectivitat (quimio-, regio- i estereoselectivitat), que resulten de la seva naturalesa quiral. Gràcies a aquestes propietats, minimitzen la formació de subproductes per reaccions secundàries no desitjades i faciliten la construcció de molècules complexes d'elevada funcionalitat sense el requeriment d'etapes de protecció i desprotecció i en pocs passos sintètics, en comparació a la síntesi orgànica clàssica. A més, les condicions suaus emprades en les transformacions enzimàtiques i l'ús d'aigua com a solvent, fan de la biocatàlisi una de les tecnologies més atractives, capaç de satisfer la creixent necessitat de processos industrials cada cop més sostenibles ambientalment com econòmicament.^{3,7,8}

En els darrers 20 anys s'han emprat una gran varietat d'enzims en química sintètica, com hidrolases, liases, oxidoreductases, glicosiltransferases o transaminases, optimitzant una gran quantitat de processos sintètics.^{3, 9, 10}

Els avenços en la tecnologia d'enginyeria genètica i en bioinformàtica han impulsat enormement el camp de la biocatàlisi. Aquestes eines han promogut el descobriment de nous enzims i el redisseny dels existents.¹ Així, en l'actualitat és possible modificar-ne les característiques catalítiques a fi d'adaptar-los als requeriments de processos industrials, en comptes de dissenyar aquests en funció de les limitacions dels enzims.

Les aldolases, juntament amb les transaldolases i transcetolases, representen una de les classes de biocatalitzadors més prometedors en síntesi asimètrica ja que catalitzen la formació d'un nou enllaç C-C, permetent la construcció d'estructures moleculars quirals complexes a partir de precursors simples aquirals.^{11, 12}

1.1.2 REACCIONS ALDÒLIQUES ENZIMÀTIQUES

La reacció d'addició aldòlica és un dels mètodes més efectius per a la formació d'enllaços carboni-carboni, vital en la química orgànica. A través de l'addició aldòlica, es formen simultàniament fins a dos centres estereogènics. En síntesi orgànica, el control de la configuració absoluta dels centres estereogènics generats ha estat un objectiu i un repte important d'aquesta metodologia. Es per això que s'han desenvolupat un elevat nombre de mètodes d'addició aldòlica asimètriques catalítiques, on les reaccions enzimàtiques s'han establert com una alternativa a la organometàl·lica o la organocatàlisi.^{4, 13, 14}

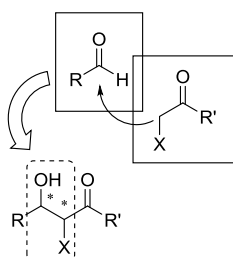


Figura 1.1.1. Reacció d'addició aldòlica

Els enzims que catalitzen les addicions aldòliques o retroaldòliques en la natura són les **aldolases**. Pertanyen a un grup específic de liases i s'encarreguen de la formació o excisió estereoselectiva d'enllaços C-C mitjançant una reacció aldòlica o retro-aldòlica, en l'atac d'un donador nucleòfil, enolat o cetona, a un

aldehid acceptor electròfil, generant compostos β -hidroxi carboníl·lics (Figura 1.1.1).^{15, 16}

Les reaccions aldòliques asimètriques biocatalítiques són especialment adequades per a la síntesi de compostos biològicament rellevants, típicament polifuncionals i hidrosolubles, com ara aminoàcids, carbohidrats, iminociclitols, entre altres compostos polihidroxilats.^{11, 12, 16-18}

Existeixen diverses aldolases natives comercials i altres han estat optimitzades en els darrers anys mitjançant tècniques d'enginyeria de proteïnes, permeten el seu ús a nivell preparatiu en processos biocatalítics.¹⁸⁻²¹

1.1.3 OPTIMITZACIÓ DE PROCESSOS BIOCATALÍTICS

L'ús d'enzims en síntesi orgànica, malgrat el seu enorme potencial i avantatges, presenta sovint certes limitacions. Alguns d'aquests inconvenients, en segons quins casos, són la baixa activitat en presència de solvents orgànics, estret rang de substrats tolerats, requeriment de cofactors complexos i cars o presenten una estabilitat baixa sota les condicions operatives desitjades. En molts casos han estat resolts amb el desenvolupament d'estratègies tecnològiques apropiades al llarg de dècades, que han contribuït enormement al desenvolupament processos biocatalítics eficients.^{6, 10, 22}

En el disseny i millora de processos biocatalítics, les estratègies s'han centrat en l'estudi de les condicions òptimes de reacció -Enginyeria de reacció- i en l'estudi del biocatalitzador -Enginyeria de proteïnes-.

1.1.3.1 ENGINYERIA DE REACCIONS

L'enginyeria de reacció consisteix en la manipulació racional de les condicions de reacció per influenciar positivament a les propietats catalítiques de l'enzim.^{6, 11} Entre les variables més importants, es troben el pH, la temperatura i la composició del medi de reacció.

Els canvis de pH en el medi afecten tant a la conformació i/o l'estat d'ionització dels enzims, als substrats, així com també en reaccions secundàries. En relació als enzims, residus bàsics o àcids poden formar part del centre actiu i, per tant, el seu estat d'ionització influir en els valors de k_{cat} i k_M enzimàtics.²³⁻²⁵

La variació de la temperatura de reacció té efectes més difícils de predir sobre l'estereoselectivitat dels productes, atès que els enzims són termolàbils. Generalment, però, a temperatures més elevades s'incrementa les velocitats de reacció i a temperatures més baixes, s'obtenen productes amb una major puresa enantiomèrica.²⁶⁻²⁸

El medi de reacció també pot influir en l'eficiència global i selectivitat d'un enzim. Es ben conegut que molts enzims toleren solvents orgànics, inclús sense presència d'aigua, i que la estereoselectivitat enzimàtica pot ser modulada gràcies a la naturalesa del solvent orgànic seleccionat. La interacció d'aquest amb la capa de solvatació i amb els grups polars i apolars de la cadena polipeptídica provoquen modificacions en l'estructura tridimensional dels enzims, les quals poden afectar a llurs propietats catalítiques, l'estabilitat i/o l'activitat.^{11, 25, 29, 30}

L'ús de solvents orgànics s'ha emprat principalment per a solubilitzar substrats hidrofòbics, en sistemes homogenis o bifàsics. Els sistemes homogenis s'anomenen co-solvents, formats per una barreja d'aigua i un solvent miscible. Gràcies a la homogeneïtat del medi, no presenten la limitació de transferència de massa característica de sistemes bifàsics. Tanmateix, el biocatalitzador pot inactivar-se en contacte amb el dissolvent orgànic, sobretot si es requereixen elevades concentracions d'aquest.²⁹ Els sistemes heterogenis són una alternativa als sistemes de co-solvent, amb dues fases aquosa-orgànica, on l'enzim es situa en la fase aquosa i els substrats i productes en la fase orgànica. En són exemples de sistemes bifàsics les microemulsions, emulsions, miscel·les, cristalls líquids o vesícules, on l'àrea d'interfase aquosa-orgànica és molt elevada, i permeten una transferència de massa excel·lent.²⁴

Si bé els efectes dels diferents paràmetres de reacció poden tenir una influència important sobre l'especificitat, estereoselectivitat i rendiment global de les reaccions enzimàtiques, els comportaments exhibits no permeten ser generalitzats.²⁴ Per tant, l'estudi individual de les diferents variacions en cada cas concret és fonamental per al seu ús en síntesi asimètrica.

1.1.3.2 ENGINYERIA DE PROTEÏNES

L'enginyeria de proteïnes implica tot un conjunt de tècniques de biologia molecular aplicades a la modificació estructural d'una proteïna per alterar intencionadament característiques bioquímiques específiques.³¹

Les altes temperatures, solvent orgànics, valors de pH extrems o materials de partida utilitzats en processos industrials actuals, poden inactivar enzims nadius emprats. Així, mitjançant l'enginyeria de proteïnes, es poden superar aquestes limitacions.^{11, 31}

D'altra banda, aquestes tècniques s'han emprat per trobar noves activitats catalítiques, optimitzar els biocatalitzadors front substrats no-naturals o bé modificar-ne el curs estereoquímic, ampliant les possibilitats sintètiques per biocatàlisi.^{1, 22}

Dins de l'enginyeria de proteïnes en destaquen dos enfocaments principals.^{32,33} En primer lloc, el redisseny racional del centre actiu de l'enzim per a un propòsit concret. En aquest cas, s'empren tècniques de mutagènesi dirigida de lloc, amb les quals es reemplaça un aminoàcid per un residu en concret seleccionat -mutagènesi de lloc dirigit-, o bé es modifica la posició aleatoriament per saturació de lloc -mutagènesi de lloc per saturació-. La comparació d'estructures tridimensionals d'enzims relacionats permet la identificació dels aminoàcids responsables d'una propietat (lloc a modificar) o bé a través de la detecció de posicions conservades en l'alineament de seqüències entre proteïnes homòlogues (**Figura 1.1.2**).³⁴

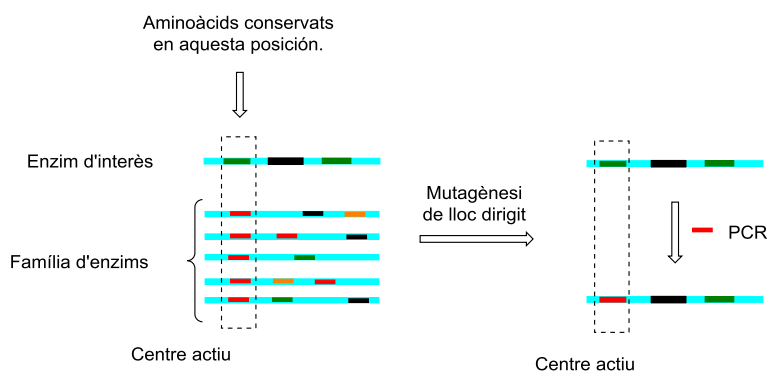


Figura 1.1.2 Representació de l'aproximació guiada per seqüència i estructura. Un aminoàcid conservat en una família de proteïnes ha de contribuir en la característica comuna del grup. La seva inserció en una altra proteïna similar pot resultar en la modificació d'aquesta propietat en menor o major grau.

L'avantatge principal d'aquestes tècniques és el nombre relativament baix de variants possibles, una o dues posicions, de manera que el procés de selecció és més ràpid. Tanmateix, requereixen del coneixement precís de l'estructura proteica tridimensional i del mecanisme catalític associat. La tendència per aquesta aproximació va en augment gràcies al nombre d'estructures proteiques conegudes, el qual supera les 77.000 en la base de dades *RCSB Protein Data Bank* (<http://www.pdb.org>) i que s'ha vist incrementat en un 450 % en la última dècada.¹

En segon lloc, les tècniques d'evolució dirigida són processos que simulen l'evolució natural i per a les quals no es requereixen coneixements estructurals o mecànics previs. Es basen en la generació aleatòria de proteïnes genèticament modificades i avaluar-les seguidament envers a una propietat desitjada. Les millors variants de la primera ronda es fan servir de motlle per a la següent ronda de modificació a l'atzar i selecció. Per a la selecció d'aquestes variants,

entre milers o milions generades, es fa ús de procediments ràpids i fiables de cerca (*High throughput screening*). No obstant, són tècniques lentes i tedioses.^{1, 35}

Durant els últims anys, les propietats catalítiques de diverses aldolases han estat modificades gràcies a l'enginyeria de proteïnes. Entre els èxits obtinguts en destaquen l'ampliació de la gamma de substrats tolerats, l'augment de l'enantioselectivitat i, fins i tot, la modificació de l'activitat catalítica natural de l'enzim.^{16, 21, 36, 37}

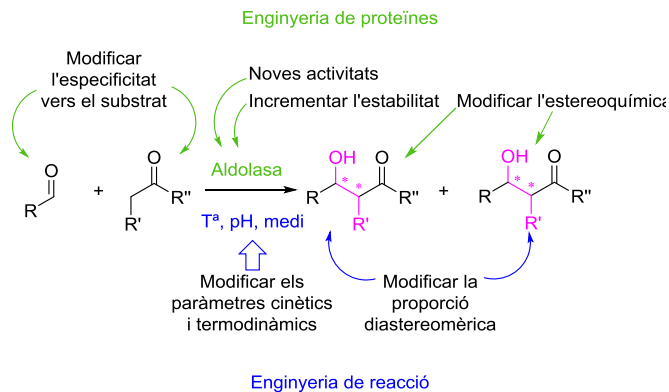


Figura 1.1.3. Modificacions més rellevants sobre les reaccions aldòliques i enzimàtiques en general, aconseguides per diferents estratègies d'enginyeria de proteïnes i de les condicions de reacció.

La integració d'ambdós enfocaments d'optimització de processos biocatalítics és primordial per dur a terme els processos industrials. Mentre que l'enginyeria de proteïnes permet dissenyar el biocatalitzador i ampliar-ne el coneixement del mecanisme catalític, la complementària enginyeria de reacció optimitza les variables de la reacció per tal d'obtenir una major taxa de producte (**Figura 1.1.3**).

L'optimització i ampliació de l'aplicabilitat sintètica de les aldolases en la síntesi de compostos biològicament actius com els iminociclitolos és fonamental tant des d'un de vista científic com industrial, i objecte d'estudi d'aquesta tesi i principal en el nostre grup de recerca.

1.2 IMINOCICLITOLS: ESTRUCTURA, APLICACIONS I SÍNTESI

Els iminociclitolos, també anomenats iminosucres o azasucres, són compostos cíclics polihidroxilats mimètics de sucres, en els quals l'àtom d'oxigen endocíclic es troba substituït per un àtom de nitrogen.

Gràcies a la similitud estructural amb monosacàrids i disacàrids naturals, poden fàcilment interactuar amb els processos relacionats de metabolisme de sucres,

permetent ampliar així el coneixement i comprensió sobre llur paper en sistemes biològics.^{38, 39}

Fins a l'actualitat, més de 100 compostos amb gran varietat estructural monocíclics i bicíclics han estat aïllats de fonts naturals com plantes, bacteris i fongs.⁴⁰ En base al seu esquelet estructural, es classifiquen en set grups: pirrolidines, piperidines, azepans, pirrolizidines, indolizidines, quinolizidines i tropans polihidroxilats (**Figura 1.2.1**).

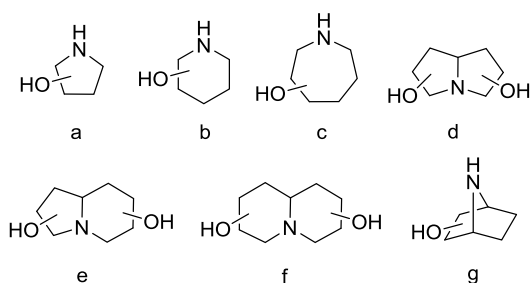


Figura 1.2.1. Estructures d'iminosucres sintètics o naturals més comuns (a) pirrolidines, (b) piperidines, (c) azepans, (d) pirrolizidines, (e) indolizidines, (f) quinolizidines i (g) tropans.

1.2.1 PROPIETATS BIOLÒGIQUES I FARMACOLÒGIQUES

Els iminociclitols són glicomimètics, atractius farmacològicament ja que molts d'ells mostren activitat inhibidora d'enzims relacionats amb el processament d'hidrats de carboni, o bé poden interferir en la funció de proteïnes de reconeixement d'aquests.

Els oligosacàrids i glicoconjugats, per exemple amb lípids i proteïnes, són compostos polifuncionalitzats de gran importància en processos bioquímics de reconeixement, tals com adhesió cel·lular, infeccions virals, diferenciació cel·lular, metàstasi i nombrosos esdeveniments de transduccions de senyals.⁴¹ Alteracions en el metabolisme d'oligosacàrids i glicoconjugats poden provocar disfuncions dràstiques en l'organisme i estan directament relacionades amb malalties com la diabetis de tipus II, hepatitis B i C, desordres de dipòsit de glicoesfingolípids (per exemple, la malaltia de Gaucher i de Fabri), fibrosis cística, càncer de còlon o infeccions virals,^{42, 43} inclosa la d'immunodeficiència adquirida humana VIH.

Conseqüentment, els enzims relacionats en la síntesi o degradació d'oligosacàrids i glicoconjugats, com les glicosidases o glicosiltransferases són importants dianes terapèutiques. Els iminociclitols, compostos moduladors de

les seves activitats, han resultat vitals per al desenvolupament de nous fàrmacs, com antiinflamatoris, antitumorals, antivírics i antibiòtics.⁴⁴⁻⁴⁶

El primer alcaloide aïllat de fonts naturals fou la nojirimicina, l'any 1966,⁴⁷ un potent inhibidor de glicosidases. Des de llavors, s'han descrit nombrosos iminociclitolos amb propietats farmacològiques diverses. En destaquen amb estructura monocíclica la 1-deoxinojirimicina (DNJ)⁴⁸, el 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol (DAB 1)⁴⁹ o la D-fagomina.⁵⁰ Respecte als bicíclics, els alcaloides més abundants i els primers en ser estudiats foren les indolizidines polihidroxilades castanospermina⁵¹ i swainsonina.⁵² Seguidament, s'aïllaren les pirrolizidines alexina⁵³ (**Figura 1.2.2**), el seu epímer australina (7a-*epi*-alexina⁵⁴), casuarina⁵⁵ i les hiacintacines.⁵⁶

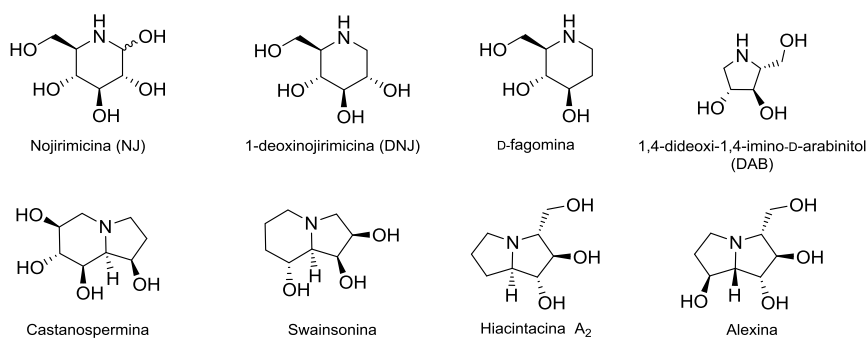


Figura 1.2.2. Exemples d'iminoiciclitolos naturals amb capacitat inhibidora de glicosidases i glicosiltransferases.

A nivell industrial, es representa en la **Figura 1.2.3** diferents fàrmacs comercials o que es troben en fases clíniques. Per exemple, el compost *N*-butil-DNJ (miglustat, Zavesca®)⁵⁷ és un fàrmac pel tractament de la malaltia de Gaucher tipus I i el *N*-hidroximetil-DNJ (miglitol, Glyset®),⁵⁸ per la diabetis de tipus II. Els compostos 1-deoxigalactonojirimicina (migalastat, Amigal®) i isofagomina (Plicera®) estan donant bons resultats en fases clíniques pel tractament de les malalties de Fabry i de Gaucher, respectivament.^{40, 59}

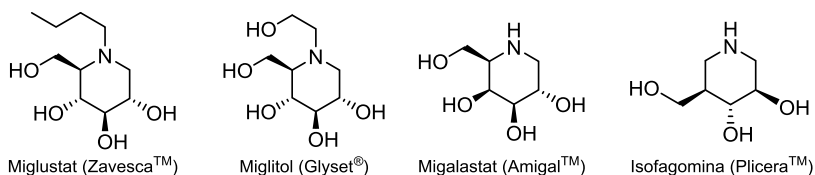


Figura 1.2.3. Exemples d'iminoiciclitolos comercials en fàrmacs.

L'activitat inhibidora dels iminociclitolos vers les diferents glicosidasas i glicosiltransferases podria estar relacionada amb el mimetisme electrònic de l'estat de transició d'hidròlisi de l'enllaç glicosídic durant la seva catàlisi, mimètic de l'ió oxòni, gràcies a la protonació de l'àtom de nitrogen endocíclic en condicions de pH fisiològiques (**Figura 1.2.4**). Alhora, la configuració dels grups hidroxil, la posició del centre catiònic, la geometria de l'anell i la flexibilitat dels iminociclitolos són determinants per a la selectivitat enzimàtica.⁶⁰⁻⁶²

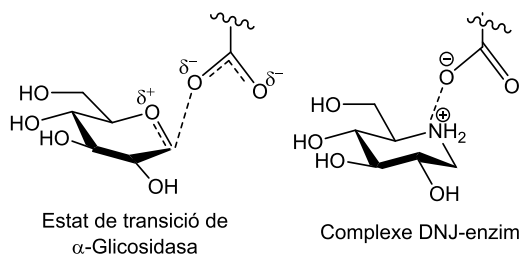


Figura 1.2.4. Mimetisme de l'ió oxoni en l'estat de transició de la α -glicosidasa pel complex enzim-deoxinojirimicina (DNJ).

Tot i que els models proposats segueixen vigents,^{61, 63} es requereix l'estudi a fons dels mecanismes catalítics i naturalesa dels estats de transició associats per a cada glicosidasa en concret a fi d'ampliar el coneixement i permetre el disseny de nous fàrmacs o determinar noves dianes terapèutiques.

Una eina emprada en el desenvolupament de nous fàrmacs és l'avaluació dels efectes directes en la capacitat inhibidora i especificitat dels glicomimètics en relació a les seves estructures. Per tant, és de rellevància important disposar de col·leccions àmplies d'imino-ciclitolos amb diversitat estructural i configuracional.

1.2.2 SÍNTESI D'IMINOCICLITOLS

En els darrers 40 anys la síntesi d'imino-ciclitolos ha atret l'atenció dels científics sintètics gràcies al creixent coneixement de les propietats biològiques associades i a la materialització d'alguns d'ells com a potents fàrmacs.

Nombroses síntesis d'imino-ciclitolos naturals i/o anàlegs sintètics han estat descrites, seguint metodologies químiques o quimioenzimàtiques. Les aproximacions sintètiques químiques han estat desenvolupades a partir de substrats quirals, generalment monosacàrids o alditols,⁶⁴⁻⁶⁷ de precursors no-glicídics^{68,69} o bé, en els últims anys, mitjançant rutes amb etapa clau organocatalítica.⁷⁰⁻⁷² La síntesi d'aquests compostos és particularment complexa, a causa de l'elevat nombre de centres estereogènics i funcionalització. Convé

remarcar la importància de generar compostos amb diversitat estructural i configuracional dels substituents, per tal d'optimitzar l'activitat i selectivitat envers les glicosidases.^{40, 59, 73}

Tot i l'agudesia i aplicabilitat d'aquestes metodologies, requereixen de múltiples i complexes seqüències de protecció/desprotecció, presenten dificultats en el control de la estereoselectivitat i purificació dels compostos intermedis i finals. En resum, la gran majoria resulten complicades, llargues i cares.

En les últimes dècades, aquestes estratègies químiques s'han complementat amb etapes biocatalítiques, per a la transformació o introducció de grups funcionals (per exemple lipases, esterases o toluè dioxigenases) o bé per resolucions cinètiques o deracemitzacions. L'etapa enzimàtica es troba en els passos inicials o finals de seqüències sintètiques llargues. No obstant, el gran avenç en la síntesi d'iminoclitols s'ha donat en els darrers anys en l'ús d'enzims de formació de nous enllaços C-C, com les aldolases, les quals permeten la construcció de molècules complexes en pocs passos sintètics, sense requeriment de nombrosos grups protectors i a partir de substrats simples, situant l'etapa biocatalítica en la central del procés.^{3, 74}

En la **Figura 1.2.5** es comparen diferents mètodes per a l'obtenció de D-fagomina (Veure estructura en la **Figura 1.2.2**), clar exemple del salt qualitatiu en la síntesi d'iminoclitols mitjançant aldolases. S'obtingué fins a un 65 % de producte final per etapa biocatalítica en comparació al millor rendiment de 34 % per síntesi química. A més, cal destacar que en aquesta darrera estratègia el substrat de partida no és comercial.

Article	Material de partida	Passos sintètics	Etales claus	Rendiment global
Kato <i>et al.</i> 1997	Fulles i arrels de <i>Xanthocercis zambeiaca</i>	3 ^[a]	Extracció (50% aq. MeOH), cromatografia d'intercanvi iònic	Fulles: 0.03%
Kato <i>et al.</i> 2003	Llavors de <i>Castanospermum australis</i>	3 ^[a]	Extracció (50% aq. MeOH), cromatografia d'intercanvi iònic	Arrels: 0.13%
Banba <i>et al.</i> 2001		6	Metàtesi de tancament d'anells (<i>Ring-closing metathesis</i> , RCM), Epoxidació, hidròlisi d'epòxid	0.04%
Takahata <i>et al.</i> 2003		7	Cloroamidació, aminació reductiva intramolecular	12%
Kumari <i>et al.</i> 2009		9	Reducció de cetona diastereoselectiva, substitució al·lílica intramolecular Pd-catalitzada	34%
Kim <i>et al.</i> 2009		2	Addició aldòlica enzimàtica, aminació reductiva intramolecular	19%
Castillo <i>et al.</i> 2006 Sugiyama <i>et al.</i> 2007		2	Addició aldòlica enzimàtica, aminació reductiva intramolecular	Castillo: 51% Sugiyama: 65%

Figura 1.2.5. Comparació de diferents mètodes de producció de D-fagomina (**Figura 1.2.2**) ^a Passos de purificació.⁷⁴

En la present tesi, l'ús d'un conjunt d'aldolases en etapes clau d'addició aldòlica ha permès la síntesi d'una extensa varietat d'iminociclitols mono i bicíclics polihidroxilats en poques etapes sintètiques i a partir de substrats simples i econòmics (**Capítol 3.2 i 3.4**).

1.3 ALDOLASES NATIVES I MODIFICADES GENÈTICAMENT

En els organismes vius les aldolases catalitzen la formació o excisió d'enllaços C-C de carbohidrats, ceto-àcids i d'alguns aminoàcids.¹⁶ En l'actualitat, es coneixen més de 40 aldolases (EC 4.1.3.X),⁷⁵ i moltes d'altres poden ser descobertes atès que la majoria - sinó tots- dels organismes en contenen.

Les aldolases exhibeixen una elevada especificitat pels substrats donadors, acceptant només petites variacions isostèriques dels donadors no-naturals. En canvi, mostren flexibilitat vers l'estructura dels aldehids acceptors.^{12, 13} La principal avantatge d'emprar aldolases és la capacitat de controlar eficaçment l'estereoquímica de l'addició aldòlica, on la configuració absoluta del C- α depèn exclusivament de l'enzim i és, en principi, independent dels substrats. A més, l'existència d'aldolases estereocomplementàries i amb tolerància similar als

substrats, fa possible la síntesi orientada a la diversitat funcional i estructural dels adductes.^{12, 18}

L'aplicació de l'enginyeria de proteïnes per aquests biocatalitzadors és de vital importància a fi d'ampliar versatilitat en aplicacions sintètiques, és a dir, en millorar les conversions a adductes aldòlics, les diastereoselectivitats, ampliar la diversitat estructural dels aldehids acceptors i modificar l'especificitat pel donador.²¹

A continuació, es s'exposa la classificació vigent de les aldolases segons el seu mecanisme d'acció, o bé, segons la dependència del substrat donador (**Apartat 1.3.1**). Seguidament s'amplia la informació de les aldolases de primordial interès per la present tesi, les aldolases dependents de glicina (**Apartat 1.3.2**), dependents de DHAP (**Apartat 1.3.3**) i d'anàlegs no fosforilats (**Apartat 1.3.4**).

1.3.1 MECANISME D'ACCIÓ I CLASSIFICACIÓ

Les aldolases es classifiquen en dos grups segons la naturalesa del complex nucleofílic enzim-donador generat en el mecanisme catalític (**Figura 1.3.1**).^{20, 75-77}

- **Classe I:** El substrat donador s'enllaça covalentment a l'aldolasa via imina a través d'un residu de lisina (altament conservada) en el centre actiu de l'enzim. La imina o base de Schiff actua com atraient d'electrons, disminuint l'energia d'activació de l'abstracció del H- α i la posterior formació d'una enamina nucleòfila. Principalment es troben presents en animals i plantes superiors.^{75, 76}
- **Classe II:** Requereixen un catió divalent, generalment Zn^{2+} , (tot i que el Co^{2+} o Fe^{2+} també poden ser actius)⁷⁸ en el centre actiu de l'enzim. Aquest actua com un àcid de Lewis per facilitar la desprotonació del H- α de la cetona, que proporciona l'enolat com espècie nucleòfila. Principalment es troben presents en organismes inferiors, és a dir, bacteries i fongs.⁷⁵

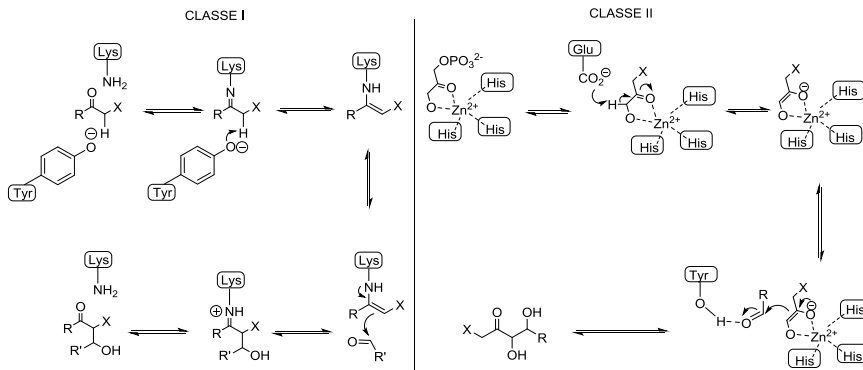


Figura 1.3.1. Mecanisme de les Aldolases de Classe I i II. Les aldolases de classe I activen el substrat donador per la formació d'una enamina gràcies a un residu de lisina en el centre actiu. Les aldolases de classe II requereixen un ió metàl·lic en el centre actiu, el qual actua d'àcid de Lewis en l'activació del nucleòfil.

Les aldolases de classe I i II varien en altres aspectes, com en l'estructura de les subunitats, perfil de pH i afinitats pels substrats. La homologies entre les seqüències, si n'hi ha, és baixa i són aparentment de diferents orígens evolutius.⁷⁷

L'elevada especificitat i dependència de les aldolases més conegudes pel substrat nucleòfil origina també la classificació d'aquests enzims en cinc grups principals (**Figura 1.3.2**).

- Aldolases dependents de piruvat o fosfoenol piruvat (PEP).
- Aldolases dependents de glicina.
- Aldolases dependents d'acetaldehid.
- Aldolases dependents de dihidroxiacetona fosfat (DHAP).
- Aldolases dependents de dihidroxiacetona (DHA) i altres anàlegs no fosforilats. Les úniques que mostren una àmplia selectivitat pel substrat donador.

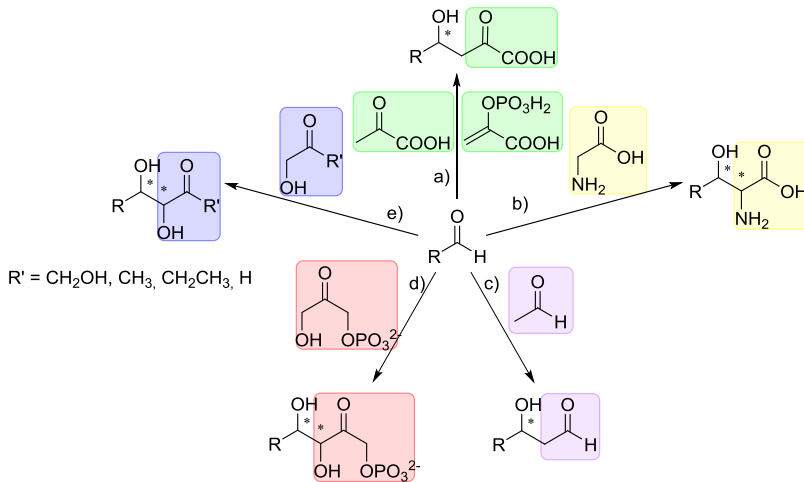


Figura 1.3.2. Classificació de les aldolases en funció del seu substrat donador en cinc grups majoritaris. Les diferents aldolases generen un o dos estereocentres. (a) Aldolases dependents de piruvat o fosfoenolpiruvat (PEP) (b) Aldolases dependents de glicina (c) Aldolases dependents d'acetaldehid (d) Aldolases dependents de dihidroxiacetona fosfat (DHAP) (e) Aldolases dependents de dihidroxiacetona (DHA) i altres anàlegs no fosforilats.

1.3.2 ALDOLASES DEPENDENTS DE GLICINA

Les aldolases dependents de glicina catalitzen la reacció aldòlica reversible entre la glicina a un al·dehid acceptor per trencar o formar estereoselectivament β-hidroxi-α-aminoàcids. Mecanísticament pertanyen a les aldolases de Classe I i requereixen el cofactor piridoxal-5-fosfat (PLP, vitamina B₆) per a l'activació de l'enamina nucleòfila (**Figura 1.3.3**).^{79, 80}

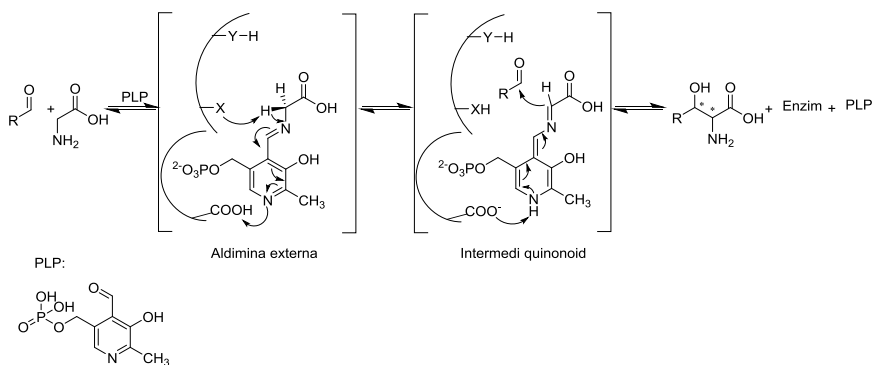


Figura 1.3.3. Mecanisme proposat de l'addició aldòlica catalitzada per les aldolases dependents de glicina, les quals requereixen el cofactor piridoxal-5-fosfat (PLP) per a l'activació de l'enamina nucleòfila.⁸¹

Entre les diferents aldolases dependents de glicina en destaquen les treonina aldolases (TA, EC 4.1.3.5) i les serina hidroximetil transferases (SHMT, EC 2.1.3.1).

Les treonina aldolases són ubiqües en la natura, es troben presents en plantes, vertebrats, bactèries, llevats i fongs i catalitzen l'excisó de treonina a glicina i acetaldehid.^{79, 82, 83} Exhibeixen un especificitat exquisida en el C- α de la treonina, donant lloc a la classificació del tipus D- o L- (**Figura 1.3.4**). Alhora, les L-TA es divideixen en tres subgrups segons l'estereoespecificitat que mostrin vers al C- β (1) L-treonina, que actuen preferiblement sobre el substrat *treo* o *sin* (L-TA); (2) L-*allo*-treonina, que actuen preferiblement sobre el substrat *eritro* o *anti* (L-*allo*-TA); (3) L-*baixa especificitat*-treonina, que actuen sobre els substrats *sin* o *anti* sense distinció (L-*low*-TA). La mateixa classificació es podria dur a terme en un futur per les D-TA, però només D-*low*-TA han estat identificades fins al moment.⁷⁹

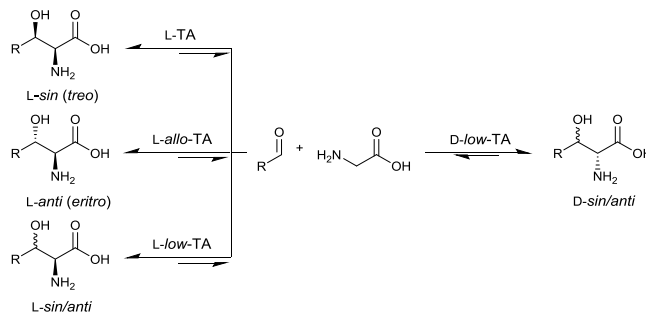


Figura 1.3.4. Esquema de la estereocomplementarietat de les aldolases dependents de glicina, L-TA, L-*allo*-TA i L-/D-*low*-TA.⁷⁹

1.3.2.1 L-TREONINA ALDOLASES

Principalment, les aldolases dependents de glicina amb activitat L-treonina són les L-TA i SHMT. Ambdues pertanyen a la família de PLP dependents del tipus I de plegament, amb estructura tetramèrica (35-40 KDa) i mecanismes catalítics similars. L'alanina racemasa procedent de fong també forma part d'aquest subgrup i totes elles provindrien d'una mateixa proteïna evolucionada per a l'especialització a diferents funcions.⁸⁴ Els centres actius d'aquests enzims són molt similars, fet que explicaria el solapament d'activitats catalítiques entre ells.

L'estructura cristal·logràfica de dues L-TA, L-TA de *E.coli*⁸⁵ i L-TA de *Thermotoga maritima*,⁸¹ han estat publicades i ha permès conèixer més àmpliament el seu mecanisme catalític. L'enzim L-TA_{*ecoli*} s'ha classificat com L-*allo*-TA, però, la seva

funció fisiològica encara no és del tot clara ja que el substrat L-*allo*-treonina no és un metabòlit present *E.coli*.

Les serina hidroximetil transferases (SHMT) catalitzen *in vivo* la transferència del grup hidroximetil d'un residu de serina al tetrahidrofolat, formant 5,10-metilentetrahidrofolat i glicina. En absència de tetrahidrofolat, les SHMT trenquen retroaldòlicament la L-treonina formant glicina i acetaldehid.⁸⁴ Es classifica com L-*allo*-TA, atès que presenta una K_M per L-*allo*-treonina 38 vegades inferior que la corresponent a L-treonina.⁸⁶

Concretament, la SHMT de *Streptococcus thermophilus*⁸⁶ i L-TA d'*Escherichia coli*⁸⁷ han estat clonades i àmpliament estudiades en el nostre grup de recerca com a biocatalitzadors per a la síntesi de L- β -hidroxi- α,ω -diaminoàcids a partir de glicina i diferents aminoaldehids.

1.3.2.2 D-TREONINA ALDOLASES

Es coneixen pocs gens codificants d'aldolases amb activitat D- i aquests han estat detectats principalment en bacteries.⁸² En destaquen la D-TA d' *Arthrobacter sp.* DK-38 (D-TA_{asp})⁸⁸ i d'*Achromobacter xylosoxidans* (D-TA_{axy})⁸⁹, ambdues classificades com D-*low*-TA i amb una homologia de les seves seqüències del 54 %. Les seves estructures no presenten cap similitud significant amb les L-TAs, és a dir, formen part d'una nova família d'enzims dependents de piridoxal com a plegament de tipus III, com les alanina racemases procedents de bacteries.⁹⁰

Les estructures de D-TAs són monomèriques (35-40 KDa) i requereixen un catió divalent (Mn^{2+} , Mg^{2+} o Co^{2+}) com activador addicional al cofactor PLP, presumptament per formar l'aldimina amb la lisina catalítica i el substrat D- β -hidroxi- α -aminoàcids en el centre actiu.⁸² També s'ha conjeat que el catió divalent juga un paper decisiu en la termoestabilitat de l'enzim.⁹¹

Una altra aldolasa dependent de glicina coneguda amb activitat D- és la D-3-hidroxiaspartat aldolasa de *Paracoccus denitrificans*⁹² (D-HAA_{pde}, EC 4.1.3.14), la qual catalitza la conversió de D-3-hidroxiaspartat a glioxilat i glicina. Mostra una similitud elevada a l'estructura monomèrica de les D-TAs, però amb una especificitat diferent pels substrats, acceptant tant D-treonina, D-3-fenilserina i derivats d'aquesta darrera. Com les D-*low*-TA, té una elevada especificitat pel C- α , però no diferencia els substrats *sin* i *anti*.

L'alanina racemasa de *Geobacillus stearothermophilus* (AlaRacs, EC 5.1.1.1) exhibeix activitat de D-TA per mitjà d'una simple mutació (Y265A).⁹³ Accepta β -fenilserines com a substrat, activitat que no posseeixen les TA naturals, amb

preferència per l'isòmer D-*sin*. A més, tolera D-alanina com a donador, generant aminoàcids α -ramificat.⁹⁴⁻⁹⁶

Fins al moment, no s'ha publicat cap estructura cristal·logràfica de D-TAs, però si es construí un model tridimensional de D-TA *Arthrobacter sp.* per homologia de tant sols el 13 % amb la seqüència d'AlaRacs.⁹⁰

En el **Capítol 3.1** es presenta l'estudi de la producció i conservació de l'enzim D-TA d'*Achromobacter xylosoxidans* i la seva aplicació en la síntesi directa de D- β -hidroxi- α -aminoàcids.

1.3.2.3 OPTIMITZACIÓ DE LES ALDOLASES DEPENDENTS DE GLICINA

Els principals inconvenients de l'aplicació sintètica de les aldolases dependents de glicina són el desplaçament desfavorable de l'equilibri de les reaccions i la baixa selectivitat en el C- β , generant mescles epimèriques de β -hidroxi- α -aminoàcids *sin:anti*.

La diastereoselectivitat pot ser modificada o millorada en condicions cinètiques de reacció, és a dir, a temps curts i temperatures baixes de reacció.^{97, 98} Per exemple, en estudis en el nostre grup de recerca, s'obtingueren exclusivament L-*anti*- β -hidroxi- α -aminoàcids amb conversions 34-60 % efectuant les reaccions a 4 °C emprant SHMT_{*Stth*} (**Figura 1.3.5** i **Figura 1.3.6**).⁸⁷

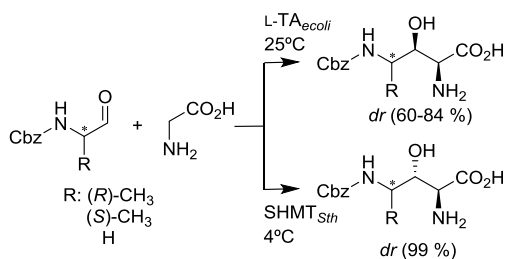


Figura 1.3.5. Síntesi diastereoselectiva de diversos estereoisòmers derivats de β -hidroxi- α , ω -diaminoàcids catalitzades per serina hidroximetil transferasa de *S. thermophilus* (SHMT; *anti*-selectiva) i L-TA de *E. coli* (L-TA; *sin*-selectiva).

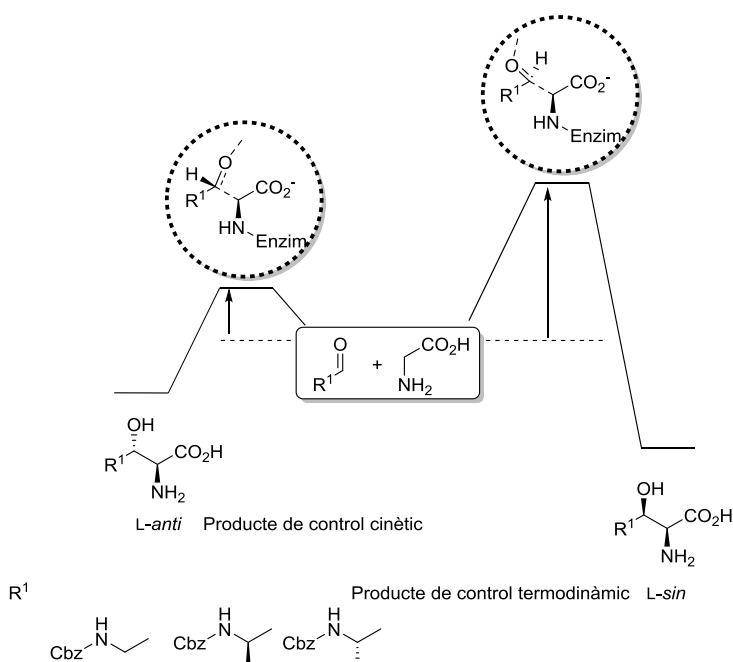


Figura 1.3.6. Esquema del diagrama energètic de l'obtenció del producte per control cinètic o termodinàmic en la síntesi de L-β-hidroxi-α,ω-diaminoàcids catalitzada per SHMT_{Sth}. A 4 °C s'obtenen exclusivament els productes de control cinètic L-anti, però al augmentar la temperatura, també s'obté el producte de control termodinàmic, generant mesclures sin:anti.

Els rendiments de síntesi varien considerablement segons l'al·dehid emprat i poden ser millorats amb l'ús d'excessos elevats de glicina.⁹⁹ Un altre recurs per a desplaçar l'equilibri de l'addició aldòlica és realitzar un pas irreversible consecutiu *in situ* com, per exemple, la descarboxilació enzimàtica de l'aminoàcid.⁹⁷

Per tècniques de devolució dirigida també s'ha incrementat la diastereoselectivitat enzimàtica. N'és exemple l'optimització de la síntesi de L-sin-DOPS (**Figura 1.3.6**) per modificació de l'enzim L-low-TA *S.coelicolor*, gràcies a la qual passa d'exhibir un *de*: 14 % a 55 % en els productes aldòlics generats.¹⁰⁰

Respecte a l'especificitat pel donador, aquesta ha estat limitada a glicina durant molt anys. No obstant, gràcies al rastreig de nous biocatalitzadors naturals, s'han descobert noves SHMTs i TAs amb tolerància a altres aminoàcids com a donadors. El primer exemple fou la D-TA *Pseudomonas sp.*, la qual accepta D-alanina, D-serina o D-cisteïna generant D-β-hidroxi-α,α-dialquil-α-aminoàcids (Fesko *et al.*, 2010).¹⁰¹ Recentment, en el nostre grup de recerca, es dué a terme un estudi racional de la SHMT_{Sth}, on la variant SHMT Y55T permeté la

síntesi de α,α -dialquil- α -aminoàcids a partir de D-alanina o D-serina i una àmplia varietat estructural d'aldehids acceptors, activitat que no posseeix l'enzim natiu.¹⁰²

1.3.2.4 APLICACIONS SINTÈTIQUES D'ALDOLASES DEPENDENTS DE GLICINA

Les TA són importants eines en síntesi atès que generen β -hidroxi- α -aminoàcids amb dos nous centres estereogènics controlats enzimàticament. En la natura, els β -hidroxi- α -aminoàcids constitueixen una classe important de compostos com aminoàcids naturals (serina, treonina, 3-hidroxiprolina) i es troben presents com a components de productes naturals complexes amb ampli rang d'activitat biològica com antibiòtics (per exemple el cloramfenicol i vancomicina) immunosupressors, agents antifúngics, inhibidors VIH, anticancerígens, anti-inflamatoris, entre altres.^{80, 99}

En síntesi química, els β -hidroxi- α -aminoàcids són útils com a intermedis quirals polifuncionalitzats per a la síntesi de molècules més complexes. Diverses TA s'han emprat per a la preparació de precursors de productes farmacèutics com els antibiòtics tiamfenicol o florfenicol (**Figura 1.3.7**), el compost L-*sin*-3,4-dihidroxifenilserina (L-*sin*-DOPS, **Figura 1.3.8**), compostos antifúngics o intermediaris per a la síntesi d'esfingolípid.^{82, 99, 103} A continuació s'expliquen les seves síntesis.

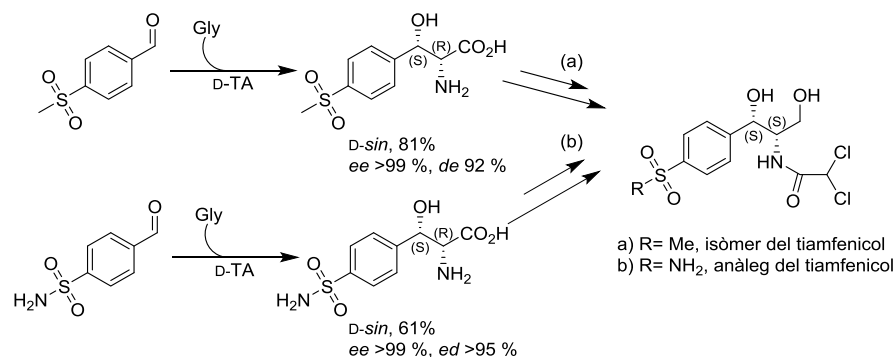


Figura 1.3.7. Ruta sintètica per a la síntesi de dos precursors de l'enantiòmer del tiamfenicol emprant D-TA *Arthrobacter xylosoxidans*.⁸⁰

L'antibiòtic tiamfenicol és un derivat de la L-*sin*-fenilserina, similar al clorfenicol. En l'estudi de Steinreiber *et al.* (2007)⁸⁰, es presentà la síntesi de dos precursors de l'enantiòmer del tiamfenicol emprant D-TA *Arthrobacter xylosoxidans* amb rendiments elevats (61 i 81 %) i excel·lents estereocontrols en el C- β (*e.d.*: >92 %)(**Figura 1.3.7**).

La síntesi de L-*sin*-DOPS representa un exemple important de l'aplicació de les TA en síntesi orgànica directa a escala industrial. Aquest compost s'utilitza en el tractament de la malaltia de Parkinson i l'enzim emprat en l'etapa clau aldòlica és L-TA de *Sreptomycetes avermitilis* MA-4680 (**Figura 1.3.8**).¹⁰⁴

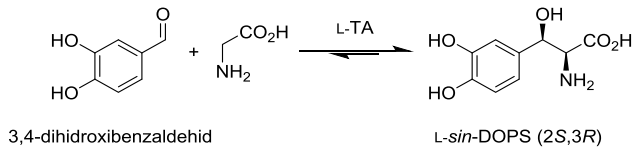


Figura 1.3.8. Esquema de l'addició aldòlica per a la síntesi de DOPS mitjançant l'ús de L-TA de *Sreptomycetes avermitilis* MA-4680.¹⁰⁴

En la síntesi d'esfingolípidis mitjançant TA, es reportà l'obtenció de precursors derivats de L-/D-3-aquilserina γ -halogenats o de cadena llarga.¹⁰⁵ En aquest estudi, es demostrà el potencial sintètic de l'enzim D-TA *Arthrobacter xylooxidans* per a la síntesi de D- β -hidroxi- α -aminoàcids no aromàtics.

1.3.3 ALDOLASES DEPENDENTS DE DIHIDROXIACETONA FOSFAT (DHAP)

Les aldolases dependents de dihidroxiacetona fosfat (DHAP) catalitzen l'escissió aldòlica reversible de cetoses-1-fosfat o 1,6-difosfat, reacció primordial en el metabolisme de carbohidrats en mamífers i microorganismes. Es coneixen quatre aldolases d'aquest grup amb estereoquímiques complementaries respecte als C-3 i C-4 (**Figura 1.3.9**).

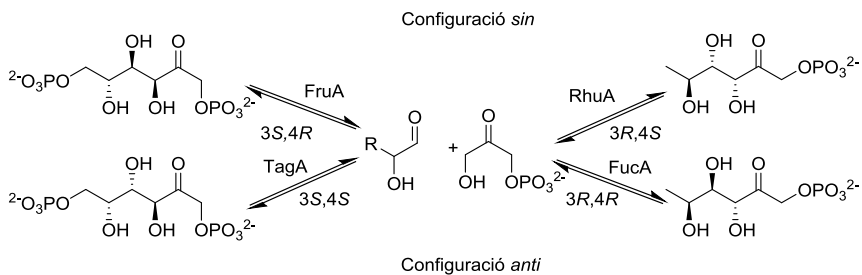


Figura 1.3.9. Estereoquímica complementaria de les aldolases dependents de DHAP (FruA, TagA i FucA) i els respectius substrats naturals.

- D-fructosa-1,6-bifosfat aldolasa (FruA, EC 4.1.3.13)
- D-tagatosa-1,6-bifosfat aldolasa (TagA, EC 4.1.3.40)
- L-fuculosa-1-fosfat aldolasa (FucA, EC 4.1.3.17)
- L-rhamnulosa-1-fosfat aldolasa (RhuA, EC 4.1.3.19)

Gràcies a la seva naturalesa complementaria i alta estereoselectivitat, les aldolases DHAP-dependents han estat àmpliament estudiades i utilitzades en síntesi orgànica. Exhibeixen una tolerància àmplia front l'aldehid acceptor, generant productes aldòlics amb excel·lent estereoselectivitat en el C-3 i elevat en el C-4.

Probablement, l'aldolasa DHAP-dependent més ben coneguda és la **FruA**, la qual catalitza l'addició reversible de DHAP a D-gliceraldehid-3-fosfat per formar D-fructosa-1,6-bifosfat. Aquest enzim ha estat aïllat a partir de mamífers i diversos microorganismes, entre els quals, el provinent de múscul de conill (RAMA) ha estat el més emprat donada la seva disponibilitat comercial.

L'enzim **TagA** catalitza l'addició de DHAP a D-gliceraldehid fosfat per a generar D-tagatosa-1,6-bifosfat. Tanmateix, és l'únic membre d'aquesta família d'aldolases que manca d'estereoselectivitat quan s'empren aldehids diferents al substrat natural, limitant la seva aplicabilitat en síntesi.

Els enzims **FucA** i **RhuA** catalitzen el catabolisme dels sucres poc comuns L-fucosa i L-ramnosa respectivament, produint L-lactaldehid i DHAP. Han estat clonats, sobreexpressats a partir de *E.coli*, i les seves estructures cristal·logràfiques i mecanismes catalítics determinats i estudiats àmpliament per Schulz i col·laboradors.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

FucA i **RhuA** són homotetràmers i les estructures dels seus centres catalítics molt similars, amb el catió Zn^{2+} coordinat a fi d'unir la DHAP - Classe II d'aldolases.¹⁰⁹ Difereixen en el nombre de coordinació del metall, sent hexacoordinat en el cas de la RhuA - tres histidines, el residu bidentat àcid fosfoglicolhidroxàmic (PGH), anàleg estructural de la DHAP, i una molècula d'aigua - o pentacoordinat en el cas de la FucA - tres histidines i PGH- (**Figura 1.3.10**). A més, es coneix que ambdós enzims, en presència del catió Co^{2+} o Mn^{2+} en el centre actiu en comptes de Zn^{2+} , mantenen l'activitat enzimàtica.⁷⁸

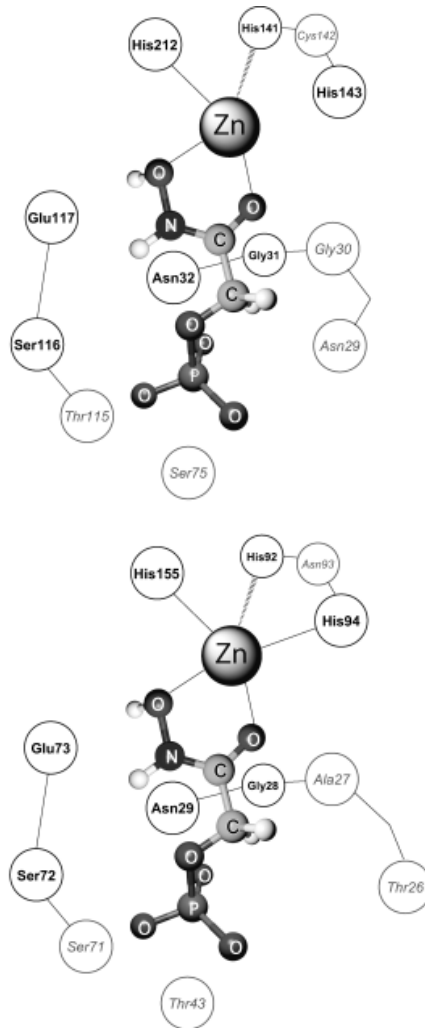


Figura 1.3.10. Esquema del centre actiu de RhuA (a dalt) i de FucA (a baix) indicant els residus equivalents entre ambdós aldolases en cursiva i en negreta, els idèntics. L'anàleg estructural en l'estat de transició del substrat DHAP correspon a l'àcid fosfoglicolhidroxàmic (PGH), compost amb el qual es varen cristal·litzar els enzims.¹⁰⁶

En la **Figura 1.3.11** es detalla el mecanisme proposat per la FucA, on el H- α de la DHAP és abstrert pel residu d'àcid glutàmic 73, formant un complex enolat estable amb el catió metàl·lic.¹⁰⁷ L'atac nucleofílic es dona per la cara *Si* de l'aldehid mitjançant el qual es genera la configuració *anti* en el producte aldòlic. Respecte a la RhuA, les diferències principals entre ambdós mecanismes radiquen en el lloc d'unió del L-lactaldehid, el qual es atacat per la cara *Re*, obtenint la configuració *sin*.

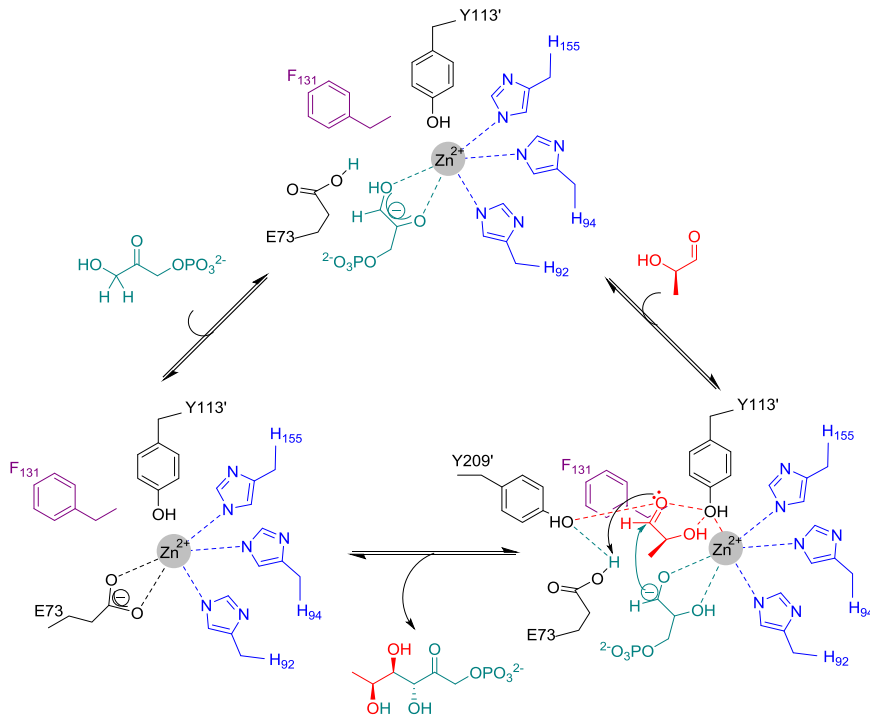


Figura 1.3.11. Mecanisme catalític de formació de l'enllaç C-C per FucA entre els substrats naturals DHAP i L-lactaldehid.¹⁰⁷ El Zn²⁺ es coordina amb la DHAP, formant l'enediol (classe II d'aldolases) gràcies a l'abstracció del protó pel residu Glu 73. La prima en els números dels residus (per exemple Y113') indica que pertanyen a la subunitat veïna.

Ambdós enzims presenten una àmplia tolerància per l'aldehid acceptor.^{110, 111} L'enzim RhuA accepta aldehids estèricament impeditos, però no en són substrats els aldehids amb grups aniònics, com compostos fosforilats. Si ho són per FucA, però aquest enzim és més restringit pels aldehids voluminosos i/o estèricament impeditos.

1.3.3.1 OPTIMITZACIÓ D'ALDOLASES DEPENDENTS DE DHAP

El principal inconvenient de les DHAP-aldolases és la seva forta dependència pel substrat donador. La DHAP és un producte costós, inestable i tediós de preparar, el qual es degrada a pH neutres o bàsics a metilglioxal i fosfat inorgànic, compostos inhibidors d'aldolases. En la última dècada, s'han dedicat nombrosos esforços a fi de resoldre aquest inconvenient, per generació *in situ* de DHAP o de mimètics en el medi de reacció, o bé, per l'eliminació de la dependència mitjançant tècniques d'enginyeria de proteïnes (**Apartat 1.3.3.1.1**).

Altra gran repte en l'optimització de les aldolases dependents de DHAP és l'ampliació del ventall de substrats acceptors tolerats. En l'**Apartat 1.3.3.1.2** es detalla el redisseny del centre actiu de la FucA dut a terme en el nostre grup amb aquest objectiu.

1.3.3.1.1 Optimització en la dependència de DHAP

S'han desenvolupat diferents metodologies per a obtenir DHAP, per síntesi química, enzimàtica o per la combinació d'ambdues tècniques.¹¹² N'és un exemple de procés enzimàtic l'ús de l'enzim quimèric de DHA kinasa de *Citrobacter freundii* i FruA de *Staphylococcus carnosus*. Aquest enzim monomèric permet obtenir DHAP *in situ* amb un rendiment 20 vegades superior en comparació a les reaccions enzimàtiques per separat.^{113, 114}

No obstant, és primordial eliminar l'especificitat per aquest donador ja que, a banda de ser un substrat inestable i car de preparar, en molts casos cal treure el grup fosfat emprant fosfatases àcides o bàsiques.^{115, 116}

Una de les estratègies per tal d'eliminar aquesta dependència és la generació *in situ* d'esters fosfat, mimètics de la DHAP. Les sals inorgàniques com el borat, vanadat o arsenat formen reversiblement esters amb molècules hidroxilades en solucions aquoses neutres. En presència de DHA, formen isòmers de l'ester fosfat DHAP, els quals han estat tolerats com a donadors per aldolases dependents de DHAP (**Figura 1.3.12**).¹¹⁷⁻¹¹⁹

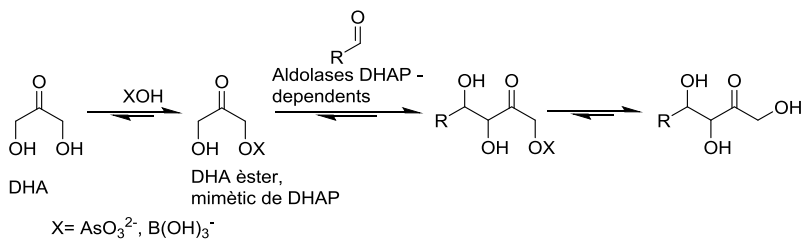


Figura 1.3.12. Generació *in situ* de mimètics de dihidroxiacetona fosfat (DHAP) a partir de dihidroxiacetona.²⁰

La toxicitat de les sals d'arsenat i la inestabilitat de les sals de vanadat, fa que siguin alternatives poc atractives. En canvi, les sals de borat tenen una toxicitat baixa i s'han aplicat per a addicionar l'ester DHA-borat a diversos aldehids catalitzades per RhuA en la síntesi de L-iminociclitols.¹²⁰ A més, s'observà que emprant borat, les reaccions esdevenen virtualment irreversibles, gràcies a la formació d'esters borats amb els productes aldòlics en la forma cíclica i, per tant, minimitzant el trencament retroaldòlic (**Figura 1.3.13**).¹²¹ Tanmateix, les

conversions amb substrats aldehydics azido substituïts foren moderades o baixes, insuficients per aplicacions sintètiques. En canvi, recentment en el nostre grup, es demostrà que *N*-Cbz-aminoaldehyds són excel·lents acceptors per RhuA en l'addició de l'èster DHA-borat en la síntesi d'iminociclitol, amb rendiments elevats (70-90 %).¹²⁰

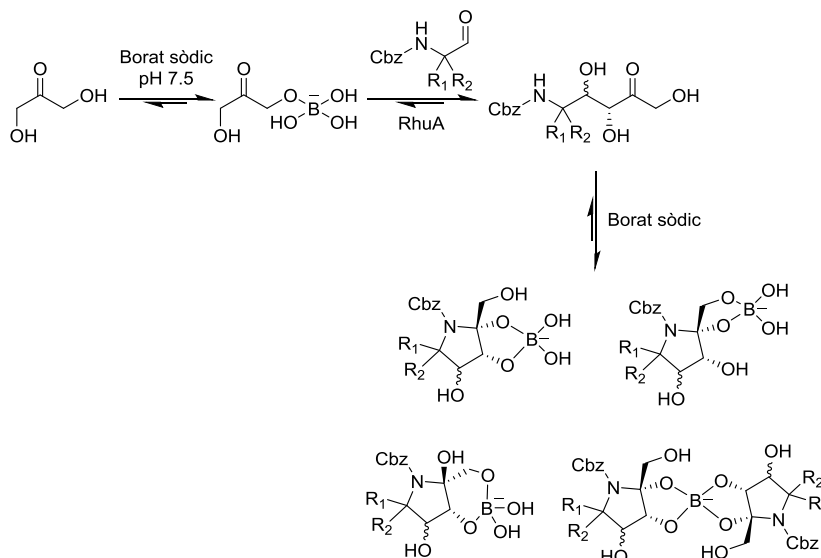


Figura 1.3.13. Formació dels complexos borats hemiaminànics per atrapar el producte aldòlic de l'addició de DHA a Cbz-*N*-aminoaldehyd catalitzat per RhuA. El procés és virtualment irreversible ja que es desplaça la reacció cap a la formació del producte aldòlic i s'evita el trencament retroaldòlic.^{120, 121}

En el mateix estudi, l'enzim FucA no presentà activitat catalítica amb l'èster DHA-borat, però si s'observà un increment en els rendiments i velocitats de reacció amb DHAP en presència del tampó borat en comparació a les reaccions sense. Es validà així la hipòtesi de l'atrapament dels productes per mitjà de la formació d'èsters borats i l'ús d'aquest tampó per a desplaçar l'equilibri de les reaccions.¹²⁰

Una altra estratègia és l'eliminació de la dependència de DHAP per tècniques d'evolució dirigida. En l'estudi publicat per Sugiyama *et. al* (2007), s'alterà l'especificitat del donador DHAP a DHA en la RhuA, obtenint L-rhamnulosa aldolasa (RhaD).¹²² Tanmateix, no s'han publicat aplicacions sintètiques d'aquest nou enzim DHA-dependent.

Fins al moment, l'únic estudi mutagènic racional del centre actiu de la RhuA a fi de modular l'especificitat per DHAP s'ha dut a terme en el nostre grup.¹²³

Sorprenentment, en aquest estudi es demostrà per primera vegada que la RhuA_{wt} tolera DHA, tot i que amb baixa afinitat. El redisseny del lloc d'unió del grup fosfat en el centre catalític proporcionà la variant RhuA N29D, la qual presentà una afinitat de 3 a 6 vegades major per la DHA en comparació a l'enzim natiu front diferents aminoaldehids, sense alterar l'estereoselectivitat.

Finalment, pel descobriment de nous enzims dependents de DHA i altres substrats no fosforilats, posa fi a l'inconvenient de la especificitat de DHAP. S'han descobert la transaldolasa TalB F178Y i la D-fructosa-6-fosfat aldolasa (FSA), que generen productes aldòlics amb estereoselectivitat *D-sin*, és a dir, amb la mateixa estereoselectivitat que FruA. Per tant, són enzims excel·lents per a la substitució d'aquest biocatalitzador en aplicacions sintètiques sense requerir DHAP. S'amplia la informació referent a TalB F178Y i FSA en l'**Apartat 1.3.4**.

1.3.3.1.2 Redisseny del centre actiu de la FucA

L'enzim FucA de *E.coli* presenta una àmplia tolerància per aldehids amb substituents lineals en el C- α , però baixa front aldehids α -ramificats i de conformacionalitat restringida, com els *N*-Cbz-prolinals, substrats d'interès per a la síntesi de pirrolizidines.

Aquest inconvenient es resolgué per enginyeria genètica de proteïnes, redissenyat el centre catalític de la FucA per mutagènesi dirigida del lloc d'unió de l'acceptor.

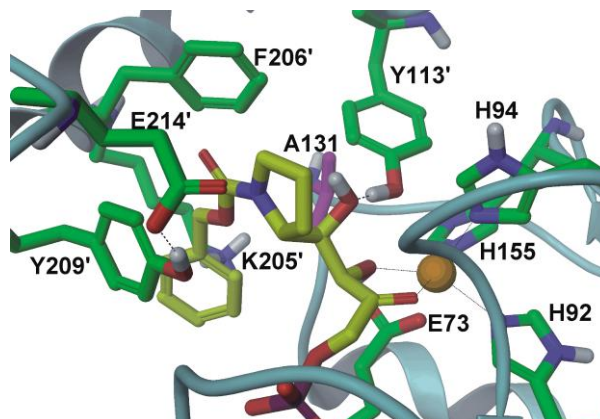


Figura 1.3.14. Modelat del centre actiu de la variant FucA F131A amb el producte aldòlic *anti* a partir de (*R*)-Cbz-aminoprolinal i DHAP. S'observen les interaccions de pont d'hidrogen entre l'aldol (4-OH) i el residu Y113'. El producte *sin* estableix la mateixa interacció però amb el residu Y209' o E214'. El metall Zn²⁺ (esfera marró) es troba pentacoordinat amb H92, H95, H155 i l'enediol 2-OH i 3-OH del producte aldòlic (provinent de DHAP). La prima en els números dels residus (per exemple Y113') indica que pertanyen a la subunitat veïna.¹²⁴

Es generaren les variants FucA F131A (**Figura 1.3.14**) i FucA F206A, entre d'altres, les quals mostraren conversions aldòliques superiors a l'enzim natiu front diferents *N*-Cbz-aminoaldehids.¹²⁴

Concretament, FucA F131A donà activitats aldòliques entre 4 i 25 vegades superiors a FucA_{wtr}, mantenint l'estereoselectivitat en els productes aldòlics.

L'espai creat per aquesta mutació puntual, permetria encabir aldehids voluminosos, com *N*-Cbz-prolinals, en l'espai hidrofòbic del centre actiu, estabilitzat per les interaccions de pont d'hidrogen amb els residus Y113' i Y209' (**Figura 1.3.14**). Alhora, permetria la interacció addicional π -catiò entre el grup protector Cbz i el residu K205'.^{107, 124}

1.3.3.2 APLICACIONS SINTÈTIQUES D'ALDOLASES DEPENDENTS DE DHAP

Les aldolases dependents de DHAP s'han emprat principalment en la síntesi de monosacàrids rars o no-naturals, els quals tenen aplicació com edulcorants no nutritius, inhibidors de glicosidases i com a sintons quirals per a la síntesi de compostos biològicament actius.^{13, 125}

Un dels exemples més destacats en l'aplicació industrial de les aldolases DHAP dependents és la síntesi de la macrolactona de 18-membres (+)-Aspicilina, a partir de 4-hidroxi-butiraldehid catalitzada per FruA (**Figura 1.3.15**).¹²⁶

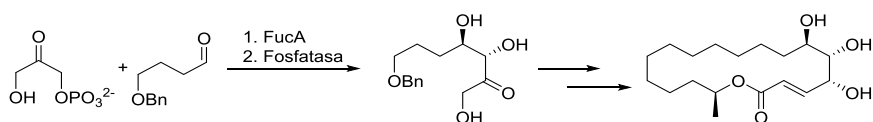


Figura 1.3.15. Síntesi aldòlica estereoselectiva catalitzada per FucA del precursor de (+)-Aspicilina.¹²⁶

Respecte als iminociclitolos, les aldolases dependents de DHAP també tenen una rellevància important i d'interès creixent. Les estratègies sintètiques es basen en una etapa clau d'addició aldòlica enzimàtica de DHAP a l'aminoaldehid d'interès, seguit de la desfosforilació del producte aldòlic. Finalment, l'iminosucre desitjat s'obté per hidrogenació catalítica (**Figura 1.3.16**). L'ús de les aldolases dependents de DHAP i aldehids acceptors, permet preparar col·leccions amb diversitat estructural i configuracional d'iminosucre mono i bicíclics polihidroxilats. Atès que els aminoaldehids lliures són substrats inestables, es preparen *N*-protegits o equivalents sintètics com azido aldehids.^{115, 127} Alhora, s'ha demostrat que el grup protector dels grup amino influeix en les conversions i diastereoselectivitats dels productes, i els millors resultats han estat obtinguts amb el grup protector Cbz.¹²⁸

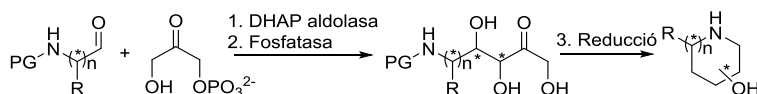


Figura 1.3.16. Estratègia quimioenzimàtica d'iminosucres.

Les primeres contribucions en aquest camp vingueren dels grups de recerca de C.-H. Wong i F. Effenberger, emprant D-fructosa-1,6-bisfosfat aldolasa (FruA) en la síntesi de (-)- i (+)-D-1-deoxinojirimicina, 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB) i D-fagomina a partir d'azido aldehids (exemple en la **Figura 1.3.17**).^{127, 129-131}

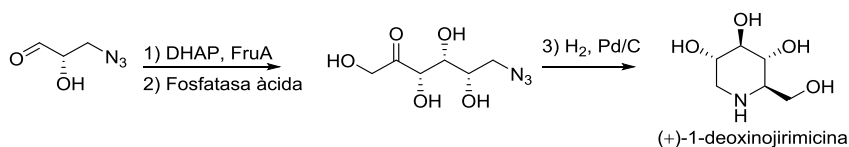


Figura 1.3.17. Síntesi quimioenzimàtica de (+)-D-1-deoxinojirimicina.

Amb aquest mateix enzim, FruA, també s'han reportat les síntesis d'iminoalcaloides pirrolizidínics tipus alexines o australines (exemple en la **Figura 1.3.18**).¹³²

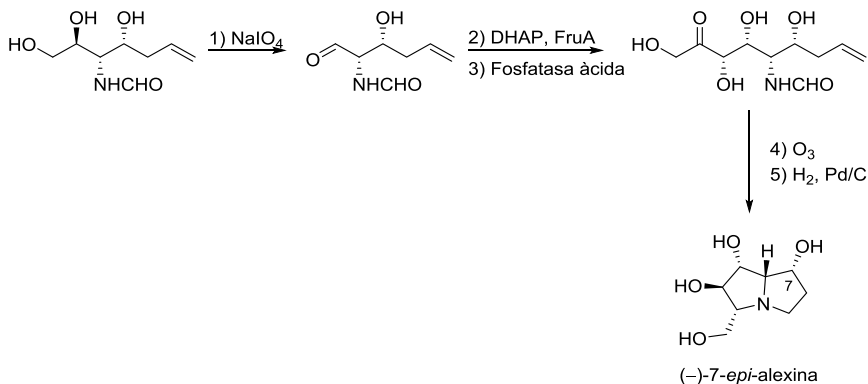


Figura 1.3.18. Síntesi de (-)-7-*epi*-alexine amb etapa clau d'addició aldòlica catalitzada per FruA.

L'addició aldòlica catalitzada per RhuA o FucA ha permès sintetitzar productes estereocomplementaris, del tipus pirrolidínics, piperidínics, pirrolizidínics, indolizidínics i quinolizidínics.^{124, 133-135} En són excel·lents exemples les síntesis de la (-)-hiacintacina A2 o derivats de pirrolidines polihidroxilades a partir de N-Cbz-aldehids (**Figura 1.3.19**).^{136, 137}

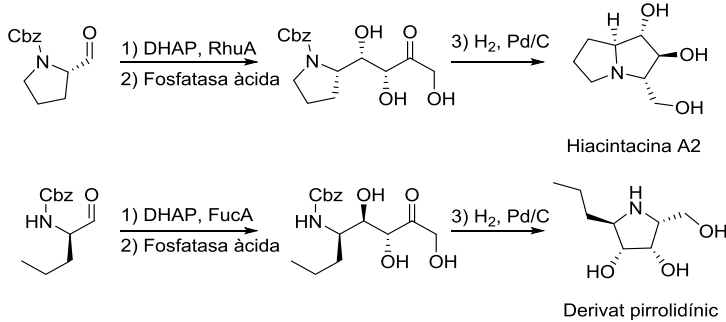


Figura 1.3.19. Síntesi de (-)-hiacintacina A2 (a dalt) i derivat polihidroxilat de pirrolidina (baix) a partir de l'addició aldòlica de DHAP als corresponents *N*-Cbz-aldehids catalitzada per RhuA i FucA de *E.coli*.

1.3.4 ALDOLASES DEPENDENTS DE DHA I ANÀLEGS NO FOSFORILATS

La *D*-Fructosa-6-fosfat aldolasa d'*Escherichia coli* (FSA) és la primera i única aldolasa natural, descrita fins al moment, que catalitza reversiblement la reacció aldòlica de dihidroxiacetona (DHA) a *D*-gliceraldehid-3-fosfat per formar *D*-fructosa-6-fosfat (**Figura 1.3.20**). Dins d'aquest grup s'inclou la variant genèticament modificada Transaldolasa B de *E.Coli* TalB F178Y.

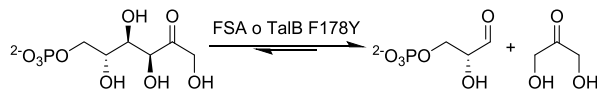


Figura 1.3.20. Formació reversible de *D*-Fructosa-6-fosfat a partir de *D*-gliceraldehid-3-fosfat i dihidroxiacetona (DHA), catalitzada per FSA o la variant TalB F178Y.

Ambdues permeten l'ús de la DHA no fosfatada, evitant l'ús de la DHAP i el pas addicional de desfosforilació dels productes aldòlics. Com s'ha esmentat anteriorment, la FSA és una excel·lent alternativa a l'aldolasa DHAP-dependent FruA, atès mostren toleràncies pels substrats acceptors similars i l'estereoselectivitat *sin* de la FSA és excel·lent.

La FSA fou descrita per primera vegada per Schürmann i Sprenger el 2001¹³⁸ i el seu rol fisiològic en *E. Coli* és de moment incert. Tot i ser inclosa en el grup de les aldolases, la seva estructura i seqüència estan estretament relacionades amb els enzims transaldolases. De fet, el centre actiu de la TalB i la FSA són molt similars, amb petites variacions que es tradueixen en diferents activitats catalítiques.¹³⁸

L'estructura quaternària de la FSA (PDB ID: 1L6W), determinada per Thorell i col·laboradors (2002),¹³⁹ consisteix en un homodècimer (230 kDa) format per dos pentàmers idèntics en forma d'anell superposats, estil toroidal

(Figura 1.3.21). És particularment interessant la interacció entre les subunitats del pentàmer, on la hèlix C-terminal d'un monòmer creua sobre el lloc actiu de la subunitat veïna, cobrint-lo parcialment. Es postula que gràcies a aquesta interacció, la proteïna és més compacte i estable a temperatures elevades ($t_{1/2}$ de 16 hores a 75 °C).¹³⁹ Aquesta propietat facilita enormement la purificació de l'enzim, que es duu a terme per tractament tèrmic a 75 °C, temperatura a la qual la majoria dels enzims de *E. coli* són desnaturalitzats. A més, presenta un ampli rang de pH amb activitat, de pH 6-12, sent òptim a pH 8.5 i tolerància a dissolvents orgànics com el DMSO i DMF.

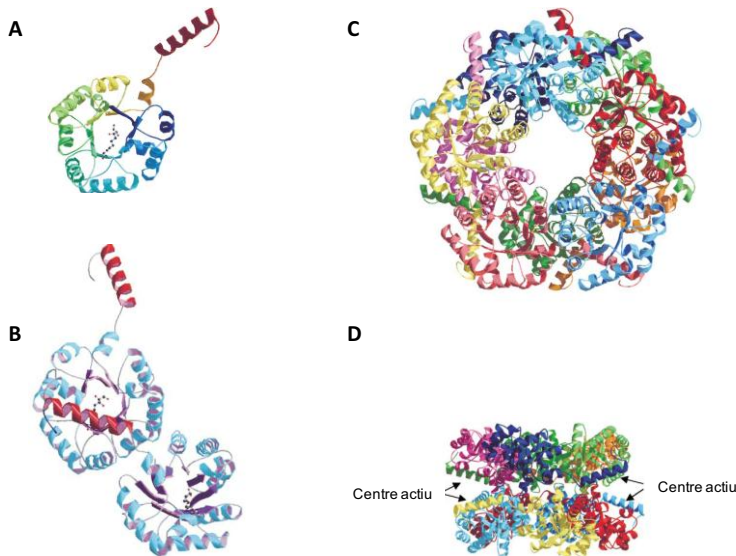


Figura 1.3.21. Vistes esquemàtiques de l'estructura de la FSA.¹³⁹ **A:** Vista del monòmer. La cadena polipeptídica és gradualment acolorida des de blau fosc en l'extrem *N*-terminal fins a vermell a *C*-terminal. Es destaca la lisina catalítica en el centre del monòmer. **B:** Acoblament entre dues subunitats. La cua *C*-terminal (vermell) d'un monòmer solapa parcialment en centre actiu de l'altre. **C:** Vista superior de l'estructura quaternària. Cada subunitat es mostra en un color diferent. **D:** Vista lateral del decàmer. Les entrades als centres actius s'indiquen amb fletxes.

Mecanísticament, la FSA és una aldolasa de classe I, on l'enamina intermediària és el nucleòfil que es genera en el centre actiu de l'enzim gràcies a la lisina catalítica Lys85. Cada subunitat es plega en forma de barril α/β , amb la Lys85 en l'extrem *C*-terminal de la cadena del barril β i en el centre del lloc actiu. S'han identificat dos residus, Leu107 i Ala129, que estan involucrats en la unió de l'hidroxil del C-1 del substrat donador i, possiblement, en l'estabilització de la base de Schiff intermèdia. Els residus Arg134, Ser166 i Lys168 possiblement interaccionen amb el grup fosfat del substrat acceptor natural (**Figura 1.3.22**).

Els residus equivalents a aquests en la família de les transaldolases es troben altament conservats i conformen el lloc d'unió del grup fosfat.^{138, 140}

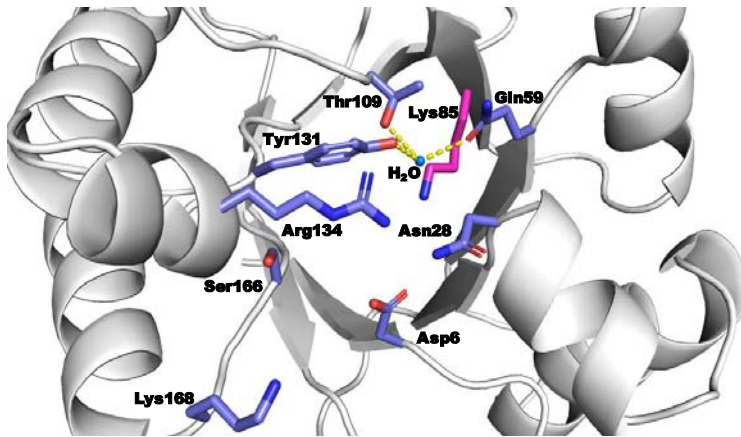


Figura 1.3.22. Centre actiu de la FSA on es mostren els residus mecànicament rellevants. La lisina catalítica es mostra en fúcsia i en blau, la resta de residus importants per al mecanisme, els quals són: Asp6, Asn28, Gln59, Thr109, Tyr131, Arg134, Ser166 i Lys168. Els puntets grocs indiquen els ponts d'hidrogen entre els residus Gln59, Thr109 i Tyr131 amb la molècula d'aigua catalítica (esfera de color blau).

Els residus Asp6, la Asn28 i la Thr109 de la FSA també es troben conservats dins de les transaldolases i estarien implicats en l'estabilització del producte aldòlic intermedi per ponts d'hidrogen. Es postulà el residu Asp6 com el responsable de la protonació de l'aldehid substrat per mecanisme àcid-base.¹³⁹ La molècula d'aigua catalítica es troba unida mitjançant ponts d'hidrogen amb els residus del centre actiu Gln59, Thr109 y Tyr131 (**Figura 1.3.22**), i pròxima al O₁ del donador, necessària per a la catàlisi. En el mecanisme catalític proposat (**Figura 1.3.23**),¹⁴¹ aquesta molècula d'aigua transfereix un protó des de i cap al substrat i intermediaris de reacció durant la formació de la base de Schiff intermèdia, especialment per a la protonació del grup sortint OH del hemiaminal.¹³⁹⁻¹⁴¹

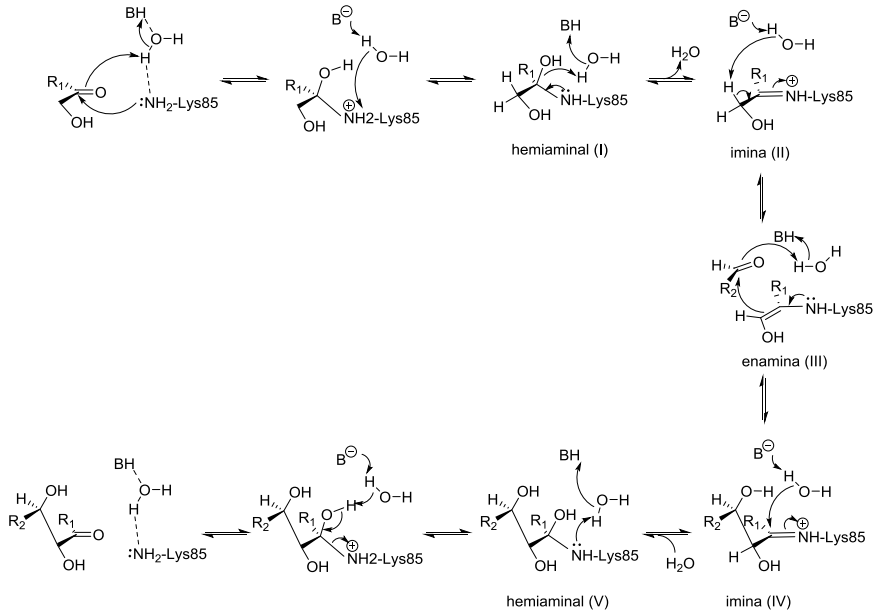


Figura 1.3.23. Mecanisme catalític proposat de la formació de l'enllaç C-C per a la FSA entre un donador (DHA, HA o GO) a un aldehyd acceptor.¹⁴¹ Tot i que no ha estat provat, en el mecanisme presentat s'hi implica una molècula d'aigua catalítica, la qual participa en la transferència de protó cap a i des dels intermediaris de reacció (I-V) i substrat acceptor durant la formació de la base de Schiff intermèdia, especialment per a la protonació del grup sortint hidroxil (I).¹³⁹ La Tyr131 i/o Asp6 es proposen com els possibles residus implicats en el mecanisme catalític àcid/base (BH).^{140, 142}

La transaldolasa modificada TalB F178Y amb activitat aldòlica, resultà d'un interessant estudi mutagènic sobre la transaldolasa B de *E. Coli* (PDB ID: 1UCW).^{143, 144} Les transaldolases (Tal, EC 2.2.1.2) són enzims gairebé omnipresents, els quals allarguen la cadena del substrat D-eritrosa 4-fosfat (E4P), alliberant gliceraldehid-3-fosfat (Ga3P) (**Figura 1.3.24**). Si bé, la TalB presenta una elevada homologia amb la FSA, és incapaç de catalitzar addicions aldòliques.

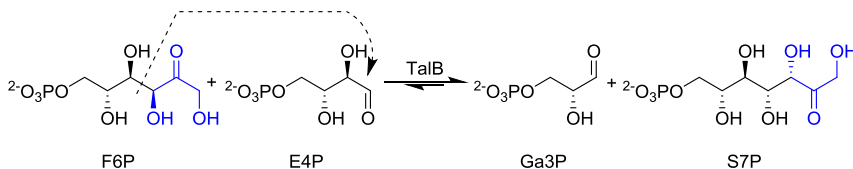


Figura 1.3.24. Reacció que catalitza en la natura la transaldolasa B (TalB) de *E. Coli*: la transferència reversible del fragment DHA de la D-Fructosa-6-fosfat (F6P) a la D-eritrosa 4-fosfat (E4P), sintetitzant D-sedoheptulosa 7-fosfat (S7P) i alliberant gliceraldehid 3-fosfat (Ga3P).

El centre actiu conté una fenilalanina altament conservada en les transaldolases (Phe178), l'equivalent del qual en FSA és la Tyr131. S'observa que aquest residu és determinant per conferir activitat aldolasa, ja que la TalB F178Y és capaç

d'utilitzar la DHA com substrat directament en una reacció aldòlica, amb activitat transaldolasa molt reduïda.¹⁴³

Com s'ha dit anteriorment, la majoria d'aldolases són fortament específiques pel donador i només accepten petites variacions. En canvi, la FSA nativa accepta anàlegs de DHA com la hidroxiacetona (HA), hidroxibutanona (HB) i el glicolaldehid (GO) amb elevada estereoselectivitat *sin* en els productes aldòlics (Figura 1.3.25).¹⁴⁵⁻¹⁴⁹

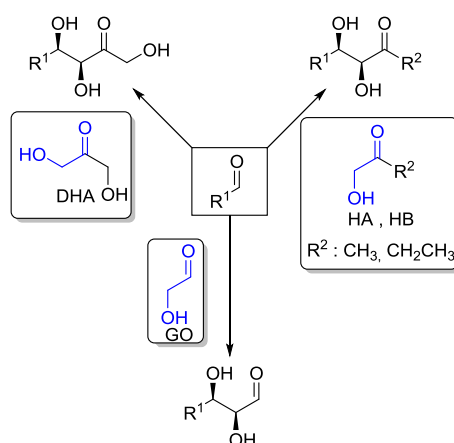


Figura 1.3.25. Reaccions aldòliques creuades de DHA i anàlegs α -hidroxicarboníl·lics a aldehids, catalitzades per FSA nativa. La part invariable hidroxiacetil en els quatre donadors (DHA, HA, HB i GO) es ressaltava en blau.

Com es denota, la presència de l'estructura hidroxiacetil en els donadors és imprescindible per a la formació de la base de Schiff i de la conseqüent enamina.

La tolerància sense precedents d'un aldehid com a donador, el GO, fou per primer cop descoberta en el nostre grup. Aquesta nova activitat permeté la síntesi de diversos sucres tipus aldoses, iminociclitols o altres molècules polihidroxilades, mitjançant l'auto-addició o addició creuada de GO catalitzada per FSA.¹⁴⁸ Alhora, l'ús d'aquest substrat com a nucleòfil en addicions aldòliques obre una nova via de síntesi inèdita fins al moment, atès que els productes aldòlics són aldehids i, per tant, susceptibles a addicions consecutives amb el mateix enzim FSA (*in situ*) o altres aldolases (s'amplia la informació en l'**Apartat 1.3.4.2** i **Apartat 1.4**).

Així doncs, gràcies a la tolerància de diversos donadors i d'aldehids acceptors, la FSA nativa és un biocatalitzador amb gran potencial sintètic per a l'obtenció de nous precursors d'imminociclitols mono i bicíclics d'interès. Tanmateix,

l'optimització addicional de les seves propietats catalítiques és fonamental per ampliar la seva versatilitat com a catalitzador.

1.3.4.1 OPTIMITZACIÓ DE FSA

En els últims anys fins a l'actualitat, s'està duent a terme un extens treball en la modulació del centre actiu de FSA en el nostre grup de recerca amb col·laboració de diversos grups d'investigació Europeus, com el grup del Professor W.-D. Fessner de l'Institut de Química Orgànica i Bioquímica de la Universitat Tècnica de Darmstadt, Darmstadt, Alemanya i el grup de la Professora M. Lemaire de la Universitat Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, França.

En aquest apartat es resumeixen els avenços més importants aconseguits en l'optimització de la FSA com a biocatalitzador, per enginyeria genètica de mutagènesi de lloc dirigit o saturat. Els estudis s'han centrat en la modificació de la tolerància vers els donadors o acceptors i de l'estereoselectivitat de l'enzim.

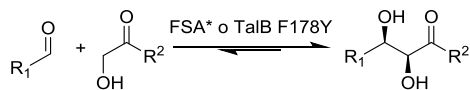
Tanmateix, el principal inconvenient que presenten les aldolases dependents de DHA és la falta d'un conjunt d'enzims estereocomplementaris, els quals no s'han trobat a la natura fins al moment.

1.3.4.1.1 Optimització en l'especificitat pels donadors DHA i GO

L'entorn del centre actiu de la FSA nativa és altament hidrofòbic, fet que facilita la unió a la lisina catalítica de substrats hidrofòbics com HA i HB, en comparació a més polars com GO o DHA (**Taula 1.3.1**).¹¹⁰ En estudis cinètics sobre la preferència de donadors de la FSA nativa, es determinà el paràmetre V_{\max}/K_M 45 vegades superior per HA respecte el substrat natural DHA.¹⁵⁰ En canvi, la TalB F178Y disposa d'un entorn més polar en el centre actiu. Conté un residu de serina (Ser176) el qual estableix un pont d'hidrogen amb DHA, fet que es reflexa en la forta preferència per a aquest nucleòfil respecte als altres.

Inspirats en aquest fet, es modificà la posició equivalent en la FSA, la alanina 129 per una serina. La nova variant FSA A129S mostrà una afinitat incrementada per la DHA, sense mostrar activitat transaldolasa, suggerint la formació d'un pont d'hidrogen entre el residu S129 amb el grup hidroxil de la DHA que estabilitzaria la base de Schiff intermèdia (**Figura 1.3.26**).¹⁵¹ Doncs, les preferències vers els donadors es poden resumir per la FSA_{wt} de HA>GO>DHA i per la variant FSA A129S, DHA>HA>GO (**Taula 1.3.1**).

Taula 1.3.1: Comparació de la preferència de donador per la FSA, FSA A129S i TalB F178Y.



R ² (Donadors)	FSA nativa	TalB F178Y	FSA A129S
CH ₂ OH (DHA)	+	+++	+++
H (GO)	++	+	+
CH ₃ (HA)	+++	+	++
CH ₂ CH ₃ (HB)	+++	-	n.a.

FSA*: FSA nativa i FSA A129S. La qualitat del donador s'especifica com +++: excel·lent, ++: bo, +: pobre, - : sense activitat, n.d.: no assajat.¹¹⁰

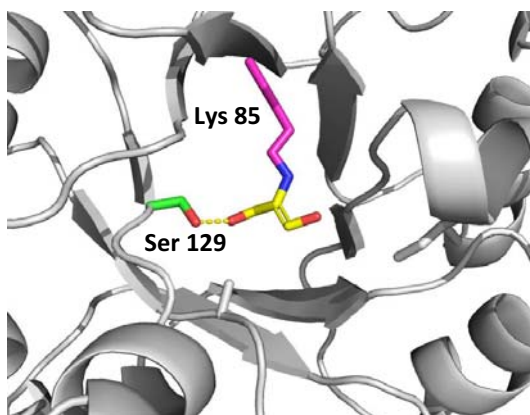


Figura 1.3.26. Model del centre actiu de la variant FSA A129S. La lisina catalítica (mostrada en color magenta) es troba unida al substrat donador DHA, formant la base de Schiff intermèdia, la qual es estabilitzada per la interacció de pont d'hidrogen amb el residu S129.

En l'apartat anterior s'ha introduït la importància del GO com a donador en les reaccions auto aldòliques o creuades amb FSA.¹⁴⁸ La FSA nativa mostra una preferència cap al GO com a donador de 320 vegades superior que com acceptor. Gràcies a aquesta propietat, es poden afavorir les addicions aldòliques creuades amb GO si la seva concentració es manté baixa en el medi de reacció (<5 mM) respecte a l'electròfil desitjat (100 mM), per tal d'evitar la seva autoaddició. No obstant, aquesta tendència només és vàlida si els aldehids són bons acceptors, és a dir, amb valors de K_M menors que el valor de GO com acceptor. A més, és altament favorable que els productes aldòlics creuats tendixin a la seva ciclació, desplaçant així la reacció. Per contra, en casos

d'acceptors febles, s'obté majoritàriament o únicament el producte aldòlic d'autoaddició D-treosa.¹⁴⁸

Paral·lelament a la realització de la present tesi, en el nostre grup de recerca es dugué a terme el redisseny del centre actiu de la FSA per tal d'augmentar l'afinitat cap al GO i optimitzar tant les homo addicions aldòliques com creuades amb acceptors febles.¹⁵² Com s'ha vist, la posició A129 és clau per a la modulació de la selectivitat respecte als donadors. Doncs, es realitzà l'estudi de mutagènesi de saturació en aquesta posició i s'emprà la reacció de formació de D-treosa (**Figura 1.3.27**) per valorar les noves variants, on FSA A129X amb X= glicina, valina o treonina mostraren millors resultats que l'enzim natiu.¹⁴¹ La variant FSA A129G presentà una activitat incrementada de 20 vegades superior, mentre que les variants FSA A129T i FSA A129V, un increment de 10 vegades.

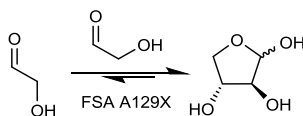


Figura 1.3.27. Auto addició aldòlica de GO per formar D-treosa catalitzada per variants de FSA A129X.

En reaccions aldòliques de GO a diversos *N*-Cbz-aminoaldehyds, la FSA A129G també rendí els millors resultats, proporcionant conversions aldòliques excel·lents amb substrats no ramificats (per exemple, 67 % amb $n=0$ i $R^1=H$; 82 % amb $n=1$ i $R^1=H$), superiors a l'enzim natiu (3 % amb $n=0$ i $R^1=H$; 38 % amb $n=1$). Tanmateix, FSA A129G no tolerà aminoaldehyds estèricament més exigents, com (*R*)- o (*S*)-*N*-Cbz-alaninal ($n=0$, $R^1=(R/S)-CH_3$; **Figura 1.3.28**).¹⁴¹

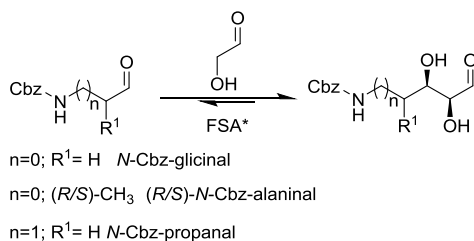


Figura 1.3.28. Addicions aldòliques de GO a *N*-Cbz-aminoaldehyds FSA nativa i variants.¹⁴¹

Seguidament, es proposà incorporar la modificació A165G en FSA A129G (Veure següent **Apartat 1.3.4.1.3**) a fi d'incrementar les conversions pels *N*-Cbz-aminoaldehyds ramificats en el C- α . No obstant, s'observà una disminució de les conversions aldòliques amb GO de la nova variant FSA A129G/A165G respecte FSA A129G. Aquesta disminució podria estar causada per la nuesa en el centre actiu arrel de la doble substitució per glicines, implicant una pèrdua de

les interaccions entre els residus amb el substrat. Per tal d'incrementar-les, es combinà A129G amb modificacions en la posició leucina 107, generant les variants FSA L107Y/A129G i FSA L107H/A129G, les quals mostraren conversions aldòliques de GO a *N*-Cbz-glicinal ($n=0$ i $R_1=H$ **Figura 1.3.28**) de 85 i 83 % respectivament. Segons els models, el residu A129G permetria la orientació adequada de la tirosina (Tyr107) o de la histidina (His107) per interactuar amb el donador. Els dos nous residus, incrementen la polaritat i compactació en aquesta posició, facilitant la interacció entre els residus del centre catalític amb el donador GO. A més, la variant L107F/A129G mostrà una activitat catalítica molt més baixa en comparació a FSA L107Y/A129G, indicant que l'hidroxil de la tirosina podria participar activament en el mecanisme de la generació del nucleòfil o que l'increment de la polaritat afavoriria l'intercanvi àcid-base del mecanisme catalític.

1.3.4.1.2 Ampliació de la flexibilitat per a donadors inèdits

La FSA nativa mostra una especificitat relaxada envers el substrat donador, en comparació a la resta d'aldolases conegudes. Tanmateix, només tolera anàlegs de la DHA de cadena curta (HA, HB i GO). En els darrers anys, en el nostre grup de recerca, s'ha ampliat el ventall de donadors tolerats per la FSA amb estructura 1-hidroxiimetilcetones de cadena llarga, lineals o ramificades, i amb la presència d'heteroàtoms, gràcies a noves variants de FSA.¹⁵²

La tolerància a donadors inèdits per la FSA amplia la diversitat estructural dels productes aldòlics generats i incrementa el potencial sintètic d'aquest biocatalitzador.

1.3.4.1.3 Ampliació i millora en la tolerància de *N*-Cbz-aminoaldehids

Malgrat els importants avenços aconseguits amb la variant FSA A129S, aquest biocatalitzador continua mostrant una tolerància baixa front *N*-Cbz-aminoaldehids C- α substituïts. Per mutagènesi de lloc dirigit basat en l'estructura, es modificaren diferents posicions en el lloc d'unió del substrat acceptor de la FSA nativa i FSA A129S, on la modificació de l'alanina 165 per una glicina (A165G) resultà clau.

Les velocitats inicials de FSA A165G amb els acceptors (*R/S*)-*N*-Cbz-alaninals i donadors DHA i HA foren fins a 175 vegades superiors que per l'enzim natiu i 12 vegades superiors respecte FSA A129S. Per efecte sinèrgic de les modificacions, la variant doble FSA A129S/A165G exhibí els millors resultats. En aquest cas, les

velocitats inicials foren entre 5 fins a >900 vegades superiors respecte FSA nativa o les variants simples.¹⁵³

En les addicions aldòliques de GO a *N*-Cbz-aminoaldehyds seleccionats (*N*-Cbz-glicinal, *N*-Cbz-alaninal i *N*-Cbz-propanal) també s'observaren increments en les velocitats inicials i conversions aldòliques de la variant FSA L107Y/A129G/A165G respecte a les variants sense la modificació A165G.¹⁴¹ S'obtingueren rendiments dels productes aldòlics de (*S*)- i (*R*)-*N*-Cbz-alaninal de 32 % i 73 % respectivament, els quals no s'havien detectat amb FSA L107Y/A129G o FSA A129G. Es reafirmà la necessitat de la modificació A165G per a la catàlisi amb aminoaldehyds C- α substituïts i el potencial sinèrgic de les mutacions en l'augment de l'afinitat tant pels donadors com acceptors.

En el **Capítol 3.3** es presenta el redisseny del centre actiu de la FSA per a incrementar les conversions aldòliques de substrats α -hidroxicarboníl·lics DHA, HA i GO a *N*-Cbz-aminoaldehyds voluminosos o estèricament impeditos, com etapa clau en la síntesi d'iminoclitols mono- i bicíclics. Per al nostre grup de recerca, és de gran importància disposar d'un conjunt d'enzims amb diferents activitats i selectivitats en les addicions aldòliques front diversos donadors i acceptors. Les noves variants de FSA presentades en aquest treball (**Capítol 3.3**), combinades amb les variants descrites anteriorment, constitueixen un conjunt d'enzims excel·lents per a la l'obtenció d'iminoclitols, carbohidrats i derivats d'aquests.

1.3.4.1.4 Modificació de l'estereoselectivitat de la FSA

La modificació de l'estereoselectivitat *sin* de la FSA (>95 %) a *anti* en els adductes aldòlics és de gran interès atès que permetria la síntesi de productes estereocomplementaris amb el mateix biocatalitzador modificat.

En estudis recents en el nostre grup, s'ha aconseguit l'obtenció de productes aldòlics amb estereoquímica *anti*, com el sucre poc comú L-eritrosa. S'obtingué aquest compost majoritàriament respecte D-treosa (producte *sin*) mitjançant l'autoaddició de GO catalitzada per variants de FSA (**Figura 1.3.29**).¹⁵²

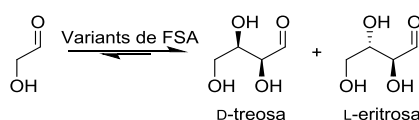


Figura 1.3.29. Obtenció de D-treosa i L-eritrosa per autoaddició aldòlica de GO catalitzada per variants de FSA. La L-eritrosa és el producte aldòlic *anti* que s'obté gràcies a les modificacions en FSA per mutagènesi de lloc dirigit.

Tot i ser resultats incipients en la modulació de l'estereoselectivitat de la FSA per mutagènesi, són molt encoratjadors.

1.3.4.2 APLICACIONS SINTÈTIQUES DE FSA

L'aplicació sintètica de la FSA ha estat principalment en la preparació de carbohidrats, iminosucres i compostos anàlegs, tal com les aldolases dependents de DHAP.

La síntesi d'iminosucres s'ha realitzat seguint la mateixa estratègia sintètica descrita anteriorment per les aldolases dependents de DHAP (**Apartat 1.3.3.1**), però amb la versatilitat de l'ús dels donadors DHA, HA, HB i GO.^{146-148, 154, 155}

A més, gràcies a les modificacions genètiques realitzades a l'enzim natiu ha permès incrementar la seva aplicabilitat sintètica.^{141, 151, 153} En són exemples les síntesis dels iminociclitolos inhibidors de glicosidases D-fagomina,^{146, 156} 1-deoxinojirimicina (DNJ)¹⁴⁷ i 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol (DAB)¹⁵⁵ (**Figura 1.3.30**).

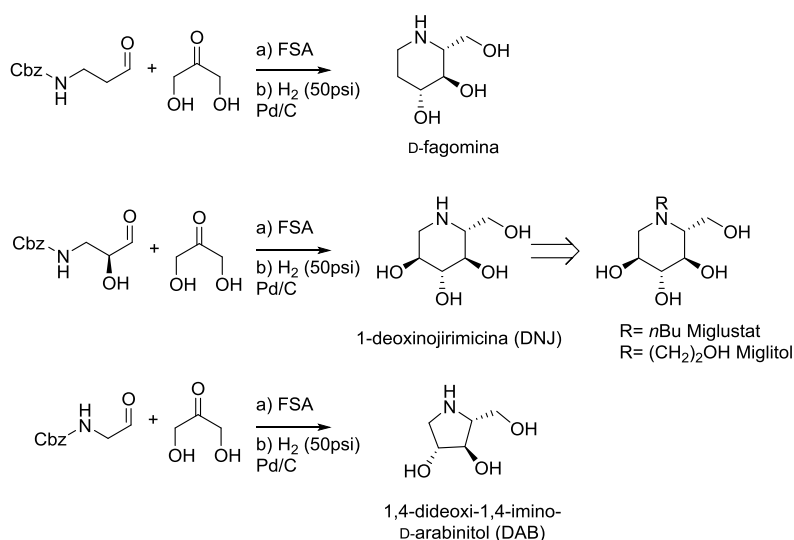


Figura 1.3.30. Exemples de síntesis d'iminociclitolos amb l'etapa clau d'addició aldòlica de DHA a N-Cbz-aminoaldehyd DHA catalitzada per FSA amb potencials aplicacions industrials.

Respecte als carbohidrats, en són exemples destacats la síntesi de D-treosa, 1-deoxi-D-ido-heptulosa o D-xilulosa (**Figura 1.3.31**). La D-treosa s'obtingué per l'auto addició del GO catalitzada per FSA nativa, estratègia sintètica que pot ser ampliada a l'obtenció de 1-deoxi-D-ido-heptulosa per una doble addició aldòlica consecutiva, també catalitzada per FSA_{wtr}, en el mateix medi de reacció ("One pot").¹⁴⁸ En l'**Apartat 1.4.1** es troba ampliada la informació en relació a

estratègies de síntesi per cascada enzimàtica tipus "One pot". La D-xilulosa es sintetitzà per l'addició creuada de DHA a GO gràcies a la variant FSA A129S amb activitat incrementada per DHA.¹⁵⁴

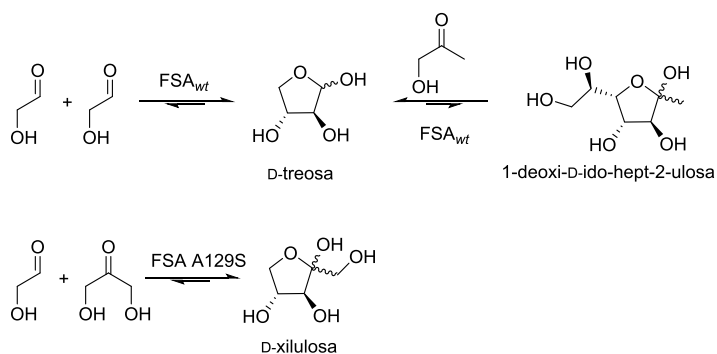


Figura 1.3.31. Exemples de síntesi de carbohidrats amb una o dos etapes claus d'addició aldòica catalitzada per FSA nativa o modificada genèticament.

A escala industrial, en el 2008 es presentà la síntesi de l'edulcorant furaneol a partir de l'addició de HA a metilglixal catalitzada per FSA nativa (**Figura 1.3.32**).¹⁵⁷

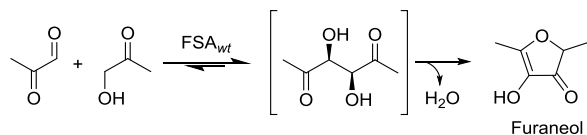


Figura 1.3.32. Síntesi de l'edulcorant Furaneol a partir de l'addició aldòica de HA a metilglixal catalitzada per FSA nativa i seguit de la deshidratació de l'adducte aldòic *in situ*.

En el **Capítol 3.2** es presenta la síntesi de derivats de l'àcid piperòlic i homoiminociclitolos per mitjà d'una innovadora estratègia de cascada enzimàtica utilitzant el poder sintètic de diverses aldolases, entre elles, la FSA_{wt} o modificada genèticament.

En el **Capítol 3.4** es presenta la síntesi d'un conjunt d'iminociclitolos polihidroxilats mono i bicíclics amb diversitat estructural i configuracional a partir de l'addició aldòica de DHA, HA o GO a *N*-Cbz-aminoaldehids catalitzades per variants de FSA.

1.4 ALDOLASES EN ESTRATÈGIES DE CASCADA ENZIMÀTICA

Les *reaccions en cascada*, també conegudes com tàndem o reaccions dominó, es defineixen com processos de dos o més etapes, en què la transformació posterior es duu a terme gràcies al producte obtingut en l'anterior pas. Atès que no requereixen la purificació dels productes intermedis, són metodologies de

síntesi excel·lents a fi d'optimitzar rendiments, costos, temps o quantitat de subproductes de processos de múltiples passos. En aquest sentit, representen estratègies ideals per a síntesi de molècules complexes a partir de substrats simples, com carbohidrats o iminociclitols.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

Les rutes metabòliques són exemples de catàlisi en cascada, les quals poden ser imitades en el camp de biocatàlisi per l'ús de sistemes multi-enzimàtics en fase homogènia. L'acció conjunta de diversos enzims o d'un de sol en la catàlisi de diversos passos consecutius, presenta extraordinaris avantatges des del punt de vista sintètic i tot un repte en l'adaptació dels biocatalitzadors en les reaccions implicades.^{159, 161, 162}

En la literatura existeixen nombrosos exemples d'acoblements de reaccions en cascada amb aldolases en combinació amb altres enzims.¹⁶³⁻¹⁶⁷ En són exemples, l'addició aldòlica de glicina, catalitzada per una treonina aldolasa, seguida de la descarboxilació enzimàtica del producte aldòlic^{97, 168} o la generació enzimàtica del donador DHAP *in situ* per a l'addició d'aquest donador a diversos aldehids acceptors.^{113, 163, 169-171}

Entre les diferents possibilitats d'estratègies en cascada multi-enzimàtiques o quimioenzimàtiques, aquesta secció es centrarà en processos de varies etapes lineals catalitzades per la mateixa o diferents aldolases en la formació de dos o més enllaços C-C.

1.4.1 REACCIONS CASCADA TIPUS "ONE POT" EMPRANT UNA ALDOLASA

En reaccions de cascada tipus *one pot* s'empra una aldolasa en els passos consecutius de reaccions aldòliques en el mateix medi de reacció. Per tant, es imprescindible que el producte intermedi sigui un aldehyd, susceptible a actuar com a acceptor en les addicions següents.

Entre les aldolases conegudes, la 2-desoxi-D-ribose-5-fosfat aldolasa (DERA, EC 4.1.3.4) i la D-fructosa-6-fosfat aldolasa (FSA) accepten aldehids com a substrats donadors i, per tant, els adductes aldòlics resultants contenen la funció aldehydica. La DERA catalitza *in vivo* l'addició aldòlica reversible d'acetaldehyd a D-gliceraldehyd-3-fosfat per formar la 2-desoxi-D-ribose 5-fosfat, producte de degradació de l'àcid desoxiribonucleic.¹⁷² A escala industrial, trobem l'exemple de la doble addició d'acetaldehyd a cloroacetaldehyd catalitzada per DERA, on el producte final és un hemiacetal cíclic precursor de l'Atorvastatin (Lipitor)

(Figura 1.4.2).^{173, 174} Les vendes estimades globals de l'Atorvastatin, medicament per a la reducció del colesterol, ascendiren fins a 11,900 milions de US\$ en 2010.

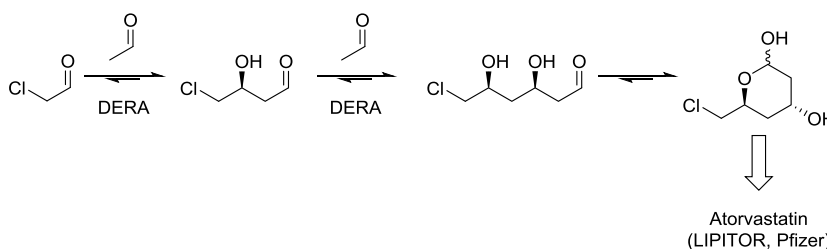


Figura 1.4.1. Doble addició aldòlica d'acetaldehid a cloroacetaldehid catalitzada per la DERA. El producte aldòlic és l'intermedi en la síntesi industrial de fàrmacs com l'Atorvastatin (Lipitor, Pfizer).¹⁷³

Com s'ha explicat en l'**Apartat 1.3.4**, la FSA tolera GO com a donador i és capaç de catalitzar diverses etapes amb GO com a donador o altres nucleòfils en les etapes consecutives. Fou demostrat per primer cop en el nostre grup amb la síntesi d'1-desoxi-D-ido-heptulosa, producte de la dimerització de GO formant la D-treosa seguida d'addició *in situ* de HA (Veure **Figura 1.3.31**).^{148, 154} Gràcies a noves variants amb activitat incrementada pel GO, s'ha ampliat el nombre de carbohidrats sintetitzats per aquesta metodologia de *one pot* en addicions consecutives de GO a si mateix o aldehids petits. N'és un exemple la síntesi del carbohidrat rar L-xilosa a partir del formaldehid (**Figura 1.4.2**).¹⁵²

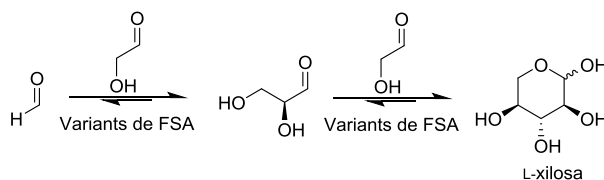


Figura 1.4.2. Doble addició de GO a formaldehid per formar L-xilosa, catalitzada per variants de FSA amb activitat millorada vers el GO.¹⁵²

1.4.2 REACCIONS "TÀNDEM" MULTI-ENZIMÀTIQUES AMB ALDOLASES

Les reaccions tàndem consecutives multi-enzimàtiques consisteixen en diversos passos d'addicions aldòliques catalitzades per dues o més aldolases, sense la purificació dels productes intermedis. Es poden dur a terme en el mateix medi de reacció (*one pot*) si els biocatalitzadors són compatibles, o bé, en passos separats per tal d'optimitzar les condicions de reacció de cada etapa.

Aquesta estratègia ha estat emprada per a preparar disacàrids per mitjà de l'addició consecutiva de DHAP a un dialdehid, catalitzades per

L-rhamnulosa-1-fosfat aldolasa (RhuA) i D-fructosa-1,6-bifosfat aldolasa (FruA) en la mateixa mescla de reacció (**Figura 1.4.3**).¹⁷⁵

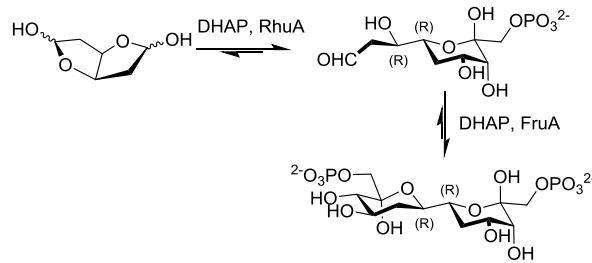


Figura 1.4.3. Addicions aldòliques en tàndem de dues molècules de DHAP a un dialdehid, catalitzades per les aldolases RhuA i FruA.

Un altre exemple és la síntesi de cetoses emprant DERA i FruA o l'àcid *N*-acetilneuramínic aldolasa (NeuAc) (**Figura 1.4.4**).¹⁷⁶ En la combinació DERA-FruA, s'aplica una quantitat baixa de DERA, i la reacció s'atura en la primera addició d'acetaldehid, seguida per l'addició de DHAP catalitzada per FruA *in situ*. En canvi, la combinació de DERA-DERA-NeuAc no es possible la combinació de les aldolases en el mateix medi de reacció i, per tant, l'intermedi es aïllat per a l'addició de piruvat catalitzada per NeuAc.

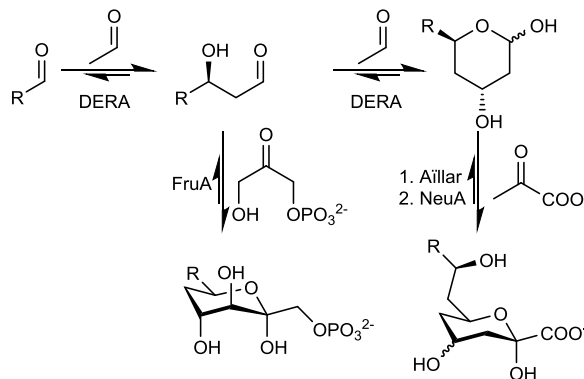


Figura 1.4.4. Síntesi de cetoses per una estratègia de cascada enzimàtica catalitzades per tres aldolases: DERA, FruA i NeuAc.

L'aldolasa FSA presenta un enorme potencial a ser aplicada en combinació amb altres aldolases en la segona addició aldòlica, en estratègies de FSA-aldolases (**Figura 1.4.5**). L'aplicabilitat d'aquestes reaccions en cascada és actualment objecte d'estudi en el nostre grup.

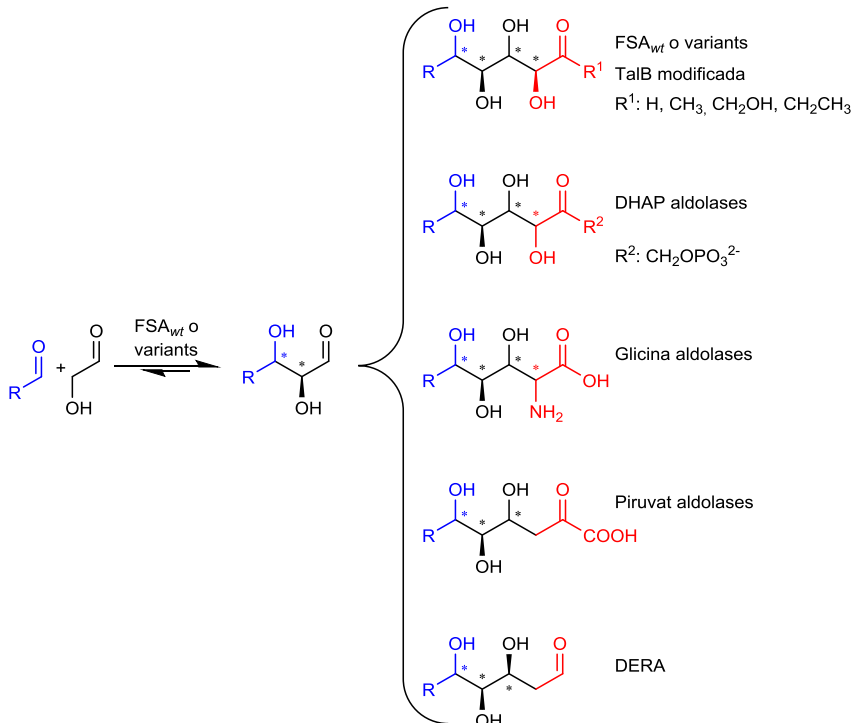


Figura 1.4.5. Exemples de potencials reaccions de cascada enzimàtica amb la combinació de la FSA en la primera etapa i altres aldolases en la segona.

1.4.3 REACCIONS "TÀNDEM" QUIMIOENZIMÀTIQUES AMB ALDOLASES

Les reaccions tàndem consecutives quimioenzimàtiques consisteixen en diversos passos d'addicions aldòliques catalitzades per dues o més aldolases amb etapes de modificacions de grups funcionals intercalades.

A excepció de DERA i FSA, la resta d'aldolases no toleren aldehids com a substrat donadors i, per tant, es requereix la generació de la funció aldehídica en el pas intermedi de les reaccions tàndem multi-enzimàtiques. Així mateix, es poden afegir passos addicionals de transformacions senzilles a fi d'ampliar el ventall estructural dels productes finals. En la **Figura 1.4.6** es representen diferents exemples de reaccions tàndem quimioenzimàtiques emprant aldolases.

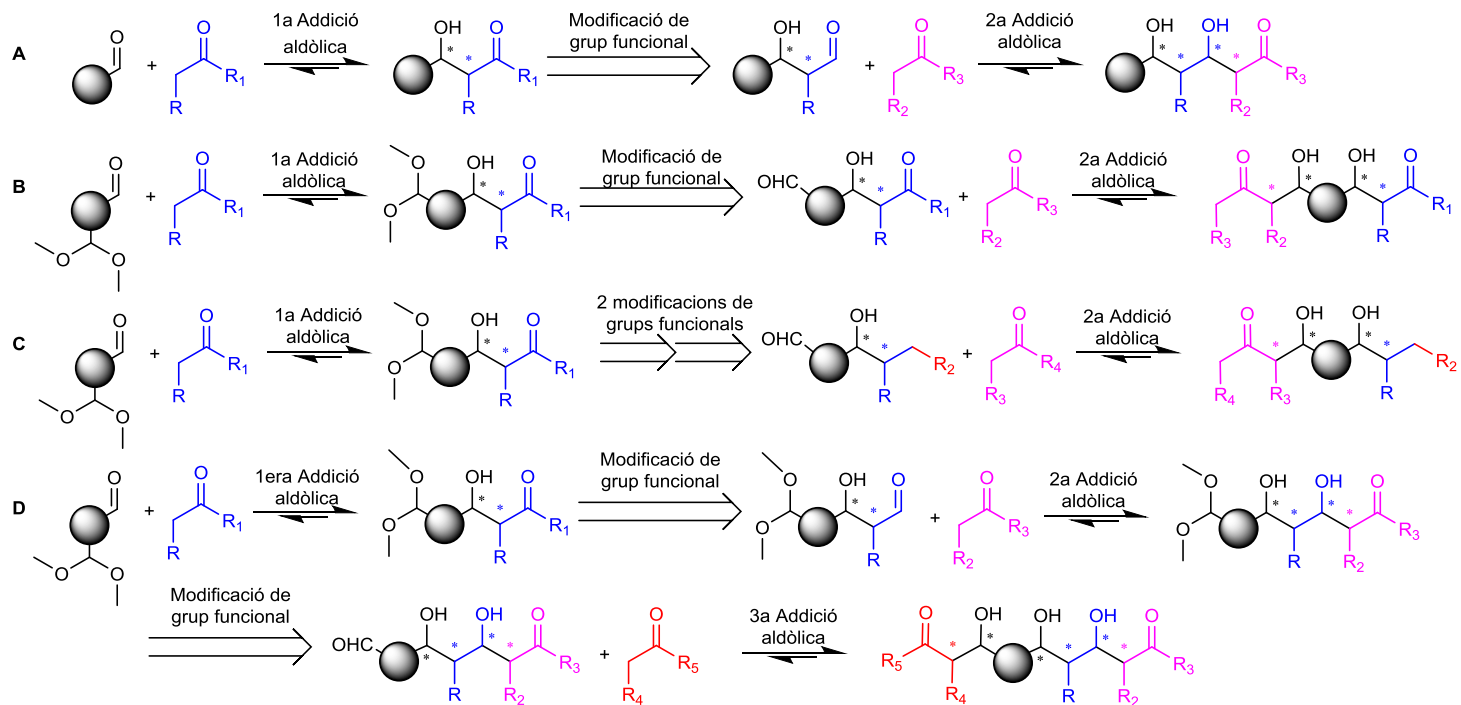


Figura 1.4.6. Estratègies per a la combinació de dues o més etapes d'addició aldòlica enzimàtica amb modificacions de grups funcionals intercalades. En la ruta sintètica **A** la segona addició s'aplica sobre la fracció corresponent al donador de la primera addició, i en la **B**, en la corresponent a l'acceptor. La ruta **C** és una variant de la **B** per tal d'ampliar la diversitat estructural del producte aldòlic final. La ruta **D** és una combinació de **A** i **B**, amb tres etapes aldòliques.

En el **Capítol 3.2** es presenta per primera vegada la síntesi d'iminoclitols polihidroxilats mitjançant estratègies tàndem quimioenzimàtiques amb aldolases. Per a la síntesi dels compostos piperidínics, s'han seguit les estratègies quimioenzimàtiques **A, B i C** i pels pirrolidínics, l'estratègia **D (Figura 1.4.6)**.

2

OBJECTIUS

2.1 OBJECTIUS GENERALS

El treball presentat en aquesta tesi forma part d'un projecte de recerca de síntesi d'iminoclitols polihidroxilats mitjançant el desenvolupament de noves estratègies quimioenzimàtiques que permeten el control de la estereoquímica dels compostos finals i de la generació d'una àmplia col·lecció de compostos amb diversitat estructural i configuracional.

L'objectiu general d'aquest treball és l'estudi de les aldolases dependents de glicina, de DHAP i D-fructosa-6-fosfat aldolasa (FSA) i optimitzar les reaccions que catalitzen en estratègies amb una única etapa d'addició aldòlica clau o en rutes de diverses etapes enzimàtiques consecutives. Alhora, el treball té com a finalitat l'estudi en concret de dues aldolases. En primer lloc, de la producció òptima de la D-treonina aldolasa d'*Arthrobacter xylosoxidans* per aplicacions sintètiques. En segon lloc, el redisseny del centre catalític de la FSA per enginyeria de proteïnes a fi d'ampliar el seu espectre sintètic aplicat en la síntesi d'iminoclitols mono i bicíclics a partir de N-Cbz-aminoaldehids i donadors α -hidroxicarbonílics.

2.2 OBJECTIUS ESPECÍFICS

I. Estudi de la producció i capacitats sintètiques de la D-treonina aldolasa d'*Arthrobacter xylosoxidans*

- ❖ Estudi de la conservació de l'activitat enzimàtica de D-TA_{oxy} segons el mètode de purificació i/o emmagatzematge emprat.
- ❖ Síntesi a escala analítica de β -hidroxi- α -aminoàcids mitjançant D-TA_{oxy} i estudi de la influència del medi de reacció en les conversions i diastereoselectivitats dels adductes aldòlics.
- ❖ Avaluació dels paràmetres de reacció a escala analítica de la reacció d'addició de glicina a 2,2-dimetoxiacetaldehid catalitzada per D-TA_{oxy}.

II. Síntesi de derivats polihidroxilats de l'àcid pipercolic i iminoclitols piperidínics i pirrolidínics a partir de substrats aquirals mitjançant aldolases dependents de

glicina, de DHAP i D-fructosa-6-fosfat aldolasa (FSA) en estratègies tàndem quimioenzimàtiques.

- ❖ Estudi a nivell analític i síntesi diastereoselectiva dels adductes aldòlics de glicina a 2,2-dimetoxiacetaldehid catalitzada per aldolases dependents de glicina. Obtenció dels intermedis quirals a partir de la primera etapa clau enzimàtica.
- ❖ Estudi a nivell analític i síntesi dels adductes aldòlics dels intermedis de la primera etapa clau i les aldolases dependents de DHAP L-fuculosa-6-fosfat aldolasa (FucA), L-rhamnulosa-6-fosfat aldolasa (RhuA) i D-fructosa-6-fosfat aldolasa (FSA).
- ❖ Síntesi, purificació i caracterització dels productes finals .

III. Generació de noves variants de FSA per a catalitzar les addicions aldòliques de donadors α -hidroxicarbonílics DHA, HA o GO a un ampli espectre estructural de *N*-Cbz-aminoaldehids.

- ❖ Disseny de noves variants de FSA per ampliar la tolerància pel substrat acceptor a partir de FSA A129S/A165G dirigides als donadors DHA i HA i FSA L107Y/A129G/A165G a GO.
- ❖ Avaluació de les capacitats sintètiques de les noves variants en les addicions aldòliques de *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats i DHA, HA i GO.

IV. Síntesi, purificació i caracterització d'iminociclitolos mono i bicíclics a partir de *N*-Cbz-aminoaldehids voluminosos α o β -substituïts lineals o cíclics catalitzades per noves variants de FSA.

3

RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1

ESTUDI DE LA D-TREONINA ALDOLASA D'*Achromobacter xylosoxidans* PER A L'OBTENCIÓ DE β -HIDROXI- α -AMINOÀCIDS

Com s'ha mencionat en la introducció, els β -hidroxi- α -aminoàcids són precursors molt valuosos per la síntesi de diversos fàrmacs i agroquímics.^{82, 177, 178} Els derivats del 2,4-diamino-3-hidroxiàcid (β -hidroxi- α,ω -diaminoàcids), en particular, presenten aplicacions polifuncionals com inhibidors de proteases aspàrtiques, enzims involucrats en malalties com la SIDA (proteases del HIV), la malària, el càncer, la malaltia d'Alzheimer i infeccions bacterianes.¹⁷⁹⁻¹⁸²

En estudis previs en el nostre grup de recerca, es dugueren a terme les síntesis diastereoselectives d'un conjunt de L- β -hidroxi- α,ω -diaminoàcids, a partir de N-Cbz-aminoaldehyds i glicina, catalitzades per Serina hidroximetil transferasa de *Streptococcus thermophilus* (L-SHMT_{sth}) i L-treonina aldolasa de *E. coli* (L-TA_{eco}). Les relacions diastereomèriques dels corresponents adductes aldòlics L-*sin/anti* β -hidroxi- α,ω -diaminoàcids foren controlats i modificats per enginyeria de les reaccions, és a dir, per mitjà de l'estudi dels paràmetres associats, com ara la temperatura, el medi de reacció i la concentració dels substrats.⁸⁷

Alhora, els β -hidroxi- α -aminoàcids són valuosos com a sintons d'estructures més complexes. En el **Capítol 3.2** s'empren els àcids (2*S*,3*R*) i (2*R*,3*R*)-2-amino-3-hidroxi-4,4-dimetoxibutanoic (L-*anti-2a* i D-*sin-3a*) com a intermedis claus en la síntesi de derivats polihidroxilats de l'àcid piperòlic i iminociclitols piperidínics.

L'interès del nostre grup per síntesis enzimàtiques estereoselectives, ens dugué a investigar la D-treonina aldolasa d'*Achromobacter xylosoxidans* (D-TA_{axy}). La finalitat en el present treball fou l'obtenció d'aquest biocatalitzador a fi d'avaluar-ne les seves capacitats sintètiques per produir D- β -hidroxi- α,ω -diaminoàcids i l'optimització de la síntesi enzimàtica del sintó (2*R*,3*R*)-2-amino-3-hidroxi-4,4-dimetoxibutanoic (D-*sin 3a*). Per a tal fi, es requerí un estudi previ de la seva producció de D-TA_{axy}, atès que les D-treonina aldolases (D-TA) són poc conegudes.

3.1.1 ESTUDIS PREVIS

En la literatura existeixen pocs estudis de síntesi enzimàtica de D- β -hidroxi- α -aminoàcids catalitzades per D-treonina aldolases. En destaquen els treballs emprant D-TA procedents de *Xanthomonas oryzae*⁹⁹, *Arthrobacter sp.*,⁹¹ *Alcaligenes xylosoxidans*,^{80, 89, 105} *Pseudomonas sp.*¹⁸³ i la variant genèticament modificada Alanina racemasa Y265A de *Geobacillus stearothermophilus* (AlaRac Y265A).⁹⁵

No obstant, totes les D-treonina aldolases anteriors han exhibit activitats de baixa especificitat front els substrats, és a dir, activitats D-low-TA, a excepció de la D-TA procedent de la bactèria *Achromobacter xylosoxidans* (D-TA_{axy}), també coneguda com *Alcaligenes xylosoxidans* (IFO 12669). La D-TA_{axy} ha exhibit excessos diastereomèrics de fins a *d.e.* >99 %, ⁸⁰ sent el biocatalitzador entre les D-TA més prometedora descrites fins al moment.

3.1.1.1 ESTUDIS PREVIS DE LA PRODUCCIÓ DE D-TA_{axy}

L'enzim D-TA_{axy} fou per primera vegada clonat i expressat en el grup de Liu *et al.* (2000).⁸⁹ En aquest treball, la purificació de l'enzim es realitzà per precipitació fraccionada amb sulfat d'amoni seguit de cromatografia d'intercanvi aniònica (DEAE-Toyopearl) en tampó de 50 mM Tris/HCl (pH 7.0) enriquit amb 10 μM de fosfat de piridoxal (PLP) i 100 μM de MnCl₂. Seguidament, es dialitzà i es conservà a 4 °C, sense pèrdua d'activitat enzimàtica durant dos mesos -rang de temps estudiat-.

Tanmateix, cap tècnica de purificació enzimàtica fou aplicada en treballs sintètics amb D-TA_{axy}, on s'emprà el lisat del cru cel·lular directament com a biocatalitzador.^{80, 105}

3.1.1.2 ESTUDIS PREVIS DE SÍNTESI ASIMÈTRICA DIRECTA DE D-β-HIDROXI-α-AMINOÀCIDS AMB D-TA_{axy}

L'enzim D-TA_{axy} ha estat emprat en síntesi enzimàtica directa de D-β-hidroxi-α-aminoàcids a partir de l'addició de glicina a una col·lecció de benzaldehids i aldehids alifàtics de cadena llarga o α-halogenats.^{80, 105} L'enzim tolera diferents benzaldehids monosubstituïts amb excel·lents enantioselectivitats i elevades diastereoselectivitats (D-*sin*, *e.e.*'s >99 % i fins a *e.d.*'s de 99 %). En relació als aldehids α-halogenats i de cadena llarga, s'obtingueren majoritàriament els productes D-*sin*. Concretament amb l'isobutanal, es generà el corresponent adducte D-*sin* amb *de* >95 % a 25 °C (**Figura 3.1.1**).

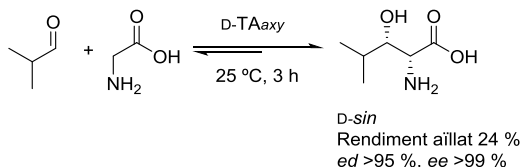


Figura 3.1.1. Addició aldòlica de glicina a isobutanal catalitzada per D-TA_{axy}. S'obtingué el producte aldòlic D-*sin* amb *e.d.* >95 % a 25 °C a les 3 hores de reacció.¹⁰⁵

Com s'ha remarcat en la introducció, un dels principals inconvenients de les TA és la baixa diastereoselectivitat en el C- β , sobretot a temps llargs de reacció. Generalment, sota condicions cinètiques de reacció, es generen productes aldòlics amb elevades diastereoselectivitats però amb rendiments baixos. Per contra, en condicions termodinàmiques, s'obtenen rendiments més elevats però amb diastereoselectivitats baixes.⁷⁹ Tanmateix, en estudis cinètics i termodinàmics realitzats per Fesko *et al.* (2008)⁸³ que la barrera d'energia d'epimerització *sin/anti* en el mecanisme catalític de D-TA_{oxy} és elevada. Com a conseqüència, aquest biocatalitzador és capaç de formar productes amb excel·lents diastereoselectivitats (*d.e.* >95 %) amb elevats rendiments sota condicions termodinàmiques.

3.1.2 OBTENCIÓ DE L'ENZIM D-TREONINA ALDOLASA d'*Achromobacter xylosoxidans* ADEQUAT PER APLICACIONS SINTÈTIQUES

En primer lloc, es dugué a terme un estudi de la purificació i estabilitat de l'activitat enzimàtica de D-TA_{oxy} vers el temps, a fi d'obtenir el biocatalitzador de forma eficaç per aplicacions sintètiques. Un dels objectius primordials fou l'obtenció de la màxima quantitat de proteïna en el menor nombre de passos possibles. D'aquesta manera, s'afavoreix tant a la conservació de l'activitat enzimàtica com es disminueixen els costos i temps de producció.

L'enzim D-TA_{oxy} fou clonat en el nostre laboratori a càrrec del Dr. Xavier Garrabou i amb la participació del Dr. Eduardo Busto (Universitat d'Oviedo).¹⁸⁴

Per a l'estudi de la purificació i estabilitat de l'enzim, s'expressà en primer lloc com a proteïna de fusió amb cua d'histidina en *N*-terminal (cua 6xHis) a fi de purificar-la per cromatografia de metalls immobilitzats (IMAC). Seguidament es purificà i conservà per diferents mètodes (**Apartat 3.1.2.1**). Tanmateix, vist els resultats poc favorables obtinguts, es procedí a purificar i/o emmagatzemar l'enzim per altres tècniques sense l'ús d'IMAC (**Apartat 3.1.2.2**). Finalment, s'expressà també l'enzim sense la cua d'histidines (D-TA_{oxyNoHis}).

Per a tots els casos, es valorà l'activitat D-treonina aldolasa de l'enzim vers el temps i en funció del mètode de purificació i/o emmagatzematge emprat (Veure **Secció experimental 5.7.4** per a la quantificació de proteïnes i en **5.7.6.1** per a la determinació de l'activitat de TA). Es consideren els valors d'activitat restant enzimàtica com a criteri de l'estabilitat i de la capacitat sintètica del biocatalitzador.

En la **Secció experimental** es detallen les tècniques de biologia molecular dutes a terme per a l'obtenció dels plasmidis D-TA_{oxy} i D-TA_{oxyNoHis} (**Apartat 5.5**) i en el

Material Suplementari S3.1 (Figures S1-S4 i Taula S1) es poden consultar les figures associades.

3.1.2.1 PURIFICACIÓ PER COLUMNA D'AFINITAT DE METALLS IMMOBILITZATS (IMAC)

El sistema de purificació per columna d'afinitat de metalls immobilitzats (IMAC) ha estat àmpliament emprat en el nostre grup de treball per les treonina aldolases L-SHMT_{sth} i L-TA_{eco}, atès que l'enzim es purifica eficaçment en tan sols un pas.^{86, 87, 185}

L'enzim D-TA_{oxy}, amb cua d'histidines en *N*-terminal, fou purificat per IMAC emprant també fosfat o també fosfat enriquit amb PLP i MnCl₂ (**Taula 3.1.1**) (Veure **Secció experimental 5.7.3.3**). Com s'ha vist en la introducció, el PLP i un catió divalent com Mn²⁺ són cofactors imprescindibles per a l'activitat catalítica de les D-TAs. Un cop eluït l'enzim, es requereix l'eliminació de l'imidazol. S'efectuà per precipitació de la proteïna amb sulfat d'amoni o bé diàlisi (**Taula 3.1.1**). A fi de comparar l'estabilitat de l'enzim, també es congelà l'enzim directament o bé es conservà a 4 °C, sense eliminar l'imidazol (mètode **4** i **5** respectivament, **Taula 3.1.1**).

En el **Material Suplementari S3.1 Figura S5** es troba inclòs el cromatograma de del pic pur de D-TA_{oxy} per IMAC i en la **Figura S6** es pot consultar el gel SDS-PAGE dels diferents passos de purificació de la proteïna seguint el mètode **6** (**Taula 3.1.1**).

Taula 3.1.1: Mètodes emprats per eliminar l'imidazol i/o emmagatzemar D-TA_{oxy} després de purificar per IMAC.

Purificació per IMAC	Mètode ^[a]	Tampó	Procediment	Emmagatzematge
	1	Fosfat-imidazol	Precipitar amb (NH ₄) ₂ SO ₄ al 80 % de saturació a 4 °C	4 °C
	2		Precipitar amb (NH ₄) ₂ SO ₄ al 40 % de saturació a 4 °C	
	3		Dialitzar	
	4		Congelar a -20 °C	-20 °C
	5		—	4 °C
	6	Fosfat-imidazol enriquit amb PLP i MnCl ₂ ^[b]	Dialitzar i liofilitzar	-20 °C

^[a]Veure la Secció experimental 5.7.3.4a. ^[b][PLP]: 10 µM i [MnCl₂]: 0.1 mM

En les **Taules 3.1.2 i 3.1.3** es mostren les activitats enzimàtiques específiques obtingudes en funció dels mètodes emprats (mètodes **1 a 5 Taula 3.1.2** i mètode **6 Taula 3.1.3**) respecte el temps.

Taula 3.1.2: Activitats enzimàtiques específiques de D-TA_{oxy} en funció dels mètodes de purificació i/o emmagatzematge aplicats després de purificar per IMAC a l'instant (0 dies) i al cap de dos dies.

Activitat enzimàtica específica^[a]/U·mg⁻¹ (% d'activitat restant)

Temps/dies	Mètodes				
	1	2	3	4	5
0 ^[b]	2.15 (100 %)				
2	0.22 (10 %)	0.85 (40 %)	0.00 (0 %)	0.03 (1 %)	1.66 (77 %)

^[a]Es defineix activitat enzimàtica específica (U·mg⁻¹) com la capacitat del enzim de convertir 1 µmol de D-treonina en acetaldehid per minut i mg D-TA_{oxy} a 25 °C. ^[b]A l'instant, després d'eluir D-TA_{oxy} de la columna.

Els resultats indicaren una pèrdua dràstica de l'activitat enzimàtica quan s'eliminà l'imidazol per precipitació de l'enzim amb sulfat d'amoni (pèrdua del 90 % i del 60 %, mètode **1 i 2** respectivament, **Taula 3.1.2**) i total quan es dialitzà

(mètode **3**, **Taula 3.1.2**) al cap de dos dies de la purificació per IMAC. En el cas de la precipitació, l'excés d'imidazol podria segrestar el catió divalent necessari pel centre actiu de l'enzim i ser més acusat si es precipita ràpidament (mètode **1**) que lentament (mètode **2**). La desactivació total de l'enzim per diàlisi podria estar causada també per la pèrdua del catió divalent i del PLP en el centre actiu. Respecte a conservar l'enzim congelat en presència de l'imidazol (mètode **4**, **Taula 3.1.2**), aquest es desactivà completament. Cal destacar que la pèrdua d'activitat és molt més pronunciada per a tots els mètodes respecte a l'enzim conservat a 4 °C dissolt en tampó fosfat-imidazol, mètode **5** (**Taula 3.1.2**), en el qual es conserva 77 % de l'activitat enzimàtica basal. No obstant, també es perdé completament l'activitat al cap d'una setmana (resultats no mostrats).

En canvi, emprant el mètode **6** l'enzim mantingué el 68 % de l'activitat enzimàtica després de dialitzar, liofilitzar i conservar a -20 °C durant 10 dies (**Taula 3.1.3** i **Secció experimental 5.7.3.4a**). En aquest mètode, s'utilitzà el tampó enriquit amb PLP i MnCl₂, és a dir, s'incubà la proteïna amb els cofactors prèviament a la purificació per IMAC. Entre els diferents metalls divalents, es seleccionà Mn²⁺ atès que és el catió amb el qual l'enzim D-TA *Arthrobacter sp.* ha presentat major activitat.¹⁸⁶ En la diàlisi també s'emprà el tampó enriquit amb els cofactors. Finalment, l'enzim es liofilitzà a fi d'obtenir D-TA_{oxy} de forma sòlida (**Taula 3.1.1**).

Tanmateix, es perdé aproximadament la meitat de l'activitat als 30 dies i gairebé la pèrdua fou total als 7 mesos (16 % d'activitat restant, **Taula 3.1.3**), impossibilitant la seva aplicació de forma fiable en síntesi.

Taula 3.1.3: Activitats enzimàtiques específiques de D-TA_{oxy} emprant el mètode **6** en funció del temps conservant l'enzim a -20 °C.

Activitat enzimàtica específica^[a]/U·mg⁻¹ (% d'activitat restant)

Mètode 6	Temps				
	0 ^[b]	10 dies	30 dies	2 mesos	7 mesos
	4.58 (100 %)	3.13 (68 %)	2.50 (55 %)	1.35 (29 %)	0.72 (16 %)

^[a]Es defineix activitat enzimàtica específica (U·mg⁻¹) com la capacitat del enzim de convertir 1 μmol de D-treonina en acetaldehid per minut i mg D-TA_{oxy} a 25 °C. ^[b]A l'instant, després d'eluir D-TA_{oxy} de la columna IMAC.

És interessant ressaltar que aquesta pèrdua d'estabilitat també fou observada amb l'enzim PLP dependent L-treonina aldolasa de *E. coli* (L-TA_{eco}) purificat per IMAC i precipitat amb sulfat d'amoni o bé dialitzat i liofilitzat.¹⁸⁵ Al cap de dos

mesos, l'enzim presentà una pèrdua del 40 % de l'activitat quan es precipità i conservà a 4 °C o del 60 % en el segon cas, conservat a -20 °C.

3.1.2.2 TRACTAMENT DE D-TA_{oxy} SENSE IMAC

Considerant els resultats anteriors, ens encaminarem cap altres procediments en els quals l'activitat específica es mantingués el màxim de temps possible. Aquests es basaren en conservar el sobrenedant obtingut de la lisis cel·lular congelat fins al seu ús (mètodes **7** i **8**), purificar l'enzim per precipitació (mètodes **9** i **10**), per precipitació seguit de diàlisi (mètode **11**) o bé liofilitzar directament (**Taula 3.1.4**). El tampó emprat en tots els casos fou el tampó fosfat enriquit amb PLP i MnCl₂ ajustat a pH 8. Només en els casos **7A**, **8** i **9** no s'addicionà cap cofactor en el tampó per tal de comprovar l'estabilitat de l'enzim en el lisat.

Taula 3.1.4: Mètodes emprats per purificar i/o emmagatzemar D-TA_{oxy} sense purificació per IMAC.

Mètode ^[a]	Procediment	Conservació	Additius
7	A	Congelar a -20 °C	—
	B		PLP i MnCl ₂ ^[b]
	C		PLP, MnCl ₂ ^[b] i DTT ^[c]
8	Congelar a -80 °C	-20 °C	—
9	Precipitar amb (NH ₄) ₂ SO ₄ al 40 % de saturació a 4 °C		—
10	A	Precipitar amb (NH ₄) ₂ SO ₄ al 20 % de saturació a 4 °C. Centrifugar i resuspendre en dissolució (NH ₄) ₂ SO ₄ 50 % saturada	PLP i MnCl ₂ ^[b]
	B		PLP, MnCl ₂ ^[b] i DTT ^[c]
11	A	Procediment mètode 9 i dialitzar	PLP i MnCl ₂ ^[b]
	B		PLP, MnCl ₂ ^[b] i DTT ^[c]
12	A	Liofilitzar	PLP i MnCl ₂ ^[b]
	B		PLP, MnCl ₂ ^[b] i DTT ^[c]

^[a]Veure la **Secció experimental 5.7.3.4b** ^[b][PLP]: 10 µM i [MnCl₂]: 0.1 mM ^[c][DTT]: 1 mM

A més, s'estudià l'efecte de l'agent reductor ditiotreitòl (DTT) en el tampó (mètodes **7C**, **10B**, **11B** i **12B**, **Taula 3.1.4**). En estudis previs publicats en la

literatura,¹⁸⁶ es tractà D-TA *Arthrobacter sp.* amb reactius específics de grups tiols com l'àcid *p*-cloromercuribenzoic (PCMB) i aquests inhibiren significativament l'enzim, suggerint la presència de residus de cisteïna en el centre actiu. Així, afegint DTT en els tampons, es reduïren els possibles ponts disulfurs presents, els quals poden influir en l'estructura, plegament i funció de la proteïna.

En les **Taules 3.1.5** i **3.1.6** es mostren les activitats enzimàtiques específiques obtingudes en funció dels mètodes esmentats **7** a **12** (**Taula 3.1.4**) respecte el temps. En la **Taula 3.1.5** es fa la selecció dels resultats pels mètodes **7A**, **8** i **9A**, en els quals no s'afegiren els cofactors PLP ni MnCl₂ en el tampó de lisis.

Taula 3.1.5: Activitats enzimàtiques específiques de D-TA_{oxy} en funció dels mètodes **7A**, **8** i **9A**, en funció del temps.

Activitat enzimàtica específica^[a]/U·mg⁻¹ (% d'activitat restant)

Temps/dies	Mètodes ^[c]		
	7A	8	9
0 ^[b]	1.33 (100 %)		
2	1.54 (115 %)	0.68 (51 %)	1.36 (100 %)
60	1.15 (86 %)	0.14 (10 %)	0.14 (10 %)

^[a]Es defineix activitat enzimàtica específica (U·mg⁻¹) com la capacitat del enzim de convertir 1 μmol de D-treonina en acetaldehid per minut i mg D-TA_{oxy} a 25 °C. ^[b]De l'extracte cru cel·lular després de la lisis.

L'activitat enzimàtica es conservà totalment als dos dies de la lisis del cru cel·lular conservant l'enzim congelat a -20 °C o purificant l'enzim per precipitació sense presència de cofactors en el tampó (mètodes **7A** i **9**, **Taula 3.1.5**). Així doncs, l'enzim demostrà ser més robust quan no es tracta per IMAC (Veure **Taula 3.1.2**, mètodes **2** i **4**). Als 60 dies (període de temps estudiat) l'enzim mantingué pràcticament tota l'activitat, el 86 %, conservant l'extracte cru congelat a -20 °C (mètode **7A**). En canvi, congelant a -80 °C (mètode **8**) o bé precipitant amb sulfat d'amoni (mètode **9**), l'activitat específica també disminuí al llarg del temps, inactivant-se gaire bé del tot al cap de dos mesos, amb una pèrdua del 90 % d'activitat.

Taula 3.1.6: Activitats enzimàtiques específiques de D-TA_{oxy} en funció dels mètodes **7, 10-12** en funció del temps.

Temps /dies	Activitat enzimàtica específica ^[a] /U·mg ⁻¹ (% d'activitat restant)								
	Mètodes								
	7A	7B	7C	10A	10B	11A	11B	12A	12B
0 ^[b]	2.05 (100%)			4.12 (100%)	4.49 (100%)	2.05 (100%)		2.50 (100%)	
10	1.06 (52%)	0.77 (37%)	1.25 (61%)	3.80 (92%)	4.38 (97%)	0 (0%)	0 (0%)	2.53 (123%)	2.44 (119%)
21	0.49 (24%)	0.80 (39%)	1.02 (50%)	6.82 (165%)	5.88 (131%)	—	—	2.71 (132%)	2.82 (138%)
38	—	—	—	5.31 (129%)	4.33 (97%)	—	—	2.54 (124%)	3.14 (153%)
90	—	—	—	—	—	—	—	2.95 (143%)	—
365	—	—	—	—	—	—	—	2.50 (122%)	—

^[a]Es defineix activitat enzimàtica específica (U·mg⁻¹) com la capacitat del enzim de convertir 1 μmol de D-treonina en acetaldehid per minut i mg D-TA_{oxy} a 25 °C. ^[b]De l'extracte cru cel·lular després de la lisis. — No determinada.

Respecte a la presència dels cofactors Mn²⁺ i PLP en el tampó, no es detectaren diferències significatives en les activitats enzimàtiques de D-TA_{oxy} dels crus conservats a -20 °C (mètodes **7A-C**, **Taula 3.1.6**). Respecte a aquests procediments, s'observaren valors no concordants entre resultats emprant el mateix mètode **7A** (86 % d'activitat restant als 60 dies, **Taula 3.1.5** i només 24 % d'activitat restant als 21 dies, **Taula 3.1.6**). La diferència entre ambdós podria estar causada per la diferent relació de volum de tampó per mg de proteïna que s'emprà en els dos experiments.

Respecte a la purificació de l'enzim per precipitació, no s'estudià el temps suficient per afirmar que la presència dels cofactors PLP i Mn²⁺ eren imprescindibles per l'activitat de D-TA_{oxy}. No obstant, la conservació completa de l'activitat específica als 38 dies (mètodes **10A-B**, **Taula 3.1.6**) en comparació a la desactivació quasi completa sense els additius (10 % d'activitat restant, mètode **9**, **Taula 3.1.5**) suggerí el requeriment d'aquests per a l'estabilitat de l'enzim.

L'avantatge principal de precipitar l'enzim és que permet purificar-lo parcialment de forma econòmica, senzilla i ràpida. No obstant, presentà incompatibilitats en les reaccions sintètiques d'interès. No fou possible la derivatització amb benziloxycarbonil (Cbz) de l'amina dels adductes aldòlics catalitzats per D-TA_{oxy} a causa de la formació de benziluretà per la presència del

catió amoni en el medi de reacció (Veure reacció de derivatització en **Secció experimental 5.8.3b**). Per tal de minimitzar aquesta interferència, es provà d'eliminar l'excés de sulfat d'amoni després de la precipitació (mètode **11, Taula 3.1.4 i 3.1.6**). No obstant, tot i la presència dels cofactors en el tampó de diàlisi, l'enzim es desactivà completament (mètodes **11A-B, Taula 3.1.6**). Doncs, en comptes d'eliminar l'excés d'amoni per contrarestar la incompatibilitat, fora interessant un estudi de precipitació de D-TA_{oxy} en presència d'una altra sal com el sulfat de potassi.

Respecte a l'addició de l'agent reductor DTT en el tampó, no representà cap diferència significativa en les activitats enzimàtiques específiques mesurades (**Taula 3.1.6**).

Finalment, liofilitzant directament el lisat en presència de PLP i MnCl₂ i conservant a -20 °C, l'enzim mantingué totalment la seva activitat en un any (mètode **12A-B, Taula 3.1.6**). Amb aquest mètode no es purificà l'enzim, però permeté disposar del biocatalitzador estable en forma sòlida i sense presentar reaccions secundàries en l'estratègia de síntesi d'interès. A més, es un procediment senzill, econòmic i ràpid.

Paral·lelament s'expressà D-TA_{oxy} com a proteïna recombinant sense cua d'histidina (D-TA_{oxyNoHis}). Es liofilitzà directament el lisat, en presència de PLP, MnCl₂ i DTT (mètode **12B, Taula 3.1.4**). El propòsit de l'eliminació de la cua d'histidines fou l'estudi de l'efecte d'aquesta en l'activitat enzimàtica de l'enzim. Podria ser que aquesta interferís en el plegament correcte de la proteïna i en la seva estabilitat, provocant una disminució en l'activitat enzimàtica. Per exemple, les histidines podrien formar un complex amb el metall Mn²⁺, present en el centre actiu.

El valor d'activitat específica obtingut un cop liofilitzat fou de 4.36 U·mg⁻¹ per D-TA_{oxyNoHis} i es mantingué estable durant 9 mesos (temps estudiat). Aquest valor d'activitat enzimàtica fou més elevat que l'obtingut amb D-TA_{oxy} (2.55 U·mg⁻¹, mètode **12B, Taula 3.1.1c**), requerint menys quantitat d'enzim per volum de reacció per a un mateix valor d'unitats. No obstant, no es pot afirmar que aquesta diferència en el valor de l'activitat enzimàtica estigui relacionada amb l'eliminació de la cua d'histidines.

3.1.2.3 ACTIVITAT ENZIMÀTICA ESPECÍFICA L- I D-TREONINA ALDOLASA DE D-TA_{axy} SEGONS EL MÈTODE DE PURIFICACIÓ EMPRAT

En vista dels resultats positius en l'activitat enzimàtica D-TA_{axy} del lisat liofilitzat (mètode **12A-B**) es determinaren les activitats enzimàtiques específiques L- i D-treonina. Atès que l'enzim prové de l'extracte cru sense purificar, es imprescindible conèixer el percentatge d'activitat basal L-treonina aldolasa vers la d'interès D-treonina. L'activitat L- prové de l'expressió del gen L-treonina aldolasa, constitutiu de *Escherichia coli*, bactèria emprada per a l'expressió de D-TA_{axy}. També s'assajaren D-TA_{axy} precipitada amb sulfat d'amoni (mètode **10A**) i l'enzim purificat per IMAC (mètode **6**). En la **Taula 3.1.7** es mostren els resultats obtinguts.

Taula 3.1.7: Activitats enzimàtiques específiques (U·mg⁻¹) D- i L- de D-TA_{axy} segons el mètode emprat **6**, **10B**, **12A-B**.

Activitat enzimàtica específica^[a]/U·mg⁻¹ (% d'activitat relativa)

	Mètode	Substrat	
		D-treonina	L-treonina
D-TA _{axy}	6	0.75 (100 %)	0.00 (0 %)
	10B	4.33 (95 %)	0.22 (5 %)
	12A	2.71 (89 %)	0.35 (11 %)
	12B	2.55 (91 %)	0.25 (9 %)
D-TA _{axyNoHis}	12B	4.48 (92 %)	0.40 (8 %)

^[a]Es defineix activitat enzimàtica específica (U·mg⁻¹) com la capacitat del enzim de convertir 1 μmol de substrat D- o L-treonina en acetaldehid per minut i mg de proteïna treonina aldolasa a 25 °C.

Com era d'esperar, la proteïna purificada per IMAC no tingué activitat L-treonina aldolasa (mètode **6**, **Taula 3.1.7**). La proteïna purificada parcialment per precipitació presentà un 5 % (mètode **10B**) d'activitat L-treonina i el cru liofilitzat directament, entre un 8 i 11 % (mètodes **12A-B**). Per tant, la diferència entre precipitar l'enzim o liofilitzar el lisat no representà una diferència significativa en la purificació de D-TA_{axy} respecte a L-TA_{eco}, presentant una diferència només del 3 % major d'activitat pel cas de l'enzim D-TA_{axyNoHis} (**Taula 3.1.7**).

En resum, es considerà el mètode **12A** (**Taula 3.6.1**) com al més òptim per a l'obtenció del biocatalitzador D-TA_{axy} per aplicacions sintètiques.

3.1.3 SÍNTESI ASIMÈTRICA DE D- β -HIDROXI- α -AMINOÀCIDS AMB D-TA_{oxy}

A continuació es dugué a terme l'estudi de les aplicabilitats sintètiques del biocatalitzador D-TA_{oxy} per a la síntesi directa asimètrica de D- β -hidroxi- α -aminoàcids. Convé recordar que la configuració absoluta del C- α dels productes aldòlics és fixa i independent de la naturalesa de l'aldehid.^{80, 82} Per contra, la configuració relativa *sin/anti* d'aquests sí depèn de la naturalesa de l'enzim, del substrat emprat i de les condicions de les reaccions, com la temperatura, medi de reacció i/o temps de reacció.

En primer lloc, s'avaluaren un conjunt d'aldehids seleccionats com a acceptors de la D-TA_{oxy}. A més, s'estudià l'efecte dels co-solvents en les diastereoselectivitats (**Apartat 3.1.3.1**). Seguidament l'estudi es centrà en l'optimització de la reacció d'addició aldòlica de glicina a 2,2-dimetoxiacetaldehid catalitzada per D-TA_{oxy} (**Apartat 3.1.3.2**).

En totes les reaccions s'emprà un pH òptim lleugerament bàsic (pròxim a 8) i els cofactors enzimàtics PLP i MnCl₂ o MgSO₄ en el medi de reacció, a fi de presentar la màxima activitat enzimàtica.^{89, 186}

3.1.3.1 ESTUDI D'ADDICIONS ALDÒLIQUES AMB ALDEHIDS ACCEPTORS SELECCIONATS I DE LA INFLUÈNCIA DEL MEDI DE REACCIÓ EN LES CONVERSIONS I DIASTEREOSELECTIVITATS

Es realitzà l'estudi de les addicions aldòliques a escala analítica de glicina a aldehids seleccionats, catalitzades per D-TA_{oxy} a fi de determinar la tolerància d'aquest biocatalitzador pels substrats d'interès i quantificar els rendiments de reacció i diastereoselectivitats. Els aldehids seleccionats foren: 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**), 3,3-dimetoxipropanal (**1b**), benziloxiacetaldehid (**1c**) i els *N*-Cbz-aminoaldehids *N*-Cbz-glicinal (**1d**), *N*-(*R/S*)-Cbz-alaninal (*(R/S)*-**1e**) i *N*-(*R*)-Cbz-etilglicinal (*(R)*-**1f**) (**Figura 3.1.2**).

Els aldehids **1a** i **1b** són hidrosolubles, doncs, el medi de reacció fou 100 % aquós. Tanmateix, els *N*-Cbz-aminoaldehids hidrofòbics seleccionats (**1c-e**) requeriren cert contingut de solvents orgànics a fi de permetre llur solubilitat. L'ús de sistemes d'emulsió i de co-solvent en catàlisi enzimàtica ha estat àmpliament estudiat en el nostre grup de recerca.^{87, 133, 187}

En aquests estudis s'observà que el medi de reacció constitueix una eina valuosa per al control de la estereoquímica dels productes aldòlics en reaccions catalitzades per treonina aldolases.

En el present treball s'emprà un medi d'emulsió amb elevat contingut d'aigua (H₂O/Hexadecà/C₁₄E₄ 90:6:4 (v/v/v)) i dos medis aquosos amb mínim volum dels co-solvents DMF (20 %) i AcOEt (10 %).

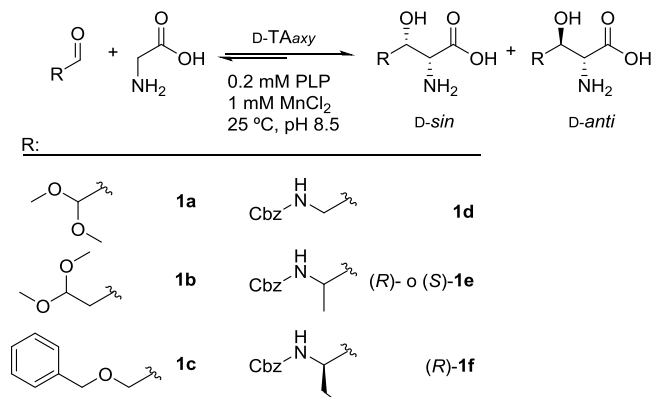


Figura 3.1.2. Esquema de les addicions aldòliques de glicina als aldehids seleccionats catalitzades per D-TA_{axy}.

Les reaccions es dugueren a terme a temperatura ambient. La concentració de glicina es disposà en defecte per a les reaccions amb els substrats **1a** i **1b** (0.77 eq.), ja que llurs adductes aldòlics requereixen la derivatització de l'amina per tal de poder ser detectats per HPLC (Veure **Secció experimental 5.8.3b**). En canvi, per **1c-f** s'emprà la glicina com a reactiu en excés (1.28 eq., veure **Secció experimental 5.9.1.1**) atès que és el substrat més econòmic, a fi d'afavorir el desplaçament de la reacció cap als productes aldòlics.

En la **Taula 3.1.8** es mostren els resultats obtinguts per a cada un dels substrats. Es detalla els medis de reacció emprats, les conversions aldòliques i les diastereoselectivitats. La metodologia per a l'assignació de la estereoquímica dels productes aldòlics obtinguts *sin/anti* s'exposa en l'**Apartat** següent **3.1.3.1.1** i els gràfics i cromatogrames dels seguiments de les reaccions s'inclouen en el **Material suplementari S3.1, Figures S7-S12**.

A grans trets, els resultats mostraren que els aldehids assajats **1a**, **1c**, **1d** i **(R/S)-1e** foren bons substrat de D-TA_{axy}, amb conversions d'acceptables a elevades (40-68 %). En canvi, les conversions per **(R)-1f** foren baixes, al voltant del 20 %, i pel **1b** no s'obtingué cap producte aldòlic (**Taula 3.1.8**).

Taula 3.1.8: Resultats obtinguts de les conversions aldòliques i els relacions diastereomèriques *sin:anti* (*d.r.*) de les addicions de glicina als aldehids seleccionats, catalitzades per D-TA_{oxy}.

Aldehid	Aldehid/ mM	Glicina/ mM	Medi de reacció ^[a]	Conversió/% ^[b] (temps de reacció)	<i>d.r.</i> ^[c] <i>sin:anti</i>
1a	90	70	a	50 (48)	90:10
1b	90	70	a	–	–
1c	70	90	b	45 (5)	78:22
		90	c	55 (5)	65:35
		90	e	68 (5)	74:26
1d	70	90	b	49 (5)	86:14
		90	c	54 (5)	89:11
		90	e	48 (5)	91:9
<i>(R)</i> - 1e	70	90	b	41 (48)	—:>97
		90	c	56 (48)	74:26
		90	e	32 (48)	65:35
<i>(S)</i> - 1e	70	90	b	17 (48)	—:>97
		90	c	55 (48)	>97:—
		90	e	11 (48)	26:74
<i>(R)</i> - 1f	70	90	b	20 (48)	—:>97
		90	c	17 (5)	27:73
		90	e	19 (48)	38:62

^[a] **a:** medi aquós; **b:** DMF/H₂O (1:4) v/v; **c:** AcOEt/H₂O (1:9) v/v; **e:** Emulsió amb alt contingut d'aigua: H₂O/hexadecà/C₁₄E₄ 90:6:4 (v/v/v). ^[b] Conversions aldòliques calculades a partir de les àrees dels pics obtinguts de cromatogrames de HPLC a les 5, 24 i 48 hores amb 20 U·mL⁻¹ D-TA_{oxy} (mètode **12B**) a escala analítica. S'indica en la taula els valors amb la relació conversió/excés diastereomèric més elevats en cada cas. Per a més informació, veure **Secció experimental Apartat 5.9.1.1 i Material suplementari S3.1 Figures S7-S12**. ^[c] Relacions diastereomèriques (*d.r.*) *D-sin/D-anti* corresponent als β-hidroxi-α-aminoàcids (Veure **Figura 3.1.2**). – Producte aldòlic no detectat per HPLC (límit de detecció 0.2-0.5 nmol).

Respecte als medis de reacció, en general, tant el sistema d'emulsió com de co-solvents, foren ben tolerats per l'enzim.

El 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**) presentà un màxim de conversió aldòlica de 50 % a temps llargs de reacció (48 hores) amb relació diastereomèrica *sin/anti* de 90:10 constant al llarg del temps (**Taula 3.1.8 i Material suplementari S3.1 Figura S7**). Atès l'interès sintètic de l'adducte aldòlic corresponent (2*R*,3*R*)-2-amino-3-hidroxi-4,4-dimetoxibutanoic (**Figura 3.1.3**), es dugué a terme

un estudi dels paràmetres de reacció per a maximitzar la conversió aldòlica i diastereoselectivitat (**Apartat 3.1.3.2**).

Quant a la resta d'aldehids (**1c-f**), els resultats suggeriren que el producte *sin* correspondria al diastereoisòmer afavorit cinèticament i l'*anti*, l'afavorit termodinàmicament. Segons el medi de reacció a un temps donat de reacció, es troba present més un o l'altre.

Els aldehids benziloxiacetaldehid (**1c**) i *N*-Cbz-glicinal (**1d**) presentaren perfils de reacció similars entre ells. A les 5 hores de reacció les relacions diastereomèriques foren acceptables (per exemple, *d.r.*: 74:26 per **1c**, en emulsió (**e**) i *d.r.*: 89:11 per **1d**, medi AcOEt/H₂O (1:9) (**c**), **Taula 3.1.8**) i les conversions arribaren al seu punt màxim (54 % per **1d** i 68 % per **1c**). A temps llargs de reacció (48 hores), l'excés diastereomèric disminuï afavorint el producte *anti*, mantenint els valors de conversió (*d.r.*: 62:39 per **1c** i *d.r.*: 86:14 per **1d**, **Material suplementari S3.1 Figura S8 i S9**). Per a l'acumulació de l'adducte *sin* de **1c**, les condicions de reacció més favorables foren en emulsió i a temps curts de reacció. En canvi, per l'acumulació del producte *sin* de **1d**, no s'observaren diferències significatives entre els medis de reacció, tant per les diastereoselectivitats o rendiments.

Respecte als substrats *N*-(*R/S*)-Cbz-alaninal ((*R/S*)-**1e**) i *N*-(*R*)-Cbz-etilglicinal ((*R*)-**1f**), s'evidencià una influència dràstica del medi de reacció en les diastereoselectivitats i/o conversions, sent més pronunciada pels enantiòmers (*R/S*)-**1e**. En medi de reacció AcOEt/H₂O (1:9) i en les emulsions a temps curts de reacció, les *d.r.* favorables foren generalment *sin* i disminuïren a temps llargs acumulant-se el producte termodinàmic *anti*. Per exemple, per (*R*)-**1f** en emulsió s'obtingueren *d.r.*: 76:24 a les 5 hores de reacció i *d.r.*: 38:62 a les 48 hores (**Material suplementari S3.1. Figura S12**. Per (*R/S*)-**1e**, veure **Figures S10 i S11**). Pel que fa a les conversions, foren més elevades en AcOEt/H₂O (1:9) i les més baixes en emulsió (**Taula 3.1.8**). En canvi, en medi de reacció DMF/H₂O (1:4), els productes afavorits foren l'*anti* amb *d.r.*: >97 a les 48 hores i amb conversió acceptable per (*R*)-**1e** (41 %) i baixes per (*S*)-**1e** i (*R*)-**1f** (~20%) (**Taula 3.1.8 i Material suplementari S3.1. Figures S10-12**). Aquest perfil de diastereoselectivitats segons els medis de reacció podria estar causada per les fases presents. En DMF/H₂O (1:4), totalment miscibles, la velocitat d'interconversió de producte cinètic a termodinàmic seria més elevada, afavorint l'acumulació del producte *anti*. En canvi, tant AcOEt/H₂O (1:9), com en emulsió, l'aldehid acceptor es distribuiria majoritàriament en la fase orgànica i els productes aldòlics preferentment es localitzarien en la fase aquosa, juntament amb l'enzim i el donador.

Pel que fa a les estructures dels aldehids, els resultats indicaren que quant més voluminós fou el substituent en la posició α respecte el carbonil, (CH_2CH_3 ((*R*)-**1f**) > CH_3 ((*R/S*)-**1e**) > H (**1d**)), les conversions aldòliques foren més baixes (**Taula 3.1.8**), probablement degut a impediments estèrics en el centre actiu amb els substituents. També n'hi podrien haver amb el substituent de la posició C- β de l'aldehid 3,3-dimetoxipropanal (**1b**), atès que no s'observà producte aldòlic de la reacció. D'altra banda, no s'observà diferenciació enantiomèrica per part de l'enzim pels substrats *N*-(*R/S*)-Cbz-alaninal ((*R/S*)-**1e**).

3.1.3.1.1 Assignació de la estereoquímica relativa dels productes *D-sin/D-anti*:

L'assignació de les configuracions relatives *D-sin/D-anti* dels productes aldòlics dels aldehids **1c** i (*R/S*)-**1e** es determinaren a partir de la informació proporcionada en estudis realitzats prèviament en el nostre grup de recerca sobre L-SHMT_{StH}.⁸⁷ Es compararen els temps de retenció d'HPLC aplicant les mateixes condicions d'elució en tots els casos (Veure **Material suplementari S3.1 Figures S13-S24**). La configuració absoluta dels productes β -hidroxi- α,ω -diaminoàcids obtinguts en l'anterior treball foren assignades inequívocament per RMN mitjançant l'obtenció de derivats de 2-oxazolidinones, amb les quals s'eliminà la lliure rotació dels enllaços C2 i C3, i gràcies a la presència d'un centre quiral conegut, procedent de l'aldehid de partida.⁸⁷

Pels aldehids **1d** i (*R*)-**1f** es pressuposà que segueixen el mateix perfil que els aldehids anteriors, és a dir, el producte cinètic correspon a *D-sin* i el termodinàmic, *D-anti*.

En el cas de (2*R*,3*R*)-2-amino-3-hidroxi-4,4-dimetoxibutanoic (**3a**), producte aldòlic de glicina a **1a**, es determinà la configuració absoluta per RMN per mitjà de la formació de la 2-oxazolidinona corresponent (Veure **Secció experimental 5.8.5** i **Material Suplementari S3.2 Figura S7**) i d'acord amb la premissa de que tant les L- com les D-treonina aldolases són altament selectives per a l'estereoquímica del C- α .^{80,82}

3.1.3.2 OPTIMITZACIÓ DELS PARÀMETRES DE LA REACCIÓ PER A L'OBTENCIÓ (2*R*,3*R*)-2-AMINO-3-HIDROXI-4,4-DIMETOXIBUTANOIC (D-*sin* **3a**)

Com s'ha mencionat en la introducció d'aquest capítol, l'adducte aldòlic (2*R*,3*R*)-2-amino-3-hidroxi-4,4-dimetoxibutanoic (D-*sin* **3a**, **Figura 3.1.3**) és especialment interessant com a intermedi clau en la síntesi de derivats polihidroxilats de l'àcid pìpecòlic i iminociclitols piperidínics (**Capítol 3.2**). A fi de maximitzar el rendiment de la reacció aldòlica de glicina a **1**, catalitzada per D-TA_{oxy}, estudiarem els següents paràmetres de reacció a partir dels resultats previs obtinguts (**Taula 3.1.8**). Es varià la temperatura, la concentració de glicina, la quantitat de D-TA_{oxy} i el pH del medi de reacció.

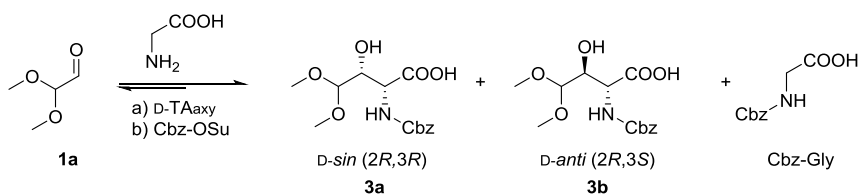


Figura 3.1.3. Esquema de l'addició de glicina a 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**) catalitzades per D-TA_{oxy} per a l'obtenció de (2*R*,3*R*)-2-amino-3-hidroxi-4,4-dimetoxibutanoic (**3a**). Es protegeix el grup amino dels adductes aldòlics amb el grup benziloxicarbonil per tractament amb Cbz-OSu.

Respecte a la temperatura, s'assajà la reacció a 4 °C i 25 °C. La proporció de diastereoisòmer *anti* respecte a *sin* foren similars a ambdues temperatures (*e.d.* 4 °C: 0.77 % i *e.d.* 25 °C: 0.71 a les 96 hores), doncs, la temperatura no mostrà tenir un efecte directe en la diastereoselectivitat de la reacció. No obstant, la conversió a 4 °C resultà ser la meitat que a 25 °C, a mateix temps de reacció (33 % a 4 °C i 60 % a 25 °C, a les 96 hores de reacció). Els gràfics es poden consultar en el **Material Suplementari S3.1, Figura S25**.

Pel que fa a la concentració del glicina, s'avaluà la reacció amb una relació de glicina en defecte o en excés respecte a l'aldehid ([Glicina]: 70 mM o 140 mM, [**1a**]: 115 mM, equivalents de glicina 0.6 o 1.2). La conversió fou més baixa amb la glicina en excés (44 %, 96 hores) respecte a la glicina en defecte (55 %, 96 hores) i els excessos diastereomèrics foren similars (*e.d.*: 0.7) (**Material Suplementari S3.1, Figures S26**). La diferència de concentració entre ambdós substrats amb la glicina en defecte (1.64 eq. **1a**, reactiu en excés) és major que amb la glicina en excés (1.22 eq. de glicina), doncs, afavorirà més el desplaçament de l'equilibri cap al producte en el primer cas. Atès que els productes d'aldòlics han de ser derivatitzats amb Cbz-OSu en el següent pas sintètic, que la glicina no consumida es derivatitza (Cbz-Gly) (**Figura 3.1.3**) i donat el baix cost de l'aldehid de partida, es determinà que el reactiu en excés fos **1a**.

Quan a la quantitat d'enzim, es valoraren la quantitat d'enzim de $20\text{-}50\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ D-TA_{oxy} per volum de reacció. Els resultats mostraren una conversió màxima a adducte aldòlic **3a** (68 %, a les 48 hores) amb l'addició $40\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ D-TA_{oxy} (**Material Suplementari S3.1, Figures S21c**).

Finalment, es valoraren les reaccions amb el medi de reacció ajustat a pH 7.5, 8.5 i a 9.5. A pH 7.5 la conversió a **3a** fou més baixa (46 %, a les 48 hores) respecte a pH 8.5 i 9.5 (~60 %, 48 hores)(**Material Suplementari S3.1, Figures S28**).

En resum, les millors condicions per a la reacció foren l'ús de **1a** amb una concentració de 115 mM, glicina de 70 mM, $40\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ D-TA_{oxy} amb el medi de reacció ajustat a pH bàsics (8-9), temperatura ambient (25 °C) i en presència dels cofactors PLP i MnCl₂. A les 96 hores de reacció s'obtingué una conversió a adducte aldòlic d'interès **3a** del 72 %, amb *e.d.*: 85 % (**Figura 3.1.4**).

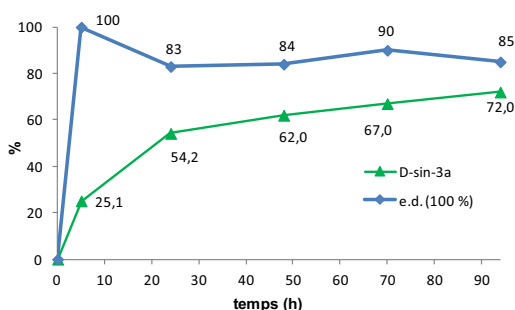


Figura 3.1.4. Representació gràfica de la conversió a adducte aldòlic **3a** i del *e.d.* de l'addició aldòlica de 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**) a glicina en funció del temps catalitzada per D-TA_{oxy}. Condicions: 200 µL volum total de reacció que conté glicina (70 mM), **1a** (115 mM), PLP (10 µM), MnCl₂ (0.1 mM), D-TA_{oxy} (8 U), pH 8.5 i a 25 °C. Conversions aldòliques calculades a partir de les àrees dels pics obtinguts de cromatogrames de HPLC.

3.1.4 CONCLUSIONS

En primer lloc, s'aconseguí obtenir la proteïna pura D-TA d'*Achromobacter xylooxidans* per tractament per IMAC seguit de diàlisi i liofilització amb l'ús de tampó enriquit amb els cofactors PLP i $MnCl_2$. Tanmateix, l'enzim perdé aproximadament la meitat de l'activitat enzimàtica als 30 dies de conservar-lo a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, impossibilitant la seva aplicació de forma fiable en síntesi. Seguidament s'establí que la forma més adient de tractar el lisat és incubar-lo amb PLP i $MnCl_2$ i liofilitzar directament. D'aquesta manera s'obtingué el biocatalitzador de forma ràpida i econòmica. L'enzim demostrà ser robust i estable, sense pèrdua d'activitat durant un any. Tot i que no està purificat, l'activitat L-treonina que posseeix és baixa i acceptable per aplicacions sintètiques, només de l'ordre d'un 10 % del total.

Respecte a la aplicabilitat sintètica del enzim, es demostrà la seva efectivitat per a sintetitzar D- β -hidroxi- α -aminoàcids, tolerant els aminoaldehids seleccionats **1c-f** amb conversions acceptables (de l'ordre del 20-70 %). La modulació de la selectivitat enzimàtica per enginyeria de la reacció, per mitjà de la variació dels medis de reacció, demostrà tenir uns efectes realment significatius en les diastereoselectivitats. Per exemple per *N*-(*R*)-Cbz-alaninal ((*R*)-**1e**) en DMF/ H_2O (1:4) s'obtingué el producte *anti d.r.*: >97 a les 48 hores de reacció. En canvi, en AcOEt/ H_2O (1:9) i en emulsió les *d.r. sin/anti* foren 74:26 i 65:35 respectivament, a mateix temps de reacció.

Tanmateix la millora substancial dels rendiments de reacció es podria aconseguir en un futur gràcies a l'aplicació d'enginyeria de genètica dirigida de la D-TA_{oxy}.

Finalment, s'estudià la reacció de l'addició de glicina a 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**) catalitzada per D-TA_{oxy}, aconseguint una conversió a adducte aldòlic d'interès D-*sin* de 72 % i *e.d.*: 0.85 a nivell analític.

3.2

**ALDOLASES EN ESTRATÈGIES TÀNDEM
QUIMIOENZIMÀTIQUES:
SÍNTESI DE DERIVATS POLIHIDROXILATS
DE L'ÀCID PIPECÒLIC I IMINOCICLITOLS
PIPERIDÍNICS I PIRROLIDÍNICS**

Els iminociclitols polihidroxilats són glicomimètics dels corresponents carbohidrats amb la mateixa configuració particular dels hidroxils i, generalment, inhibidors de la hidrolasa associada.

Com s'ha exposat en la introducció, nombrosos homoiminociclitols han estat preparats utilitzant procediments químics complexos, atrets per les seves propietats terapèutiques. En destaquen la 1-deoxinojirimicina (DNJ) i 1-deoxigalactonojirimicina (DGJ), ambdues iminoaldohexoses (**Figura 3.2.1**). Alhora, els compostos amb un o dos substituents hidroximetil, com α -homonojirimicina (α -HNJ), són de particular interès vist que aquest grup pot implicar alteracions en les capacitats i selectivitats d'inhibició (**Figura 3.2.1**).^{41, 188, 189}

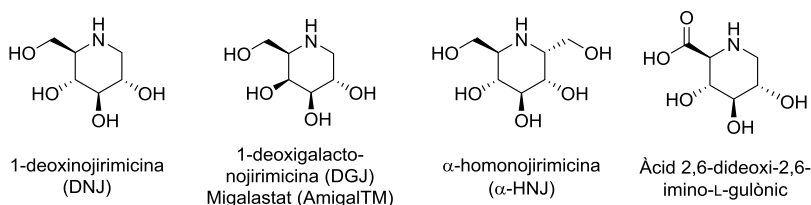


Figura 3.2.1. Exemples de compostos polihidroxilats piperidínics amb activitats biològiques interessants per a la indústria farmacèutica.

Altrament, els iminociclitols polihidroxilats amb un grup carboxil en C-2 són mimètics d'àcids urònics i, per tant, potencials inhibidors d'uronidases.¹⁹⁰⁻¹⁹² Per exemple, l'anàleg de l'àcid glucurònic (l'àcid 2,6-dideoxi-2,6-imino-L-gulònic, **Figura 3.2.1**) és un inhibidor de β -D-glucuronidasa i α -L-iduronidasa¹⁹³, amb propietats anti-VIH¹⁹⁴ i anticanceroses.¹⁹⁵ O bé, derivats amídics de l'àcid piperòlic tetrahidroxilats mostraren inhibicions competitives nanomolars de dues hexosaminidases *N*-acetil-glucosaminidases.¹⁹⁶

Per consegüent, es demostra que la presència d'altres grups funcionals, com carboxils o amides, també tenen un efecte en el mimetisme als carbohidrats i que aquest no es troba restringit només als grups hidroxils presents en els iminociclitols.¹⁹⁷

A més, derivats de l'àcid piperòlic són interessants sintons de pèptids biològicament actius, en els quals, la introducció d'addicionals grups hidroxils pot influir en la seva activitat i selectivitat.^{198, 199}

Així doncs, atès al creixent interès per aquests compostos trihidroxilats d'àcid piperòlic, s'han publicat en la literatura diverses rutes sintètiques.^{191, 192, 200-202}

No obstant, es segueixen requerint noves rutes que siguin curtes, senzilles,

econòmiques i d'elevat estereocontrol per tal d'accedir fàcilment a aquests compostos i poder elucidar llurs propietats farmacològiques.

Es presenten a continuació un conjunt d'estratègies innovadores tipus tàndem quimioenzimàtiques per a la síntesi d'iminociclitols pirrolidínics i piperidínics polihidroxilats a partir de substrats simples i aquirals.

3.2.1 ESTRATÈGIES TÀNDEM QUIMIOENZIMÀTIQUES PER A LA SÍNTESI D'IMINOCICLITOLS POLIHIDROXILATS

Les tres rutes biocatalítiques que es presenten a continuació han permès la síntesi d'una col·lecció de noves estructures de derivats polihidroxilats de l'àcid piperidínic, homioiminociclitols piperidínics i pirrolidínics a partir de substrats aquirals (**Figura 3.2.2**).

Aquestes estratègies es basaren en dues etapes claus d'addició aldòlica consecutives catalitzades per diverses aldolases. En la primera etapa clau biocatalítica s'empraren aldolases dependents de glicina, obtenint derivats d'àcid β -hidroxiamínics amb estereoquímica controlada. Llurs adductes aldòlics obtinguts es convertiren en els substrats de la segona etapa clau per mitjà de transformacions químiques senzilles. En les dues primeres (**Figura 3.2.2**), s'hidrolitzà l'acetal corresponent al substrat acceptor (**1a**) de la primera etapa clau. En la segona, també es reduí el grup carboxil a alcohol per tal d'ampliar la diversitat estructural dels productes finals. En la tercera ruta, es reduí el grup carboxil a aldehid corresponent al donador de la primera etapa, és a dir, de la glicina.

En la subsegüent etapa aldòlica clau, present en les tres vies, s'empraren les aldolases dependents de DHAP i la D-fructosa-6-fosfat aldolasa (FSA). Finalment, els productes finals d'estructura piperidínica o pirròlica s'obtingueren per mitjà de l'aminació reductiva dels adductes aldòlics obtinguts.

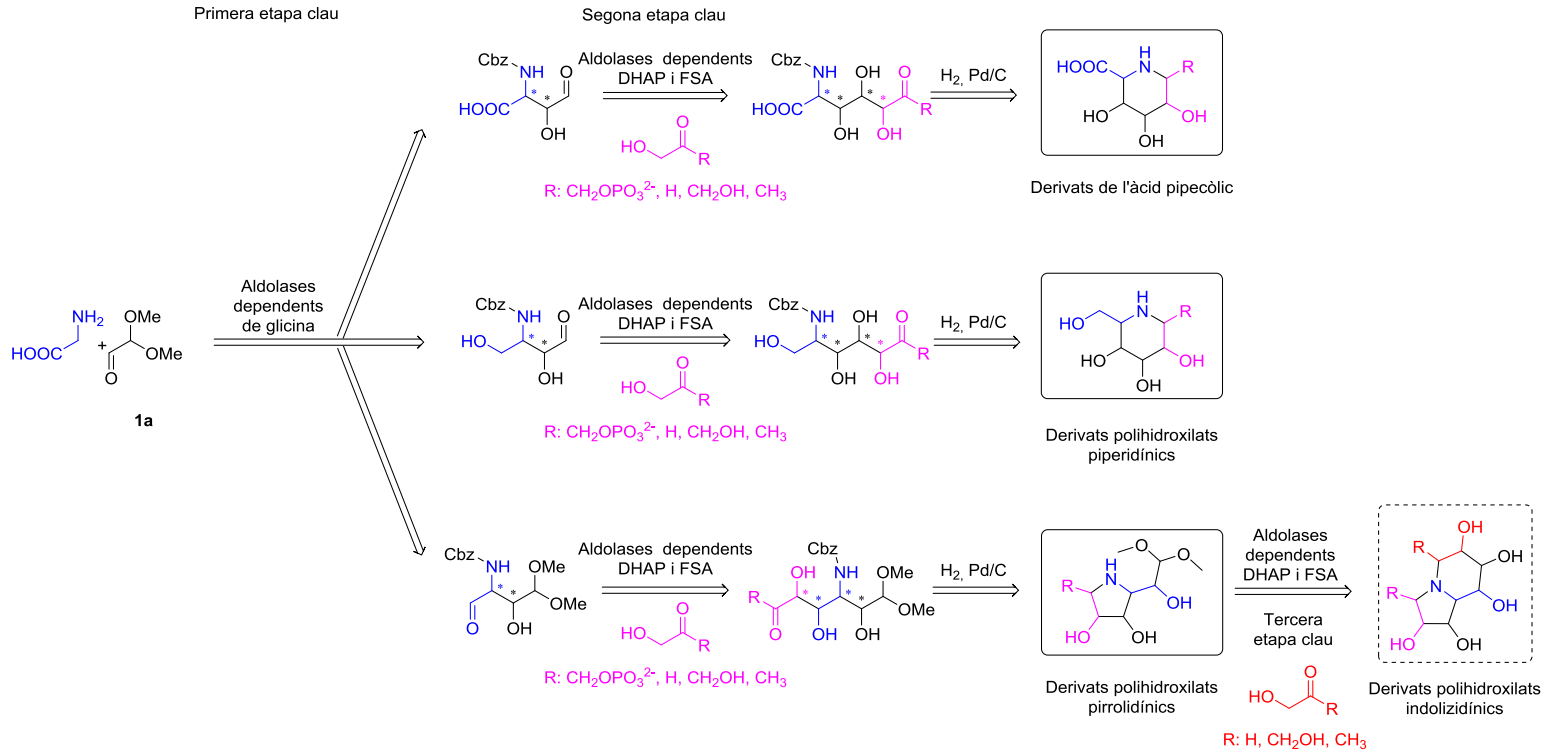


Figura 3.2.2. Esquema de les estratègies tàndem quimioenzimàtiques presentades per a la síntesi de derivats polihidroxilats de l'àcid pìpecòlic, homoiminociclitols piperidínics i pìrrolidínics a partir de substrats aquirals.

L'elongació de les cadenes de carboni de les rutes quimioenzimàtiques consistí en una seqüència $C_2+C_2+C_2$ (o C_3) gràcies a la combinació de diverses aldolases, on es generaren quatre centres estereogènics controlats enzimàticament a partir de substrats aquirals.

La tercera via podria ser ampliada amb una nova etapa aldòlica, també catalitzada per aldolases dependents de DHAP o FSA, a fi de sintetitzar derivats indolizidínics polihidroxilats. L'estratègia d'elongació completa seria de $C_2+C_2+C_2$ (o C_3)+ C_2 (o C_3), on el substrat acceptor de la darrera etapa aldòlica s'obtindria per la senzilla desprotecció de l'acetal de l'anell pirròlic (**Figura 3.2.2**). Tot i que aquesta darrera etapa no es dugué a terme en el present treball, posa de manifest el potencial sintètic de la ruta per obtenir derivats indolizidínics.

Així doncs, l'ús de les aldolases en estratègies tàndem quimioenzimàtiques és excepcionalment valuós i interessant per a generar estructures quirals polihidroxilades en pocs passos sintètics i sense necessitat de purificar els intermedis sintètics.

3.2.2 PRIMERA ETAPA BIOCATALÍTICA: SÍNTESI DIASTEREOSELECTIVA DE β -HIDROXI- α -AMINOÀCIDS MITJANÇANT ALDOLASES DEPENDENTS DE GLICINA

La primera etapa clau biocatalítica correspongué a l'addició de glicina al substrat bifuncional 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**) catalitzada per les aldolases dependents de glicina D-treonina aldolasa d'*Arthrobacter xylosoxidans* (D-TA_{axy})⁹¹ i la D-3-hidroxiaspartat aldolasa de *Paracoccus denitrificans* (D-HAA_{pde})⁹² amb activitat D-treonina aldolasa i L-serina hidroximetiltransferasa de *Streptococcus thermophilus* (L-SHMT_{sth})^{86, 87} i L-treonina aldolasa de *E. coli* (L-TA_{eco})⁸⁷ amb activitat L-treonina aldolasa.

D'aquesta manera s'obtingueren els adductes aldòlics β -hidroxi- α -aminoàcids amb diversitat configuracional i estereocomplementaris entre ells (**Figura 3.2.3**). Convé destacar que ambdós substrats de partida són comercials i molt econòmics (< 1€/g).

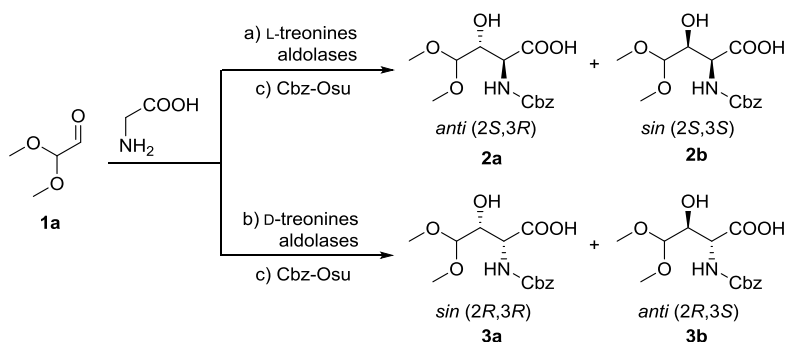


Figura 3.2.3. a) Addició aldòlica catalitzada per L-SHMT_{sth} o L-TA_{ecor}, aldolases amb activitat L-treonina b) Addició aldòlica catalitzada per D-TA_{oxy} o D-HAA_{pde}, aldolases amb activitat D-treonina; c) Protecció del grup amino amb Cbz-OSu.

Les condicions òptimes de reacció emprades per tal d'obtenir la màxima conversió a productes aldòlics pel biocatalitzador D-TA_{oxy} foren determinades en el **Capítol 3.1 (Apartat 3.1.3.2)**. Les mateixes condicions s'aplicaren per D-HAA_{pde}, atès l'elevada similitud entre ambdós enzims. Les condicions utilitzades per les aldolases dependents de glicina amb activitat L-treonina foren les descrites en treballs previs en el nostre grup de treball.⁸⁷ El medi de reacció fou aquós donada la completa hidrosolubilitat dels substrats de partida. Un cop completada les addicions aldòliques, s'extragueren els enzims dels medis de reacció per precipitació amb metanol i els adductes obtinguts foren derivatitzats amb el grup amino protector benziloxycarbonil (Cbz-)(Veure **Secció experimental 5.8.1.1a**). Aquest grup protector s'ha emprat àmpliament en el nostre grup i en estudis previs es determinà com el més adient respecte als *N*-protectors fenilacetil (PhAc), *tert*-butoxicarbonil (^tBoc) i 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc).^{128, 134, 203} La protecció del grup amino és imprescindible donada la incompatibilitat amb el grup aldehyd, que generaria la polimerització dels aminoaldehyds. Alhora facilita enormement la detecció dels compostos per UV i llurs purificacions.

Exemples de proves d'expressió i purificació dels enzims, així com de cromatogrames HPLC analític corresponents al seguiment de les addicions aldòliques, es mostren en el **Material Suplementari S3.2, Figures S1, S2, S4-6**.

Taula 3.2.1. Conversions i relacions diastereomèriques de les reaccions d'addició aldòlica de glicina a 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**) catalitzades per aldolases dependents de glicina.

Enzim	Conversió /% ^[a]	<i>d.r.</i> <i>anti/sin</i> ^[a]	Rendiment /% ^[b]	Rendiment aïllat /% ^[c]
L-SHMT _{sth}	76	98:2	72	69
L-TA _{eco}	54	28:72	–	–
D-TA _{axy}	70	5:95	62	np
D-HAA _{pde}	60	44:56	52	35(<i>anti</i>):31(<i>sin</i>)

^[a]Conversions a productes aldòlics i relacions diastereomèriques (*d.r.*) (*anti/sin*) a escala analítica determinades per HPLC dels corresponents derivats de Cbz. ^[b]Quantitat dels productes aldòlics *N*-Cbz derivatitzats en els crus de reacció després d'efectuar el *work-up* del cru de reacció. Els crus de reacció contenen *N*-Cbz-Glicina com a impuresa majoritària. ^[c]Rendiment aïllat dels productes aldòlics *N*-Cbz derivatitzats determinats per la purificació d'una fracció dels crus de reacció (Veure **Secció experimental 5.10.1**). **np**: no purificat. – no escalat.

Els biocatalitzadors seleccionats demostraren tenir bona tolerància vers l'aldehid acceptor (**1a**), obtenint conversions amb valors de moderats a bons (54-76 %, **Taula 3.2.1**). Es reafirmà l'amplia tolerància de les aldolases dependents de glicina per a substrats no naturals i voluminosos en el C- α .^{79, 82}

Les configuracions absolutes dels productes foren assignades inequívocament per RMN mitjançant l'obtenció de derivats d'oxazolidinones dels adductes aldòlics **2a**, **3a** i **3b** (Veure **Material Suplementari S3.2 Figura S7** i **Secció experimental 5.8.5**). Els enzims L-TA_{eco} i D-HAA_{pde} donaren mesclures epimèriques en C-3, doncs les aldolases dependents de glicina presenten generalment diastereoselectivitat baixa en el C- β .^{80, 83, 92, 204}

La relació diastereomèrica *anti/sin* exhibida per L-TA_{eco} fou acceptable (*d.r.*: 28:72) tot i que amb una conversió moderada (54 %) (**Taula 3.2.1**). Si bé, aquests valors podrien ser optimitzats modificant les condicions de reacció.⁸⁷

L'addició aldòlica catalitzada per D-HAA_{pde} no fou diastereoselectiva. Els adductes aldòlics presents en la mescla racèmica foren aïllats del cru de reacció de manera eficient per HPLC semi-preparatiu, obtenint els rendiments aïllats de 31 % (*sin*, **3a**): 35 % (*anti*, **3b**) (**Taula 3.2.1**)(Veure **Secció experimental 5.10.1.2**). Cal remarcar que fins al moment no s'havien publicat en la literatura aplicacions sintètiques d'aquest enzim.

En canvi, L-SHMT_{StH} i D-TA_{oxy} foren altament diastereoselectives (**e.d.** >95 %) amb conversions de reacció elevades (70-76 %). Les dues aldolases rendiren els adductes aldòlics majoritaris **2a** (2*S*,3*R*) i **3a** (2*R*,3*R*), respectivament (**Taula 3.2.1**). Doncs, els valors obtinguts amb D-TA_{oxy} i L-SHMT_{StH} representen dels pocs exemples presents en la literatura amb diastereoselectivitats i rendiments elevats amb aldolases dependents de glicina.

Per consegüent, les quatre aldolases dependents de glicina seleccionades varen permetre la síntesi dels quatre possibles estereoisòmers de l'àcid 2-amino-3-hidroxi-4,4-dimetoxibutanoic (**2a-b**, **3a-b**) (**Figura 3.2.3**). S'assolí així el primer objectiu en la primera etapa biocatalítica, és a dir, accedir a la màxima estereodiversitat possible dels nous centres quirals generats.

Com a prova de concepte de la síntesi de derivats polihidroxilats de l'àcid pipecòlic i homioiminociclitolos piperidínics, es varen seleccionar els adductes aldòlics **2a** i **3a** com a intermedis sintètics per a la segona etapa biocatalítica (**Apartats 3.2.3** i **3.2.4**). Per a la síntesi de derivats polihidroxilats pirrolidínics, es seleccionà l'intermedi **2a** (**Apartat 3.2.5**).

3.2.3 SÍNTESI DE DERIVATS POLIHIDROXILATS DE L'ÀCID PIPECÒLIC

En la **Figura 3.2.4** es presenta l'esquema sintètic dels derivats polihidroxilats de l'àcid pipecòlic. Un cop obtinguts els adductes aldòlics de la primera etapa enzimàtica (**2a** i **3a**), s'obtingueren els aldehids acceptors segona etapa aldòlica clau per hidròlisi àcida del l'acetal (**Apartat 3.2.3.1**). La segona addició aldòlica es catalitzada per les aldolases DHAP-dependents de *E.coli*, L-fuculosa-1-fosfat aldolasa (FucA_{wt} o variants) i L-rhamnulosa-1-fosfat aldolasa (RhuA_{wt}) i per l'aldolasa FSA (FSA_{wt} o variants). La FSA presenta l'avantatge d'acceptar diversos donadors, com la hidroxiacetona (HA), dihidroxiacetona (DHA) i glicolaldehid (GO).

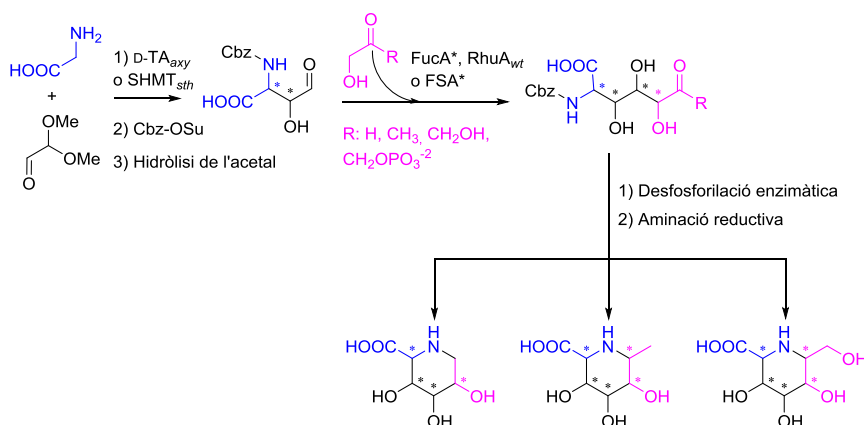


Figura 3.2.4. Esquema de l'estratègia quimioenzimàtica proposada per a la síntesi de derivats polihidroxilats piperidínics. FucA*: FucA_{wt} i variants. FSA*: FSA_{wt} i variants.

La finalitat principal fou l'obtenció d'una col·lecció de compostos polihidroxilats piperidínics amb diversitat configuracional i estructural, donada l'estereoquímica complementària i diferent de les tres aldolases dependents de DHAP i FSA i als diversos donadors utilitzats.

En els **Apartats 3.2.3.2-3** es dugué a terme l'estudi a nivell analític de les addicions aldòliques a fi de seleccionar les millors condicions de reacció i/o els biocatalitzadors més adients per als escalats dels precursors dels derivats polihidroxilats de l'àcid pipecòlic (**Apartat 3.2.3.4**).

3.2.3.1 OBTENCIÓ DELS ALDEHIDS SUBSTRAT DE LA SEGONA ETAPA BIOCATALÍTICA

Els aldehids substrat de la segona etapa biocatalítica **2d** i **3d** (**Figura 3.2.5**) s'obtingueren per hidròlisi àcida de l'acetal dels adductes *N*-Cbz-**2a** i **3a**, respectivament (Veure **Material Suplementari S3.2. Figura S8** i **Secció experimental Apartat 5.10.3**).

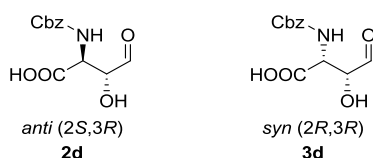


Figura 3.2.5. Aldehids substrats seleccionats per la segona etapa clau biocatalítica, els àcids *N*-Cbz-2*S*,3*R*) i (2*R*,3*R*)-3-hidroxi-4-oxo-butanonic (**2d** i **3d**).

El subproducte majoritari observat en HPLC correspon a *N*-Cbz-Glicina (Cbz-Gly), provinent de l'excés de glicina emprada com donador en la primera etapa enzimàtica, i el qual no interfereix en la següent addició aldòlica. També

s'observaren petites quantitats dels aminoaldehids protegits corresponents als productes aldòlics minoritaris **2b** i **3b** (<5 %), entre altres impureses, però, es consideraren menyspreables en comparació als aldehids desitjats **2a** i **3a** (>95 %).

Per tant, s'empraren els aldehids **2d** (*anti*) i **3d** (*sin*) directament, sense cap purificació intermèdia, simplificant així el nombre de passos entre ambdues reaccions d'addició aldòlica enzimàtiques. El rendiment aïllat d'ambdós productes **2d** i **3d** fou de 56 i 50 % respectivament, en relació a la glicina de partida.

3.2.3.2 ESTUDI A NIVELL ANALÍTIC DE LES ADDICIONS ALDÒLIQUES CATALITZADES PER ALDOLASES DEPENDENTS DE DHAP

Es dugué a terme un estudi preliminar a escala analítica de les addicions aldòliques de DHAP als aldehids **2d** i **3d** catalitzades per les aldolases RhuA i FucA (**Figura 3.2.6**). S'estudiaren els enzims nadius i les variants de FucA F131A i FucA F131A/F206A. Les variants de FucA foren dissenyades i estudiades en el nostre grup de recerca.^{123, 124} Addicionalment es provà com a donador DHA en presència de tampó borat sòdic. Es genera *in situ* un mimètic de la DHAP per la formació de l'èster entre el borat i la DHA (DHA-Borat).¹²⁰ Els resultats es mostren en la **Taula 3.2.2**.

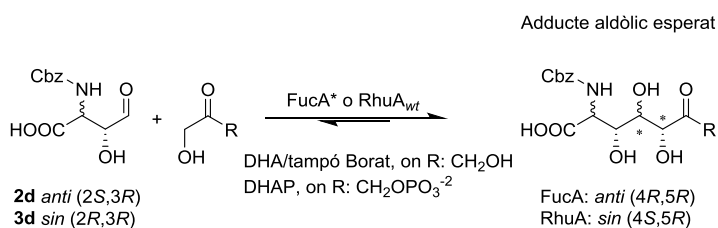


Figura 3.2.6. Esquema de les addicions aldòliques entre els aldehids **7** i **8** amb les aldolases dependents de DHAP FucA_{wt}, FucA F131A, FucA F131A/F206A i RhuA_{wt}.

Taula 3.2.2. Conversions a adducte aldòlic de les adicions aldòliques a escala analítica de DHAP o DHA-Borat als aldehids **2d** i **3d** catalitzades per RhuA, FucA, FucA F131A i FucA F131A/F206A.

Aldehid	Donador	Enzim	T/ °C	Conversió/ % ^[a]
2d	DHAP	FucA _{wt}	25	20
		FucA F131A	25	51
			4	26
		FucA F131A/F206A	25	—
	RhuA _{wt}	—		
DHA-Borat sòdic	RhuA _{wt}		—	
3d	DHAP	FucA _{wt}	25	25
		FucA F131A	25	42
			4	13
		FucA F131A/F206A	25	16
	RhuA _{wt}	—		
DHA-Borat sòdic	RhuA _{wt}		—	

^[a]Conversions aldòliques calculades a partir de les àrees dels pics obtinguts de cromatogrames de HPLC després de 24 hores de reacció a escala analítica, emprant 3.0 mg·mL⁻¹ de FucA_{wt} o variants i 0.7 mg·mL⁻¹ de RhuA_{wt}, per volum de reacció. [**2d** o **3d**]: 50 mM; [DHAP o DHA]: 80 mM. [Borat sòdic]: 200 mM. (Veure **Secció experimental 5.9.2**). —: Producte aldòlic no detectat.

Les conversions més elevades resultaren amb la variant FucA F131A, 42 % de producte aldòlic amb **3d** i 51 % amb **2d**, a les 24 hores de reacció (**Taula 3.2.2**). Els perfils d'ambdues reaccions respecte el temps s'inclouen en el **Material Suplementari Figura S8**. Com s'ha demostrat en estudis previs, la modificació F131A és clau per a l'acceptació dels aldehids amb substituents voluminosos en C- α . Tanmateix, la doble modificació F131A/F206A no millorà les conversions de reacció.¹²⁴

Respecte a les reaccions amb RhuA, cap dels dos aldehids foren substrats de l'enzim, ni amb DHAP o DHA-borat. Els resultats concorden amb els de la literatura, on els substrats fosforilats o aniònics (per exemple D- i L- gliceraldehid fosfat o l'àcid glioxilic) no són tolerats per la RhuA_{wt}.²⁰⁵⁻²⁰⁷

En relació a la temperatura de reacció, en treballs previs s'observà un increment de les conversions aldòliques a temperatures baixes (4 °C) amb l'enzim FucA F131A.¹²⁴ No obstant això, en aquest cas, les conversions obtingudes pels substrats **2d** i **3d** foren més baixes a 4 °C (26 % i 13 %, respectivament, **Taula 3.2.2**).

Així doncs, es seleccionà la variant FucA F131A com la més adient per a escalar els productes finals derivats de l'àcid pìpecòlic **8a-c** a 25 °C (**Apartat 3.2.3.4**).

3.2.3.3 ESTUDI A NIVELL ANALÍTIC DE LES ADDICIONS ALDÒLIQUES CATALITZADES PER D-FRUCTOSA-6-FOSFAT ALDOLASA (FSA)

Es realitzà l'estudi a nivell analític de les addicions aldòliques de DHA, HA i GO a **2d** i **3d** catalitzades per diferents variants de FSA, inclòs l'enzim natiu, a fi de seleccionar els biocatalitzadors més adients (**Figura 3.2.7**).

Les aldolases es seleccionaren d'una col·lecció de variants de FSA, tenint en compte les propietats sintètiques conegudes de cada una. Totes les variants foren dissenyades, expressades i estudiades prèviament o paral·lelament al transcurs del present treball en el nostre grup de recerca.^{141, 148, 151, 153, 154} Els resultats es mostren en la **Taula 3.2.3**.

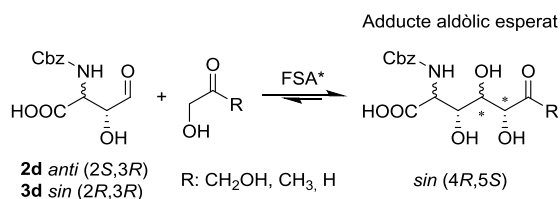


Figura 3.2.7. Esquema de les addicions aldòliques de DHA, HA o GO als aldehids **2d** i **3d**, catalitzades per FSA nativa o variants.

Taula 3.2.3. Conversions a adducte aldòlic de les adicions aldòliques a escala analítica de DHA, HA o GO als aldehids **2d** i **3d** catalitzades FSA nativa o variants.

		Conversió/ % ^[a] (temps de reacció)					
Donadors:		DHA		HA		GO	
Aldehids:		2d	3d	2d	3d	2d	3d
Variants de FSA	Nativa	27	8	>99	90	19	10
	A129S	99 (24h)	73	–	93	–	–
	A129S/A165G	–	60	–	90	–	–
	S166G	–	85	>99	91	pnd	85
	A129S/A165G/S166G	91	97	95	–	pnd	40
	A129G	80	51	–	–	98 (24h)	90
	A129G/S166G	71	46	–	–	98 (24h)	90
	L107Y/A129G	–	–	–	–	63	71
	L107Y/A129G/A165G	–	–	–	–	21	34

^[a]Conversions aldòliques calculades a partir de les àrees dels pics obtinguts de cromatogrames de HPLC després de 48 hores de reacció (o 24 hores, indicat en els casos corresponents) a escala analítica (Veure **Secció experimental 5.9.3.1**). – no assajat; **pnd**: producte aldòlic no detectat.

Com es conegut, l'ordre d'afinitat pels donadors de l'enzim natiu és HA>>>GO>DHA.¹¹⁰ En efecte, amb FSA_{wt} i el donador HA, s'obtingueren valors de conversió quantitativs amb els substrats **2d** i **3d**. Pels donadors DHA i GO, però, la modificació en l'enzim en la posició A129 resultà clau i imprescindible, amb plena concordança amb resultats anteriors en el nostre grup d'investigació.¹⁵¹

Ahora, els resultats suggeriren que **2d** presenta una qualitat superior com a substrat de la FSA respecte **3d**, atès que les conversions foren més elevades pel primer amb els diferents donadors i variants de l'enzim (**Taula 3.2.3**). La única diferència entre ambdós substrats rau en la configuració del C-2, és a dir, en l'orientació del grup carboxil en el centre actiu de l'enzim.

En les reaccions amb DHA, la variant FSA A129S incrementà enormement les conversions per aquest donador. Amb l'enzim natiu els rendiments foren de 27 % per **2d** i 8 % per **3d** i amb la variant simple s'obtingueren conversions quantitatives per **2d** i de 73 % per **3d**. Finalment, gràcies a la variant FSA A129S/A165G/S166G, s'aconseguien rendiments quantitativs per **3d**, pel qual la modificació clau és S166G. Aquest fet es dedueix donades les conversions més baixes obtingudes amb la variant FSA A129S/A165G (60 %), respecte les obtingudes amb FSA A129S (73 %) o FSA S166G (85 %). Així, l'efecte sinèrgic positiu en FSA A129S/A165G/S166G (98 %) resultaria de la combinació de les modificacions A129S i S166G (**Taula 3.2.3**).

Com s'ha exposat en la introducció (**Apartat 1.2.4.3**), la modificació A165G genera espai en el centre actiu, permetent encabir aldehids més voluminosos.¹⁵³

En la mateixa direcció s'introduí la modificació S166G, la qual es discutirà en profunditat en el següent **Capítol 3.3**. El disseny de la variant triple FSA A129S/A165G/S166G però, es realitzà un cop els escalats dels productes ja havien estat realitzats amb FSA A129S.

Quant al donador GO, la variant FSA A129G proporciona les conversions més elevades. La modificació de A165 per una glicina, augmentà enormement l'afinitat per aquest donador,¹⁴¹ incrementant les conversions de tan sols 10-19 % a valors quasi bé quantitativs (90-98 %, **Taula 3.2.3**). En canvi, amb les variants FSA L107Y/A129G i FSA L107Y/A129G/A165G les conversions foren més baixes (21-71 %). Si bé, aquestes variants havien exhibit excel·lents resultats en addicions de GO a *N*-Cbz-aminoaldehids amb substituents en el C- α (Veure **Capítol 3.3**).¹⁴¹

Per a tot això, es seleccionaren l'enzim FSA natiu per a les reaccions amb HA, FSA A129S per DHA i FSA A129G per GO com els biocatalitzadors més adients per a escalar els productes finals derivats de l'àcid pipecòlic **8d-k** (**Apartat 3.2.3.4**).

3.2.3.4 ESCALATS I CARACTERITZACIÓ DELS DERIVATS POLIHIDROXILATS DE L'ÀCID PIPECÒLIC

Gràcies als bons resultats exhibits per les aldolases dependents de DHAP i FSA en la segona etapa clau, es procedí a escalar a nivell semi-preparatiu els corresponents productes aldòlics **4-7** a partir dels aldehids **2d** i **3d**. L'objectiu principal fou l'obtenció de 35-150 mg dels derivats polihidroxilats de l'àcid pipecòlic **8a-k** (Veure **Figura 3.2.8**).

En la **Taula 3.2.4** es mostren les conversions enzimàtiques obtingudes a adductes aldòlics obtinguts **11-14**. Els biocatalitzadors seleccionats i les condicions de reacció foren determinades d'acord amb els resultats obtinguts a nivell analític (**Apartats 3.2.3.2** i **3.2.3.3**).

Taula 3.2.4: Conversions i relacions diastereomèriques dels adductes aldòlics **4-7** obtinguts a escala semi-preparativa mitjançant aldolases dependents de DHAP i FSA.

Enzim	Producte	Conversió/ % ^[a]	<i>d.r.</i> <i>anti:sin</i> ^[b]
FucA F131A	4	44	>97:—
	5	46	>97:—
FSA A129S	6a	87	—:>97
FSA _{wt}	6b	95	—:>97
FSA A129G	6c	65	—:>97
FSA A129S	7c	98	—:>97
FSA _{wt}	7b	99	—:>97
FSA A129G	7c	78	—:>97

^[a] Conversions aldòliques calculades a partir de les àrees dels pics obtinguts de cromatogrames de HPLC quan no s'observa un canvi apreciable en la concentració del producte mesurat (24-72 hores). Per a més informació, veure **Secció experimental Apartats 5.10.5** i **5.10.6**. ^[b] Relacions diastereomèriques (*d.r.*) *anti:sin* corresponent al nou enllaç C4-C5 generat, *anti* (4*R*,5*R*):*sin* (4*R*,5*S*). (Veure **Figura 3.2.8**).

Les conversions a adductes aldòlics foren moderades per la FucA (44-46 %), bones amb FSA i GO (65-78 %) i excel·lents amb FSA i DHA o HA (87-99 %) (**Taula 3.2.4**). Alhora, les diastereoselectivitats mostrades per ambdós enzims foren excel·lents, obtenint exclusivament el producte aldòlic *anti* per la FucA F131A i *sin* per FSA. Els cromatogrames HPLC del seguiment de la formació dels productes **6-7** es troben inclosos en el **Material Suplementari S3.2 Figures S10** i **S11**.

Tot seguit, es dugué a terme la hidròlisi quantitativa de l'enllaç fosfoester dels adductes **4** i **5** mitjançant una fosfatasa àcida (Cromatogrames del seguiment de la reacció disponibles en el **Material Suplementari S3.2 Figura S9**) i, a continuació, tots els adductes aldòlics (**4-5** desfosforilats i **6-7**) foren purificats per HPLC semi-preparatiu en fase reversa (Veure **Secció experimental apartats 5.10.4** i **5.10.6**).

Finalment, les fraccions pures de cada un dels adductes aldòlics sotmeteren a la desprotecció del grup *N*-Cbz i la subsegüent aminació reductora amb H₂ en presència de Pd/C en un únic pas. Els compostos piperidínics (**8a-k**) es varen obtenir de forma ràpida, neta i amb valors quantitius en aquest darrer pas. En la **Figura 3.2.8** es presenta l'esquema sintètic complet d'aquests compostos a partir dels substrat aquirals de partida.

Les caracteritzacions per RMN dels compostos **8a-k** s'adjunten en el **Material Suplementari S3.2 Figures S16-S23**. Pels productes purs respecte C-6 (no són mesclades epimèriques) es proporcionen els valors de les rotacions òptiques específiques (**Material Suplementari S3.2 Taula S2**). La síntesi detallada de cada un (**8a-k**) es pot consultar en el **Material Suplementari S5**.

Gràcies a la caracterització dels compostos, s'afirma que els biocatalitzadors emprats foren totalment diastereoselectius en la generació dels aldols **4-7** (Veure **Taula 3.2.4**).

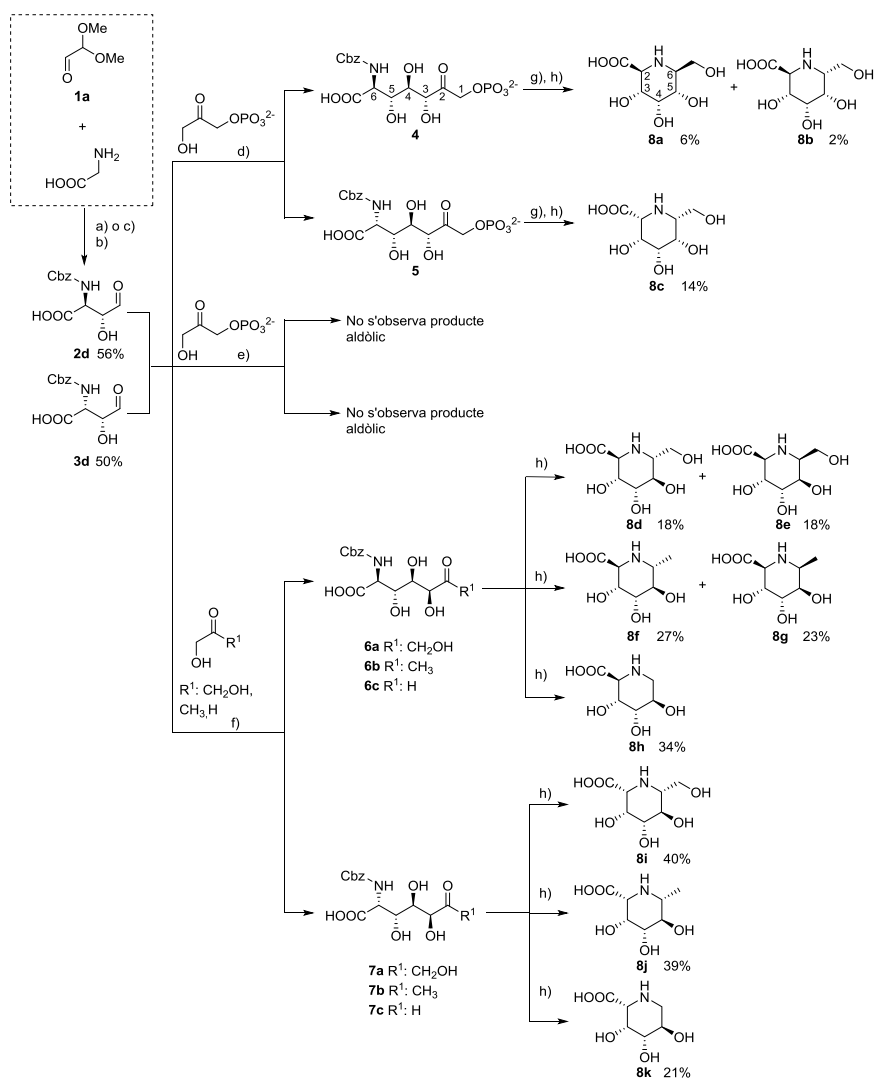


Figura 3.2.8. Esquema sintètic complet de derivats de l'àcid piperidí polihidroxilat en múltiples passos quimioenzimàtics amb dues etapes de reaccions aldòliques clau catalitzades per aldolases a partir de substrats aquirals. a) SHMT_{StH}; b) 1: Cbz-OSu; 2: CH₃CN/aquós HCl, 60 °C, 1h; c) D-TA_{oxy}; d) FucA F131A; e) RhuA_{wt} f) FSA A129S per R¹: CH₂OH, FSA_{wt} per R¹: CH₃, FSA A129G per R¹: H; g) fosfatasa àcida; h) H₂, Pd/C. S'indica el rendiment aïllat de cada producte (%) obtingut respecte la glicina, substrat limitant de partida.

Respecte al curs estereoquímic en l'aminació reductora, s'observà que aquest depèn de la configuració dels compostos intermedis. Pels adductes aldòlics amb configuració *sin* (5*R*,6*R*), **5** i **7a-c**, la hidrogenació es donà només per una cara, obtenint així un únic epímer (**8c**, **8i** i **8j**). En canvi, pels aldols amb configuració *anti* (5*R*,6*S*), és a dir, **4** i **6a-c**, es generaren mesclures epimèriques en C-6 (**8a/b**,

8d/e i 8f/g). En la **Figura 3.2.9** es representen els intermedis plausibles de la hidrogenació, assumint que el grup carboxil adopta la posició equatorial de la imina cíclica. Els adductes *sin* (5*R*,6*R*) presenten una cara més favorable (cara *Si*), la menys impedida oposada als substituents axials, per on H₂ és més fàcil que ataqüi (**Figura 3.2.9a i b**).²⁰⁸ Per contra, els adductes *anti* (5*R*,6*S*) no presenten una diferenciació facial clara ja que contenen impediments estèrics en ambdues cares. El grup COOH es troba en la cara β i en la cara α, el C4-OH es troba sempre en posició axial (**Figura 3.2.9c i d**).

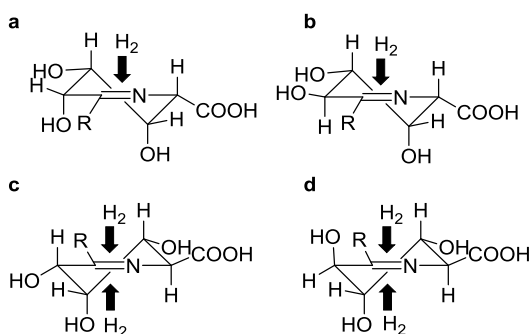


Figura 3.2.9. Selectivitat facial en l'aminació reductiva dels adductes 4-7. **(a) i (b)** Representació de les imines cícliques intermèdies plausibles dels adductes aldòlics amb configuració *sin* (5*R*,6*R*) els quals corresponen als productes finals ciclats **8c**, **8i** i **8j**, i **(c) i (d)** amb configuració *anti* (5*R*,6*S*), corresponents als productes finals ciclats **8a/b**, **8d/e** i **8f/g**.

La separació de les mesclades epimèriques generades en la hidrogenació catalítica, es poden efectuar per cromatogràfica d'intercanvi catiònic de resina forta.^{196, 209}

Com a exemple, es purificà la mescla diastereomèrica de derivats d'àcids piperòlics **8f** i **8g** (Veure **Secció experimental apartat 5.10.8**).

En la **Figura 3.2.8** es detallen els rendiments aïllats de cada un dels compostos obtinguts a partir de la glicina, substrat limitant inicial de la ruta quimioenzimàtica. Els valors són baixos (2-40 %) atès que els passos de purificació no foren optimitzats.

3.2.4 SÍNTESI DE DERIVATS POLIHIDROXILATS D'HOMOIMINOCICLITOLS PIPERIDÍNICS

En la **Figura 3.2.10** es resumeix la síntesi de derivats polihidroxilats d'homoiminociclitols piperidínics duta a terme. L'estratègia sintètica és la mateixa que per a la síntesi dels derivats polihidroxilats de l'àcid piperòlic (**Apartat 3.2.3**), però el grup carboxil es reduït a alcohol prèviament a la segona

etapa biocatalítica. La segona etapa aldòlica clau fou catalitzada per les aldolases FucA F131A i RhuA_{wt} i FSA (FSA_{wt} o variants).

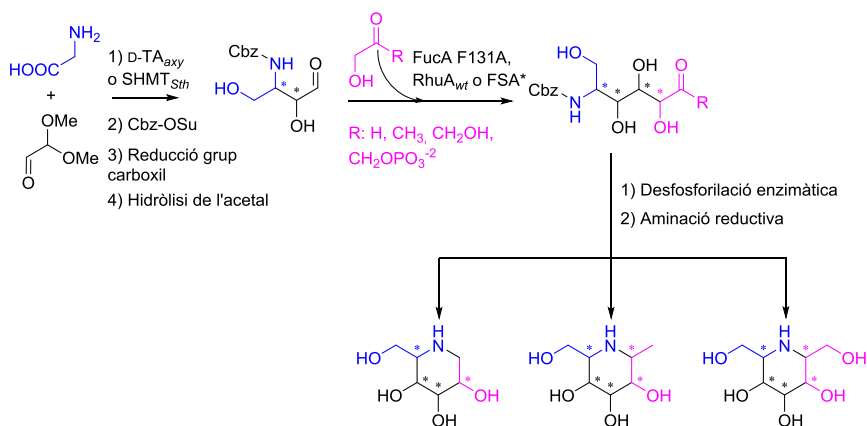


Figura 3.2.10. Esquema de l'estratègia quimioenzimàtica proposada per a la síntesi de derivats polihidroxilats d'homoiminoclitols piperidínics.

De forma similar, es dugueren a terme estudis a nivell analític per tal de seleccionar els biocatalitzadors més adients, previ als escalats dels adductes aldòlics.

3.2.4.1 OBTENCIÓ DELS ALDEHIDS SUBSTRAT DE LA SEGONA ETAPA BIOCATALÍTICA

Els *N*-Cbz- α,γ -dihidroxi aminoaldehyds **2e** i **3e** s'obtingueren de la reducció del grup carboxil i desprotecció de l'acetal dels adductes aldòlics **2a** (*anti*) i **3a** (*sin*) (Figura 3.2.11).

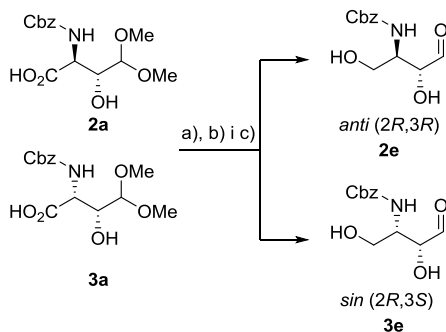


Figura 3.2.11. Obtenció dels *N*-Cbz- α,γ -dihidroxi amino aldehyds **2e** i **3e** a) SOCl₂/MeOH; b) NaBH₄/tetrahidrofurà/CaCl₂, etanol c) CH₃CN/aquós HCl (0.33 M) 4:3, 60 °C, 1 h. Per a més informació, veure **Secció experimental Apartat 5.10.4**.

Aquests aldehids s'empraren directament com a substrats de la segona etapa aldòlica clau, sense necessitat d'aïllar-los. El subproducte principal observat per a cada un en els cromatogrames d' HPLC correspon a Cbz-glicinol, el qual no interfereix en la següent addició aldòlica (Veure **Material Suplementari S3.2 Figures S12-S15**).

Els rendiments aïllats d'ambdós productes **2e** i **3e** foren de 44 % i 33 % respectivament, respecte a la glicina de partida.

3.2.4.2 ESTUDI A NIVELL ANALÍTIC DE LES ADDICIONS ALDÒLIQUES CATALITZADES PER ALDOLASES DEPENDENTS DE DHAP

Es realitzà un estudi preliminar de les addicions aldòliques de DHAP als *N*-Cbz- α,γ -dihidroxiainoaldehids **2e** i **3e** (**Figura 3.2.12**), tenint en compte els resultats previs amb els substrats **2d** i **3d** (**Apartat 3.2.3.2**).

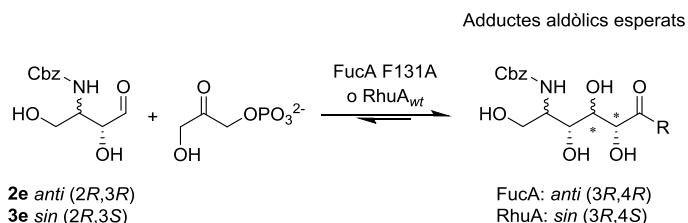


Figura 3.2.12. Esquema de les adicions aldòliques de DHAP als aldehids **2e** i **3e** catalitzades per les aldolases dependents de DHAP FucA F131A i RhuA_{wt}.

Taula 3.2.5. Conversions a adducte aldòlic de les adicions aldòliques a escala analítica de DHAP a **2e** i **3e** catalitzades per FucA F131A i RhuA_{wt}.

Aldehid	Enzim	Conversió /% ^[a]	<i>d.r. anti:sin</i> ^{[a] [b]}	
2e	FucA F131A	49	91:9	
	RhuA _{wt}	(Zn ²⁺)	82	41:59
		(Co ²⁺)	88	80:20
3e	FucA F131A	52	>97:—	
	RhuA _{wt}	(Zn ²⁺)	86	—:>97
		(Co ²⁺)	80	—

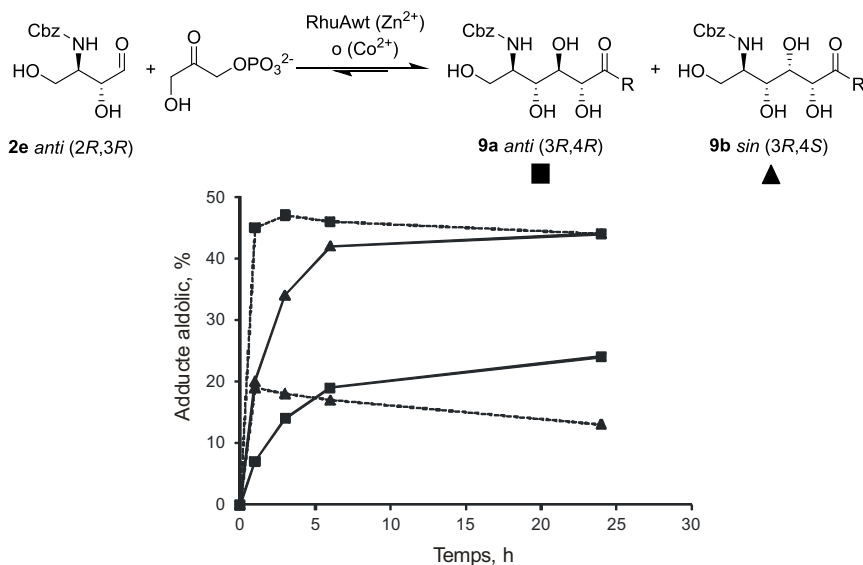
^[a] Conversions a productes aldòlics i relacions diastereomèriques (*d.r.*) (*anti:sin*) calculades a partir de les àrees dels pics obtinguts de cromatogrames de HPLC després de 20 hores de reacció a escala analítica, emprant 3 mg·mL⁻¹ de FucA_{wt} i 0.7 mg·mL⁻¹ de RhuA_{wt} amb cofactor Co²⁺ o Zn²⁺. Temperatura de reacció 25 °C (**Secció experimental Apartat 5.9.2**). ^[b] *anti* (3*R*/4*R*) i *sin* (3*R*/4*S*). — No fou possible determinar *d.r.* (*anti:sin*) per HPLC, atès que els pics de productes es solapen (Veure **Material Suplementari S3.2 Figures S12 i S13**).

Les conversions a adducte aldòlic per als substrats **2e** i **3e** foren moderats amb FucA F131A (49-52%) i l'estereoselectivitat *anti* fou 91 % amb **2e** i >97 % per **3e** (Taula 3.2.5). Aquests resultats foren similars als mostrats anteriorment per **2d** i **3d** (Taula 3.2.4). En conseqüència, el grup carboxil no té cap efecte directe en la qualitat d'aquests com a substrats acceptors de la FucA.

Respecte a les addicions catalitzades per RhuA_{wt}, els substrats **2e** i **3e** si foren tolerats per l'enzim i les conversions exhibides, elevades (80-88 %, Taula 3.2.5). Convé recordar que **2d** i **3d** no foren acceptats per aquesta aldolasa (Taula 3.2.2), doncs, es corrobora que el grup aniónic té un efecte directe en la tolerància dels substrats acceptors.

Sorprenentment, s'advertí que la diastereoselectivitat mostrada per aquest biocatalitzador depenia de la naturalesa del metall cofactor present en el centre actiu de l'aldolasa de classe II. Aquest correspon a Co²⁺ o Zn²⁺, segons la sal de metall divalent addicionada en la precipitació de l'enzim amb sulfat d'amoni (Veure Secció experimental 5.7.3.2b).

Figura 3.2.13: Perfil de productes aldòlics obtinguts respecte el temps en les addicions aldòliques de DHAP a **2e**, catalitzades per RhuA_{wt} (Zn²⁺) (línia sòlida) o per RhuA_{wt} (Co²⁺) (línia discontinua).^[a]



^[a]Conversions aldòliques calculades a partir de les àrees dels pics obtinguts per cromatogrames de HPLC a escala analítica, emprant 0.7 mg·mL⁻¹ de RhuA_{wt} amb cofactor Co²⁺ o Zn²⁺. Temperatura de reacció 25 °C. [**2e**]: 50 mM; [DHAP]: 75 mM. (Secció experimental apartat 5.9.2).

En les addicions de DHAP a **2e**, l'adducte majoritari format fou *sin* (3*R*,4*S*) quan s'emprà RhuA (Zn²⁺). En canvi, quan es catalitzà la reacció amb RhuA (Co²⁺), l'adducte majoritari fou l'*anti* (3*R*,4*R*) (Veure **Taula 3.2.5** i **Figura 3.2.13**).

Ahora, aquest comportament es va veure influenciat segons la quantitat d'enzim present en el medi de reacció. Per ambdós cofactors, a més quantitat d'enzim, la proporció del producte *anti* (3*R*,4*R*) incrementà. Per contra, a menys quantitat d'enzim, incrementà la proporció del producte *sin* (3*R*,4*S*) (**Taula 3.2.6**).

Així doncs, els resultats suggeriren que el producte *sin* (3*R*,4*S*) correspon a l'adducte afavorit cinèticament i l'*anti* (3*R*,4*R*), l'afavorit termodinàmicament. Per una mateixa quantitat de biocatalitzador, l'equilibri de reacció s'assoleix més ràpidament amb RhuA_{wt} (Co²⁺) que amb RhuA_{wt} (Zn²⁺) (**Figura 3.2.13**).

Taula 3.2.6. Estudi de les conversions a adducte aldòlic i diastereoselectivitats en addicions aldòliques de DHAP a **2e** emprant diferents quantitats de RhuA_{wt} amb cofactor Zn²⁺ o Co²⁺.

Aldehid	Cofactor	Quantitat d'enzim/ mg·mL ⁻¹ de reacció	Conversió /% ^[a]	<i>d.r.</i> <i>anti:sin</i> ^{[a] [b]}
2e	(Zn ²⁺)	2.0	70	41:58
		1.0	71	38:62
		0.5	68	35:65
	(Co ²⁺)	2.0	45	87:13
		1.0	54	80:20
		0.5	57	77:33

^[a] Conversions a productes aldòlics i relacions diastereomèriques (*d.r.*) (*anti:sin*) calculades a partir de les àrees dels pics obtinguts de cromatogrames de HPLC després de 24 hores de reacció a escala analítica, emprant 0.5-2.0 mg·mL⁻¹ de RhuA_{wt} amb cofactor Co²⁺ o Zn²⁺. Temperatura de reacció 25 °C. [**2e**]: 50 mM; [DHAP]: 75 mM. (**Secció experimental apartat 5.9.2**).^[b] *anti* (3*R*,4*R*) i *sin* (3*R*,4*S*).

Per tant, per a obtenir la màxima quantitat de producte *sin* (3*R*,4*S*) es convenient emprar RhuA_{wt} (Zn²⁺) i en poca quantitat (0.5 mg·mL⁻¹ per volum de reacció). Altrament, si es vol obtenir majoritàriament el producte *anti* (3*R*,4*R*), el més adient és catalitzar la reacció amb quantitats elevades de RhuA_{wt} (Co²⁺) (2.0 mg·mL⁻¹ per volum de reacció).

El mateix comportament s'intuí pel substrat **3e**, tot i que no es pogueren determinar els *d.r.* exactes a partir dels cromatogrames de HPLC, atès que ambdós productes aldòlics posseeixen temps de retenció similars (Veure

Material Suplementari S3.2 Figures S13 i S14). No obstant, de la mateixa manera que pel substrat **2e**, és convenient emprar poca quantitat RhuA_{wt} (Zn^{2+}) ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ per volum de reacció) a fi d'obtenir majoritàriament el producte *sin* (3*R*,4*S*). En aquestes condicions, s'obtingué només el producte cinètic *sin* (3*R*,4*S*) amb una conversió a adducte aldòlic excel·lent (86 %)(Veure **Taula 3.2.5**).

D'altra banda, convé aclarir per què les conversions a producte aldòlic de les addicions de DHAP a **2e** mostrades en la **Taula 3.2.5** (82-88 %) foren força més elevades a les mostrades en la **Taula 3.2.3** (57-68 %), a mateixes condicions de reacció. La raó més plausible seria la qualitat de la DHAP emprada. Com s'ha exposat en la introducció (**Apartat 1.2.3.4**), la DHAP presenta una estabilitat química baixa i es degrada amb el temps, empitjorant les conversions de reacció. No obstant, com és un reactiu costós, s'emprà en ocasions DHAP d'una qualitat inferior, a fi de reduir despeses econòmiques i de temps.

Adicionalment també es provà DHA en presència de tampó borat sòdic, catalitzades per RhuA_{wt} .¹²⁰ Tanmateix no es detectà cap producte aldòlic.

3.2.4.3 ESTUDI A NIVELL ANALÍTIC DE LES ADDICIONS ALDÒLIQUES CATALITZADES PER D-FRUCTOSA-6-FOSFAT ALDOLASA (FSA)

De la mateixa manera que en l'**Apartat 3.2.3.3**, es realitzà un estudi a nivell analític de les addicions dels donadors DHA, HA i GO als aldehids **2e** i **3e**, catalitzades per FSA nativa i variants (**Figura 3.2.14**).

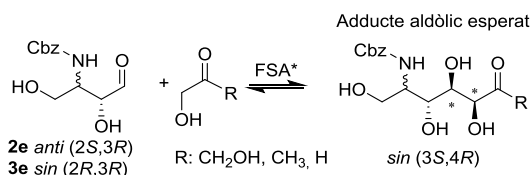


Figura 3.2.14. Esquema de les addicions aldòliques de DHA, HA o GO a **2e** i **3e**, catalitzades per FSA nativa o variants.

Els resultats es mostren en la **Taula 3.2.7** i foren similars als obtinguts per **7** i **8** (**Taula 3.2.3**).

Taula 3.2.7. Conversions a adducte aldòlic de les addicions aldòliques a escala analítica de DHA, HA o GO als aldehids **2e** i **3e** catalitzades FSA nativa o variants.

Donadors:		Conversió /% ^[a] (temps de reacció)					
		DHA		HA		GO	
Variants de FSA	Aldehids:	2e	3e	2e	3e	2e	3e
	Nativa	62	<5	94	90	–	–
	A129S/A165G	87 (24)	12	–	–	–	–
	A129S/A165G/S166G	90 (24)	97	–	–	–	–
	A129G	–	–	–	–	68	10
	A129G/S166G	–	–	–	–	67	16
	L107Y/A129G	–	–	–	–	43	10

^[a] Conversions aldòliques calculades a partir de les àrees dels pics obtinguts de cromatogrames de HPLC després de 48 hores de reacció (o 24 hores, indicat en els casos corresponents) a escala analítica (Veure **Secció experimental 5.9.3.1**). – no assajat.

La modificació d'aquest grup funcional, el grup carboxil, no representà una diferència notable en la qualitat dels substrats com a acceptors de la FSA. Així, les addicions amb HA presentaren conversions quantitatives amb l'enzim natiu. En canvi, pel donador GO es requerí el biocatalitzador FSA A129G i amb DHA, la millor variant fou FSA A129S/A165G/S166G, amb valors de conversió quantitatives.

3.2.4.4 ESCALAT I CARACTERITZACIÓ DELS DERIVATS POLIHIDROXILATS D'HOMOIMINOCICLITOLS PIPERIDÍNICS

A partir dels estudis analítics realitzats, es procedí a escalar a nivell semi-preparatiu els corresponents productes aldòlics **9-11**. Amb aquest fi, només es realitzaren a partir de l'aminoaldehyd **2e**, catalitzades per FucA F131A, RhuA_{wt} i FSA (**Taula 3.2.8**). Addicionalment, també s'escalà el producte aldòlic de **3e** catalitzat per RhuA_{wt}, atès que el seu equivalent en la síntesi de derivats de l'àcid piperidínic no s'havia pogut sintetitzar. L'objectiu principal fou l'obtenció de 30-150 mg dels derivats d'homoiminociclitols piperidínics finals **12a-j** (Veure **Figura 3.2.15**).

Taula 3.2.8: Conversions i relacions diastereomèriques dels adductes aldòlics **20-22** obtinguts a escala semi-preparativa mitjançant aldolases dependents de DHAP i FSA.

Enzim	Adducte aldòlic	Conversió/ % ^[a]	<i>d.r.</i> <i>anti:sin</i> ^[b]
FucA F131A	9a	30	>97:—
RhuA _{wt} (Zn ²⁺)	9a/9b	85	40:60
	10b	78	—:>97
FSA _{wt}	22a	43	—:>97 ^[c]
FSA A129S/A165G		87	—:>97 ^[c]
FSA _{wt}	22b	83	—:>97 ^[c]
FSA A129G	22c	68	—:>97 ^[d]

^[a] Conversions aldòliques calculades a partir de les àrees dels pics obtinguts de cromatogrames de HPLC quan no s'observa un canvi apreciable en la concentració del producte mesurat (24-72 hores). Per a més informació, veure **Secció experimental apartats 5.10.3 i 5.10.5**. ^[b] Relacions diastereomèriques (*d.r.*) (*anti:sin*) corresponent al nou enllaç C-C generat (Veure **Figura 3.2.15**), *anti* (3*R*,4*R*) i *sin* (3*R*,4*S*). ^[c] *sin* (3*S*,4*R*). ^[d] *sin* (2*S*,3*R*).

La conversió a l'adducte **9a** amb FucA F131A fou baixa (30 %), però amb excel·lent diastereoespecificitat (>97 % *anti*). Convé remarcar que el mateix producte es podria obtenir amb millor rendiment emprant RhuA (Co²⁺). Com s'ha vist prèviament a nivell analític (**Apartat 3.2.4.2**), la conversió fou excel·lent (88 %) però amb diastereoselectivitat més baixa (*d.r.*: 80:20, **9a** (*anti*)/ **9b** (*sin*)).

Amb l'objectiu d'obtenir els productes *sin* **9b** i **10b**, es va emprar RhuA_{wt} (Zn²⁺) per als escalats. Les conversions foren excel·lents (78-89 %) (**Taula 3.2.8**) i la diastereoselectivitat *sin* >97 % amb el substrat **3e**. No obstant, tal com s'havia observat a nivell analític, s'obtingueren mesclades diastereomèriques amb l'acceptor **2e** (mescla 3:2 de *sin* (3*R*,4*S*) (**9b**):*anti* (3*R*,4*R*) (**9a**), **Taula 3.2.8**).

Els rendiments dels productes **11a-c** a escala preparativa foren de moderats a excel·lents (68-90 %, **Taula 3.2.8**) i la diastereoespecificitat *sin* de la FSA >97 %, independentment del donador. Els cromatogrames HPLC es poden consultar en el **Material Suplementari S3.2 Figura S15**.

A continuació, es seguí exactament el mateix procediment realitzat pels adductes de derivats de l'àcid pipecòlics (**11-14**). Un cop purificats i desfosforilats, en cas necessari, es va dugué a terme l'aminació reductiva dels adductes aldòlics (**11** i **9-10** desfosforilats) amb H₂ en presència de Pd/C. En la

Figura 3.2.15 es presenta l'esquema sintètic complet dels producte homioiminociclitol **12a-j** a partir de (**1a**) i glicina, substrats aquirals de partida.

Les caracteritzacions per RMN dels compostos **12a-j** es troben en el **Material Suplementari S.3.2 Figures S24-S29**. Pels productes **12c** i **12h** també es proporcionen els valors de les rotacions òptiques específiques (**Material Suplementari S3.2 Taula S2**). La síntesi detallada de cada un (**12a-j**) es pot consultar en el **Material Suplementari S5**.

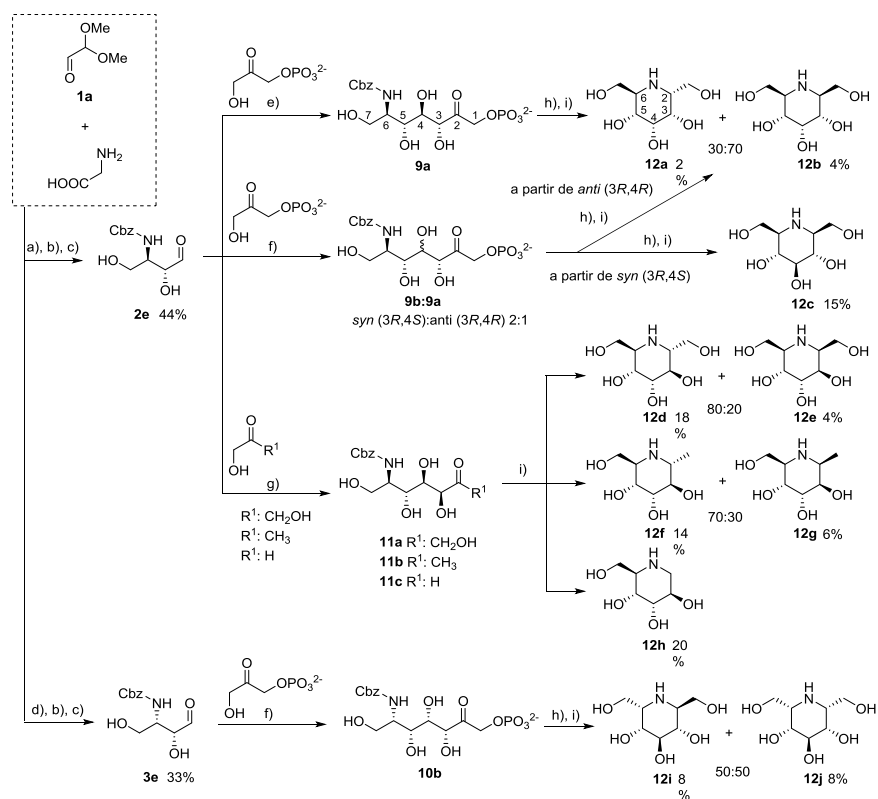


Figura 3.2.15. Esquema sintètic complet d'homioiminociclitol en múltiples passos quimioenzimàtics amb dues etapes de reaccions aldòliques clau catalitzades per aldolases a partir de substrats aquirals. a) SHMT_{StH}; b) 1) Cbz-OSu; 2) MeOH/SO₂Cl₂; 3) CaCl₂, NaBH₄, EtOH/THF, c) CH₃CN/aquós HCl d) D-TA_{oxy}; e) FucA F131A; f) RhuA_{wt} g) FSA A129S/A165G per R¹: CH₂OH, FSA_{wt} per R¹: CH₃, FSA A129G per R¹: H; h) fosfatasa àcida; i) H₂ Pd/C. S'indica el rendiment de cada producte (%) obtingut respecte la glicina, substrat limitant de partida.

En quant al curs estereoquímic presentat durant l'aminació reductiva dels aldols purs, s'observà que la modificació del grup funcional en C-5 no representà cap canvi en aquest respecte al presentat pels precursors dels derivats

polihidroxilats de l'àcid pipercolic (**Apartat 3.2.3.4**). Pels aldols amb configuració *anti* (5*R*,6*S*) **9a**, **9b** i **11a-c** es generaren mescles epimèriques en C-2, de la mateixa manera que pels seus equivalents amb el grup carboxil (aldols **11** i **14**, **Figura 3.2.9c-d**). Tanmateix, l'aldol **9b** (*anti* (5*R*,6*S*)), si presentà discriminació facial. A diferència dels anteriors, **9b** té el C4-OH en la cara β , com el grup C-6 hidroximetil, afavorint l'atac de l'hidrogen per la cara oposada (**Figura 3.2.16a**). El cas contrari s'observà per l'aldol **10**, amb configuració *sin* (5*R*,6*R*), a partir del qual s'obté la mescla **12i** i **12j**. La presència C4-OH en la cara β en posició axial i del grup C-6 hidroximetil en la α , resultà en una pèrdua de selectivitat facial en l'atac del H₂ (**Figura 3.2.16b**) en comparació als aldols *sin* (5*R*,6*R*) **12** i **14** (**Apartat 3.2.3.4**, **Figura 3.2.9a-b**). Així doncs, la configuració en C4-OH sembla tenir un efecte directe en la diferenciació facial en l'aminació reductiva de les imines cíclics.

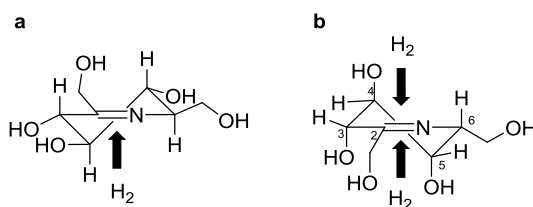


Figura 3.2.16. Representació de les imines cícliques intermèdies plausibles i hipotètica selectivitat facial en l'aminació reductiva dels adductes **9b** (a) i **10** (b).

Les separacions de les mescles epimèriques generades es podrien realitzar per cromatogràfica d'intercanvi catiònic de resina feble.¹³⁷

En la **Figura 3.2.15** es detallen els rendiments aïllats dels productes homoiminociclitols piperidínics rendits respecte la glicina, substrat limitant inicial de la ruta quimioenzimàtica. De nou, els valors són baixos (2-20 %) ja que els passos de purificació no foren optimitzats.

El producte D-1-deoxialtronojirimicina (**12h**) conté quatre centres estereogènics, els quals es generen en les dues etapes biocatalítiques catalitzades per les aldolases SHMT_{StH} i FSA. Aquest compost en concret també es podria sintetitzar a partir de l'addició de DHAP a (*R*)-*N*-Cbz-3-amino-2-hidroxiopropionaldehid catalitzada per l'aldolasa D-tagatosa-1,6-bisfosfat (TagA) (**Figura 3.2.17**).

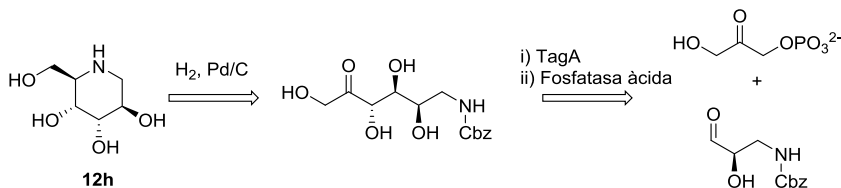


Figura 3.2.17. Esquema retrosintètic del producte D-1-deoxialtronojirimicina (**12h**).

No obstant, aquesta altra via presenta els inconvenients de l'ús de DHAP i la baixa diastereoespecificitat mostrada generalment per TagA, raó per la qual aquest enzim no ha estat emprat àmpliament en síntesi asimètrica.^{20, 210, 211} A més, en l'aminació reductiva, es possible la generació de la corresponent mescla epimèrica. Per tant, la nova estratègia presentada a partir de GO i **2e** i **3e**, extensible a altres substrats, representa una nova ruta de síntesi de deoximinociclitol més efectiva que la fins ara coneguda amb DHAP.

3.2.5 SÍNTESI DE DERIVATS POLIHIDROXILATS PIRROLIDÍNICS

En la mateixa línia general de treball, es dugué a terme la síntesi dels derivats polihidroxilats pirrolidínics **15a-d** seguint la tercera via proposada tàndem quimioenzimàtiques (**Figura 3.2.18**). Aquest treball fou realitzat per Karel Hernández en el nostre grup de recerca.

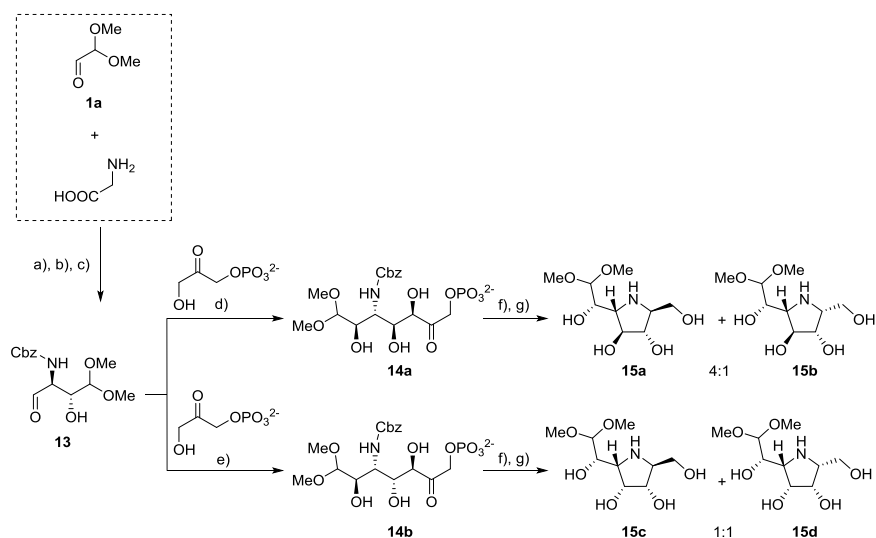


Figura 3.2.18. Esquema de la síntesi completa de derivats polihidroxilats pirrolidínics en múltiples passos quimioenzimàtics amb dues etapes de reaccions aldoliques clau catalitzades per aldolases a partir de substrats aquirals. a) SHMT_{StH}; b) 1: Cbz-OSu; 2: MeO/SO₂Cl₂; 3: CaCl₂, NaBH₄, EtOH/THF, c) TEMPO; d) RhuA_{wTi}; e) FucA F131A, f) fosfatasa àcida; g) H₂ Pd/C.

A continuació es fa un breu resum dels resultats obtinguts, els quals consoliden la varietat de productes que es poden obtenir a partir dels sintons inicials.

L'objectiu principal en aquest cas fou el d'explorar noves possibilitats sintètiques dels adductes de dimetoxiacetaldehid (**1a**) i glicina obtinguts amb treonina aldolases. En efecte i com a prova de concepte, es transformà el grup carboxil de **2a** en aldehid, per tal d'obtenir el substrat de la segona addició aldòlica (**13**). Aquest compost manté la funció aldehydica emmascarada en forma d'acetal. Previ a la modificació del grup funcional però, fou imprescindible la purificació per HPLC-preparatiu de *N*-Cbz- β -hidroxi- α -amino àcid **2a** per tal d'eliminar l'excés de *N*-Cbz-Glicina. En cas contrari, es generaria l'aldehid *N*-Cbz-2-aminoetanal, el qual és un bon substrat acceptor de les aldolases dependents de DHAP i FSA seleccionades.^{115, 133, 153}

Les conversions aldòliques de l'addició de DHAP a **13** resultaren excel·lents, amb valors >95 % de conversions i diastereoselectivitats de >97 %. S'obtingueren exclusivament el producte *sin* (3*R*,4*S*) **14a** amb Rhua_{wt} i l' *anti* (3*R*,4*R*) **14b** amb FucAF131A (**Figura 3.2.18**).

Malauradament, l'aldehid **13** no fou substrat per cap de les variants de FSA disponibles. És probable que el substituent voluminós en el C- α de l'aldehid impedeixi a encabir-s'hi en el centre actiu del biocatalitzador.

Finalment, l'aminació reductiva dels compostos no fou estereoselectiva, proporcionant mescles epimèriques en C-2 dels iminoclitols (**Figura 3.2.18**). Aquests diastereoisòmers foren separats per cromatografia d'intercanvi catiònic.

Gràcies a la funció aldehydica emmascarada de les pirrolidines **15**, es podrien preparar fàcilment derivats d'aquestes o bé transformar-les en aldehids acceptors per una nova addició aldòlica consecutiva catalitzada per aldolases Dependents de DHAP, amb la finalitat de sintetitzar derivats polihidroxilats indolizidínics (Veure **Figura 3.2.2**).

La informació detallada de la síntesi dels compostos pirrolidínics **15a-d** es poden consultar en l'article "*Sequential Biocatalytic Aldol Reactions in Multistep Asymmetric Synthesis: Pipecolic acid, Piperidine and Pyrrolidine (Homo)Iminocyclitol Derivatives from Achiral Building Blocks*" disponible en el **Material Suplementari S6**.

3.2.6 CONCLUSIONS

De forma general podem concloure que les estratègies tàndem quimioenzimàtiques realitzades en aquest treball constitueixen vies innovadores i eficients per a la síntesi de nous compostos polihidroxilats de l'àcid pìpecòlic, iminociclitols piperidínics i pirrolidínics. Aquestes rutes presenten l'avantatge principal de partir de substrats simples, aquirals i econòmics per a produir iminociclitols complexes, els quals contenen fins a cinc centres quirals.

Gràcies a la combinació de diverses aldolases, s'introdueixen quatre centres quirals en només dues etapes biocatalítiques i emprant condicions suaus de reacció. Al mateix temps, l'ús de diferents aldolases, permet l'obtenció de productes amb diversitat estructural i configuracional. Un avantatge addicional en la síntesi dels derivats polihidroxilats piperidínics és que no es requereix la purificació dels productes intermedis de les etapes enzimàtiques.

A grans trets, les aldolases emprades i les seves variants exhibiren conversions moderades a quantitatives a nivell d'escalat (30-98 %) i diastereoselectivitats excel·lents (>97 %). Per primera vegada, es descriu la utilitat sintètica de la D-TA *Arthrobacter xylosoxidans* per a la síntesi d'iminociclitols; sent l'aldolasa dependent de glicina més diastereoselectiva juntament amb SHMT de *Streptococcus thermophilus*, i amb estereoselectivitat complementària a aquesta. Aquest fet és remarcable ja que generalment les aldolases dependents de glicina mostren diastereoselectivitats baixes en C-3.

En quant a les aldolases dependents de DHAP, les conversions foren moderades a quantitatives (30-100 %) per FucA F131A i elevades per RhuA_{wt} (78-85 %). No obstant, els substrats carboxilats no foren substrats per a la RhuA_{wt}.

En relació a la FSA en la síntesi d'iminociclitols piperidínics, es reafirmà l'orde de preferència de l'enzim natiu cap als donadors, sent HA>>GO>DHA. Respecte a les variants modificades genèticament de FSA, foren imprescindibles les modificacions FSA A129S o A129S/A165G per síntesi amb DHA. En canvi, la variant FSA A129G incrementà enormement les conversions amb GO.

Malauradament, la FSA no acceptà com a substrats els precursors dels iminociclitols pirrolidínics (**13**) de la tercera via, atès que contenen un grup voluminós en el C- α .

3.3

**REDISSENY DEL CENTRE ACTIU DE LA FSA
PER A INCREMENTAR L'AFINITAT PER
ACCEPTORS *N*-CBZ-AMINOALDEHIDS**

L'enzim D-fructosa-6-fosfat aldolasa (FSA) ofereix grans avantatges respecte les aldolases DHAP dependents. Ha demostrat ser molt robust, altament estereoselectiu (més de >95 % del producte aldòlic *sin* (3*S*,4*R*), respecte els límits de RMN) i capaç d'utilitzar com a donadors els compostos α -hidroxicarboníl·lics dihidroxiacetona (DHA), hidroxiacetona (HA) i glicolaldehid (GO), entre altres.^{146-148, 154}

El nostre grup d'investigació compta amb una ampla experiència en l'ús i redisseny d'aquest biocatalitzador per enginyeria genètica de proteïnes. Gràcies a petites modificacions en el centre catalític, s'ha aconseguit alterar enormement les seves capacitats sintètiques. Com s'ha exposat en la introducció (**Apartat 1.3.4**), la modificació A129S incrementà l'afinitat del biocatalitzador per DHA per mitjà de la formació d'un pont d'hidrogen entre el residu de la serina i l'hidroxil del donador.¹⁵¹ En canvi, la doble modificació de L107Y/A129G incrementà l'afinitat pel GO. A més, la modificació en A165G dotà al centre actiu del enzim de més flexibilitat i espai imprescindible per encabir *N*-Cbz-aminoaldehids- α -substituïts. Per exemple, la conversió d'addició aldòlica de GO a (*R*)-*N*-Cbz-2-aminopropanal s'incrementà de tan sols un 2 % amb L107Y/A129G a un 73 % amb L107Y/A129G/A165G per efecte sinèrgic positiu de les modificacions.^{141, 151}

Així doncs, les variants descrites fins al moment FSA A129S/A165G¹⁵³ i FSA L107Y/A129G/A165G¹⁴¹ representaren els biocatalitzadors més adients pels donadors DHA/ HA i GO, respectivament, i els substrats *N*-Cbz-aminoaldehids α -substituïts. Ara bé, aquestes variants continuen presentant una tolerància reduïda front aminoaldehids amb substituent voluminosos en C α o d'altres conformacionalment restringits com carbaldehids derivats de pirrolidines o piperidines.

L'objectiu principal en aquest treball consistí en obtenir noves variants de FSA per incrementar les conversions i possibilitar les addicions aldòliques dels donadors α -hidrocarboníl·lics a *N*-Cbz-aminoaldehids voluminosos. Seguint la mateixa línia de treball del nostre grup, es dugué a terme un estudi de redisseny del centre actiu de FSA A129S/A165G i FSA L107Y/A129G/A165G i la construcció de noves per enginyeria genètica. Les posicions inèdites modificades s'estudiaren en el lloc d'unió del substrat acceptor a fi d'encabir *N*-Cbz-aminoaldehids voluminosos i amb activitat catalítica incrementada pels donadors per efecte sinèrgic de les modificacions.

La FSA representa un biocatalitzador molt potent per a la generació d'intermedis quirals d'imminoclitols polihidroxilats mono- i bicíclics, d'interès per a la present tesi i pel nostre grup de recerca.

3.3.1 ESTRATÈGIA D'AVALUACIÓ DE NOVES VARIANTS DE FSA PER A LA SÍNTESI D'IMINOCICLITOLS POLIHIDROXILATS MONO I BICÍCLICS

L'estratègia d'avaluació de les noves variants generades per enginyeria genètica en aquest treball es realitzaren per mitjà de cribratges amb les reaccions d'addició aldòliques d'interès dels donadors α -hidroxicarbonílics a una selecció de *N*-Cbz-aminoaldehids. Aquesta etapa biocatalítica representa el pas clau per a la síntesi de nous compostos iminoclitols polihidroxilats mono- i bicíclics. En la **Figura 3.3.1** es representa l'esquema sintètic, on l'imminoclitol final s'obté a partir de la desprotecció del grup amino i aminació reductora en un sol pas de l'adducte aldòlic.

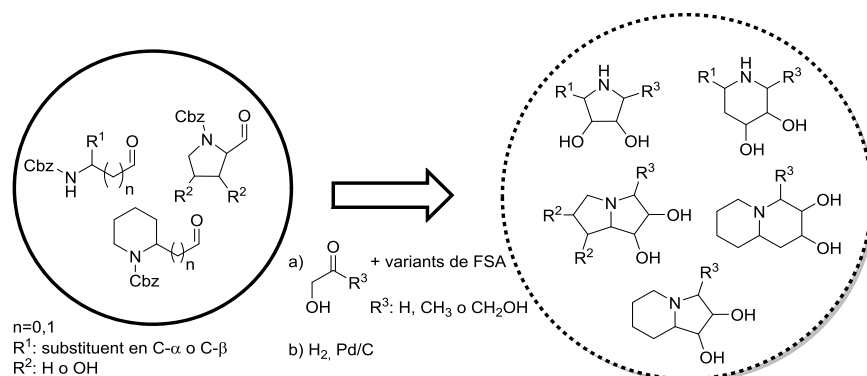


Figura 3.3.1. Esquema de l'estratègia presentada per a la síntesi d'imminoclitols polihidroxilats a partir de *N*-Cbz-aminoaldehids i els donadors α -hidroxicarbonílics DHA, HA i GO. a) Adició aldòlica catalitzada per variants modificades genèticament de FSA. b) Aminació reductora amb H₂ en presència de Pd/C.

Els *N*-Cbz-aminoaldehids foren seleccionats per tal de cobrir un ampli ventall estructural de derivats C- α o C- β substituïts. En C- α , s'estudiaren substituents lineals o ramificats (**1f-k**), o bé cíclics (**1m-p**). Respecte als substituïts en C- β , s'empraren l'aspàrtic semialdehid (*S*)-**1l** i l'aminoaldehid cíclic racèmic (\pm)-**1q** (**Figura 3.3.2** i **Figura 3.3.3**).

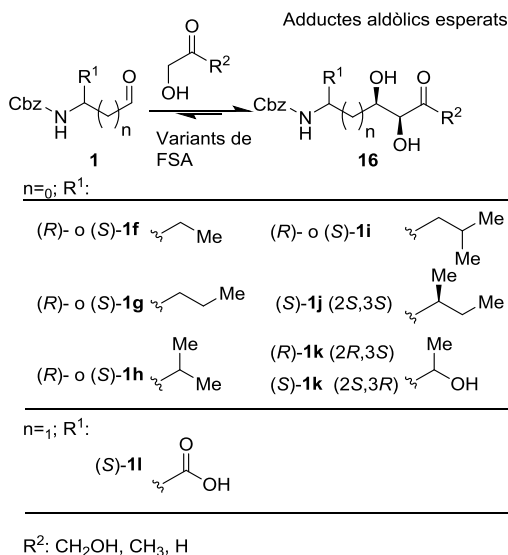


Figura 3.3.2. Addicions aldòliques dels donadors α -hidrocarbonil·lics DHA, HA i GO als *N*-Cbz-aminoaldehyds C- α o C- β substituïts lineals, ramificats seleccionats. Les reaccions foren catalitzades per les noves variants de FSA a fi d'avaluar les seves capacitats sintètiques.

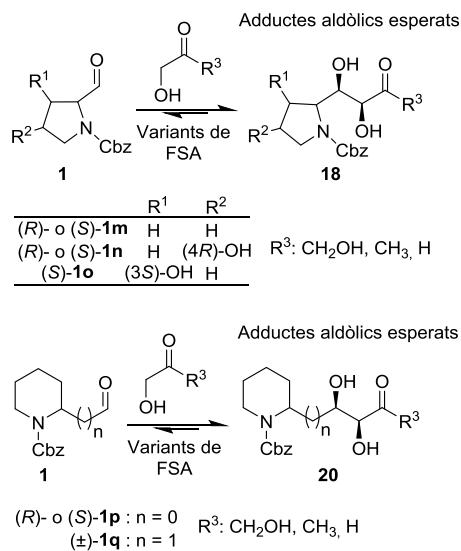


Figura 3.3.3. Addicions aldòliques dels donadors α -hidrocarbonil·lics DHA, HA i GO als *N*-Cbz-aminoaldehyds C- α o C- β substituïts cíclics seleccionats. Les reaccions foren catalitzades per les noves variants de FSA a fi d'avaluar les seves capacitats sintètiques.

L'estudi de la qualitat de diversos *N*-Cbz-aminoaldehyds voluminosos com a substrats acceptors de les noves variants de FSA (**Figures 3.3.2 i 3.3.3**) facilità la identificació de nous residus implicats en el lloc d'unió dels aldehyds. D'aquesta

manera, es pretenia conèixer més a fons el mecanisme catalític de l'enzim i permetre així l'ampliació de les capacitats sintètiques d'aquest biocatalitzador. Per a aquest estudi, es dugueren a terme les reaccions de cribratge a nivell analític i sota les mateixes condicions de reacció. Les concentracions dels substrats i la quantitat d'enzim foren escollides tenint en compte treballs anteriors,²¹² sense ser optimitzades. La finalitat fou la comparació entre els diferents biocatalitzadors nous produïts per a determinar quins eren els més adients per a la síntesi dels iminociclitols finals. La uniformitat de les condicions en totes les reaccions assajades permetré la comparació entre els resultats obtinguts de forma precisa.

La síntesi a escala preparativa dels nous iminociclitols mono i bicíclics, així com les conclusions intrínseques del mecanisme de la FSA s'exposen en el **Capítol 3.4**.

3.3.2 GENERACIÓ DE NOVES VARIANTS DE FSA AMB MODIFICACIÓ S166G, FSA A129S/A165G/S166G I FSA L107Y/A129G/A165G/S166G I LA SEVA AVALUACIÓ FRONT *N*-CBZ-AMINOALDEHIDS SELECCIONATS

Les variants FSA A129S/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/A165G/S166G es generaren per mutagènesi de lloc dirigit a partir de FSA A129S/A165G i FSA L107Y/A129G/A165G (**Figura 3.3.4**).

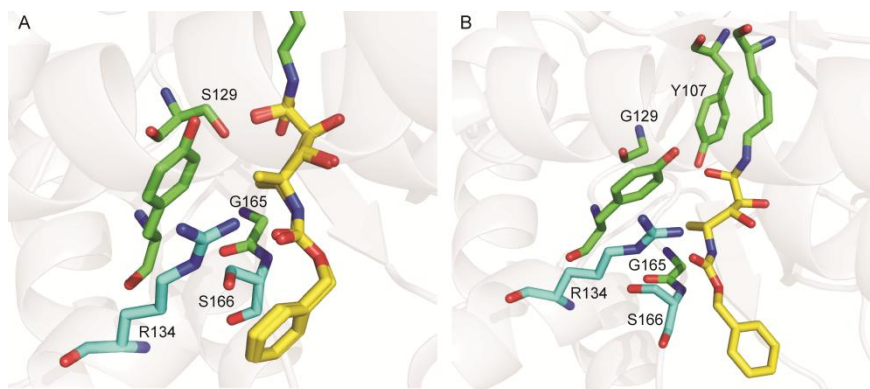


Figura 3.3.4. (A) Modelat dels complexos hemiaminàtics de (5R)- i (5S)-*N*-Cbz-alaninal (en groc) units a la lisina K85 catalítica del centre actiu de la variant FSA A129S/A165G i (B) modelat del complex hemiaminàtic de (5R)-*N*-Cbz-alaninal (en groc) unit a la lisina K85 catalítica del centre actiu de la variant FSA L107Y/A129G/A165G. Ambdós modelatges permeten observar la disposició del grup metil en el C- α del *N*-Cbz-alaninal sense enfrontaments estèrics amb la proteïna gràcies a la modificació A165G.¹⁵³ Els residu S166 es mostra en cian.

S'introduí en ambdues plataformes la modificació de la serina 166 per una glicina (S166G) en base al mateix criteri seguit per la substitució de l'alanina

adjacent per una glicina (A165G). Eliminant la cadena lateral d'aquesta serina, de la mateixa manera que treien el grup metil de l'alanina, es pretenia incrementar l'espai estèric en el centre catalític de l'enzim en la banda d'unió de l'aldehid acceptor i facilitar així la unió de substrats acceptors més voluminosos.

En primer lloc, es va dissenyar, purificar i expressar la triple variant FSA A129S/A165G/S166G en el nostre grup de recerca (Gutiérrez, M. Tesi Doctoral) (Veure **Material suplementari S3.3 Taula S1** i **Figura S1A**).²¹² Seguidament, es varen avaluar les seves capacitats sintètiques front els vint *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats (**Figures 3.3.2** i **3.3.3**), establint com a referent la variant FSA A129S/A165G. En la **Figura 3.3.5** es mostren els resultats obtinguts de les conversions aldòliques obtinguts amb els donadors DHA (**A**) i HA (**B**).

Com s'observa en els gràfics (**Figura 3.3.5**) la nova variant FSA A129S/A165G/S166G mostrà conversions aldòliques majors front els diferents *N*-Cbz-aminoaldehids respecte a FSA A129S/A165G. Aquests increments podrien resultar de la generació d'un espai més favorable per encabir substrats voluminosos donades les modificacions efectuades en el centre actiu. Com era d'esperar, l'afinitat pel substrat donador no es modificà entre ambdues variants, obtenint en tots els casos conversions més elevades per HA que per a DHA.

Les conversions aldòliques amb els substrats C- α lineals incrementaren respecte als valors mostrats per FSA A129S/A165G en tots els casos, mantenint la preferència pels que tenen configuració *R*, respecte als *S*. Per exemple, s'incrementaren els valors amb α -propil (*R*)-**1g** amb HA, passant d'un 32 % a valors quantitius; l'adducte de (*S*)-**1g** amb HA s'obtingué amb un rendiment analític de 30 %, fins ara no observat. Alhora, es detectaren per primera vegada els adductes aldòlics de α -propil (*R/S*)-**1g** i α -isopropil (*R/S*)-**1h** amb DHA.

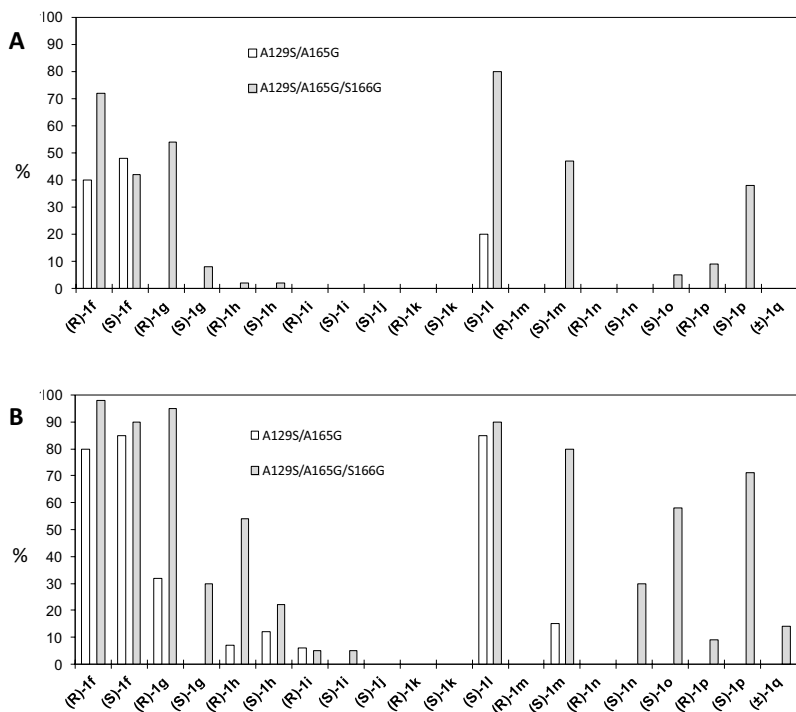


Figura 3.3.5. Representació gràfica de les conversions aldòliques (%) obtingudes en les addicions aldòliques de DHA (A) o HA (B) als N-Cbz-aminoaldehids seleccionats. S'avalua la modificació S166G per comparació dels resultats obtinguts amb FSA A129S/A165G i FSA A129S/A165G/S166G, sota les mateixes condicions de reacció. Valors obtinguts després de 24 hores de reacció, mesurat per HPLC emprant un mètode estàndard extern. Per a més informació veure **Secció experimental 5.9.3.2a**.

La modificació de S166G resultà clau pels N-Cbz-aminoaldehids cíclics en C- α . Fins al moment, tan sols s'havia detectat l'adducte aldòlic de HA a (S)-1m (15 % de conversió). Gràcies a la nova variant, s'aconseguien conversions de bones a excel·lents en les addicions de HA als substrats (S)-1m-o i (S)-1p (30-80 %), i acceptables amb DHA a (S)-1m i (S)-1p (47 % i 38 %, respectivament). La preferència de l'enzim fou exclusiva pels de configuració S, contràriament a la preferència exhibida pels substrats amb substituents C- α lineals. Si bé, s'observaren per primera vegada els presumptes adductes aldòlics de (R)-1p tant amb DHA com HA (9 % de conversió).

Respecte als substrats amb substituent en C- β , també s'incrementà significativament (de 20 % a 80 %) el rendiment de la reacció de DHA i l'aspàrtic semialdehid (S)-1l amb el nou biocatalitzador.

D'altra banda, s'obtingué per primera vegada l'adducte aldòlic de HA i l'aldehid racèmic (\pm)-1q.

En vista als excel·lents resultats obtinguts amb la modificació S166G, es procedí a realitzar la mateixa substitució en la variant FSA L107Y/A129G/A165G.

La variant FSA L107Y/A129G/A165G/S166G es va generar també per mutagènesi de lloc dirigit (Veure **Material suplementari S3.3 Taula S1 i Figura S1B; Secció experimental 5.5-5.7**).

En la **Figura 3.3.6** es representen gràficament els valors de les conversions en les reaccions aldòliques creuades de GO als *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats (**Figures 3.3.2 i 3.3.3**), catalitzades per FSA L107Y/A129G/A165G i FSA L107Y/A129G/A165G/S166G.

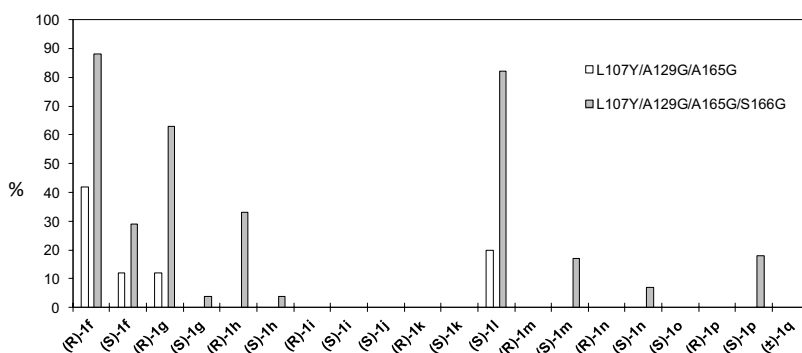


Figura 3.3.6. Representació gràfica de les conversions aldòliques (%) obtingudes en les addicions aldòliques de GO als *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats. S'avalua la modificació S166G per comparació dels resultats obtinguts amb FSA L107Y/A129G/A165G i FSA L107Y/A129G/A165G/S166G, sota les mateixes condicions. Valors obtinguts després de 24 hores de reacció, mesurat per HPLC emprant un mètode estàndard extern. Per a més informació veure **Secció experimental 5.9.3.2b**.

Novament, s'incrementaren les conversions gràcies a la introducció de la modificació S166G en el centre actiu, en plena concordança amb els resultats prèviament obtinguts amb els donadors DHA i HA. La triple variant FSA L107Y/A129G/A165G mostrà només tolerància pels substrats α -metil (*R/S*)-**1f** i α -propil (*R*)-**1g**. Amb el nou biocatalitzador, s'incrementaren les conversions amb aquests substrats, al mateix temps que es detectaren adductes aldòlics inèdits fins al moment amb α -propil (*S*)-**1g**, α -isopropil (*R/S*)-**1h** i els α -cíclics (*S*)-**1m/n/p**. Respecte al C- β substituït (*S*)-**1l**, la conversió a producte aldòlic augmentà notablement d'un 20 a un 82 %.

En termes generals, es conclou que l'afinitat pel donador per part de l'enzim influeix fortament a la tolerància vers als substrats acceptors. Els rendiments

analítics mostrats són molt més elevats per HA, respecte a DHA o GO (**Figures 3.3.5 i 3.3.6**).

Quant a la nova modificació S166G, tal com A165G, demostrà tenir un alt impacte en la tolerància de *N*-Cbz-aminoaldehyds voluminosos i d'altres amb ramificació en C- α . Ambdues modificacions doten al centre actiu de més espai i flexibilitat per acomodar els substrats acceptors. A més a més, aquestes dues modificacions, juntament amb les realitzades a fi de modificar l'afinitat pel donador, exhibeixen efectes sinèrgics positius i complementaris.

Així doncs, FSA A129S/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/A165G/S166G s'establiren com els biocatalitzadors amb més potencial sintètic vers *N*-Cbz-aminoaldehyds voluminosos.

3.3.3 GENERACIÓ DE NOVES VARIANTS DE FSA AMB ACTIVITAT INCREMENTADA PER ADDICIONS DE GO A *N*-CBZ-AMINOALDEHIDS

Com s'ha mencionat anteriorment, la combinació de les modificacions L107Y/A129G fou la més eficaç per a incrementar l'afinitat pel donador GO en addicions aldòliques creuades a *N*-Cbz-aminoaldehyds.¹⁴¹ En aquest mateix estudi, realitzat paral·lelament al desenvolupament de la present tesi, les variants simples FSA A129G, FSA A129T, FSA A129V mostraren també resultats similars a FSA L107Y/A129G.

Conseqüentment, es va considerar que si es combinaven les modificacions A165G/S166G per a una major tolerància per *N*-Cbz-aminoaldehyds voluminosos, amb les modificacions que han mostrat una major afinitat pel GO, exhibirien efectes sinèrgics positius, com els mostrats per la quàdruple variant FSA L107Y/A129G/A165G/S166G.

Per tant, es crearen les variants FSA A129G/A165G/S166G, FSA A129T/A165G/S166G i FSA A129V/A165G/S166G per mutagènesi de lloc dirigit (Veure **Material Suplementari S3.3 Taula S1 i Figura S1; Secció experimental 5.5-5.7**). Seguidament, s'avaluaren les seves propietats sintètiques respecte als biocatalitzadors de referència FSA A129S/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/A165G/S166G.

A fi de simplificar l'estudi de cribratge, es seleccionaren com a substrats α -etil i α -propil (*S*)-**1f**, (*R*)-**1g** i els cíclics (*S*)-**1m** i (*S*)-**1p**, representatius de la col·lecció de *N*-Cbz-aminoaldehyds (**Figures 3.3.2 i 3.3.3**). En la **Figura 3.3.7** es mostren els

percentatges d'adductes aldòlics de GO obtinguts gràcies a les noves variants generades.

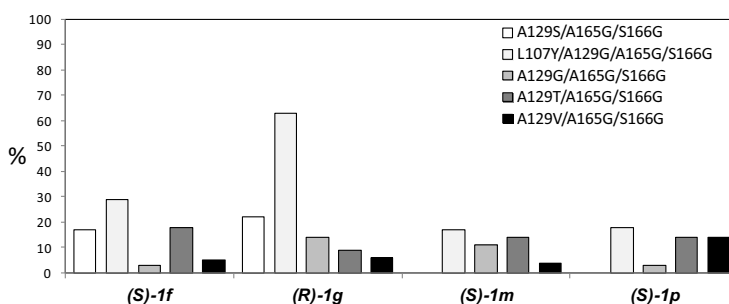


Figura 3.3.7. Representació gràfica de les conversions aldòliques (%) obtingudes en les addicions aldòliques de GO als *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats. S'avaluen els efectes sinèrgics de la combinació de les modificacions A165G/S166G amb les modificacions A129G, A129T, A129V o L107Y/A129G en la FSA. Valors obtinguts després de 24 hores de reacció, mesurat per HPLC emprant un mètode estàndard extern. Per a més informació veure **Secció experimental 5.9.3.2b**.

Es corroborà l'augment en l'afinitat pel GO amb les modificacions L107Y/A129G, A129G, A129T i A129V en la FSA respecte a A129S. Amb els substrats cíclics (S)-1m i (S)-1p, no s'observa producte aldòlic amb la variant triple FSA A129S/A165G/S166G i sí per la resta estudiades (**Figura 3.3.7**).

Tanmateix, les noves variants rendiren valors més baixos respecte a FSA L107Y/A129G/A165G/S166G. El cas més evident el mostrà el substrat C α -propil (R)-1g, on la conversió amb el biocatalitzador quàdruple és del 60 % i, per la resta, menor del 20 %. Ara bé, la FSA A129T/A165G/S166G sí exhibí una capacitat catalítica similar a la variant quàdruple front els substrats acceptors cíclics (**Figura 3.3.7**).

En relació a FSA A129G/A165G/S166G, l'afinitat pels substrats resultà força inferior que a la quàdruple FSA L107Y/A129G/A165G/S166G (**Figura 3.3.7**). Com s'advertí prèviament en el nostre grup, la doble modificació A129G/A165G genera un espai massa voluminós en el centre actiu de la FSA.¹⁴¹ Aquest fet comporta una pèrdua en les interaccions entre els substrats aldòlics i els residus catalítics enzimàtics. En canvi, la combinació L107Y/A129G dota de compactació i robustesa a la variant quàdruple.

Per tant, es reafirmà el biocatalitzador FSA L107Y/A129G/A165G/S166G com el més adient per a les addicions aldòliques creuades de GO estudiades i s'establí com a plataforma per a les subsegüents modificacions.

3.3.4 ESTUDI DE NOVES MODIFICACIONS EN EL CENTRE CATALÍTIC DE LA FSA PER ENGINYERIA DE PROTEÍNES PER A INCREMENTAR L'ACTIVITAT FRONT *N*-CBZ-AMINOALDEHIDS

Arribats en aquest punt, es procedí a substituir les posicions inèdites de l'arginina 134 (R134), l'alanina 164 (A164) i fenilalanina 167 (F167) per mutagènesi de lloc dirigit del centre catalític de l'aldolasa FSA a fi d'incrementar la capacitat sintètica del biocatalitzador en les addicions aldòliques d'interès, en especial pels *N*-Cbz-aminoaldehyds amb substituents voluminosos en C- α o cíclics. Aquestes posicions, R134, A164 i F167, es troben en el supòsit lloc d'unió del substrat acceptor segons els models cristal·logràfics de la proteïna (**Figura 3.3.8**), tal com S166.

Les modificacions s'efectuaren sobre les variants prèviament descrites FSA A129S/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/A165G/S166G.

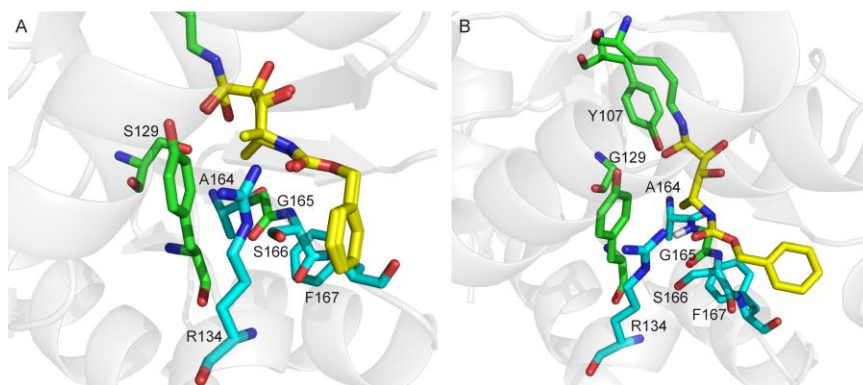


Figura 3.3.8. A) Modelat dels complexos hemiaminals de (5*R*)-i (5*S*)-*N*-Cbz-alaninal (en groc) units a la lisina K85 catalítica del centre actiu de la variant FSA A129S/A165G (B) modelat del complex hemiaminal de (5*R*)-*N*-Cbz-alaninal (en groc) unit a la lisina K85 catalítica del centre actiu de la variant FSA L107Y/A129G/A165G. El residu S166 i els considerats a substituir per mutagènesi dirigida, és a dir, R134, A164 i F167, es mostren en cian.

A continuació s'exposen les raons per a cada una de les modificacions:

- **R134V:** El residu de l'arginina R134 es troba orientat al centre actiu de la FSA, juxtaposat al residu catalític essencial tirosina 131 (Y131). El catió guanidini de la cadena lateral possiblement interacciona amb el grup fosfat del substrat natural de l'enzim, *D*-gliceraldehid-3-fosfat, per tal d'estabilitzar-lo. Al tractar-se d'un residu gran i catiònic, podria limitar l'aproximació dels aldehyds voluminosos no aniònics al lloc d'unió del complex enzim-donador. Un indicatiu d'això el trobem en el treball de Samland i col·laboradors, on generaren la variant

TaIB F178Y/R181E.¹⁴⁴ Aquesta variant presentà una activitat d'aldolasa dues vegades major per substrats no fosforilats, com el D-gliceraldehid, gràcies a la modificació R181E respecte a la variant simple. Recordem que el centre catalític de la TaIB i la FSA són molt similars i que el residu TaIB R181 equival a la FSA R134.¹⁴⁹

D'altra banda, aquest residu fou modificat prèviament en el nostre grup per una alanina, generant la variant FSA R134A, amb el mateix propòsit que en el present treball.²¹² Tot i que la variant simple no rendí resultats positius, es desconeixien els efectes sinèrgics que pugui tenir aquesta modificació en combinació amb la resta de modificacions de les plataformes de biocatalitzadors dissenyats.

Així doncs, es substituï per una valina a fi d'incrementar l'espai i flexibilitat en el centre actiu i potenciar les interaccions hidrofòbiques i no iòniques en aquesta posició.

- **A164G:** Es substituï l'alanina 164 per una glicina, seguint el mateix criteri que per la modificació de la posició veïna A165G. De nou, es pretenia crear més espai i flexibilitat en el centre actiu de l'aldolasa.
- **F167A i F167V:** Aquest residu voluminós es troba en el lloc d'unió de l'aldehid acceptor i es substituï per una alanina o valina a fi de crear més espai en el lloc d'unió de l'electròfil. La substitució per la valina pretén conservar un mica més l'estructura original de la fenilalanina.

En primer terme, es generaren les variants dirigides a GO, és a dir, a partir de FSA L107Y/A129G/A165G/S166G. Doncs, es dissenyaren i expressaren les variants FSA L107Y/A129G/R134V/A165G/S166G, FSA L107Y/A129G/A164A/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/A165G/S166G/**F167X** on X: A o V (Veure **Material Suplementari S3.3 Taula S1 i Figura S1B; Secció experimental 5.5-5.7**).

A continuació s'avaluaren les seves capacitats sintètiques en les addicions aldòliques d'interès, seleccionant com a substrats (R/S)-**1f**, (R/S)-**1g** i els cíclics (R/S)-**1m** i (R/S)-**1p** (**Figures 3.3.2 i 3.3.3**). No es realitzaren els cribratges a tota la col·lecció de N-Cbz-aminoaldehids per tal de simplificar i reduir el temps d'estudi. La gràfica dels resultats obtinguts es presenta tot seguit (**Figura 3.3.9**).

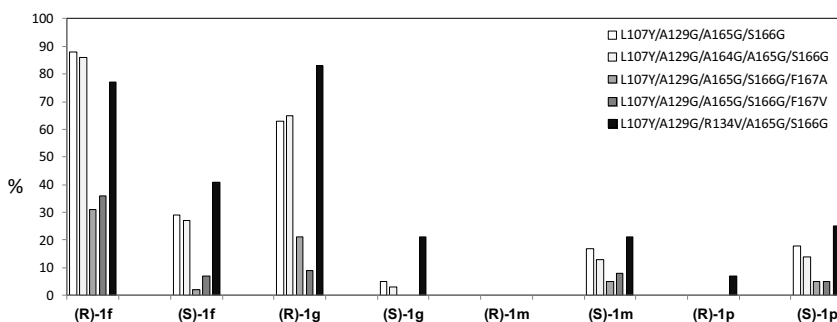


Figura 3.3.9. Representació gràfica de les conversions aldòliques (%) obtingudes en les addicions aldòliques de GO als *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats. S'avaluen les noves modificacions en la banda d'unió de l'aldehid acceptor R134V, A164A, F167A i F167V, realitzades en la variant amb activitat incrementada pel GO FSA L107Y/A129G/A165G/S166G. Valors obtinguts després de 24 hores de reacció, mesurat per HPLC emprant un mètode estàndard extern. Per a més informació veure **Secció experimental 5.9.3.2b**.

La introducció de la substitució A164G en la plataforma no tingué cap efecte notable en la catàlisi enzimàtica del nou biocatalitzador respecte al de referència. Els valors de les conversions aldòliques foren similars i, per tant, es deduí que el residu A164 no presenta cap interacció negativa amb els substrats acceptors. Aquest resultat es podria haver anticipat per l'observació de l'orientació del grup metil de A164 en l'estructura cristal·logràfica de la proteïna.¹³⁹

En canvi, la modificació de F167A si tingué un efecte dramàtic en l'activitat aldòlica de FSA L107Y/A129G/A165G/S166G/**F167A**. Els rendiments disminuïren en tots els casos respecte a la variant quàdruple, perdent inclús la seva activitat catalítica vers el substrat (S)-1g (**Figura 3.3.9**). Aquesta disminució podria ser causada per una pèrdua acusada de la rigidesa en el centre actiu. Per tal de disminuir aquesta flexibilitat, es dissenyà la variant FSA L107Y/A129G/A165G/S166G/**F167V**, intentant conservar una mica més l'estructura del residu original fenilalanina. Tanmateix, aquesta nova variant també presentà activitats molt més baixes respecte a la quàdruple en les reaccions d'estudi (**Figura 3.3.9**).

En canvi, la modificació de l'arginina 134 per una valina resultà ser molt beneficiosa. Els rendiments de les conversions aldòliques augmentaren per quasi bé en tots els *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats i inclús es detectà l'adducte aldòlic inèdit del substrat cíclic (R)-1p.

Paral·lelament es dissenyaren i expressaren les variants quàdruples FSA A129S/A165G/S166G/**F167A** i A129S/**R134V**/A165G/S166G dirigides a les reaccions amb donador cetònics DHA i HA, i s'avaluaren els seus potencials sintètics (**Figura 3.3.9**). Es prengué com a referència la triple variant FSA A129S/A165G/S166G i com a acceptors, (R/S)-1f, (R/S)-1g, (R/S)-1m i (R/S)-1p (**Figures 3.3.2 i 3.3.3**).

Tal com en les addicions amb GO, també el nou biocatalitzador amb la modificació R134V (FSA A129S/R134V/A165G/S166G) mostrà increments en les conversions de les reaccions aldòliques en tots els casos respecte a la variant triple de referència (**Figura 3.3.10**). Els increments amb els donadors DHA i HA foren inclús superiors als presentats amb GO (**Figura 3.3.9**).

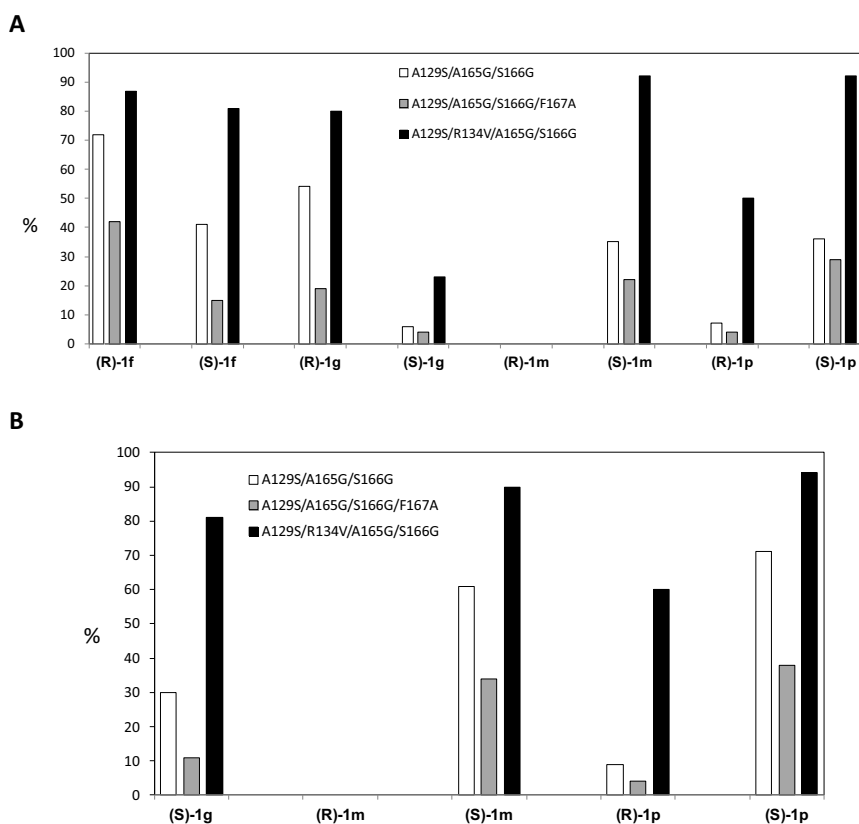


Figura 3.3.10. Representació gràfica de les conversions aldòliques (%) obtingudes en les addicions aldòliques de DHA (**A**) o HA (**B**) als *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats. S'avaluen les noves modificacions en la banda d'unió de l'aldehid acceptor R134V i F167A, realitzades en la variant amb activitat incrementada per DHA o HA GO FSA A129S/A165G/S166G. Valors obtinguts després de 24 hores de reacció, mesurat per HPLC emprant un mètode estàndard extern. Per a més informació veure **Secció experimental 5.9.3.2b**.

Per exemple, les conversions amb DHA i (S)-**1m** passà de valors moderats (35 %) a quasi bé quantitativs (90 %). També s'incrementaren notablement les conversions amb (R)-**1p**, de valors merament detectables (5-10 %) a bons (50-60 %). Ara bé, cap de les noves variants toleraren l'aldehid conformacionalment més restringit (R)-**1m** (**Figura 3.3.9 A i B**).

La introducció de la modificació F167A, en canvi, suposà de nou una pèrdua important de la capacitat catalítica. Doncs, es conclou que les modificacions realitzades en el lloc d'unió del substrat acceptor del centre actiu tenen la mateixa repercussió en ambdues plataformes, FSA A129S/A165G/S166G i L107Y/A129G/A129S/A165G/S166G.

Conseqüentment, no es seguí l'estudi en les posicions A164 ni F167, i es centrà exclusivament en la posició R134.

3.3.5 ESTUDI DE LA POSICIÓ R134 DE FSA EN LES PLATAFORMES FSA A129S/A165G/S166G I FSA L107Y/A129G/A165G/S166G

Els resultats preliminars obtinguts de la modificació R134V ens impulsaren a investigar més profundament aquesta posició i l'efecte de les substitucions en les conversions aldòliques. D'entrada, es generaren la col·lecció de variants FSA A129S/R134X/A165G/S166G amb els residus X= A, G, S i E de forma racional, és a dir, per mutagènesi de lloc dirigit (**Apartat 3.3.5.1.1**). En vista dels bons resultats obtinguts, es decidí realitzar el mateix però pel GO, creant així la col·lecció de variants FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G (**Apartat 3.3.5.1.2**). Tot seguit, i per tal d'estudiar plenament aquesta posició, es dugué a terme un estudi per mutagènesi de lloc per saturació (**Apartat 3.3.5.2**).

En el **Material Suplementari S.3.3** es poden consultar les activitats enzimàtiques específiques de cada una, així com els gels de SDS-PAGE (**Taula S1 i Figura S1**).

Paral·lelament, s'avaluaren les propietats sintètiques de cada una de les noves variants produïdes front els corresponents donadors i els N-Cbz-aminoaldehids seleccionats. En els **Apartats 3.3.5.3 i 3.3.5.4** s'exposen els resultats obtinguts a escala analítica.

3.3.5.1 GENERACIÓ RACIONAL DE NOVES VARIANTS DE FSA EN R134 PER MUTAGÈNESI DE LLOC DIRIGIT

3.3.5.1.1 FSA A129S/R134X/A165G/S166G on X= A, G, S i E

L'estudi incipient de la modificació R134V (**Apartat 3.3.4**) suggerí que amb el canvi s'havia dotat de més espai i flexibilitat en el centre actiu per encabir aldehids voluminosos. A més, s'eliminà la carga iònica del grup bàsic guanidini i es potenciaren les interaccions hidrofòbiques. En aquesta mateixa direcció, es decidí incorporar en aquesta posició una alanina (R134A) o una glicina (R134G), creant encara més espai.

Respecte a la substitució pel residu de serina (R134S), s'efectuà per tal de conèixer l'efecte del grup polar hidroxil en aquesta posició, alhora que també es creà un espai més gran en el centre actiu respecte l'arginina. Finalment, amb la substitució de l'arginina per l'àcid glutàmic (R134E), es pretenia crear l'espai requerit i determinar la repercussió de la introducció d'una càrrega negativa en la posició d'estudi.

Per començar es crearen les quatre variants dirigides als donadors DHA i HA, és a dir, FSA A129S/R134X/A165G/S166G on X: A, G, S i E. Tanmateix, la variant amb la substitució R134G no s'expressà.

3.3.5.1.2 FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G on X= S i E

Seguidament, es construïren les variants FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G, on X: E i S, dirigides cap al donador GO. Les raons per les substitucions foren les mateixes que s'ha exposat per les variants homòlogues dirigides als donadors cetònics (**Apartat 3.3.4.1.1**).

La variant amb una alanina (R134A) en aquesta plataforma no fou dissenyada, ja que els resultats sintètics de la seva homòloga FSA A129S/R134A/A165G/S166G foren decebedors (Veure **Apartat 3.3.4.3**). En canvi, la variant X: G, tal com FSA A129S/R134G/A165G/S166G, es confirmà la seqüència per seqüenciació, però la proteïna tampoc s'expressà. Així doncs, aquests resultats podrien indicar que la supressió total de la cadena lateral de l'arginina podria tenir un efecte dramàtic en l'estabilitat i plegament correcte de llur proteïna.

3.3.5.2 GENERACIÓ DE NOVES VARIANTS DE FSA PER MUTAGÈNESI DE SATURACIÓ DE LLOC EN R134

3.3.5.2.1 Construcció de la genoteca FSA A129S/R134X/A165G/S166G

La biblioteca genòmica FSA A129S/R134X/A165G/S166G es construí emprant la degeneració VVB (V, A/C/G; B, C/G/T) en la posició R134. Amb aquesta degeneració s'obtenen 27 codons, la qual inclou els aminoàcids d'interès glicina (3 codons), histidina (3), treonina (3), asparagina (3), prolina (3), àcid aspàrtic (2), lisina (1) i glutamina (1). Alhora, queden inclosos els aminoàcids ja estudiats alanina (3), serina (2), àcid glutàmic (1), així com l'original arginina (4) (Veure procediment en **Secció experimental 5.7.7**). Per a l'expressió de les proteïnes, s'incubaren 80 colònies en una placa de 96 pous (600 µL de medi en cada pou) i s'incloué com a control positiu i de referència la variant FSA A129S/R134V/A165G/S166G.

Un cop expressades les proteïnes corresponents, s'assajaren les capacitats sintètiques de cada una vers les addicions aldòliques de HA i DHA als *N*-Cbz-aminoaldehids (*R*)-**1h** i (*S*)-**1p**, respectivament (**Figura 3.3.11**). Es seleccionaren aquestes dues reaccions aldòliques com a referència per tal de representar tan substrats ramificats com cíclics. Alhora, es simplificà la detecció, doncs les conversions d'ambdues reaccions foren elevades amb FSA A129S/R134V/A165G/S166G (Veure **Figura 3.3.10**). Es consideraren clons positius si mostraven conversions del mateix ordre o superiors al de referència, mesurats per HPLC.

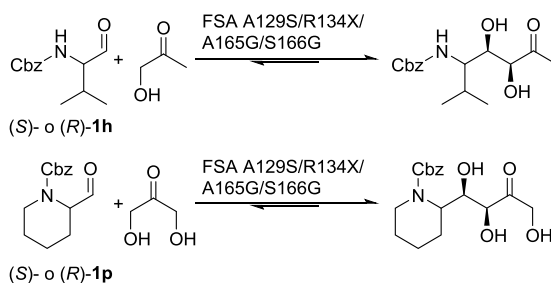


Figura 3.3.11. Reaccions seleccionades per al cribratge de clons positius en la genoteca FSA A129S/R134X/A165G/S166G.

A partir d'aquí es seleccionaren 11 clons positius de la placa mare i s'expressaren les proteïnes corresponents amb més volum de medi (12 mL). En el **Material Suplementari S3.3 Figura S2** es pot consultar el gel *SDS-PAGE* de la prova d'expressió corresponent. Seguidament es valoraren les capacitats sintètiques d'aquests 11 biocatalitzadors vers les addicions de HA i DHA als

N-Cbz-aminoaldehids (*R/S*)-1h i (*R/S*)-1p (Figura 3.3.11). En aquest segon cribratge s'incloueren els (*S*)-1h i (*R*)-1p per a incrementar la diversitat configuracional dels substrats estudiats.

A partir dels resultats en aquest darrer cribratge, es seleccionaren 6 clons positius de la placa mare i es seqüenciaren. Els plasmidis correspongueren a les noves variants FSA A129S/R134X/A165G/S166G on X: H (3 clons), P (2 clons) i A (1 clon).

En la Figura 3.3.12 es mostren els valors de les conversions aldòliques assolides per les variants més reeixides de FSA A129S/R134X/A165G/S166G, on X= A, P o H, en comparació a la de referència, X=V.

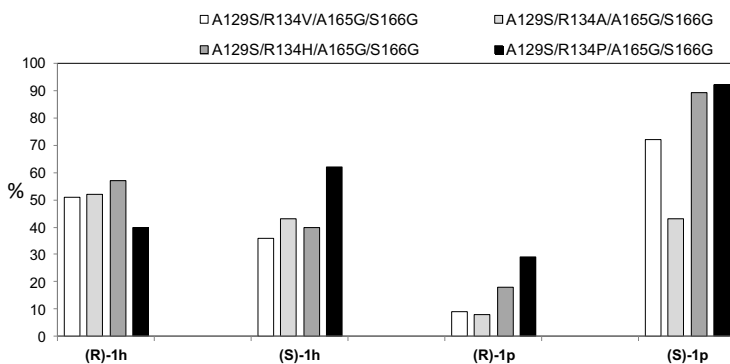


Figura 3.3.12. Representació gràfica de les conversions aldòliques (%) obtingudes en les addicions aldòliques de HA a (*R/S*)-1h i de DHA a (*R/S*)-1p. S'avaluen les capacitats sintètiques dels clons positius obtinguts en la genoteca FSA A129S/R134X/A165G/S166G. Valors obtingut després de 24 hores de reacció, mesurat per HPLC emprant un mètode estàndard extern. Per a més informació veure Secció experimental 5.9.3.3.

Els valors que s'obtingueren per a la FSA A129S/R134V/A165G/S166G de referència difereixen amb els que es presenten a continuació en l' **Apartat 3.3.5.3**. Cal tenir en compte que l'expressió i purificació dels enzims es realitzà per procediments diferents. A més, en aquest cas, es desconeix la quantitat exacte d'enzim present en el medi de reacció.

Ara bé, al emprar les mateixes condicions de producció i assaig de les diferents variants, els resultats indicaren que les noves variants FSA A129S/R134X/A165G/S166G on X= P i H presentaven una activitat catalítica millorada vers la variant control.

3.3.5.2 Construcció de les variants FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G, on X= P i H

Gràcies a la realització de la genoteca FSA A129S/R134X/A165G/S166G, trobarem les variants X=P i H com a interessants d'estudi. Doncs, es dissenyaren i expressaren les variants homòlogues FSA L107Y/A129G/R134P/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/R134H/A165G/S166G. Es seguí la premissa de què si les modificacions es realitzen en la banda de l'aldehid acceptor del centre actiu, aquestes també seran favorables en la plataforma de variants dirigides al GO, com es s'observà prèviament amb la modificació S166G (**Apartat 3.3.2**).

3.3.5.3 AVALUACIÓ DE LES CAPACITATS SINTÈTIQUES DE LES VARIANTS A129S/R134X/A165G/S166G EN LES ADDICIONS DE DHA O HA A N-CBZ-AMINOALDEHIDS SELECCIONATS

Les variants produïdes en els **Apartats** anteriors **3.3.5.1.1** i **3.3.5.2.1**, conjuntament als biocatalitzadors de referència FSA A129S/A165G/S166G i FSA A129S/R134V/A165G/S166G, s'assajaren front les addicions de DHA i HA a la col·lecció de *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats (**Figures 3.3.2** i **3.3.3**).

En les **Figures 3.3.13** i **3.3.14** es mostren els resultats més rellevants. La taula completa de resultats es pot consultar en el **Material Suplementari S3.3, Taula S2**.

En termes generals, es conclou que gràcies a les modificacions en R134 s'incrementaren els rendiments a adductes aldòlics per a tots els aldehids els quals eren substrats de la variant triple (FSA A129S/A165G/S166G), com permeté ampliar el ventall de substrats acceptors, no tolerats fins al moment. Altra vegada, l'afinitat de les noves variants pel donador cetònic HA foren superiors que per DHA (**Figures 3.3.12** i **3.3.13**).

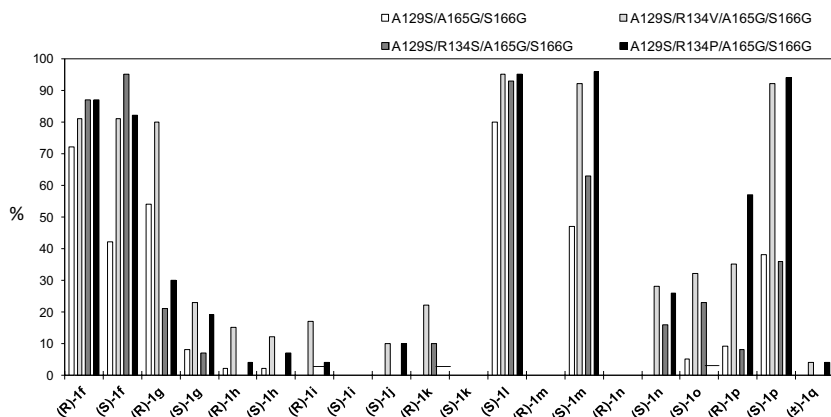


Figura 3.3.13. Representació gràfica de les conversions aldòliques (%) obtingudes en les addicions aldòliques de DHA als *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats. S'avaluen les noves modificacions en la posició R134. Valors obtinguts després de 24 hores de reacció, mesurat per HPLC emprant un mètode estàndard extern. —: No assajat. Per a més informació veure **Secció experimental 5.9.3.2a**.

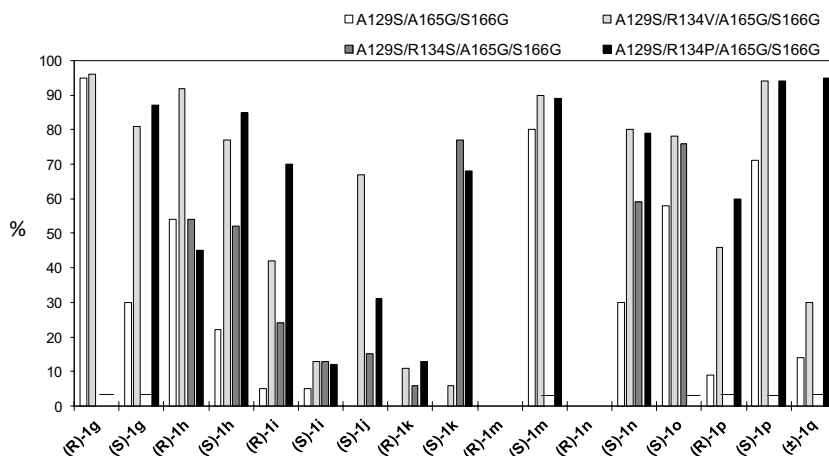


Figura 3.3.14. Representació gràfica de les conversions aldòliques (%) obtingudes en les addicions aldòliques de HA als *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats. No s'assagen *(R/S)*-1f ni *(S)*-1l atès que els rendiments amb la triple variant FSA A129S/A165G/S166G són quantitius. S'avaluen les noves modificacions en la posició R134. Valors obtinguts després de 24 hores de reacció, mesurat per HPLC emprant un mètode estàndard extern. —: No assajat. Per a més informació veure **Secció experimental 5.9.3.2a**.

Les variants que mostraren conversions més elevades foren FSA A129S/R134X/A165G/S166G, on X= V o P. En casos puntuals també exhibí bons resultats la variant amb R134S. En canvi, les variants amb l'alanina (R134A), l'àcid aspàrtic (R134E) o la histidina (R134H) rendiren conversions aldòliques

més baixes, respecte a R134V o R134P (Veure **Material suplementari S3.3 Taula S2**).

Referent a la preferència dels substrats acceptors, la tendència no es vegué modificada, és a dir, foren més bons substrats els (*R*)-substituïts en el C- α dels *N*-Cbz-aminoaldehids lineals i ramificats i els (*S*)-*N*-Cbz-aminoaldehids cíclics. Un bon exemple d'això foren les conversions quantitatives dels adductes aldòlics de (*S*)-**1m**, mentre que pel seu enantiòmer (*R*)-**1m**, no es detectaren en cap cas.

A continuació es desglossa la informació extreta de les **Figures 3.3.12 i 3.3.13** i de les **Taules S2 i S3** presents en el **Material Suplementari S3.3**, segons les característiques estructurals dels *N*-Cbz-aminoaldehids. Les corresponents reaccions aldòliques es troben representades en les **Figures 3.3.2 i 3.3.3**.

N-Cbz-aminoaldehids amb substituents en C- α lineals o ramificats:

- Per a les addicions de DHA als *N*-Cbz-aminoaldehids amb substituent α -etil (*R/S*)-**1f**, les conversions més elevades s'obtenen amb les variants que contenen la modificació R134S, P o V, respecte a la resta de variants assajades.
- Pels *N*-Cbz-aminoaldehids amb substituent α -propil (*R/S*)-**1g** o amb substituent en C- α ramificats apolars (*R/S*)-**1h**, (*R/S*)-**1i**, (*S*)-**1j** es compleix de forma general que les conversions més elevades s'obtenen amb les variants que contenen la modificació R134P o V, respecte a la resta de variants assajades.
- A partir dels dos punts anteriors es conclou que al crear més espai en R134, s'augmentaria la tolerància front substrats amb substituents C- α voluminosos, a excepció del residu d'alanina. La modificació R134A podria comportar una pèrdua de consistència i/o rigidesa en aquesta posició i disminuir així les capacitats sintètiques de la variant. En canvi, la modificació R134S incrementaria l'espai per encabir-hi el substituent C α -etil de (*R/S*)-**1f**, però presentaria repulsions estèriques amb cadenes més voluminoses. Finalment, el residu de valina o prolina dotarien al centre actiu de més espai per acomodar els diferents substituents del C- α assajats.
- En relació a *N*-Cbz-(2*S*,3*R*)-**1k**, s'aconseguien conversions elevades amb HA catalitzades per FSA A129S/R134S/A165G/S166G (77 %) o FSA A129S/R134P/A165G/S166G (68 %). En canvi, pel seu enantiòmer (2*R*,3*S*)-**1k** les conversions foren minses, de tant sols un 22 % amb A129S/R134V/A165G/S166G. Doncs, es tractaria d'una excepció en la preferència de la FSA pels (2*R*)-*N*-Cbz-aminoaldehids. Aquest fet es

podria explicar per la formació d'un pont d'hidrogen entre el residu de serina amb la cadena polar del C- α de (2*S*,3*R*)-**1k**, o bé amb algun altre residu polar disponible atesa la nova disposició espacial del substrat com a conseqüència de la modificació R134S o P. Tanmateix, no es detectà producte aldòlic de l'addició de DHA a aquest substrat amb cap biocatalitzador.

N-Cbz-aminoaldehids amb substituents en C- α cíclics:

- Per a tots ells es varen obtenir conversions més elevades amb les variants que contenen la modificació R134P, V o H, respecte a la resta de modificacions assajades. Per exemple, els rendiments foren quantitatius per les addicions de DHA a (*S*)-**1m** i (*S*)-**1p**, les quals eren de 47 i 38 % respectivament amb FSA A129S/A165G/S166G.
- Les conversions del substrat piperidínic *N*-Cbz-(*R/S*)-**1p** foren més elevades respecte als substrats pirrolidínics, probablement causat per una major flexibilitat de l'anell de sis baules respecte al conformacionalment més restringit de cinc. Un bon exemple d'això és que s'obtingueren els pressuposats adductes aldòlics de (*R*)-**1p** amb ambdós donadors i en conversions elevades (57-60 %), però cap amb (*R*)-**1m**.

N-Cbz-aminoaldehids amb substituents en C- β

- La conversió del producte aldòlic de DHA i (*S*)-**1l** augmentà del 80 % amb la triple variant de referència a valors quantitatius amb qualsevol de les variants assajades amb modificació en la posició R134.
- Respecte al racèmic (\pm)-**1q**, la variant FSA A129S/R134P/A165G/S166G resultà clau per a l'obtenció de rendiments quantitatius amb HA. L'enzim no mostrà enantioespecificitat front l'aldehid, ja que s'obtingueren mesclades 1:1 dels productes aldòlics (**21c i d**, **Figura S21**, **Material Suplementari S3.4**). Ara bé, els adductes aldòlics amb DHA foren tot just detectables (<5 % de conversió).

En darrer lloc, i vist els resultats positius obtinguts amb els substrats cíclics hidroxilats (4*R*)-OH (*S*)-**1n** i (3*S*)-OH (*S*)-**1o** (**Figura 3.3.13**), es provà el *N*-Cbz-(2*S*,3*R*,4*R*)-2-formil-3,4-dihidroxipirrolidina ((*S*)-**1r**) com a substrat de l'enzim (**Figura 3.3.14**). Aquest derivat aldehídic es sintetitzà a partir del 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinol (DAB), el qual s'obté eficaçment per l'addició

aldòica de DHA a *N*-Cbz-glicinal catalitzada per FSA.¹⁵⁵ No obstant, cap de les variants de FSA el tolerà.

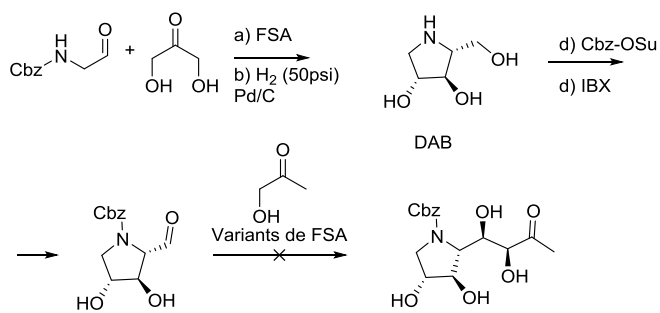


Figura 3.3.14. Esquema de l'addició aldòica de HA a *N*-Cbz-(2*S*,3*R*,4*R*)-2-formil-3,4-dihidropirrolidina ((*S*)-**1r**) catalitzada per variants de FSA. (*S*)-**1r** s'obté a partir de DAB, el qual es sintetitzat quimioenzimàticament a partir de *N*-Cbz-glicinal i DHA.

3.3.5.4 AVALUACIÓ DE LES CAPACITATS SINTÈTIQUES DE LES VARIANTS L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G EN LES ADDICIONS DE GO A *N*-CBZ-AMINOALDEHIDS SELECCIONATS

De la mateixa manera que en l'apartat anterior, es varen assajar les capacitats sintètiques de les variants generades en els **Apartats 3.3.5.1.2** i **3.3.5.2.2** i FSA L107Y/A129G/R134V/A165G/S166G per a les addicions creuades de GO a la col·lecció de *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats (**Figures 3.3.2** i **3.3.3**). Es compararen els valors amb els prèviament obtinguts amb l'aldolasa de referència FSA L107Y/A129G/A165G/S166G (**Figura 3.3.14** i **Taula S3** del **Material Suplementari S3.3**).

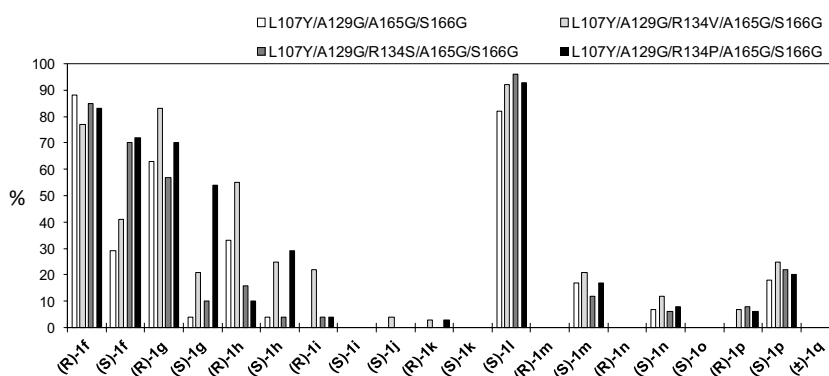


Figura 3.3.14. Representació gràfica de les conversions aldòliques (%) obtingudes en les addicions aldòliques creuades de GO als *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats. S'avaluen les noves modificacions en la posició R134. Valors obtinguts després de 24 hores de reacció, mesurat per HPLC emprant un mètode estàndard extern. Per a més informació veure **Secció experimental 5.9.3.2b**.

Arran dels resultats obtinguts, es pot afirmar que la modificació en R134 ha permès incrementar les conversions aldòliques creuades d'estudi. Les variants que proporcionaren els millors resultats foren FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G, on X= V o P, amb plena concordança amb els resultats anteriors pels donadors cetònics. De la mateixa manera, les preferències cap als substrats acceptors no es veieren alterades respecte a la variant quàdruple FSA L107Y/A129G/A165G/S166G.

L'increment en les conversions amb el donador aldehídic no fou tant pronunciat com amb els derivats cetònics. Tanmateix, si s'observà una millora notable amb els substrats (S)-1f-h i (±)-1q. En el primer cas ((S)-1f), s'incrementà la conversió d'un 17 % amb la quàdruple variant a un 72 %. Pel que fa a (S)-1g, (S)-1h i (±)-1q, s'aconseguien conversions de 54 %, 29 % i 26 %, respectivament, amb la nova variant FSA L107Y/A129G/R134P/A165G/S166G (**Figura 3.3.14**).

3.3.6 CONCLUSIONS

En aquest estudi es presenta una expansió sense precedents en la tolerància de substrats acceptors de la FSA en addicions aldòliques dels donadors α -hidroxicarbonílics DHA, HA i GO a diversos *N*-Cbz-aminoaldehids voluminosos. Aquesta expansió es dugué a terme mitjançant el redisseny racional del centre actiu, gràcies als models cristal·logràfics de la proteïna.

En termes generals, l'afinitat de les variants de FSA pels substrat donadors influència fortament en la tolerància del biocatalitzador vers els substrats acceptors. Els rendiments analítics foren molt més elevats per HA, respecte a DHA o GO.

En primer lloc, les noves variants amb la substitució S166G, és a dir, FSA A129S/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/A165G/S166G mostraren conversions més elevades en les reaccions d'interès respecte a les variants sense la modificació.

Seguidament, les noves variants FSA A129S/R134X/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G on X= V, P i en casos puntuals S, foren les que rendiren conversions més elevades i incrementaren les conversions respecte a les variants sense la modificació. Per exemple, en foren substrat amb rendiments quantitatius els *N*-Cbz-aminoaldehids amb substituent α -isopropil o derivats carbaldehids de piperidines i pirrolidines.

Gràcies al nou canvi de l'arginina 134 en la seqüència de la FSA pels aminoàcids valina, serina o prolina, es dotà al centre actiu de més espai i flexibilitat. En el cas concret del residu de serina, a més, es podria formar un nou enllaç d'hidrogen. En canvi, amb la prolina, s'estaria modificant la distribució dels residus en el centre actiu. Ara bé, es requeririen estudis computacionals addicionals per a poder verificar aquestes hipòtesis.

En definitiva, es reafirma un cop més que amb petites modificacions en el centre actiu de l'enzim es poden incrementar enormement les capacitats sintètiques associades. Convé destacar que, gràcies a aquest estudi, es fa possible la síntesi quimioenzimàtica d'una extensa col·lecció d'iminosucres mono i bicíclics polihidroxilats mitjançant l'etapa clau d'addició aldòlica. Les síntesis es presenten a continuació en el **Capítol 3.4**.

3.4

**SÍNTESI DE NOUS IMINOCICLITOLS MONO
I BICÍCLICS POLIHIDROXILATS
MITJANÇANT VARIANTS DE FSA**

**ESTUDI DE LA CONFIGURACIÓ
ESTRUCTURAL DELS NOUS COMPOSTOS I
DE LA ESTEREOSELECTIVITAT DE LA FSA**

Com s'ha mencionat en la introducció (**Apartat 1.2**) i en el **Capítol 3.1**, la importància dels iminociclitols polihidroxilats rau en les potencials capacitats inhibidores de glicosidases i glicosiltransferases. Es mostren les estructures mono- o bicíclics d'alguns exemples en la **Figura 3.4.1**. Actualment, els esforços en el sector farmacèutic es dirigeixen a la síntesi d'aquests compostos de segona generació, és a dir, amb elevada diversitat estructural i configuracional a fi d'encabir més dianes terapèutiques i amb activitats i selectivitats incrementades.⁵⁹ Així doncs, el disseny de noves rutes sintètiques d'aquests compostos és de gran interès tan per a la investigació com per a la indústria.

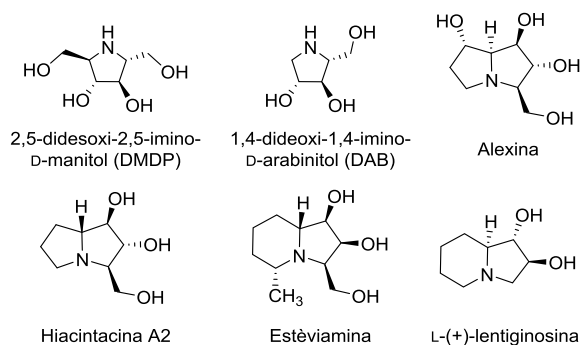


Figura 3.4.1. Exemples d'iminosucres naturals inhibidors de glicosidases i glicosiltransferases amb esquelets pirròlics, pirrolizidínics o indolizidínics.

Fins a l'actualitat, s'han publicat excel·lents treballs de síntesi quimioenzimàtica d'iminociclitols mono i bicíclics emprant aldolases, així com l'avaluació de les seves propietats biològiques i terapèutiques.^{40, 110} Com s'ha vist en l'**Apartat 1.3.3.2**, principalment s'han utilitzat aldolases dependents de DHAP per a construir estereoselectivament les estructures polihidroxilades, on el nostre grup de recerca ha tingut un paper destacat en aquesta tasca.^{124, 133, 135-137, 155, 213} Fins a dia d'avui, però, no s'han publicat síntesis d'iminociclitols emprant el biocatalitzador FSA en una sola etapa clau d'addició aldòlica.

A continuació es presenta la producció d'una gran varietat funcional i configuracional d'iminociclitols mono- i bicíclics polihidroxilats, gràcies a les noves variants de FSA generades per enginyeria genètica (**Capítol 3.3**). A més, la caracterització dels compostos sintetitzats permetrà en un futur profunditzar en el coneixement del mecanisme catalític d'aquest potent biocatalitzador.

3.4.1 SÍNTESI QUIMIOENZIMÀTICA I CARACTERITZACIÓ D'IMINOCICLITOLS POLIHIDROXILATS CATALITZADES PER VARIANTS DE FSA

L'estratègia sintètica proposada per a la preparació dels iminociclitols d'interès consistí de tant sols dues etapes a partir de substrats simples. En primer lloc, l'etapa clau d'addició aldòlica dels donadors α -hidroxicarbonílics a *N*-Cbz-aminoaldehids catalitzada per variants de FSA. Aquestes reaccions foren estudiades en profunditat a escala analítica en el **Capítol 3.3**. La segona etapa es tractà de la desprotecció del grup Cbz i l'aminació reductora intramolecular en un sol pas.

Com es veurà a continuació, aquesta estratègia permet la construcció de nombroses i innovadores estructures polihidroxlades pirrolidíniques, piperidíniques, pirrolizidíniques, indolizidíniques i quinolizidíniques de forma simple i eficaç. Els compostos finals contenen fins a 4 centres estereogènics, tres d'ells generats durant la ruta sintètica.

3.4.1.1 SÍNTESI A ESCALA PREPARATIVA D'IMINOCICLITOLS A PARTIR DE COMPOSTOS α -HIDROXICARBONÍL-LICS I *N*-CBZ-AMINOALDEHIDS VOLUMINOSOS

Donada la gran quantitat de reaccions estudiades a nivell analític (**Capítol 3.3**), es seleccionaren 31 d'aquestes addicions aldòliques fruit de diferents combinacions dels donadors DHA, HA i GO als *N*-Cbz-aminoaldehids estudiats. S'escolliren les que presentaren conversions a adductes aldòlics més elevades, o bé, per l'interès de l'iminociclitol final (s'exposa més endavant les raons sintètiques en cada cas, segons els donadors emprats).

En les **Figures 3.4.2, 3.4.3 i 3.4.4** s'exposen les síntesis d'iminoiciclitols dutes a terme, classificades segons si el donador és DHA, HA i GO, respectivament. Les variants de FSA escollides per la primera etapa corresponen a FSA A129S/R134X/A165G/S166G o FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G, on X= R, S, V o P, les quals exhibiren els millors rendiments.

Es realitzaren les addicions aldòliques de DHA, HA o GO als aldehids seleccionats a fi d'obtenir 35-150 mg de producte iminociclitol final (**Figures 3.4.2, 3.4.3 i 3.4.4**). Les reaccions es realitzaren sota les condicions establertes en el cribratge preliminar, sense optimitzar les condicions de reacció ni els procediments de purificació. Els detalls experimentals es troben explicats en l'**Apartat 5.11** de la **Secció experimental**. Els cromatogrames HPLC corresponents es troben inclosos en el **Material suplementari S3.4 Figures S1 a S31**.

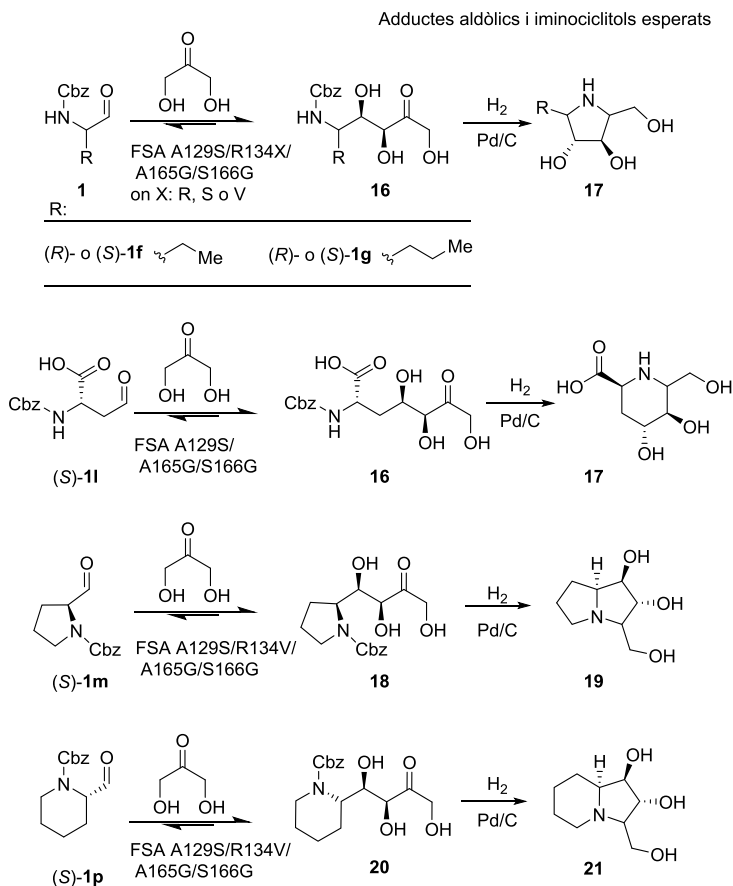


Figura 3.4.2. Esquema de les síntesis d'iminoiclitols amb etapa clau d'addició aldòlica de DHA (100 mM) als *N*-Cbz-aminoaldehids (80 mM) seleccionats, catalitzades per variants de FSA A129S/R134X/A165G/S166G on X= R, S o V. (3.0 mg de proteïna total·mL⁻¹ reacció).

Es seleccionaren els *N*-Cbz-aminoaldehids (*R/S*)-**1f**, (*R/S*)-**1g**, (*S*)-**1l**, (*S*)-**1m** i (*S*)-**1p** per a les addicions amb DHA (**Figura 3.4.2**). Totes aquestes reaccions presentaren conversions aldòliques excel·lents a escala analítica (87-96 %), a excepció de (*S*)-**1g** (23 %). Aquest darrer s'escalà a fi d'obtenir més informació relativa al mecanisme catalític amb substrats amb substituents lineals en C- α amb configuració S.

Diastereoisòmers i enantiòmers dels iminociclitols finals esperats (**Figura 3.4.2**) foren prèviament sintetitzats en el nostre grup, emprant RhuA i FucA amb la mateixa estratègia sintètica.^{124, 135-137} En aquest treball, ens proposarem construir una col·lecció complementària configuracionalment utilitzant FSA, a fi d'ampliar la diversitat d'iminoiclitols disponibles. En seria un clar exemple la

indolizina del tipus hiacintacines que s'obténdria a partir de *N*-Cbz-prolinal (**S**)-**1m** (Figura 3.4.2).¹³⁶

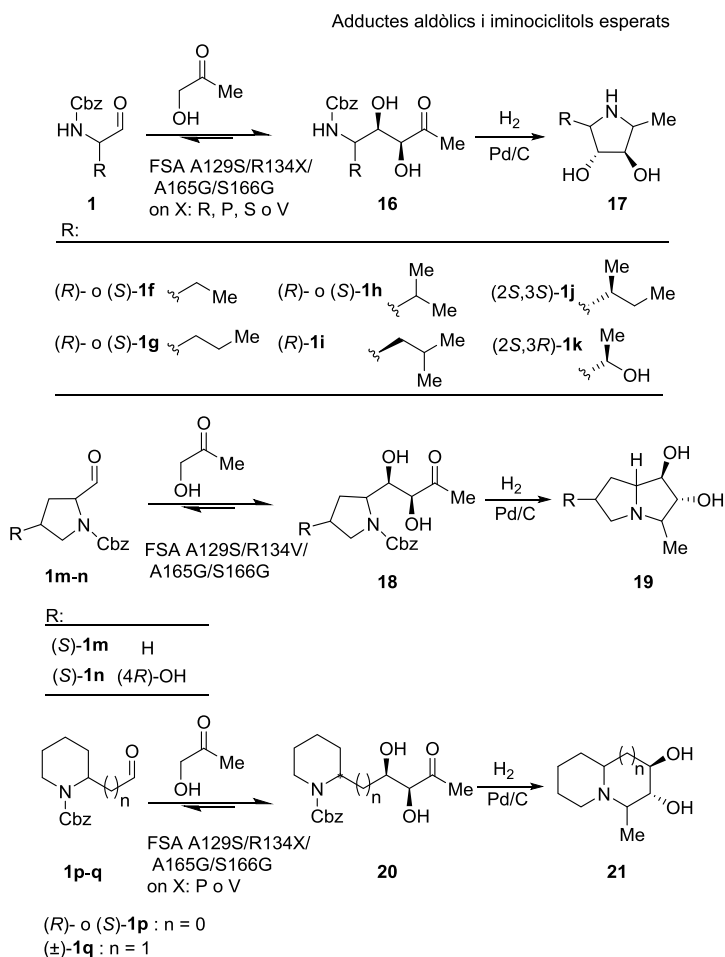
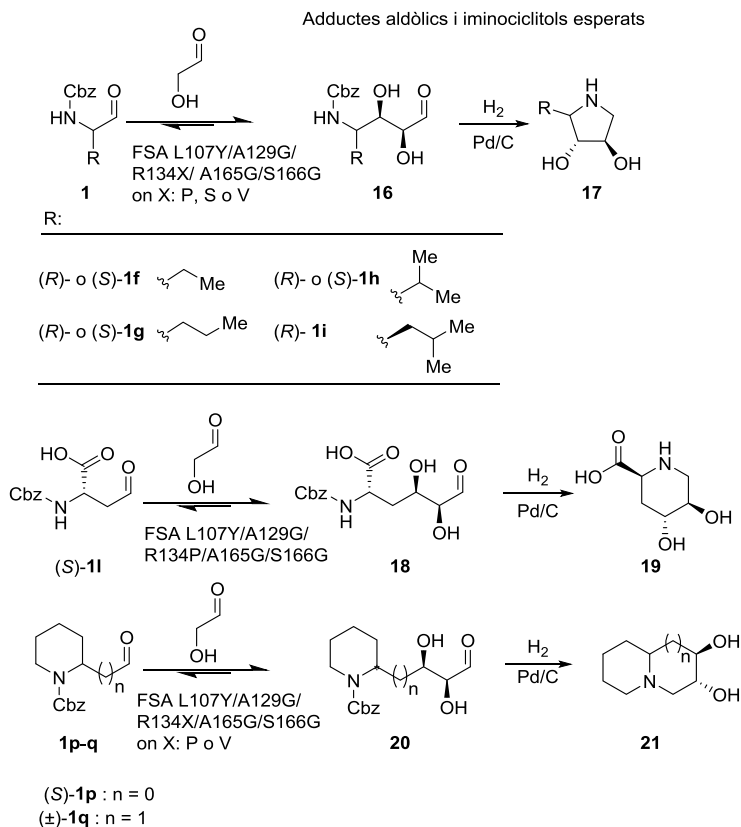


Figura 3.4.3. Esquema de les síntesis d'iminoiclitols amb etapa clau d'addició aldòlica de HA (100 mM) als *N*-Cbz-aminoaldehid (80 mM) seleccionats, catalitzades per variants de FSA A129S/R134X/A165G/S166G on X= R, S o V. (3.0 mg de proteïna total mL⁻¹ reacció).

Respecte a les addicions amb HA, es realitzaren catorze reaccions amb *N*-Cbz-aminoaldehid (*R/S*)-**1f**, (*R/S*)-**1g**, (*R/S*)-**1h**, (*R*)-**1i**, (*2S,3S*)-**1j**, (*2S,3R*)-**1k**, (*S*)-**1m**, (*S*)-**1n** (*R/S*)-**1p** i (\pm)-**1q** (Figura 3.4.3). A nivell analític presentaren valors de conversió de bons fins a quantitius (60-98 %). Els iminoiclitols finals esperats complementarien la col·lecció d'iminoiclitols anterior esmentada amb diversitat estructural.

Figura 3.4.4: Esquema de les síntesis d'iminoiclitols amb etapa clau d'addició aldòica de GO (100 mM) als *N*-Cbz-aminoaldehyds (80 mM) seleccionats, catalitzades per variants de FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G on X= P, S o V. (3.0 mg de proteïna total·mL⁻¹ reacció).



Finalment, les addicions amb GO es realitzaren pels *N*-Cbz-aminoaldehyds (*R/S*-**1f**, (*R/S*)-**1g**, (*R/S*)-**1h**, (*R*)-**1i**, (*S*)-**1l**, (*S*)-**1p** i (±)-**1q** (**Figura 3.4.4**). Tot i presentar conversions més baixes respecte als donadors cetònics (25-96 %), els productes finals esperats són molts d'ells estructures inèdites i d'interès sintètic. N'és un excel·lent exemple l'iminoiclitol de la classe de les lentiginosines que s'obtidria a partir de (*S*)-**1p** (**Figura 3.4.4**). El seu diastereoisòmer L-(+)-lentiginosina exhibeix activitat com a inductor d'apoptosis en cèl·lules tumorals.^{40, 214}

A continuació, els adductes aldòics es sotmeteren a la desprotecció de l'amina i l'aminació reductora per a obtenir els corresponents iminoiclitols mono o bicíclics finals. Com es mostra en la **Figura 3.4.5**, aquest procés té lloc en dues

etapes. La primera és l'hidrogenòlisi catalítica del grup Cbz, alliberant l'amina, la qual forma l'imina cíclica (base de Schiff) intramolecularment. La segona etapa és la reducció de la imina per donar lloc a l'iminociclitol. Ambdues reaccions tenen lloc simultàniament en presència del catalitzador metàl·lic Pd/C i H₂ (50 psi) i presenten generalment rendiments quantitius.

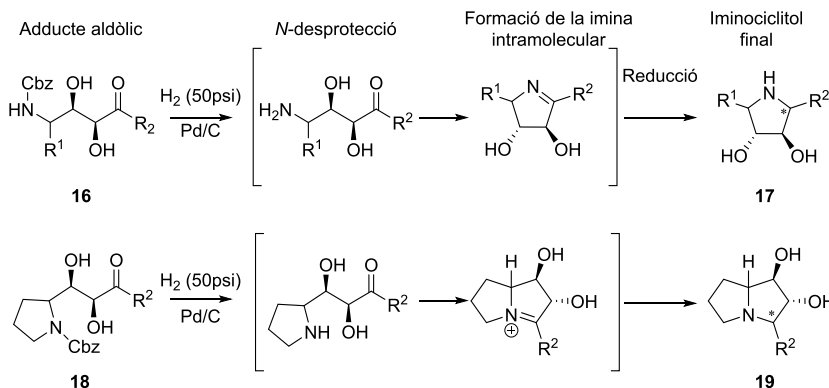


Figura 3.4.5. Esquema general de l'aminació reductora dels adductes aldòlics **16** i **17** amb H₂ (50 psi), Pd/C i la formació dels iminociclitols monocíclics pirròlics (**17**) o bicíclics pirrolidínics (**19**). R¹: substituent C- α del *N*-Cbz-aminoaldehyd de partida; R²: CH₂OH, CH₃, H.

En l'etapa d'aminació reductora, el pal·ladi es coordina amb el doble enllaç entre el nitrogen i el carboni i, posteriorment, es produeix l'atac estereoselectiu de l'hidrogen per la mateixa cara.^{208, 215} Així, en aquest pas, es crea un centre estereogènic addicional pels adductes aldòlics cetònics (R²: CH₂OH, CH₃, H, **Figura 3.4.5**).

3.4.1.2 ESTEREOQUÍMICA ESPERADA DELS IMINOCICLITOLS MONO I BICÍCLICS

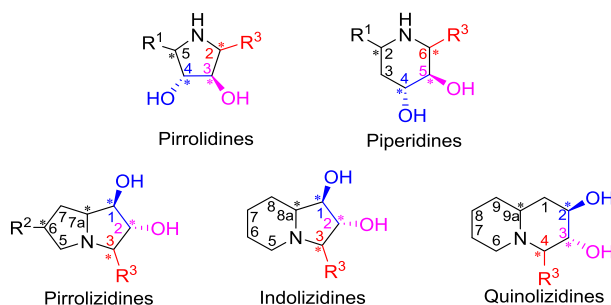
En la **Figura 3.4.6** es representen les estructures generals i la procedència dels centres estereogènics dels iminociclitols tipus pirrolidínics, piperidínics, pirrolidínics, indolizidínics i quinolizidínics esperats de l'estratègia proposada. En el transcurs d'aquesta estratègia es generen tres nous centres estereogènics.

Les configuracions en els carbonis que contenen els hidroxils (de color rosa i blau, **Figura 3.4.6**) són controlades enzimàticament. La configuració del centre acolorit en rosa en les estructures és fixa i ve determinada únicament pel tipus d'aldolasa, per tant, és independent del substrat acceptor o del transcurs de la reacció. Es genera en l'atac de l'enamina nucleòfila únicament per la cara enantiotòpica *Sí* d'aquesta a l'aldehyd acceptor. Des d'un punt de vista

mecanístic, l'atac per la cara contrària *Re* es troba impedita estèricament per l'estructura dels aminoàcids en el centre actiu.

La configuració del centre adjacent, acolorit en blau, depèn de la disposició de l'aldehid acceptor (aproximació per la cara *Re* o *Si*) durant l'atac de l'enamina nucleòfila (Veure mecanisme **Apartat 1.3.4**). En les aldolases, inclosa la FSA, la disposició adoptada pel complex enzim-donador només permet l'aproximació de l'electròfil per una de les dues cares enantiotòpiques, assegurant d'aquesta manera la correcta discriminació diastereofacial. La FSA exhibeix estereoselectivitat *sin* (>95 %, aproximació *Si-Si*) en tots els casos fins ara observats.¹⁴¹

Figura 3.4.6: Estructures generals i configuració dels centres estereogènics esperats dels iminociclitols mono i bicíclics sintetitzats a escala preparativa.



- * Centres generats durant l'aminació reductora
- ** Centres generats durant l'addició adòlica catalitzada per variants de FSA
- * Centres estereogènics procedents dels aldehids de partida

R¹ i R²: Substituents dels *N*-Cbz-aminoaldehids de partida

R³: CH₂OH, CH₃ o H, segons si el substrat donador és DHA, HA o GO, respectivament

En quant al centre estereogènic que conté el substituent R³ (en vermell, **Figura 3.4.6**), aquest es forma durant l'aminació reductora i depèn, en molts casos, de la estereoquímica de C-OH oposat (en blau). En sistemes d'anells de 5 o 6 baules, es coneix que la hidrogenació es realitza per la cara oposada a l'hidroxil del C4, independentment de la estereoselectivitat de la resta de substituents.^{115, 133, 137} Per tant, en la majoria de casos, s'espera una configuració *sin* dels substituents en C2 i C4 en anells pirrolidínics i piperidínics. Respecte als iminociclitols bicíclics, s'ha observat en treballs anteriors que la selectivitat facial en l'aminació reductiva depèn generalment del centre C-1 per les pirrolizidines i indolizidines o C-2 per quinolizidines, formant preferentment les configuracions *sin* ((1*R*,3*R*) o (2*R*,4*R*)).^{124, 135, 136}

La configuració en el C5 en pirrolidines, C2 en piperidines, C7a en pirrolizidines, C8a en indolizidines i C9a en quinolizidines provenen del *N*-Cbz-aminoaldehyd de partida (**Figura 3.4.6**). S'assumeix que aquestes configuracions són fixes i no estan subjectes a reaccions d'epimerització en el transcurs de l'estratègia sintètica, ni tampoc durant les purificacions dels compostos. De la mateixa manera, es consideren els centres esterogènics generats durant l'addició aldòlica i l'aminació reductora també fixes i invariables fins a la caracterització, donades les condicions suaus amb què es tracten els compostos. Conseqüentment, a partir de l'anàlisi dels espectres de RMN i la determinació de la configuració relativa dels centres estereogènics, es possible elucidar inequívocament la estereoselectivitat de les reaccions enzimàtiques catalitzades per variants de FSA i de l'aminació reductora.

3.4.1.3 ELUCIDACIÓ ESTRUCTURAL I ESTEREOQUÍMICA DELS IMINOCICLITOLS SINTETITZATS

L'elucidació estructural i estereoquímica dels productes cíclics i de les seves estructures diastereomèriques, es dugueren a terme mitjançant tècniques d'RMN mono i bidimensionals (Veure **Material Suplementari Figures S1-S31**). A més, es determinaren les masses exactes de tots el compostos i els valors de les rotacions òptiques específiques dels productes purs (Veure **Material Suplementari Taula S1**).

En les **Taules 3.4.1 i 3.4.2** es detallen les estructures dels iminociclitols sintetitzats, les proporcions obtingudes en cas de mescla, i els rendiments finals associats. En les taules també s'indica per a cada cas el *N*-Cbz-aminoaldehyd de partida, el donador i la variant de FSA emprada per tal de facilitar la procedència de l'iminociclitol final.

En determinats casos fou necessària la purificació de les mescles diastereomèriques finals per a poder caracteritzar per RMN cada un dels productes components per separat i assignar inequívocament les estructures (mescles **17q:17f**, **19a:19d**, **19b:19e**, **21e:9h**, **21e** impur i **21d:21g:21f**, **Taula 3.4.1 i 3.4.2**). A tal fi, s'utilitzà una columna cromatogràfica d'intercanvi catiònic feble amb una resina tipus Sepharose TM CL-6B (carboximetil sefarosa) com a fase estacionària i una solució aquosa d'amoniac com a fase mòbil (Veure **Secció experimental 5.4.11** i per a cada compost en **Material Suplementari S3.5**).

Els rendiments dels iminosucre final foren majoritàriament baixos, donat que els passos de purificacions no foren optimitzats. Pel que fa als valors de les conversions aldòliques a escala preparativa, foren similars als obtinguts a escala

analítica (**Capítol 3.3**). Només en el cas de l'addició aldòlica de HA a (*R*)-**1p** (**Taula 3.4.1**, entrada 20), la conversió fou de tan sols el 14 %, quan a escala analítica els valors obtinguts foren de fins a 60 %. Aquesta disminució podria ser causada per factors d'escalat com, per exemple, que l'agitació del medi de reacció no hagués estat efectiva.

Respecte a l'elucidació configuracional, l'anàlisi estructural dels iminociclitols obtinguts revelà l'excel·lent estereoselectivitat de les variants de FSA en les addicions aldòliques (**Taules 3.4.1 i 3.4.2**). Es generaren tots els adductes amb estereoselectivitats *sin* (3*S*,4*R*) o (2*S*,3*R*) en les addicions de GO; >95 determinat per RMN. Per tant, el nou enllaç C-C es formà per l'aproximació de les cares *Si-Si* tant de l'enamina nucleòfila com de l'aldehid acceptor. Només s'observà una excepció, el compost **21h** (**Taula 3.4.2**). Es discuteix la seva configuració més endavant.

En quant a l'estereoselectivitat exhibida durant l'aminació reductora en iminociclitols pirrolidínics, s'observà que la diastereoselectivitat facial depenia de la configuració en C5. Per (5*R*)-pirrolidines, l'atac del H₂ es produïda només per la mateixa cara del substituent en C-5, generant productes amb configuració *sin* respecte C2 i C4 ((2*R*):(2*S*)>95:—) (**Taula 3.4.1**, entrades 1, 2, 4 (**17b**), 5, 6, 9, 11, 12 (**17k**), 13 (**17ae**)). Aquests resultats foren consistents amb la bibliografia.^{115, 133, 137} En canvi, per (5*S*)-pirrolidines, no es donà aquesta diastereoselectivitat facial clara i es generaren mescles (2*R*):(2*S*) (**Taula 3.4.1**, entrades 3, 4, 7, 8, 10 i 12, a excepció de **17ac** (entrada 13)), tal com s'havia observat en articles anteriors.^{133, 137}

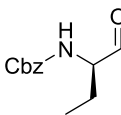
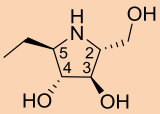
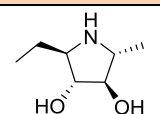
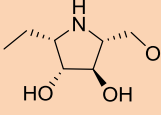
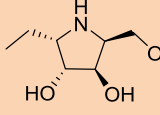
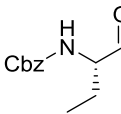
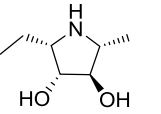
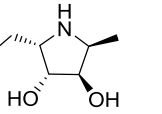
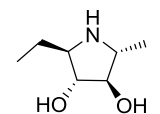
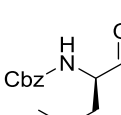
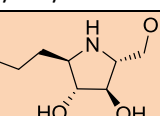
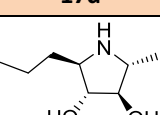
Pels derivats de l'àcid pìpecòlics s'obtingueren els iminociclitols **17ae:17af** amb proporció 1:1, doncs, no presentaren diastereoselectivitat en C-6 (**Taula 3.4.1**, entrada 14). La mateixa proporció s'observà en els compostos anàlegs **8d/8e** i **8f/8g**, **Capítol 3.2** (Veure **Figura 3.2.8**, pàg. 111).

Pel que fa als iminociclitols bicíclics, l'aminació reductora fou diastereoselectiva pels iminociclitols **21a**, **21b** i **21d**, és a dir, per indolizidines i quinolizidines amb configuració (*S*)-C7a o (*S*)-C9a, respectivament (**Taula 3.4.1**, entrades 18 a 21).

Les configuracions relatives en aquestes compostos foren *sin* ((1*R*,3*R*) o ((2*R*,4*R*)).^{124, 135, 136}

En canvi, no presentaren discriminació facial les aminacions reductives de (8*aR*)-pirrolizidines (**Taula 3.4.1**, entrades 15, 16 i 17) o (9*aR*)-quinolizidines (**Taula 3.4.1**, entrada 21 (**21f:21g**)), fet que ja s'advertí en publicacions anteriors.^{124, 135, 136, 216}

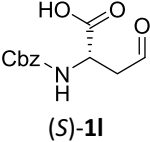
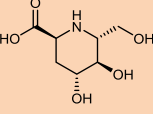
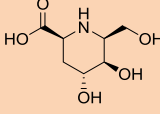
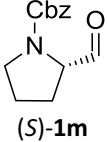

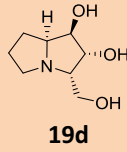
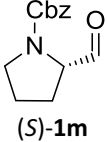
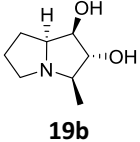
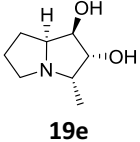
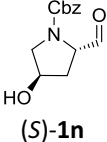
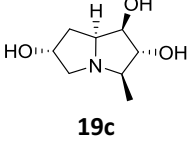
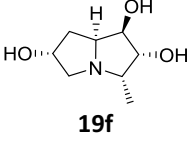
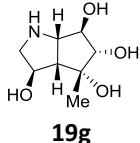
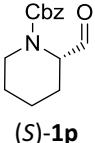
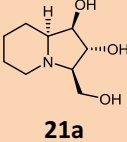
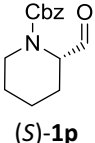
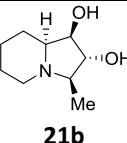
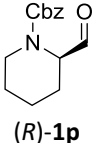
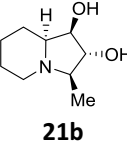
Taula 3.4.1: Col·lecció d'iminoiclitols polihidroxilats obtinguts per etapa clau d'addició aldòlica de DHA (fons en rosa) i HA a *N*-Cbz-aminoaldehyds catalitzades per variants de FSA A129S/R134X/A165G/S166G i aminació reductora catalitzada per Pd/C. [a] Número de reacció [b] Aldehid de procedència [c] Variant X de FSA A129S/R134X/A165G/S166G (Conversió, %, temps, h) [d] Iminoiclitols [e] Estereoselectivitat de l'aminació reductiva, relació (R):(S) [f] Rendiment final del productes respecte al *N*-Cbz-aminoaldehyd de partida.

[a]	[b]	[c] ^[1]	[d]	[e]	[f] ^[2]	
1		R (97, 72)	 17a	>95:— ^[5]	19	
2	(<i>R</i>)-1f	R (96, 72)	 17b	>95:— ^[5]	34	
3		S (86, 50)	 17l	 17w	75:25 ^[5]	11
4	 (<i>S</i>)-1f	R (88, 72)	 17m	 17x	55:45 ^[5]	30
			 17b	>95:— ^[5]		
			17m/17x/17b 48:38:14			
5		V (80, 72)	 17d	>95:— ^[5]	8	
6	(<i>R</i>)-1g	R (95, 72)	 17e	>95:— ^[5]	8	

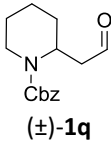
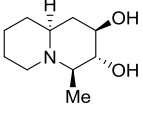
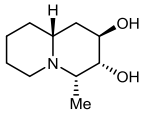
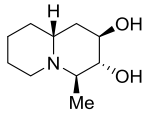
Continua en la pàgina següent

[a]	[b]	[c] ^[1]	[d]	[e]	[f] ^[2]
7		V (18, 65)		65:35 ^[5]	3
8	(S)-1g	P (87, 65)		50:50 ^[5]	27
9		V (90, 48)		>95:— ^[5]	28
10		P (84, 68)		30:70 ^[5]	32
11		P (70, 72)		>95:— ^[5]	32
12		V (67, 72)		25:75 (17v:17ac) ^[5]	7
				>95:— (17k) ^[5]	11
			17v/17ac/17k 13:37:50		
13		S (70, 72)		>95:— (17ad) ^[5] >95:— (17ae) ^[5]	9
			17ad/17ae 78:22		

Continua en la pàgina següent

[a]	[b]	[c] ^[1]	[d]	[e]	[f] ^[2]	
14	 (S)-1l	R (70, 72)	 17af	 17ag	50:50 ^[6]	46
15	 (S)-1m	V (90, 46)	 19a	 19d	38:62 ^[7]	26
16	 (S)-1m	V (90, 46)	 19b	 19e	80:20 ^[7]	74
17	 (S)-1n	V (90, 72)	 19c	 19f	50:50 ^[7]	25
			 19g	>95:— ^[8]	15	
18	 (S)-1p	V (90, 68)	 21a	>95:— ^[7]	28	
19	 (S)-1p	V (90, 46)	 21b	>95:— ^[7]	51	
20	 (R)-1p	V (14, 72)	 21b	>95:— ^[7]	8	

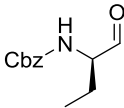
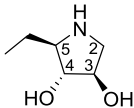
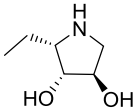
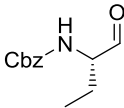
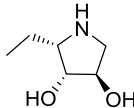
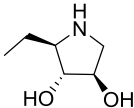
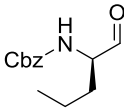
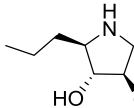
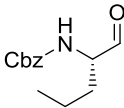
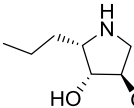
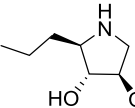
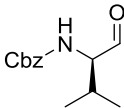
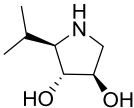
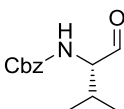
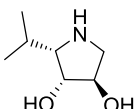
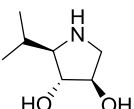
Continua en la pàgina següent

[a]	[b]	[c] ^[1]	[d]	[e]	[f] ^[2]
21	 (±)- 1q	P (97, 72) ^[3]	 21d	>95:— ^[8]	93
		P (97, 72) ^[4]	 21g	 21f	50:50 ^[8]

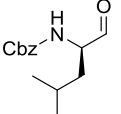
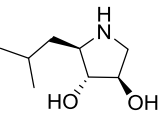
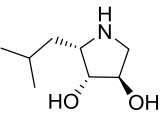
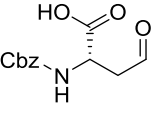
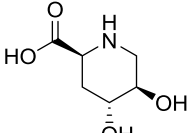
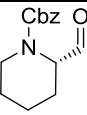
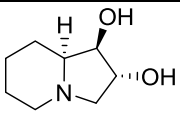
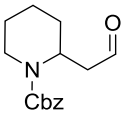
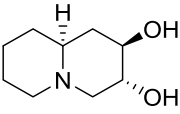
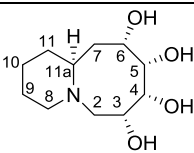
^[1] Percentatge d'adducte aldòlic determinat per HPLC respecte a l'àrea de substrat limitant (aldehid), límit de detecció: 0.2-0.5 nmol. ^[2] Els processos de purificació no foren optimitzats. ^[3] 97% global, 50 % de l'enantiòmer (*S*)-**1q**. ^[4] 97 % global, 50 % de l'enantiòmer (*R*)-**1q**. ^[5] (6*R*):(6*S*) Relació epimèrica en C2. ^[6] (6*R*):(6*S*) Relació epimèrica en C6. ^[7] (3*R*):(3*S*) Relació epimèrica en C3. ^[8] (4*R*):(4*S*) Relació epimèrica en C4.

El fet més destacat en l'anàlisi estereoquímica dels diferents centres estereogènics fou la detecció de racemitzacions en els centres estereogènics C- α fixes provinents dels *N*-Cbz-aminoaldehids de partida. Aquesta racemització es detectà principalment en iminociclitols obtinguts a partir d'addicions amb GO com a donador (**Taula 3.4.2**, entrades 22, 23, 25, 27 i 28), però també en casos puntuals on s'addicionà HA (**Taula 3.4.1**, entrades 4, 12, 13 i 20). Pels resultats obtinguts, es dedueix que la presència d'inversió de la configuració del C- α depèn tant de l'estructura del substrat acceptor, com del donador emprat. En general, es donà en reaccions on els substrats acceptors són menys tolerats per l'enzim, com (*S*)-*N*-Cbz-aminoaldehids amb substituents voluminosos en C- α o (*R*)-cíclics, o en les addicions de GO. Un exemple clar fou l'obtenció només de l'iminoiciclitol **21b** a partir de (*R*)-**1p** (**Taula 3.4.1**, entrada 20). En aquest cas, la inversió de la configuració en el producte aldòlic detectat fou completa.

Taula 3.4.2: Col·lecció d'imino-ciclitols polihidroxilats obtinguts per etapa clau d'addició aldòlica de GO a *N*-Cbz-aminoaldehyds catalitzades per variants de FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G i aminació reductora catalitzada per Pd/C. [a] Número de reacció [b] Aldehid de procedència [c] Variant X de FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G (Conversió, %, temps, h) [d] Iminociclitols [e] Relació epimèrica en C-2 [f] Rendiment final del productes respecte al *N*-Cbz-aminoaldehyd de partida.

[a]	[b]	[c] ^[1]	[d]	[e]	[f] ^[2]
22	 (<i>R</i>)-1f	S (83, 30)	 17c	 17n	60:40 64
23	 (<i>S</i>)-1f	S (80, 66)	 17n	 17c	70:30 41
24	 (<i>R</i>)-1g	V (70, 72)	 17f	— ^[3]	33
25	 (<i>S</i>)-1g	P (52, 72)	 17q	 17f	70:30 32
26	 (<i>R</i>)-1h	V (63, 72)	 17h	— ^[3]	32
27	 (<i>S</i>)-1h	P (29, 72)	 17s	 17h	70:30 18

Continua en la pàgina següent

[a]	[b]	[c] ^[1]	[d]	[e]	[f] ^[2]
28	 (<i>R</i>)-1i	V (20, 96)	 17j	 17t	66:34 2
29	 (<i>S</i>)-1l	P (90, 72)	 17ah		— ^[3] 27
30	 (<i>S</i>)-1p	V (20, 17)	 21c		— ^[3] 8
31	 (±)-1q	P (24, 65)	 21e		5
		P (44, 65)	 21h		— ^[3] 7

^[1] Percentatge d'adducte aldòlic determinat per HPLC respecte l'àrea d'adducte aldòlic determinat per HPLC respecte a l'àrea de substrat limitant (aldehid), límit de detecció: 0.2-0.5 nmol. ^[2] Els processos de purificació no foren optimitzats. ^[3] No es detectà dins dels límits de RMN, i.e.>95:5.

En un principi, l'obtenció d'aquests epímers s'atribuí a una disminució de l'estereoselectivitat *sin* de la FSA com a conseqüència de les modificacions dutes a terme en el centre actiu de l'enzim. Doncs, es generarien també els adductes aldòlics *anti*, epimèrics en C-4. No obstant, si la configuració de l'aldehid de partida roman invariable i atès que els espectres de RMN coincideixen amb els iminociclitols obtinguts amb *N*-Cbz-aminoaldehids enantiòmers de partida, els productes haurien de ser enantiòmers. Per tant, no només l'addició aldòlica transcorreria amb inversió en C-4, sinó també en C-3. Inversions en el C-4 són conegudes i han estat publicades anteriorment.^{110,141} En canvi, inversions en C-3 no han estat descrites fins al moment i serien poc probables ja que implicarien canvis mecànics de l'aldolasa.

Finalment, es demostrà inequívocament que els diastereoisòmers corresponien a epímers en C5 en pirrolidines, emprant com a referència el l'iminoiciclitol **17f** (Taula 3.4.2, entrada 24 i 25). L'addició de GO a (*R*)-**1f** generà exclusivament l'iminoiciclitol esperat **17f** (Figura S24 Material Suplementari S3.4). En canvi, a partir de (*S*)-**17f**, s'obtingueren dos adductes aldòlics (**16ac:16ab** 70:30, Figura S25 Material Suplementari S3.4), on el majoritari generà l'iminoiciclitol esperat **17q** i els espectres de RMN de l'adducte minoritari foren idèntics a **17f**. Gràcies a la determinació dels valors de les rotacions òptiques d'ambdós **17f** obtinguts, es confirmà que en efecte eren el mateix producte i no pas enantiòmers (Figura S25 Material Suplementari S3.4).

Donat que aquest fet no s'havia observat prèviament ni en la FSA ni tampoc en cap altra aldolasa, es decidí aprofundir més en aquest tema. En el següent apartat (Apartat 3.4.2) s'exposen els experiments duts a terme a fi d'elucidar el mecanisme catalític associat a les racemitzacions observades en el present treball.

Finalment, s'exposen els casos de dos iminoiciclitols obtinguts, **19g** i **21h**, els quals no presentaren l'estructura final esperada.

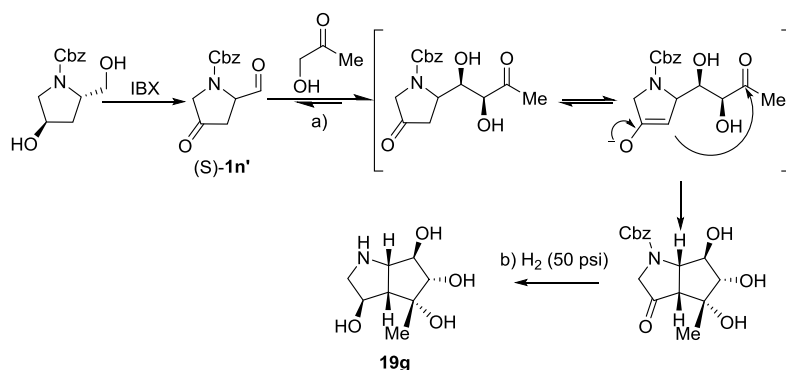


Figura 3.4.7. Plausible esquema sintètic del compost cíclic **19g**. a) A129S/R134V/A165G/S166G variant, b) Pd/C.

En primer lloc, l'aldol precursor del compost cíclic **19g** fou aïllat com a producte minoritari (relació 2:7 respecte al precursor aldòlic de **19c/19f**) a partir de l'addició aldòlica de HA al *N*-Cbz-aminoaldehyd (*S*)-**1n** (Taula 3.4.1, entrada 17).

Aquest iminoiciclitol, el qual no conté el *N* en la posició de cap de pont del bicicle, podria provenir del *N*-Cbz-aminoaldehyd (*S*)-**1n'**, subproducte de sobreoxidació del *N*-Cbz-aminoalcohol precursor (Veure Apartat 5.8.1.1, Secció Experimental). Es donaria l'addició de HA a (*S*)-**1n'**, catalitzada per la variant de

FSA, i una addició intramolecular tot seguit. Finalment, durant la hidrogenació catalítica, es desprotegeria l'amina i es reduiria la cetona per obtenir **19g** (Figura 3.4.7).

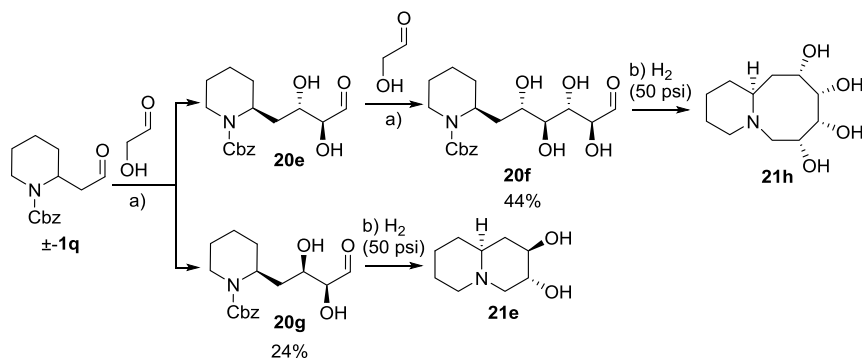


Figura 3.4.8. Esquema sintètic dels iminociclitolos **21h** i **21e** a partir de l'addició aldòlica de GO a *N*-Cbz-piperidin-carbaldehid (\pm)-**1q**, seguida de l'aminació reductiva catalítica. Es produeix la doble addició de GO a (*S*)-**1q** amb configuració *anti* (2*S*,3*S*,4*S*,5*S*) en ambdós productes aldòlics consecutius en la síntesi de **21h**. a) FSA L107Y/A129G/R134P/A165G/S166G amb 68 % de conversió total respecte (*S*)-**1q**. b) H₂ Pd/C.

En quant a l'imino-ciclitol **21h**, es sintetitzà a partir de l'addició aldòlica de GO a (\pm)-**1q**, on (*S*)-**1q** fou l'únic enantiòmer tolerat (Figura 3.4.8). S'observà la simple addició de GO a (*S*)-**1q**, obtenint la quinolizidina final esperada **21e** (Figura 3.4.8). Però, sorprenentment, també s'obtingué l'imino-ciclitol **21h**, fruit de la doble addició de GO a (*S*)-**1q** i subsegüent aminació reductiva (Figura 3.4.8), amb estructura de bicicle fusionat de 6 i 8 baules i nitrogen de cap de pont. La configuració observada fou *anti* en ambdós productes aldòlics consecutius (2*S*,3*S*,4*S*,5*S*, aldol **20f**, Figura 3.4.8). Doncs, la generació dels dos nous enllaços C-C es produïren per l'aproximació del nucleòfil des de la cara *Si* a la cara *Re* de l'aldehid, és a dir, per la cara enantiotòpica contrària a la observada per la resta d'aldehids. Només amb determinades variants de FSA s'ha observat estereoselectivitat *anti* en els adductes aldòlics en treballs anteriors.¹⁴¹

Aquest compost, **21h**, correspon al primer imino-ciclitol azabícclic polihidroxilat del tipus decahidro-2H-pirido [1,2-*a*] azocina sintetitzat gràcies a la FSA. A més, també representa el primer exemple de doble addició aldòlica de GO a *N*-Cbz-aminoaldehyds catalitzada per aquest biocatalitzador. Fins al moment, només s'havien detectat addicions consecutives de GO a aldehids poc voluminosos catalitzades per FSA en síntesi de carbohidrats.^{148, 152}

La síntesi detallada de cada un dels compostos finals caracteritzats (**17a-ah**, **19a-g** i **21a-h**) es poden consultar en el **Material Suplementari S4**.

3.4.2 ESTUDIS SOBRE LA RACEMITZACIÓ DE *N*-CBZ-AMINOALDEHIDS EN ADDICIONS ALDÒLIQUES CATALITZADES PER VARIANTS DE FSA

Com s'ha exposat, principalment els (*S*)-*N*-Cbz-aminoaldehyds i alguns (*R*)-*N*-Cbz-aminoaldehyds com (*R*)-**1p** cíclic, donaren resultats inesperats en els iminociclitols finals. En addicions amb GO majoritàriament i en casos puntuals amb HA, s'obtingueren epímers en el centre corresponent al C- α de l'aldehid de partida, en proporcions variables (entre 6 % i 34 %, respecte a l'aldehid inicial). Doncs, paral·lelament al treball de síntesi, es dugué a terme un estudi per a detectar si la racemització es produïa a causa de l'enzim o degut al medi de reacció.

3.4.2.1 ESTUDI DE LA RACEMITZACIÓ DELS *N*-CBZ-AMINOALDEHIDS EN PRESENCIA DE FSA

D'entrada es postulà que la racemització en el C- α dels *N*-Cbz-aminoaldehyds podia ser causada per la interacció a temps llargs de l'aldehid amb l'enzim. La inversió de la configuració del centre es produiria per mitjà de la formació d'una enamina amb la lisina catalítica del centre actiu (K85) o bé, per interacció amb una altra posició inespecífica de l'enzim.

Per elucidar aquest fet, s'incubaren per separat els *N*-Cbz-aminoaldehyds (*R/S*)-**1f** i (*R/S*)-**1g** amb FSA_{wt}, FSA A129S/A165G/S166G, FSA K85M i l'aldolasa FucA F131A, sota les mateixes condicions de reacció però sense la presència de donador (Veure **Apartat 5.12, Secció experimental**). Es disposà la variant FSA A129S/A165G/S166G atès que fou la primera que presentà epimerització en els iminociclitols finals sintetitzats (**Taula 3.4.1**, entrada 4). La variant inactiva FSA K85M (on s'ha substituït la lisina catalítica pel residu metionina) serví per comprovar si és en aquesta posició on es dóna la interacció; la FucA F131A s'emprà com a control, ja que no s'ha observat racemització en cap treball de síntesi d'iminoiclitols emprant aquest biocatalitzador.^{124, 133, 137} S'analitzaren les mostres per HPLC quiral a diferents temps d'incubació (24, 48 i 72 hores), després de reduir les alíquotes amb hidrur de bor i sodi a fi de detectar els corresponents (*R*)- i (*S*)-*N*-Cbz-aminoalcohols. Els resultats es mostren en la **Taula S1 del Material Suplementari S3.4**.

L'anàlisi revelà percentatges dels enantiòmers corresponents entre un 1 a 7 % a les 24 hores i fins 8 a 10 % després 72 hores d'incubació amb l'enzim FSA A129S/A165G/S166G (2 mg de proteïna per mL de medi de reacció). Doncs, aquest cert grau de racemització explicaria la detecció dels epímers dels iminociclitols finals de fins 10-15 % respecte l'aldehid de partida. Tanmateix, no explicaria graus més elevats observats (per exemple, **Taula 3.4.1**, entrada 12, 34 % de **17k** respecte (*S*)-**1j** i **Taula 3.4.2**, entrada 22, 33% **17n** de respecte

(*R*)-**1f**). Alhora, no explicaria perquè es detectaren epimeritzacions en adductes aldòlics corresponents d'un donador i no un altre, al emprar el mateix aldehid de partida (per exemple, **Taules 3.4.1 i 3.4.2**, entrades 10 i 27, addicions de HA i GO a (*S*)-**1h** respectivament).

D'altra banda, els resultats indicaren que la interacció no es dóna amb la lisina catalítica del centre actiu. Els percentatges d'inversió del centre C- α exhibits per la variant FSA K85M foren lleugerament superiors als exhibits per FSA_{wt} o FSA A129S/A165G/S166G. Alhora, cal destacar que l'enzim control FucA F131A presentà valors de racemització superiors a FSA (**Taula S1 del Material Suplementari S3.4**).

Per tant, arran dels resultats, es concloué que el mecanisme de l'epimerització probablement té lloc en el transcurs de l'addició aldòlica, i no per la simple interacció dels *N*-Cbz-aminoaldehids amb el biocatalitzador.

3.4.2.2 ESTUDI DE LA EPIMERITZACIÓ DELS ADDUCTES ALDÒLICS CATALITZATS PER VARIANTS DE FSA

Com s'ha vist, l'elucidació estructural i configuracional dels productes iminociclitols finals obtinguts permeté la detecció del fenomen d'epimerització esmentat en el C- γ dels adductes aldòlics. Al mateix temps, permeté, en la majoria de casos, l'assignació inequívoca d'aquests adductes en els pics dels cromatogrames HPLC i la consegüent quantificació del grau de racemització associat a partir de les seves àrees (Veure **Figures S12, S22, S23, S25, S27 i S28** del **Material Suplementari S3.4**). En la **Figura 3.4.9** es mostra l'exemple de l'addició de GO a (*S*)-**1h**.

Sorprenentment, al observar amb més detall aquests cromatogrames, es detectà que la proporció dels adductes aldòlics epimèrics en C- γ depenia del biocatalitzador emprat. Al catalitzar la reacció amb FSA L107Y/A129G/R134V/A165G/S166G s'obtingué la proporció **16ad:16ae** 62/38. En canvi, si s'empra FSA L107Y/A129G/R134P/A165G/S166G, la relació de l'adducte aldòlic epimer disminueix (**16ad:16ae** 19/81) (**Figura 3.4.9**).

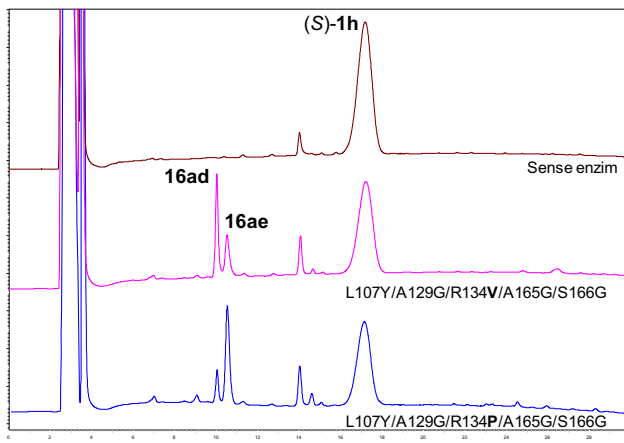
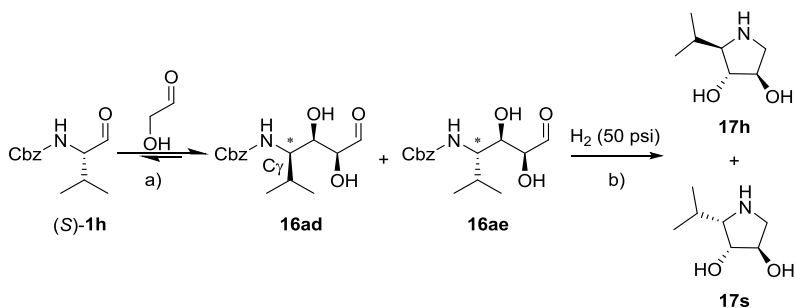


Figura 3.4.9. Cromatogrames d'addició aldòlica de GO a (S)-1h catalitzades per FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G, on X=V (**16ad:16ae** 62/38) i X=P (**16ad:16ae** 19/81) a les 48 hores de reacció.

La caracterització de les mescles racèmiques dels corresponents iminociclitols **17h:17s** obtinguts a partir de FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G, on X= P o V es pot consultar en la **Figura S27 Material Suplementari S3.4**.

Aquest fet, és a dir, la variació del grau d'epimerització segons la variant de FSA emprada, també s'observà en les addicions de HA a (S)-1j i de GO a (S)-1f-g (**Figures S33-35 Material Suplementari S3.4**).

A continuació, es proposà estudiar si la racemització tenia lloc per mitjà de les reaccions retroaldòliques associades. Per a tal fi, s'incubà la mescla dels adductes aldòlics diastereomèrics **16ae:16ad** (30:70) amb les variants FSA L107Y/A129G/R134V/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/R134P/A165G/S166G (**Figura 3.4.10**).

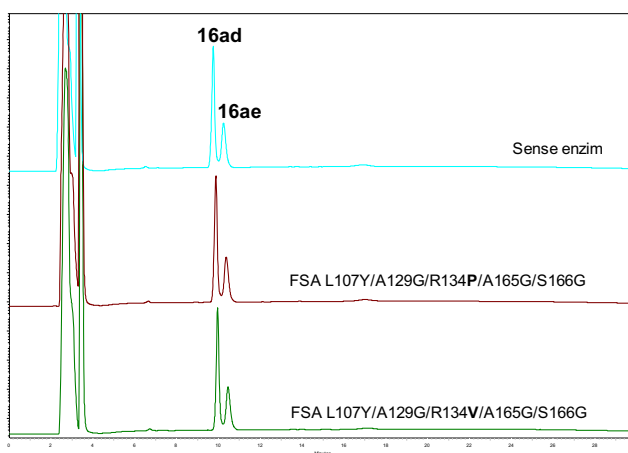
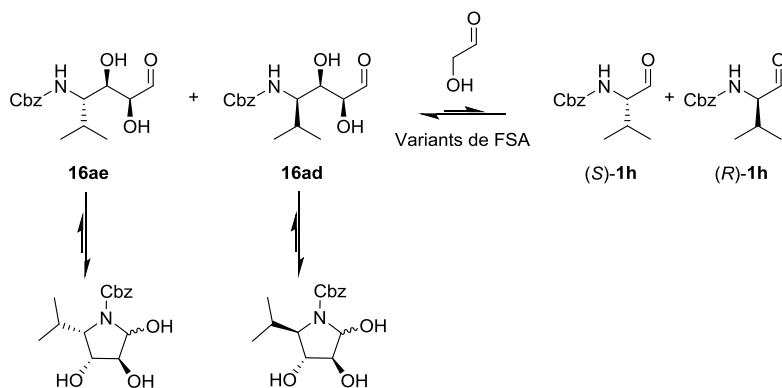


Figura 3.4.10. Incubació de la mescla diastereomèrica dels adductes aldòlics **16ae:16ad** 30:70 amb les variants FSA L107Y/A129G/R134V/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/R134P/A165G/S166G. Mostres a les 48 hores.

Tanmateix, la relació epimèrica es mantingué constant, sense cap enriquiment d'un dels adductes a les 48 hores. Tampoc s'observà cap variació en els cromatogrames HPLC realitzant el mateix experiment d'incubació amb la mescla d'adductes aldòlics **16ac:16ab**, ni en proves de competència de donador per retroaldòlica dels adductes aldòlics **16ac:16ab** i **16ae:16ad** amb FSA A129S/R134P/A165G/S166G en presència de HA (Veure **Figures S36** i **S37**, **Material Suplementari S3.4**, respectivament).

Tenint en compte que els adductes aldòlics de GO existeixen preferentment en la forma d'hemiaminal furànica respecte a l'aldehídica acíclica,¹⁴¹ és probable que això impedeixi la retroaldòlisi, fent les addicions aldòliques estudiades pràcticament irreversibles.

Així doncs, es conjectura que la isomerització del C- γ dels adductes aldòlics es produeix en el transcurs de la formació del nou enllaç C-C en el centre catalític de la FSA. Possiblement, podrien estar implicats residus de l'enzim en un mecanisme àcid-base, de tal forma que la disposició de l'adducte aldòlic en l'espai del centre actiu, les característiques estructural dels *N*-Cbz-aminoaldehids de partida, així com les modificacions dels residus del centre actiu, podrien influenciar en el mecanisme. A més, es postula que el grau de racemització vindria determinat per les velocitats relatives de les reaccions. És a dir, quan la reacció de la formació del nou enllaç C-C fos més favorable, la reacció tindria lloc més ràpid sense donar lloc a la inversió del centre estereogènic. Si bé, quan l'addició aldòlica no fos tan favorable, es produiria un major grau de racemització en aquest centre.

En un futur es pretén dur a terme un estudi cinètic de les reaccions. Actualment s'estan duent a terme en el nostre grup estudis de modelatge molecular a fi de racionalitzar els resultats obtinguts.

3.4.3 CONCLUSIONS

L'expansió sense precedents de les capacitats sintètiques de la FSA ha estat possible gràcies a la modificació per enginyeria de proteïnes del biocatalitzador amb l'objectiu d'ampliar la tolerància vers els *N*-Cbz-aminoaldehids substituïts en el C- α , incloent derivats de pirrolidina i piperidina. Les variants de FSA A129S/R134X/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G variants, on X és R, V, P i S foren les més adequades pels donadors DHA, HA i GO.

Seguidament, l'obtenció dels iminociclitols finals per aminació reductiva i llurs caracteritzacions, proporcionaren informació directa i molt valuosa sobre el mecanisme de l'aldolasa.

L'estereoquímica de les variants de la FSA foren excel·lents, generant els adductes aldòlics *sin*, a excepció del cas sorprenent i puntual de la doble addició de GO en *anti* observat en la síntesi de **21h**. Les aminacions reductives per hidrogenació en presència Pd/C foren totalment estereoselectives pels aldols obtinguts a partir de (*R*)-*N*-Cbz-aminoaldehids, (*S*)-*N*-Cbz-pirrolidina (**S-1m**) i (*S*)-Cbz-piperidina carbaldehid (**S-1p**). S'obtingueren els corresponents iminociclitols (>95) pirrolidínics (*2R,4R*), indolizidínics (*1R,3R*) i quinolizidínics (*2R, 4R*) amb configuracions *sin*. Si bé, els adductes aldòlics generats a partir dels (*S*)-*N*-Cbz-aminoaldehids acíclics i la resta de *N*-Cbz-aminoaldehids cíclics, no presentaren una preferència facial en l'atac del hidrogen, doncs, rendiren mescles epimèriques dels iminociclitols finals.

L'estratègia quimioenzimàtica proposada és excel·lent per a generar una àmplia col·lecció d'iminoiclitols complementaris configuracionalment i estructuralment als obtinguts amb les aldolases dependents de DHAP FucA i RhuA. Alhora, la FSA rendeix la mateixa estereoquímica que l'aldolasa D-fructosa-1,6-fosfat (FruA), la qual, però, no té activitat catalítica vers *N*-Cbz-aminoaldehids α -substituït.^{124, 133, 137} A més a més, la FSA presenta l'enorme avantatge d'acceptar diversos donadors α -hidroxicarbonílics no fosforilats, sense necessitat de l'ús de DHAP.

D'altra banda, s'observaren mescles epimèriques en els iminoiclitols finals a causa de la isomerització del corresponent C- α dels *N*-Cbz-aminoaldehids de partida en el transcurs de l'addició aldòlica. Principalment es detectaren en les reaccions amb GO i que el grau de racemització depenia de la variant utilitzada. Tanmateix, no s'elucidà el mecanisme de la racemització, però, és plausible que es produeixi durant la formació del nou enllaç C-C en el centre actiu de l'enzim.

Finalment, cal remarcar que els rendiments dels productes finals es podrien millorar enormement al optimitzar els passos de purificació dels intermedis aldòlics i productes d'iminoiclitols finals.

En definitiva, el conjunt de noves variants de FSA permeté la síntesi d'estructures complexes i sofisticades de forma eficaç. Altrament, conèixer a fons el mecanisme d'aquest prometedor biocatalitzador és de vital importància. Amb el redisseney exhaustiu del centre actiu es podria arribar a dissenyar per una reacció en concret, és a dir, per a un producte final diana determinat.

4

CONCLUSIONS

Les conclusions generals, corresponents als objectius tipificats en l'**Apartat 2**, es resumeixen a continuació:

I. Obtenció de D-treonina aldolasa d'*Arthrobacter xylosoxidans* (D-TA_{axy}) per aplicacions sintètiques.

- ❖ S'establí un procediment adient per a l'obtenció de D-TA_{axy}: incubació del lisat cel·lular amb PLP i MnCl₂, liofilització i conservació a -20 °C. L'enzim mantingué l'activitat enzimàtica total durant un any.
- ❖ L'enzim demostrà la seva efectivitat per a la síntesi de β-hidroxialfa-D-aminoàcids a partir dels aldehids seleccionats amb conversions aldòliques analítiques acceptables (20-70 %).
- ❖ S'obtingué l'adducte aldòlic D-*sin* amb conversió aldòlica analítica del 72 % i *d.r.*: 95:5 a partir de l'addició aldòlica de 2,2-dimetoxiacetaldehid (115 mM) i glicina (70 mM) catalitzada per D-TA_{axy} (40 U·mL⁻¹) a pH: 8.5 i temperatura 25 °C a temps llargs de reacció (96 hores).

II. Establiment d'estratègies tàndem quimioenzimàtiques en la síntesi de derivats polihidroxilats de l'àcid piperòlic i iminociclitols piperidínics mitjançant aldolases dependents de glicina, de DHAP i D-fructosa-6-fosfat aldolasa (FSA).

- ❖ S'obtingueren els quatre possibles estereoisòmers de l'àcid 2-amino-3-hidroxialfa,4,4-dimetoxibutanoic a partir de glicina i 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**). Les aldolases L-serina hidroximetiltransferasa de *Streptococcus thermophilus* (L-SHMT_{sth}) i D-TA_{axy} foren altament diastereoselectives (*e.d.* 95 %, L-*anti* i D-*sin*, respectivament) amb conversions del 70-76 %.
- ❖ En la segona etapa clau, la variant FucA F131A rendí conversions de moderades a quantitatives (30-100 %) amb diastereoselectivitats L-*anti* de 91->97 %. La RhuA_{wt} mostrà conversions de 78-85 % amb diastereoselectivitats L-*sin* de 60-97 %, però no tolerà com a substrats els intermedis carboxilats per a la síntesi de derivats de l'àcid piperòlic. La FSA mostrà conversions 65-99 % amb completa diastereoselectivitat D-*sin*

(97 %). Es requeriren les variants FSA A129S o A129S/A165G per les reaccions amb DHA i FSA A129G, pel donador GO.

- ❖ L'estratègia dissenyada permet la síntesi d'iminoclitols polihidroxilats complexos formant fins a cinc centres estereogènics a partir de substrats aquirals. Dels cinc centres, quatre són controlats enzimàticament en les dues etapes d'addició aldòlica claus.

III. Ampliació del rang de substrats tolerats per la FSA en addicions aldòliques de donadors α -hidroxicarboníl·lics, DHA, HA i GO, a *N*-Cbz-aminoaldehids. Redisseny de les variants FSA A129S/A165G i FSA L107Y/A129G/A165G per enginyeria de proteïnes (Veure centre catalític en la **Figura 4.1.**).

- ❖ Les conversions aldòliques als diversos *N*-Cbz-aminoaldehids es veieren fortament influenciades per la qualitat del substrat donador. Els rendiments analítics foren més elevats per HA, respecte a DHA o GO.

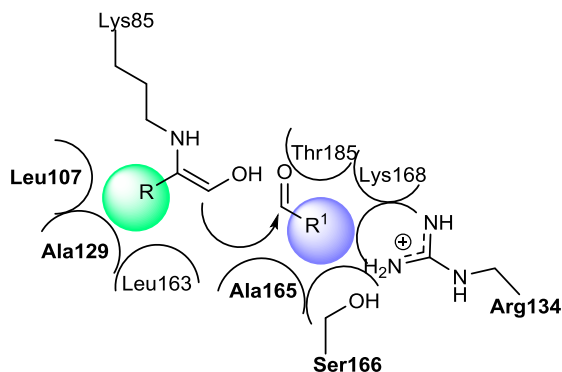


Figura 4.1. Representació esquemàtica del centre actiu de la FSA. S'indica en negreta els residus els quals han sigut modificats en aquest treball amb resultats positius en les addicions aldòliques estudiades.

- ❖ Les variants FSA A129S/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/A165G/S166G proporcionaren conversions aldòliques més elevades que les seves respectives variants de partida. La modificació S166G dotà al centre actiu de més espai per encabir-hi *N*-Cbz-aminoaldehids estructuralment variats inclosos aquells conformacionalment restringits tipus pirrolidina.

- ❖ La modificació de l'arginina 134 resultà també clau per a les conversions aldòliques de les reaccions estudiades. Les variants FSA A129S/R134X/A165G/S166G i FSA L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G on X= V, P i en casos puntuals S, foren les que rendiren conversions més elevades i incrementaren les conversions respecte a les variants sense la modificació. Per exemple, s'obtingueren rendiments analítics quantitius amb els *N*-Cbz-aminoaldehids amb substituent α -isopropil o derivats carbaldehids de piperidines i pirrolidines.

IV. Establiment d'estratègia quimioenzimàtica per la síntesi d'iminociclitols mono i bicíclics a partir de l'addició de DHA, HA i GO a *N*-Cbz-aminoaldehids voluminosos o conformacionalment restringits mitjançant variants de FSA.

- ❖ Obtenció i elucidació estructural d'una extensa col·lecció d'iminociclitols polihidroxilats pirrolidínics, piperidínics, pirrolizidínics, indolizidínics i quinolizidínics amb diversitat estructural i configuracional amb dos passos sintètics on es generen tres nous centres quirals. Síntesi de compostos inèdits fins ara no accessibles per biocatàlisi.
- ❖ La FSA exhibí un control complet de la diastereoselectivitat generant adductes aldòlics *D-sin* en tots els casos, amb només una excepció.
- ❖ Obtenció de l'iminociclitol azabicíclic polihidroxilat del tipus decahidro-2H-pirido [1,2-*a*] azocina inèdit gràcies a la doble addició aldòlica consecutiva de GO catalitzada per FSA.
- ❖ S'observà en alguns casos l'epimerització del centre estereogènic del substrat acceptor, produït probablement en el transcurs de la formació del nou enllaç C-C en el centre catalític de la FSA.

5

SECCIÓ EXPERIMENTAL

5.1 EQUIP GENERAL

Agitador magnètic MR 2002, Heidolph.

Agitador tipus vòrtex Genius 3, IKA.

Agitador VIBRAX, KS130 basic, IKA.

Bany d'agitació lateral Certomat, VWR.

Bany d'ultrasons, Selecta.

Centrífuga 5810R, Eppendorf.

Cromatògraf de HPLC LaChrom Elite amb bomba L-2130, autosampler L-2200 i detector UV L-2400, VWR-Hitachi.

Cromatògraf de HPLC semi-preparatiu amb detector de UV-Vis L4000, inyector LC4000 i controlador de flux CF4000, Waters.

Espectròmetre de RMN Varian 500 MHz del Servei d'Espectroscòpia del IQAC-CSIC.

Espectròmetre de RMN Varian 400 MHz del Servei d'Espectroscòpia del IQAC-CSIC.

Espectròmetre de RMN Bruker 500 MHz del Servei d'Espectroscòpia de la UAB.

Espectrofotòmetre NanoDrop LKB Ultraespec III, IQAC

Espectrofotòmetre Cary 100 i Cary 500 Bio UV-Visible, Varian.

Incubador Infors AG CH-4103, Bottmingen.

Incubador Minishaker, VWR.

Liofilizador Christ Alpha 2-4.

pHmetre GLP21, Crison.

Polarímetre 341, Perkin-Elmer.

Sistema FPLC amb bomba P5000, programador GP250, detector de UV/Vis i col·lector de mostres 2212 206.

Termocicladora Bio-Rad, Eppendorf.

Altres equips utilitzats més específics es detallen en els apartats corresponents.

5.2 REACTIUS QUÍMICS I ALTRES

Tots els reactius emprats en aquest treball foren de qualitat analítica.

Els reactius i enzims utilitzats en els assajos d'activitat biològica, els antibiòtics, l'acril-bisacrilamida, 1,4-ditiotreitòl (DTT), piridoxal-5-fosfat (PLP) i els components de solució tampó es van adquirir de Sigma-Aldrich. L'agarosa emprada fou de Roche i l'isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosid (IPTG) de Duchefa Biochemie. Els components pels medis de cultiu procediren de la casa comercial Pronadisa. Els aminoalcohols, aminoàcids, així com el 2,2-dimetoxiacetaldehid, dihidroxiacetona, hidroxiacetona i glicolaldehid, s'adquiriren de Sigma-Aldrich i Fluka.

Els dissolvents per HPLC i altres dissolvents requerits, es van obtenir de Carlo-Erba, Panreac, Sigma-Aldrich i Fisher Chemical. Per l'ús de HPLC analític i semi-preparatiu s'emprà aigua Milli-Q. Els dissolvents deuterats foren adquirits de Euriso-top.

La procedència d'altres materials o productes més específics es detallen en els apartats corresponents.

5.3 MATERIAL BIOLÒGIC

5.3.1 SOQUES BACTERIANES

Les soques bacterianes utilitzades en aquest treball, junt a la seva procedència i característiques més rellevants, es detallen en la **Taula 5.1**.

Les soques bacterianes JM109 i Nova Blue es van emprar en els experiments de clonació i modificació genètica i la soca *E.coli*, per a l'expressió de proteïnes.

Taula 5.1: Soques bacterianes emprades i les seves característiques més rellevants.

Soca	Genotip/Propietats rellevants	Ref./Origen
<i>E.coli</i> JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺), relA1, supE44, D (lac-proAB), [F ϕ , traD36, proAB, laqIq ZDM15]	Promega
<i>E.coli</i> Nova Blue	endA1, hsdR17 (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac F'[proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ZDM15::Tn10] (Tet ^R)	Novagen
<i>E.coli</i> M15 [pREP4]	nal ^S , str ^S , rif ^S , thi ⁻ , lac ⁻ , ara ⁺ , gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , recA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ , Km ^R , lac F'[proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ZDM15::Tn10] (Amp ^R), [Kan ^R]	Qiagen

5.3.2 VECTORS

Els vectors i construccions plasmídiques utilitzats i preparats durant aquest treball es detallen en la **Taula 5.2**, especificant en cada cas les característiques més rellevants i la procedència de cada un. El vector pQE40 es va utilitzar per a la construcció de tots els plasmidis d'aquest treball, a excepció del plasmidi pQE60-DHThrA_{axy}, pel qual es va requerir el vector pQE60.

Taula 5.2: Vectors i construccions plasmídiques utilitzades durant aquest treball.

Plasmidis	Característiques genètiques rellevants	Ref./Origen
pQE40	PT5, Amp ^R , ColE1, N-term 6xHis	Qiagen
pQE60	PT5, Amp ^R , ColE1, C-term 6xHis	Qiagen
pQE-DHapA _{pde}	Gen DHapA _{pde} (1164 bp) (BamHI/HindIII)	Soler <i>et al.</i> , 2014 ¹⁸⁴
pQE-DHThrA _{axy}	Gen DHapA _{axy} (1134 bp) (BamHI/HindIII)	
pQE60-DHThrA _{axy}	Gen DHapA _{axy} (1134 bp) (BamHI/HindIII)	Aquest estudi
pQEshmt	Gen <i>glyA</i> (505 bp)	Vidal <i>et al.</i> , 2005 ⁸⁶
pQEIta	Gen (1001 bp)	
pQEfucA	Gen <i>fucA</i> (650 bp)	Departament d'Enginyeria Química de la UAB
pQEfucAF131A	Gen <i>fucA F131A</i> (650 bp)	Garrabou <i>et al.</i> , 2010 ¹²⁴
pQEfucAF131A/F206A	Gen <i>fucA F131A/F206A</i> (650 bp)	
pQErhaD	Gen (820 bp) clonat en pQE40	Departament d'Enginyeria Química de la UAB
pQEfsa	Gen <i>fsa</i> (660 bp) clonat en pQE40 (<i>BseRI/HindIII</i>). La cua 6xHistidines N-terminal fou eliminada.	Garrabou <i>et al.</i> , 2009 ¹⁴⁸
pQEfsaL107Y/A129G	Gen <i>fsaL107Y/A129G</i> (660 bp)	Székrenyi, <i>et al.</i> , 2014 ¹⁴¹

Continua en la pàgina següent

Plasmidis	Característiques genètiques rellevants	Ref./Origen
QEfsaL107Y/A129G/A165G	Gen <i>fsaL107Y/A129G/A165G</i> (660 bp)	Szekrényi, <i>et al.</i> , 2014 ¹⁴¹
pQEfsa A129G	Gen <i>fsaA129G</i> (660 bp)	
pQEfsa A129G/S166G	Gen <i>fsaA129G/S166G</i> (660 bp)	
pQEfsa A129S	Gen <i>fsaA129S</i> (660 bp)	Gutierrez <i>et al.</i> , 2010 ¹⁵¹
pQEfsa A129S/A165G	Gen <i>fsaA129S/A165G</i> (660 bp)	Gutierrez <i>et al.</i> , 2011 ¹⁵³
pQEfsa A129S/A165G/S166G	Gen <i>fsaA129S/A165G/S166G</i> (660 bp)	Tesi de Mariana Gutierrez Tejada, 2011 ²¹²
pQEfsaA129T	Gen <i>fsaA129T</i> (660 bp)	Tesi de Anna Szekrényi, 2014 ¹⁵²
pQEfsaA129T/A165G	Gen <i>fsaA129T/A165G</i> (660 bp)	
pQEfsa A129T/A165G/S166G	Gen <i>fsaA129T/A165G/S166G</i> (660 bp)	
pQEfsa A129V	Gen <i>fsaA129V</i> (660 bp)	
pQEfsaA165G/S166G	Gen <i>fsaA165G/S166G</i> (660 bp)	
pQEfsa S166G	Gen <i>fsaS166G</i> (660 bp)	Tesi de Mariana Gutierrez Tejada, 2011 ²¹²

Taula 5.3: Construccions plasmídiques de FSA realitzades durant aquest treball. Es detallen en la taula els motlles i oligonucleòtids emprats en la mutagènesi.

Plasmidis	Motlle per la mutagènesi	Oligonucleòtids ^[a]
pQEfsa K85M	pQEfsa	3/4
pQEfsaL107Y/A129G/A165G/S166G	pQEfsa L107Y/A129G/ A165G	29/30
pQEfsaL107Y/A129G/R134A/A165G/S166G	pQEfsa L107Y/A129G/ A165G/S166G	19/5
pQEfsaL107Y/A129G/R134E/A165G/S166G		20/6
pQEfsaL107Y/A129G/R134H/A165G/S166G		22/7
pQEfsaL107Y/A129G/R134P/A165G/S166G		23/8
pQEfsaL107Y/A129G/R134S/A165G/S166G		24/9
pQEfsaL107Y/A129G/R134V/A165G/S166G		25/10
pQEfsaL107Y/A129G/A164G/A165G/S166G		27/28
pQEfsaL107Y/A129G/A165G/S166G/F167A		31/32
pQEfsaL107Y/A129G/A165G/S166G/F167V		33/34
pQEfsa A129S/R134A/A165G/S166G		pQEfsa A129S/A165G/ S166G
pQEfsa A129S/R134E/A165G/S166G	20/12	
pQEfsa A129S/R134G/A165G/S166G ^[b]	13/21	
pQEfsa A129S/R134H/A165G/S166G	26/16	
pQEfsa A129S/R134P/A165G/S166G	26/16	
pQEfsa A129S/R134S/A165G/S166G	24/14	
pQEfsa A129S/R134V/A165G/S166G	25/15	
pQEfsa A129S/A165G/S166G/F167A	31/32	
pQEfsa A129V/A165G/S166G	pQEfsa	17/18
pQEfsaA165G/S166G/F167A	A165G/S166G	31/32

^[a] En la **Taula 5.4** es detallen les seqüències (5' → 3') dels oligonucleòtids *Up* i *Down* emprats. ^[b] No s'observà expressió de proteïna.

5.3.3 OLIGONUCLEÒTIDS

En la **Taula 5.4** es detallen els oligonucleòtids requerits en aquest estudi. Tots els oligonucleòtids foren proporcionats per la casa comercial Eurofins MWG-Operon amb un grau de puresa >70 %, a través del sistema de purificació HPSF (*High Purity Salt Free*).

Els oligonucleòtids *DHThrA_{axy} up* i *DHThrA_{axy} down* es van emprar per a la construcció del plasmidi pQE60-*DHThrA_{axy}*. El lloc de tall dels enzims de restricció BamHI i HindIII es troben subratllats.

La resta d'oligonucleòtids, tots ells de FSA, foren dissenyats específicament per aquest estudi, a fi d'obtenir noves variants de FSA per mutagènesi de lloc dirigit o per saturació. Els codons mutagènics estan ressaltats en negreta i cursiva; els

oligonucleòtids foren dissenyats per mitjà del solapament parcial entre les dues seqüències de parells de bases complementaries²¹⁷ i seguint les recomanacions del protocol de *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis* (Veure **Apartat 5.5.8.1**).

Taula 5.4: Oligonucleòtids emprats i/o dissenyats en aquest estudi per al subclonatge de l'enzim D-treonina aldolasa d' *Achromobacter xylosoxidans* (D-TA_{oxy}) i per a la mutagènesi de lloc dirigit i de lloc per saturació de l'enzim D-fructosa-6-fosfat aldolasa (FSA) de *E.coli*.

Entrada	Seqüència (5' → 3')	Seqüència (5' → 3')
1	<i>DHThrA_{oxy} up</i>	CATCACGGATCCATGTCCCAGG AAGTCATACGCG
2	<i>DHThrA_{oxy} down</i>	CTAATTAAGCTTGCGGCAGAAA ACGGGAATGC
3	FSA K85M <i>up</i>	GTGGT GATG GTCCGGTGACCG CC
4	FSA K85M <i>down</i>	GGAAC CATC ACCACGATATCCG CAATAATAG
5	FSA A129GR134A <i>down</i>	GCATCAAT AGC ATTAACGTAAG G CCCA ACATATTCC
6	FSA A129GR134E <i>down</i>	GCATCAAT CTC ATTAACGTAAG G CCCA ACATATTCCG
7	FSA A129GR134H <i>down</i>	GCATCAAT ATG ATTAACGTAAG G CCCA ACATATTCC
8	FSA A129GR134P <i>down</i>	GCATCAAT AGG ATTAACGTAAG G CCCA ACATATTCC
9	FSA A129GR134S <i>down</i>	GCATCAAT ACT ATTAACGTAAG G CCCA ACATATTCC
10	FSA A129GR134V <i>down</i>	GCATCAAT CAC ATTAACGTAAG G CCCA ACATA TCC
11	FSA A129SR134A <i>down</i>	GCATCAAT AGC ATTAACGTAAG G CGA AACATATTCC
12	FSA A129SR134E <i>down</i>	GCATCAAT CTC ATTAACGTAAG G CGA AACATATTCC
13	FSA A129SR134G <i>down</i>	GCATCAAT ACC ATTAACGTAAG G CGA AACATATTCC
14	FSA A129SR134S <i>down</i>	GCATCAAT ACT ATTAACGTAAG G CGA AACATATTCC
15	FSA A129SR134V <i>down</i>	GCATCAAT CAC ATTAACGTAAG G CGA AACATATCC
16	FSA A129SR134X <i>down</i>	GCATCAAT VBB ATTAACGTAAG G CGA AACATATTCC

Continua en la pàgina següent

Entrada	Seqüència (5' → 3')	Seqüència (5' → 3')
17	FSA A129V <i>up</i>	TATGTT GTG CCCTTACGTTAATCG TATTGATGC
18	FSA A129V <i>down</i>	ACGTAAGG CACA ACATATTCCG CACCTGC
19	FSA R134A <i>up</i>	CGTTAAT GCT ATTGATGCTCAG GGCGGTAGCGGC
20	FSA R134E <i>up</i>	CGTTAAT GAG ATTGATGCTCAG GGCGGTAGCGG
21	FSA R134G <i>up</i>	CGTTAAT GGT ATTGATGCTCAG GGCGGTAGCGGC
22	FSA R134H <i>up</i>	CGTTAAT CAT ATTGATGCTCAG GGCGGTAGCGGC
23	FSA R134P <i>up</i>	CGTTAAT CCT ATTGATGCTCAG GGCGGTAGCGGC
24	FSA R134S <i>up</i>	CGTTAAT AGT ATTGATGCTCAG GGCGGTAGCGGC
25	FSA R134V <i>up</i>	CGTTAAT GTG ATTGATGCTCAG GGCGGTAGCGGC
26	FSA R134X <i>up</i>	CGTTAAT VVB ATTGATGCTCAG GGCGGTAGCGGC
27	FSA A164GA165GS166G <i>up</i>	GCTG GGAGGAGG TTTCAAAA CCCCGCGTC
28	FSA A164GA165GS166G <i>down</i>	GAA ACCTCCTCC CAGCACTTTCG CCTGCGGC
29	FSA A165G/S166G <i>up</i>	GAAAGTGCTGGCAG GGGGG TTT CAAACC
30	FSA A165G/S166G <i>down</i>	GGTTTTGAA ACCCCT GCCAGC ACTTTC
31	FSA A165GS166GF167A <i>up</i>	C AGGAGGTGCC AAAACCCCGC GTCAGGC
32	FSA A165GS166GF167A <i>down</i>	GGTTTT GGCACCTCCT GCCAGC ACTTTCGCC
33	FSA A165GS166GF167V <i>up</i>	C AGGAGGTGT CAAACCCCGC GTCAGGC
34	FSA A165GS166GF167V <i>down</i>	GGTTTT GACACCTCCT GCCAGC ACTTTCGCC

5.4 MEDIS I SOLUCIONS

Tots els medis de cultiu i solucions emprades en aquest treball es van preparar amb aigua destil·lada ultra pura i esterilitzar per calor humit en autoclau a 121 °C durant 20 minuts, a excepció de solucions termolàbils (per exemple amb antibiòtics) i solucions concentrades de microelements, que es van esterilitzar per filtració ($\phi = 0,22 \mu\text{m}$).

Medi LB (Luria-Bertani)

Medi àmpliament utilitzat per al cultiu rutinari de *E. coli*.

Composició: Triptona $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, extracte de llevat $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ i NaCl $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Per emprar aquest medi com a medi sòlid en plaques de cultiu, s'addiciona 1.5 % d'agar després d'esterilitzar la solució amb autoclau.

Es complementa el medi LB, tant per medi líquid com per plaques, amb l'antibiòtic Ampicil·lina (LB-Amp, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) o bé amb Ampicil·lina i Kanamicina (LB-Amp-Kan 100 i $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivament), a fi de mantenir la selecció del plasmidi contingut i desitjat.

Medi SOB

Medi ric en sals que s'utilitza per a l'obtenció de cèl·lules competents i medi SOC. Composició: Triptona 2.0 %, extracte de llevat 0.5 %, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl_2 10 mM i MgSO_4 10 mM.

Medi SOC

Aquest medi conté la mateixa composició que el medi SOB, però a més conté glucosa com a font de carboni. S'emprà per al creixement de les bactèries just transformades durant la incubació a 37 °C i previ al sembrat en placa.

Composició: Medi SOB + glucosa 20 mM.

Solució TFB

Es requereix per a la preparació de cèl·lules competents.

Composició: KCH_3COO 30 mM, CaCl_2 10 mM, MnCl_2 50 mM, RbCl 100 mM i glicerol 15 %. El pH s'ajusta a 5.8 amb àcid acètic 1 M.

5.5 TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

A continuació s'exposen breument els mètodes i tècniques bàsiques de tecnologia de l'ADN recombinant emprades en aquest treball. Els protocols es troben descrits en *Molecular cloning: a laboratory manual* (Sambrook *et al.* 1989)²¹⁸ i en les instruccions de les cases comercials dels kits específics.

5.5.1 EXTRACCIÓ I AÏLLAMENT D'ADN PLASMÍDIC

Les extraccions d'ADN plasmídic procedents directament de cultius de *E. coli*, es varen dur a terme mitjançant el kit comercial "High Pure Plasmid Isolation Kit" (Roche) per a quantitats finals d'ADN plasmídic purificat de fins a 15 µg o el kit "Genopure Plasmid Midi Kit" (Roche) per a quantitats de fins a 100 µg. Ambdós kits basen la seva extracció per mitjà de la lisis alcalina parcial de les cèl·lules, permeten així que l'ADN plasmídic travessi la membrana bacteriana i disposar-se en el sobrenedant. L'ADN cromosòmic de *E. coli*, en canvi, es queda atrapat en la paret cel·lular i l'ARN es degradat per les ribonucleases presents en la solució de lisis, eliminant-los per centrifugació. El sobrenedant es disposa en una columna de sílica on l'àcid nucleic es reté específicament, separant-lo així de sals, proteïnes i altres impureses cel·lulars per mitjà de rentats. Finalment s'elueix l'ADN pur i s'emmagatzema a -20 °C.

Es segueix el protocol descrit per la casa comercial.

5.5.2 ELECTROFORESI D'ADN EN GEL D'AGAROSA

L'electroforesi d'ADN en gel d'agarosa es va emprar per a la separació, visualització i/o purificació de plasmidis, fragments de restricció o productes de PCR. La tècnica es duu a terme en horitzontal amb gel d'agarosa (grau analític, Roche) submergit, seguint el sistema de Wide Mini.Sub Cell GT System (Bio-Rad). Per a la preparació del gel, es dissol l'agarosa (1 %) en tampó TAE 1X (base Tris 40 mM, àcid acètic 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8.1) i s'agrega 5-10 µL de colorant d'ADN SYBR-Safe (Invitrogen). Les mostres es mesclen amb solució de càrrega (6X ADN *Loading dye*, Fermentas) a proporció 1/5 del seu volum i es dipositen en els pouets del gel. Es disposa un marcador de pes molecular (GeneRuler ADN ladder mix, Fermentas) a fi de facilitar la identificació i llargada aproximada dels fragments d'estudi. A continuació, s'aplica un voltatge constant de 5-10 V·cm⁻¹ fins que l'indicador del front ha recorregut 3/4 del gel. Un cop finalitzada l'electroforesi, l'ADN es visualitza per exposició a llum ultraviolada (302 nm) en un transiluminador (TFX-20.M, Ecogen).

5.5.3 EXTRACCIÓ I PURIFICACIÓ D'ADN EN GEL D'AGAROSA

Per a l'extracció d'ADN plasmídic en gel d'agarosa es va emprar el *kit* comercial *QIAquick™ Gel Extraction* de QUIAGEN. Es basa en la solubilització del fragment de gel d'agarosa que conté l'ADN d'interès en una solució tampó i l'absorció en micro columna de forma selectiva i quantitativa. Un cop efectuat els rentats amb els tampons corresponents, s'elueix l'ADN amb tampó d'elució amb baixa concentració de sals o amb aigua ultrapura.

Es segueix el protocol descrit per la casa comercial.

5.5.4 QUANTIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS EN SOLUCIÓ

Es determinà la concentració d'ADN obtingut en solució mesurant l'absorbància de la mostra amb espectrofotòmetre NanoDrop ND 2000, Thermo. Es calcula la relació entre l'absorbància i la concentració amb el valor estàndard $A_{260}=1$ per a dissolucions que contenen $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'ADN de cadena doble. Amb les mesures, es calcula també els coeficients d'absorbància a 260 nm respecte a 280 nm i 230 nm per determinar el grau de puresa de les mostres. Es considera que valors de A_{260}/A_{280} menors a 1.8 indiquen contaminació proteínica i valors de A_{260}/A_{280} majors a 2, contaminació per ARN. El rang de valors de A_{260}/A_{230} acceptat és de 2.0-2.2.

5.5.5 TRANSFORMACIÓ DE PLASMIDIS *E. COLI* PER MÈTODE QUÍMIC

S'ha emprat el mètode de clorur de rubidi, RbCl (modificació del mètode de Hanahan, 1983)²¹⁹, per a transformar les cèl·lules de *E. coli*. Aquest mètode permet obtenir una eficiència de transformació elevada, de fins a 5×10^8 transformacions per cada μg d'ADN utilitzat.

5.5.5.1 PREPARACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS

Per a obtenir cèl·lules competents, s'addiciona 12 mL de solució 5 M de NaCl a 200 mL de medi SOB preparat recentment, s'inocula amb cultiu saturat ($\text{DO}_{600}=1.5$) de LB amb la soca desitjada que prèviament s'ha incubat tota la nit i es manté durant 3-4 hores a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ i 200 rpm fins arribar a $\text{DO}_{600}=0.5$. Posteriorment es deté el creixement cel·lular centrifugant en fred ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) durant 10 minuts a 12000 g. Es descarta el sobrenedant i el sediment cel·lular es resuspèn en 20 mL d'una solució freda de TFB i s'incuba en gel durant 15 minuts. Seguidament, s'addicionen 700 μL de DMSO i es manté en gel durant 10 minuts. A continuació, es torna a addicionar 700 μL de DMSO sota agitació suau i

s'incuba 5 minuts més en gel. Finalment la suspensió es reparteix en alíquotes de 1 mL en tubs que prèviament s'han refredat en un bany d'etanol/gel sec i es conserven a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins a la seva utilització.

5.5.5.2 TRANSFORMACIÓ PER XOC TÈRMIC

Per a la transformació de 10-50 ng d'ADN, s'addicionen 100 μL de cèl·lules competents, es barreja suaument amb moviments circulars i s'incuba en gel durant 5 minuts. A continuació, es realitza el xoc tèrmic incubant durant 5 minuts a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ o 30 segons a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ i es torna a posar en gel durant 2 minuts. Finalment, s'agrega 800 μL de medi SOC i es sembra la solució en plaques de medi LB en agar que contenen els antibiòtics desitjats, i s'incuba tota la nit a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.5.6 AMPLIFICACIÓ D'ADN MITJANÇANT LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Aquesta tècnica permet amplificar entre 105 i 109 vegades un determinat fragment d'àcid nucleic utilitzant dos oligonucleòtids (3' i 5') que hibriden en els extrems del fragment a amplificar i actuen com encebadors d'una ADN polimerasa termostable.²²⁰

Aquesta metodologia s'ha emprat per a tres finalitats diferents i en cada cas amb les condicions òptimes per a cada una. En primer lloc, s'ha emprat aquesta tècnica per a l'amplificació del gen d'interès *DHThrA_{oxy}* per tal de subclonar-lo en un vector pQE60 (**Apartat 5.5.7.1**). Seguidament, s'ha emprat aquesta tècnica per a la verificació del producte de lligació entre l'insert del gen *DHapA_{oxy}* en el vector per a la construcció del nou plasmidi pQE60-*DHThrA_{oxy}* (**Apartat 5.5.7.4**). D'altra banda, s'ha utilitzat la PCR per a preparar noves construccions de plasmidis de pQE*fsa* per mutagènesi dirigida i de lloc de saturació (**Apartat 5.5.8.2**), les quals s'han detallat a la **Taula 5.3** i els oligonucleòtids requerits, en la **Taula 5.4**. S'utilitzen dues ADN polimerases diferents segons si l'ADN a amplificar prové d'un plasmidi o bé de colònia. Per l'experiment concret de la verificació dels productes de lligació per a la construcció del plasmidi pQE60-*DHThrA_{oxy}*, la PCR es va fer a partir de colònies transformades (PCR sobre colònies) i es va emprar la *Taq* ADN polimersa (Promega). L'ADN motlle s'obté posant en contracte una punta de pipeta estèril amb la colònia i submergint-la en la mescla de reacció de PCR. Per a la resta de PCR, la quantitat d'ADN motlle fou de 0.01-1 ng dels corresponents plasmidis per a un volum final de 50 μL de reacció i s'empra la *PfuTurbo* ADN polimerasa (Biotools).

En tots els casos, s'empra una mescla de dNTPs (Fermentas) que conté 25 mM de cada base nucleotídica.

En cada un dels apartats corresponents, es detallen els procediments seguits.

5.5.7 SUBCLONATGE EN VECTORS D'EXPRESSIONÓ: CONSTRUCCIÓ DEL NOU PLASMIDI PQE60-DHThRA_{axy}

Aquesta tècnica s'empra per a moure un gen d'interès d'un vector d'origen a un altre de destí. En el cas concret d'aquest treball, es va procedir a introduir el gen *DHThrA_{axy}* procedent del plasmidi pQE-DHThrA_{axy}¹⁸⁴ en el vector pQE60 per tal d'eliminar la cua de sis histidines en *N*-terminal del vector de procedència. El vector destí pQE60, conté per construcció la cua d'histidina en *C*-terminal, però es pot eliminar si se li efectua una doble digestió amb els enzims de restricció BamHI i HIndIII (Fermentas).

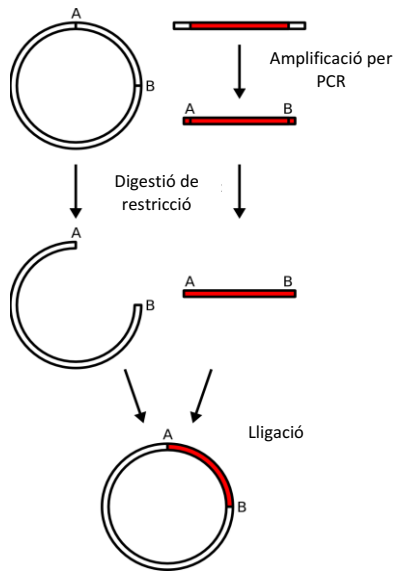


Figura 5.1. Esquema general dels passos a realitzar per al subclonatge en vectors d'expressió.

El procediment seguit consta dels següents passos:

5.5.7.1 AMPLIFICACIÓ DEL GEN DHThRA_{axy}

S'amplificà el fragment d'interès de 1173 pd seguint la mescla de reacció detallada en la **Taula 5.5** i les condicions de reacció de la **Taula 5.6**.

Taula 5.5: Composició general de la mescla de reacció utilitzada per a l'amplificació del gen *DHThrA_{oxy}* per PCR.

Tampó ADN pol (10x)	1/10 del volum final
dNTP mix 25 mM	0.25 mM de cada base
oligo 5' 3' ¹	100-200 pmol
oligo 3' 5' ¹	100-200 pmol
ADN motlle	100 pg-1 µg
<i>PfuTurbo</i> ADN pol	1-5 U

¹Els oligonucleòtids es detallen en la **Taula 5.4**.

Taula 5.6: Seqüència i durada dels cicles de PCR emprats per a l'amplificació del gen *DHThrA_{oxy}* per PCR.

Desnaturalització inicial	Amplificació			Extensió final
	Desnaturalització	Hibridació	Elongació	
95 °C, 3 min	95 °C, 1 min	55 °C ¹ , 1 min	95 °C, 2 min ²	72 °C, 10 min
1 cicle	35 cicles			1 cicle

¹Es determinà la temperatura òptima segons la temperatura de fusió dels oligonucleòtids emprats calculada empíricament. ²El temps d'extensió pot variar segons la longitud del fragment a amplificar. En general, s'utilitza 1 minut·kilobase⁻¹.

A continuació, s'aïllà i es purificà el gen amplificat per electroforesi en gel d'agarosa seguint els procediments descrits en els **Apartats 5.5.2** i **5.5.3**.

5.5.7.2 DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ DE L'INSERT I DEL VECTOR DESTÍ

Es realitzà la doble digestió del producte de PCR - insert amplificat *DHThrA_{oxy}*- i del vector destí pQE60 per separat. Es dugué a terme amb els enzims de restricció BamHI i HindIII, els quals generen extrems cohesius. La composició de la doble digestió es detalla en la **Taula 5.7**, tot seguint les recomanacions de la casa comercial Fermentas.

Taula 5.7: Composició emprada per a 50 μL de reacció de doble digestió del vector origen pQE-*DHThrA_{oxy}* i destí pQE60 amb els enzims de restricció BamHI i HindIII.

Tampó BamHI (10x)	5 μL
ADN	0.1-40 μg
BamHI	10 U
HindIII	10 U
Aigua ultra pura	Resta del volum

Les mescles s'incubaren a 37 °C durant 16 hores. Posteriorment es visualitzaren els fragments d'ADN digerits per electroforesi en gel d'agarosa seguint els procediments descrits en els **Apartats 5.5.2 i 5.5.3**.

5.5.7.3 REACCIÓ DE LLIGACIÓ

S'utilitzà l'ADN lligasa del bacteriòfag T4 (New England BioLabs) per a unir covalentment els dos fragments purificats d'ADN cohesius complementaris corresponents a l'insert *DHThrA_{oxy}* i al vector pQE60 prèviament digerits, en una relació molar de 1:3 respectivament. La composició de la reacció de lligació es detalla en la **Taula 5.8**, tot seguint les recomanacions de la casa comercial.

Taula 5.8: Composició emprada per a 20 μL de mescla reacció de lligació entre l'insert *DHThrA_{oxy}* i el vector d'expressió pQE60, prèviament digerits.

Tampó T4 ADN lligasa (10x)	2 μL
ADN del vector	80 ng
ADN de l'insert	85 ng
Polietilenglicol	2 μL
T4 ADN lligasa	60 U
Aigua ultra pura	Resta del volum

La reacció de lligació es dugué a terme en un termociclador programat amb un cicle de 30 segons a 30 °C seguit de 30 segons a 10 °C que es repeteix 100 vegades. Aquestes condicions foren un compromís entre les baixes temperatures d'hibridació dels extrems cohesius i la temperatura òptima de funcionament de la T4 ADN lligasa.²²¹

5.5.7.4 VERIFICACIÓ DEL VECTOR DE LLIGACIÓ: PCR DE COLÒNIES.

Es transformaren cèl·lules competents *E. coli* Nova Blue amb 5 µL de la reacció de lligació seguint el procediment descrit en l'**Apartat 5.5.5.2** i es sembrà en placa d'agar-ampicilina. S'incubà a 37 °C durant tota la nit i seguidament es picaren diverses colònies aleatòriament i es procedí a fer una PCR per amplificar l'insert seguint la mescla de reacció detallada en la **Taula 5.9** i les mateixes condicions de reacció que en la **Taula 5.8**.

Taula 5.9: Composició general de la mescla de reacció utilitzada per a la PCR de colònia de les cèl·lules transformades amb producte de lligació pQE-DHThrA_{oxy}.

Tampó ADN pol (5x)	1/10 del volum final
dNTP mix 25 mM	0.25 mM de cada base
oligo 5' 3' ¹	100-200 pmol
oligo 3' 5' ¹	100-200 pmol
ADN motlle	1 colònia
Taq ADN pol	1-5 U

¹ Els oligonucleòtids es detallen en la **Taula 5.4**.

Seguidament, es seleccionen els clons positius gràcies a la visualització de l'insert amplificat per electroforesi en gel d'agarosa, i es procedeix a l'extracció plasmídica seguint el mètode descrit en l'**Apartat 5.5.1**. La integritat dels plasmidis es verificà per seqüenciació -Servei de Seqüenciació d'ADN del CRAG-CSIC- i s'estimà la seva concentració espectroscòpicament seguint la metodologia descrita en l'**Apartat 5.5.4**.

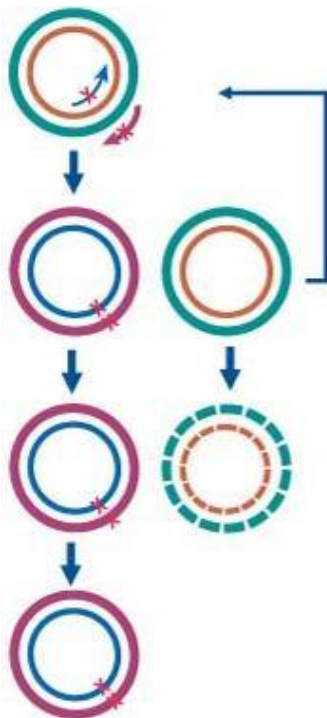
5.5.8 MUTAGÈNESI DIRIGIDA I DE SATURACIÓ DE LLOC

Per a l'obtenció de mutacions puntuals en el gens de la *fsa*, sigui dirigida o per saturació de lloc²¹⁷, s'emprà el sistema de la casa comercial Stratagene, *QuickChange® Site directed mutagenesis*.

El procediment consisteix en la utilització d'un vector que conté l'insert d'interès a mutar i un parell d'oligonucleòtids complementaris. Aquests encebadors contenen la mutació específica a inserir (mutagènesi de lloc dirigit) o la degeneració desitjada en els codons corresponents (mutagènesi de saturació de lloc). La degeneració en un codó concret permet obtenir de cop una col·lecció de diversos plasmidis amb diferents mutacions en la mateixa posició.

Els oligonucleòtids hibriden amb els brins oposats d'ADN del vector i són estesos durant els cicles de temperatura per la *Pfu* ADN polimerasa. La incorporació dels oligonucleòtids genera un nou plasmidi que conté la mutació d'interès i dos talls en la seqüència, que són reparats posteriorment en l'interior de la cèl·lula. Completada la reacció, la mescla es digereix amb endonucleases Dnpl. Les Dnpl digereixen específicament ADN metilat i hemi-metilat, per tant, permet eliminar les cadenes parentals del plasmidi. Finalment, s'empra la solució digerida per a transformar les cèl·lules competents *E. coli* (**Figura 5.2**).

Aquesta tècnica permet una excel·lent eficiència de mutació gràcies a l'elevada taxa de fidelitat de replicació de la *Pfu* ADN polimerasa i el baix nombre de cicles de temperatura requerits durant el procés.



1. Cicle de temperatura

- Desnaturalització del plasmidi i hibridació d'oligonucleòtids amb la mutació desitjada.
- Extensió dels oligonucleòtids amb la *Pfu* ADN polimerasa

2. Digestió amb DpnI

- Digestió de l'ADN parental no metilat i sense mutacions

3. Transformació

- Incorporació del plasmidi amb les mutacions en cèl·lules competents

Figura 5.2. Esquema del mètode de mutagènesi dirigida de lloc emprant el *kit* comercial *QuickChange® Site directed mutagenesis* (Stratagene).

A continuació, s'exposa de forma més detallada cada un dels passos a dur a terme per aquesta tècnica.

5.5.8.1 DISSENY D'OLIGONUCLEÒTIDS

Un dels factors que influeix més en l'èxit de la mutagènesi és el disseny dels oligonucleòtids. Per al disseny de cada un dels encebadors mutagènics es van seguir les recomanacions de la casa comercial Stratagene (*Primer Design Guidelines*) i l'estratègia descrita en la publicació de Zheng *et al.*(2004).²¹⁷ Els oligonucleòtids dissenyats en aquest treball s'esmenten en la **Taula 5.4**.

Les consideracions principals que es seguiren pel disseny dels encebadors s'enumeren a continuació:

1) Les seqüències dels dos encebadors (*up* i *down*) són solapables entre ells de forma parcial i almenys vuit parells de bases no solapables s'han d'introduir en l'encebador 3'-terminal.

2) Ambdós encebadors han de contenir la mutació desitjada.

3) La llargada dels encebadors ha de ser entre 20 i 45 parells de bases.

4) La temperatura de fusió dels encebadors (T_m) ha de ser superior o igual a 78 °C.

5) El contingut mínim de GC ha de ser del 40 %, i almenys una o més d'aquestes bases han de disposar-se en els extrems dels encebadors.

Un cop dissenyats, les seqüències s'analitzaren amb el programa *Gene Runner* (Heliogenetics, <http://www.generunner.net>) per a determinar el valor de T_m , % CG i per detectar si es formen artefactes estructurals.

En el cas concret de **mutagènesi de saturació de lloc** en un sol codó, els encebadors a emprar es dissenyaren seguint els mateixos paràmetres exposats i la degeneració del codó es determinà gràcies al programa *AA-Calculator*. Aquest programa proporciona la degeneració adequada segons els aminoàcid a introduir en la posició a modificar i conèixer el nombre de colònies necessàries a estudiar per tenir fidelitat del 95 %.

5.5.8.2 REACCIÓ DE SÍNTESI DE CADENES MUTADES

Per a l'obtenció d'un vector amb la mutació d'interès, es realitzaren varies reaccions simultànies emprant diferents concentracions d'ADN motlle en un rang entre 5-50 ng per cada 50 µL de reacció, mantenint la concentració d'oligonucleòtids constant i en excés. La composició general de la mescla i condicions de reacció es detallen en les **Taules 5.10** i **5.11**, respectivament.

Taula 5.10: Composició emprada per a 50 µL de mescla reacció de mutagènesi, emprant el kit comercial *QuickChange® Site directed mutagenesis (Stratagene)*.

Tampó <i>Pfu</i> ADN pol (10x)	5 µL
dNTP mix 25mM	1 µL
oligo 5' 3'	100-200 pg
oligo 3' 5'	100-200 pg
ADN motlle	5-50 ng
<i>Pfu</i> ADN pol	2.5 U
Aigua ultrapura estèril	Fins 50 µL

Taula 5.11: Seqüència i durada dels cicles de temperatura per a les reaccions de mutagènesi.

Desnaturalització inicial	Amplificació			Extensió final
	Desnaturalització	Hibridació	Elongació	
96 °C, 1 min	96 °C, 30 s	55 °C, 1 min	68 °C, 12 min ²	68 °C, 30 min
1 cicle	16 cicles ¹			1 cicle

¹ El nombre de cicles depèn del tipus de la mutació desitjada (mutació puntual, múltiple, inserció o deleció). ² El temps d'extensió pot variar segons la llargada del fragment a amplificar, sent necessari com a mínim 1 min/Kb del plasmidi.

Finalitzada la reacció, s'incuben durant 1 hora a 37 °C.

5.5.8.3 TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS

Es transformaren les cèl·lules competents *E. coli* Nova Blue amb 1-2 µL de les solucions d'ADN digerides d'acord amb la metodologia descrita en l'**Apartat 5.5.5.2**. Com a mínim, s'obtingueren 10 colònies per placa.

Per a la **mutagènesi de lloc dirigida**, es seleccionaren de forma aleatòria diverses colònies i s'utilitzaren per a fer extraccions plasmídiques (Veure **Apartat 5.5.1**). Els plasmidis purificats obtinguts s'analitzaren per seqüenciació en el Servei de Seqüenciació de CRAG-CSIC.

Per a la **mutagènesi de saturació de lloc**, es seleccionaren el nombre de colònies necessàries a estudiar indicades per la degeneració escollida i s'utilitzaren per a expressar la proteïna amb la mutació que contingui en cada cas. Tan els clons positius com altres seleccionats aleatòriament, s'efectuaren extraccions

plasmídiques (Veure **Apartat 5.5.1**). Així, permet conèixer quines mutacions han resultat reeixides i comprovar que la degeneració ha estat correctament efectuada. Els plasmidis purificats obtinguts s'analitzaren per seqüenciació en el Servei de Seqüenciació de CRAG-CSIC.

5.6 ANÀLISI BIOINFORMÀTICA DE SEQÜÈNCIES D'ADN

L'anàlisi de les seqüències d'ADN es realitzà per mitjà de diferents programes informàtics. Per a la visualització i anàlisi dels cromatogrames obtinguts a partir del Servei de Seqüenciació, s'utilitzà el programa Chromas (Technelysium Pty Ltd). Seguidament, s'identificaren les seqüències d'ADN amb elevada homologia a les obtingudes amb el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).²²² Es tradurien les seqüències d'ADN a la corresponent cadena d'aminoàcid amb el programa pDRAW32 (AcaClone) i es realitzà la recerca de proteïnes homòlogues en la base de dades del Servei de Proteòmica ExPASy (<http://www.expasy.org>) del Portal de l'Institut Suïss de Bioinformàtica SIB. L'alineament de seqüències de proteïnes es realitzà amb el programa ClustalW, disponible en línia pel servei de ExPASy.

5.7 TÈCNiques MICROBIOLÒGIQUES PER A L'ESTUDI DE PROTEÏNES

Les proteïnes expressades pel present treball foren D-treonina aldolasa d'*Achromobacter xylosoxidans* (D-TA_{axy}), D-3-hidroxiasepartat aldolasa de *Paracoccus denitrificans* (D-HAA_{pde}), L-serina hidroximetiltransferasa de *Streptococcus thermophilus* (L-SHMT_{sth}), la variant L-fuculosa-1-fosfat aldolasa F131A de *E.coli* (FucA F131A), L-rhamnulosa-1-fosfat aldolasa de *E.coli* (RhuA) i les variants de D-fructosa-6-fosfat aldolasa de *E.coli* (FSA) dissenyades (Veure **Taula 5.3**). L'enzim L-treonina aldolasa de *E. coli* (L-TA_{eco}) i altres variants de FucA i de FSA foren generosament proporcionats per Xavier Garrabou, Mariana Gutiérrez i Anna Szekrényi, tots ells del nostre grup de recerca.

5.7.1 SISTEMES DE CULTIU DE *E.COLI*: EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES

Per a la producció de les proteïnes es seguí el mateix procediment per a totes d'expressió en erlenmeyers. Els plasmidis corresponents (**Taula 5.3**) es transformen per xoc tèrmic en cèl·lules competents *E. coli* M15 [pREP-4] (QIAGEN), es sembren en plaques amb medi LB-agar-Amp/Kan i s'incuben tota la nit a 37 °C. Es piquen entre 3 i 5 colònies i es realitza una prova d'expressió a petita escala (Volum de cultiu LB de 10 mL). Seguidament, s'inocula 100 mL LB-Amp/Kan amb la colònia a partir de la qual s'ha obtingut una major expressió i s'incuba a 37 °C, 250 rpm durant 12-18 hores fins arribar a una DO₆₀₀=3-4. 25 mL

del cultiu es transfereixen a erlenmeyers de 2 L que contenen 1 L LB-Amp/Kan i s'incuben durant 3-4 hores fins a $DO_{600} \sim 0.7$. En aquest punt, s'addiciona als cultius IPTG (0.05 mM per FucA i RhuA; 0.2 mM per a treonina aldolases i 1 mM per FSA) i es disminueix la temperatura d'incubació a 30 °C per a minimitzar la formació de cossos d'inclusió. S'incuba durant 12 hores més i finalment es recull el sediment cel·lular format centrifugant durant 20 minuts, a 4 °C i 8500 rpm. Es verifica la sobreexpressió proteica per *SDS-PAGE* (Veure **Apartat 5.7.5.1**) a partir d'una alíquota del cru cel·lular i la resta es conserva a -20 °C fins a l'extracció proteica.

5.7.2 EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES DE CÈL·LULES DE *E. COLI*

Per a l'extracció proteínica a partir dels crus cel·lulars s'utilitza un disruptor cel·lular (Constant Systems), també anomenat "premsa francesa". La lisis cel·lular s'efectua en fred (0-4 °C), a 1.6 kbars i emprant un tampó de resuspensió (5 mL de tampó per cada 1 g cru cel·lular humit).

Per a les proteïnes amb cua d'histidina s'empra un tampó de fosfat de sodi ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (50 mM), NaCl (300 mM) i imidazol (20 mM) a pH 7.4) i per a les que no en contenen, un tampó de Gly-Gly (Glicilglicina (50 mM), DTT (1 mM) a pH 8).

Seguidament, es centrifuga el cru lisat a 8500 rpm i 4 °C durant 30 minuts a fi de separar les restes cel·lular de les proteïnes solubles. El sobrenedant es conserva en gel fins a la seva purificació.

5.7.3 PURIFICACIÓ I CONSERVACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

Les proteïnes recombinants expressades com a proteïnes de fusió amb cua d'histidines es purifiquen per cromatografia d'afinitat de metalls immobilitzats (IMAC, *Immobilized-Metal Affinity Chromatography*). Aquestes proteïnes foren: D-TA_{oxy}, D-HAA_{pde}, L-SHMT_{sth}, RhuA i FucA F131A. El tractament post-columna per L-SHMT_{sth} i D-HAA_{pde} fou de diàlisi i liofilització. En canvi, el tractament post columna pels enzims RhuA i FucA F131A fou de precipitació amb sulfat en presència de metalls divalents. El procés concret seguit per D-TA_{oxy} es detalla en l'**Apartat 5.7.3.4**.

L'enzim termostable FSA_{wt} i variants derivades es purifiquen per tractament tèrmic i es liofilitzen posteriorment.

A continuació s'explica amb més detall les tècniques de purificació emprades.

5.7.3.1 PURIFICACIÓ DE PROTEÍNES PER COLUMNA D'AFINITAT DE METALLS IMMOBILITZATS (IMAC)

Per a la purificació per columna d'afinitat de metalls immobilitzats s'emprà una columna XK 50/20 (Amersham Pharmacia Biotech) temperada per mitjà d'una camisa amb solució refrigerant. El volum de la columna fou de 50 mL, empaquetada amb la resina Quelating Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada amb NiCl_2 (0.1 M) i acoblada a un equip cromatogràfic FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*, Pharmacia). Els seguiments de les purificacions es realitzà mitjançant la lectura de l'absorbància a 280 nm amb detector UV (Pharmacia). Procediment: la columna s'equilibra amb el mateix tampó de fosfat de sodi emprat en la lisis a $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Seguidament, es carrega la solució proteica a $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, per tal d'afavorir la interacció entre els residus d'histidina de la proteïna recombinant i el Ni^{2+} de la matriu. Un cop carregada tota la mostra, es renta la columna amb el mateix tampó de carga fins que no s'observi l'elució de més enzims inespecífics no retinguts. Finalment, s'elueix amb un tampó de fosfat de sodi amb elevades concentracions d'imidazol ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (50 mM), NaCl (300 mM) i imidazol (300 mM) ajustat a pH 7.4) a $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

S'analitzaren les fraccions d'interès per *SDS-PAGE* (Veure **Apartat 5.7.5.1**).

5.7.3.2 PROCESSAMENT POST-PURIFICACIÓ PER COLUMNA D'AFINITAT

A continuació es detallen els dos procediments que es segueixen per a l'eliminació del tampó d'elució amb elevada concentració d'imidazol:

a) Diàlisi i liofilització

Per a la diàlisi s'empra una membrana de cel·lulosa (32 mm, Sigma Aldrich) semipermeable que permet el pas de molècules petites de solut i reté les proteïnes. El tampó emprat de diàlisi per la L-SHMT_{StH} fou Na_2HPO_4 (10 mM), piridoxal 5'-fosfat (PLP) (10 μM) ajustat a pH 7. Per D-HAA_{pde} s'emprà el mateix tampó enriquit amb MnCl_2 (50 μM). Les mostres es dialitzaren durant 3 dies, canviant el tampó de diàlisi cada 24 hores a raó aproximada de 0.15 mL de tampó de diàlisi $\cdot\text{mL}^{-1}$ de solució aquosa proteica. Seguidament, es congelaren les mostres a -80°C i es liofilitzaren.

b) Precipitació per sals

Es precipitaren els enzims augmentant la força iònica del medi amb sulfat d'amoni, fet que provoca l'eliminació de les molècules d'aigua d'hidratació de les proteïnes. Procediment: s'addiciona en fred (0-4 °C) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fins al 40 % de saturació i es recull la proteïna precipitada centrifugant a 12000 *g* durant 10 minuts. Seguidament es resuspèn la proteïna en una solució de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.4 g mL^{-1}) i es conserva a 4 °C. Prèviament a la precipitació, s'addiciona una sal de metall divalent, Zn^{2+} per a FucA (ZnSO_4 , 1 mM) i Zn^{2+} o Co^{2+} per RhuA (ZnSO_4 1 mM o $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM), i s'incuba durant 15 minuts.

5.7.3.3 PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES PER TRACTAMENT TÈRMIC

L'enzim termostable FSA es purificà per tractament tèrmic per a separar-lo de la resta de proteïnes solubles. Procediment: la fracció soluble del lisat es tracta durant 30 minuts a 70 °C i seguidament es centrifuga (12000 *g*, 4 °C durant 20 minuts). Les proteïnes desnaturalitzades resten en el precipitat i el sobrenedant es dialitza front un tampó Gly-Gly (Glicilglicina (5 mM), DTT (0.1 mM) a pH 8.5) seguint el mateix procediment descrit en l'**Apartat 5.7.3.2 a**.

5.7.3.4 PURIFICACIÓ, TRACTAMENT I CONSERVACIÓ DE D-TA_{axy}

Per a la purificació de D-TA_{axy} amb cua d'histidina es seguien diferents estratègies que s'enumeren a continuació i es divideixen segons si l'enzim es purificat per cromatografia de metalls immobilitzats o no.

a) Purificació per IMAC i tractament post-columna

Es purificà la proteïna seguint la metodologia descrita en l'**Apartat 5.7.3.1** emprant un tampó d'elució de fosfat de sodi (Na_2HPO_4 (50 mM), imidazol (20 mM), NaCl (300 mM) ajustat a pH 8). Els procediments post-columna foren:

1. Precipitar amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80 % de saturació a 4 °C. Conservar a 4 °C.
2. Precipitar amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40 % de saturació a 4 °C. Conservar a 4 °C.
3. Dialització durant 12 hores, canviant el tampó tres vegades. Aquest conté Tris-HCl (50 mM), MnCl_2 (0.1 mM) i PLP (10 μM), ajustat a pH 7. Conservar a 4 °C.
4. Congelar a -20 °C i conservar a -20 °C.
5. Conservar a 4 °C.

6. Procediment **3** i liofilitzar. Prèviament a la lisis cel·lular, s'enriquí el tampó amb PLP (10 μ M) i $MnCl_2$ (0.1 mM). Conservar a -20 °C.

b) Procediments sense IMAC

El cru cel·lular es dissolgué en el tampó de lisis fosfat (NaH_2PO_4 (100 mM) ajustat a pH 8.5), al qual se li addicionà en els casos corresponents PLP (10 μ M), $MnCl_2$ (0.1 mM) i DTT (1 mM). Posterior a la lisis es tractà pels següents mètodes:

7. Congelar a -20 °C i conservar a -20 °C.

8. Congelar a -20 °C i conservar a -80 °C.

9. Precipitar amb $(NH_4)_2SO_4$ al 40 % de saturació en fred (0-4 °C). Conservar a 4 °C.

10. Precipitació amb $(NH_4)_2SO_4$ al 20 % de saturació en fred. Centrifugar i resuspendre en la meitat de volum inicial en dissolució $(NH_4)_2SO_4$ al 50 % saturada. Conservar a 4 °C.

11. Procediment **9** i dialitzar. Tampó de diàlisi (NaH_2PO_4 (100 mM), PLP (10 μ M), $MnCl_2$ (0.1 mM)). S'addiciona DTT (1 mM) al tampó en cas requerit.

12. Liofilitzar i conservar a -20 °C.

Per a D-TA_{oxyNoHis} es seguí exclusivament el procediment **12**.

5.7.4 QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES

Per a la quantificació de proteïnes s'utilitzà en tots els casos el mètode Bradford.²²³ Es preparen les mostres a partir dels extractes proteïnics purificats i se'ls hi addiciona el colorant de Coomassie Blue G-25 (Bio-Rad). Les proteïnes formen un complex de color blau fosc que absorbeix a 595 nm i la intensitat del qual és directament proporcional a la concentració de proteïna de la mostra. Per a la interpolació de les mesures d'absorbància s'empra una recta de calibratge preparada amb seroalbúmina bovina (BSA).

5.7.5 ELECTROFORESI DE PROTEÏNES EN GEL DE POLIACRILAMIDA

L'electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida es pot dur a terme en condicions natives (ND-PAGE) o desnaturalitzants (SDS-PAGE). Les diferències entre ambdues tècniques radica en els components dels gels, el tampó d'electroforesi i en el tractament de les mostres.

Els protocols seguits es poden trobar en

<http://www.assay-protocol.com/molecular-biology/electrophoresis>

5.7.5.1 EN CONDICIONS DESNATURALITZANTS (SDS-PAGE)

Es va emprar la tècnica d'electroforesi de proteïnes en presència de l'agent desnaturalitzant dodecil sulfat de sodi (*SDS-PAGE*) per a la verificació d'expressió proteínica, identificació i avaluació de la puresa dels enzims en tots els casos. S'utilitzà una concentració de 12 % d'acrilamida en el gel, que permet separar les proteïnes amb pes molecular entre 10 i 200 KDa. Gràcies al detergent SDS i el tractament tèrmic previ de les mostres, la mobilitat electroforètica depèn exclusivament de la seva mida.

5.7.5.2 EN CONDICIONS NATIVES (ND-PAGE)

Es va emprar la tècnica d'electroforesi de proteïnes en condicions natives per a verificar l'estructura tridimensional activa de l'enzim FSA K85M (257 KDa, dodecamèric). S'utilitzà una concentració de 7 % d'acrilamida en el gel, que permet separar les proteïnes amb pes molecular entre 50 i 500 KDa. En aquest cas, les mostres es preparen en condicions no desnaturalitzants i la mobilitat electroforètica depèn de la relació càrrega/pes molecular com també de la forma i mida de l'estructura nativa de la proteïna.

5.7.5.3 DETECCIÓ DE PROTEÏNES EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Per a la detecció de proteïnes en gel de poliacrilamida es va utilitzar el mètode de tinció de blau de Comassie. El reactiu blau brillant de Comassie (Bio-Rad) s'uneix als residus aromàtics i bàsics de les proteïnes, permetent la seva visualització amb un color blau intens. Aquest mètode presenta una sensibilitat de fins 50 ng de proteïna.

5.7.6 ASSAJOS D'ACTIVITAT ENZIMÀTICA

Per a la determinació de l'activitat enzimàtica de les diferents aldolases, s'empraren mètodes espectrofotomètrics cinètics acoblats. Per a tots els assajos, s'utilitzà un espectrofotòmetre Cary 100 o 500 UV-Visible (Varian) on l'activitat enzimàtica es monitoritzada durant 5-10 minuts.

5.7.6.1 DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT DE TREONINA ALDOLASES

Per a la determinació de l'activitat treonina aldolasa es va emprar el mètode de Liu *et al.*^{91, 224} lleugerament modificat. Es mesura la disminució del NADH consumit per l'enzim alcohol deshidrogenasa (ADH) a partir de l'acetaldehid

generat per l'enzim amb activitat L-treonina aldolasa (L-TA) en presència de L-treonina (L-Thr) o D-treonina aldolasa (D-TA) en presència de D-treonina (D-Thr) (**Figura 5.3**). S'efectuaren les mesures a 340 nm i a 30 °C.

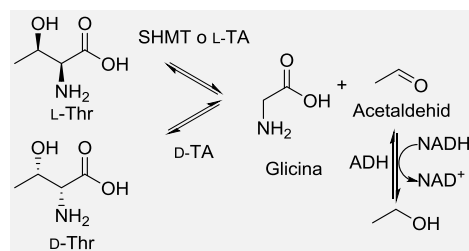


Figura 5.3. Esquema de les reaccions implicades en l'assaig enzimàtic per a detectar i quantificar l'activitat de les aldolases glicina dependents.

La composició de la mescla de reacció es resumeix en la **Taula 5.12**. El volum final de la reacció fou de 1 mL i la reacció s'inicià per l'addició de l'enzim treonina aldolasa, després d'homogeneïtzar i temperar la mescla a 30 °C.

Taula 5.12: Composició de la mescla de reacció emprada per a l'assaig enzimàtic de quantificació de l'activitat de D-/L-treonina aldolasa.

Components	Volum (µL)	Concentració d'assaig
Tampó 200 mM ¹	500	100 mM
D- o L-Treonina (500 mM)	100	50 mM
MgSO ₄ (100 mM) ²	100	10 mM
PLP (2 mM)	25	0.05 mM
ADH (600 U·mL ⁻¹)	50	30 U·mL ⁻¹
NADH (3 mM)	50	0.15 mM
H ₂ O	125	–
Treonina Aldolasa ³	50	1-100 µg

¹Per D-TA i L-TA: Tris/HCl (200 mM), pH 8 i per SHMT: Fosfat de potassi (200 mM), pH 6.5. ² Per assajos amb D-Treonina i D-HAA amb activitat D-treonina. ³D-TA, D-HAA, L-TA i SHMT.

Les mostres es prepararen el mateix dia de l'assaig i es conservaren en gel. Es disposà aproximadament 1 mg·mL⁻¹ de proteïna i es realitzaren dilucions apropiades en cas necessari. Es defineix 1 unitat d'activitat enzimàtica com la quantitat necessària d'enzim capaç de convertir 1 µmol de D-/L-treonina en acetaldehid (equivalent a 1 µmol de NADH oxidat) en un minut a 30 °C.

5.7.6.2 DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT D'ALDOLASES DHAP DEPENDENTS

Per a la determinació de l'activitat de les aldolases DHAP dependents RhuA i FucA es va emprar el mètode de Durany *et al.*^{225, 226} lleugerament modificat. Es mesurà a 340 nm i a 25 °C la disminució del NADH₂ consumit per l'enzim glicerol 3-fosfat deshidrogenasa (GDH) a partir de la dihidroxiacetona fosfat (DHAP) generada per l'enzim RhuA en presència de L-rhamnulosa-1-fosfat (L-RhuA-1P) o FucA en presència de L-fuculosa-1-fosfat (L-FucA-1P).

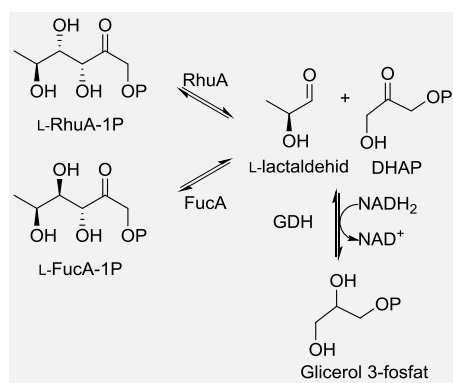


Figura 5.4. Esquema de les reaccions implicades en l'assaig enzimàtic per a detectar i quantificar l'activitat de les aldolases DHAP dependents FucA i RhuA.

La composició de la mescla de reacció es resumeix en la **Taula 5.13**. El volum final de la reacció fou de 1 mL i la reacció s'inicià per l'addició de RhuA o FucA, després d'homogeneïtzar i temperar la mescla a 25 °C.

Taula 5.13: Composició de la mescla de reacció emprada per a l'assaig enzimàtic de quantificació de l'activitat de L-rhamnulosa-1-fosfat aldolasa o L-fuculosa-1-P aldolasa.

Components	Volum (μL)	Concentració d'assaig
Tampó TRIS 100 mM	500	50 mM
L-rhamnulosa-1-P/L-fuculosa-1-P (40 mM)	50	2 mM
GDH (40 U·mL ⁻¹)	50	2.0 U·mL ⁻¹
NADH (3 mM)	50	0.15 mM
H ₂ O	300	–
RhuA/FucA ²	50	1-100 μg

¹ Tampó TRIS (100 mM) KCl (200 mM) pH 7.5. ²RhuA_{wt} i FucA_{wt}. No es realitzà l'assaig d'activitat per FucA F131A ja que aquesta variant no presenta activitat front el substrat natural.¹²⁴

Les mostres es prepararen el mateix dia de l'assaig i es conservaren en gel. Es disposà aproximadament $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteïna i es realitzaren dilucions en els casos requerits. Es defineix 1 unitat d'activitat enzimàtica com la quantitat necessària d'enzim capaç de convertir $1 \text{ }\mu\text{mol}$ de L-rhamnulosa-1-fosfat o L-fuculosa-1-fosfat en DHAP i L-lactaldehid per minut a pH 7.5 i $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.7.6.3 DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT D-FRUCTOSA-6-FOSFAT ALDOLASA (FSA)

S'emprà el mètode descrit per Schürmann i Sprenger (2001)¹³⁸ per a la determinació de l'activitat de FSA. Consisteix en mesurar la formació de D-fructosa-6-fosfat (F6P) a partir de D,L-gliceraldehid-3-fosfat (D,L-GAP) i dihidroxiacetona (DHA) en reaccions acoblades emprant glucosa-6-fosfat isomerasa (PGI) i D-glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PDH) (**Figura 5.5**). Es segueix la reducció del NADP^+ consumit a 340 nm durant 5 minuts i temperant les reaccions acoblades a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

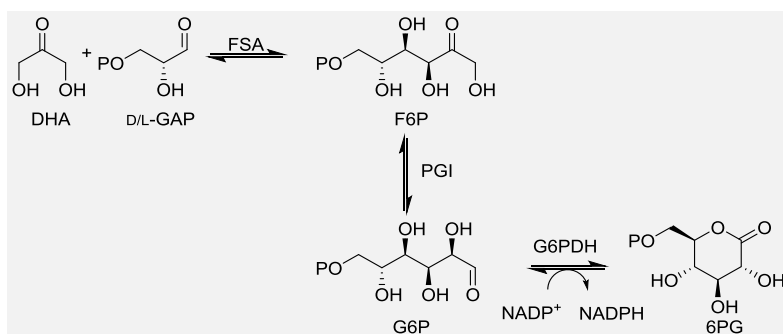


Figura 5.5. Esquema de les reaccions implicades en l'assaig enzimàtic per a detectar i quantificar l'activitat de D-fructosa-6-fosfat aldolasa.

La composició de la mescla de reacció emprada es resumeix en la **Taula 5.14**. El volum final de la reacció fou de 1 mL i la reacció s'inicià per l'addició de D,L-GAP, després d'homogeneïtzar i temperar la mescla a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Taula 5.14: Composició de la mescla de reacció emprada per a l'assaig enzimàtic de quantificació de l'activitat de D-fructosa-6-fosfat aldolasa.

Components	Volum (μL)	Concentració d'assaig
Tampó 50 mM ¹	868	~50 mM
DHA (5 M)	60	300 mM
PGI	1	3-6 U·mL ⁻¹
G6PDH	1	3-6 U·mL ⁻¹
NADP ⁺ (50 mM)	10	0.5 mM
FSA ²	50	1-100 μg
D,L-GAP (280 M)	10	2.8 mM

¹ Glicilglicina (50 mM), DTT (1 mM), pH 8.5 ² FSA_{wt} i variants de FSA.

Les mostres es prepararen el mateix dia de l'assaig i es conservaren en gel. Es disposà aproximadament 1 mg·mL⁻¹ de proteïna i es realitzaren dilucions en els casos requerits. Es defineix 1 unitat d'activitat enzimàtica com la quantitat necessària d'enzim capaç de convertir 1 μmol de D,L-gliceraldehid en fructosa-6-fosfat (equivalent a 1 μmol de NADP⁺ oxidat) en un minut a 30 °C.

5.7.7 CONSTRUCCIÓ DE LA GENOTECA FSA A129S/R134X/A165G/S166G

En aquest estudi, es dugué a terme la construcció de la genoteca FSA A129S/R134X/A165G/S166G. S'emprà la degeneració VVB (V, A/C/G; B, C/G/T) en la posició R134 amb la qual s'obtenen 27 codons, que inclouen els aminoàcids arginina (4), alanina (3 codons), glicina (3), prolina (3), treonina (3), àcid aspàrtic (2), asparagina (2), histidina (2), serina (2), àcid glutàmic (1), glutamina (1) i lisina (1). Aquesta degeneració requereix assajar 79 colònies per a tenir un 95 % de representativitat.

A continuació s'exposa el procediment següent.

- Procediment:

Es preparà la genoteca mitjançant els oligonucleòtids amb la degeneració VVB en la posició R134 (Veure **Taula 5.4**) i el vector pQEfsa A129S/A165G/S166G, seguint el procediment descrit en l'**Apartat 5.5.8.2**. Seguidament es transformaren els productes de PCR en cèl·lules competents *E.coli* Nova Blue (**Apartat 5.5.8.3**) i s'inoculà 80 colònies en una placa de 96 pous (placa estèril d' 1 mL/cada pou, Sigma-Aldrich). Per a cada pou, es disposaren 600 μL de medi YT/Amp i s'addicionà una colònia procedent de la transformació amb el plasmidi degenerat. S'incloueren dos controls positius i dos de negatius. En els controls

positius, s'inoculà el medi amb una colònia coneguda que contenia el plasmidi A129S/R134V/A165G/S166G. En els controls negatius, no s'addicionà cap colònia. La placa es precintà amb un adhesiu permeable al gas i seguidament s'incubà tota la nit a 37 °C i agitació (1000 rpm). Es verificà la correcta degeneració per seqüenciació (servei CRAG-CSIC) de plasmidis seleccionats aleatòriament de la placa realitzant extraccions plasmídiques (**Apartat 5.5.1**).

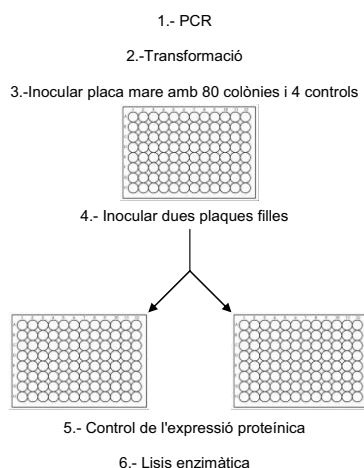


Figura 5.6. Esquema del procediment seguit per a la construcció de la biblioteca genòmica FSA A129S/R134X/A165G/S166G per mutagènesi de saturació de lloc.

A partir de la placa mare, se'n preparen dues més amb 500 µL de medi YT/Amp i 100 µL procedent de la placa inoculada. La placa mare es conservà en fred (4 °C) i les dues plaques filles s'incubaren durant 2.5 hores a 37 °C i agitació (1000 rpm). A continuació s'induí la producció de proteïnes amb IPTG (0.7 µmol, 7 µL de dissolució mare de 100 mM) i s'incubaren tota la nit, a 37 °C i agitació (1000 rpm). Es verificà l'expressió de les proteïnes per electroforesi *SDS-PAGE* (**Apartat 5.7.5.1**).

Per a l'obtenció de les proteïnes expressades, es centrifugaren les plaques (1000 g durant 30 minuts), s'eliminà el sobrenedant i es lisaren els precipitats cel·lulars amb una solució tampó TEA (100 µL, 50 mM, pH 8) amb lisozim (1 mg·mL⁻¹) (procedent d'ou de pollastre, Sigma-Aldrich). Després de 2 hores d'incubació a 37 °C, s'eliminaren les restes cel·lulars per centrifugació (1000 g durant 30 minuts) i el sobrenedant que contenia les proteïnes, es disposà en una nova placa de 96 pous.

Per a determinar els clons positius, s'emprà una alíquota de cada una de les proteïnes dels 84 pous com a catalitzadors en les reaccions aldòliques d'interès (Veure **Apartat 5.9.3.3a**). Es realitzà així un primer cribratge de les 80 colònies

seleccionades. Un cop determinat quins eren els clons positius (11 en aquest estudi), es realitzaren extraccions plasmídiques a partir del cultiu de la placa mare (**Apartat 5.5.1**) i es seqüenciaren.

A continuació es realitzà un segon cribratge dels clons positius seleccionats. Aquests s'expressaren a partir de la placa mare en un volum de medi YT/Amp de 12 mL, en tubs de plàstic (50 mL, falcon) seguint el mateix procediment a diferent escala. L'objectiu fou l'obtenció de més quantitat de cada una de les variants més destacades i valorar de nou les seves capacitats sintètiques front les reaccions aldòliques d'interès (Veure **Apartat 5.9.3.3b**). D'aquesta manera, es poden eliminar falsos clons positius.

5.7.8 MÈTODES COMPUTACIONALS: MODELATGE MOLECULAR

Totes les figures de les estructures proteiques de la FSA foren realitzades amb el programa *Pymol* (Schrödinger) a partir de les coordenades obtingudes en el *Protein Data Bank*. L'entrada per la FSA de *E. coli* és 1L6W.

5.8 TÈCNiques QUÍMIQUES I ANALÍTIQUES

5.8.1 PREPARACIÓ DE N-CBZ-AMINOALDEHIDS

Per a la síntesi dels *N*-Cbz-aminoaldehyds es partí dels aminoalcohols o dels aminoàcids corresponents comercials (Sigma-Aldrich), seguint estratègies posades a punt en el nostre laboratori. En primer lloc es protegiren els grups amino amb benziloxicarbonil (Cbz) i seguidament s'oxidà l'aminoalcohol protegit amb l'àcid 2-iodoxibenzoic (IBX)¹¹⁵ (**Apartat 5.8.1.1**), respectivament) o bé es reduí el grup àcid dels *N*-Cbz-aminoàcids a aldehyd¹³⁵ (**Apartat 5.8.1.2**). Els rendiments globals foren de 75-95 %.

En el cas concret del *N*-Cbz-(*S*)-aspàrtic-semialdehyd (**1**) es preparà a partir de l'ozonòlisi de l'olefina corresponent (**Apartat 5.8.1.3**).²²⁷

5.8.1.1 SÍNTESI A PARTIR DE L'AMINOALCOHOL COMERCIAL

Els *N*-Cbz-aminoaldehyds **1d**, (*R/S*)-**1e**, (*R/S*)-**1f**, (*R/S*)-**1g**, (*R/S*)-**1h**, (*R/S*)-**1i**, (*2S,3R*)-**1j** i (*R/S*)-**1q** es prepararen a partir dels corresponents aminoalcohols comercials (**Figura 5.7**).

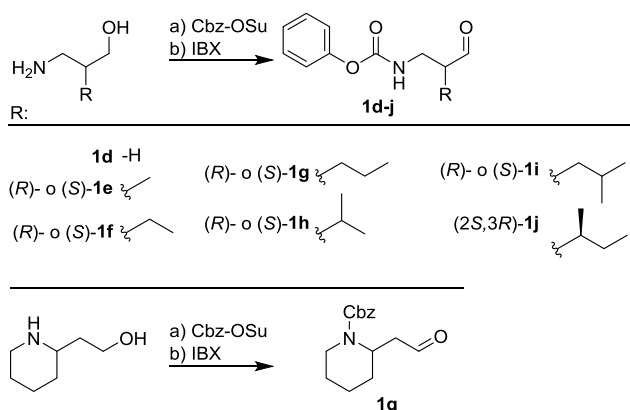


Figura 5.7. Esquema sintètic per a l'obtenció *N*-Cbz-aminoaldehids a partir dels aminoalcohols comercials corresponents.

a) Protecció del grup amino dels aminoalcohols amb Cbz

L'aminoalcohol (13-65 mmol) es dissolgué en una solució d'aigua/dioxà (1:4, 25-150 mL) a la qual s'addicionà, gota a gota i sota agitació, benciloxicarboniloxisuccinimida (Cbz-OSu) (11-54 mmol) dissolt en aigua/dioxà (1:4, 25-50 mL) i es deixà reaccionar tota la nit. Seguidament, s'evaporà el dioxà i es redissolgué en acetat d'etil (150 mL) i es rentà amb àcid cítric al 5 % (3x50 mL) i amb una solució saturada de NaCl (3x50 mL). La fase orgànica es secà amb Na₂SO₄, es filtrà i s'evaporà sota buit fins a sequedat.

b) Oxidació de *N*-Cbz-aminoalcohols amb IBX

El *N*-Cbz-aminoalcohol (9-30 mmol) es dissolgué en acetat d'etil (30-50 mL) i se li addicionà IBX (24-48 mmol) sota agitació, i es portà a reflux entre 5-11 hores, seguint la conversió de reacció per capa fina o HPLC. Finalitzada la reacció, la suspensió blanca es filtrà i la fase orgànica es rentà amb NaHCO₃ al 5 % (3x60 mL) i amb una solució saturada de NaCl (3x60 mL). Es secà amb Na₂SO₄, filtrà i s'evaporà sota buit fins a sequedat.

Es preparà una dissolució mare dels *N*-Cbz-aminoaldehids en DMF (1 M).

Síntesi de l'àcid 2-iodoxibenzoic IBX

La síntesi de l'àcid *o*-iodoxibenzoic (IBX) es realitzà per metodologies prèviament descrites.²²⁸ Es dissolgué l'àcid 2-iodoxibenzoic (160 mmol) en d'aigua destil·lada (1.5 L) i se li agregà Oxone® (2KHSO₅·K₂SO₄·KHSO₄) (450 mmol) sota agitació i es deixà reaccionar durant 3 hores a 70 °C. La solució blanca resultant es refredà a

temperatura ambient i seguidament es deixà a la nevera durant 12 hores. El precipitat blanc obtingut es filtrà i rentà amb aigua (4 x 120 mL) i acetona (4 x 120 mL). Finalment es secà sota buit el sòlid blanc, obtenint un rendiment de 85-90 % rendiment i es guardà protegit de la llum a 4 °C.

5.8.1.2 SÍNTESI A PARTIR DE L'AMINOÀCID COMERCIAL

Els *N*-Cbz-aminoaldehids (*2R,3R*)-**1k**, (*2S,3R*)-**1k**, (*R/S*)-**1m**, (*R/S*)-**1n**, (*S*)-**1o** i (*R/S*)-**1p** es prepararen a partir dels corresponents aminoàcids comercials (**Figura 5.8**), prèviament *N*-Cbz protegit (**Apartat 5.8.1.1a**).

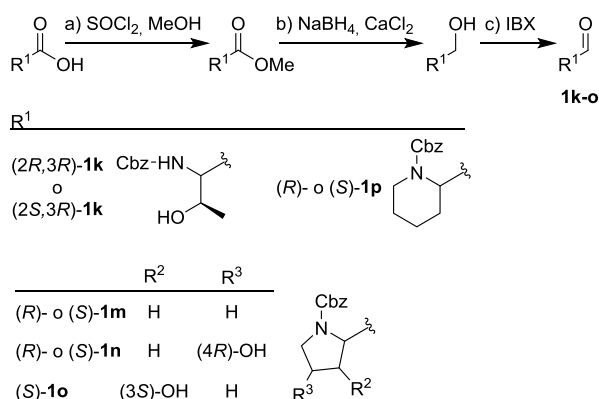


Figura 5.8. Esquema sintètic per a l'obtenció *N*-Cbz-aminoaldehids a partir dels aminoàcids comercials corresponents.

a) Metilació del grup carboxílic dels *N*-Cbz-aminoàcids

El *N*-Cbz-aminoàcid (4-20 mmol) es dissolgué en MeOH (3-20 mL) i es refredà la solució en un bany de gel sec (−78 °C). S'agregà SO₂Cl₂ dissolt en MeOH (8-40 mmol, 2-5 mL) en fred, gota a gota i amb agitació. Un cop addicionada la solució, es retirà el bany de gel i es deixà reaccionar durant entre 1-3 hores, seguint la conversió de reacció per capa fina o HPLC. Finalitzada la reacció, s'addicionà en fred (−78 °C) una solució saturada de NaHCO₃ fins a pH neutre i una solució saturada de NaCl (5-25 mL). S'evaporà sota buit el metanol i s'extragué el compost de la fase aquosa amb acetat d'etil (3x 10-50 mL). Finalment, es secà amb Na₂SO₄, es filtrà i s'evaporà sota buit fins a sequedat.

b) Reducció dels *N*-Cbz-aminoesters amb borhidruir de sodi

Es prepararen els *N*-Cbz-aminoalcohols per reducció dels aminoesters seguint el procediment descrit per *Luly et al.* (Mètode B)²²⁹ lleugerament modificat. Es

dissol el *N*-Cbz-aminoester (4-20 mmol) en una solució de THF/Etanol (1:3, 25-150 mL) i s'hi addicionà NaBH_4 (16-80 mmol) i CaCl_2 (8-40 mmol) en fred (0-4 °C) sota agitació. Transcorreguts 10 minuts, es retirà el bany de gel i es controlà la reacció per capa fina o HPLC. Completada la reacció (1-4 hores), es neutralitzà l'excés de NaBH_4 amb d'àcid cítric al 5 % i s'afegí una solució saturada de NaCl (5-25 mL). S'evaporà sota buit el THF/Etanol i s'extragué el compost de la fase aquosa amb acetat d'etil (3x 10-50 mL). Finalment, es secà amb Na_2SO_4 , filtrà i s'evaporà sota buit fins a sequedat.

c) Oxidació de *N*-Cbz-aminoalcohols amb IBX

Es seguí el mateix procediment descrit en l'**Apartat 5.6.8.1b**.

5.8.1.3 SÍNTESI DEL CBZ-*N*-(*S*)-ASPÀRTIC-SEMIALDEHID

Es preparà *N*-Cbz-(*S*)-aspàrtic-semialdehid ((*S*)-**11**) per ozonòlisi d'al·lilglicina en presència de sulfur de dimetil (**Figura 5.9**).²²⁷

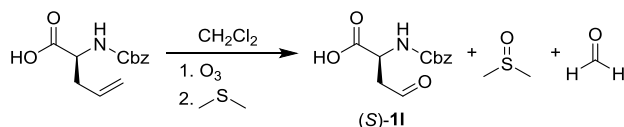


Figura 5.9. Esquema sintètic per a l'obtenció *N*-Cbz-aspàrtic-semialdehid ((*S*)-**11**) a partir de l'olefina comercial corresponent mitjançant l'etapa clau d'ozonòlisi.²²⁷

L'àcid (*S*)-2-*Cbz*-amino-4-pentenoic (Boaopharma Inc.) (10 mmol) es dissolgué en CH_2Cl_2 (30 mL) i es refredà la solució en un bany de gel sec (-78 °C). Es bombollejà O_3 fins que la solució virà de color de transparent a blau intens (~30 minuts) i s'hi addicionà en fred (-78 °C) $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ (100 mmol). Es deixà reaccionar durant tota la nit a temperatura ambient. Finalment, s'evaporà sota buit fins a sequedat i s'obtingué un sòlid blanc amb una conversió de reacció del 77 %. Es preparà una dissolució mare de *N*-Cbz-(*S*)-aspàrtic-semialdehid ((*S*)-**11**) (160 mM) en tampó TEA (100 mM, pH 7.5).

5.8.2 SÍNTESI DE DIHIDROXIACETONA FOSFAT (DHAP)

Es preparà la dihidroxiacetona fosfat (DHAP) per hidròlisi àcida del dímer etil hemiacetal d'hidroxiacetona fosfat seguint el procediment descrit per Effenberg.²³⁰ El dímer de partida fou proporcionat pel Departament de Química Orgànica de la UAB. Es dissolgué el dímer etil hemiacetal d'hidroxiacetona fosfat (12 mmol) en aigua destil·lada (160 mL) i s'afegí la resina Dowex 50Wx8 (Fluka)

fins arribar a pH 1. Es filtrà la dissolució àcida per separar la resina i es disposà el filtrat en un bany de 65 °C durant 6 hores. La solució de DHAP resultant es quantificà i conservà a -20 °C.

Determinació de la concentració de la DHAP

La quantificació de la DHAP es realitzà per assaig espectrofotomètric, mitjançant un espectrofotòmetre Cary 100 o 500 UV-Visible (Varian), a 25 °C i a pH 7.5. La DHAP es reduïda pel NADH en presència de l'enzim glicerol 3-fosfat deshidrogenasa (GPDH) a glicerol 3-fosfat (Figura 5.10). La disminució de l'absorbància a 340 nm és directament proporcional a la quantitat de DHAP present a la mostra. La mescla de reacció s'exposa en la Taula 5.15.



Figura 5.10. Esquema de l'assaig per a la determinació de la concentració de DHAP.

Taula 5.15: Composició de la mescla de reacció per a la determinació de la concentració de DHAP.

Components	Volum (µL)	Concentració d'assaig
Tampó TRIS 100 mM , pH 7.5	977.5	~100 mM
NADH (3 mM)	10	0.03 mM
Mostra	10	–
GDH	2.5	3-6 U·mL ⁻¹

5.8.3 ANÀLISI DE SUBSTRATS I PRODUCTES PER CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC, HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

El seguiment de les reaccions de síntesi dels aldehids de partida, així com el de les addicions aldòliques realitzades en aquest estudi, s'efectuaren per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). S'utilitzà el sistema LaChrom Elite-HPLC (VWR-Hitachi) amb una columna analítica de fase reversa XBridgeTM C18, 5 µm, 4.6x250 mm (Waters). En tots els casos els dissolvents emprats foren: solvent A (H₂O en presència de 0.1 % (v/v) d'àcid trifluoroacètic (TFA) i solvent B (CH₃CN/H₂O 4:1 que conté 0.095 % (v/v) TFA), amb un flux de 1 mL·min⁻¹, detector a 215 nm i temperatura de columna a 30 °C.

La concentració dels productes es calculà a partir de l'àrea dels pics, emprant un mètode estàndard extern. Les conversions de reacció es calcularen a partir de la

concentració inicial del reactiu limitant o a partir del producte de reacció format. Les condicions de gradient foren específiques per cada cas i es detallen en els apartats corresponents.

a) Preparació de mostres per HPLC

Es prengueren mostres (25 o 50 μL) a partir del cru de les reaccions i es dissolgueren en MeOH (475-950 μL). Es centrifugaren prèviament a l'anàlisi per HPLC si es requerí.

b) Preparació de les mostres per derivatització

Es derivatitzà el grup amino dels adductes aldòlics de glicina i **1a-b** amb benciloxycarboniloxi-succinimida (Cbz-OSu), atès que els substrats no contenen un grup cromòfor (**Figura 5.11**). Es prengueren mostres (25 μL) a partir del cru de les reaccions, s'addicionà Cbz-OSu en excés dissolt en dioxà (50 μL , 130 mM) i s'incubaren a 30 °C durant 1 hora. S'addicionà metanol (925 μL) i es centrifugà prèviament a l'anàlisi per HPLC.

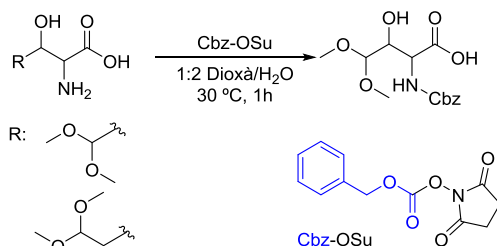


Figura 5.11. Esquema de la derivatització dels adductes aldòlics de les addicions de glicina als aldehids **1a-b** amb Cbz-OSu.

5.8.4 ANÀLISI DE COMPOSTOS PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR (RMN)

L'anàlisi de compostos per RMN ha permès l'elucidació estructural de tots els compostos sintetitzats en aquest treball, així com la quantificació relativa en mescles de productes.

S'emprà l'equip Varian Mercury-400 i generalment tots els compostos es caracteritzaren amb les tècniques 1D de ¹H (400 MHz) i ¹³C (101 MHz) i 2D COSY i HSQC. En mostres més complexes, es va fer ús de les tècniques NOE, NOESY i TOCSY. Els paràmetres foren els de rutina per a molècules petites (pes molecular inferior a 500 g·mol⁻¹) i els dissolvents deuterats utilitzats foren aigua, metanol, dimetilsulfòxid i clorofom.

Els anàlisis per RMN de mostres més complexes es realitzaren amb la col·laboració del Dr. T. Parella del Servei d'Espectroscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona. L'espectròmetre fou AVANCE 500 BRUKER equipat amb una crio-sonda d'alta sensibilitat per a solucions deuterades de H₂O i MeOH.

5.8.5 SÍNTESI DE DERIVATS DE 2-OXAZOLIDINONES

Es realitzà la síntesi de derivats de 2-oxazolidinones dels adductes aldòlics **2a**, **3a** i **3b** per a la seva determinació estructural i determinar així l'estereoquímica de les reaccions, seguint el procediment posat a punt en el nostre grup.⁸⁷

Els *N*-Cbz-β-hidroxi-α-aminoaldehyds **2a**, **3a** i **3b** (0.08 mmols) es dissolgueren en una dissolució KOH (800 μL, 500 mM) i s'incubaren a temperatura ambient durant 30 minuts. Seguidament, es confirmà per HPLC la formació del pic d'alcohol benzílic i la total desaparició del pic de partida. S'addicionà aigua al cru de reacció (10 mL), s'acidulà fins a pH 2 amb àcid acètic diluït i s'extragué el producte de la fase aquosa amb acetat d'etil (2x5 mL). Evaporant fins a sequedat sota buit, s'obtingueren les oxazolidinones corresponents (sòlid blanquinós) que es caracteritzaren per RMN en DMSO deuterat.

Els espectres ¹H RMN i 1D NOESY selectius dels derivats 2-oxazolidinones dels productes **2a**, **3a** i **3b** es troben en el **Material Suplementari S3.2 Figura S7**.

5.8.6 DETERMINACIÓ DE ROTACIONS ÒPTIQUES ESPECÍFIQUES (α_D^{20})

Els valors de les rotacions òptiques específiques dels iminocitols s'obtingueren mitjançant un polarímetre (Perkin-Elmer) amb làmpada de sodi (Na, λ=589 nm). Els productes (1.5-10.0 mg) es dissolgueren en aigua destil·lada o metanol (volum total de 1 mL). Es mesuraren a temperatura ambient emprant una cel·la de 0.1 dm i en modalitat de microapertura per llum polaritzada.

5.8.7 DETERMINACIÓ DE LA MASSA MOLECULAR

La determinació de les masses moleculars dels iminocitols es realitzaren en el Servei d'Espectroscòpia de Masses del CID-CSIC, emprant un espectròmetre de masses ESI-TOF (LCT Waters). Les mostres (50 μg·mL⁻¹) es prepararen en de MEOH/H₂O (8:2, 1 mL). El programa MassLynx 4.1 (Waters) utilitzà per a l'adquisició i el processat de les dades i el portal www.chemcalc.org, per a determinar amb exactitud les masses teòriques de cada compost.

5.9 ADDICIONS ALDÒLIQUES CATALITZADES PER ALDOLASES A ESCALA ANALÍTICA

5.9.1 ADDICIONS ALDÒLIQUES AMB ALDOLASES DEPENDENTS DE GLICINA

5.9.1.1 ADDICIONS ALDÒLIQUES CATALITZADES PER D-TREONINA ALDOLASA D'*Achromobacter xylosoxidans* (D-TA_{oxy}) PER OBTENIR β-HIDROXI-α-AMINOÀCIDS

S'empraren els aldehids 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**) i 3,3-dimetoxiacetaldehid (**1b**) i els *N*-Cbz-aminoaldehids (**1c**, **1d**, (*R/S*)-**1e** i *R*-**1f**) en les addicions aldòliques de glicina catalitzades per D-TA_{oxy}. Totes les reaccions es duen a terme a escala analítica (200-500 µL) amb D-TA_{oxy} (20 U·ml⁻¹ de reacció, purificat per mètode 12, veure **Apartat 5.7.3.4**), en presència dels cofactors PLP (10 µM) i MnCl₂ (0.1 mM), a 25 °C, pH 8.5 i sota agitació (1000 rpm).

Per **1a-b** (115 mM), el reactiu limitant fou la glicina (70 mM) i el medi de reacció aquós. Per **1c**, **1d**, (*R/S*)-**1e** i *R*-**1f** (70 mM), s'emprà la glicina en excés (90 mM). S'empraren tres medis de reacció: DMF/H₂O (1:4), AcOEt/H₂O (1:9) i en emulsió d'alta concentració aquosa H₂O:C₁₆H₃₄:C₁₄E₄ (90:6:4).¹¹⁵

Es monitoritzaren les reaccions per HPLC, emprant un gradient de 10 % a 70 % B en 30 minuts. Per **1a-b**, les mostres de reacció es derivatitzen prèviament (Veure **Apartat 5.8.3 b**) a l'anàlisi per HPLC i es seguiren també per capa fina, amb fase mòbil de *N*-propanol/nitrometà/àcid acètic/aigua 3:2:2:1 i es revelaren amb ninhidrina.

5.9.1.2 ESTUDI DELS PARÀMETRES DE REACCIÓ DE L'ADDICIÓ DE GLICINA A 2,2-DIMETOXIACETALDEHID (**1a**) CATALITZADA PER D-TA_{oxy}

S'estudiaren els paràmetres de temperatura d'incubació, concentració de glicina, unitats d'enzim i el pH de la reacció d'addició de glicina a 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**) catalitzada per D-TA_{oxy} a fi de maximitzar la conversió a l'adducte aldòlic l'àcid D-(2*R*,3*R*)-2-amino-3-hidroxi-4,4-dimetoxi-butanoic (**2a**).

Totes les reaccions es duen a terme a escala analítica (200 µL) en presència dels cofactors PLP (10 µM) i MnCl₂ (0.1 mM), sota agitació (1000 rpm).

- Efecte de la T^a de reacció: 4° i 25° C. Glicina (14 µmol, 155 µL de solució mare 90.3 mM), **1a** (23 µmol, 28.7 µL de solució mare 800 mM) a pH 8.5 i D-TA_{axy} (4 U).

- Efecte de la concentració de glicina: 70 o 140 mM. Glicina (14 µmol o 28 µmol, 155 µL de solució mare 90.3 mM o 180 mM), **1a** (23 µmol, 28.7 µL de solució mare 800 mM) a pH 8.5, 25° C i D-TA_{axy} (4 U).

- Efecte de les unitats D-TA_{axy}: 4, 6, 8 o 10 U. Glicina (14 µmol, 155 µL de solució mare 90.3 mM), **1a** (23 µmol, 28.7 µL de solució mare 800 mM) a pH 8.5 i 25° C.

- Efecte del pH de la reacció: 7.5, 8.5 o 9.5. Glicina (14 µmol, 155 µL de solució mare 90.3 mM), **1a** (23 µmol, 28.7 µL de solució mare 800 mM) a 25° C i D-TA_{axy} (8 U).

El seguiment de les reaccions s'efectuà aplicant el mateix procediment anterior descrit en **Apartat 5.9.1.1**.

5.9.1.3 ADDICIONS ALDÒLIQUES AMB 2,2-DIMETOXIACETALDEHID (**1a**) CATALITZADES PER ALDOLASES DEPENDENTS DE GLICINA

L'aldehid 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**, 50 µmols; 62.5 µL d'una solució mare 800 mM) es dissolgué en medi aquós amb glicina (35 µmols; 387.5 µL d'una solució mare 90.3 mM) en presència de PLP (12.9 µM) sota agitació (1200 rpm) i volum final de reacció de 500 µL. S'ajustà el pH de les reaccions amb NaOH segons requereixi l'enzim (pH 8.0 per L-SHMT_{sth}; pH 6.8 per L-TA_{eco}, pH 8.5 per D-TA_{axy} i pH 9.0 per D-HAA_{pde}). S'addicionà MnCl₂ (5 µL, 10 mM) a les reaccions amb D-TA_{axy} i D-HAA_{pde} i cada un dels enzims: SHMT_{sth} (1.1 U, 2.50 mg), L-TA_{eco} (2.0 U, 1.44 mg), D-TA_{axy} (10 U, 2.23 mg) i D-HAA_{pde} (20 U, 0.36 mg). La temperatura de reacció fou de 4 °C, a excepció per D-TA_{axy} que fou a 25 °C.

Es segueixen les reaccions a diferents temps aplicant el mateix procediment anterior descrit (**Apartat 5.9.1.1**).

5.9.2 ADDICIONS ALDÒLIQUES CATALITZADES PER ALDOLASES DEPENDENTS DE DHAP

Els *N*-Cbz-β-hidroxi aminoaldehyds **2d**, **3d**, **2e** i **3e** (29.2 µmol, 100 µL de solució mare de 291.9 mM) es dissolgueren en medi DMF/H₂O (1:4) amb DHAP (35.0 µmol, 342.1 µL de solució mare de 102.3 mM prèviament ajustada a pH 6.9 amb NaOH) sota agitació (1200 rpm) a 4 o 25 °C i un volum final de reacció de 500 µL. S'empraren els enzims FucA_{wf} (15 U, 1.5 mg), FucA F131A (0.15 U, 1.5 mg)¹²⁴, FucA F131A/ F206A (0.075 U, 1.5 mg)¹²⁴, RhuA_{wf} (Zn²⁺) (2.3 U, 0.35 mg),

RhuA_{wt} (Co²⁺) (4.2 U, 0.35 mg) dissolts en 100 µL d'aigua ultrapura. Les reaccions s'ajusten a pH 7.5 si s'empra FucA_{wt} o variants i a pH 6.9 si s'empra RhuA_{wt}, amb una dissolució NaHCO₃ saturada o NaOH (1 M). Les reaccions catalitzades amb RhuA_{wt} també s'empra DHA (35.0 µmol, 342.1 µL de solució mare de 102.3 mM) en dissolució borat sòdic (200 mM) en comptes de DHAP com a donador. Les reaccions es monitoritzaren per HPLC emprant un gradient de 10 % a 70 % B en 30 minuts.

5.9.2.1 ESTUDI DE L'EFFECTE DEL COFACTOR EN EL CENTRE ACTIU DE LA RHUA_{wt} EN LA ESTEREOSELECTIVITAT DELS ADDUCTES DE REACCIONS

Es realitza el mateix procediment anterior descrit (**Apartat 5.9.2**) amb el *N*-Cbz-β-hidroxi aminoaldehyds (**2e** i **3e**) i DHAP catalitzades per RhuA_{wt} (Zn²⁺) o RhuA_{wt} (Co²⁺) (0.25 mg, 0.5 mg i 1 mg) a 25 °C. S'analitzaren mostres per HPLC a diferents temps de reacció (0, 1, 3, 6 i 24 hores).

5.9.3 ADDICIONS ALDÒLIQUES CATALITZADES PER FSA_{wt} I VARIANTS

S'ha realitzat l'estudi d'addicions aldòliques a escala analítica emprant FSA_{wt} i les variants dissenyades en aquest treball o en el nostre grup de recerca.^{141, 152, 153, 212}

5.9.3.1 ESTUDI PER A LA SÍNTESI DELS INTERMEDIS DE DERIVATS DE L'ÀCID PIPECÒLIC I IMINOCICLITOLS PIPERIDÍNICS

Els *N*-Cbz-β-hidroxi aminoaldehyds **2d**, **3d**, **2e** i **3e** (11.7 µmol o 29.2 µmol, concentració final de 50 mM) es dissolgueren en medi DMF/H₂O (1:4) ajustat a pH 7.5-8 amb també TEA (15.0 µmol, 30 µL de solució mare de 500 mM, ajustada a pH 7.5) i emprant com a donadors DHA/HA (33.0 µmol, 66 µL de solució mare de 500 mM) o GO (0.045 mmol, addicionat 10 µL a les 0, 0.5, 1, 3, 4, 5 hores de reacció i 30 µL a les 6 hores¹⁴⁸ de solució mare 500 mM) a escala analítica (200 µL de volum total per reaccions amb DHA i HA, i 500 µL per GO). Les reaccions s'iniciaren amb l'addició de l'enzim FSA_{wt} o variants (1 mg·mL⁻¹ volum de reacció). Les variants assajades foren: FSA L107Y/A129G, FSA L107Y/A129G/A165G, FSA A129G, FSA A129G/S166G, FSA A129S, FSA A129S/A165G, FSA A129S/A165G/S166G, FSA S166G.

Les reaccions s'incubaren a temperatura ambient (20-25 °C) amb agitació (1200 rpm) durant 48 hores i es prengueren mostres a diferents temps de reacció (0, 6, 24 i 48 hores). Totes les reaccions es monitoritzaren per HPLC amb les mateixes condicions que l'**Apartat 5.9.2**.

5.9.3.2 ESTUDI DE LA CAPACITAT SINTÈTICA DE VARIANTS DE FSA AMB DIFERENTS DONADORS I DIVERSOS *N*-CBZ-AMINOALDEHIDS α - O β -SUBSTITUÏTS

a) Emprant com a donador dihidroxiacetona (DHA) o hidroxiacetona (HA)

Els *N*-Cbz-aminoaldehyds **1f-q** (24.0 μ mol, 24 μ L de solució mare de 1M en DMF) es dissolen en medi DMF/H₂O (1:4) amb DHA/HA (33.0 μ mol, 66 μ L de solució mare de 500 mM) i tampó TEA (15.0 μ mol, 30 μ L de solució mare de 500 mM, ajustada a pH 7.5) a escala analítica (300 μ L). En el cas concret del Cbz-*N*-(*S*)-aspàrtic-semialdehid ((*S*)-**1l**; 24.0 μ mol, 150 μ L de solució mare de 160 mM en TEA 100 mM, pH 7.5) les reaccions es dugueren a terme en medi aquós.

S'empraren les variants de FSA (0.9 mg):

FSA A129S/A165G/S166G	FSA A129S/R134E/A165G/S166G
FSA A129S/A164A/A165G/S166G	FSA A129S/R134H/A165G/S166G
FSA A129S/A165G/S166G/F167A	FSA A129S/R134P/A165G/S166G
FSA A129S/A165G/S166G/F167V	FSA A129S/R134S/A165G/S166G
FSA A165G/S166G/F167A	FSA A129S/R134V/A165G/S166G
FSA A129S/R134A/A165G/S166G	

Les reaccions s'incubaren a temperatura ambient (20-25 °C) amb agitació (1200 rpm) durant 48 hores i es prengueren mostres a diferents temps de reacció (0, 24, 48 i 72 hores). Totes les reaccions es monitoritzaren per HPLC amb gradient d'elució de 10 a 70 % de B en 30 minuts pels aldehyds (**1f**, **1g**, **1k**, **1l**) i el gradient 30 a 100 % de B en 30 minuts pels aldehyds (**1h**, **1i**, **1j**, **1m**, **1n**, **1o**, **1p**, **1q**).

b) Emprant com a donador glicolaldehid (GO)

Es realitzà el mateix procediment anterior descrit (**Apartat 5.9.3.2a**) amb GO (30.0 μ mol, 60 μ L de solució mare de 500 mM) el qual s'addicionà a diferents temps de reacció (3 μ mol a 0, 0.5, 1, 1.5, 2 i 3 hores de reacció i 6 μ mol a les 4 i 6 hores¹⁴⁸).

S'empraren les variants de FSA (0.9 mg):

FSA L107Y/A129G/A165G	FSA L107Y/A129G/R134V/A165G/S166G
FSA L107Y/A129G/A165G/S166G	FSA L107Y/A129G/A165G/S166G/F167A
FSA L107Y/A129G/A164A/A165G/S166G	FSA L107Y/A129G/A165G/S166G/F167V
FSA L107Y/A129G/R134E/A165G/S166G	FSA A129G/A165G/S166G
FSA L107Y/A129G/R134H/A165G/S166G	FSA A129T/A165G/S166G
FSA L107Y/A129G/R134P/A165G/S166G	FSA A129V/A165G/S166G
FSA L107Y/A129G/R134S/A165G/S166G	

En el cas concret del (S)-**1l** també s'assajaren les variants FSA A129G, FSA A129G/A165G i FSA L107Y/A129G.

5.9.3.3 CRIBRATGE DE LA GENOTECA FSA A129S/R134X/A165G/S166G

a) Primer cribratge

Els *N*-Cbz-aminoaldehids (*R*)-**1h** i (*S*)-**1p** (18.0 μmol, 46 μL de solució mare de 391.3 mM en DMF) es dissolgueren en un volum final de 230 μL (DMF/H₂O (1:4)) que contenia HA per (*R*)-**1h** o DHA per (*S*)-**1p** (DHA/HA; 26.0 μmol, 51 μL de solució mare de 111.0 mM), tampó TEA (23 μL de solució mare de 500 mM, pH 7.5), H₂O (35 μL) i FSA A129S/R134X/A165G/S166G (100 μL en TEA, provinents de les plaques filles (**Apartat 5.7.7**)). Les reaccions (84 per a cada aldehid) es dugueren a terme en placa de 96 pous (d' 1 mL/cada pou, Sigma-Aldrich) i s'incubaren sota agitació (1200 rpm) a 25 °C. Es prengueren mostres de reacció a les 24 hores i s'analitzaren per HPLC, emprant un isocràtic de 65 % B durant 9 minuts per (*R*)-**1h** i un gradient de 40 % a 100% B en 18 minuts per (*S*)-**1p**. Es seguiren les reaccions també per capa fina, emprant com a fase mòbil AcOEt/Hexà ((*R*)-**1h**, 2:1; (*S*)-**1p**, 4:1) i revelador (dissolució de 75 g de (NH₄)₆ Mo₇O₂₄·4H₂O i 2.5 g de Ce(SO₄)₂ en 500 mL de H₂SO₄ 10 %).

b) Segon cribratge

Es realitzà el mateix procediment anterior descrit (**Apartat 5.9.3.3a**) amb (*R/S*)-**1h** amb HA i (*R/S*)-**1p** amb DHA. Les variants de FSA provingueren de l'expressió de les variants més eficaces del primer cribratge (11 enzims) i un control corresponent a FSA A129S/R134V/A165G/S166G (12 reaccions per a cada aldehid, un total de 48 reaccions).

5.10 SÍNTESI DE DERIVATS POLIHIDROXILATS DE L'ÀCID PIPECÒLIC I IMINOCICLITOLS PIPERIDÍNICS

5.10.1 SÍNTESI DELS INTERMEDIS OBTINGUTS AMB TREONINA ALDOLASES

5.10.1.1 SÍNTESI DE L'ÀCID (2*R*,3*R*)-2-(BENZILOXICARBONILAMINO)-3-HIDROXI-4,4-DIMETOXI-BUTANOIC (3a) AMB D-TA_{oxy}

En erlenmeyer de tap de rosca (500 mL) es mesclà 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**, 24.0 mmol, 15 mL de solució mare 120 mM) amb tampó de glicina (14.0 mmol, 185 mL de solució mare de 70 mM) que conté PLP (0.03 mmols, 0.05 mM) i MnCl₂ (0.02 mmol, 0.1 mM) ajustat a pH 8.5 amb NaOH (1 M). El volum final de reacció és de 200 mL i la reacció s'inicià amb l'addició de D-TA_{oxy} (8 KU, 40 U·mL⁻¹ de volum de reacció, 6.8 U·mg⁻¹ de proteïna total). Després de 20 hores, s'hi afegí més quantitat D-TA_{oxy} (1 KU, 5 U·mL⁻¹ de volum de reacció). La reacció s'incubà en un bany (agitació lateral) temperat a 20 °C i es monitoritzà per HPLC i TLC (condicions en **Apartat 5.9.1.1**). Després de 66 hores, s'aturà la reacció amb acetonitril (200 mL) i la mescla es filtrà a través de Celite/Charcoal (50:50). S'addicionà al filtrat Cbz-OSu (4.38 g, 16.8 mmol) i es seguí la reacció de derivatització per TLC (AcOEt/ Hexà / Àcid acètic 3:2:1; es revelà amb Ce/Mo). Després de 48 hores a 25 °C, s'extragué l'acetonitril del cru evaporant sota buit i s'ajustà el pH a 10 amb NaHCO₃. Es rentà la fase aquosa amb acetal d'etil (4x50 mL), s'acidulà a pH 4 amb HCl diluït i es saturà amb NaCl. Seguidament, s'extragué el producte de la fracció aquosa amb rentats d'acetat d'etil (4x50 mL). La fracció orgànica s'assecà amb Na₂SO₄ anhidre i s'evaporà sota buit fins a sequedat. Aquest procediment es repetí altre cop per obtenir suficient producte pels següents passos sintètics. L'oli incolor obtingut total (8.5 g) contingué **3a** (5.45 g, 30.4 mmol), producte minoritari **3b** (0.329 g, 1.8 mmol) i *N*-Cbz-glicina (1.92 g, 9.2 mmol) determinat per HPLC. La resta del material (0.8 g) correspongué a dissolvent. S'empraren els crus obtinguts sense cap altre pas de purificació en els següents passos.

5.10.1.2 SÍNTESI DE L'ÀCID (2*R*,3*R*)- (3a) I (2*R*,3*S*)- 2-(BENZILOXICARBONIL-AMINO)-3-HIDROXI-4,4-DIMETOXI-BUTANOIC (3b) AMB D-HAA_{pde}

En erlenmeyer de tap de rosca (250 mL) es mesclà 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**, 10.0 mmol, 2.5 mL de solució al 40% wt/v) amb tampó de glicina (7.0 mmol, 25 mL de solució mare de 280 mM que conté PLP (12.9 µM) i MnCl₂ (129 µM) ajustat a pH 9 amb NaOH (1 M)). S'afegí aigua destil·lada (17.5 mL) fins a un volum final de 50 mL i la reacció s'inicià amb l'addició de D-HAA_{pde} (2.2 kU en 5

mL). La reacció s'incubà en un bany (agitació lateral) temperat a 20 °C, durant 2 dies. Es monitoritzà la reacció, es derivatitzà el producte i es purificà el cru de reacció de la mateixa que en l'apartat anterior (**Apartat 5.10.1.1**). S'obtingué un oli incolor (1.70 g) que contenia **3a** (502 mg, 1.60 mmol), **3b** (639 mg, 2.03 mmol) i *N*-Cbz-glicina (508 mg, 2.42 mmol) determinat per HPLC.

5.10.1.3 SÍNTESI DE L'ÀCID (2*S*,3*R*)-2-(BENZOLOXICARBONILAMINO)-3-HIDROXI-4,4-DIMETOXI-BUTANOIC (**2a**) AMB L-SHMT_{sth}

En erlenmeyer de tap de rosca (250 mL) es mesclà 2,2-dimetoxiacetaldehid (**1a**, 10.0 mmol, 2.5 mL de solució al 40% wt/v) amb glicina (7.0 mmol, 25 mL de solució mare de 280 mM) ajustada a pH 8 amb NaOH (1 M). S'afegí aigua destil·lada (17.5 mL) fins a un volum final de 50 mL i la reacció s'inicià amb l'addició de SHMT_{sth} (110 U, 0.250 g dissolts en 5 mL). La reacció s'incubà en un bany (agitació lateral) temperat a 4 °C, durant 4 dies. Es monitoritzà la reacció, es derivatitzà el producte i es purificà el cru de reacció de la mateixa que en l'apartat anterior (**Apartat 5.10.1.1**). S'obtingué un oli incolor (1.92 g) que contenia **2a** (1.58 g, 5.05 mmol) i *N*-Cbz-glicina (0.33 g, 1.60 mmol) determinat per HPLC. El mateix procediment es va repetir i es va obtenir un oli incolor (8.0 g) que contenia **2a** (4.9 g), producte minoritari **2b** (0.57 g) i *N*-Cbz-glicina (2.3 g).

S'empraren els crus obtinguts sense cap altre pas de purificació en els següents passos.

5.10.2 PURIFICACIÓ DELS ÀCIDS *N*-CBZ-3-HIDROXI-4,4-DIMETOXI-BUTANOIC (**2a**, **3a-b**) PER LA CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL

Una fracció dels productes aldòlics **2a**, **3a**, **3b** (150 mg) es purificaren per HPLC semi-preparatiu equipat amb columna X-Terra Prep MS C-18, 10 µm, 19 x 250 mm. Els dissolvents emprats foren (A): H₂O 5 mM CH₃COONH₄ i (B) ACN/H₂O 4/1, 5 mM CH₃COONH₄. S'eluíren amb un gradient de 10 a 50 % de B en 30 minuts i flux de 10 mL min⁻¹. Els productes es detectaren a 215 nm i les fraccions recollides s'analitzaren per HPLC analític. S'ajuntaren les fraccions pures de cada compost, s'ajustaren a pH 4.0 amb àcid acètic i es liofilitzaren.

S'obtingué **2a** (85.0 mg), (30.4 mg) i **3b** (35.1 mg), i es prepararen les oxazolidinones corresponents seguint el procediment descrit en l'**Apartat 5.8.5**.

5.10.3 OBTENCIÓ DELS ÀCIDS (2*R*,3*R*)- (3d) I (2*S*,3*R*)-*N*-CBZ-2-AMINO-3-HIDROXI-4-OXOBUTANOIC (2d)

S'obtingueren els àcids (2*R*,3*R*)- (3d) i (2*S*,3*R*)-*N*-Cbz-2-amino-3-hidroxi-4-oxobutanoic (2d) a partir dels crus finals de reacció descrits en els apartats anteriors 5.10.1.1 i 5.10.1.3, respectivament. Una fracció de cada cru (cru que conté de 3d (1.8 mg); cru que conté 2d (4.2g)) es dissolgueren en ACN/H₂O/HCl (1 M) (2:1:1) i s'incubaren 1 hora en un bany temperat a 60 °C. La transformació quantitativa es comprovà per HPLC (gradient de 10 a 70 % de B en 30 minuts). Seguidament s'eliminà l'acetoneitril per evaporació sota buit, es saturà la fase aquosa amb NaCl i es realitzaren extraccions amb acetat d'etil. S'assecà la fracció orgànica amb Na₂SO₄ anhidre, es filtrà i s'evaporà fins a sequedat sota buit.

De la primera fracció, s'obtingué un oli groguenc que conté 3d (821 mg, 3.1 mmol), l'aldehid corresponent al 3b (43 mg, 0.16 mmol) i *N*-Cbz-glicinol (285 mg, 1.4 mmol).

De la segona fracció, s'obtingué un oli groguenc que conté 2d (2.4 g, 9.0 mmol), l'aldehid corresponent a 2b (0.05 g, 0.2 mmol) i *N*-Cbz-glicinol (1.2 g, 5.9 mmol).

S'empraren els crus obtinguts sense cap altre pas de purificació en els següents passos.

5.10.4 OBTENCIÓ DELS ALDEHIDS (2*S*,3*R*)- (3e) I (2*R*,3*R*)-*N*-CBZ-3-AMINO-2,4-DIHIDROXIBUTANAL (2e)

S'obtenen els aldehids (2*R*,3*R*) (3e) i (2*S*,3*R*)-*N*-Cbz-2-amino-3-hidroxi-4,4-dimetoxi-butanoic (2e) a partir dels crus finals de reacció descrits en els apartats anteriors 5.10.1.1 i 5.10.1.3, respectivament. Es metilà el grup carboxílic (Veure Apartat 5.8.1.2 a), es reduí l'aminoesters amb borhidrur de sodi (Veure Apartat 5.8.1.2 b) i s'hidrolitzà l'acetal (Veure Apartat 5.10.2). S'obtingueren conversions quantitatives en els tres passos sintètics i es seguiren per capa fina o HPLC (gradient de 10 a 70 % de B en 30 minuts). El rendiment total fou de 50-65 % respecte del producte majoritari d'interès (3e i 2 e).

A partir del cru que contenia 3a (Apartat 5.10.1.1) s'obtingué un oli groguenc (339 mg) amb 3e (248 mg, 0.98 mmol), *N*-Cbz-glicinol (78 mg, 0.39 mmol) i el diastereoisòmer (2*S*,3*S*)-*N*-Cbz-3-amino-2,4-dihidroxibutanal (13.0 mg, 0.05 mmol).

A partir del cru que contenia 2a (Apartat 5.10.1.3) s'obtingué un oli groguenc (1.4 g) que conté 2e (753 mg, 2.9 mmol), *N*-Cbz-glicinol (302 mg, 1.5 mmol) i el

diastereoisòmer (2*R*,3*R*)-*N*-Cbz-3-amino-2,4-dihidroxibutanal (15.4 mg, 0.06 mmol).

S'empraren els crus obtinguts sense cap altre pas de purificació en els següents passos.

5.10.5 SÍNTESI DELS ADDUCTES ALDÒLICS CATALITZATS PER FUCA F131A I RhuA_{wt} (4,5,9a-b i 10a)

A nivell preparatiu, les addicions aldòliques de DHAP als aldehids acceptors **2d-e** i **3d-e**, catalitzades per RhuA_{wt} i FucA F131A es realitzaren amb l'objectiu d'obtenir 30-70 mg de productes finals derivats de l'àcid piperòlic (**8a-c**) i homioiminociclitols piperidínics (**12a-c**, **12i-j**). En erlenmeyers amb tapa de rosca de 50 mL (volum final de reacció 10.5-20.0 mL), **2d-e,3d-e** (0.47-0.8 mmol, concentració final de 40-45 mM) dissolts en DMF (2.1-4 mL, 20% (v/v) del volum final de reacció) es mesclaren amb DHAP (0.91-1.5 mmol, concentració final de 70-75 mM). Les reaccions amb FucA F131A (6.5 mg proteïna·mL⁻¹ de reacció) es dugueren a terme a pH 6.9 (NaOH 1 M) a 4 °C. Les reaccions amb RhuA_{wt}(Zn²⁺)(0.3-0.6 mg proteïna·mL⁻¹ de reacció) es dugueren a terme a pH 7.5 (NaOH 1 M) a 25 °C.

Les reaccions s'agitaren en un bany (agitació lateral) i es controlaren les conversions per HPLC fins que els pics màxim de productes (**4,5,9a-b** i **10a**) es mantingueren constants (17-46 hores de reacció). S'addicionà MeOH (20 mL) als crus de reacció, es centrifugaren (8000 rpm durant 40 minuts) per tal d'extreure l'enzim precipitat i s'eliminà dels filtrats el MeOH per evaporació sota buit. Seguidament, els crus de reacció es purificaren de dues maneres diferents, segons si l'adducte format contenia el grup carboxilat (**4,5**) o no (**9a-b**, **10a**).

Pels adductes aldòlics amb el grup carboxilat (**4,5**), s'ajustà el cru a pH 4 (HCl, 1 M) i s'extragué el *N*-Cbz-aminoaldehid de partida que no ha reaccionat per extraccions amb acetat d'etil (6x50 mL). En canvi, els adductes aldòlics (**9a-b**, **10a**) es purificaren del cru de reacció per HPLC semi-preparatiu amb columna de fase reversa (procediment descrit en l'**Apartat 5.10.7**).

Finalment, es desfosforilaren els adductes aldòlics emprant fosfatasa àcida (0.3-0.6 U·mg⁻¹ de producte fosforilat; Sigma-Aldrich, tipus II procedent de patata, 1.9 U·mg⁻¹ sòlid), en medi aquós, temperatura 25 °C i incubant en un bany lateral durant 18-24 hores. Es seguiren les conversions quantitatives per HPLC i s'aturaren les reaccions afegint metanol (20 mL). S'eliminà l'enzim desnaturalitzat filtrant els crus a través de filtre de niló (0.45 µm). Els filtrats es

conservaren en fred (4 °C) fins la seva purificació per columna de HPLC semi-preparatiu.

5.10.6 SÍNTESI DELS ADDUCTES ALDÒLICS CATALITZATS PER FSA_{wt} I VARIANTS (6a-c, 7a-c, 11a-c)

A nivell preparatiu, les addicions aldòliques de DHA, HA i GO als acceptors **2d-e** i **3d** catalitzades per FSA_{wt} i variants es realitzaren amb l'objectiu d'obtenir 35-150 mg de productes finals derivats de l'àcid pipecòlic (**8d-k**) i homoiminociclitols piperidínics (**12d-h**). En tubs amb tapa de rosca de 50 mL (volum final de reacció 11-14 mL), els aldehids (**2d-e** i **3d** 0.36-1.1 mmol, concentració final de 50 mM) es mesclaren amb els donadors (DHA/HA, 0.54-2.2 mmol, concentració final de 100 mM; GO, 0.66-1.21 mmol, concentració final de 90 mM) i tampó TEA (50 mM, pH 7.5). Les reaccions es dugueren a terme en medi aquós per l'aldehid **3d**, o amb un 15% de DMF (v/v) pels aldehids **2d-e**. L'addició del GO es realitzà a diferents temps de reacció (10 mM a les 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 hores i 30 mM a les 6 hores). S'emprà FSA_{wt} per a les reaccions amb HA, FSA A129S i FSA A129S/A165G per DHA i FSA A129G per GO. Les reaccions s'iniciaren agregant l'enzim (2-3 mg proteïna·mL⁻¹ reacció) i es deixà en agitació (800 rpm) a temperatura ambient. Es controlaren les conversions aldòliques per HPLC (gradient de 10 a 70% de B en 30 minuts) i s'aturaren les reaccions quan els pics màxim de productes (**6a-c**, **7a-c**, **11a-c**) es mantingueren constants (5-45 hores de reacció) per addició HCl fins a pH 5-6 i MeOH (10-30 mL). Seguidament, s'eliminà l'enzim desnaturalitzat filtrant els crús a través de filtre de niló (0.45 µm) i es conservaren els filtrats en fred (4 °C) fins la seva purificació per columna de HPLC semi-preparatiu.

5.10.7 PURIFICACIÓ DELS ADDUCTES ALDÒLICS

Els crús de reacció es purificaren per HPLC semi-preparatiu amb columna de fase reversa X-Terra Prep MS C-18, 10 µm, 19x250 mm. Els crús s'injectaren a la columna directament en fase aquosa, s'elueïren amb un flux de 10 mL·min⁻¹ i es detectaren els compostos a 215 nm.

Pels intermedis fosforilats (**9a-b**, **10a**) s'ajustà el pH del cru a 2-3 (HCl, 1 M), s'eliminaren les sals i DMF amb un isocràtic de 5 minuts d'aigua 0.1 % (v/v) TFA i s'elueïren amb gradient de 8 a 56 % CH₃CN 0.1 % v/v en 40 minuts.

Pels intermedis amb grup carboxilat (**4**, **5** (desfosforilats) i **6a-c**, **7a-c**) s'ajustà el pH del cru a 2-3 (HCl, 1 M), s'eliminaren les sals i DMF amb un isocràtic de 5-10 minuts a d'aigua 0.1 % (v/v) TFA i s'elueïren amb diferents gradients de 0 a 25-40 % CH₃CN v/v en 40-70 minuts.

Pels intermedis (**9a-b**, **10a** (desfosforilats) i **11a-c**) s'eliminaren les sals i DMF amb un isocràtic de 5-10 minuts a d'aigua i s'elueixen emprant un gradient de 10 a 56 % CH₃CN v/v en 30 minuts.

Les fraccions d'interès s'analitzaren per HPLC (gradient de 10 a 70 % de B en 30 minuts), s'ajuntaren les que contenen els aldols purs i es liofilitzaren. En alguns casos, es requerí repetir la purificació per tal d'obtenir les fraccions pures (99 %).

5.10.8 OBTENCIÓ DE DERIVATS D'ÀCID PIPECÒLIC I IMINOCICLITOLS PIPERIDÍNICS FINALS

S'obtingueren els productes finals derivats de l'àcid pipecòlic i homociclitols piperidínics (**8a-k**, **12a-j**) per aminació reductiva dels aldols purificats. Cada un dels productes purs liofilitzats (**6a-c**, **7a-c**, **11a-c**, i els productes desfosforilats provinents de **4,5,9a-b** i **10a**) es dissolgueren en MeOH/H₂O (1:1) o Etanol/H₂O (1:1) a una concentració final de 5-10 mM, s'hi agregà el Pd/C 10 % p/v (0.4-2.6 mg·mg⁻¹ adducte aldòlic) i s'ajustà a pH 5-6 amb una solució d'àcid fòrmic diluïda. Cada solució es desgasà amb N₂ i seguidament es deixà amb H₂ (50 psi) amb agitació durant tota la nit a temperatura ambient. Finalitzada la reacció, el cru es filtrà a través d'una membrana de niló de 0.45 µm. S'evaporà sota buit el MeOH del filtrat, s'ajustà el pH a 6 amb formiat amònic, es congelà i liofilitzà.

La síntesi detallada de cada un dels compostos finals (**8a-k**, **12a-j**) es poden consultar en el **Material suplementari S.5** i els espectres de RMN es troben inclosos en el **Material Suplementari S3.2**.

5.10.9 PURIFICACIÓ DE DERIVATS DE L'ÀCID PIPECÒLIC PER CROMATOGRAFIA DE BSCANVI CATIONIC FORTA

La mescla de derivats de l'àcid pipecòlic **8f:8g** (1:1) (108.9 mg) es purificà per cromatografia d'intercanvi catiònic forta. S'emprà un sistema de FPLC equipat amb una columna de vidre (120 x 20 mm; V_{columna}= 38 mL) amb resina Macro-Prep High S (Bio-Rad, grup funcional sulfopropil). La mostra es dissolgué en aigua (5 mL), s'ajustà a pH 2.5 amb àcid acètic (1 M) i es carregà a la columna equilibrada amb aigua amb un flux de 1 mL·min⁻¹. Seguidament es rentà la columna amb aigua amb dos volums de columna a 3 mL·min⁻¹, per tal d'eliminar impureses no retingudes, s'elueixen els compostos purs amb un gradient de 0 a 350 mM NH₄OH en 152 minuts (304 mL) i es recolliren les fraccions en tubs (2 mL). Finalment, la columna es rentà amb isocràtic de 100 mM NH₄OH amb flux de 6 mL·min⁻¹. S'analitzaren les fraccions per ¹H RMN.

5.11 SÍNTESI D'IMINOCICLITOLS A PARTIR DE *N*-CBZ-AMINOALDEHIDS CATALITZADES PER VARIANTS DE FSA

5.11.1 SÍNTESI DELS ADDUCTES ALDÒLICS A PARTIR *N*-CBZ-AMINOALDEHIDS I DHA, HA I GO

A nivell preparatiu, les addicions aldòliques de DHA, HA i GO a *N*-Cbz-aminoaldehids seleccionats (**1f-q**) catalitzades per variants de FSA es realitzaren amb l'objectiu d'obtenir 35-150 mg de producte iminociclitol final (**17**, **19** i **21**). S'emprà el mateix procediment i concentracions seguits a escala analítica (**Apartat 5.9.3.2**). En tubs amb tapa de rosca de 50 mL (volum final de reacció 13.5-30.0 mL), **1f-q** (1.1-2.4 mmol, concentració final de 80 mM) es mesclaren amb els donadors (DHA/HA, 1.54-3.36 mmol, concentració final de 112 mM; GO, 1.37-3.00 mmol, concentració final de 100 mM) i amb tampó TEA (50 mM, pH 7.5). Les reaccions es dugueren a terme en medi aquós amb un 20 % de DMF (v/v) (2.7-6 mL). L'addició del GO es realitzà amb una bomba d'addició (Syringe Pump, model A-99, Razel) amb xeringa de plàstic de 5 o 10 mL (0.13-0.2 mmol GO·hora⁻¹).

En el cas concret del Cbz-*N*-(*S*)-aspàrtic-semialdehid ((*S*)-**1l**), la reacció es duqué a terme en medi aquós.

La reacció s'inicià agregant la variant de FSA corresponent (2-3 mg proteïna·mL⁻¹ reacció) i es deixà en agitació (800 rpm) a temperatura ambient. Es controlaren les conversions de les reaccions per HPLC i s'aturaren les reaccions quan els pics màxim de productes es mantingueren constants (18-96 hores de reacció). S'aturaren per addició HCl fins a pH 5-6 i de MeOH (10-30 mL). Seguidament, es conservaren els crus en fred (4 °C) per tal d'afavorir la precipitació de l'enzim desnaturalitzat.

5.11.2 PURIFICACIÓ DELS ADDUCTES ALDÒLICS

Els crus de reacció es varen purificar per dues vies diferents segons la hidrofília dels compostos. Els adductes aldòlics de GO a (*R/S*)-**1f** (**16aa**, **16z**), DHA a (*R/S*)-**1f** (**16a**, **16c**) i de DHA a (*S*)-**1l** (**16p**) es purificaren per HPLC semi-preparatiu amb columna de fase reversa X-Terra Prep MS C-18, 10 µm, 19x250 mm.

En canvi, la resta dels adductes aldòlics es purificaren per columna de gel de sílice (60 Å).

5.11.2.1 PER HPLC SEMI-PREPARATIU AMB COLUMNA DE FASE REVERSA

Els crus de reacció es centrifugaren (15 minuts, 8000 rpm) i s'evaporà sota buit el metanol del filtrat. Seguidament, tot el volum s'injectà a la columna, equilibrada prèviament amb aigua. S'eliminaren les sals i DMF amb un isocràtic de 5-10 minuts d'aigua i s'elüïren els productes amb un gradient de 0 a 30 % CH₃CN (v/v) en 45 minuts amb un flux de 10 mL·min⁻¹ i detector a 215 nm. Les fraccions d'interès s'analitzaren per HPLC (isocràtic de 40 % de B en 15 minuts), s'ajuntaren les que contenien els aldols purs i es liofilitzaren.

Pel cas concret de l'adducte aldòlic de DHA a (S)-**11** (**16p**) es purificà seguint el mateix procediment descrit en l'**Apartat 5.10.9**. S'ajustà el pH del cru a 2-3 (HCl, 1 M), s'eliminaren les sals i DMF amb un isocràtic de 5-10 minuts a d'aigua 0.1 % (v/v) TFA i s'eluí amb gradient de 0 a 30 % CH₃CN v/v en 30 minuts. Per HPLC analític s'emprà un isocràtic de 28 % B en 18min.

5.11.2.2 PER COLUMNA DE GEL DE SÍLICE

Totes les columnes de gel de sílice es realitzaren amb una alçada de 20-30 cm, diàmetre de 1.5-3 cm i fase mòbil d' AcOEt/ Hexà o bé CHCl₃/MeOH. Per a la preparació de la mostra, s'evaporà sota buit el MeOH present en el cru de reacció, es congelà i liofilitzà. Seguidament, es redissolgueren en MeOH en un baló de vidre (500 mL), on s'afegí gel de sílice i s'evaporà sota buit fins a sequedat. Tot el gel de sílice impregnat amb cru de reacció liofilitzat es carregà a la columna, prèviament equilibrada amb AcOEt/Hexà (4:6) o CHCl₃ 100 %. S'elüïren generalment amb gradient de 40 a 100 % d'AcOEt en Hexà (v/v), o bé de 0 a 20 % de MeOH en CHCl₃ (V/v). Les fraccions recollides s'analitzaren per capa fina amb fase mòbil de AcOEt/Hexà (1:1) o 5 % de MeOH en CHCl₃ (v/v) o per HPLC. S'ajuntaren les fraccions que contenien els aldols purs i es liofilitzaren.

5.11.3 OBTENCIÓ DELS IMINOCICLITOLS FINALS

S'aplicà el mateix procediment descrit en l'**Apartat 5.10.11** pels adductes aldòlics (**16a-p**, **18a-d** i **20a-ak**) a fi d'obtenir els iminociclitols finals (**17a-ag**, **19a-g** i **21a-h**).

La síntesi detallada de cada un dels compostos finals (**17a-ag**, **19a-g** i **21a-h**) es poden consultar en el **Material suplementari S.5** i els espectres de RMN es troben inclosos en el **Material Suplementari S3.4**.

5.11.4 PURIFICACIÓ DELS IMINOCICLITOLS PER CROMATOGRAFIA DE BESCANVI CATIÒNIC FEBLE

Les mescles de productes o productes amb impureses (**17q/f** (57.4 mg), **17ad/ae** (62.6mg), **19a/b** (82.7 mg), **19b/e** (80.0 mg), **19c/f** (50.0 mg), **21e** (32.3 mg), **21h** (55.2 mg) i **21g/f** (42.8 mg)) es separaren per cromatografia d'intercanvi catiònic.¹²⁴ S'emprà un sistema de FPLC equipat amb una columna de vidre (448 x 25 mm; $V_{\text{columna}}=220$ mL) amb resina CM-Sepharoe CL-6B (Amersham Pharmacia, grup funcional $-\text{OCH}_2\text{COO}^-$). Les mostres es dissolgueren en aigua (2-5 mL) i es carregaren a la columna equilibrada amb aigua amb un flux de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Seguidament es rentà la columna amb aigua amb dos volums de columna a $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, per tal d'eliminar impureses no retingudes. S'el·luïren els compostos purs amb isocràtics de NH_4OH (5-70 mM) amb un flux de $4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ i es recolliren les fraccions en tubs (8 mL). La columna es rentà amb un isocràtic de 100 mM NH_4OH amb flux de $6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. S'analitzaren les fraccions per ^1H RMN i s'ajuntaren les fraccions de cada producte pur. Finalment, s'ajustaren a pH 6 (dissolució de NH_4HCOO diluït), es congelaren i liofilitzaren.

5.12 ESTUDI DE LA RACEMITZACIÓ EN C- α DELS N-CBZ-AMINOALDEHIDS EN PRESENCIA DE FSA

Aquest estudi es realitzà en col·laboració de la Dra. Cristina Minguillón Llombart del Departament de Farmacologia i Química Terapèutica de la Unitat de Química Farmacèutica.

Per a l'estudi, s'incubaren els N-Cbz-aminoaldehyds ((*R/S*)-**1f** i (*R/S*)-**1g**) en presència de FSA, sense donador. A diferents hores, es prengueren mostres i es reduïren per obtenir els N-Cbz-aminoalcohols corresponents (**Apartat 5.12.1**). Les mostres s'analitzaren a continuació per columna quiral analítica (**Apartat 5.12.2**).

5.12.1 PREPARACIÓ DE MOSTRES

Les mostres es prepararen en una placa de 96 pous (1 mL/cada pou, Sigma-Aldrich) en medi $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ 4:1 amb un volum total de 500 μL (28 reaccions en total). Els N-Cbz-aminoaldehyds (*R/S*)-**1f** i (*R/S*)-**1g**; 50 μmol , 50 μL de solució mare de 1 M) dissolts en 100 μL de DMF es mesclaren amb tampó TEA (25 μmol , 50 μL de solució mare de 500 mM a pH 7.5). Per a cada N-Cbz-aminoaldehyd s'emprà un control sense enzim, FSA_{wt} (1.71 U, 0.5 mg), FSA A129S/A165G/S166G (0.5 i 1 mg), FSA K85M (0.5 i 1 mg) i FucA F131A (2.5 mg). S'incubaren fins a 72 hores a 25 °C i agitació (1000 rpm). Les mostres (5 μmol , 50 μL ; a les

24, 48 i 72 hores) es tractaren amb NaBH_4 (15 μmol , 75 μL de dissolució de 0.2 M) durant 30 minuts, a temperatura ambient i agitació 1000 rpm. Seguidament s'eliminà l'excés d'agent reductor amb HCl (15 μmol , 200 μL de dissolució de 75 mM) i s'ajustà el pH a 6-7 amb una dissolució de NaHCO_3 saturada. Les mostres es congelaren, liofilitzaren i es redissolgueren en 2-propanol (500 μL). Finalment, es filtraren a través de membranes de PVDF (0.45 μm , Millipore).

Es repetí aquest procediment per tal d'obtenir duplicats de les mostres.

5.12.2 ANÀLISI I SEPARACIÓ DE *N*-CBZ-AMINOALCOHOLS PER COLUMNA QUIRAL

Per a analitzar i separar els *N*-Cbz-aminoalcohols, s'emprà HPLC equipat amb una columna quiral Chiral Pack[®] AD (4.6x250 mm) de fase normal que conté un suport de amilosa carbamat en gel de sílice (10 μm). Totes les mostres s'elüïren ($V_{\text{injecció}} = 20 \mu\text{L}$, 0.2 μmol) amb flux de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ i isocràtic de Heptà/2-Propanol 9:1 durant 30 minuts. Els compostos es detectaren a 215 nm (límit de detecció de la columna de 0.05 μmol).

6

BIBLIOGRAFIA

1. Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K., Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **2012**, 485, (7397), 185-194.
2. Patel, R. N., *Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. Coordination Chemistry Reviews* **2008**, 252, 659-701.
3. Wohlgemuth, R., Biocatalysis - key to sustainable industrial chemistry *Curr. Opin. Biotech.* **2010**, 21, (6), 713-724.
4. Mahrwald, R., *Modern Aldol Reactions, Vol. 1: Enolates, Organocatalysis, Biocatalysis and Natural Product Synthesis*. Wiley-VCH, Weinheim: 2004; p 335.
5. Raskin, I.; Ribnicky, D. M.; Komarnytsky, S.; Ilic, N.; Poulev, A.; Borisjuk, N.; Brinker, A.; Moreno, D. A.; Ripoll, C.; Yakoby, N.; O'Neal, J. M.; Cornwell, T.; Pastor, I.; Fridlender, B., Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology* **2002**, 20, (12), 522-531.
6. Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B., Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **2001**, 409, (6817), 258-268.
7. Tao, J. H.; Xu, J. H., Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, (1), 43-50.
8. Woodley, J. M., New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends in Biotechnology* **2008**, 26, (6), 321-327.
9. Roberts, S. M., Preparative biotransformations. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, (13), 1475-1499.
10. Meyer, H.-P.; Eichhorn, E.; Hanlon, S.; Lutz, S.; Schurmann, M.; Wohlgemuth, R.; Coppolecchia, R., The use of enzymes in organic *synthesis* and the life sciences: perspectives from the Swiss Industrial Biocatalysis Consortium (SIBC). *Catalysis Science & Technology* **2013**, 3, (1), 29-40.
11. Gotor, V.; Alfonso, I.; Garcia-Urdiales, E.; Editors, *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*. 2008; p 325 pp.
12. Fessner, W.-D., Aldolases: enzymes for making and breaking C-C bonds. In *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Gotor, V.; Alfonso, I.; Garcia-

Urdiales, E., Eds. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2008; pp 275-318.

13. Fessner, W.-D., Biocatalytic C-C bond formation in asymmetric synthesis. In *Asymmetric Synthesis with chemical and biological methods*, Enders, D.; Jaeger, K.-E., Eds. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA: Weinheim, 2007; pp 351-375.

14. Machajewski, T. D.; Wong, C.-H., The catalytic asymmetric aldol reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, (8), 1353-1374.

15. Samland, A.; Sprenger, G., Microbial aldolases as C-C bonding enzymes—unknown treasures and new developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 71, (3), 253-264.

16. Dean, S. M.; Greenberg, W. A.; Wong, C.-H., Recent advances in aldolase-catalyzed asymmetric synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, (8-9), 1308-1320.

17. Fessner, W.-D., Enzyme-catalyzed aldol additions. In *Modern Aldol Reactions. Enolates, Organocatalysis, Biocatalysis and Natural Product Synthesis*, Rainer, M., Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2004; Vol. 1, pp 201-272.

18. Clapés, P.; Fessner, W.-D.; Sprenger, G. A.; Samland, A. K., Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases. *Curr. Opin. in Chem. Bio.* **2010**, 14, (2), 154-167.

19. Fessner, W.-D.; Jennewein, S., Biotechnological applications of aldolases. In *Biocatalysis in the Pharmaceutical Biotechnological Industries.*, Patel, R. N., Ed. Marcel Dekker: New York, 2007; pp 363-400.

20. Clapés, P.; Fessner, W.-D., Enzymatic direct aldol additions. In *Science of Synthesis. Stereoselective Synthesis 2. Stereoselective Reactions of Carbonyl and Imino Groups*, Molander, G. A., Ed. Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart (Germany), 2011; Vol. 2, pp 677-734.

21. Windle, C. L.; Müller, M.; Nelson, A.; Berry, A., Engineering aldolases as biocatalysts. *Curr. Opin. in Chem. Bio.* **2014**, 19, 25-33.

22. Reetz, M. T., Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, (34), 12480-12496.

23. Wong, C.-H.; Whitesides, G. M., *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*. First Edition ed.; Elsevier Science Ltd.: Kidlington, Oxford, U.K., 1994; Vol. 12, p 370.

24. Klaus Buchholz, V. K., Uwe T. Bornscheuer, *Biocatalysts and Enzyme Technology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2005.
25. Halling, P. J., Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme and Microbial Technology* **1994**, 16, (3), 178-206.
26. Jonsson, A.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P., Low reaction temperature increases the selectivity in an enzymatic reaction due to substrate solvation effects. *Biotechnol. Lett.* **1997**, 19, (1), 85-88.
27. Phillips, R. S. Z., C.; Pham, V. T.; Andrade, F. A. C.; Andrade, M. A. C., Effects of temperature on stereochemistry of enzymatic reactions. *Biocatal. Biotrans.* **1994**, 10, (1-4), 77-86.
28. Phillips, R. S., Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis: Prospects for exploitation. *Trends in Biotechnology* **1996**, 14, (1), 13-16.
29. Klibanov, A. M., Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **2001**, 409, (6817), 241-246.
30. Carrea, G.; Ottolina, G.; Riva, S., Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends in Biotechnology* **1995**, 13, (2), 63-70.
31. Drauz, K.; Waldmann, H.; Editors, *Enzyme catalysis in organic synthesis: A comprehensive handbook, Volume I*. Wiley-VHC Verlag GmbH: 2002; p 334.
32. Toscano, M. D.; Woycechowsky, K. J.; Hilvert, D., Minimalist active-site redesign: teaching old enzymes new tricks. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, (18), 3212-3236.
33. Bornscheuer, U. T.; Pohl, M., Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, (2), 137-143.
34. Koeller, K. M. W., C.-H., Enzymes for chemical synthesis. *Nature* **2001**, 409, (6817), 232-240.
35. May, O. V., C. A.; Arnold, F. H., *Enzyme Engineering by Directed Evolution. In Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A comprehensive handbook*. Ed. Drauz, K. Waldmann, H: Weinheim: 2002; Vol. 1, p 95-133.

36. Bolt, A.; Berry, A.; Nelson, A., Directed evolution of aldolases for exploitation in synthetic organic chemistry. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, 474, (2), 318-330.
37. Fesko, K. G.-K., M. , Biocatalytic Methods for C-C Bond Formation. *ChemCatChem* **2013**, 5, (6), 1248-1272.
38. Winchester, B.; Fleet, G. W. J., Amino-sugar glycosidase inhibitors: versatile tools for glycobiologists. *Glycobiology* **1992**, 2, (3), 199-210.
39. Asano, N.; Nash, R. J.; Molyneux, R. J.; Fleet, G. W. J., Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, (8), 1645-1680.
40. Horne, G.; Wilson, F. X.; Witty, G. L. a. D. R., Therapeutic Applications of Iminosugars: Current Perspectives and Future Opportunities. In *Progress in Medicinal Chemistry*, Elsevier: 2011; Vol. Volume 50, pp 135-176.
41. Winchester, B. G., Iminosugars: from botanical curiosities to licensed drugs. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, (6-8), 645-651.
42. Chang, J.; Guo, J.-T.; Du, Y.; Block, T., Imino sugar glucosidase inhibitors as broadly active anti-filovirus agents. *Emerg Microbes Infect* **2013**, 2, e77.
43. Norton, P. A., Iminosugars as antiviral agents. in *Iminosugars. Edited by Compain P, Martin OR* **2007**, CAP.9, 209-221.
44. Compain, P.; Martin, O. R.; Boucheron, C.; Godin, G.; Yu, L.; Ikeda, K.; Asano, N., Design and *synthesis* of highly potent and selective pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher's disease. *ChemBioChem* **2006**, 7, (9), 1356-1359.
45. Asano, N., Glycosidase-inhibiting alkaloids: isolation, structure, and application. In *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*, Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O., Eds. Wiley-VCH: Weinheim, 2008; pp 111-138.
46. Asano, N., Sugar-mimicking glycosidase inhibitors: bioactivity and application. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2009**, 66, (9), 1479-1492.
47. Ishida N., K. K., Niida T., Tsuruoka T., Yumoto H. , Nojirimycin, a new antibiotic. II. Isolation, characterization and biological activity. *J. Antibiot.* **1967**, 20, (2), 66-71.
48. Paulsen, H., Carbohydrates Containing Nitrogen or Sulfur in the "Hemiacetal" Ring. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1966**, 5, (5), 495-510.

49. Jones, D. W. C.; Nash, R. J.; Bell, E. A.; Williams, J. M., Identification of the 2-hydroxymethyl-3,4-dihydroxypyrrolidine (or 1,4-dideoxy-1,4-iminopentitol) from *angyocalyx boutiqueanus* and from *arachniodes standishii* as the (2R, 3R, 4S)-isomer by the *synthesis* of its enantiomer. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, (26), 3125-3126.
50. Koyama, M.; Sakamura, S., Structure of a new piperidine derivative from buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum*). *Agr. Biol. Chem.* **1974**, 38, (5), 1111-12.
51. Humphries, M. J.; Matsumoto, K.; White, S. L.; Olden, K., Inhibition of Experimental Metastasis by Castanospermine in Mice: Blockage of Two Distinct Stages of Tumor Colonization by Oligosaccharide Processing Inhibitors. *Cancer Research* **1986**, 46, (10), 5215-5222.
52. Elbein, A. D.; Solf, R.; Dorling, P. R.; Vosbeck, K., Swainsonine: an inhibitor of glycoprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1981**, 78, (12), 7393-7397.
53. Nash, R. J.; Fellows, L. E.; Dring, J. V.; Fleet, G. W. J.; Derome, A. E.; Hamor, T. A.; Scofield, A. M.; Watkin, D. J., Isolation from *Alexa leiopetala* and x-ray crystal structure of alexine, (1R,2R,3R,7S,8S)-3-hydroxymethyl-1,2,7-trihydroxypyrrolizidine [(2R,3R,4R,5S,6S)-2-hydroxymethyl-1-azabicyclo[3.3.0]octan-3,4,6-triol], a unique pyrrolizidine alkaloid. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, (20), 2487-90.
54. Molyneux, R. J.; Benson, M.; Wong, R. Y.; Tropea, J. E.; Elbein, A. D., Australine, a novel pyrrolizidine alkaloid glucosidase inhibitor from *Castanospermum australe*. *J. Nat. Prod.* **1988**, 51, (6), 1198-206.
55. Nash, R. J.; Thomas, P. I.; Waigh, R. D.; Fleet, G. W. J.; Wormald, M. R.; de Q. Lilley, P. M.; Watkin, D. J., Casuarine: A very highly oxygenated pyrrolizidine alkaloid. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, (42), 7849-7852.
56. Kato, A.; Adachi, I.; Miyauchi, M.; Ikeda, K.; Komae, T.; Kizu, H.; Kameda, Y.; Watson, A. A.; Nash, R. J.; Wormald, M. R., Polyhydroxylated pyrrolidine and pyrrolizidine alkaloids from *Hyacinthoides non-scripta* and *Scilla campanulata*. *Carbohydr. Res.* **1999**, 316, (1-4), 95-103.
57. Lachmann, R. H., Miglustat: Substrate reduction therapy for glycosphingolipid lysosomal storage disorders. *Drugs of Today* **2006**, 42, (1), 29-38.

58. Goda, T.; Suruga, K.; Komori, A.; Kuranuki, S.; Mochizuki, K.; Makita, Y.; Kumazawa, T., Effects of miglitol, an α -glucosidase inhibitor, on glycemic status and histopathological changes in islets in non-obese, non-insulin-dependent diabetic Goto-Kakizaki rats. *British Journal of Nutrition* **2007**, 98, (4), 702-710.
59. Horne, G.; Wilson, F. X.; Tinsley, J.; Williams, D. H.; Storer, R., Iminosugars past, present and future: medicines for tomorrow. *Drug Discovery Today* **2011**, 16, (3-4), 107-118.
60. Legler, G., Glycosidase Inhibition by Basic Sugar Analogs and the Transition State of Enzymatic Glycoside Hydrolysis. In *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors*, Stutz, A. E., Ed. 1999; pp 31-37.
61. Vocadlo, D. J.; Davies, G. J., Mechanistic insights into glycosidase chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, (5), 539-555.
62. Gloster, T. M.; Davies, G. J., Glycosidase inhibition: assessing mimicry of the transition state. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, (2), 305-320.
63. Heightman, T. D.; Vasella, A. T., Recent insights into inhibition, structure, and mechanism of configuration-retaining glycosidases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, (6), 750-770.
64. Ferla, B. L.; Cipolla, L.; Nicotra, F., General Strategies for the *Synthesis of Iminosugars and New Approaches Towards Iminosugar Libraries*. In *Iminosugars*, John Wiley & Sons, Ltd: 2008; pp 25-61.
65. La Ferla, B.; Bugada, P.; Cipolla, L.; Peri, F.; Nicotra, F., *Synthesis of Imino Sugar Scaffolds for the Generation of Glycosidase Inhibitor Libraries*. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2004, (11), 2451-2470.
66. Cipolla, L.; La Ferla, B.; Nicotra, F., General methods for iminosugar *synthesis*. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3, (5), 485-511.
67. Palmer, A. M.; Jager, V., Preparation and biological evaluation of pyrrolidinediols and pyrrolidine N-oxides from D-ribose using the nitrone approach. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, (13), 2547-2558.
68. Sames, D.; Polt, R., Piperidine Triols via Enantioselective Alkylation and Osmylation of Alanine Schiff Base Esters. *Synlett* **1995**, 1995, (Sup. I), 552,554.
69. Dondoni, A.; Merino, P.; Perrone, D., Totally chemical *synthesis of azasugars via thiazole intermediates*. Stereodivergent routes to (-)-nojirimycin, (-)-mannojirimycin and their 3-deoxy derivatives from serine. *Tetrahedron* **1993**, 49, (14), 2939-2956.

70. Calderon, F.; Doyaguez, E. G.; Fernandez-Mayoralas, A., *Synthesis of azasugars through a proline-catalyzed reaction. J. Org. Chem.* **2006**, 71, (16), 6258-6261.
71. Liao, W. W.; Ibrahim, I.; Cordova, A., A concise enantioselective *synthesis* of iminosugar derivatives. *Chem. Commun.* **2006**, (6), 674-676.
72. Imashiro, R.; Uehara, H.; Barbas, C. F., One-Pot Enantioselective Syntheses of Iminosugar Derivatives Using Organocatalytic anti-Michael-anti-Aza-Henry Reactions. *Org. Lett.* **2010**, 12, (22), 5250-5253.
73. Compain, P.; Martin, O. R., Design, *synthesis* and biological evaluation of iminosugar-based glycosyltransferase inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2003**, 3, (5), 541-560.
74. Schrittwieser, J. H.; Resch, V., The role of biocatalysis in the asymmetric *synthesis* of alkaloids. *RSC Advances* **2013**, 3, (39), 17602-17632.
75. Samland, A. K.; Sprenger, G. A., Microbial aldolases as C-C bonding enzymes - unknown treasures and new developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 71, (3), 253-264.
76. Fessner, W.-D., Enzyme mediated C-C bond formation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, (1), 85-97.
77. Gefflaut, T.; Blonski, C.; Perie, J.; Willson, M., Class I aldolases: Substrate specificity, mechanism, inhibitors and structural aspects. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1995**, 63, (3), 301-40.
78. Hixon, M.; Sinerius, G.; Schneider, A.; Walter, C.; Fessner, W.-D.; Schloss, J. V., Quo Vadis photorespiration: A tale of two aldolases. *FEBS Lett.* **1996**, 392, (3), 281-284.
79. Dückers, N.; Baer, K.; Simon, S.; Gröger, H.; Hummel, W., Threonine aldolases—screening, properties and applications in the *synthesis* of non-proteinogenic β -hydroxy- α -amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 88, (2), 409-424.
80. Steinreiber, J.; Fesko, K.; Reisinger, C.; Schürmann, M.; van Assema, F.; Wolberg, M.; Mink, D.; Griengl, H., Threonine aldolases - an emerging tool for organic *synthesis*. *Tetrahedron* **2007**, 63, (4), 918-926.
81. Kielkopf, C. L.; Burley, S. K., X-ray structures of threonine aldolase complexes: Structural basis of substrate recognition. *Biochemistry* **2002**, 41, (39), 11711-11720.

82. Liu, J. Q.; Dairi, T.; Itoh, N.; Kataoka, M.; Shimizu, S.; Yamada, H., Diversity of microbial threonine aldolases and their application. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, 10, (1-3), 107-115.
83. Fesko, K.; Reisinger, C.; Steinreiber, J.; Weber, H.; Schürmann, M.; Griengl, H., Four types of threonine aldolases: similarities and differences in kinetics/thermodynamics. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, 52-3, 19-26.
84. Contestabile R, P. A., Pascarella S, di Salvo ML, D'Aguanno S, Bossa F., L-Threonine aldolase, serine hydroxymethyltransferase and fungal alanine racemase. A subgroup of strictly related enzymes specialized for different functions. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268 (24), 6508-25.
85. di Salvo, M. L.; Remesh, S. G.; Vivoli, M.; Ghatge, M. S.; Paiardini, A.; D'Aguanno, S.; Safo, M. K.; Contestabile, R., On the catalytic mechanism and stereospecificity of *Escherichia coli* L-threonine aldolase. *FEBS Journal* **2014**, 281, (1), 129-145.
86. Vidal, L.; Calveras, J.; Clapés, P.; Ferrer, P.; Caminal, G., Recombinant production of serine hydroxymethyl transferase from *Streptococcus thermophilus* and its preliminary evaluation as a biocatalyst. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 68, (4), 489-497.
87. Gutierrez, M. L.; Garrabou, X.; Agosta, E.; Servi, S.; Parella, T.; Joglar, J.; Clapés, P., Serine hydroxymethyl transferase from *Streptococcus thermophilus* and L-threonine aldolase from *Escherichia coli* as stereocomplementary biocatalysts for the synthesis of β -hydroxy- β,ω -diamino acid derivatives. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, (15), 4647-4656.
88. Kataoka M1, I. M., Morikawa T, Miyoshi T, Nishi K, Wada M, Yamada H, Shimizu S., Isolation and characterization of D-threonine aldolase, a pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme from *Arthrobacter* sp. DK-38. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 248, (2), 385-93.
89. Liu, J. Q.; Odani, M.; Yasuoka, T.; Dairi, T.; Itoh, N.; Kataoka, M.; Shimizu, S.; Yamada, H., Gene cloning and overproduction of low-specificity D-threonine aldolase from *Alcaligenes xylosoxidans* and its application for production of a key intermediate for parkinsonism drug. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, 54, (1), 44-51.
90. Paiardini, A.; Contestabile, R.; D'Aguanno, S.; Pascarella, S.; Bossa, F., Threonine aldolase and alanine racemase: novel examples of convergent evolution in the superfamily of vitamin B-6-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* **2003**, 1647, (1-2), 214-219.

91. Liu, J.-Q.; Dairi, T.; Itoh, N.; Kataoka, M.; Shimizu, S.; Yamada, H., A novel metal-activated pyridoxal enzyme with a unique primary structure, low specificity D-threonine aldolase from *Arthrobacter* sp. strain DK-38. Molecular cloning and cofactor characterization. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, (27), 16678-16685.
92. Liu, J. Q.; Dairi, T.; Itoh, N.; Kataoka, M.; Shimizu, S., A novel enzyme, D-3-hydroxyaspartate aldolase from *Paracoccus denitrificans* IFO 13301: purification, characterization, and gene cloning. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 62, (1), 53-60.
93. Seebeck, F. P.; Hilvert, D., Conversion of a PLP-dependent racemase into an aldolase by a single active site mutation. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (34), 10158-10159.
94. Seebeck, F. P.; Guainazzi, A.; Amoreira, C.; Baldrige, K. K.; Hilvert, D., Stereoselectivity and expanded substrate scope of an engineered PLP-dependent aldolase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, (41), 6824-6826.
95. Fesko, K.; Giger, L.; Hilvert, D., *Synthesis* of β -hydroxy- α -amino acids with a reengineered alanine racemase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, (22), 5987-5990.
96. Toscano, M. D.; Müller, M. M.; Hilvert, D., Enhancing activity and controlling stereoselectivity in a designed PLP-dependent aldolase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, (24), 4468-4470.
97. Steinreiber, J.; Schürmann, M.; Wolberg, M.; van Assema, F.; Reisinger, C.; Fesko, K.; Mink, D.; Griengl, H., Overcoming thermodynamic and kinetic limitations of aldolase-catalyzed reactions by applying multienzymatic dynamic kinetic asymmetric transformations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, (10), 1624-1626.
98. Shibata, K.; Shingu, K.; Vassilev, V. P.; Nishide, K.; Fujita, T.; Node, M.; Kajimoto, T.; Wong, C.-H., Kinetic and thermodynamic control of L-threonine aldolase catalyzed reaction and its application to the *synthesis* of mycestericin D. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, (16), 2791-4.
99. Kimura, T.; Vassilev, V. P.; Shen, G. J.; Wong, C.-H., Enzymatic *synthesis* of β -hydroxy- α -amino acids based on recombinant D- and L-threonine aldolases. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, (49), 11734-11742.
100. Gwon, H.-J.; Baik, S.-H., Diastereoselective *synthesis* of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine by low-specific L-threonine aldolase mutants. *Biotech. Lett.* **2010**, 32, (1), 143-149.

101. Fesko, K.; Uhl, M.; Steinreiber, J.; Gruber, K.; Griengl, H., Biocatalytic Access to α,α -dialkyl- α -amino acids by a mechanism-based approach. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, (1), 121-124.
102. Hernandez, K. Z., I.; Petrillo, G.; Usón, I.; Wantke, C. M.; Bujons, J.; Joglar, J.; Parella, T.; Clapés, P., Engineered L-Serine Hydroxymethyltransferase from *Streptococcus thermophilus* for the Synthesis of α,α -Dialkyl- α -Amino Acids.
103. Alonso, M.; Riera, A., Improved preparation of β -hydroxy- α -amino acids: direct formation of sulfates by sulfuryl chloride. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, (23), 3908-3912.
104. Baik, S.-H.; Yoshioka, H., Enhanced synthesis of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine by high-density whole-cell biocatalyst of recombinant L-threonine aldolase from *Streptomyces avermitilis*. *Biotech. Lett.* **2009**, 31, (3), 443-448.
105. Steinreiber, J.; Fesko, K.; Mayer, C.; Reisinger, C.; Schürmann, M.; Griengl, H., Synthesis of γ -halogenated and long-chain β -hydroxy- α -amino acids and 2-amino-1,3-diols using threonine aldolases. *Tetrahedron* **2007**, 63, (34), 8088-8093.
106. Dreyer, M. K.; Schulz, G. E., Refined high-resolution structure of the metal-ion dependent L-fucose-1-phosphate aldolase (class II) from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr.* **1996**, Sect. D, (Biol. Crystallogr., D52), 1082-1091.
107. Joerger, A. C.; Gosse, C.; Fessner, W.-D.; Schulz, G. E., Catalytic action of fucose 1-phosphate aldolase (Class II) as derived from structure-directed mutagenesis. *Biochemistry* **2000**, 39, (20), 6033-6041.
108. Kroemer, M.; Merkel, I.; Schulz, G. E., Structure and catalytic mechanism of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase. *Biochemistry* **2003**, 42, (36), 10560-10568.
109. Jiménez, A.; Clapés, P.; Crehuet, R., Protein Flexibility and Metal Coordination Changes in DHAP-Dependent Aldolases. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, (6), 1422-1428.
110. Clapés, P.; Garrabou, X., Current Trends in Asymmetric Synthesis with Aldolases. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, (13), 2263-2283.
111. Fessner, W.-D., Enzymatic asymmetric synthesis using aldolases. In *Stereoselective Biocatalysis*, Patel, R. N., Ed. Marcel Dekker Inc.: New York, N. Y, 2000; pp 239-265.

112. Schümperli, M.; Pellaux, R.; Panke, S., Chemical and enzymatic routes to dihydroxyacetone phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 75, (1), 33-45.
113. Sánchez-Moreno, I.; Iturrate, L.; Doyaguez, E. G.; Martínez, J. A.; Fernández-Mayoralas, A.; García-Junceda, E., Activated α,β -unsaturated aldehydes as substrate of dihydroxyacetone phosphate (DHAP)-dependent aldolases in the context of a multienzyme system. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, 351, (17), 2967-2975.
114. Iturrate, L.; Sánchez-Moreno, I.; Doyaguez, E. G.; García-Junceda, E., Substrate channelling in an engineered bifunctional aldolase/kinase enzyme confers catalytic advantage for C-C bond formation. *Chem. Commun.* **2009**, (13), 1721-1723.
115. Espelt, L.; Parella, T.; Bujons, J.; Solans, C.; Joglar, J.; Delgado, A.; Clapés, P., Stereoselective aldol additions catalyzed by dihydroxyacetone phosphate dependent aldolases in emulsion systems: preparation and structural characterization of linear and cyclic aminopolyols from aminoaldehydes. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, (20), 4887-4899.
116. Guanti, G.; Banfi, L.; Zannetti, M. T., Phosphonic derivatives of carbohydrates: chemoenzymatic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, (17), 3181-3185.
117. Durrwachter, J. R.; Drucehammer, D. G.; Nozaki, K.; Sweers, H. M.; Wong, C.-H., Enzymic aldol condensation/isomerization as a route to unusual sugar derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, (24), 7812-18.
118. Schoevaart, R.; vanRantwijk, F.; Sheldon, R. A., Facile enzymatic aldol reactions with dihydroxyacetone in the presence of arsenate. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, (13), 4559-4562.
119. Drucehammer, D. G.; Durrwachter, J. R.; Pederson, R. L.; Crans, D. C.; Daniels, L.; Wong, C.-H., Reversible and in situ formation of organic arsenates and vanadates as organic phosphate mimics in enzymatic reactions: mechanistic investigation of aldol reactions and synthetic applications. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, (1), 70-7.
120. Garrabou, X.; Calveras, J.; Joglar, J.; Parella, T.; Bujons, J.; Clapes, P., Highly Efficient Aldol additions of DHA and DHAP to *N*-Cbz-Amino aldehydes Catalyzed by L-Rhamnulose-1-Phosphate and L-Fuculose-1-Phosphate Aldolases in Aqueous Borate Buffer. *Org. Biomol. Chem.* **2011**.

121. Sugiyama, M.; Hong, Z. Y.; Whalen, L. J.; Greenberg, W. A.; Wong, C.-H., Borate as a phosphate ester mimic in aldolase-catalyzed reactions: practical *synthesis* of L-fructose and L-iminocyclitols. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, (18), 2555-2559.
122. Sugiyama, M.; Hong, Z.; Greenberg, W. A.; Wong, C.-H., In vivo selection for the directed evolution of L-rhamnulose aldolase from L-rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhaD). *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, (17), 5905-5911.
123. Garrabou, X.; Joglar, J.; Parella, T.; Bujons, J.; Clapés, P., Redesign of the Phosphate Binding Site of L-Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase towards a Dihydroxyacetone Dependent Aldolase. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, (1), 89-99.
124. Garrabou, X.; Gomez, L.; Joglar, J.; Gil, S.; Parella, T.; Bujons, J.; Clapés, P., Structure-guided minimalist redesign of L-fuculose-1-phosphate aldolase active site. Expedient *synthesis* of novel polyhydroxylated pyrrolizidines and their inhibitory properties against glycosidases and intestinal disaccharidases *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 10691-10706.
125. Fessner, W.-D.; Helaine, V., Biocatalytic *synthesis* of hydroxylated natural products using aldolases and related enzymes. *Curr. Opin. Biotech.* **2001**, 12, (6), 574-586.
126. Chenevert, R.; Lavoie, M.; Dasser, M., Use of aldolases in the *synthesis* of non-carbohydrate natural products. Stereoselective *synthesis* of aspicilin C-3-C-9 fragment. *Canadian Journal of Chemistry* **1997**, 75, (1), 68-73.
127. Von der Osten, C. H.; Sinskey, A. J.; Barbas, C. F., III; Pederson, R. L.; Wang, Y. F.; Wong, C.-H., Use of a recombinant bacterial fructose-1,6-diphosphate aldolase in aldol reactions: preparative *syntheses* of 1-deoxynojirimycin, 1-deoxymannojirimycin, 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol, and fagomine. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, (11), 3924-7.
128. Calveras, J.; Bujons, J.; Parella, T.; Crehuet, R.; Espelt, L.; Joglar, J.; Clapés, P., Influence of N-amino protecting group on aldolase-catalyzed aldol additions of dihydroxyacetone phosphate to amino aldehydes. *Tetrahedron* **2006**, 62, (11), 2648-2656.
129. Pederson, R. L.; Kim, M. J.; Wong, C.-H., A combined chemical and enzymic procedure for the *synthesis* of 1-deoxynojirimycin and 1-deoxymannojirimycin. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, (37), 4645-8.
130. Ziegler, T.; Straub, A.; Effenberger, F., Enzyme-catalyzed reactions. 3. Enzyme-catalyzed *synthesis* of deoxymannojirimycin, 1-deoxynojirimycin and 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 27, (5), 716-717.

131. Pederson, R. L.; Wong, C.-H., Enzymic aldol condensation as a route to heterocycles: *synthesis* of 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol, fagomine, 1-deoxynojirimycin and 1-deoxymannojirimycin. *Heterocycles* **1989**, 28, (1), 477-80.
132. Romero, A.; Wong, C.-H., Chemo-enzymatic total *synthesis* of 3-*epiaustraline*, *australine*, and 7-*epialexine*. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, (24), 8264-8268.
133. Espelt, L.; Bujons, J.; Parella, T.; Calveras, J.; Joglar, J.; Delgado, A.; Clapés, P., Aldol additions of dihydroxyacetone phosphate to N-Cbz-amino aldehydes catalyzed by L-fuculose-1-phosphate aldolase in emulsion systems: Inversion of stereoselectivity as a function of the acceptor aldehyde. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, (5), 1392-1401.
134. Calveras, J. Síntesis quimioenzimàtica d'iminociclitols amb activitat inhibidora de glicosidases. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, Barcelona, 2007.
135. Gomez, L.; Garrabou, X.; Joglar, J.; Bujons, J.; Parella, T.; Vilaplana, C.; Cardona, P. J.; Clapes, P., Chemoenzymatic *synthesis*, structural study and biological activity of novel indolizidine and quinolizidine iminocyclitols. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, (31), 6309-6321.
136. Calveras, J.; Casas, J.; Parella, T.; Joglar, J.; Clapés, P., Chemoenzymatic *synthesis* and inhibitory activities of hyacinthacines A1 and A2 stereoisomers. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, (10), 1661-1666.
137. Calveras, J.; Egidio-Gabás, M.; Gómez, L.; Casas, J.; Parella, T.; Joglar, J.; Bujons, J.; Clapés, P., Dihydroxyacetone phosphate aldolase-catalyzed *synthesis* of structurally diverse polyhydroxylated pyrrolidine derivatives and evaluation of their glycosidase inhibitory properties. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 7310-7328.
138. Schürmann, M.; Sprenger, G. A., Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, (14), 11055-11061.
139. Thorell, S.; Schurmann, M.; Sprenger, G. A.; Schneider, G., Crystal structure of decameric fructose-6-phosphate aldolase from *Escherichia coli* reveals inter-subunit helix swapping as a structural basis for assembly differences in the transaldolase family. *J. Mol. Biol.* **2002**, 319, (1), 161-171.
140. Lehwiss-Litzmann, A.; Neumann, P.; Parthier, C.; Lüdtkke, S.; Golbik, R.; Ficner, R.; Tittmann, K., Twisted Schiff base intermediates and substrate locale revise transaldolase mechanism. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, (10), 678-84.

141. Szekrenyi, A.; Soler, A.; Garrabou, X.; Guérard-Hélaine, C.; Parella, T.; Joglar, J.; Lemaire, M.; Bujons, J.; Clapés, P., Engineering the donor selectivity of D-Fructose-6-phosphate aldolase for biocatalytic asymmetric cross-aldol additions of glycolaldehyde. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, (39), 12572-12583.
142. Schörken, U.; Thorell, S.; Schürmann, M.; Jia, J.; Sprenger, G. A.; Schneider, G., Identification of catalytically important residues in the active site of *Escherichia coli* transaldolase. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, (8), 2408-2415.
143. Schneider, S.; Sandalova, T.; Schneider, G.; Sprenger, G. A.; Samland, A. K., Replacement of a phenylalanine by a tyrosine in the active site confers fructose 6-phosphate aldolase activity to the transaldolase of *Escherichia coli* and human origin. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, (44), 30064-30072.
144. Schneider, S.; Gutiérrez, M.; Sandalova, T.; Schneider, G.; Clapés, P.; Sprenger, G. A.; Samland, A. K., Redesigning the active site of transaldolase TalB from *Escherichia coli*: New variants with improved affinity towards non-phosphorylated substrates. *ChemBioChem* **2010**, *11*, (5), 681-690.
145. Schürmann, M.; Schürmann, M.; Sprenger, G. A., Fructose 6-phosphate aldolase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Escherichia coli* as tools in enzymatic synthesis of 1-deoxysugars. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *19*, 247-252.
146. Castillo, J. A.; Calveras, J.; Casas, J.; Mitjans, M.; Vinardell, M. P.; Parella, T.; Inoue, T.; Sprenger, G. A.; Joglar, J.; Clapés, P., Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: preparation of D-fagomine, N-alkylated derivatives, and preliminary biological assays. *Org. Lett.* **2006**, *8*, (26), 6067-6070.
147. Sugiyama, M.; Hong, Z.; Liang, P. H.; Dean, S. M.; Whalen, L. J.; Greenberg, W. A.; Wong, C.-H., D-Fructose-6-phosphate aldolase-catalyzed one-pot synthesis of iminocyclitols. *J Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, (47), 14811-14817.
148. Garrabou, X.; Castillo, J. A.; Guérard-Hélaine, C.; Parella, T.; Joglar, J.; Lemaire, M.; Clapés, P., Asymmetric self- and cross-aldol reaction of glycolaldehyde catalyzed by D-fructose-6-phosphate aldolase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5521-5525.
149. Rale, M.; Schneider, S.; Sprenger, G. A.; Samland, A. K.; Fessner, W.-D., Broadening Deoxysugar Glycodiversity: Natural and Engineered Transaldolases Unlock a Complementary Substrate Space. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2623-2632.
150. Garrabou, X.; Castillo, J. A.; Guérard-Hélaine, C.; Parella, T.; Joglar, J.; Lemaire, M.; Clapés, P., Asymmetric self- and cross-aldol reaction of glycolaldehyde catalyzed by D-fructose-6-phosphate aldolase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, (30), 5521-5525.

151. Castillo, J. A.; Guérard-Hélaine, C.; Gutiérrez, M.; Garrabou, X.; Sancelme, M.; Schürmann, M.; Inoue, T.; Hélaine, V.; Charmantray, F.; Gefflaut, T.; Hecquet, L.; Joglar, J.; Clapés, P.; Sprenger, G. A.; Lemaire, M., A Mutant D-Fructose-6-Phosphate Aldolase (Ala129Ser) with Improved Affinity towards Dihydroxyacetone for the *Synthesis* of Polyhydroxylated Compounds. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, (6), 1039-1046.
152. Szekrenyi, A. Chemoenzymatic *Synthesis* of Carbohydrates and Derivatives with Engineered D-Fructose-6-Phosphate Aldolase. Facultat de Farmacia. Universitat de Barcelona.Barcelona, 2014.
153. Gutierrez, M.; Parella, T.; Joglar, J.; Bujons, J.; Clapés, P., Structure-guided redesign of D-fructose-6-phosphate aldolase from *E. coli*: remarkable activity and selectivity towards acceptor substrates by two-point mutation. *Chem. Commun.* **2011**, 47, (20), 5762-5764.
154. Concia, A. L.; Lozano, C.; Castillo, J. A.; Parella, T.; Joglar, J.; Clapés, P., D-Fructose-6-phosphate aldolase in organic *synthesis*: cascade chemical-enzymatic preparation of sugar-related polyhydroxylated compounds. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, (15), 3808-3816.
155. Concia, A. L.; Gomez, L.; Bujons, J.; Parella, T.; Vilaplana, C.; Cardona, P. J.; Joglar, J.; Clapés, P., Chemo-enzymatic *synthesis* and glycosidase inhibitory properties of 1,4 dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB1) and LAB1 2-aminomethyl derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 2005-2021.
156. Padró, M.; Castillo, J.; Gómez, L.; Joglar, J.; Clapés, P.; de Bolós, C., Cytotoxicity and enzymatic activity inhibition in cell lines treated with novel iminosugar derivatives. *Glycoconjugate Journal* **2010**, 27, (2), 277-285.
157. Schuermann, M.; Mink, D.; Hyett, D. J. Chemoenzymatic preparation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-2,3-dihydrofuran-3-one via an aldol condensation. WO2008067997A1, 20071205., 2008.
158. Nicolaou, K. C.; Edmonds, D. J.; Bulger, P. G., Cascade Reactions in Total *Synthesis*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, (43), 7134-7186.
159. Garcia-Junceda, E., *Multi-Step Enzyme Catalysis. Biotransformations and Chemoenzymatic Synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2008.
160. Touré, B. B.; Hall, D. G., Natural Product *Synthesis* Using Multicomponent Reaction Strategies. *Chemical Reviews* **2009**, 109, (9), 4439-4486.

161. Oroz-Guinea, I. G.-J., E., Enzyme catalysed tandem reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17, (2), 236-249.
162. Ricca, E. B., B.; Schrittwieser, J. H., Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, (13), 2239-2262.
163. Schoevaart, R.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A., A Four-Step Enzymatic Cascade for the One-Pot *Synthesis* of Non-natural Carbohydrates from Glycerol. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, (21), 6940-6943.
164. Yu, H.; Yu, H.; Karpel, R.; Chen, X., Chemoenzymatic *synthesis* of CMP-sialic acid derivatives by a one-pot two-enzyme system: comparison of substrate flexibility of three microbial CMP-sialic acid synthetases. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, (24), 6427-6435.
165. Horinouchi, N. O., J.; Kawano, T.; Sakai, T.; Saito, K.; Matsumoto, S.; Sasaki, M.; Mikami, Y.; Shimizu, S., Biochemical *retrosynthesis* of 2'-deoxyribonucleosides from glucose, acetaldehyde, and a nucleobase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 71, (5), 615-621.
166. Cao, H.; Li, Y.; Lau, K.; Muthana, S.; Yu, H.; Cheng, J.; Chokhawala, H. A.; Sugiarto, G.; Zhang, L.; Chen, X., Sialidase substrate specificity studies using chemoenzymatically synthesized sialosides containing C5-modified sialic acids. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, (24), 5137-5145.
167. Fessner, W.-D. H., D.; Rale, M., Multi-enzymatic cascade *synthesis* of D-fructose 6-phosphate and deoxy analogs as substrates for high-throughput aldolase screening. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, 2, (8), 1596-1601.
168. Steinreiber, J.; Schürmann, M.; van Assema, F.; Wolberg, M.; Fesko, K.; Reisinger, C.; Mink, D.; Griengl, H., *Synthesis* of aromatic 1,2-amino alcohols utilizing a bienzymatic dynamic kinetic asymmetric transformation. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, (8+9), 1379-1386.
169. Sanchez-Moreno, I.; Francisco Garcia-Garcia, J.; Bastida, A.; Garcia-Junceda, E., Multienzyme system for dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolase catalyzed C-C bond formation from dihydroxyacetone. *Chem. Commun.* **2004**, (14), 1634-1635.
170. van Herk, T.; Hartog, A. F.; Schoemaker, H. E.; Wever, R., Simple Enzymatic in situ Generation of Dihydroxyacetone Phosphate and Its Use in a Cascade Reaction for the Production of Carbohydrates: Increased Efficiency by Phosphate Cycling. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, (16), 6244-6247.

171. van Herk, T.; Hartog, A. F.; Babich, L.; Schoemaker, H., E. ; Wever, R., Improvement of an Acid Phosphatase/DHAP-Dependent Aldolase Cascade Reaction by Using Directed Evolution. *ChemBioChem* **2009**, 10, (13), 2230-2235.
172. Racker, E., Racker, E., Enzymatic *synthesis* and breakdown of deoxyribose phosphate. *J. Biol. Chem.* 1952, 196, 347–365. *J. Biol. Chem.* **1952**, 196, 347–365.
173. Jennewein, S.; Schürmann, M.; Wolberg, M.; Hilker, I.; Luiten, R.; Wubbolts, M.; Mink, D., Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase. *Biotechnol. J.* **2006**, 1, (5), 537-548.
174. Ma, S. K.; Gruber, J.; Davis, C.; Newman, L.; Gray, D.; Wang, A.; Grate, J.; Huisman, G. W.; Sheldon, R. A., A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate. *Green Chemistry* 12, (1), 81-86.
175. Eyrisch, O.; Fessner, W.-D., Enzymes in organic *synthesis*. 10. Disaccharide mimetics by enzymic tandem aldol additions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, (15), 1639-41.
176. Gijssen, H. J. M.; Wong, C.-H., Sequential Three- and Four-Substrate Aldol Reactions Catalyzed by Aldolases. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, (29), 7585-91.
177. Schoemaker, H. E.; Mink, D.; Wubbolts, M. G., Dispelling the myths - Biocatalysis in industrial *synthesis*. *Science* **2003**, 299, (5613), 1694-1697.
178. Panke, S.; Wubbolts, M., Advances in biocatalytic *synthesis* of pharmaceutical intermediates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, (2), 188-194.
179. Farran, D.; Toupet, L.; Martinez, J.; Dewynter, G., Stereocontrolled *Synthesis* of 2,4-diamino-3-hydroxyacids Starting from Diketopiperazines: A New Route for the Preparation of Statine Analogues. *Org. Lett.* **2007**, 9, (23), 4833-4836.
180. Zuo, Z.; Luo, X.; Zhu, W.; Shen, J.; Shen, X.; Jiang, H.; Chen, K., Molecular docking and 3D-QSAR studies on the binding mechanism of statine-based peptidomimetics with β -secretase. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, (6), 2121-2131.
181. Schostarez, H. J.; Chrusciel, R. A. Preparation of statine derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. 2003006021, 2003.
182. Kroemer, R. T.; Etmayer, P.; Hecht, P., 3D-Quantitative Structure-Activity Relationships of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Proteinase Inhibitors: Comparative Molecular Field Analysis of 2-Heterosubstituted Statine

Derivatives-Implications for the Design of Novel Inhibitors. *J. Med.Chem.* **1995**, *38*, (25), 4917-28.

183. Baer, K.; Dückers, N.; Hummel, W.; Gröger, H., Expanding the Application Range of Aldolases: Novel Asymmetric Syntheses of α -Methylated β -Hydroxy α -Amino Acids and β -Amino Alcohols. *ChemCatChem* **2010**, *2*, (8), 939-942.

184. Soler, A.; Garrabou, X.; Hernández, K.; Gutiérrez, M. L.; Busto, E.; Bujons, J.; Parella, T.; Joglar, J.; Clapés, P., Sequential Biocatalytic Aldol Reactions in Multistep Asymmetric *Synthesis*: Pipecolic Acid, Piperidine and Pyrrolidine (Homo)Iminocyclitol Derivatives from Achiral Building Blocks. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, (14-15), 3007-3024.

185. Vidal, L. Producción de aldolasas recombinantes: de la biología molecular al desarrollo de procesos. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), 2006.

186. Kataoka, M.; Ikemi, M.; Morikawa, T.; Miyoshi, T.; Nishi, K.-i.; Wada, M.; Yamada, H.; Shimizu, S., Isolation and characterization of D-threonine aldolase, a pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme from *Arthrobacter* sp. DK-38. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *248*, (2), 385-393.

187. Espelt, L.; Clapés, P.; Esquena, J.; Manich, A.; Solans, C., Enzymatic carbon-carbon bond formation in water-in-oil highly concentrated (gel emulsions). *Langmuir* **2003**, *19*, 1337-1346.

188. Pandey, G.; Dumbre, S. G.; Khan, M. I.; Shabab, M., Convergent approach toward the *synthesis* of the stereoisomers of C-6 homologues of 1-deoxynojirimycin and their analogues: Evaluation as specific glycosidase inhibitors. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, (22), 8481-8488.

189. Zhang, G.-L.; Chen, C.; Xiong, Y.; Zhang, L.-H.; Ye, J.; Ye, X.-S., *Synthesis* of N-substituted iminosugar derivatives and their immunosuppressive activities. *Carbohydrate Research* **2010**, *345*, (6), 780-786.

190. Bernotas, R. C.; Ganem, B., *Synthesis* of 2S-carboxy-3R,4R,5S-trihydropiperidine, a naturally occurring inhibitor of β -D-glucuronidase. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, (41), 4981-2.

191. Malle, B. M.; Lundt, I.; Wrodnigg, T. M., Regioselective intramolecular ring closure of 2-amino-6-bromo-2,6-dideoxyhexono-1,4-lactones to 5- or 6-membered iminuronic acid analogues: *synthesis* of 1-deoxymannojirimycin and 2,5-dideoxy-2,5-imino-D-glucitol. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, (10), 1779-1786.

192. Yoshimura, Y.; Ohara, C.; Imahori, T.; Saito, Y.; Kato, A.; Miyauchi, S.; Adachi, I.; Takahata, H., *Synthesis* of both enantiomers of hydroxypipicolinic acid derivatives equivalent to 5-azapyranuronic acids and evaluation of their inhibitory activities against glycosidases. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, (17), 8273-8286.
193. di Bello, I. C.; Dorling, P.; Fellows, L.; Winchester, B., Specific inhibition of human β -D-glucuronidase and α -L-iduronidase by a trihydroxy pipicolinic acid of plant origin. *FEBS Letters* **1984**, *176*, (1), 61-64.
194. Makeev, G. M.; Kumskov, M. I., The relationship between the structure and anti-AIDS activity of polyhydroxypiperidines and polyhydroxypyrrolidines. *Mendeleev Commun.* **1996**, (1), 27-9.
195. Tsuruoka, T.; Fukuyasu, H.; Ishii, M.; Usui, T.; Shibahara, S.; Inouye, S., Inhibition of mouse tumor metastasis with nojirimycin-related compounds. *Journal of Antibiotics* **1996**, *49*, (2), 155-61.
196. Shilvock, J. P.; Nash, R. J.; Lloyd, J. D.; Winters, A. L.; Asano, N.; Fleet, G. W. J., Intermediates for incorporation of tetrahydroxypipicolinic acid analogues of α - and β -mannopyranose into combinatorial libraries: unexpected nanomolar-range hexosaminidase inhibitors. *Synthesis of α - and β -homomannojojirimycin. Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, (19), 3505-3516.
197. Cummings, R. D., The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Molecular BioSystems* **2009**, *5*, (10), 1087-1104.
198. Furumai, R.; Matsuyama, A.; Kobashi, N.; Lee, K. H.; Nishiyama, M.; Nakajima, H.; Tanaka, A.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Yoshida, M.; Horinouchi, S., {FK228} (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class {I} histone deacetylases. *Cancer Research* **2002**, *62*, 4916-4921.
199. Emmer, G.; Grassberger, M. A.; Meingassner, J. G.; Schulz, G.; Schauder, M., Derivatives of a Novel Cyclopeptolide. 1. *Synthesis*, Antifungal Activity, and Structure-Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, (13), 1908-1917.
200. Tsimilaza, A.; Tite, T.; Boutefnouchet, S.; Lallemand, M.-C.; Tillequin, F.; Husson, H.-P., A new asymmetric *synthesis* of (2S,3R,4R,5S)-trihydroxypipicolinic acid. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, (13), 1585-1588.
201. Ohara, C.; Takahashi, R.; Miyagawa, T.; Yoshimura, Y.; Kato, A.; Adachi, I.; Takahata, H., *Synthesis* of all stereoisomers of 3-hydroxypipicolinic acid and 3-hydroxy-4,5-dehydropipicolinic acid and their evaluation as glycosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, (6), 1810-1813.

202. Kadouri-Puchot, C.; Comesse, S., Recent advances in asymmetric *synthesis* of pipercolic acid and derivatives. *Amino Acids* **2005**, 29, (2), 101-130.
203. Clapés, P.; Sprenger, G. A.; Joglar, J., Novel Strategies in Aldolase-catalyzed *Synthesis* of Iminosugars. In *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*, Anthonsen, W.-D. F. a. T., Ed. John Wiley & Sons Ltd 2008; pp 299-311.
204. Baer, K.; Dückers, N.; Rosenbaum, T.; Leggewie, C.; Simon, S.; Krauß, M.; Oßwald, S.; Hummel, W.; Gröger, H., A study towards efficient l-threonine aldolase-catalyzed enantio- and diastereoselective aldol reactions of glycine with substituted benzaldehydes: biocatalyst production and process development. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, 22, (9), 925-928.
205. Fessner, W.-D.; Sinerius, G., *Synthesis* of Dihydroxyacetone Phosphate (and Isosteric Analogues) by Enzymatic Oxidation; Sugars from Glycerol. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, 33, (2), 209-212.
206. Fessner, W.-D.; Sinerius, G., Phosphoenolpyruvate as a dual purpose reagent for integrated nucleotide/nicotinamide cofactor recycling. *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, (7), 639-645.
207. Fessner, W.-D.; Walter, C., Enzymic C-C bond formation in asymmetric *synthesis*. *Top. Curr. Chem.* **1997**, 184, (Bioorganic Chemistry), 97-194.
208. Kajimoto, T.; Chen, L.; Liu, K. K. C.; Wong, C.-H., Palladium-mediated stereocontrolled reductive amination of azido sugars prepared from enzymic aldol condensation: a general approach to the *synthesis* of deoxy aza sugars. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, (17), 6678-80.
209. Bashyal, B. P.; Chow, H. F.; Fellows, L. E.; Fleet, G. W. J., The *synthesis* of polyhydroxylated amino acids from glucuronolactone: enantiospecific syntheses of 2*S*,3*R*,4*R*,5*S*-trihydroxypipercolic acid, 2*R*,3*R*,4*R*,5*S*-trihydroxypipercolic acid and 2*R*,3*R*,4*R*-dihydroxyproline. *Tetrahedron* **1987**, 43, (2), 415-22.
210. LowKam, C.; Liotard, B.; Sygusch, J., Structure of a Class I Tagatose-1,6-bisphosphate Aldolase. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285:, 21143-21152.
211. Hall, D. R.; Bond, C. S.; Leonard, G. A.; Watt, I.; Berry, A.; Hunter, W. N., Structure of tagatose-1,6-bisphosphate aldolase - Insight into chiral discrimination, mechanism, and specificity of class II aldolases. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, (24), 22018-22024.
212. Gutiérrez, M. Aplicaciones sintéticas de aldolasas nativas y modificadas genéticamente dependientes de glicina y compuestos α -hidroxicarbonílicos. Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, Barcelona, 2011.

213. Concia, A. L. G., L.; Parella, T.; Joglar, J.; Clapés, P., Casuarine Stereoisomers from Achiral Substrates: Chemoenzymatic *Synthesis* and Inhibitory Properties. *J. Org. Chem.* **2014**, 79 (11), 5386-5389.
214. Macchi, B.; Minutolo, A.; Grelli, S.; Cardona, F.; Cordero, F. M.; Mastino, A.; Brandi, A., The novel proapoptotic activity of nonnatural enantiomer of Lentiginosine. *Glycobiology* **2010**, 20, (5), 500-506.
215. Heinen, Annemieke W.; Peters, Joop A.; Bekkum, Herman v., The Reductive Amination of Benzaldehyde Over Pd/C Catalysts: Mechanism and Effect of Carbon Modifications on the Selectivity. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2000, (13), 2501-2506.
216. Laborda, P.; Sayago, F. J.; Cativiela, C.; Parella, T.; Joglar, J.; Clapés, P., Aldolase-Catalyzed *Synthesis* of Conformationally Constrained Iminocyclitols: Preparation of Polyhydroxylated Benzopyrrolizidines and Cyclohexapyrrolizidines. *Org. Lett.* **2014**, 16, (5), 1422-1425.
217. Zheng, L.; Baumann, U.; Reymond, J.-L., An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Research* **2004**, 32, (14), e115.
218. J. Sambrook, E. F. F. a. T. M., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: N.Y, 1989.
219. Hanahan, D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **1983**, 166, 557-580.
220. Mullis K, F. F., Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **1986**, 51, 263-73.
221. Lund, A. H. D., M.; Skou Pedersen, F., Increased Cloning Efficiency by Temperature-Cycle Ligation. *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 800.
222. Altschul, S. F. G., W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J., Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, 215, 403.
223. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
224. Liu, J. Q.; Ito, S.; Dairi, T.; Itoh, N.; Shimizu, S.; Yamada, H., Low-specificity L-threonine aldolase of *Pseudomonas* sp. NCIMB 10558: purification, characterization and its application to β -hydroxy- α -amino acid *synthesis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 49, (6), 702-708.

225. Vidal, L.; Durany, O.; Suau, T.; Ferrer, P.; Benaiges, M. D.; Caminal, G., High level production of recombinant His-tagged Rhamnulose-1-phosphate aldolase in E.coli. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2003**, *78*, 1171-1179.
226. Durany, O.; Caminal, G.; de Mas, C.; Lopez-Santin, J., Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in E. coli. *Process Biochemistry* **2004**, *39*, (11), 1677-1684.
227. Turner, N. J.; Whitesides, G. M., A combined chemical-enzymic *synthesis* of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, (2), 624-7.
228. Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S.; Palmisano, G., Oxidation of Alcohols with o-Iodoxybenzoic Acid in DMSO: A New Insight into an Old Hypervalent Iodine Reagent. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, (22), 7272-6.
229. Luly, J. R.; Dellaria, J. F.; Plattner, J. J.; Soderquist, J. L.; Yi, N., A *synthesis* of protected aminoalkyl epoxides from α -amino acids. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, (8), 1487-92.
230. Effenberger, F.; Straub, A., A novel convenient preparation of dihydroxyacetone phosphate and its use in enzymatic aldol reactions. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, (15), 1641-4.

