

University of Groningen

Biocatalytic Synthesis of Pharmaceutically Relevant Amides and Amino Acids

Mohammad Zainal Abidin, Zainal

DOI:
[10.33612/diss.178642544](https://doi.org/10.33612/diss.178642544)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2021

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Mohammad Zainal Abidin, Z. (2021). *Biocatalytic Synthesis of Pharmaceutically Relevant Amides and Amino Acids*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.178642544>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING EN TOEKOMSTPERSPECTIEF

SAMENVATTING EN TOEKOMSTPERSPECTIEF

Samenvatting

Het werk beschreven in dit proefschrift richtte zich op de toepassingen van enzymen en enzymcascades voor de synthese van complexe aminozuren en amiden die kunnen dienen als veelzijdige bouwstenen voor bioactieve moleculen. De gewenste verbindingen omvatten *N*-arylalkyl-gesubstitueerde L-asparaginezuur derivaten en vitamine B₅-derivaten die moeilijk of lastig te synthetiseren zijn. De nieuw ontwikkelde biokatalytische synthese strategieën zullen waarschijnlijk ons vermogen vergroten bij het zoeken naar en bereiden van nieuwe bioactieve verbindingen, inclusief degene die gericht zijn op de biosynthese en het gebruik van CoA in verschillende pathogenen.

In **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift hebben we de biochemische eigenschappen, structuren en katalytische mechanismen van twee C-N lyasen, MAL en EDDS-lyase, beschreven. We bespreken specifiek de recente toepassing van deze twee enzymen bij het bereiden van een reeks L-asparaginezuur derivaten en complexe bioactieve moleculen van farmaceutisch en nutraceutisch belang via chemo-enzymatische en multi-enzymatische cascades.

Vervolgens onderzochten we in de studie die beschreven staat in **Hoofdstuk 2**, de asymmetrische synthese van *N*-arylalkyl-gesubstitueerde L-asparaginezuren met behulp van EDDS-lyase uit *Chelativorans sp.* BNC1. Poelarends en medewerkers rapporteerden eerder de potentie van het enzym voor de bereiding van een reeks aminocarbonzuren (en derivaten) zoals toxine A, aspergillomarasmine A (AMA), aspergillomarasmine B (AMB)^[1], *N*-gesubstitueerde L-asparaginezuren (*N*-cycloalkyl, *N*-aryl, *N*-alkyl), heterocyclische verbindingen zoals pyrazolidinonen^[2-4], evenals belangrijke voorlopers van voedseladditieven (neotaam en advantaam). Vanwege het brede amine substraat bereik van dit enzym, zijn we verder gegaan met het verkennen van het synthetische vermogen van EDDS-lyase voor biokatalytisch vervaardigen van *N*-arylalkyl-gesubstitueerde L-asparaginezuren, inclusief nuttige bouwstenen van bekende remmers van aspartaat *N*-acetyl transferase. Gewoonlijk worden deze moleculen gesynthetiseerd met behulp van metaal gekatalyseerde reductieve *N*-alkylering van L-asparaginezuur. In deze studie toonden we aan dat EDDS lyase een effectieve biokatalysator is om *N*-arylalkyl-gesubstitueerde L-asparaginezuren te

synthetiseren door enantioselectieve hydroaminatie van fumaarzuur. Een goede omzetting van de uitgangssubstraten tot de gewenste aminozuurproducten werd bereikt (17-91%) binnen 24-48 uur met 0.15 mol% katalysator. Zeven enzymatisch geproduceerde aminozuurproducten werden gezuiverd met een goede opbrengst (28-76%) en geïdentificeerd door middel van ^1H NMR, ^{13}C NMR en HRMS als de gewenste N-arylalkyl-gesubstitueerde L-asparaginezuren met een hoge optische zuiverheid (>99% e.e.). EDDS-lyase vertoont dus een uitstekende enantioselectiviteit en een zeer breed substraatbereik, waaronder veel structureel diverse niet-natuurlijke aminen. Deze capaciteit maakt EDDS-lyase een krachtig hulpmiddel voor de biokatalytische asymmetrische synthese van veelzijdige L-asparaginezuur derivaten.

In **Hoofdstuk 3** beschrijven we de toepassing van het C-N lyase MAL en de geconstrueerde variant MAL-H194A in multi-enzymatische cascade synthese van (*R*)-pantotheenzuur (vitamine B₅) en beide diastereoisomeren van α -methyl-gesubstitueerde vitamine B₅ met hoge stereoisomere overmaat. Deze moleculen zijn belangrijke synthetische voorlopers van antimicrobiële pantothenamiden, die moeilijk of lastig te synthetiseren zijn, wat het onderzoek naar hun therapeutische potentie bemoeilijkt. De ontwikkelde synthetische enzymatische cascade bestaat uit drie opeenvolgende stappen, waaronder aminering, decarboxylering en condensatie. Eerst werd een 1-pot, twee-staps enzymatische cascade ontwikkeld met behulp van MAL (of MAL-H194A) en een aminozuur decarboxylase [aspartaat α -decarboxylase (ADC), β -methylaspartaat α -decarboxylase (CrpG), of glutamaat decarboxylase (GAD)]. De respectievelijke reacties resulteerden in β -alanine en beide enantiomeren van α -methyl- β -alanine, bouwstenen van respectievelijk pantotheenzuur en α -methyl-pantotheenzuur, met een hoge conversie (75-99%), een goede opbrengst aan gezuiverd product (63-85%) en hoge enantiomere overmaat (>99% e.e.). Vervolgens werd deze twee-staps cascade uitgebreid door toevoeging van pantotheenzuur synthetase (PS) om een drie-staps enzymatische cascade te vormen, waarbij (*R*)-pantotheenzuur en de gewenste diastereoisomeren van α -methyl-pantotheenzuur in een 1-pot systeem werden gegenereerd (>75% omzetting over drie stappen, 46-70% geïsoleerde opbrengst). Deze studie laat zien dat door het combineren van deze drie verschillende biokatalysatoren het mogelijk is om snel uit goedkope en eenvoudige uitgangsmaterialen complexe diastereozuivere bouwstenen te synthetiseren voor bioactieve amideverbindingen.

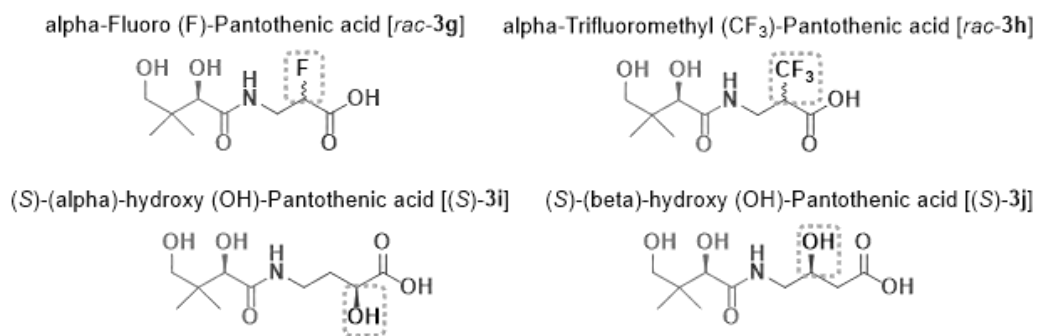
In het werk beschreven in **Hoofdstuk 4**, onderzochten we de biokatalytische potentie van het PS-enzym voor de synthese van farmaceutisch relevante amiden, waaronder bekende vitamine B₅ antimetaboliëten. We laten zien dat naast het natuurlijke amine substraat β -alanine, het enzym een breed scala aan structureel diverse aminen accepteert voor koppeling aan het native carbonzuursubstraat (*R*)-pantoaat om amideproducten te vormen met tot >99% conversie. Vier interessante amideproducten, die kunnen dienen als synthons voor veelbelovende antimicrobiële pantothenamiden, werden op mg-schaal bereid, gezuiverd en geïdentificeerd door middel van ¹H NMR, ¹³C NMR en HRMS als de gewenste pantotheenzuur derivaten, met >99% conversie en 71-89% opbrengst aan geïsoleerd product. Van groot belang zijn de gefluoreerde pantotheenzuur derivaten, bereid door de enzymatische condensatie van (*R*)-pantoaat en α -fluor-gesubstitueerd β -alanine of α -CF₃-gesubstitueerd β -alanine, waarvan is gebleken dat ze buitengewoon moeilijk te synthetiseren zijn met de conventionele methoden. Daarom biedt de ontwikkelde enzymatische strategie een aantrekkelijk alternatief voor de huidige chemische methoden om moeilijke pantotheenzuur derivaten te bereiden.

TOEKOMSPERSPECTIEF

In het werk dat in dit proefschrift wordt beschreven, hebben we de synthetische potentie van C-N-lyasen (MAL en EDDS-lyase) voor de biokatalytische asymmetrische hydroaminatie van onverzadigde carbonzuren onderzocht om veelzijdige L-asparaginezuur derivaten te produceren. Bovendien werd de condensatiereactie tussen structureel diverse aminen en (*R*)-pantoaat gekatalyseerd door pantothenaat synthetase (PS) onderzocht om gesubstitueerde pantotheenzuren te genereren. Dit zijn belangrijke synthons om antimicrobiële verbindingen te produceren. Zowel EDDS-lyase als PS hebben een breed nucleofiel substraatbereik en vertonen een goede katalytische activiteit, dus een grote potentie voor biokatalytische toepassing.

Vervolgens is er behoefte aan uitbreiding van het elektrofiel substraatbereik van EDDS-lyase, dat alleen fumaarzuur als substraat accepteert en geen activiteit vertoont voor analogen zoals crotonzuur, mesaconzuur, itaconzuur, 2-penteenzuur en glutaconzuur. Structuur-gebaseerde 'engineering' van EDDS-lyase lijkt een goede strategie te zijn om het substraatspectrum van het enzym uit te breiden, waardoor de asymmetrische synthese van andere aminozuren mogelijk wordt, waaronder

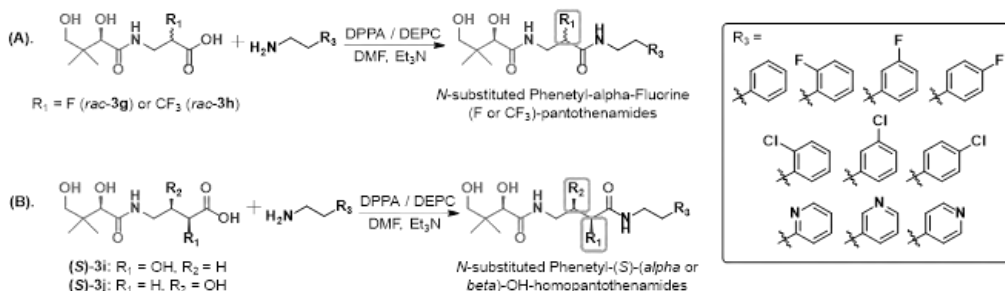
veelzijdige β -aminozuren. Aspartase van *Bacillus sp.* YM55-1 (AspB), een enzym uit de aspartaat/fumarase-superfamilie, werd met succes gemodificeerd door computationeel herontwerp om veelbelovende activiteiten te geven met verschillende α , β -onverzadigde monocarbonzuren die β -aminozuren opleveren [5]. Interessant is dat EDDS-lyase en AspB sterk geconserveerd zijn met betrekking tot de aminozuur residuen die verantwoordelijk zijn voor α -carboxylaats binding, wat ondersteuning biedt voor het gebruik van een vergelijkbare engineeringstrategie om het elektrofile substraatspectrum van EDDS-lyase te vergroten [5,6]. Als de enzym modificatie aanpak succesvol zou zijn in het vergroten van het elektrofile substraatspectrum van EDDS-lyase, zonder het brede nucleofiele substraatspectrum ervan te schaden, zou het grote kansen bieden voor biokatalytische synthese van een extreem grote bibliotheek van synthetisch bruikbare en/of biologisch actieve aminozuren. Ook de verschillende decarboxylasen (ADC, CrpG en GAD) die in onze studies worden gebruikt, zijn interessante doelwitten voor laboratorium evolutie om hun substraatbereik uit te breiden, waardoor een breed scala aan L-asparaginezuur derivaten kan worden omgezet in de productie van waardevolle β -alanine derivaten.



Figuur 1. De chemische structuur van pantotheenzuur analogen gesynthetiseerd met het PS enzym als biokatalysator.

Tenslotte, in het werk dat beschreven staat in **Hoofdstuk 4** hebben we de bruikbaarheid van het PS enzym aangetoond voor de synthese van gesubstitueerde pantotheenzuren (Figuur 1), die belangrijke bouwstenen zijn voor het bereiden van nieuwe antimicrobiële verbindingen (Figuur 2). Om deze potentiële antimicrobiële stoffen te synthetiseren moeten de gesubstitueerde pantotheenzuren selectief worden gekoppeld aan *N*-fenethylamine derivaten door amide-binding vorming aan de α -carbonzuurgroep [7]. De potentie van deze nieuwe pantotheenamiden moet worden

getest voor zowel stabiliteit als biologische activiteit. Verdere studies naar de therapeutische potentie van nieuwe biologisch actieve pantotheenamiden zijn dringend nodig en hun eenvoudige bereiding via chemo-enzymatische synthese strategieën kan zeer nuttig zijn bij het verder uitbreiden en optimaliseren van deze interessante groep van antimicrobiële stoffen die gericht zijn op de biosynthese en het gebruik van co-enzym A.



Figuur 2. De voorgestelde chemische synthese van nieuwe pantotheenamiden als potentiële antimicrobiële stoffen. (A). Synthese van *N*-gesubstitueerde-phenethyl- α -F/CF₃-pantotheenamide (B). Synthese van *N*-gesubstitueerde-phenethyl-(S)-(α/β)-OH-homopantotheenamide.

REFERENTIES

- [1] H. Fu, J. Zhang, M. Saifuddin, G. Cruiming, P. G. Tepper, G. J. Poelarends, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 186–191.
- [2] J. Zhang, H. Fu, P. G. Tepper, G. J. Poelarends, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2433–2437.
- [3] H. Fu, A. Prats Luján, L. Bothof, J. Zhang, P. G. Tepper, G. J. Poelarends, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 7292–7299.
- [4] J. Zhang, E. Grandi, H. Fu, T. Saravanan, L. Bothof, P. G. Tepper, A.-M. W. H. Thunnissen, G. J. Poelarends, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2020**, *59*, 429–435.
- [5] R. Li, H. J. Wijma, L. Song, Y. Cui, M. Otzen, Y. Tian, J. Du, T. Li, D. Niu, Y. Chen, J. Feng, J. Han, H. Chen, Y. Tao, D. B. Janssen, B. Wu, *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 664–670.
- [6] H. Poddar, J. De Villiers, J. Zhang, V. Puthan Veetil, H. Raj, A. M. W. H. Thunnissen, G. J. Poelarends, *Biochemistry* **2018**, *57*, 3752–3763.
- [7] C. Spry, L. Barnard, M. Kok, A. K. Powell, D. Mahesh, E. T. Tjhin, K. J. Saliba, E. Strauss, M. de Villiers, *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 1844–1854.