

## PLAN

### **Biocatalyse**

Dédoublement cinétique

Désymétrisation

Dédoublement cinétique dynamique

Synthèse ; synthèse asymétrique

Réactions en cascade

Réactions « non naturelles »

## Réactions enzymatiques : avantages et handicaps

- Réduction coût
- Meilleur impact environmental
- Sécurité améliorée
- Economie d'atomes / réduction étapes
- Réduction utilisation solvants



Procédés de fabrication durables

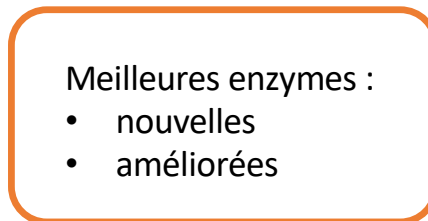
Enzymes « sauvages »

- Panel de substrats limité
- Stabilité faible (*e.g.* solvant organique)
- Concentrations substrat limitées



Meilleures enzymes :

- nouvelles
- améliorées



So why is it taking industry so long to adopt biocatalytic processes?

<https://www.chemistryworld.com/news/chemical-industry-hasnt-yet-developed-an-appetite-for-biocatalysis-survey-finds/4018056.article>

Status check: biocatalysis; its use with and without chemocatalysis. How does the fine chemicals industry view this area?

F. Gallou, H. Gröger, B.H. Lipshutz Green Chem 2023, 25, 6092 DOI: 10.1039/d3gc01931d

## Dédoublément cinétique

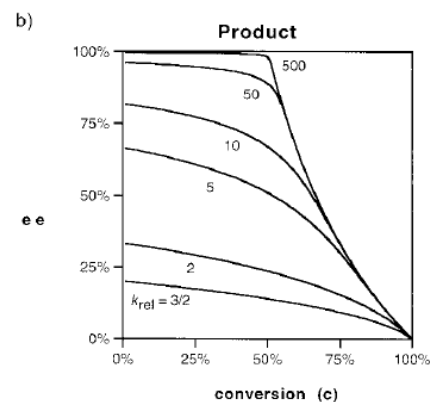
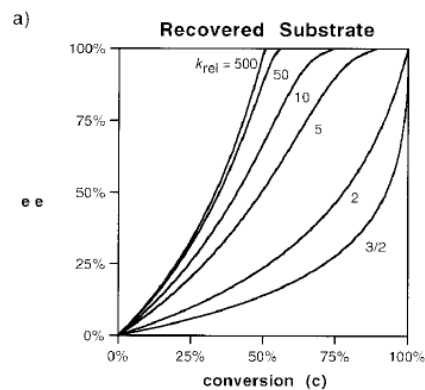
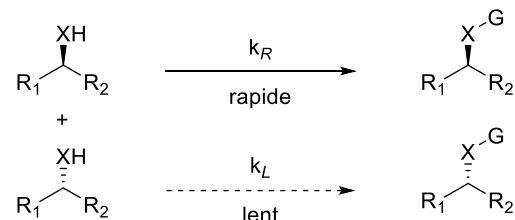
### Séparation d'énantiomères

Principe : vitesses de réactions des deux énantiomères sont différentes, idéalement  $k_R \gg k_S$ .

Conversion limitée à 50%.

Facteur de sélectivité,  $S = k_{rel} = k_R / k_S$ .

Plus S est élevé, plus le dédoublément est efficace.



J.M. Keith *et al.* *Adv. Syn. Catal.* **2001**, 343, 5-26

Ratio énantiomérique : fonction de la conversion, ee substrat et ee produit.

$$E = \frac{\ln \frac{[e.e.p (1 - e.e.s)]}{(e.e.p + e.e.s)}}{\ln \frac{[e.e.p (1 + e.e.s)]}{(e.e.p + e.e.s)}}$$

$E < 15$  : non acceptable pour synthèse

$15 < E < 30$  : bon à modéré

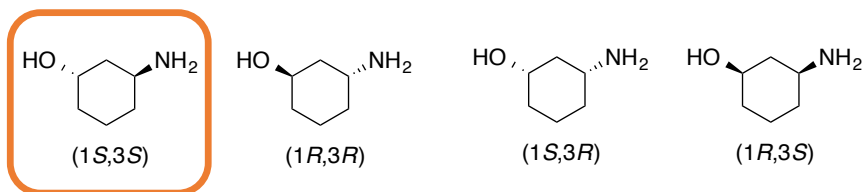
$E > 30$  : excellent.

*NB : pour  $E > 200$ , limites des méthodes analytiques.*

## Dédoublage cinétique

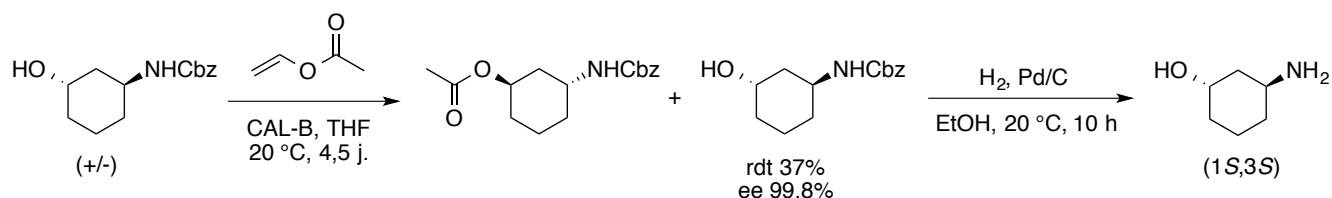
### Séparation d'énantiomères

Synthèse des quatre diastéréoisomères du 3-aminocyclohexanol (Novartis).



C.E. Brocklehurst *et al.* OPRD 2011, 15, 294-300

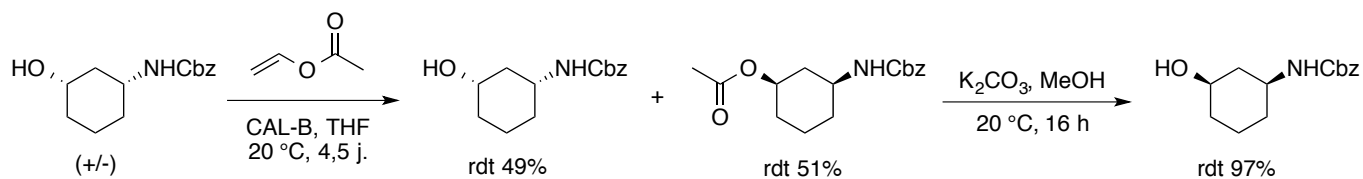
Réaction d'esterification.



CAL-B : lipase de *Candida antarctica* (levure, commerciale)

*NB : pas la voie la plus efficace. Mise au point d'une résolution par formation de sels diastéréoisomériques avec l'acide mandélique.*

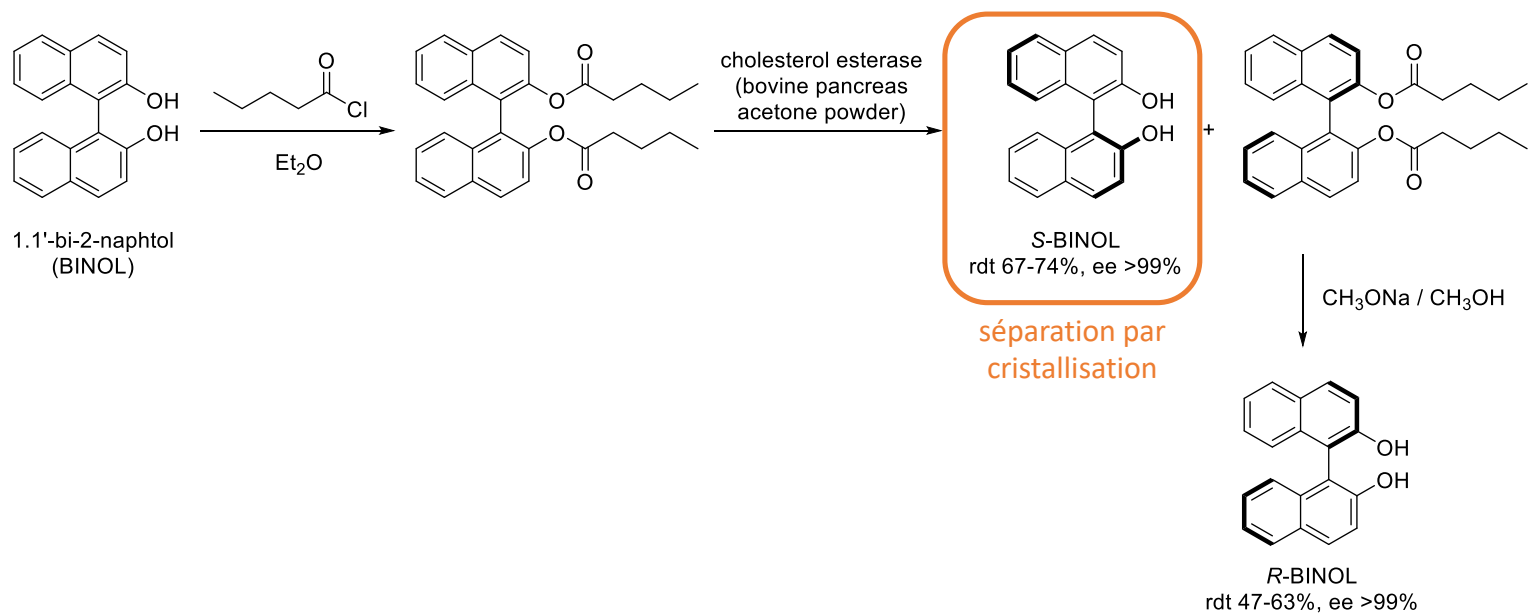
Résolution sur le second couple d'énantiomères.



## Dédoublément cinétique

### Séparation d'atropoisomères

Préparation des *S*-BINOL et *R*-BINOL, ligands chiraux pour catalyse par métaux de transition.



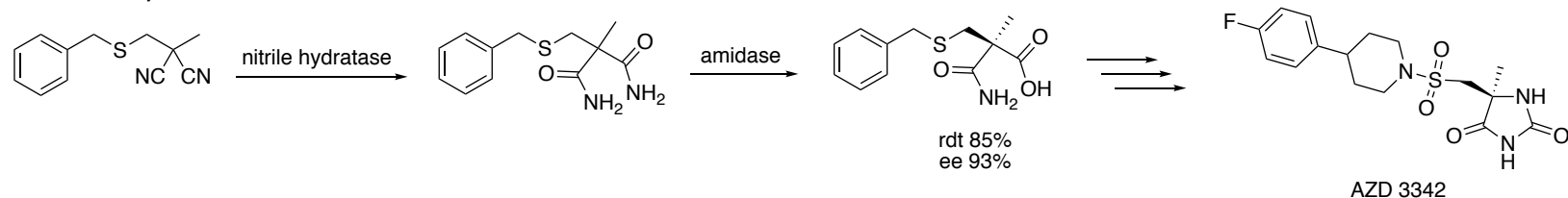
Enzyme : cholesterol esterase contenue dans « bovine pancreas acetone powder », extrait de pancréas, commercial.

## Désymétrisation

### Désymétrisation de composés prochiraux

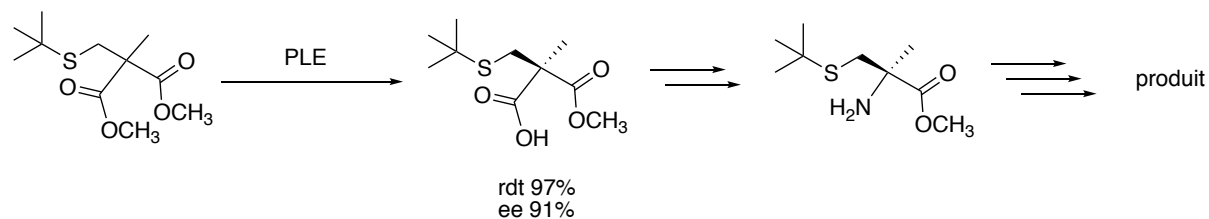
Synthèse d'acides aminés quaternaires chiraux.

Réaction d'hydrolyse de nitrile, en deux étapes : nitrile hydratase (non stéréospécifique) puis amidase (stéréospécifique) (AstraZeneca).



Amidase de *Rhodococcus erythropolis* (bactérie, recombinante)

Accès à l'autre énantiomère par hydrolyse stéréospécifique d'ester.

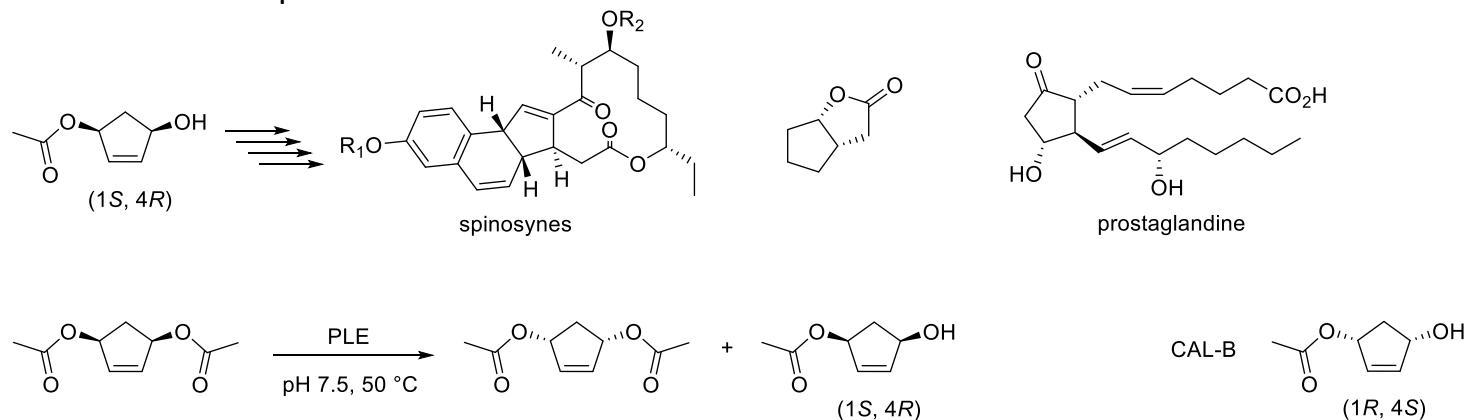


PLE : pig liver esterase (commerciale)

## Désymétrisation de composés meso :

démasquer les caractéristiques stéréogènes déjà présentes dans les molécules symétriques pour obtenir des molécules chirales avec des centres stéréogènes multiples en une seule étape.

Synthèse de molécule plateforme.



PLE : pig liver esterase (commerciale)

« Petite » échelle, 2 mmoles substrat : conversion 98%, ee 88%.

Montée en échelle, 0,4 mole (78g), 5 U/mL enzyme :

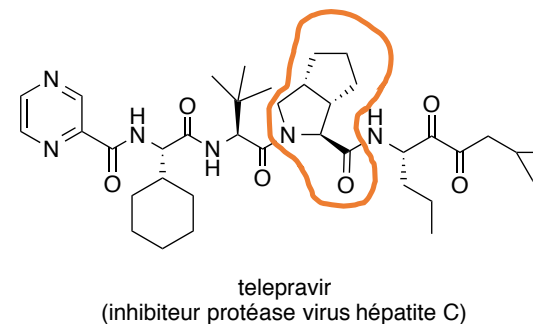
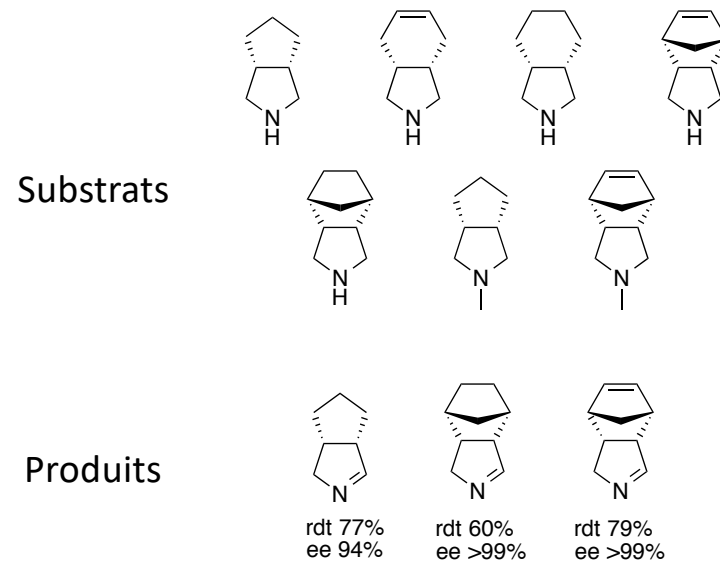
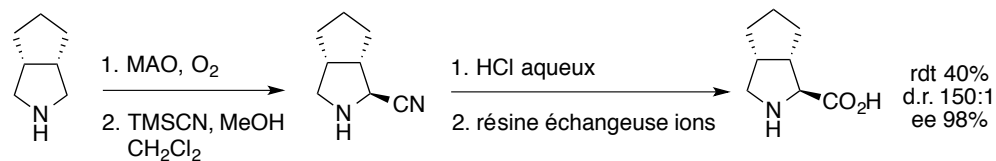
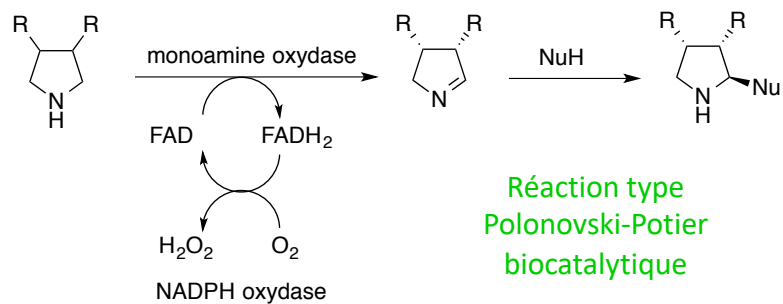
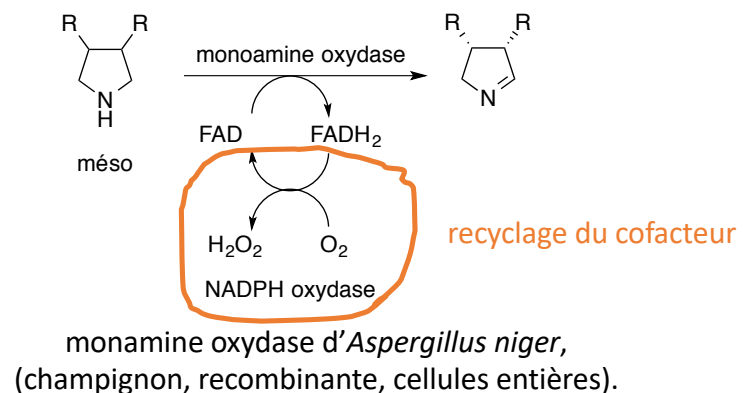
rendement brut 70%, après cristallisation ee >99%, rdt 28%.

Unité pour la quantité d'enzyme : U.

1 U = quantité d'enzyme nécessaire pour former 1  $\mu$ mole de produit / min.

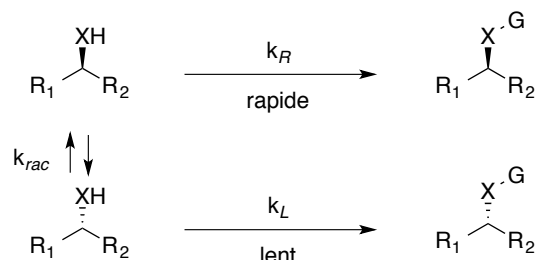
## Désymétrisation de composés méso

### Synthèse de pyrrolidines chirales





## Dédoublément cinétique dynamique



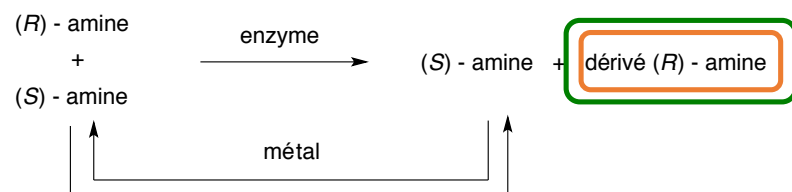
$$k_{rac} > k_R \gg k_L$$

rdt théorique 100%

Exemple du dédoublément cinétique dynamique d'amines et d'acides aminés.

Pour une revue récente :  
Yang et al. *OPRD* **2022**, *26*, 1925-46

## Couplage résolution cinétique enzymatique et racémisation chimique

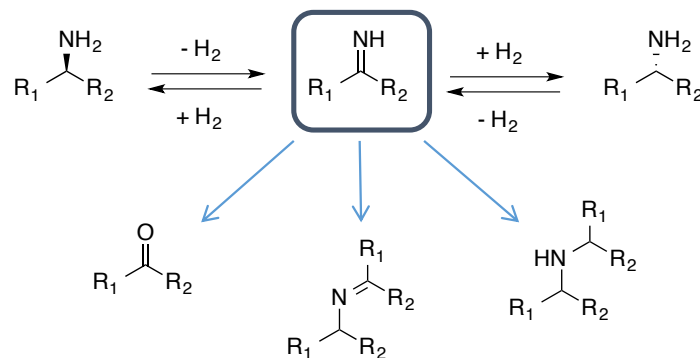


procédé cinétique :  
rdt 50%

procédé dynamique :  
rdt 100%

Principe : formation réversible d'imine par déhydrogénation / hydrogénation.

Métal : Pd, Ru, Ni, Ir.



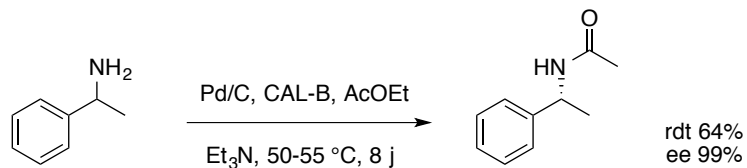
sous-produits possibles



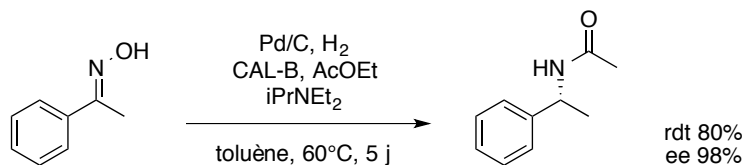
Réaction à haute T pour la racémisation par catalyseur métallique.

Enzyme thermostable, ex CAL-B, lipase *Candida antarctica*.

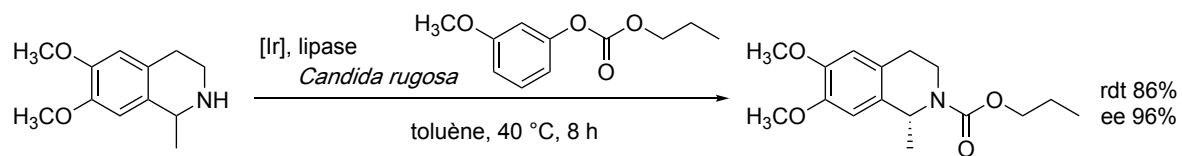
- amine primaire



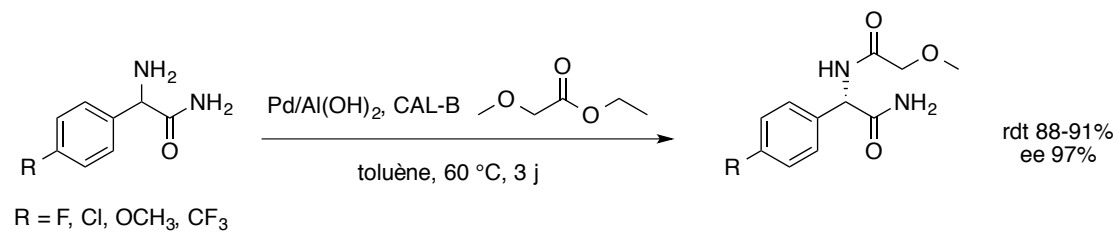
- à partir d'oxime



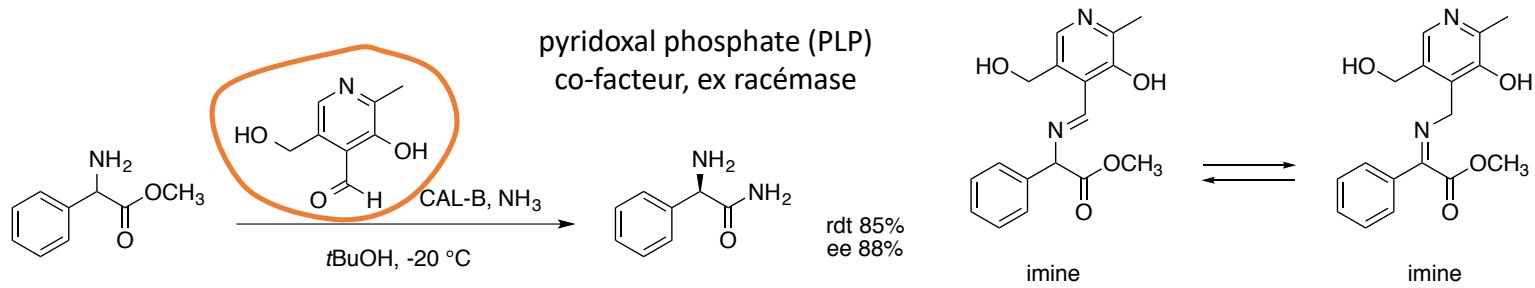
- amine secondaire



- acide aminé



Racémisation par formation biomimétique d'imine.

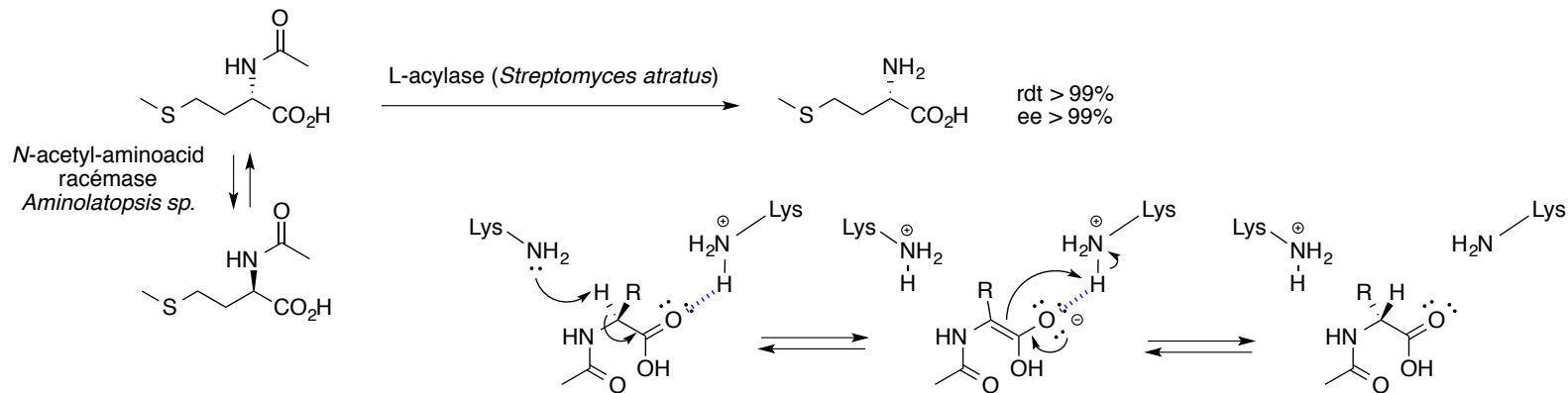


M.A.P.J. Hacking et al. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **1998**, 5, 155-1577

## Dédoublage cinétique dynamique entièrement biocatalytique

Racémisation avec racémase.

Synthèse de L-méthionine.

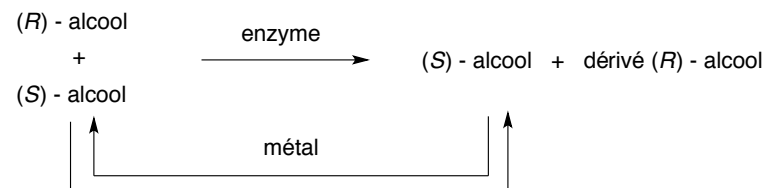


racémisation type céto-énolique

J.B. Thoden et al. *Biochemistry* **2004**, 43, 5716-5727

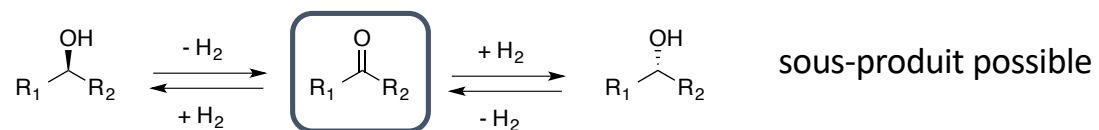
Exemple du dédoublement cinétique dynamique d'alcools.

## Couplage dédoublement cinétique enzymatique et racémisation chimique

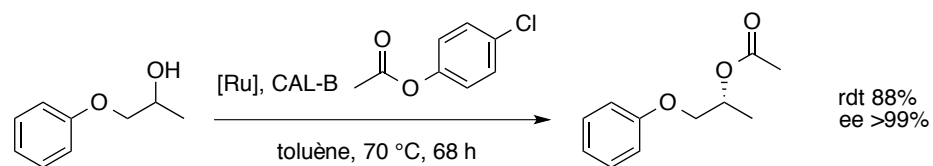


Principe : formation réversible de cétone par déhydrogénation / hydrogénation.

Métal : Pd, Ru, Ni, Ir.

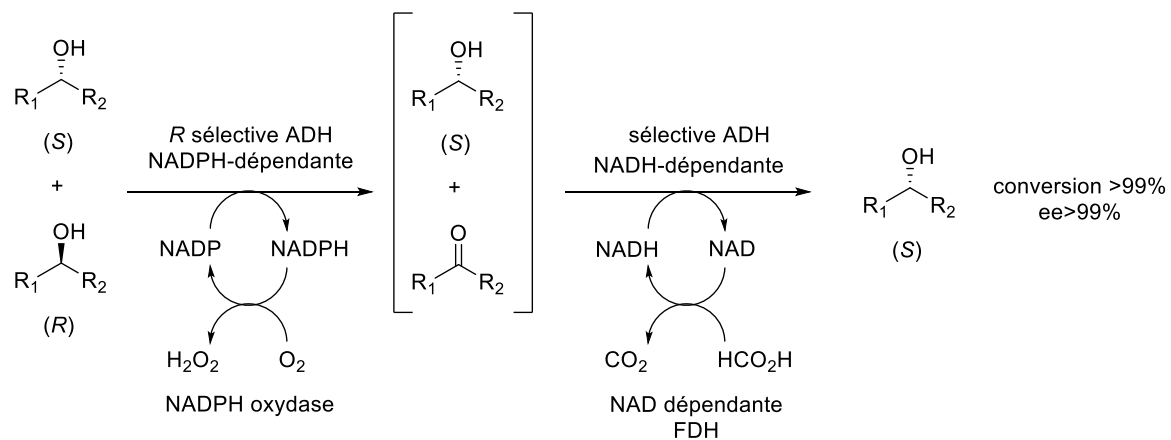


- alcool secondaire



## Déracémisation biocatalytique

Déracémisation d'alcools secondaires.

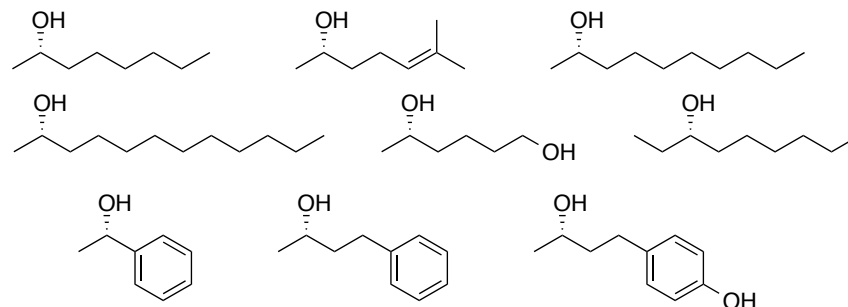


C. V. Voss et al. *Synlett* **2010**, 991-998



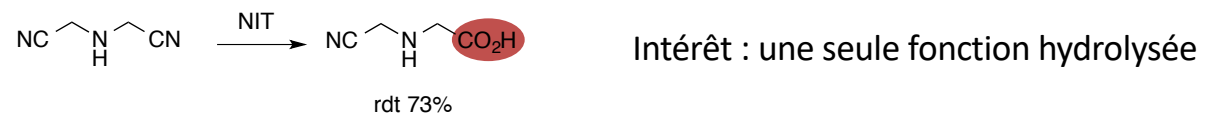
Oxydation énantiospécifique et réduction stéréosélective simultanées.

Substrats testés :



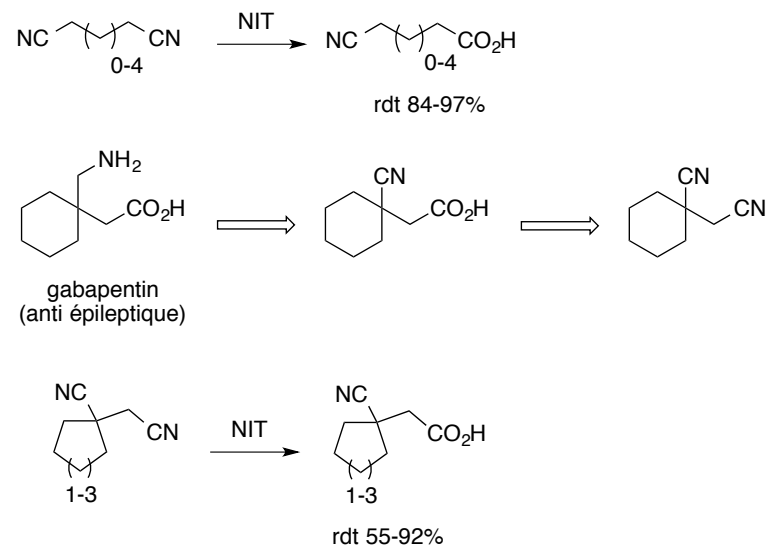
## Synthèse

Exemple de transformation chimique régiosélective.  
Désymétrisation de substrats achiraux.



NIT : nitrilase ; enzyme recombinante *Spingomonas wittichii*, isolée ou extrait cellulaire.

C. Vergne-Vaxelaire et al. *Adv.Syn.Catal.* **2013**, 355, 1763-1779.



D. Zhu et al. *Adv.Syn.Catal.* **2007**, 349, 1667-1670.

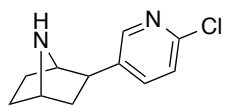
NIT : nitrilase ; enzyme recombinante *Bradyrhizobium japonicum*, isolée.

## Synthèse

Alcools chiraux par hydroxylation : oxydation liaison C-H non activée.

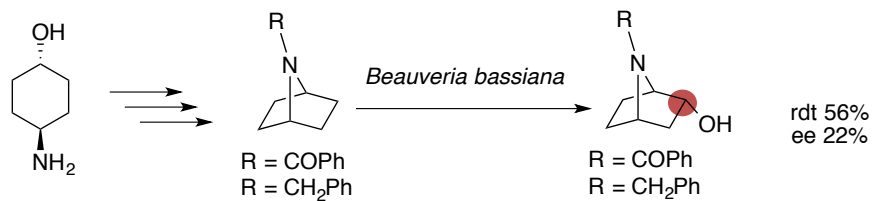
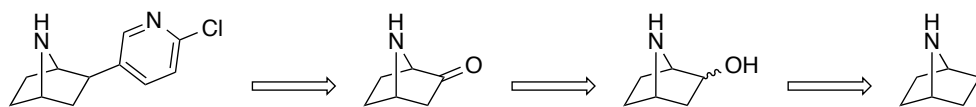
Désymétrisation de molécule prochirale.

Exemple de transformation chimique régiosélective.



épiibatidine

Alcaloïde, analogue ligand récepteurs nicotinique/muscarinique.

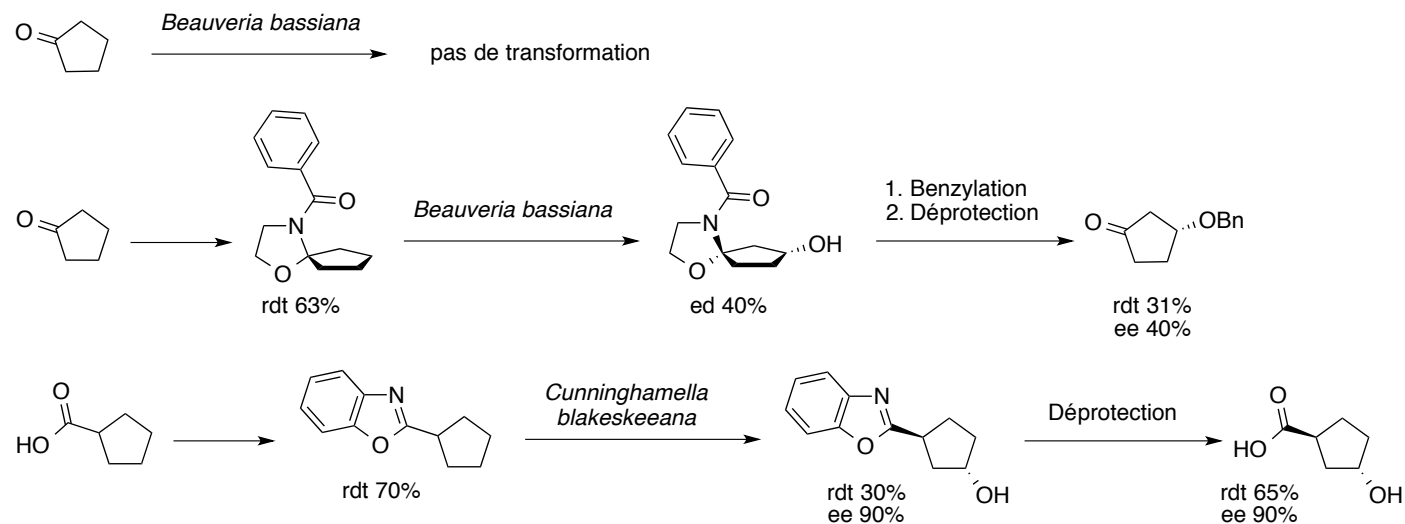


oxydation régiosélective

*Beauveria bassiana* champignon

## Synthèse asymétrique

Hydroxylation par cellules entières.

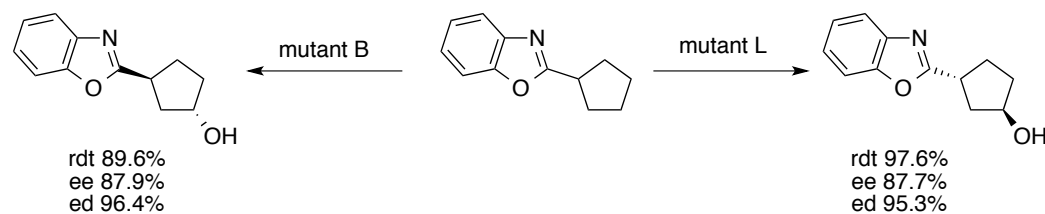


« ingénierie de substrats »

G. Braunegg et al. *Angew. Chem.Int.Ed.* **1999**, *38*, 2763-2765.

Hydroxylation par enzymes purifiées (recombinantes, ingénierées).

Cytochrome P450 BM-3, *Bacillus megaterium*.



D.F. Münzer et al. *Chem.Comm.* **2005**, 2597-2599.

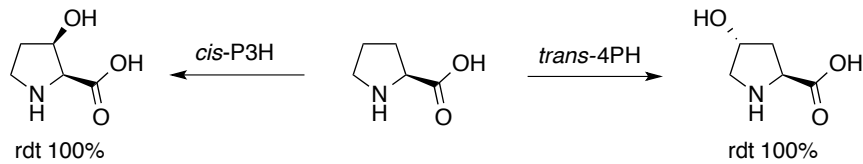


## Synthèse asymétrique

Hydroxylation par dioxygénases  $\alpha$ -cétoglutarate dépendantes.

Screening fonctionnel d'environ 3000 souches d'actinomyces (bactéries).

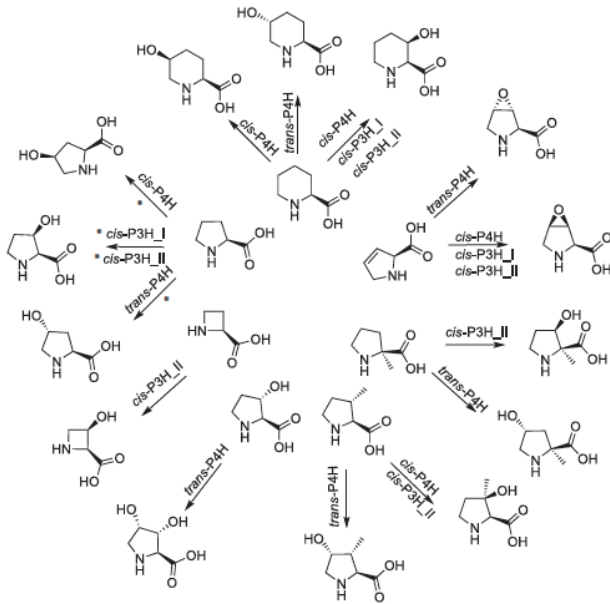
Oxydation régio et stéréosélective.



Enzymes recombinantes  
 cis-P3H : *Streptomyces* sp.  
 trans-4PH : *Dactylosporangium* sp.

T. Shibasaki *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, 64, 746-750.

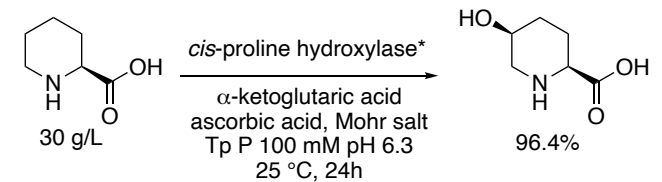
Production : trans-4PH 41 g/L ; cis-3PH 68 g/L.



Activité très intéressante *mais* :

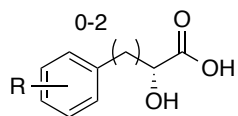
- essentiellement sur substrats métaboliques
- faible panel de substrats.

Merck & Codexis

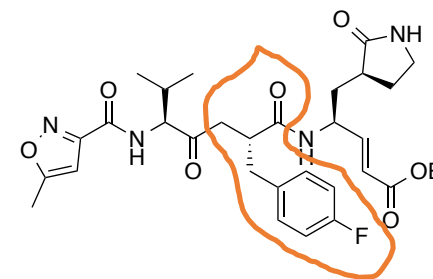


## Synthèse asymétrique

Alcools chiraux par réduction.

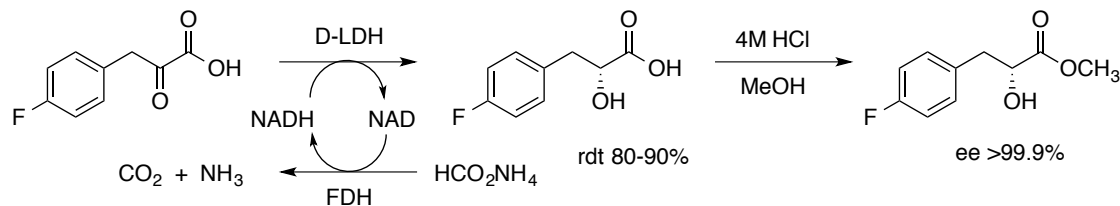


$\alpha$ -céto-acides chiraux :  
building block pour la synthèse de  
composés d'intérêt biologique.



Biocatalyse : méthode de choix.

- substrat bon marché
- chimiosélectivité
- à priori excellente stéréosélectivité.



NB : ee mesuré sur ester

D-LDH : lactate déshydrogénase, *Leuconostoc mesenteroides*, recombinante, commerciale.

FDH : formate déshydrogénase, *Candida biodinii*, recombinante, commerciale.

Optimisation du procédé, productivité = 560 g/L/jour.

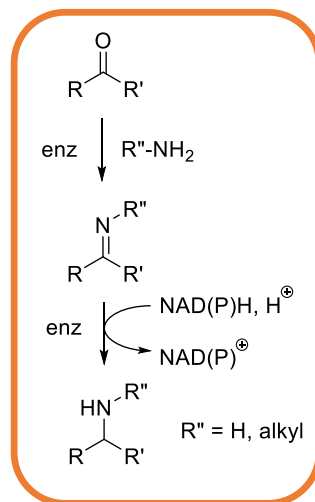
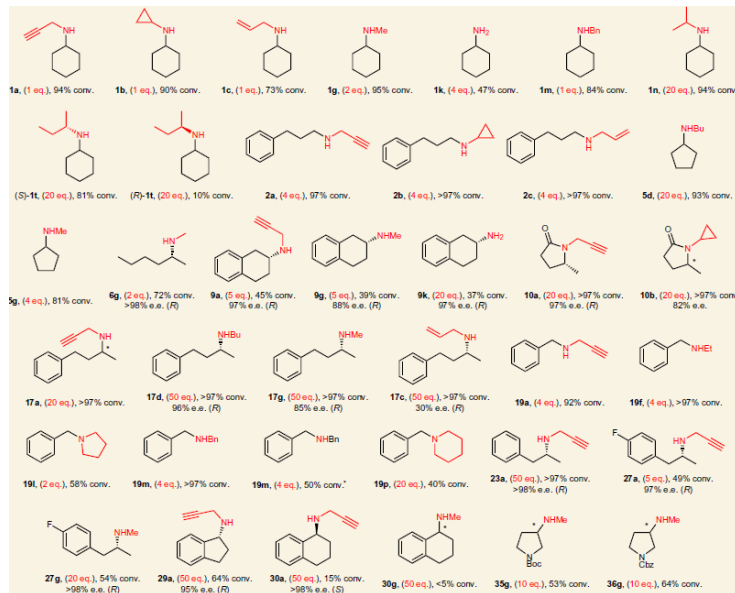
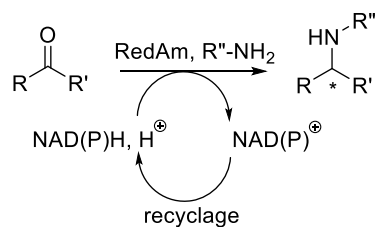
# Synthèse asymétrique

## Amines chirales.

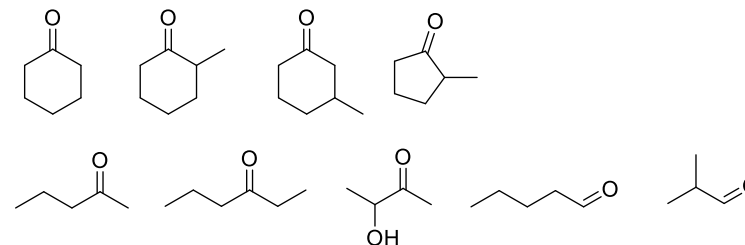
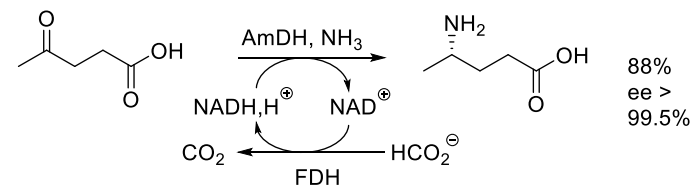
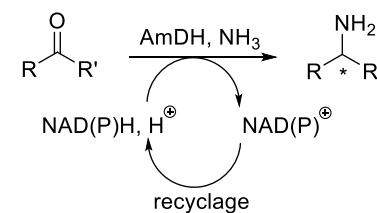
Synthèse d'amines chirales à partir de cétones prochirales et d'ammoniac ou d'alkylamines, un des challenges majeurs pour la synthèse pharmaceutique.

Réaction d'amination réductrice :

- Reductive Aminase (RedAm)

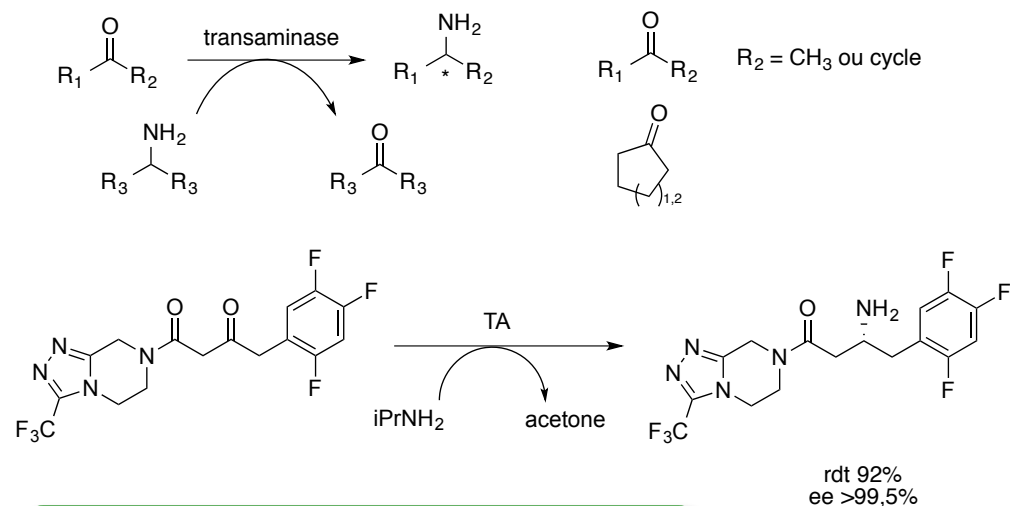


- Amine Dehydrogénases (AmDH)



## Synthèse asymétrique

Produit final chiral : introduction chiralité par biocatalyse.



Ingénierie protéique nécessaire :

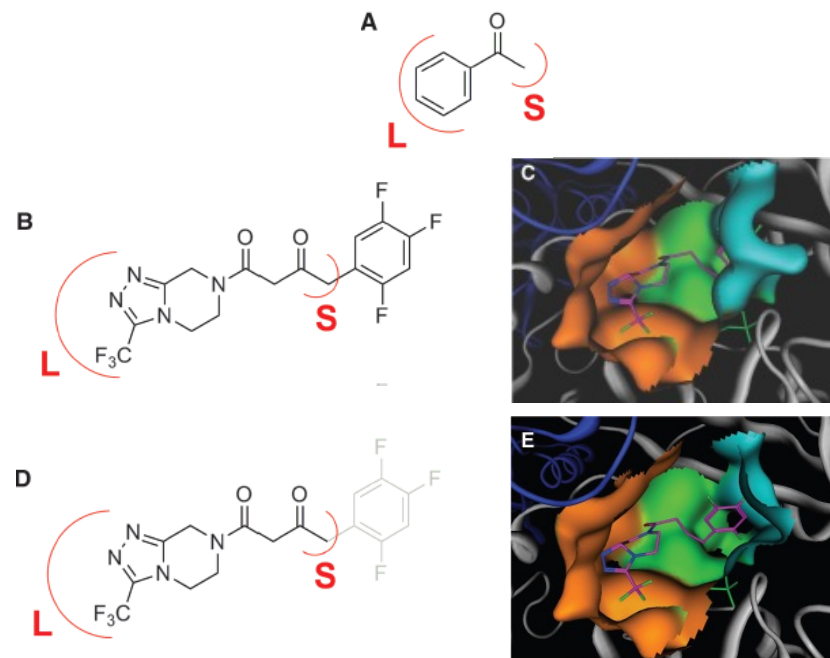
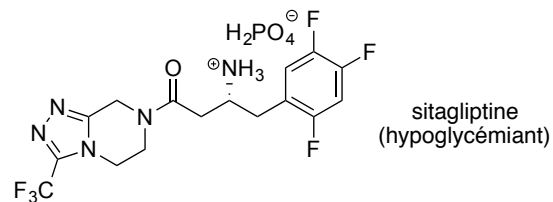
- changer la spécificité de substrat
- stabilité à forte concentration en substrat

TA commerciale d'*Arthrobacter sp.*

Comparé au procédé catalytique au rhodium :

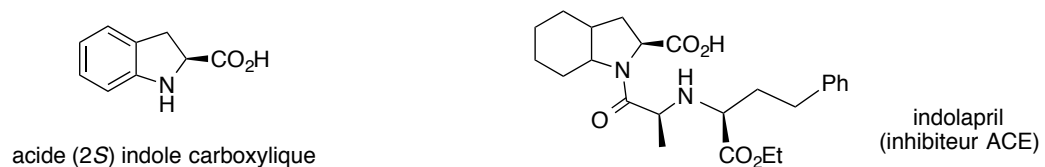
- 10-13% augmentation rdt global,
- 53% augmentation productivité(kg/L par jour),
- 19% réduction déchets totaux,
- élimination de tous les métaux lourds,
- réduction du coût global manufacturé

Substrat 200 g/L  
6 g/L enzyme  
dans 50% DMSO

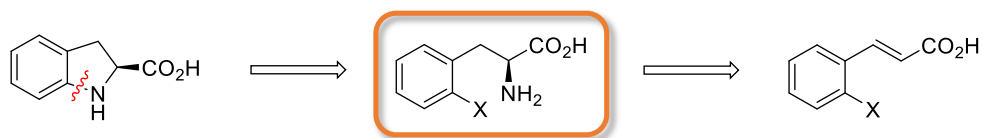


## Synthèse asymétrique chemoenzymatique

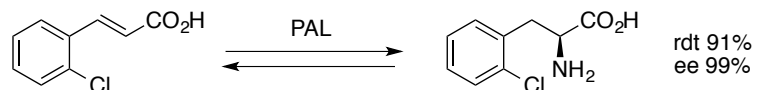
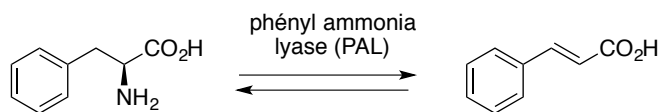
Intermédiaire chiral : introduction chiralité par biocatalyse.



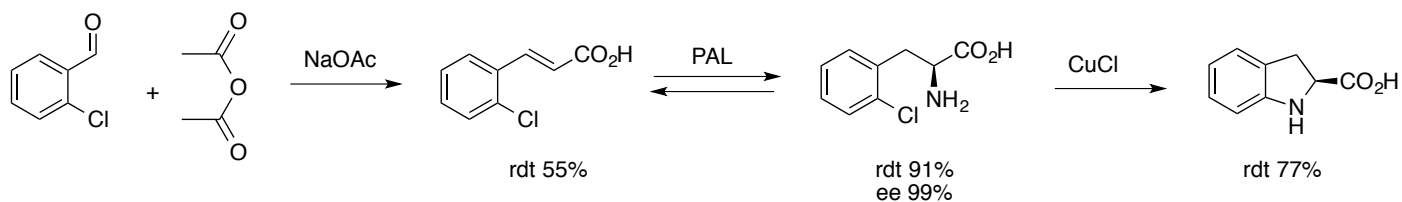
Rétrosynthèse.



Activité lyase :



PAL recombinante, *Rhodotorula glutinis*

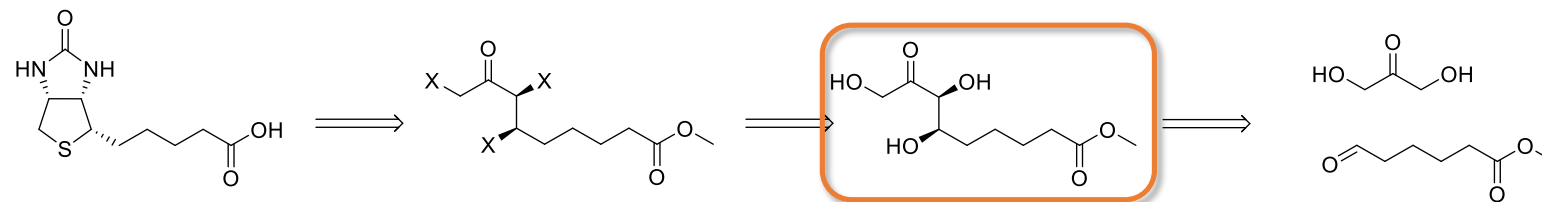


## Synthèse asymétrique chemoenzymatique

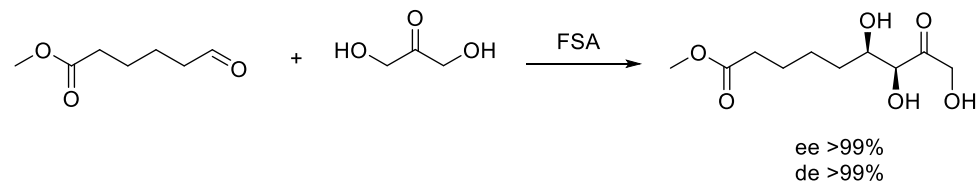
Intermédiaire chiral : introduction chiralité par biocatalyse.

Synthèse de la (+)-biotine à partir de la dihydroxyacétone (DSM).

Rétrosynthèse.



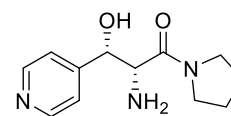
Réaction d'aldolisation : fructose-6-phosphate aldolase (FSA)



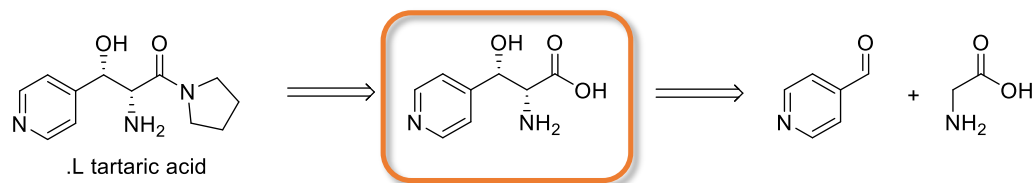
## Synthèse asymétrique chemoenzymatique

Synthèse d'amino alcool chiral en une étape (Bristol-Myers Squibb).

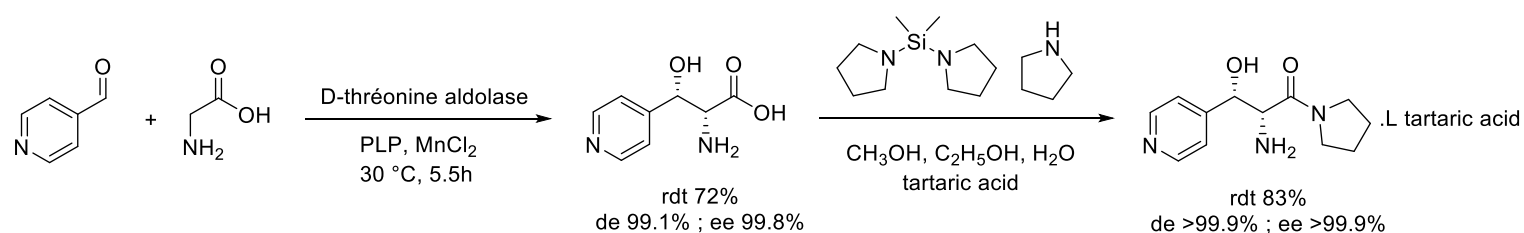
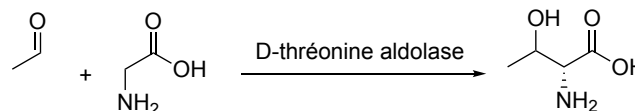
Tartrate de  $\beta$ -hydroxyamino amide.



.L tartaric acid



Réaction d'aldolisation catalysée par la thréonine aldolase :



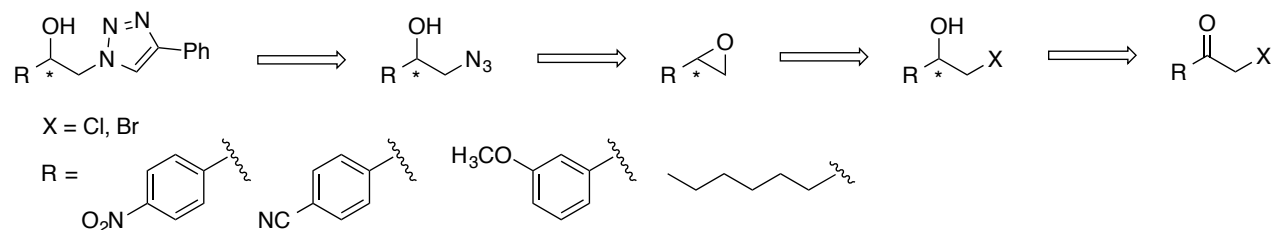
Procédé initial en 5 étapes, rdt global 25%.

Synthèse chemoenzymatique en 2 étapes, rendement doublé.

## Synthèse chemoenzymatique asymétrique multi-étapes

Synthèse de  $\beta$ -hydroxytriazoles :  
étude de cascades multi-catalytique.

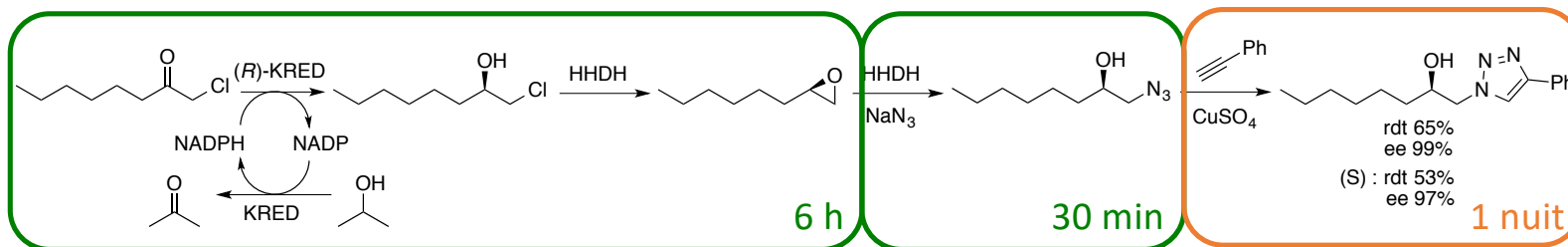
Rétrosynthèse.



biocatalyse

chimie « clic »

W. Szymanski et al. *Adv.Syn.Catal.* **2010**, 352, 2111-2115.



Cellules entières ou lyophilisées ; réaction monotope.

KRED : cétoréductase, recombinante, *Thermoanaerobacter* sp.  
HDDH : halohydrine déhalogénase, recombinante,  
*Agrobacterium radiobacter*

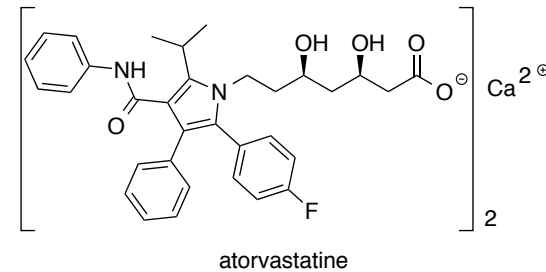
} surexpression dans le  
même hôte



## Synthèse chemoenzymatique asymétrique multi-étapes

Étude des cétoréductases (KRED) et autres enzymes pour l'obtention d'intermédiaires chiraux dans les voies de synthèse de produits pharmaceutiques.

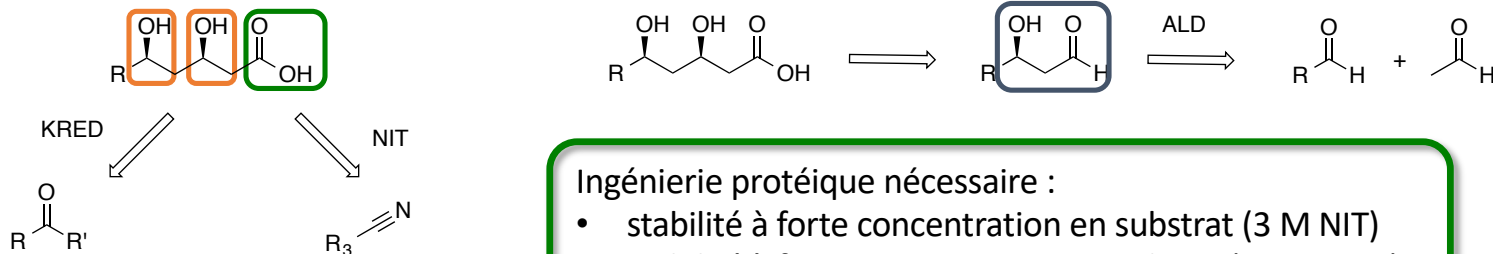
Exemple de l'atorvastatine :  
principe actif du Lipitor (anti cholestérol), vente globale 11 900 000 000 \$ en 2010.



Sept approches enzymatiques différentes ont été développées :

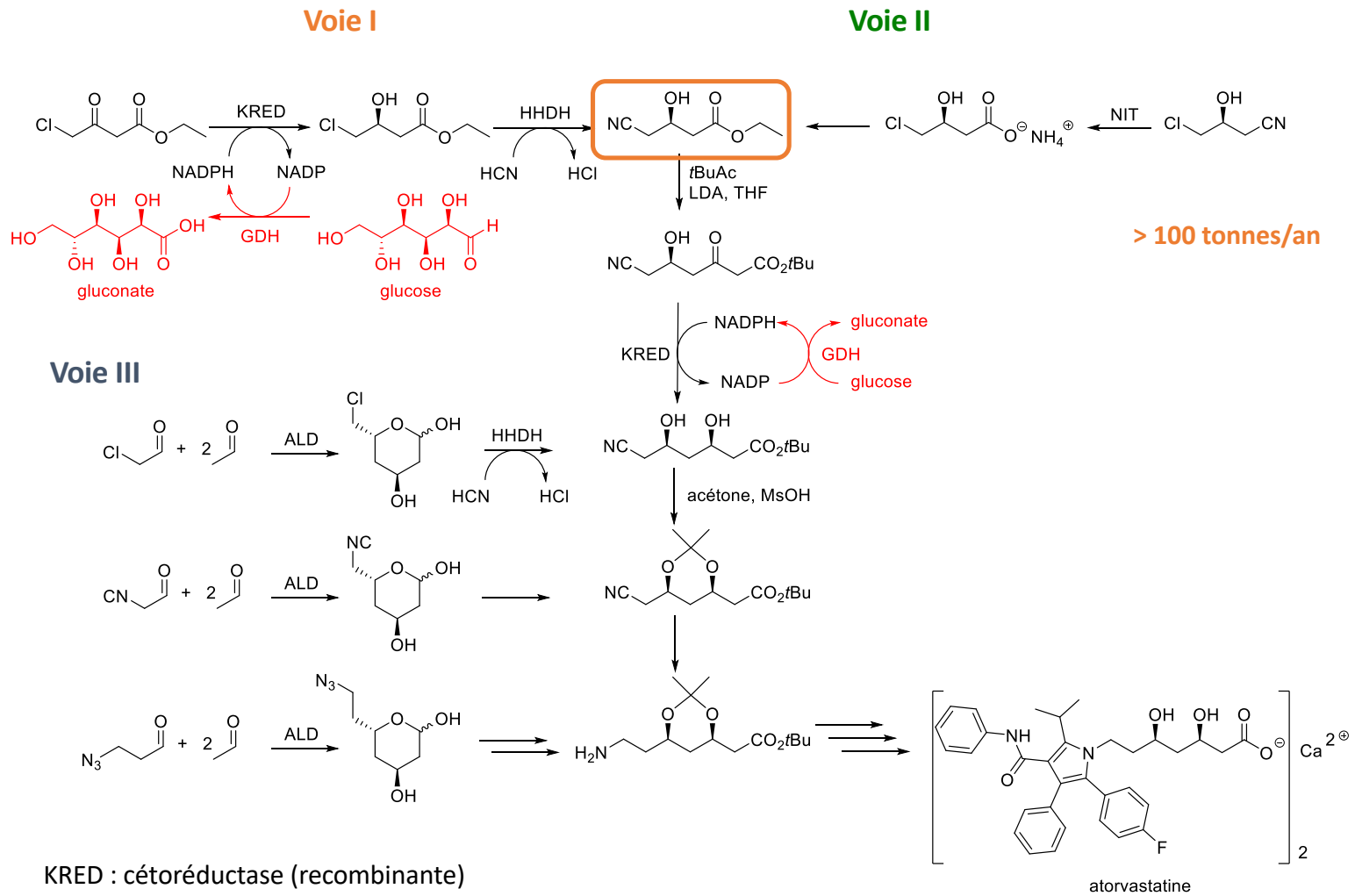
- choix de l'enzyme et produit de départ
- nature du produit obtenu : matière première avec un centre chiral ou intermédiaire avancé avec deux centres chiraux.

## Rétrosynthèse



Ingénierie protéique nécessaire :

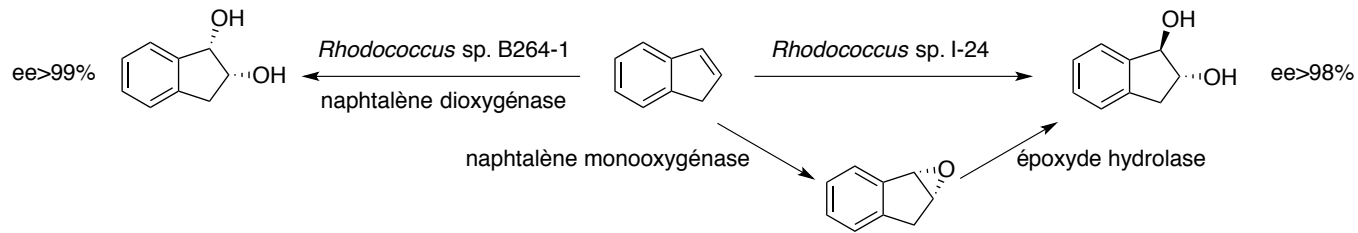
- stabilité à forte concentration en substrat (3 M NIT)
- stabilité à forte concentration en solvant (20% KRED)



## Synthèse par réactions en cascade : synthèse asymétrique multi-étapes

Synthèse de diols vicinaux chiraux.

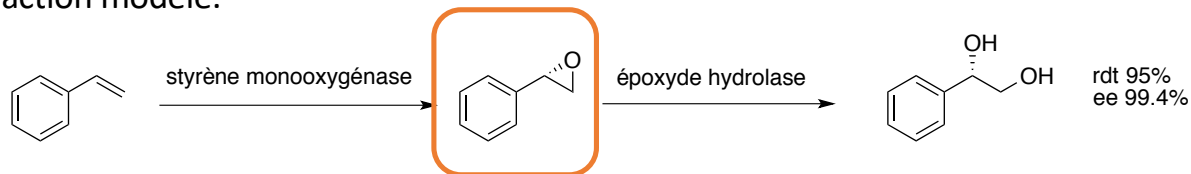
Par fermentation.



M. Chartrain et al. *J.Ferm.Bioeng.* **1998**, 86, 550-558.

Par réaction biocatalytique en tandem.

Réaction modèle.

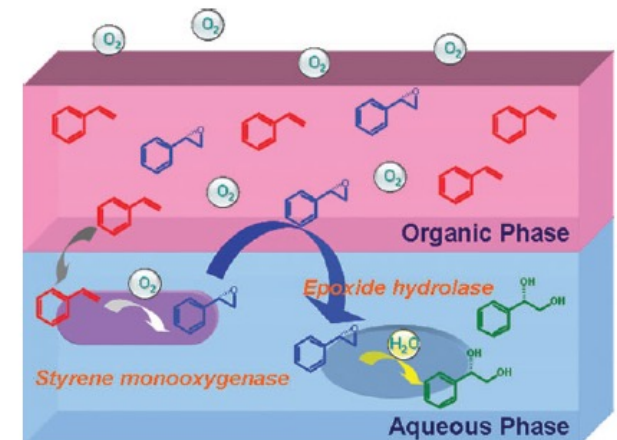


SMO : *E. coli*, recombinante, cellule entière.

EH : *Sphingomonas* sp. extrait cellulaire.

Hydrolyse spontanée en milieu aqueux.

Procédé bi-phasique.

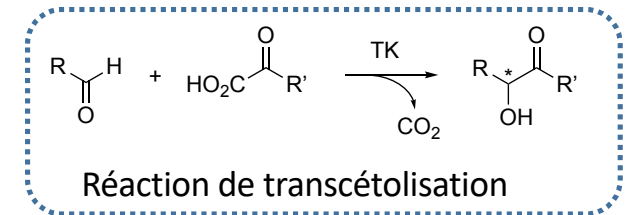
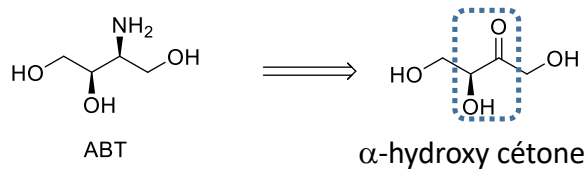
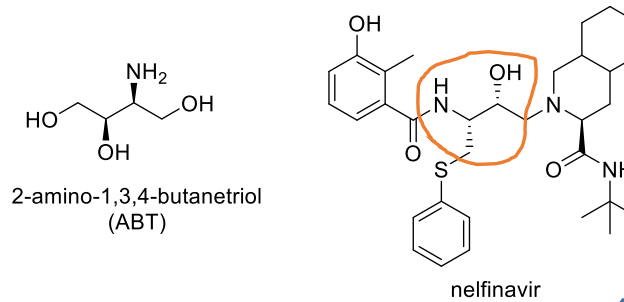


Y. Xu et al. *Chem.Comm.* **2009**, 1481-1483.

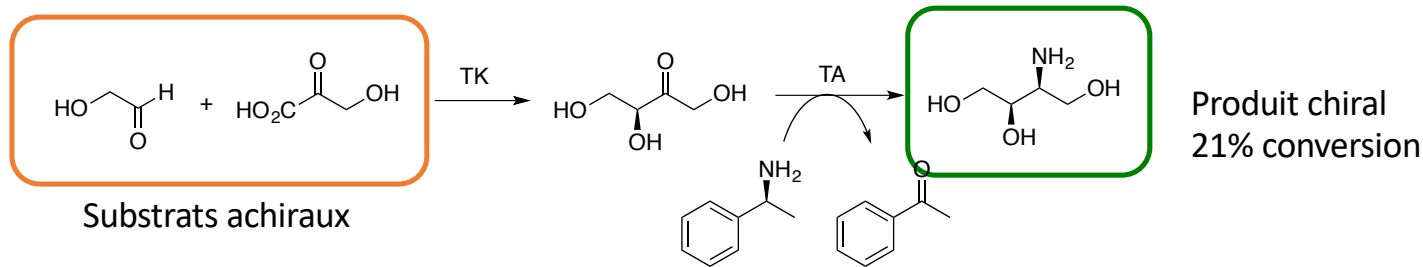
## Synthèse par réactions en cascade

Synthèse d'amino alcools chiraux.

Exemple de l'ABT, molécule plateforme.



Introduction centres chiraux en deux étapes : transcétolisation puis transamination.



TK : transcétolase *E. coli*, recombinante (activité métabolique)

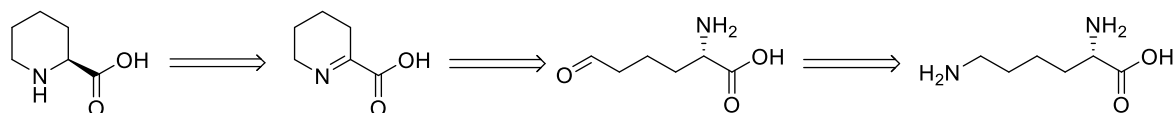
TA : transaminase *Pseudomonas aeruginosa*, recombinante

} surexpression dans le même hôte

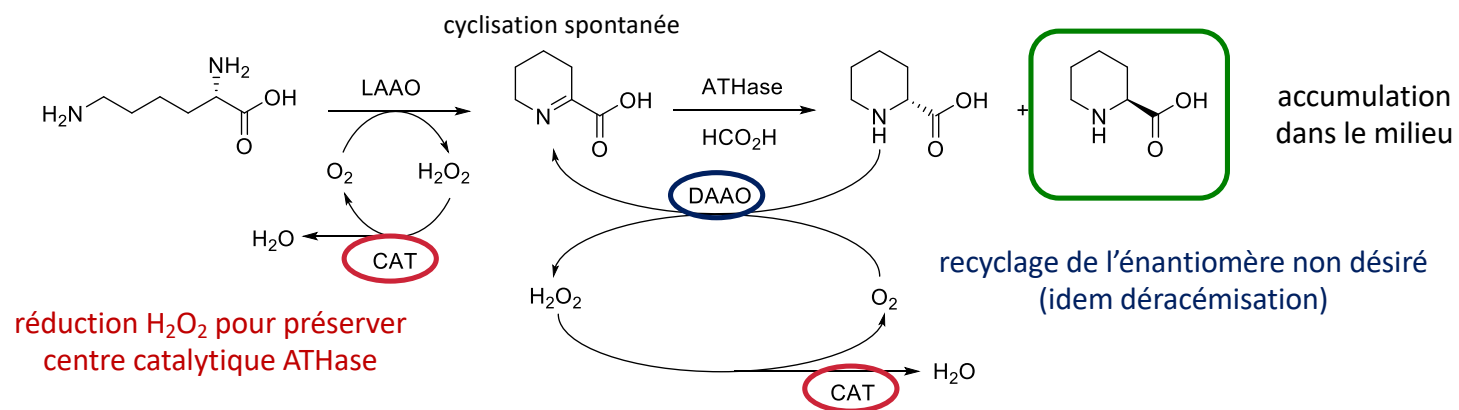
Cellule entière ou lysat cellulaire.

## Synthèse par réactions en cascade

Synthèse de l'acide pipécolique, aa naturel non protéinogène.



NB : idem voie de biosynthèse métabolites secondaires de plantes, type alcaloïdes.



LAAO : L-amino acid oxidase

DAAO : D- amino acid oxidase

ATHase : artificial transfer-hydrogenase

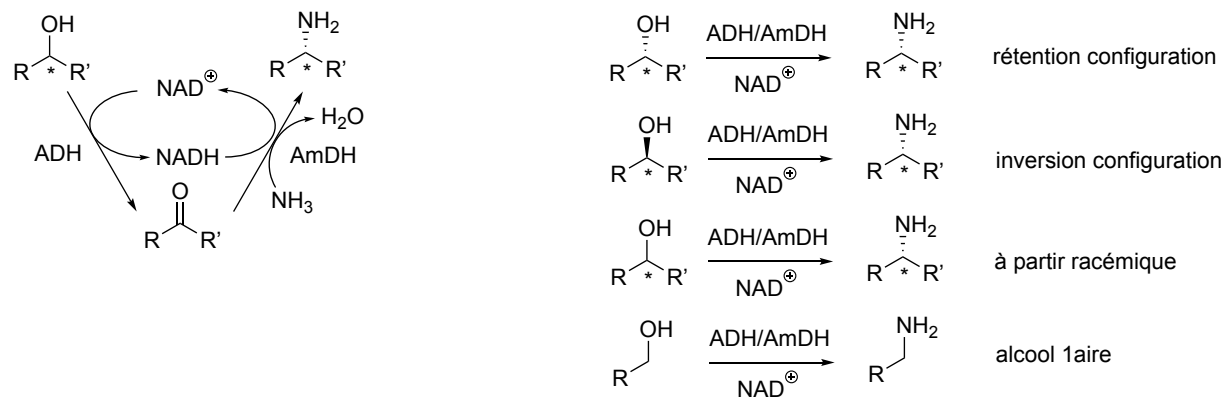
CAT : catalase.

conversion : 88%

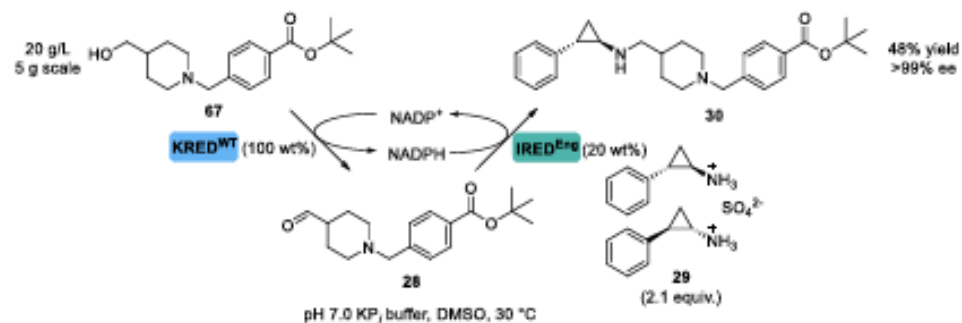
ee : 86% (S)

## Synthèse par réactions en cascade : cascade redox neutre par réactions avec emprunt d'hydrogène

Transformation d'alcool en amine chirale



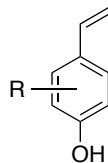
Scheme 30. Enzymatic KRED-IRED Hydrogen Borrowing Cascade Synthesis of an Intermediate for the LSD1 Inhibitor GSK2879552 (XII)<sup>54</sup>



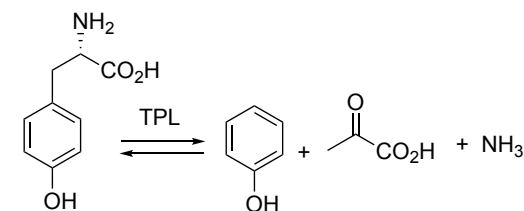
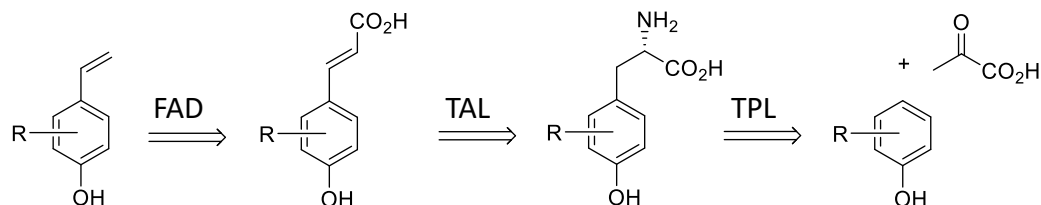
## Synthèse par réactions en cascade

Synthèse de vinylarènes.

Précurseurs de polymères et en chimie fine.



Rétrosynthèse.

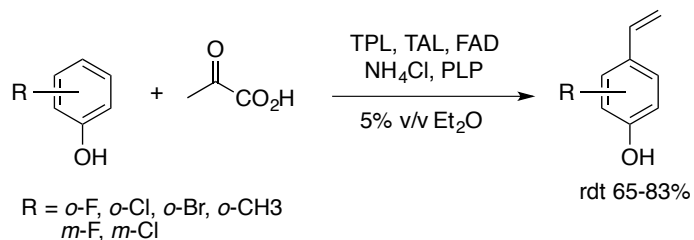


TPL : tyrosine phenol lyase, PLP dépendante, recombinante *Citrobacter freundii*

TAL : tyrosine ammonia lyase, recombinante, *Rhodobacter sphaeroides*

FAD : ferulic acid decarboxylase, recombinante, *Enterobacter* sp.

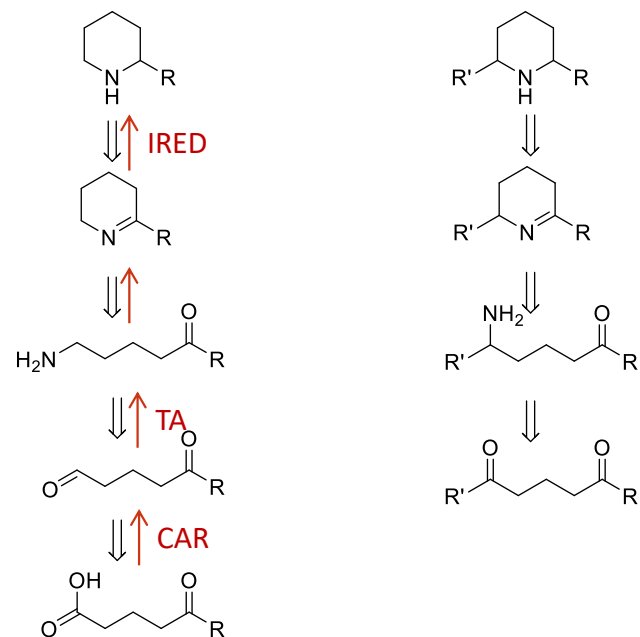
tyrosine phenol lyase, enzyme à PLP  
<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/m-csa/entry/933/>



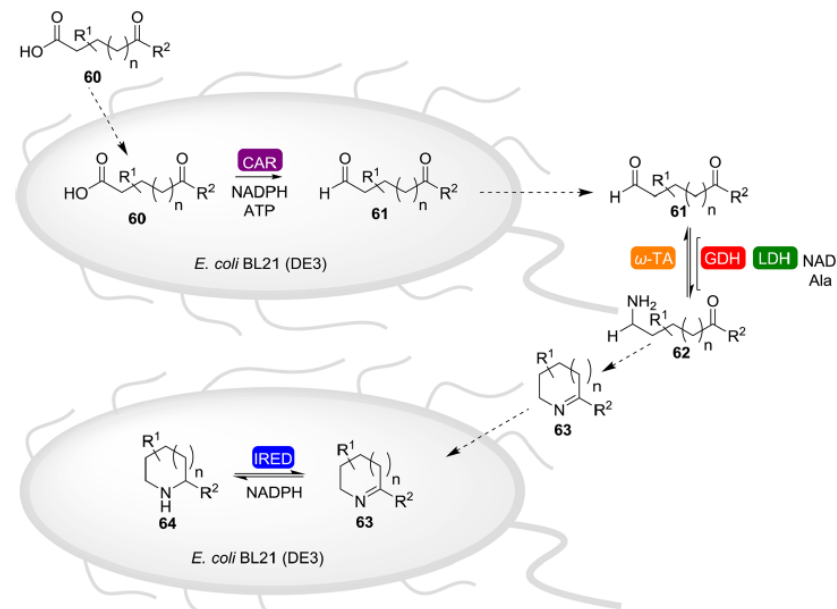
## Synthèse par réactions en cascade

Cascades « hybrides » *in vivo* et *in vitro*.

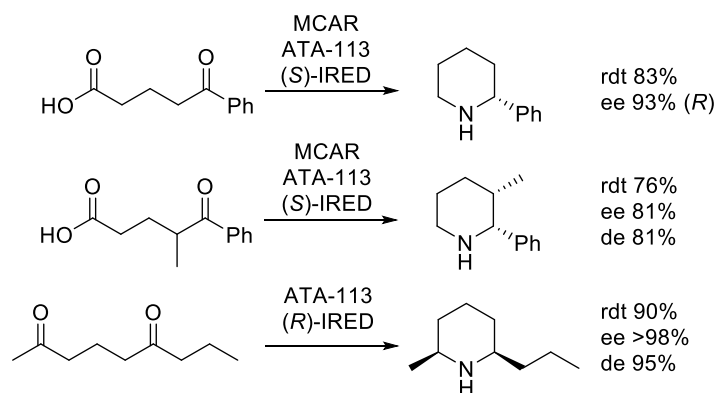
Synthèse de piperidines et pyrrolidines substituées.



CAR : carboxylic acid reductase  
 TA : transaminase  
 IRED : imine reductase



R<sup>1</sup> = H, Me  
 R<sup>2</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 4-F-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-Me-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 2-thienyl  
 n = 0, 1

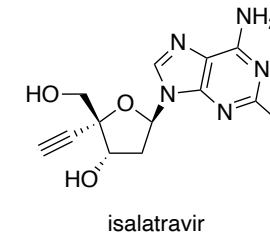


MCAR : *Mycobacterium marinum*  
 ATA-113 : commerciale  
 IRED : *Streptomyces sp.*



## Synthèse par réactions en cascade

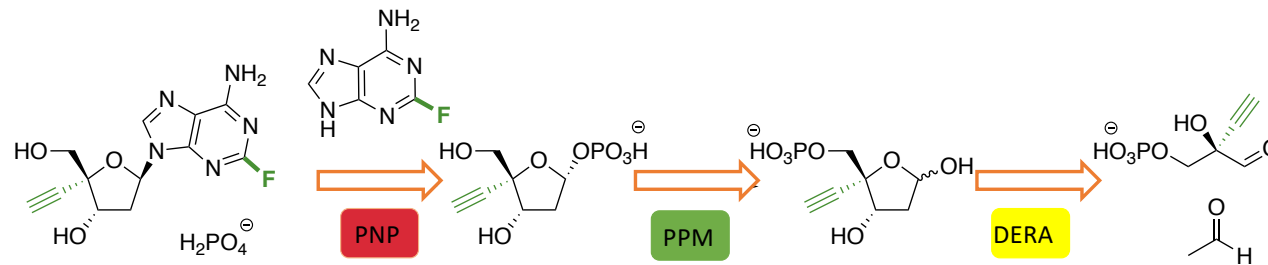
Cascade *in vitro* pour la synthèse d'un analogue de nucléoside inhibiteur de la translocation de la transcriptase inverse, traitement HIV (Merck).



Problèmes de la voie de synthèse :

- nécessité d'avoir des étapes de protection/ déprotection
- contrôle de l'anométrie sur le 2'-deoxyribonucléotide.

Voie de dégradation des nucléosides : inspiration pour rétrosynthèse

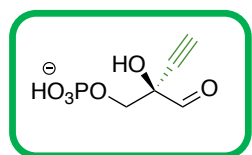


éléments structuraux non naturels

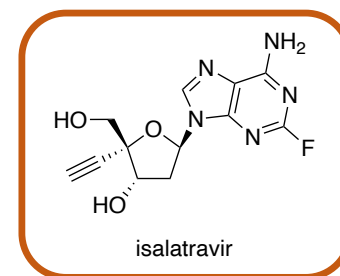
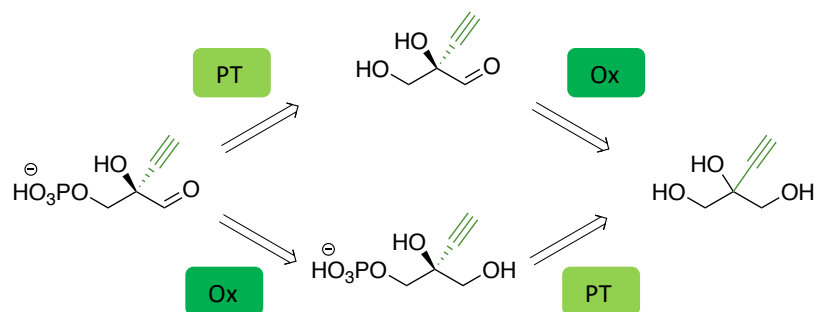
PNP : purine nucléoside phosphorylase ; PPM : phosphopentomutase ; DERA : deoxyribose 5-phosphate aldolase



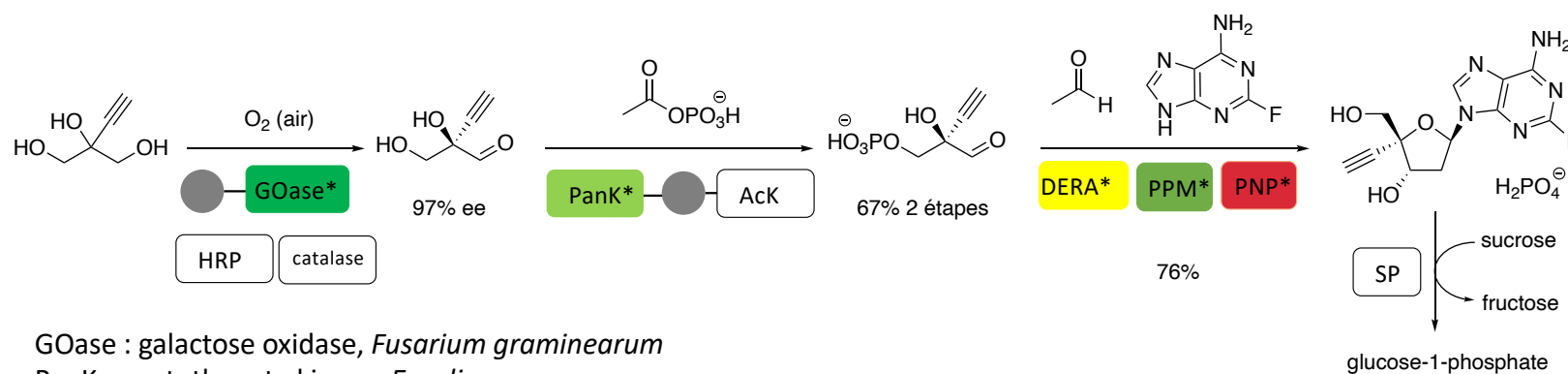
Faisabilité de l'approche testée en voie inverse sur islatravir.



cible



islatravir



GOase : galactose oxidase, *Fusarium graminearum*

PanK : pantothenate kinase, *E. coli*

DERA : deoxyribose 5-P aldolase, *Shewanella halifaxensis*

PPM : phosphopentomutase, *E. coli*

PNP : purine nucleoside phosphorylase, *E. coli*

\* : enzyme évoluée

HRP : horseradish peroxidase

Catalase : *Bos taurus*

AcK : acetate kinase, *Thermotoga maritima*

SP : sucrose phosphorylase, *Alloscardovia omnicolens*

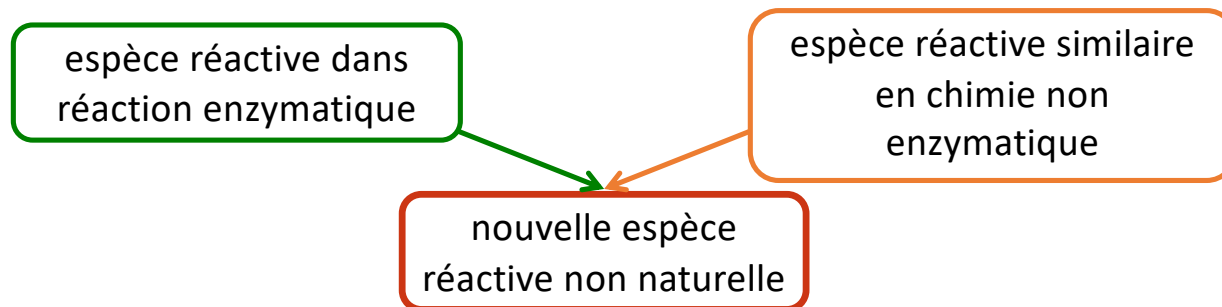
Rendement total : 51% à partir d'un building block achiral.

Economie d'atomes + nombre d'étapes inférieur (plus de la moitié) + conditions douces aqueuses sans isolement des intermédiaires.

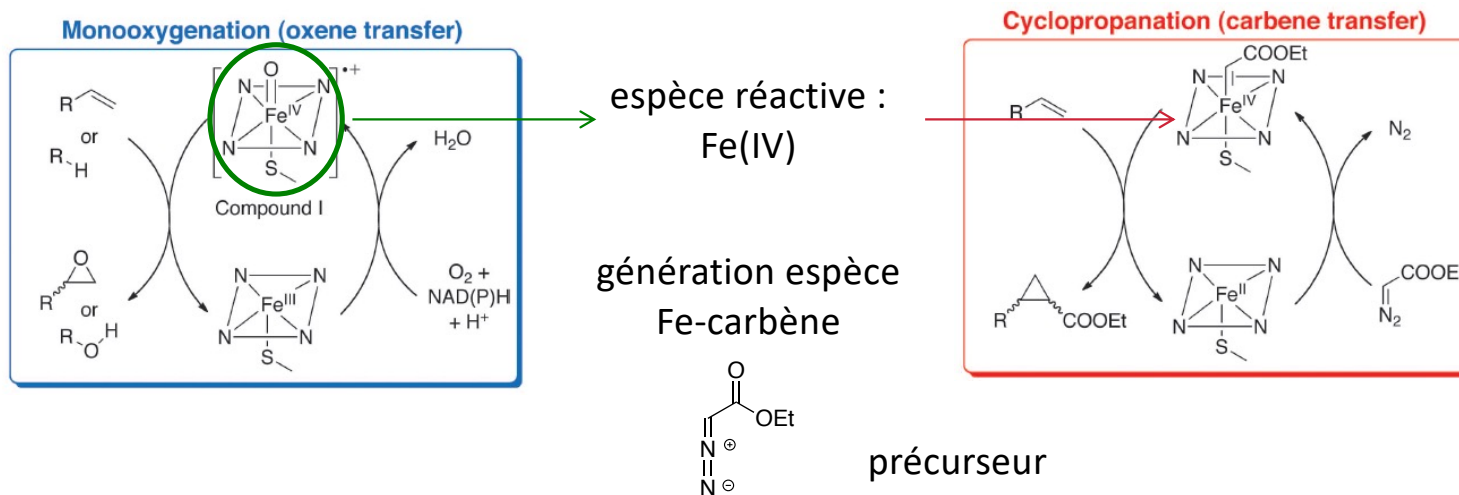
## Réactions enzymatiques non-naturelles : adaptation d'enzymes existantes

Concept basé sur triple partenariat : la nature apporte les enzymes, la chimie propose des modes d'activité innovants avec des substrats non biologiques et l'ingénierie protéique développe de nouveaux outils et algorithmes pour régler la fonction enzymatique et l'améliorer.

D. C. Miller *et al.* *NatSynthesis* **2022**, 1, 18-23



### Exemple de la cyclopropanation

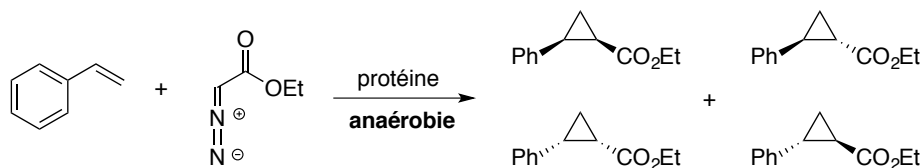


Frances Arnold



P.S. Coelho *et al.* *Science* **2013**, 339, 307-310

Réaction test :



HRP : peroxydase

Mb : myoglobine

CytC : cytochrome C

P450<sub>BM3</sub> : CYP450 *Bacillus megatorium*.

protéines à fer

Catalyseur	cis:trans
HRP	7:93
CytC	6:94
Mb	6:94
P450 <sub>BM3</sub>	37:63
<i>Hemine*</i>	6:94

\*: Fer-porphyrine

Essais de différents variants de P450<sub>BM3</sub>:

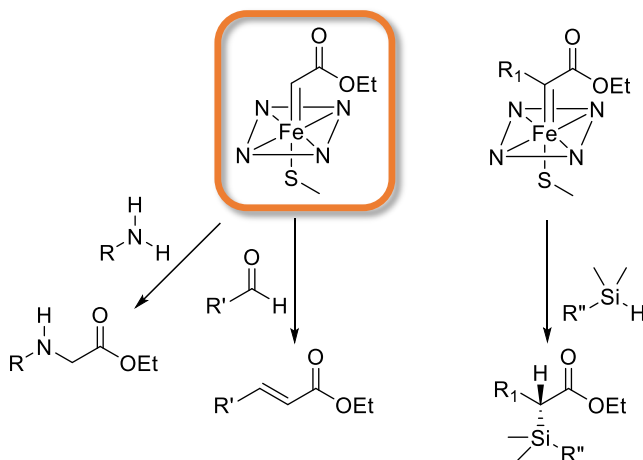
P450 <sub>BM3</sub> variant	rdt	cis:trans	ee cis%	ee trans%
P450 <sub>BM3</sub>	1%	6:94	-27	-2
variant1	65%	1:99	-15	-96
variant 2	59%	16:84	-41	-63
variant 3	59%	92:8	-97	-66

Adaptation d'enzymes existantes pour la catalyse de réactions non naturelles.

Autres réactions ?

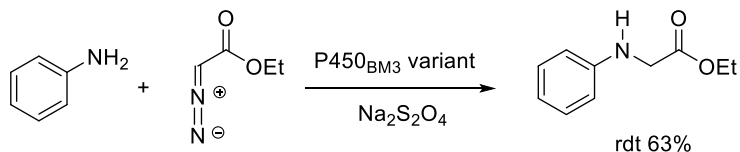
insertion N-H

oléfination carbonyle



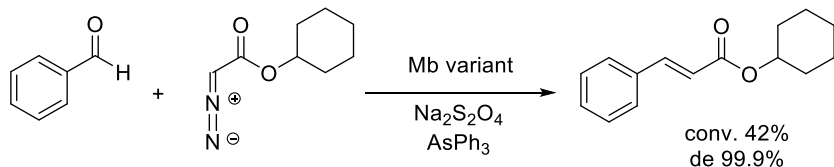
insertion Si  
C-Si formation

• Insertion N-H.



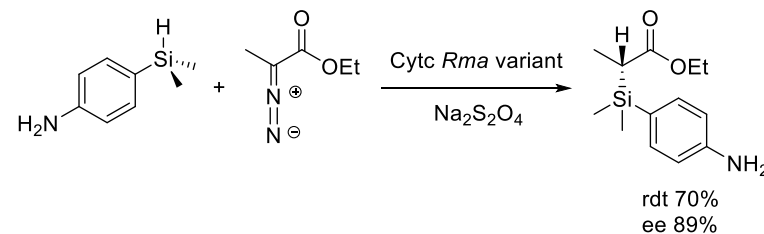
Variant de CYP450 *Bacillus megatorium*.

• Oléfination carbonyle.



Variant de myoglobine de sperme de baleine.

• Insertion Si.



Z.J. Wang *et al. Chem. Sci.* **2014**, 5, 598-601 ●

V. Tyagi, R. Fasan *Ang. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 2512-2516

S.B.J. Kan *et al Science.* **2016**, 354, 1048-1051 ●

Pour une revue sur les réactions non naturelles catalysées par des métalloenzymes,  
voir : T.K. Hyster, T.R. Ward *Ang. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 7344-7357.

Pour une revue sur l'extension de l'utilisation des Fer-dpt monooxygénases,  
voir : N. P. Dunham, F. H. Arnold *ACS Catal.* **2020**, 10, 12239-12255.