



Diseño y Síntesis de Inhibidores Enzimáticos

Trabajo presentado por MSc. Verónica Martínez para aspirar al título de
Doctor en Química

Director de Tesis: Dra. Graciela Mahler

Co-Director de Tesis: Dr. Danilo Davyt

Tribunal:

Dra. Virginia López

Dra. Mariana Pazos

Dra. Lucía Gandolfi

Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica,
Facultad de Química, UdelaR.

Octubre 2021

Agradecimientos

A mis directores de tesis Graciela y Danilo, por guiarme en este camino. Gracias por darme la oportunidad, por confiar en mi, y sobre todo gracias por todos los conocimientos compartidos a lo largo de estos años.

A mis compañeros del laboratorio de Química farmacéutica a los cuales siento como amigos y familia.

A Ceci y Guillo con los cuales comparto desde mis inicios en el lab, por todos los momentos y las charlas compartidas, por estar siempre dispuestos a escucharme y alentarme siempre a a dar lo mejor de mi.

A Valentina y Laura P. por ser tan buenas compañeras, por estar dispuestas siempre a darme una mano y por las charlas y las risas compartidas.

Al Chelo por ser buen compañero, porque siempre está de buen humor y por hacernos reír a todos con sus ocurrencias. Gracias también por ser un buen vecino y por los asados compartidos.

A Franco, Martín, Natalia, Camila, Magdalena que son los más jóvenes y son los que llenan de energía positiva el laboratorio.

A Gloria y Laurita por estar siempre dispuestas a escuchar y aportar desde sus experiencias.

A mi madre que nos ha enseñado con el ejemplo a que no hay que rendirse nunca y que debemos luchar siempre por nuestros sueños.

A mi hermana por ser mi mejor amiga y por estar siempre que la necesito.

A Leo por ser mi compañero de vida, por su amor incondicional y siempre apoyarme en mis proyectos.

Especialmente a Sofi por que desde que llego al mundo es el motor de mi vida y es la que me impulsa a ser mejor persona cada día.

A los colaboradores que hicieron posible este trabajo de tesis:

Dra. Ana Bellomo, Laboratorio de Síntesis Orgánica, Dpto. de Ingredientes Activos y Biorrefinerías (edificio 38) - Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), por recibirme y compartir sus conocimientos sobre HTE.

Horacio Pezaroglo y Gonzalo Hernandez, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, FQ, UdelaR por los espectros de RMN

Alejandro Peixoto y Leopoldo Suescun Laboratorio de Cristalografía, Estado Sólido y Materiales, DETEMA, FQ, UdelaR por los Rayos X.

Prof. Alejandro Vila y Lic. Agustina Rossi, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario-Argentina (IBR-CONICET), por los ensayos de inhibición enzimática.

Prof. James Spencer y su grupo de trabajo, School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol-UK, por la cristalografía de los complejos enzima-inhibidor.

Prof. Roberto Bonomo y Dra. Maria Mojica, Research Service, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, and Departments of Pharmacology, Biochemistry, Microbiology, and Molecular Biology, Case Western Reserve University, Cleveland-USA, por los ensayos de CMI.

A las agencias que financiaron este trabajo:

Agencia Nacional de Investigación e Innovación ANII, por la beca de doctorado (POS_FMV_2015_4_1005275)

Comisión académica de Posgrado CAP, por la beca de finalización de doctorado

Comisión Sectorial de Investigación Científica CSIC, por un proyecto CSIC iniciación 2019 (S2021INIC2019)

Abreviaturas:

δ : desplazamiento químico

2-MMT: 2-mercaptometil tiazolidina

2MMBT: 2-mercaptometil bistiazolidina

AB: Antibióticos

A β L: Antibióticos β -lactámicos

AcOEt: Acetato de Etilo

AcOH: Ácido Acético

cat: catalizador

Cys: Cisteína

CyA.HCl: Cisteamina Clorhidrato

¹³C-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de carbono

DCC: dicyclohexylcarbodiimide

DCM: Diclorometano

EtOH: Etanol

eq: equivalente

h: hora

HATU: hexafluorofosfato del N-óxido de N-[(dimetalamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridino-1-ilmetilen]-N-metilmetanaminio

Hex: Hexano

HOBt: N-hidroxibenzotriazol

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

¹H-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de protón

NaSH: Sulfuro ácido de sodio

[MH]⁺: ión molecular

m/z: relación masa/carga

MeOH: Metanol

min: minutos

2-MMBT: 2- Mercaptometil bistiazolidina

2-MMT: 2-Mercaptometil tiazolidina

MW: microondas

PNA: Penicilamina

ppm: partes por millón

p-TsOH: Ácido *para*-Toluensulfónico

s: singulete

Ser: Serina

t: triplete

TA: Temperatura ambiente

TFA: Ácido Trifluoro acético

TFE: Trifluoro etanol

Thr: Treonina

TIS: Triisopropil silano

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 INTRODUCCIÓN	3
1.2 ANTECEDENTES	21

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34

CAPÍTULO 3: DISEÑO Y SÍNTESIS DE 2-MERCAPTOMETIL TIAZOLIDINAS Y ANÁLOGOS COMO INHIBIDORES DE M β L

3.1 ANTECEDENTES	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.4 CONCLUSIONES	78
3.5 PERSPECTIVAS.....	81
BIBLIOGRAFÍA	82

CAPITULO 4: DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS A 2-MERCAPTOMETIL BISTIAZOLIDINAS

4.1 ANTECEDENTES.....	87
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	88
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
4.4 CONCLUSIONES.....	128
4.5 PERSPECTIVAS	130
BIBLIOGRAFÍA.....	131

CAPÍTULO 5: SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE PRODROGAS DERIVADAS DE 2-MERCAPTOMETIL BISTIAZOLIDINAS

5.1. INTRODUCCIÓN.....	136
5.2. ANTECEDENTES.....	140
5.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	142
5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	142
5.5. CONCLUSIONES.....	160
5.6. PERSPECTIVAS	161
BIBLIOGRAFÍA.....	163

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

6.1. CONCLUSIONES GENERALES	169
6.1.1. HETEROCICLOS 2-MERCAPTOMETIL TIAZOLIDINAS	169
6.1.2. HETEROCICLOS 2-MERCAPTOMETIL BISTIAZOLIDINAS	172
6.1.3. PRODROGAS	174

CAPÍTULO 7: PARTE EXPERIMENTAL

7.1. CONSIDERACIONES GENERALES	179
7.2. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS TIAZOLIDINAS	180
7.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS BISTIAZOLIDINAS	190
7.4. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS PRODROGAS	201
7.5. MÉTODOS EXPERIMENTALES	204
7.6. ESPECTROSCOPÍA DE ^1H Y ^{13}C -RMN DE PRODUCTOS SELECCIONADOS	215

CAPÍTULO 8: ANEXO

ANEXO	242
-------------	-----

Capítulo 1

Introducción y Antecedentes

1.1. Introducción:

1.1.1. Resistencia bacteriana: un problema de salud pública

Los antibióticos (AB) han sido la herramienta más importante usada en la práctica clínica para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Sin embargo, el uso generalizado de AB ha llevado a una presión selectiva de cepas bacterianas resistentes (bacterias con capacidad para resistir a los efectos de los AB) amenazando la eficacia de estos fármacos. La resistencia bacteriana a los AB ha aumentado en los últimos años a un ritmo alarmante resultando en una emergencia de seguridad sanitaria a nivel mundial. Como consecuencia los regímenes de tratamiento de las enfermedades infecciosas actuales no son eficaces, provocando estancias hospitalarias prolongadas, incremento de los costos médicos y aumento de la mortalidad^{1,2}.

La resistencia a los AB puede ocurrir como un proceso de selección natural de la evolución y genética bacteriana, dado que las bacterias como todo ser vivo, exhibe mecanismos biológicos que les permiten adecuarse a los cambios ambientales. No obstante, existen algunos factores que contribuyen al aumento de la expresión y diseminación de esta característica intrínseca. El uso indiscriminado e irresponsable de AB tanto con fines terapéuticos como profilácticos en industrias agrícolas y ganaderas ha sido la principal causa del aumento de cepas bacterianas resistentes. El uso cada vez mayor de AB en la alimentación de animales de granja como promotores del crecimiento, ha aumentado la resistencia a los AB, por lo que la cadena alimenticia puede considerarse como la principal vía de transmisión de bacterias resistentes entre poblaciones animales y humanas^{3,4}.

1.1.2. Antibióticos β -lactámicos

El desarrollo de los antibióticos β -lactámicos (A β L) surgió dado el éxito que se observó en el tratamiento de enfermedades infecciosas con la incorporación del uso clínico de la Penicilina. Hoy a más de 70 años del primer betalactámico, esta familia de fármacos son los antibióticos más prescritos tanto en atención primaria como hospitalaria⁵. La característica estructural común en los A β L es la presencia de un anillo β -lactama de 4 miembros altamente reactivo y un grupo ácido carboxílico, ver Figura 1.

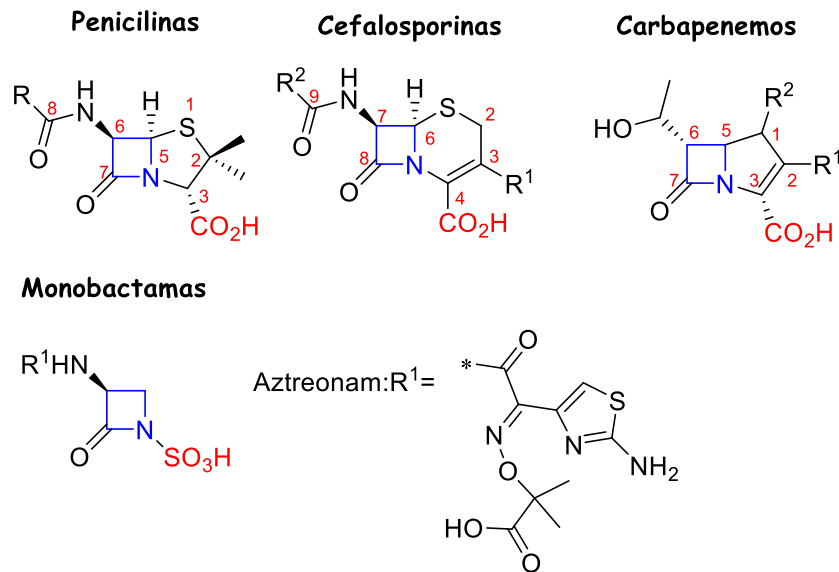


Figura 1. Estructura química de las cuatro clases de antibióticos betalactámicos: Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemos y Monobactamas. El anillo β -lactama se representa en azul y los grupos ácido carboxílico y ácido sulfónico en rojo.

En la actualidad hay cuatro clases principales de A β L que se utilizan en clínica, y se dividen según su estructura química, Figura 1. Las penicilinas presentan el anillo β -lactámico unido a un anillo tiazolidina de cinco miembros. Las cefalosporinas tienen un anillo de dihidrotiazina de seis miembros fusionado al anillo β -lactama. Los derivados de la cefalosporina con diversos sustituyentes en R¹ y R² en la posición C3 y C9, se clasifican en cinco generaciones según su actividad antimicrobiana⁶. Los carbapenemos son la última generación de A β L y presentan el anillo β -lactámico fusionado a un anillo de cinco miembros sin heteroátomos y con un doble enlace en C2-C3. Son compuestos de gran relevancia clínica dado que cubren un amplio espectro bacteriano, presentan buena tolerancia y baja resistencia comparado con penicilinas y cefalosporinas. Por estos motivos, los carbapenemos se reservan como tratamientos de último recurso para infecciones bacterianas resistentes⁷. En cuanto a los compuestos monocíclicos monobactamas, el anillo β -lactámico está N-sustituido por un ácido sulfónico y en la clínica se usa sólo el derivado aztreonam^{8,9}.

- *Mecanismo de acción de A β L y Mecanismos de resistencia bacteriana*

La actividad antibacteriana de los A β L tiene su efecto al inhibir la enzima llamada proteína de anclaje a penicilinas (PBP por su sigla en inglés) la cual es una transpeptidasa implicada en la síntesis de la pared celular bacteriana, Figura 2-A. La pared celular está compuesta por unidades alternadas de ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG). Un pentapeptido se une a cada unidad NAM, y la reticulación de dos pentapéptidos D-alanina-D-alanina NAM catalizada por la enzima PBP le confiere rigidez a la pared celular. La similitud del resto D-alanina-D-alanina del pentapéptido NAM con los grupos amida del anillo β -lactámico y el carboxilato adyacente que imitan el enlace peptídico y el carboxilato terminal de D-alanina-D-alanina respectivamente, hace que el residuo serina nucleofílico de las PBP reconozca erróneamente como bloque de construcción el anillo β -lactama. Esto produce la acilación irreversible de la enzima, (Figura 2-C), por lo cual no puede catalizar más reacciones de transpeptidación y causa la lisis celular^{10, 11,12}.

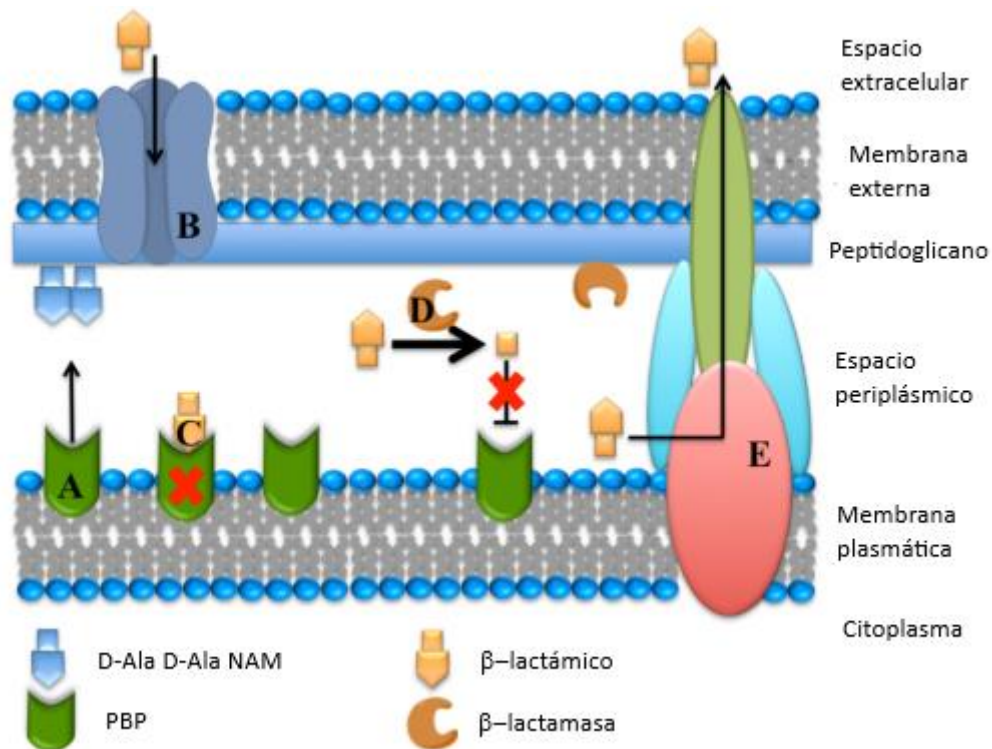


Figura 2. Representación esquemática de la membrana bacteriana de Gram (-), incluyendo la interacción de antibióticos β -lactámicos y β -lactamasas⁹. **A:** Las PBP con actividad transpeptidasa están involucradas en la biosíntesis de la pared celular catalizando la reticulación de péptidos adyacentes en la porción terminal D-Ala-D-Ala. **B:** Los β -Lactámicos entran en el espacio periplásmico a través de porinas. **C:** Los β -lactámicos inhiben covalentemente las transpeptidasas imitando los sustratos, pero dando lugar a un aducto de éster covalente inhibitorio de larga duración. **D:** Las β -lactamasas se exportan al periplasma e hidrolizan catalíticamente los antibióticos β -lactámicos a productos que ya no inhiben las transpeptidasas. **E:** Las bacterias también pueden evitar la acción de los antibióticos transportándolos activamente al medio ambiente externo a través de bombas de eflujo

Las bacterias han desarrollado tres mecanismos distintos de resistencia a los A β L^{6,13}:

- 1) Modificación del sitio activo de las PBP como disminución o pérdida de la afinidad¹⁴ dificultando la unión de estas enzimas a los A β L lo que disminuye su actividad.
- 2) Bombas de eflujo: son capaces de exportar una amplia gama de sustratos desde el periplasma al entorno circundante, Figura 2-E. Estas bombas son importantes en la resistencia intrínseca a múltiples fármacos incluidos los A β L de muchos patógenos gramnegativos (Gram (-))¹⁵.
- 3) Producción de enzimas β -lactamasas: es el principal mecanismo de resistencia frente a los A β L, especialmente en Gram (-), aunque también pueden producirlas grampositivos y anaerobios, Figura 2-D.

1.1.3 β -lactamasas clasificación

Las β -lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico inactivando el fármaco antes de su unión con las PBP. La producción de estas enzimas puede estar mediada por plásmidos o puede estar cromosómicamente codificada. Según la clasificación molecular de Ambler en base a los residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo, las β -lactamasas se dividen en cuatro clases (A, B, C y D), Figura 3. Las enzimas de clase A, C y D se denominan serina- β -lactamasas (S β L) debido a que presentan un residuo serina nucleofílico en su sitio activo. Las β -lactamasas de clase B son las metalo- β -lactamasas (M β L) que abarca un grupo heterogéneo de enzimas dependientes de uno o dos iones zinc en el sitio activo¹⁶.

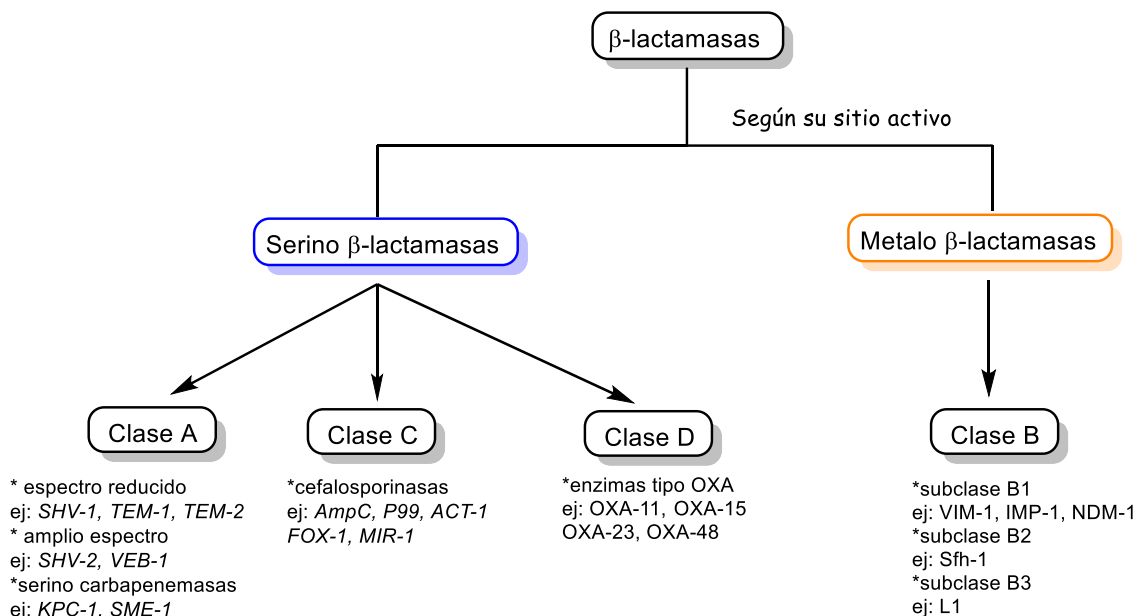


Figura 3. Sistema de clasificación de Ambler de β -lactamasas.

1.1.4. Metallo- β -lactamasas (M β Ls)

Las enzimas M β Ls se dividen a su vez en tres subclases B1, B2 y B3, las cuales se diferencian no sólo en su alto grado de diversidad de secuencias aminoacídicas, sino también en el número de iones zinc (Zn^{+2}) y los aminoácidos que coordinan con dichos iones en el sitio activo. Cada subclase posee además varios tipos diferentes de enzimas con una variante de al menos un 30% en la diversidad de aminoácidos. Todas las M β Ls tienen como característico en su estructura un sándwich $\alpha\beta/\beta\alpha$, con dos láminas

centrales de β y cinco hélices de α expuestas al solvente. El centro metálico en el sitio activo está ubicado en una ranura delimitada por la interfaz de dos dominios, Figura 4¹⁷.

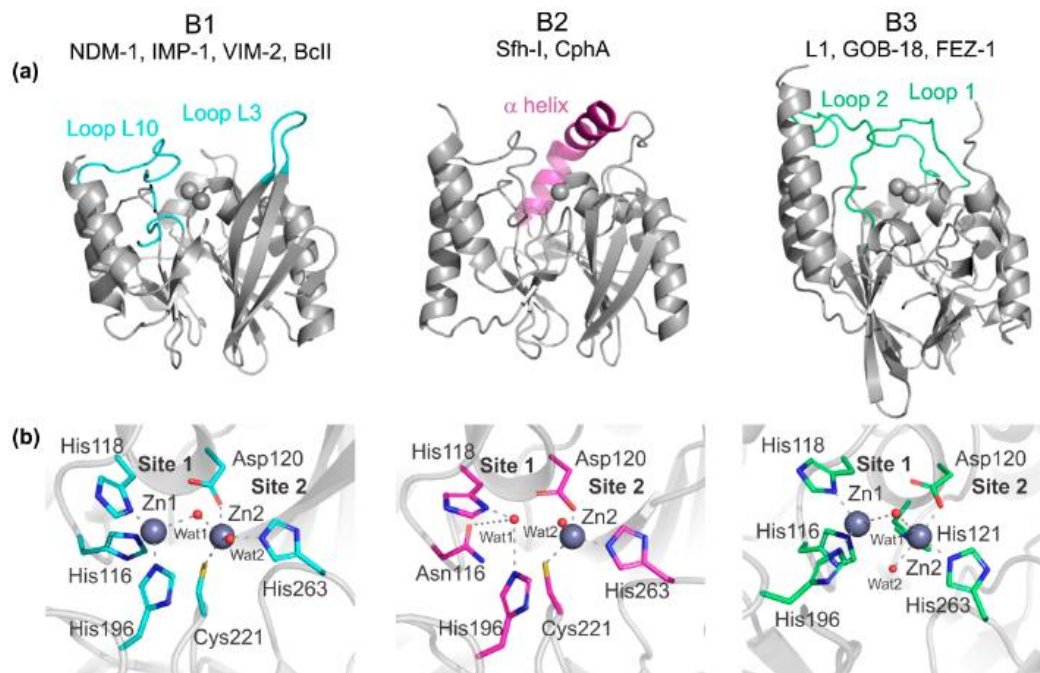


Figura 4. Representación de las estructuras de las tres subclases de M β Ls¹⁸: B1 NDM-1 (PDB 3spu), B2 Sfh-I (PDB 3sd9) y B3 L1 (PDB 1sml). a) Estructuras proteicas generales. Los bucles y las hélices implicadas en las interacciones del sustrato. b) Sitios activos. Los iones Zn(II) se muestran como esferas grises y las moléculas de agua/OH como esferas rojas. Las interacciones Zn(II) se muestran como líneas discontinuas y los ligandos metálicos se muestran en color gris. Para la enzima B2 Sfh-I, se muestra la forma activa mono-Zn(II).

La subclase B1 presenta en el sitio activo dos iones Zn⁺² (Zn1 y Zn2) posicionados en el borde externo del sándwich $\alpha\beta/\beta\alpha$. El primer ion Zn1 está unido al sitio activo a través de una geometría tetraédrica con tres residuos de histidinas (His116, His118 y His196) y una molécula de agua (WAT1), mientras que Zn2 está unido al sitio activo mediante una geometría bipiramidal trigonal con la misma molécula de agua (WAT1), los aminoácidos Asp120, Cys221 y His263 y una molécula de agua adicional (WAT2)¹⁸. La cavidad del sitio activo está rodeada por dos bucles funcionalmente importantes llamados L3 y L10. L3 es un bucle móvil y se ha comprobado que ejerce diversos papeles en la unión al sustrato y la catálisis a través de interacciones hidrofóbicas dependientes de enzimas^{19,20}.

La subclase B2, se caracteriza por tener en el sitio activo sólo un ion Zn⁺² (Zn2). El ion Zn2 está coordinado en el sitio activo a tres residuos de aminoácidos Asp120, Cys221 e

His263 y una molécula de agua, en una geometría tetraédrica¹⁸. Otra característica de B2 es la sustitución del bucle flexible L3 por una hélice α alargada ($\alpha 3$) que forma una pared hidrofóbica al proporcionar interacciones hidrofóbicas que se cierran sobre el surco del sitio activo^{21,22}. Esta orientación de $\alpha 3$ limita la accesibilidad de sustratos voluminosos y se ha propuesto como responsable de su afinidad limitada de sustratos^{21,22,23}.

La subclase B3 tiene una estructura similar a la subclase B1, con dos iones Zn^{+2} en su sitio activo ($Zn1$ y $Zn2$). El ion $Zn1$ también está unido por una geometría tetraédrica con tres residuos histidinas (His116, His118, His196) y WAT1. El ion $Zn2$ sin embargo está coordinado a los aminoácidos Asp120, His263 y His121 (en lugar de Cys221 en B1) además de WAT1 Y WAT2 en una geometría bipiramidal trigonal distorsionada¹⁸. La cavidad del sitio activo está delimitada por dos bucles móviles llamados 1 y 2 los cuales también intervienen en el reconocimiento del sustrato²⁴.

La flexibilidad de los bucles móviles que delimitan los sitios activos en las enzimas B1 y B3 les otorga plasticidad a los sitios activos de las M β ls facilitando la unión y la hidrólisis de diferentes sustratos y la adaptación a diferentes desafíos evolutivos.

Las M β ls de subclase B1 abarcan el mayor número de miembros clínicamente relevantes, incluyendo VIMs (M β L codificado con integrina de Verona), IMPs (imipenemasa) y NDMs (M β L de Nueva Delhi), entre otros⁹. Las enzimas de tipo IMPs que presentan una amplia especificidad por cefalosporinas y carbapenemos, se detectaron a finales de la década de 1980 en Japón y desde entonces se ha diseminado en todo el mundo en *Enterobacterias* y en bacterias Gram (-) como *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp*, Figura 5. Se han descrito más de 20 diferentes alotipos de IMP, pertenecientes a diversos sublinajes y aunque la diversidad alotípica puede tener implicancias funcionales no parecen tener implicaciones clínicas considerables²⁵.

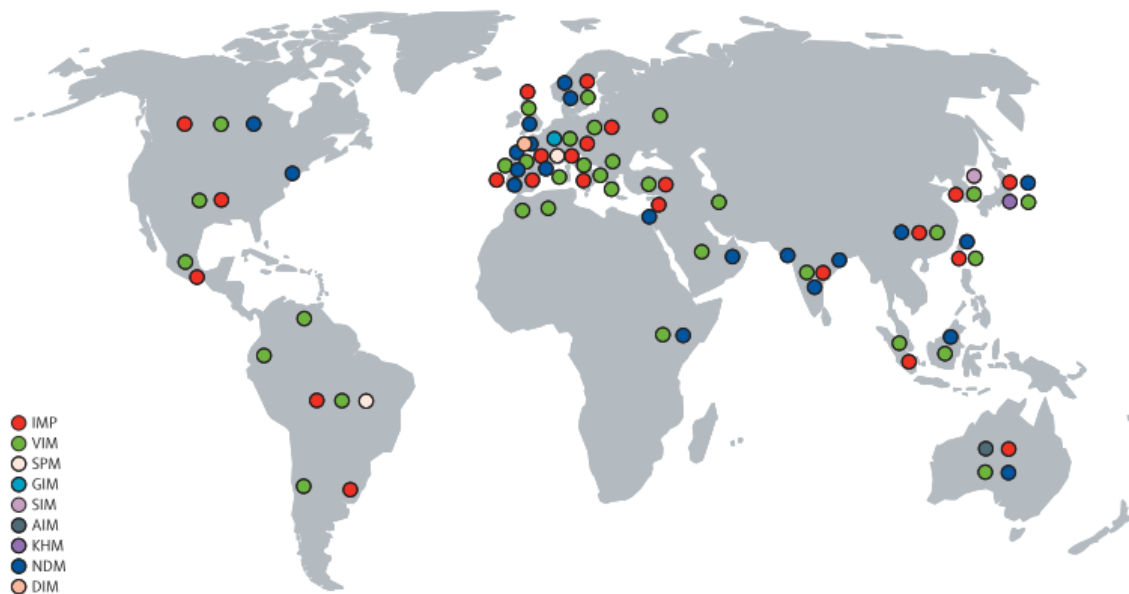


Figura 5. Distribución mundial de diferentes tipos de MβL¹⁴

Las enzimas de tipo VIM que muestran mayor afinidad por carbapenemos, fueron descubiertas en Europa a finales de la década de 1990 y también se ha reportado una amplia distribución geográfica, Figura 5. Al igual que las enzimas IMP, se conocen de estas enzimas más de 20 diferentes alotipos pertenecientes a tres sublinajes. Las VIM se detectaron en *P. aeruginosa*, en especies Gram (-) no fermentadoras, y en *enterobacterias* por lo que se han convertido en un problema importante en algunos hábitats. La enzima NDM-1 es una de las últimas MβLs adquiridas y su gran tendencia a la diseminación a nivel mundial es de gran preocupación. Fue detectada por primera vez en 2008 en Suecia en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* aislada de un paciente que regresaba de India, donde NDM-1 está muy extendida en *enterobacterias*²⁶. Otras MβLs adquiridas como SIM-1, GIM-1, AIM-1 y DIM-1 presentan una menor tasa de diseminación y un menor impacto clínico que NDM-1¹⁴.

1.1.4.1 Mecanismo hidrolítico de MβLs

Las MβLs catalizan la hidrólisis irreversible del anillo β-lactámico, los iones Zn(II) que se encuentran en el sitio activo son claves en el mecanismo de reacción. En las subclases B1 y B3 que son enzimas con dos iones zinc, se ha propuesto que el Zn1 cumple con una función similar a otras hidrolasas Zn(II) (como la glioxalasa II²⁷ o la anhidrasa carbónica²⁸) disminuyendo el pKa de una molécula de agua generando un grupo hidroxilo en el sitio

activo que actúa como nucleófilo^{29,30}. Sin embargo, en la subclase B2 dónde Zn1 está ausente, el Zn2 que es la única característica estructural preservada en las MβLs desempeña un papel esencial en el posicionamiento y estabilización de diferentes especies durante la reacción.

Se han realizado numerosos estudios del mecanismo de hidrólisis de antibióticos betalactámicos por parte de las MβLs y se ha logrado proponer un mecanismo común para las enzimas di-zinc (subclase B1 relevante a nivel clínico), el cual se describe en la Figura 6^{31, 32}.

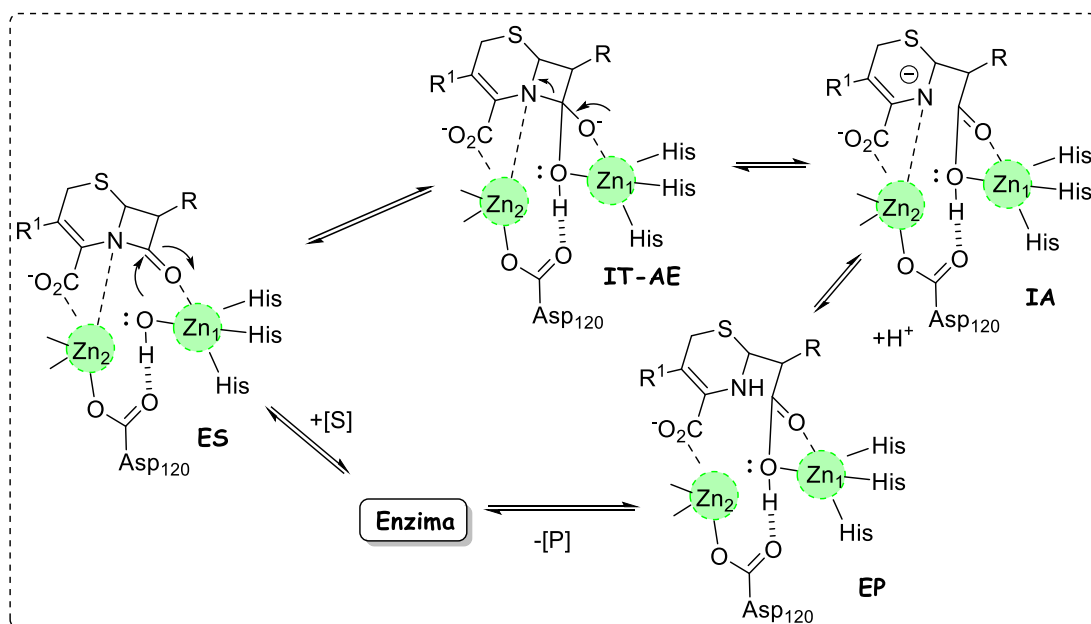


Figura 6: Mecanismo propuesto para la hidrólisis de cefalosporinas por enzimas di-Zinc de la subclase B1. Sustrato (S), Enzima (E), Complejo Enzima-Sustrato (ES), Intermedio tetraédrico de alta energía (IT-AE), Intermedio aniónico (IA), Complejo Enzima-Producto (EP), Producto (P)

Luego de la unión del sustrato (S) al sitio activo de la enzima (E), dónde el sustrato se une a través de la interacción del oxígeno carbonílico del anillo de β-lactama con Zn1 y el grupo carboxilo en el anillo fusionado con Zn2(ES). El residuo Asp120 desprotonado en la enzima orienta la molécula de agua/hidróxido estabilizado por Zn1 y Zn2 para que ataque el carbonilo del anillo β-lactama, formando una especie tetraédrica de alta energía (IT-AE). Este intermedio inmediatamente sufre la apertura del anillo betalactama por escisión del enlace amida, generando un intermedio aniónico (IA). Estos intermedios están unidos al sitio activo por interacciones electrostáticas y carecen de carbono tetraédrico, ya que se ha producido la escisión del enlace C-N en el anillo β-

lactámico. La carga negativa se estabiliza por una fuerte interacción con Zn^{2+} y se deslocaliza dentro de la estructura del antibiótico hidrolizado. La posterior protonación de estas especies (paso limitante) da lugar a la formación del complejo enzima-producto (EP), con la liberación final del producto y la recuperación de la enzima libre.

1.1.5. Inhibidores de M β Ls

Las variantes clínicas de M β Ls aumentan día a día y según la base de datos Beta Lactamase Data Base (BLDB)³³ las enzimas VIM, NDM, IMP y GOB han reportado entre 69, 29, 85 y 21 variantes. Sin embargo, actualmente no hay inhibidores disponibles contra estas enzimas en uso clínico a pesar de los esfuerzos y la gran variedad de estrategias que se han desplegado en el diseño y la búsqueda de inhibidores eficaces.

Ninguno de los inhibidores aprobados y aplicados clínicamente contra las Serina β -lactamasas (S β L) como el ácido clavulánico, el tazobactam y el sulbactam son eficaces en las M β Ls, esto se debe principalmente a las diferencias entre los mecanismos catalíticos y la naturaleza de las especies intermedias que se acumulan en los sitios activos. Por lo tanto, el conocimiento adquirido en la inhibición de S β Ls no es aplicable a la hora de diseñar inhibidores de M β Ls. La secuencia y diversidad estructural en el sitio activo de estas enzimas que implica diferentes topologías, el número de iones metálicos y los bucles adyacentes de unión al sustrato, son factores que dificultan el diseño racional de inhibidores.

Existen muchas revisiones sobre los inhibidores de M β Ls en literatura basándose en distintas perspectivas, como por ejemplo agrupando los inhibidores según los farmacóforos³⁴ o según los mecanismos de inhibición^{35,36}. En este capítulo vamos a abordar la clasificación reportada recientemente por Palacios *et al.*¹⁸ que agrupó los inhibidores según sus estructuras químicas y su analogía con las diferentes especies formadas durante el mecanismo catalítico, como por ejemplo estructuras que imitan al sustrato (S), o intermedio tetraédrico del estado de transición (IT), o intermedios aniónicos estables (IA) o complejos enzima: sustrato (EP).

Inhibidores análogos al sustrato (S)

Debido a que las MβLs son enzimas de amplio espectro que unen a la mayoría de los AβL, se pueden diseñar inhibidores que imiten a los AβL que son sustratos de estas enzimas. En literatura se han adoptado diferentes enfoques para diseñar inhibidores que imitan a los sustratos bicíclicos de las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemos, Figura 7.

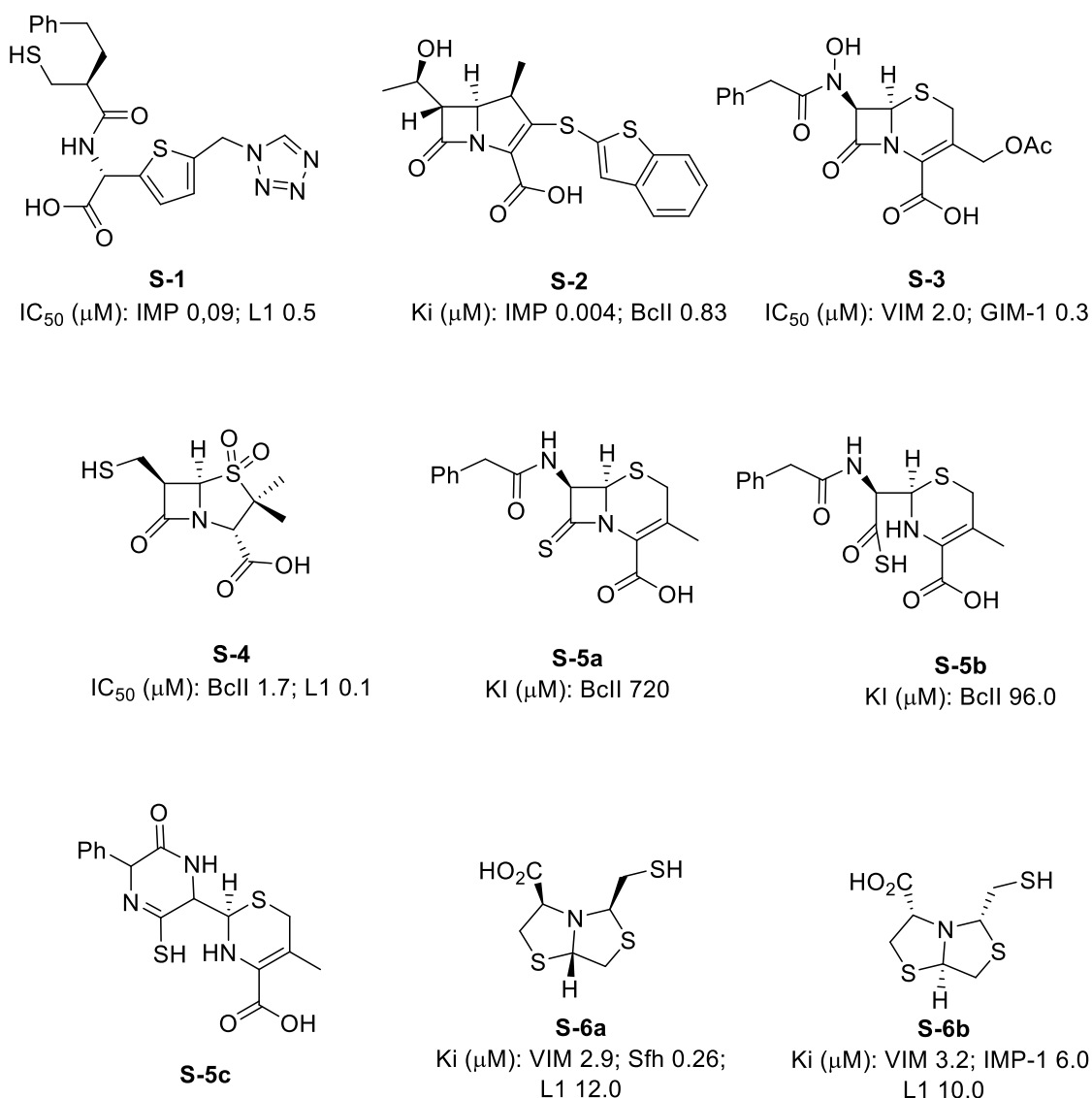


Figura 7. Inhibidores bicíclicos análogos al sustrato

El mercaptocarboxilato **S-1** fue el primer inhibidor descrito, el cual contiene una amida lineal, el carboxilato y un motivo aromático que imita la cadena R¹ presente en

bencilpenicilina, además de un grupo tiol libre³⁷. También se han descrito varios compuestos que incluyen la adición de diferentes grupos al núcleo bicíclico de β -lactamas. El compuesto J-110.441 **S-2** que contiene un grupo benzotiofeno en C2, fue identificado de una biblioteca de derivados de 1- β -metilcarbapenem y presentó muy buenos valores de K_i en M β L de subclase B1 y B2³⁸. El compuesto **S-3** fue preparado usando la estructura base de cefalosporinas reemplazando el N-H en C7 por N-OH, formando un hidroxamato inverso que puede unirse a los iones Zn (II) en el sitio activo, presentando un bajo valor de IC_{50} frente a enzimas B1³⁹. El derivado de penicilamina **S-4** fue diseñado como un inhibidor dual, incluyendo modificaciones que generan un complejo estable acil-enzima apuntado a la inhibición de S β L y un grupo tiol para que interactúe con las M β Ls. El derivado 8-tioxocefalosporina **S-5a** presenta una muy mala actividad frente a BcII ($K_i=720\text{mM}$), sin embargo, el tioácido **S-5b** que es su producto de hidrólisis resultó ser mejor inhibidor en BcII ($K_i = 96 \mu\text{M}$)⁴⁰. La mono-tioxo-piperazinadiona **S-5c** inhibe el BcII con una mayor potencia aún ($K_i = 29 \mu\text{M}$)³⁹. Otros inhibidores que basaron su diseño en la estructura de penicilina son los derivados bistiazolidinas descritos por nuestro grupo L-CS319 **S-6a** y D-CS319 **S-6b**^{41,42}. Estos inhibidores lograron inhibir las tres subclases de M β Ls, se ampliará sobre ellos en el capítulo 4.

Inhibidores análogos del estado de transición (ET)

Los análogos del estado transición generalmente son inhibidores que se espera sean más eficaces ya que se unen mejor a la enzima que los propios sustratos. En las M β L el estado de transición implica la preformación de un carbono tetraédrico (sp^3) generado después del ataque nucleofílico y antes de la escisión del enlace amida, que da lugar a la formación de un intermedio tetraédrico estable. Por lo tanto, a la hora de diseñar estos análogos se intenta imitar un átomo tetraédrico en esta posición, Figura 8.

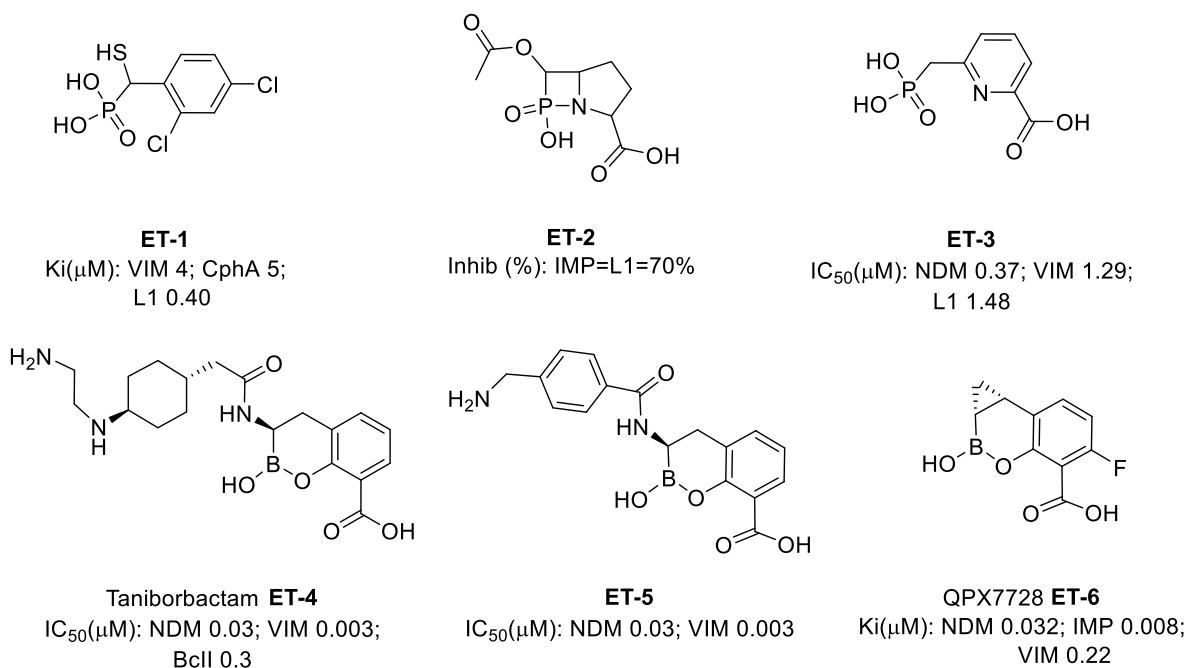


Figura 8. Inhibidores análogos al estado de transición

El grupo fosfonato, debido a la geometría tetraédrica del átomo de fósforo, ha sido utilizado para preparar inhibidores análogos al estado de transición, **ET-1**⁴³, **ET-2**⁴⁴ y **ET-3**⁴⁵. Recientemente el Boro ha sido propuesto para preparar este tipo de análogos, ya que tiene la capacidad de imitar el C sp^2 del grupo carbonilo o el C sp^3 generado en las especies tetraédricas. La hibridación del boro se puede ajustar dependiendo del pK_a de la molécula. El boro puede adoptar una hibridación plana sp^2 en forma de ácido borónico o éster trigonal, o adoptar una geometría tetraédrica sp^3 como es el caso del anión boronato, con la carga negativa sobre el átomo de Boro. Además, los enlaces B-O y C-O poseen longitudes similares, así como la de los enlaces B-C y C-C, lo cual favorece su acción como análogos. Algunos boronatos cíclicos activos frente a MβL y SβL descritos como inhibidores duales son Taniborbactam **ET-4**⁴⁶, **ET-5**⁴⁷ y QPX7728 **ET-6**⁴⁸. El Taniborbactam y QPX7728 resultaron ser muy buenos inhibidores de las enzimas MβL de subclase B1 y en este momento son los únicos inhibidores de MβL que se encuentran en ensayos clínicos de fase 3 y fase 1, respectivamente

Inhibidores análogos al intermedio aniónico/producto de hidrólisis (IP)

Tanto en el producto de hidrólisis (P) como el intermedio aniónico (IA), Figura 6, que se forma luego que el enlace β -lactámico es escindido, la unión de los grupos carboxilatos a los iones Zn(II) forman una interacción estable y conservada con la enzima en los complejos enzima-producto (EP) o enzima-intermedio (EIA) . La carga negativa en intermedios (IA) se posiciona de manera diferente según el sustrato. En los derivados de penicilina, se cree que la carga negativa se localiza en el nitrógeno, mientras que en los intermedios de cefalosporinas o carbapenemos se deslocaliza a través de un doble enlace en el anillo que estaba fusionado a la β -lactama, Figura 9. Una estrategia en la búsqueda de inhibidores de M β Ls ha sido diseñar y proponer moléculas conocidas que imiten al intermedio de reacción o el producto de hidrólisis de los A β Ls (IP), Figura 9.

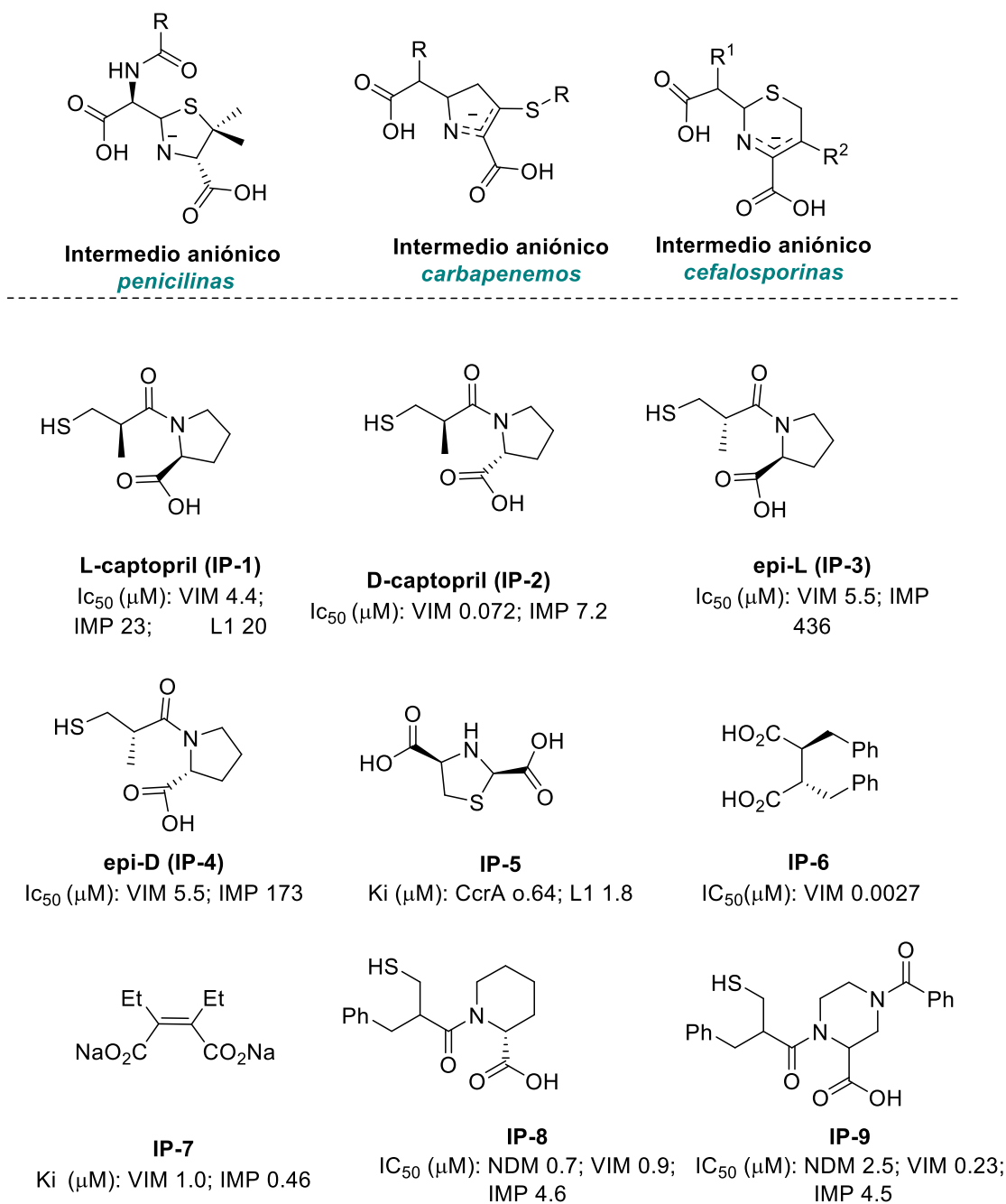


Figura 9. Inhibidores análogos al intermedio aniónico/producto de hidrólisis

El L-captopril **IP-1** es un antihipertensivo desarrollado en los años 70, que se usó por varias décadas como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA). Este compuesto imita parcialmente el anillo de cinco miembros presentes en las penicilinas hidrolizadas, conservando el resto carboxilato y aportando un grupo tiol que proporciona un punto de anclaje al sitio metálico presente en estas enzimas. Se han estudiado los cuatro estereoisómeros del captopril: L-captopril **IP-1**, D-captopril **IP-2**,

epi-L-captopril **IP-3** y epi-D-captopril **IP-4** frente a varias enzimas de M β L^{49,50}. El enantiómero que presentó mejor actividad inhibitoria fue el D-captopril, demostrando que la estereoquímica juega un rol importante en la unión con la enzima. Se han probado diversos inhibidores con dos grupos carboxilatos, el heterociclo tiazolidina con dos grupos carboxilatos **IP-5** mostró una potente inhibición frente a la enzima CcrA de la subclase B1 de M β L⁵¹. Compuestos más sencillos como derivados del ácido succínico⁵² **IP-6** y derivados del ácido maleico⁵³ **IP-7** fueron estudiados, y el derivado **IP-6** presentó una actividad en el rango nM frente a IMP ($IC_{50}=0.0027\mu M$)⁵². Como análogos al producto de hidrólisis de cefalosporinas que contienen un anillo de seis miembros, se evaluaron los compuestos **IP-8** con un anillo piperidina e **IP-9** con un anillo piperazina, ambos con una inhibición en el rango μM .

Otras estrategias utilizadas para el diseño de inhibidores

Una estrategia que se está explorando es el uso de inhibidores de M β Ls suicidas como prodrogas que liberen el fármaco activo en el sitio activo de la enzima. Como ejemplos podemos citar a los antibióticos moxalactam y cefoxitina que son hidrolizados por la enzima CphA⁵⁴, Figura 10. El producto de hidrólisis del mexolactam inmediatamente sufre la eliminación del sustituyente en C3 liberando el producto 5-mercapto-1-metiltetrazol que se une covalentemente a la enzima inactivándola irreversiblemente. El mecanismo de inhibición de la cefoxitina no ha sido elucidado aún. Otro inhibidor irreversible de M β L reportado es el Ebselen⁵⁵ que contiene en su estructura un átomo de selenio, el cual forma un enlace covalente con Cys221 de la enzima. Ebselen inhibió las enzimas B1 y B2 con valores de IC_{50} en el rango μM , pero no fue activo contra la subclase B3.

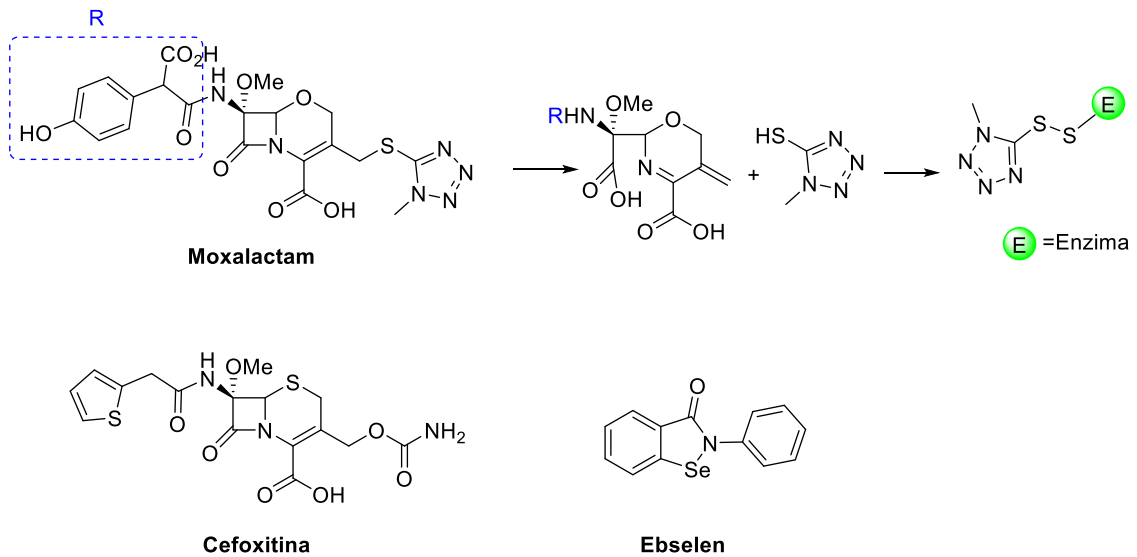


Figura 10. Inhibidores irreversibles y prodrugs

Otra estrategia utilizada ampliamente en los ensayos *in vitro* microbiológicos para detectar e inhibir M β L es el uso de agentes quelantes de metales, Figura 11. Estos agentes secuestran los iones Zn (II) presentes en estas enzimas y si bien presentan una buena eficacia *in vitro* su uso clínico es muy controvertido ya que debido a su baja especificidad pueden reaccionar con otras metaloenzimas. El EDTA fue el primer agente quelante descrito como inhibidor de M β L⁵⁶, restaurando la eficacia de A β L en patógenos bacterianos que producen M β Ls y también presentando eficacia antimicrobiana por sí mismo, pero los efectos citotóxicos contra células eucariotas impiden su uso terapéutico^{57,58}. Algunos ejemplos de agentes quelantes utilizados como inhibidores de M β L son los derivados del ácido picolínico como el ácido dipicolínico (DPA), tri(piridilmetil)amina (TPA) y N,N,N',N'- tetrakis (2-piridilmetil) etilendiamina (TPEN). Estos agentes restauraron la sensibilidad al meropenem de Enterobacterias productoras de NDM o VIM y en el caso de IMP-8 sólo mostraron actividad TPA y TPEN⁵⁹.

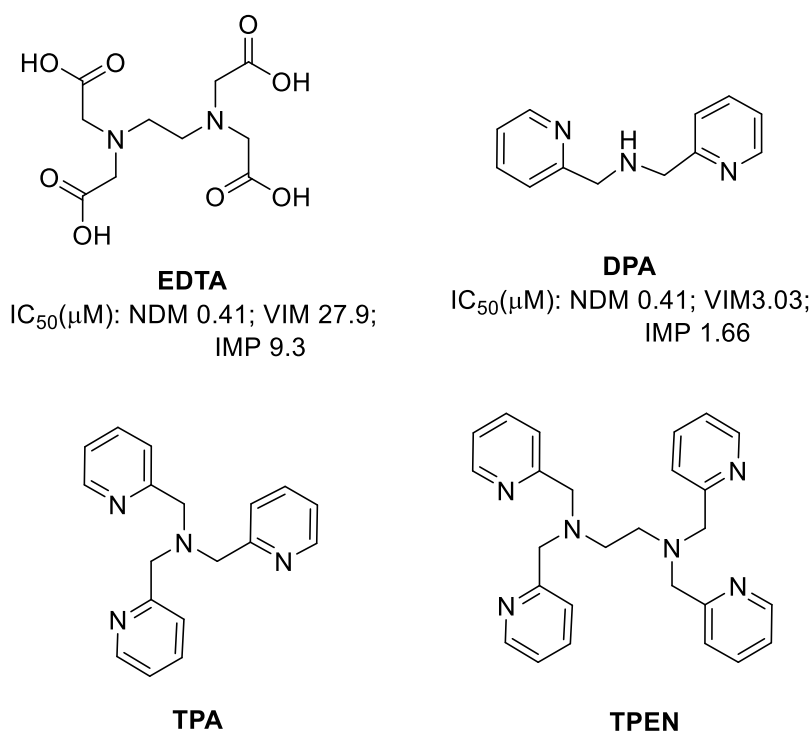


Figura 11. Agentes quelantes inhibidores de M β L

Como conclusión podemos decir que el aumento y diseminación de las M β L como mecanismo de resistencia bacteriana es un motivo de preocupación a nivel mundial respecto al tratamiento de enfermedades infecciosas. Por lo tanto, el desafío es encontrar inhibidores y nuevos antibióticos capaces de reducir el crecimiento de las cepas bacterianas productoras de M β L.

En los últimos años se han diseñado varios inhibidores para estas enzimas, pero la mayoría resultaron activos sólo frente a pocas M β L de la misma subclase. Los avances en la biología y la química computacional, así como la elucidación del mecanismo catalítico y la obtención de estructuras cristalinas de los complejos enzimas-sustratos ha sido clave en el diseño de estos inhibidores. Sin embargo, hasta el momento los compuestos más prometedores que han logrado inhibir todas las clases de M β L son los que contienen boro en su estructura y permiten imitar el estado de transición tetraédrico en las M β Ls y los compuestos que contienen un tiol libre capaz de interactuar con los iones Zn (II) en el sitio activo de las enzimas.

1.2. Antecedentes

Nuestro grupo se ha enfocado en estos últimos años en la búsqueda y el diseño de inhibidores de M β Ls. Entre las estructuras que se diseñaron se encuentran las 2-mercaptometil bistiazolidinas (2-MMBT) análogos a penicilinas y las 2-mercaptometil tiazolidinas (2-MMT) análogos al producto de hidrólisis de penicilinas, Figura 12.

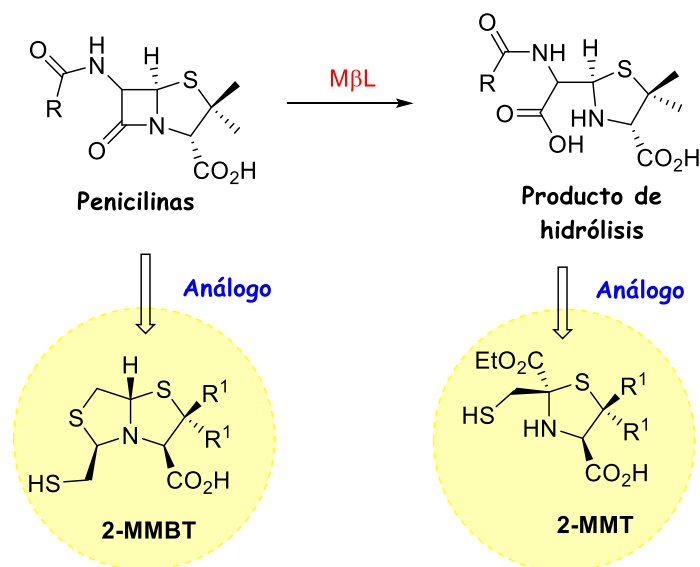


Figura 12. Estructura química de penicilinas, producto de hidrólisis, 2-MMBT y 2-MMT.

1.2.1. Biciclos 2-mercaptometil bistiazolidinas

Recientemente se describieron cuatro heterociclos 2-MMBT como inhibidores frente a las tres subclases de M β Ls^{41,42,60}. Como mencionamos anteriormente estos heterociclos fueron diseñados como análogos a las penicilinas, que son sustrato de las M β L. Estructuralmente contienen dos tiazolidinas fusionadas, que poseen un N tetraédrico cabeza de puente, una cadena con un grupo tiol terminal en posición 2 y un carboxilato capaz de interactuar con los iones Zn (II) en el sitio activo de las enzimas, Figura 13.

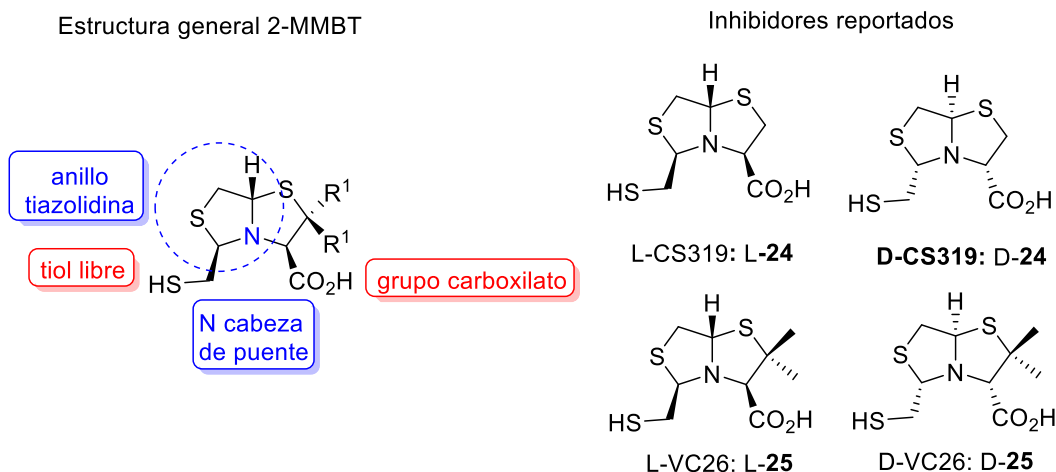


Figura 13: Estructura general de 2-MMBT y estructura química de los inhibidores descritos.

Los enantiómeros L y D de CS319 y VC26 que en este trabajo llamaremos **24** y **25** respectivamente, resultaron inhibidores competitivos *in vitro* en todas las subclases de M β L con valores de K_i de 0.26 a 84 μM ^{41,42}, Tabla 1. Para las M β L de la subclase B1 los cuatro compuestos presentaron mejor inhibición contra la enzima VIM-2 (2.9 a 10 μM). Contra Sfh-I de la subclase B2, los enantiómeros L de ambas clases de bistiazolidinas exhiben K_i 100 veces menor (0.26 - 0.36 μM) que los enantiómeros D (26 - 29 μM). Para las enzimas L1 y GOB-18 de la subclase B3 todos los biciclos presentan K_i del mismo orden (10-41 μM).

Tabla 1. Constantes de inhibición K_i obtenidas de las 2-MMBT **24** y **25** frente a distintas M β Ls

Subclase	Enzima	Sustrato	Constante de inhibición K_i (μM)			
			L-24	L-25	D-24	D-25
B1	BCII	Imipenem	36 \pm 2	32 \pm 3	53 \pm 5	84 \pm 6
	NDM-1	Imipenem	7 \pm 1	18 \pm 3	19 \pm 3	12 \pm 1
	IMP-1	Imipenem	8 \pm 2	15 \pm 3	6 \pm 1	14 \pm 3
	VIM-2	Imipenem	2.9 \pm 0.2	6 \pm 1	3.2 \pm 0.4	10 \pm 2
B2	Sfh-1	Imipenem	0.26 \pm 0.03	0.36 \pm 0.04	26 \pm 3	29 \pm 3
B3	L1	Imipenem	12 \pm 1	10 \pm 1	11 \pm 2	10 \pm 1
	GOB-18	Imipenem	41 \pm 4	31 \pm 2	30 \pm 2	10 \pm 1

Las estructuras cristalinas de los complejos M β L:2-MMBT, entre las tres principales subclases de M β L (NDM-1, IMP-1, Sfh-1, L1) y las series L y D de **24** y **25** fueron obtenidas y publicadas^{41,42}. Estas estructuras cristalinas revelan que las 2-MMBT presentan

diferentes modos de unión al sitio activo de estas enzimas según la orientación de los restos carboxilato y tiol. En la Figura 14 se muestran solo los complejos obtenidos de L-24 con las enzimas NDM-1⁴², Sfh-I⁴¹ y L1⁴¹ de las subclases B1, B2 y B3 respectivamente.

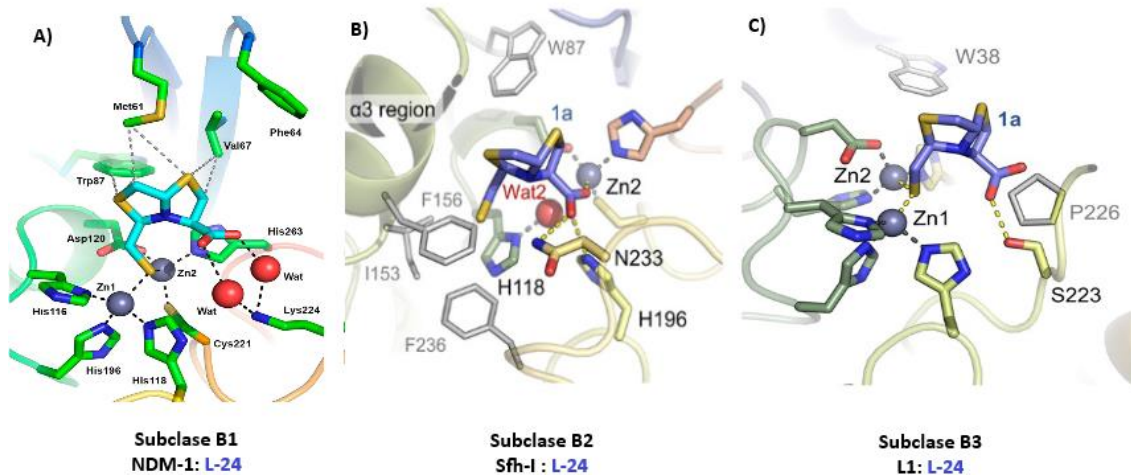


Figura 14: Estructura cristalina de los complejos de L-24 con las enzimas: A) NDM-1, subclase B1⁴², B) Sfh-I, subclase B2⁴¹ y C) L1, subclase B3⁴¹.

En general, se observó que los enantiómeros L no se unen con Zn2 a las MβL binucleares B1 y B3. Pero sí se unen a través de la interacción del tiol con el ion Zn1 y por interacción del carboxilato con residuos conservados implicados en la unión a la β-lactama: Lys224 en BclII, IMP-1, y NDM-1 (Figura 14-A, ejemplo complejo NDM-1: L-24), Arg228 en VIM-2 y el residuo Ser223 en L1 (Figura 14-C, ejemplo complejo L1: L-24). Este modo de unión es robusto a las diferencias en la composición y la orientación del loop móvil L3 que se encuentra en la mayoría de las MβL de subclase B1, pero no en las B3. En contraste, la unión de los enantiómeros D difiere profundamente entre las enzimas IMP-1 (B1) y L1 (B3). En el complejo D-24: IMP-1 se replica la unión prevista de β-lactama (el tiol se intercala en el centro metálico, y el carboxilato interacciona con el Zn2 y Lys224) mientras que la unión de D-24 a L1 está dominada por el tiol y no implica ninguna interacción con el carboxilato. Por último, en la unión de L-24 con la enzima Sfh-I de la subclase B2, se vio que el tiol se encuentra en la profundidad de la cavidad hidrofóbica y el carboxilato es el que interactúa con Zn2 (Figura 14-B, complejo Sfh-I: L-24).

Estos datos estructurales exponen que estos biclos diseñados por analogía al sustrato son capaces de inactivar a las diferentes subclases de M β L. Además, muestran que el modo de unión varía según la enzima diana y del enantiómero 2-MMBT utilizado.

Por otro lado, las 2-MMBT **24** y **25** también fueron evaluadas en su capacidad de restaurar la actividad de A β Ls contra patógenos resistentes. Los biclos presentaron actividad para microorganismos Gram (-) que expresan NDM-1: *Klesiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Providencia rettgeri*, aisladas de casos clínicos hospitalarios. También fueron evaluadas contra *S. maltophilia* un microorganismo patógeno oportunista que afecta a pacientes comprometidos que padecen de fibrosis cística pulmonar y que produce dos M β Ls de la subclase B3 inducibles (L1 y L2), confiriéndole resistencia a la mayoría de los A β Ls. En este caso las 2-MMBT evaluadas mostraron capacidad para restaurar la eficacia de los A β Ls contra este microorganismo aislado.

1.2.2. Estructuras de 2-mercaptometil tiazolidinas

Las 2-MMT son compuestos que imitan al producto de hidrólisis de las penicilinas. En su estructura mantiene el anillo tiazolidina y se le incorpora una cadena mercaptometilo que contiene un grupo tiol con alta afinidad hacia el Zn (II) y dos grupos carboxilatos capaces de interactuar también con los iones Zn1 y Zn2 en el sitio activo de las M β Ls, Figura 15.

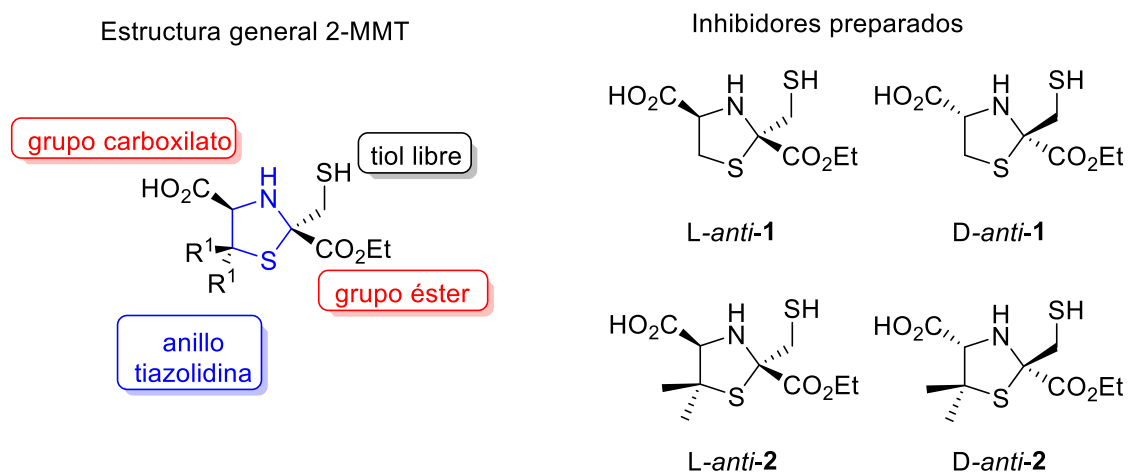


Figura 15: Estructura química general de 2-MMT y de las dos series de 2-MMT preparadas por nuestro grupo

Se trabajó en la preparación de dos tipos de 2-MMT con sus respectivos enantiómeros L y D⁶¹. Los derivados **1** con R¹ = H, y los derivados **2** con R¹ = Me similar al grupo gem dimetilo presente en las penicilinas, Figura 15. Estos compuestos fueron evaluados frente a las 3 subclases de MβLs y se comportaron como inhibidores competitivos *in vitro*, con valores de K_i en el rango 0.16-130 μM, Tabla 2.

Tabla 2. Estudio de inhibición de 2-MMT ensayadas sobre tres subclases de MβL usando Imipenem como sustrato

Subclase	Enzima	K _i (μM)			
		L-anti-1	D-anti-1	L-anti-2	D-anti-2
B1	NDM-1	5.2 ± 0.7	2.5 ± 0.5	0.44 ± 0.06	3.1 ± 0.3
B1	IMP-1	-	-	0.46 ± 0.05	-
B1	VIM-2	-	-	0.75 ± 0.09	-
B2	Sfh-I	0.16 ± 0.03	20 ± 2	1.3 ± 0.1	130 ± 10
B3	L1	10.0 ± 0.8	4.0 ± 0.5	20 ± 2	1.4 ± 0.2

Por lo tanto, teniendo en cuenta la capacidad que han demostrado las 2-MMBT y las 2-MMT para inhibir las tres subclases de MβLs, podemos considerarlas como estructuras muy prometedoras para el desarrollo de nuevos inhibidores de estas enzimas.

Bibliografía

¹ World Health Organization, **2014**. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, apps.who.int/iris/handle/10665/112642.

² J.A. Alós. Antibiotic Resistance : A Global Crisis, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, **2015**, 33 (10), 692–699, doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004.

³ S. B. Zaman , M. A. Hussain , R. Nye , V. Mehta , K. T. Mamun ,N. Hossain. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells Are Ringing, *Cureus*, **2017**, 9(6), 1403-1409, doi.org/10.7759/cureus.

⁴ W. Witte. Medical consequences of antibiotic use in agriculture, *Science*, **1998**, 279(5353), 996-7, [doi:10.1126/science.279.5353.996](https://doi.org/10.1126/science.279.5353.996).

⁵ C. Suarez, F. Gudiol. Beta-lactam Antibiotics, *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009, 27(2), 116–129, doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001.

⁶ M. G. P. Page. Cephalosporins in clinical development, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2004**, 13, 973–985, doi.org/10.1517/13543784.13.8.973.

⁷ K.M. Papp-Wallace, A. Endimiani, M.A. Taracila, R.A. Bonomo. Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, 55, 4943–4960, doi.org/10.1128/AAC.00296-11.

⁸ D. Niccolai, L. Tarsi, R. J. Thomas. The renewed challenge of antibacterial chemotherapy, *Chem. Commun.*, **1997**, 24, 2333–2342, doi.org/10.1039/A704497F.

⁹ C. Ramsey, A.P. MacGowan, A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of aztreonam, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2016**, 71, 2704–2712, doi.org/10.1093/jac/dkw231.

¹⁰ S. M. Drawz, R. A. Bonomo. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors, *Clinical Microbiology Reviews*, **2010**, 23(1), 160–201, doi.org/10.1128/CMR.00037-09.

¹¹ C. L Tooke, P. Hinchliffe, E. C Bragginton, C. K Colenso, V. H. A. Hirvonen, Y. Takebayashi, J. Spencer. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century, *Journal of Molecular Biology*, **2019**, 1(18), 3472–3500, doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002.

¹² M. F Mojica, R. A. Bonomo, W. Fast. B1-Metallo-Beta-Lactamases: Where Do We Stand, *Curr Drug Targets.*, **2016**, 17(9), 1029–1050. doi.org/10.2174/1389450116666151001105622

¹³ M. S Wilke, A. L. Lovering, N. C. J. Strynadka, β -Lactam Antibiotic Resistance , *Curr. Opin. Microbiol.*, **2005**, 8(5), 525-533, doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.016.

¹⁴ F. Malouin, L. E. Bryan, Modification of Penicillin-Binding Proteins of β -Lactam Resistance, *Antimicrob Agents Chemother.*, 1986, 30(1), 1–5, doi.org/10.1128/aac.30.1.1.

¹⁵ X. Z. Li, D. Ma, D. M. Livermore, H, Nikaido. Role of Efflux Pump (s) in Intrinsic Resistance of Pseudomonas Aeruginosa : Active Efflux as a Contributing Factor to β -Lactam Resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, 38(8), 1742–1752, doi.org/10.1128/AAC.38.8.1742

-
- ¹⁶ R. P. Ambler. The structure of beta-lactamases, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **1980**, 289(1036), 321–331, doi.org/10.1098/rstb.1980.0049.
- ¹⁷ M.F. Mojica, S.G. Mahler, C.R. Bethel, M.A. Taracila, M. Kosmopoulou, K.M. Papp-Wallace, L.I. Llarrull, B.M. Wilson, S.H. Marshall, C.J. Wallace, M. V. Villegas, M. E. Harris, A. J. Vila, J. Spencer, R. A. Bonomo. Exploring the Role of Residue 228 in Substrate and Inhibitor Recognition by VIM Metallo- β -lactamases, *Biochemistry*, **2015**, 54(20), 3183–3196, doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00106.
- ¹⁸ P. Behzadi, H. A. García-Perdomo, T. M. Karpiński, L. Issakhanian. Metallo- β -Lactamases: A Review, *Molecular Biology Reports*, **2020**, 47, 6281–6294, doi.org/10.1007/s11033-020-05651-9.
- ¹⁹ C. Moali, C. Anne, J. Lamotte-Brasseur, S. Gros Lambert, B. Devreese, J. Van Beeumen, M. Galleni, J. M. Frere. Analysis of the importance of the metallo- β -lactamase active site loop in substrate binding and catalysis, *Chem. Biol.*, **2003**, 10, 319–329. doi.org/10.1016/S1074-5521(03)00070-X
- ²⁰ I. C. Materon, Z. Beharry, W. Huang, C. Perez, T. Palzkill. Analysis of the context dependent sequence requirements of active site residues in the metallo-beta-lactamase IMP-1, *J. Mol. Biol.*, **2004**, 344, 653–663, doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.074.
- ²¹ C. Bebrone, H. Delbrück, M. B. Kupper, P. Schlömer, C. Willmann, J. M. Frère, R. Fischer, M. Galleni, K. M. Hoffmann. The structure of the dizinc subclass B2 metallo- β -lactamase CphA reveals that the second inhibitory zinc ion binds in the histidine site, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2009**, 53(10), 4464–4471, doi.org/10.1128/AAC.00288-09.
- ²² F. Fonseca, E. H. Bromley, M. J. Saavedra, A. Correia, J. Spencer. Crystal structure of *Serratia fonticola* Sfh-I: Activation of the nucleophile in mono-zinc metallo-beta-lactamases, *J. Mol. Biol.*, **2011**, 411, 951–959, doi.org/10.1016/j.jmb.2011.06.043.
- ²³ L.J. Gonzalez, V.C. Stival, J.L. Puzzolo, D.M. Moreno, A.J. Vila. Shaping substrate selectivity in a broad spectrum metallo- β -lactamase, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2018**, 62(4), e02079-17, doi.org/10.1128/AAC.02079-17.
- ²⁴ J. Wachino, Y. Yamaguchi, S. Mori, H. Kurosaki, Y. Arakawa, K. Shibayama. Structural insights into the subclass B3 metallo- β -lactamase SMB-1 and the mode of inhibition by the common metallo- β -lactamase inhibitor mercaptoacetate, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2013**, 57, 101–109, doi.org/10.1128/AAC.01264-12.
- ²⁵ G. Cornaglia, H. Giamarellou, G. M. Rossolini. Metallo- β -Lactamases: A Last Frontier for β -Lactams?, *Lancet Infect. Dis.*, **2011**, 11(5), 381–393, doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70056-1.
- ²⁶ J. M. Rolain, P. Parola, G. Cornaglia. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemia?, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2010**, 16(12), 1699–701, doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03385.x

-
- ²⁷ S. L. Chen, W. H. Fang, F. Himo. Reaction mechanism of the binuclear zinc enzyme glyoxalase II—A theoretical study, *J. Inorg. Biochem.*, **2009**, 103, 274–281, doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.10.016.
- ²⁸ S. Lindskog, J. E. Coleman. The catalytic mechanism of carbonic anhydrase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1973**, 70, 2505–2508, doi.org/10.1073/pnas.70.9.2505.
- ²⁹ S. Bounaga, A. P. Laws, M. Galleni, M. I. Page. The mechanism of catalysis and the inhibition of the *Bacillus cereus* zinc-dependent β -lactamase, *Biochem. J.*, **1998**, 331(3), 703–711. doi.org/10.1042/bj3310703.
- ³⁰ M. F. Tioni, L. I. Llarrull, A. A. Poeylout-Palena, M. A. Marti, M. Saggu, G. R. Periyannan, E. G. Mata, B. Bennett, D. H. Murgida, A. J. Vila. Trapping and characterization of a reaction intermediate in carbapenem hydrolysis by *B. cereus* metallo- β -lactamase, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130(47), 15852–15863, doi.org/10.1021/ja801169j.
- ³¹ M. W. Crowder, J. Spencer, A. J. Vila. Metallo- β -Lactamases: Novel Weaponry for Antibiotic Resistance in Bacteria, *Accounts of Chemical Research*, **2006**, 39 (10), 721–728. doi.org/10.1021/ar0400241.
- ³² M. F. Mojica, R. A. Bonomo, W. Fast. B1-Metallo-Beta-Lactamases: Where Do We Stand?, *Curr. Drug. Targets.*, **2016**, 17 (9), 1029–1050, doi.org/10.2174/1389450116666151001105622.
- ³³ <http://blddb.eu>
- ³⁴ W. Fast, L. D. Sutton. Metallo- β -Lactamase: Inhibitors and Reporter Substrates, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **2013**, 1834(8), 1648–59, doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.04.024.
- ³⁵ C. M. Rotondo, G. D. Wright. Inhibitors of Metallo- β -Lactamases, *Curr. Opin. Microbiol.*, **2017**, 39, 96–105, doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.026.
- ³⁶ L. Cheng Ju, Z. Cheng, W. Fast, R. A. Bonomo, M. W. Crowder. The Continuing Challenge of Metallo- β -Lactamase Inhibition: Mechanism Matters, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2018**, 39(7), 635–647, doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.007.
- ³⁷ N. O. Concha, C. A. Janson, P. Rowling, S. Pearson, C. A. Cheever, B. P. Clarke, C. Lewis, M. Galleni, J. M. Frere, D. J. Payne, J. H. Bateson, S. S. Abdel-Meguid. Crystal structure of the IMP-1 metallo beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its complex with a mercaptocarboxylate inhibitor: Binding determinants of a potent, broad-spectrum inhibitor, *Biochem.*, **2000**, 39, 4288–4298, doi.org/10.1021/bi992569m.
- ³⁸ R. Nagano, Y. Adachi, H. Imamura, K. Yamada, T. Hashizume, H. Morishima, Carbapenem derivatives as potential inhibitors of various beta-lactamases, including class B metallo- β -lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, 43, 2497–2503, doi.org/10.1128/AAC.43.10.2497
- ³⁹ S. R. Ganta, S. Perumal, S. R. Pagadala, O. Samuelsen, J. Spencer, R. F. Pratt, J. D. Buynak. Approaches to the simultaneous inactivation of metallo- and serine- β -lactamases, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 1618–1622, doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.018.

-
- ⁴⁰ W.Y. Tsang, A. Dhanda, C.J. Schofield, J.M. Frere, M. Galleni, M.I. Page. The inhibition of metallo- β -lactamase by thioxo-cephalosporin derivatives, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 1737–1739, doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.01.047.
- ⁴¹ P. Hinchliffe, M. M. González, M. F. Mojica, J. M. González, V. Castillo, C. Saiz, M. Kosmopoulou, C. L. Tooke, L. I. Llarrull, G. Mahler, R. A. Bonomo, A. J. Vila, J. Spencer. Cross-Class Metallo- β -Lactamase Inhibition by Bisthiazolidines Reveals Multiple Binding Modes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2016**, 113(26), E3745–54, doi.org/10.1073/pnas.1601368113.
- ⁴² M. M. González, M. Kosmopoulou, M. F. Mojica, Valerie. Castillo, P. Hinchliffe, I. Pettinati, J. Brem, C. J. Schofield, G. Mahler, R. A. Bonomo, L. I. Llarrull, J. Spencer, A. J. Vila. Bisthiazolidines: A Substrate-Mimicking Scaffold as an Inhibitor of the NDM-1 Carbapenemase, *ACS Infectious Diseases*, **2016**, 1(11), 544–554, doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00046.
- ⁴³ P. Lassaux, M. Hamel, M. Gulea, H. Delbruck, P.S. Mercuri, L. Horsfall, D. Dehareng, M. Kupper, J.M. Frere, K. Hoffmann, M. Galleni, C. Bebrone. Mercaptophosphonate compounds as broad-spectrum inhibitors of the metallo-beta-lactamases. *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 4862–4876, doi.org/10.1021/jm100213c.
- ⁴⁴ K.W. Yang, L. Feng, S.K. Yang, M. Aitha, A.E. LaCuran, P. Oelschlaeger, M.W. Crowder. New β -phospholactam as a carbapenem transition state analog: Synthesis of a broad-spectrum inhibitor of metallo- β -lactamases, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 5855–5859., doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.098.
- ⁴⁵ P. Hinchliffe, C.A. Tanner, A.P. Krismanich, G. Labbé, V.J. Goodfellow, L. Marrone, A.Y. Desoky, K. Calvopiña, E.E. Whittle, F. Zeng, M. B. Avison, N. C. Bols, S. Siemann, J. Spencer, G. I. Dmitrienko, Structural and Kinetic Studies of the Potent Inhibition of Metallo- β -lactamases by 6-Phosphonomethylpyridine-2-carboxylates. *Biochem.*, **2018**, 57, 1880–1892. doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01299.
- ⁴⁶ B. Liu, R.E.L. Trout, G.H. Chu, D. McGarry, R.W. Jackson, J.C. Hamrick, D.M. Daigle, S.M. Cusick, C. Pozzi, F. De Luca, M. Benvenuti, S. Mangani, J.D. Docquier, W. J. Weiss, D. C. Pevear, L. Xerri, C. J. Burns. Discovery of Taniborbactam (VNRX-5133): A Broad-Spectrum Serine- and Metallo- β -lactamase Inhibitor for Carbapenem-Resistant Bacterial Infections. *J. Med. Chem.*, **2019**, 63, 2789–2801, doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01518.
- ⁴⁷ J. Brem, R. Cain, S. Cahill, M.A. McDonough, I.J. Clifton, J.C. Jimenez-Castellanos, M.B. Avison, J. Spencer, C.W. Fishwick, C.J. Schofield. Structural base of metallo-beta-lactamase, serine-beta-inhibition of lactamase binding protein and penicillin by cyclic boronates. *Nat. Commun.*, **2016**, 7, 12406, doi: 10.1038 / ncomms12406.
- ⁴⁸ R. Tsivkovski, M. Totrov, O. Lomovskaya, Biochemical characterization of QPX7728, a new ultrabroad-spectrum beta-lactamase inhibitor of serine and metallo-beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.*, **2020**, 64, e00130-e00150, doi.org/10.1128/AAC.00130-20.
- ⁴⁹ U. Heinz, R. Bauer, S. Wommer, W. Meyer-Klaucke, C. Papamichaels, J. Bateson, H. W. Adolph. Coordination Geometries of Metal Ions in D- or L-Captopril-inhibited Metallo- β -lactamases, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278(23), 20659–20666, doi.org/10.1074/jbc.M212581200.

-
- ⁵⁰ J. Brem, S.S. van Berkel, D. Zollman, S.Y. Lee, O. Gileadi, P.J. McHugh, T.R. Walsh, M.A. McDonough, C.J. Schofield. Structural Basis of Metallo- β -Lactamase Inhibition by Captopril Stereoisomers, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2015**, 60, 142–150, doi.org/10.1128/AAC.01335-15
- ⁵¹ L. Feng, K. W. Yang, L. S. Zhou, J. M. Xiao, X. Yang, L. Zhai, Y. L. Zhang, M.W. Crowder. N-Heterocyclic dicarboxylic acids: Broad-spectrum inhibitors of metallo- β -lactamases with co-antibacterial effect against antibiotic-resistant bacteria, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 5185–5189, doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.06.074.
- ⁵² J.H. Toney, G.G. Hammond, P.M. Fitzgerald, N. Sharma, J.M. Balkovec, G.P. Rouen, S.H. Olson, M.L. Hammond, M. L. Greenlee, Y.D. Gao. Succinic acids as potent inhibitors of plasmid-borne IMP-1 metallo- β -lactamase, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 31913–31918, doi.org/10.1074/jbc.M104742200.
- ⁵³ D.M. Livermore, S. Mushtaq, A. Morinaka, T. Ida, K. Maebashi, R. Hope. Activity of carbapenems with ME1071 (disodium 2,3-diethylmaleate) against Enterobacteriaceae and *Acinetobacter* spp. with carbapenemases, including NDM enzymes, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2013**, 68, 153–158, doi.org/10.1093/jac/dks350.
- ⁵⁴ A. Zervosen, M.H. Valladares, B. Devreese, C. Prosperi-Meys, H.W. Adolph, P.S. Mercuri, M. Vanhove, G. Amicosante, J. van Beeumen, J.M. Frere, M. Galleni. Inactivation of *Aeromonas hydrophila* metallo-beta-lactamase by cephamycins and moxalactam. *Eur. J. Biochem.*, **2001**, 268, 3840–3850, doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02298.x
- ⁵⁵ J. Chiou, S. Wan, K. F. Chan, P.K. So, D. He, E. W. Chan, T. Chan, K. Wong, J. Tao, S. Chen. Ebselen as a potent covalent inhibitor of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1), *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 9543–9546, doi.org/10.1039/C5CC02594j.
- ⁵⁶ P. Marchiaro, M. A. Mussi, V. Ballerini, F. Pasteran, A. M. Viale, A. J. Vila, A. S. Limansky. Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of metallo- β -lactamases in non-fermentative gram-negative bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, **2005**, 43, 5648–5652. doi.org/10.1128/JCM.43.11.5648-5652.2005.
- ⁵⁷ R. J. Lambert, G. W. Hanlon, S. P. Denyer. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Appl. Microbiol.*, **2004**, 96, 244–253, doi.org/10.1046/j.1365-2672.2004.02135.x.
- ⁵⁸ K. F. Amaral, M. M. Rogero, R. A. Fock, P. Borelli, G. Gavini. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture, *Int. Endod. J.*, **2007**, 40, 338–343, doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01220.x.
- ⁵⁹ R. Azumah, J. Dutta, A. M. Somboro, M. Ramtahal, L. Chonco, R. Parboosing, L. A. Bester, H. G. Kruger, T. Naicker, S. Y. Essack, T. Govender. In vitro evaluation of metal chelators as potential metallo- beta -lactamase inhibitors, *J. Appl. Microbiol.*, **2016**, 120, 860–867, doi.org/10.1111/jam.13085.
- ⁶⁰ C. Saiz, V. Castillo, S. G. Mahler. Imine Domino Reactions Generate Novel Scaffolds: Fused Bisthiazolidines or Bisthiiranes, *Synlett*, **2012**, 23, 1090–94. doi.org/10.1055/s-0031-1290621.

⁶¹ V. Castillo (2016), Diseño y Síntesis de Heterociclos como posibles inhibidores de Metallo β -lactamasas (Tesis Maestría), Facultad de Química, UdelaR.

Capítulo 2

Objetivos

2.1. Objetivo General:

El objetivo general de este trabajo de tesis está centrado en el diseño, síntesis y caracterización biológica de potenciales agentes que restauren la eficacia de los A β L, específicamente inhibiendo enzimas metalo- β -lactamasas (M β L). La estrategia principal para lograr este objetivo será trabajar sobre la estructura de los heterociclos de 2-mercaptometil tiazolidinas (2-MMT) y 2-mercaptometil bistiazolidinas (2-MMBT) con el fin de obtener nuevos análogos con mejor potencia inhibitoria.

2.2. Objetivos Específicos

Los objetivos específicos planteados en esta tesis se pueden resumir en los siguientes puntos:

2.2.1. Diseño y Síntesis de 2-Mercaptometil Tiazolidinas y análogos como inhibidores de M β L:

Para este objetivo específico se plantea:

2.2.1A. Optimización de la síntesis de los heterociclos de 2-mercaptometil tiazolidinas utilizando la metodología de Experimentación de alto rendimiento

2.2.1B. Diseño y síntesis de nuevos análogos, realizando distintas modificaciones sobre la estructura general de 2-MMT: 1) modificaciones a nivel del ácido carboxílico en C4, B) Homologación de la cadena mercaptometilo; 2) modificaciones a nivel de los sustituyentes en C2; 3) preparación de análogos oxazolidinas

2.2.1C. Determinación estructural mediante cristalografía de los complejos M β L:2-MMT en el sitio de acción.

2.2.1D. Caracterización de los análogos preparados como inhibidores de M β L. Para aquellos compuestos con buena actividad inhibitoria se plantea determinar la capacidad de restaurar la actividad de A β L frente a microorganismos resistentes, midiendo la concentración mínima inhibitoria (CMI).

2.2.2. Diseño, Síntesis y Caracterización biológica de análogos a 2-mercaptometil bistiazolidinas:

Para este objetivo específico se plantea:

2.2.2A. Diseño y síntesis de nuevos análogos realizando distintas modificaciones sobre la estructura general de las 2-MMBT: 1) modificaciones sobre el grupo carboxilato en C8; 2) preparación de análogos tricíclicos fusionando el anillo bistiazolidina con un anillo aromático en los carbonos C7-C8; 3) homologación de la cadena mercaptometilo en C2

2.2.2.B. Caracterización de los análogos preparados como inhibidores de M β L. Para aquellos compuestos con buena actividad inhibitoria se plantea determinar la capacidad de restaurar la actividad de A β L frente a microorganismos resistentes, midiendo la concentración mínima inhibitoria (CMI).

2.2.3. Síntesis y evaluación de prodrogas derivadas de 2-mercaptometil bistiazolidinas

Para este objetivo específico se plantea:

2.2.3A. La síntesis de derivados δ -tiolactona mediante ciclación intramolecular entre el tiol libre de la cadena 2-mercaptometilo y el ácido carboxílico presentes en las 2-MMBT bajo condiciones de acoplamiento.

2.2.3B. Síntesis de derivados tioacetilos por acetilación del grupo tiol

2.2.3C. Estudiar la potencialidad como prodrogas de los derivados preparados determinando la estabilidad química a diferentes pHs fisiológicos y la estabilidad metabólica en plasma.

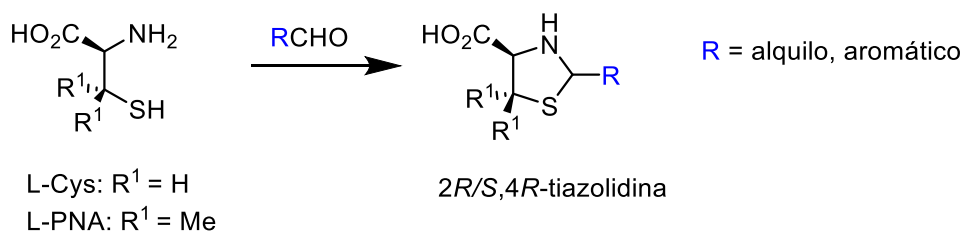
Capítulo 3

Diseño y Síntesis de 2-Mercaptometil Tiazolidinas y análogos como inhibidores de M β L

3.1 Antecedentes:

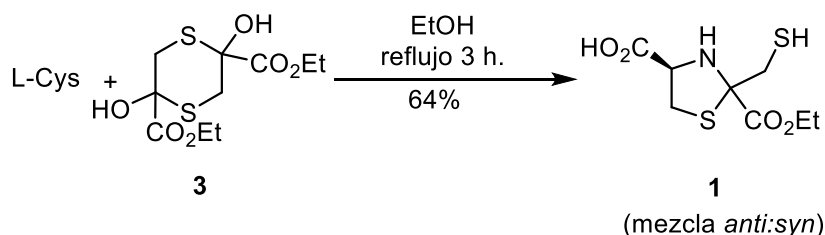
3.1.1. Antecedentes sintéticos de 2-mercaptometil tiazolidinas

Las tiazolidinas son heterociclos de cinco miembros muy versátiles ampliamente descritos en química orgánica y medicinal¹. Se utilizan como bloques de construcción en la síntesis de valiosos compuestos orgánicos que muestran diversas propiedades biológicas como anticancerígenos², antibacterianos^{3,4}, y antioxidantes⁵, entre otros. Las 4-carboxil-tiazolidinas-2-monosustituidas pueden prepararse fácilmente por condensación de cisteína (Cys) o penicilamina (PNA) y un aldehído alquílico o aromático^{6,7}, Esquema 1.



Esquema 1: Síntesis de 4-carboxil-tiazolidina -2-sustituida

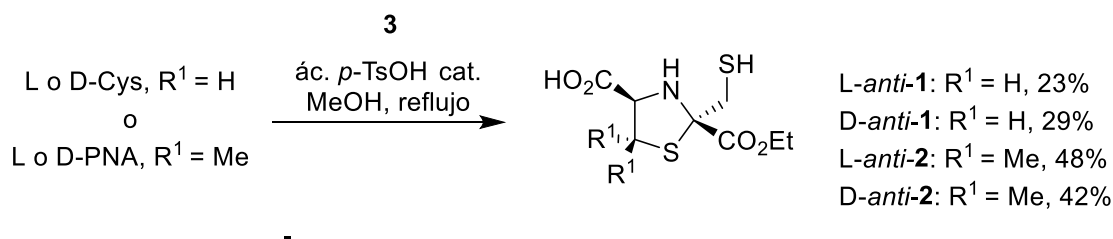
En literatura la síntesis de la L-4-carboxy-2mercaptometil tiazolidina **1** fue descrita por Nagasawa *et al.*, como antídoto para el tratamiento del envenenamiento por cianuro⁸ (Esquema 2).



Esquema 2: Síntesis reportada por Nagasawa *et al.* para la obtención de **1**

Los autores prepararon la tiazolidina **1** por ciclocondensación entre L-Cys y 2,5-dihidroxi-2,5-dietil éster- 1,4-ditiano **3**, en EtOH a reflujo por 3h. Reportaron la obtención del producto con un rendimiento del 64% como mezcla diasterómera, sin describir la relación *anti:syn*.

Basados en la metodología de Nagasawa *et al.*, nuestro grupo preparó dos series de 2-mercaptometil tiazolidinas (2-MMT) **1** y **2** partiendo de Cys o PNA respectivamente. La ciclocondensación entre el ditiano **3** con los aminotioles, se realizó en MeOH a reflujo y con el agregado de ác. *p*-TsOH como catalizador⁷, Esquema 3.



Esquema 3: Síntesis descrita por nuestro grupo para la preparación de 2-MMT **1** y **2**

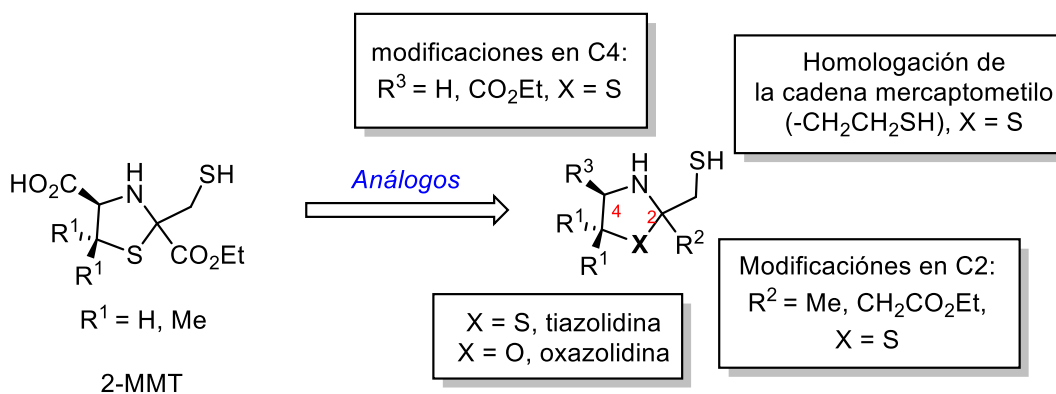
En esas condiciones se prepararon la serie L y D de las tiazolidinas **1** y **2**. La purificación se llevó a cabo por cromatografía en columna y se logró aislar sólo los diasterómeros *anti* en los cuatro casos.

3.2 Objetivos específicos:

En el presente capítulo nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

3.2.1. Optimización de la síntesis de los heterociclos de 2-mercaptometil tiazolidinas utilizando la metodología de Experimentación de alto rendimiento

3.2.2. Diseño y síntesis de nuevos análogos, realizando distintas modificaciones sobre la estructura general de 2-MMT, Esquema 4: A) modificaciones a nivel del ácido carboxílico en C4, B) Homologación de la cadena mercaptometilo, C) modificaciones a nivel de los sustituyentes en C2, D) preparación de análogos oxazolidinas (X=O)



Esquema 4: Modificaciones propuestas para la síntesis de nuevos análogos de 2-MMT

3.2.3. Determinación estructural mediante cristalografía de los complejos MβL: 2-MMT.

3.2.4. Caracterización de los análogos preparados como inhibidores de MβL. Para aquellos compuestos con buena actividad inhibitoria se plantea determinar la capacidad de restaurar la actividad de AβL frente a microorganismos resistentes, midiendo la concentración mínima inhibitoria (CMI).

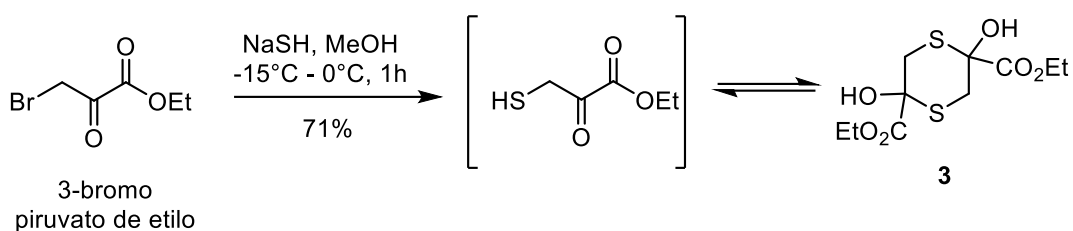
3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Optimización de la síntesis de los heterociclos 2-MMT

Dado el bajo rendimiento obtenido en la recuperación del compuesto **1** (23-29%) y que sólo se logró aislar el diastereómero *anti* en todos los casos, nos planteamos como objetivo optimizar las condiciones de síntesis de las 2-MMT para mejorar el rendimiento obtenido y lograr aislar el diastereómero *syn* de **1** y **2**.

3.3.1A. Síntesis de 2-MMT utilizando metodología anterior

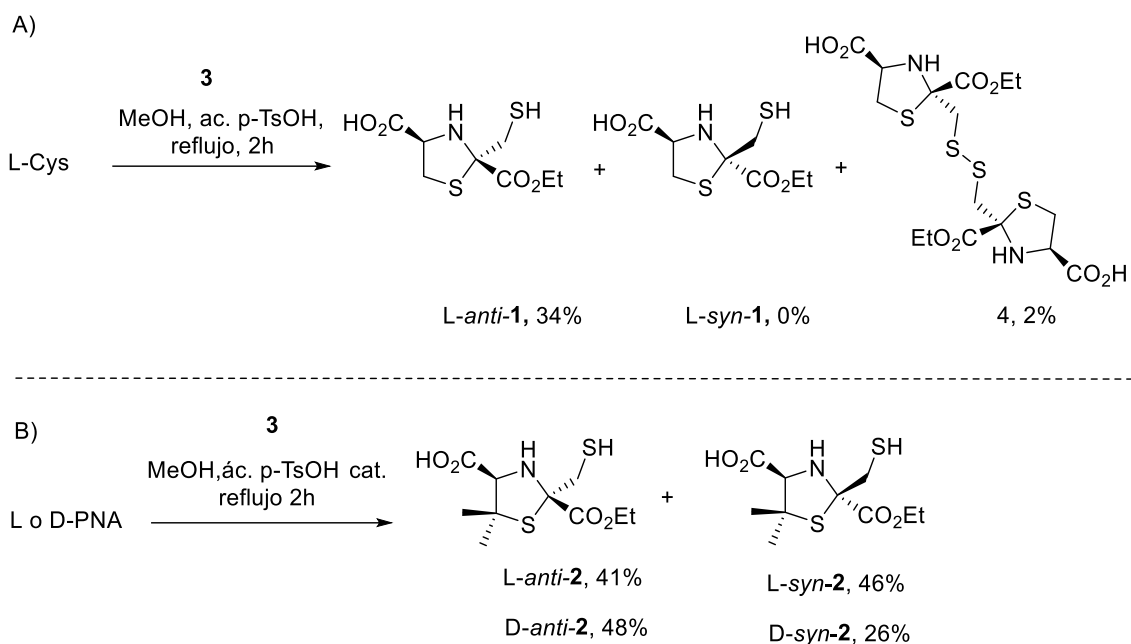
Como punto de partida, se preparó el ditiano **3** el cual nos va a servir como bloque de construcción en la síntesis de 2-MMT y análogos. El ditiano **3** se preparó de acuerdo con lo reportado por Nagasawa *et al.*⁸, ver Esquema 5.



Esquema 5. Ruta sintética empleada para la preparación del ditiano **3**

Se hizo reaccionar 3-bromo piruvato de etilo con NaSH en MeOH a baja temperatura (-15 a 0°C), para dar la mercaptocetona correspondiente, que en las condiciones de reacción dimeriza para dar el ditiano **3** con 71% de rendimiento. El paso crítico de la reacción es la pureza de la sal de NaSH que se utiliza, que debe secarse por 4 h a vacío y se debe utilizar un frasco recién abierto.

Luego de obtenido el ditiano **3**, se procedió a la síntesis de las 2-MMT **1** y **2** a partir de L-Cys y L y D-PNA respectivamente, Esquema 6.



Esquema 6. Síntesis de 2-MMT: A) partiendo de L-Cys; B) partiendo de L y D-PNA

Cuando se probó la ciclocondensación de L-Cys con **3**, en MeOH y ác. *p*-TsOH a reflujo (Esquema 6, A), en el espectro de ^1H -RMN del crudo de reacción se observó una mezcla de diastereómeros *anti:syn* en relación 56:44. Sin embargo al purificar por cromatografía en columna se aisló únicamente el diastereómero L-*anti*-1 (34%) y el producto secundario **4** (2%). La caracterización de **4** por ^1H y ^{13}C RMN, y HRMS nos permitió identificarlo como la forma dimérica de L-*anti*-1. Los espectros de ^1H -RMN del crudo de reacción y del diastereómero L-*anti*-1 puro se muestran en la Figura 1.

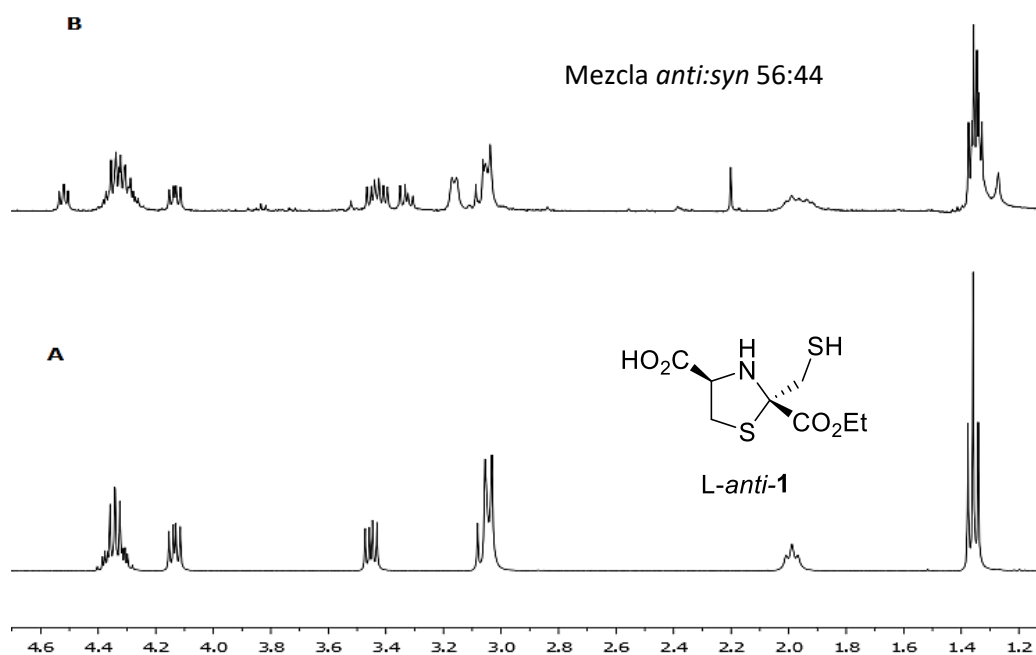


Figura 1. Espectros de ^1H -RMN (400MHz, CDCl_3): A) diastereómero aislado L-*anti*-1, B) crudo de reacción donde se observan los dos diastereómeros en una relación *anti:syn* 56:44

Cuando se probó la ciclocondensación en las mismas condiciones entre L o D-PNA y **3** (Esquema 6, B), se observó por ^1H -RMN en los crudos de ambas reacciones una mezcla de diastereómeros *anti:syn* 60:40. Por cromatografía en columna se logró aislar los cuatro diastereómeros enantioméricamente puros L-*anti*-2 (41%), L-*syn*-2 (46%), D-*anti*-2 (48%), D-*syn*-2 (26%). Los espectros de ^1H -RMN tanto del crudo de reacción como de los productos puros derivados de L-PNA se muestran en la Figura 2.

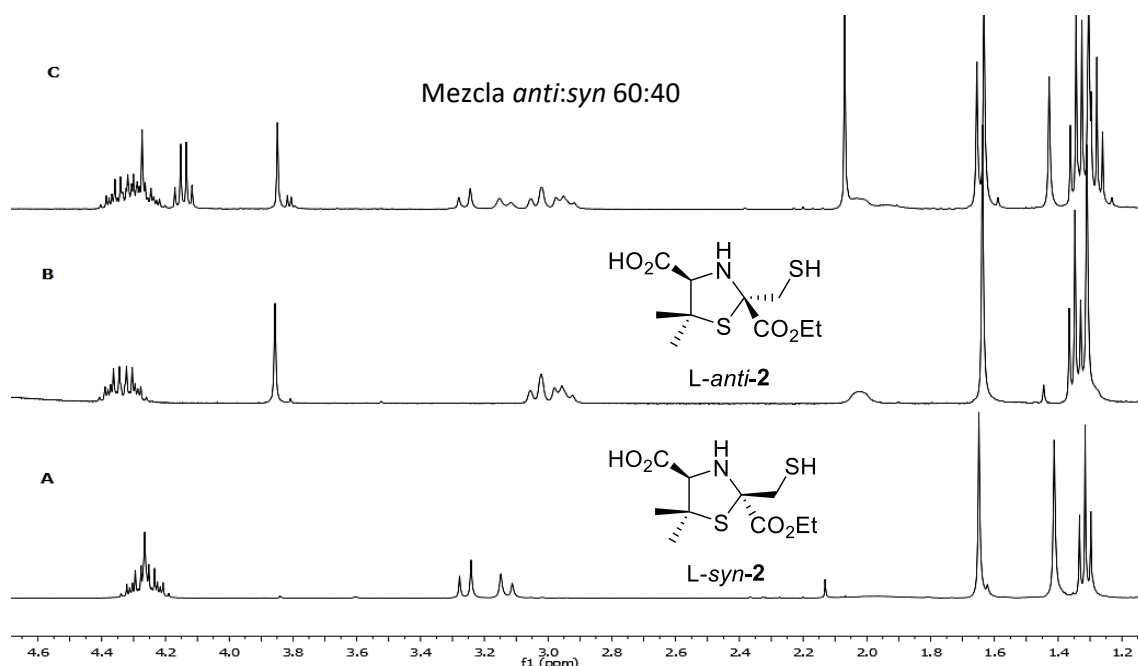


Figura 2. Espectros de ¹H-RMN (400MHz, CDCl₃): A) diastereómero aislado puro L-*syn*-2; B) diastereómero aislado puro L-*anti*-2; C) crudo de reacción dónde se observan los diastereómeros en una relación *anti:syn* 60:40

Por lo tanto, en las condiciones ensayadas para ambas tiazolidinas vimos la formación de los dos diastereómeros en el crudo de reacción, siendo el diastereómero *anti* el mayoritario en ambos casos (aproximadamente 60%). Sin embargo, en el caso de la tiazolidina **1**, sólo se pudo aislar el diastereómero *anti* con 34% de rendimiento. Este rendimiento es superior al obtenido anteriormente (23%) pero sigue siendo un rendimiento bajo siendo que este diastereómero se formó en un 60% en el crudo de reacción. En el caso de las tiazolidinas **2** derivadas de PNA, se logró aislar el diastereómero *syn* que no había sido aislado anteriormente.

3.3.1B Optimización de la reacción de obtención de la tiazolidina **1** utilizando Experimentación de Alto Rendimiento

Dado que el rendimiento obtenido para L-*anti*-1 no superó el 34%, decidimos ampliar el espacio químico explorado para esta reacción utilizando la metodología de Experimentación de alto rendimiento (HTE por su sigla en inglés). Esta metodología permite variar y probar una gran cantidad de condiciones de reacción en un período corto de tiempo y utilizando cantidades muy pequeñas de reactivos.

3.3.1B.1. Consideraciones generales sobre HTE

La metodología de HTE busca identificar rápidamente las mejores condiciones de reacción, y ofrece la posibilidad de ejecutar y analizar un gran número de reacciones en muy poco tiempo, y por lo tanto acelera la optimización de los procesos estudiados. Además, el uso de HTE permite el descubrimiento de nuevas reacciones y genera “hits” que podrían permanecer inexplorados debido al gran número de reacciones individuales que deberían ser llevadas a cabo utilizando las metodologías convencionales^{9,10,11}. Esta metodología fue inspirada en técnicas que fueron desarrolladas en el campo biológico y está siendo cada vez más utilizada para acelerar la optimización de reacciones tanto en la industria farmacéutica como en las instituciones académicas¹².

El empleo de HTE permite trabajar a microescala (2-10 μmol), utilizando cantidades muy pequeñas de reactivos. Las reacciones pueden ser llevadas a cabo empleando una escala tan pequeña como 2.5 μmol /reacción y 0.25 μmol de catalizador, lo que se traduce en microgramos de materiales, minimizando así el uso reactivo de alto valor, limitando la generación de desechos y dando lugar al desarrollo de procesos más sustentables. Estas reacciones son llevadas a cabo en bloques de micro evaluación con viales de 250 μL a 1 ml de capacidad, en un formato de 24 a 96 viales por bloque. Estos bloques se cierran herméticamente y permiten trabajar en un amplio rango de temperaturas y condiciones (anhidras, atmósfera inerte o atmósfera de un gas reactivo como H_2 o CO).

3.3.1B.2. Metodología empleada para la optimización de la obtención de L-*anti*-1

La metodología de optimización para la obtención de L-*anti*-1 por HTE implicó cinco pasos, Esquema 7: 1) diseño del experimento, 2) preparación del mismo, 3) desarrollo de las reacciones, 4) análisis e identificación de las mejores condiciones, y 5) escalado



Esquema 7. Esquemización del flujo de trabajo empleado en el HTE

Paso 1: *Diseño del experimento*

Para el diseño del experimento se usó el software *Library Studio*. Este software permitió ingresar los datos de reactivos (PM, estado), relaciones molares (equivalentes), disolventes (PM, densidad) y condiciones de proceso (Temperatura, presión). El programa creó una hoja de trabajo dónde calculó específica y automáticamente que cantidad de reactivo pesar para preparar soluciones stock en un disolvente común y las alícuotas a transferir. La preparación de soluciones stock facilitó y permitió hacer dosificaciones más reproducibles en todos los viales, ya que las concentraciones de reactivos que se usaron fueron de 10 μmol .

Paso 2: *Preparación del experimento*

La preparación del ensayo implicó la preparación de las soluciones stock de los reactivos y la dosificación de estos. La dosificación se realizó en viales de 1 mL de capacidad, ubicados en bloques de 24 y 48 posiciones. Los bloques luego se cerraron herméticamente por un sistema de tornillos, Figura 3. En este paso, fue muy importante el orden de dosificación de los reactivos, teniendo en cuenta su reactividad y descomposición, los compuestos más reactivos se agregan al final.



Figura 3: Imagen de un bloque de trabajo con 24 viales

Paso 3: *Desarrollo de las reacciones*

El desarrollo de las reacciones se realizó según las condiciones establecidas para el screening (temperatura, tiempo, disolventes, catalizadores, etc). Todos los viales contenían micropastillas magnéticas para su debida agitación. Los bloques se calentaron en planchas calefactoras por 2 o 12h. Terminadas las reacciones se abrieron y se inspeccionan para ver si las reacciones presentaban solubilidad completa/parcial, cambios de coloración, evaporación, etc.

Paso 4: *Análisis*

Las reacciones se inspeccionaron ocularmente descartando los viales que presentaban evaporación de disolvente. El resto de los viales se monitorearon por cromatografía en capa fina (TLC). Se les realizó un workup a aquellos viales que mostraron mayor avance de reacción por TLC. El mismo se realizó agregando 500 μ L de una solución MeCN:AcOH 5%, con 1 μ mol de ácido benzoico como estándar externo. El método de análisis de las reacciones por HPLC-MS no se pudo poner a punto, y se decidió analizar por ^1H -RMN algunos crudos de reacción para obtener el porcentaje de conversión.

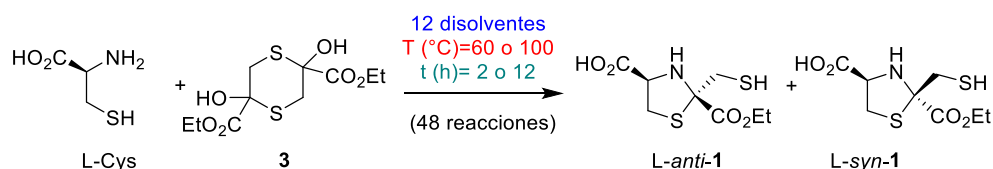
Paso 5: *Escalado*

Una vez analizados los resultados, se seleccionaron para su escalado aquellas condiciones de reacción que mostraron por ^1H -RMN mayor formación del producto deseado L-*anti*-1 en el crudo de reacción. Se purificó por cromatografía en columna y se aisló L-*anti*-1.

3.3.1B.3. Resultados y Discusión del Primer screening por HTE: Optimización del tiempo y Temperatura de reacción

Primero se realizó la optimización del disolvente, en ausencia de catalizador, utilizando 12 disolventes, a dos temperaturas (60 y 100°C) y a dos tiempos de reacción (2h y 12h). Los disolventes elegidos para el screening incluían disolventes próticos como H₂O y distintos alcoholes (MeOH, EtOH, BuOH, i-prOH, TFE), disolventes polares apróticos como DMSO, DMF, MeCN, DCE y también éteres como dioxano y THF. Se realizaron un total de 48 reacciones, los resultados obtenidos se describen en la Tabla 1.

Tabla 1: Screening de disolventes para la formación de L-*anti*-1.



Temperatura (°C)	Disolventes próticos						Éteres		Disolventes polares apróticos				tiempo (h)
	H ₂ O	MeOH	EtOH	BuOH	i-PrOH	TFE	Dioxano	THF	DMF	DMSO	MeCN	DCE	
60		65	63			63							2
100		40		67									
60													12
100													

100 80 60 40 20 0

Escala de formación de tiazolidina observada por TLC

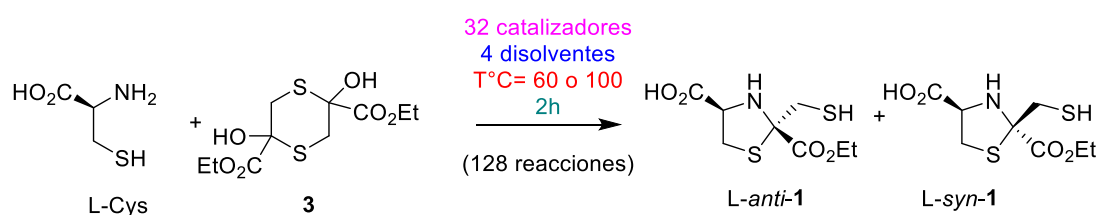
El color de las celdas depende de la formación de tiazolidina observada por TLC (ver escala), cuando por TLC se observó un % de conversión > 40%, los crudos se analizaron por ¹H-RMN. Los % de conversión obtenidos están referidos al diastereómero *anti*. La concentración de ditiano **3** fue de 10 μmol en una relación molar con L-Cys (1: 3)

Se consideraron como buenos resultados aquellos crudos analizados por ¹H-RMN con una conversión del diastereómero *anti* mayor a 60%. Las reacciones realizadas en los disolventes MeOH, EtOH y TFE a 60°C, 2h y en BuOH a 100°C, 2h, resultaron ser las más prometedoras. Por lo que se concluyó que la reacción procede mejor en solventes próticos del tipo alcoholes.

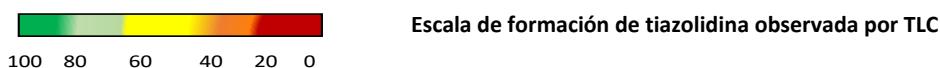
3.3.1B.4. Resultados y Discusión del Segundo screening por HTE: Optimización de catalizadores

En este segundo screening se probaron 32 catalizadores en las condiciones encontradas en el primer screening (MeOH, EtOH, TFE a 60°C, 2h y BuOH a 100°C, 2h). Entre los catalizadores utilizados había catalizadores ácidos, básicos, ácidos de Lewis y metálicos. Se realizaron un total de 128 reacciones, los resultados obtenidos se describen en la Tabla 2.

Tabla 2: Screening de catalizadores en la formación de L-*anti*-1.



	K ₂ CO ₃	Zn(OTf) ₂	In(OTf) ₃	Bi(OTf) ₃	AgOTf	CuCl	NH ₄ OAc	PPh ₃	KCl	LiCl	CuBr ₂	Ag ₂ O	ZnBr ₂	SnCl ₄ ·2H ₂ O	IBr	Cu(OAc) ₂	4-DMAP	LiBr	Oxone	KBr	Zn	P-TsOH	MgCl ₂	CuBr	DIPEA	TEA	CuSO ₄ ·2H ₂ O	NH ₄ Cl	MgSO ₄	H ₃ BO ₃	CsCO ₃	CeCl ₃	
60°C	MeOH	55						95	75	65																							
	EtOH																																
	TFE																																
100°C	BuOH							64																									



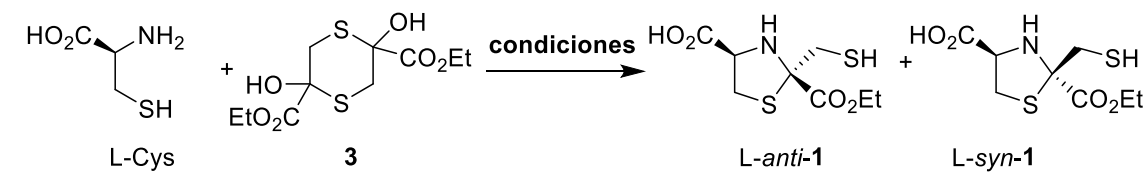
El color de las celdas depende de la formación de tiazolidina observada por TLC (ver escala), los % de conversión descriptos fueron obtenidos por ¹H-RMN y se refieren al diastereómero *anti*-1

Según los resultados obtenidos en ambos screenings (176 reacciones), las condiciones en dónde se logra el diastereómero L-*anti*-1 con un mayor porcentaje de conversión son:

- 1) BuOH, 100°C, sin catalizador (Screening 1), 2) BuOH, PPh₃, 100°C, 2h (Screening 2) y
- 3) MeOH, LiCl, 60°C, 2h (Screening 2).

3.3.1B.5. Escalado:

Una vez identificadas las mejores condiciones para la formación de L-*anti*-1 a microescala, se decidió escalar las reacciones, Tabla 3.

Tabla 3: Escalado de la obtención de L-*anti*-1


Entrada	Condiciones	HTE % conversión (<i>anti/syn</i>)-1 ^a	Escalado % conversión (<i>anti/syn</i>)-1 ^a	Rendimiento L- <i>anti</i> -1 (%) ^b
1	L-Cys, MeOH, LiCl, 60°C, 2 h	60/40	65/35	35
3	D-Cys, EtOH, LiCl, reflujo, 2h,	59/41	70/30	38
4	L-Cys, BuOH, 100°C, 2 h	64/36	65/35	27
5	L-Cys, BuOH, PPh ₃ , 100°C, 2 h	63/37	68/32	25

^a Relación *anti:syn* obtenida por ¹H-RMN del crudo de reacción teniendo en cuenta las señales independientes de los diastereómeros; ^b Rendimiento del producto aislado obtenido por purificación en columna de SiO₂.

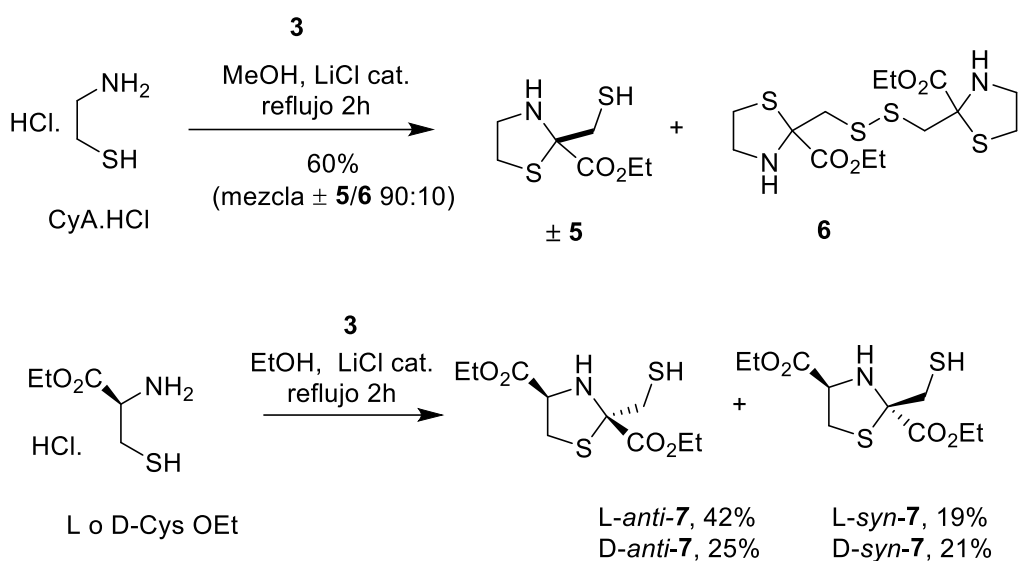
La conversión *anti/syn* de los ensayos a microescala (10 μmoles) demostraron ser reproducibles a una escala sintética de 0.34 mmoles. El porcentaje de conversión del diastereómero L-*anti*-1 en todas las condiciones escaladas fue mayor al 65%. Sin embargo, al momento de intentar aislar el producto puro, los porcentajes obtenidos fueron de 35% para L-*anti*-1 y 38% para D-*anti*-1. De todas formas, las mejores condiciones parecen ser el uso de MeOH o EtOH como disolvente y la incorporación de LiCl como catalizador.

Por lo tanto, Se logró explorar un amplio espacio químico para la reacción de obtención de L-*anti*-1, en un total de 176 reacciones usando un total de 521 mg de ditiano **3**. Sin embargo, no se logró cambiar significativamente la proporción de los diastereoisómeros obtenidos inicialmente. El porcentaje máximo de obtención del producto L-*anti*-1 puro fue 38%, y el isómero *syn* no pudo ser aislado en ninguna de las condiciones.

3.3.2. Diseño, síntesis y caracterización estructural de nuevos análogos de 2-MMT

3.3.2A. Modificaciones a nivel del ácido carboxílico en C4

Planteamos hacer modificaciones a nivel del ácido carboxílico en C4 y preparar dos tipos de análogos, sustituyendo el ácido carboxílico por un H ($R^3 = H$) o por un éster etílico ($R^3 = CO_2Et$). Para ello realizamos reacciones de ciclocondensación entre el ditiano **3** y los aminotioles cisteamina clorhidrato (CyA.HCl) o L o D-cisteína etil éster clorhidrato (Cys OEt.HCl). Las reacciones se llevaron a cabo en MeOH o EtOH a reflujo usando LiCl como catalizador, Esquema 8.



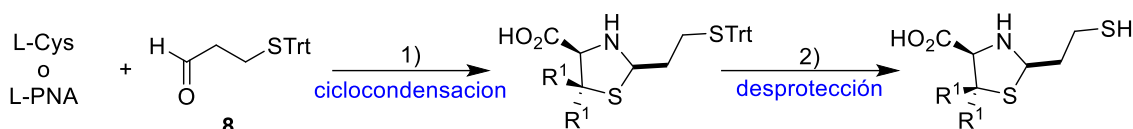
Esquema 8. Síntesis de análogos **5** y **7** con modificaciones en C4 ($R^3 = H, CO_2Et$)

Mediante la ciclocondensación de **3** con CyA.HCl se obtuvo el compuesto \pm **5** ($R^3 = H$) como una mezcla racémica (60%). A pesar de que se realizaron varias repurificaciones por cromatografía en columna utilizando distintas fases móviles, el producto no pudo ser purificado totalmente, y se obtuvo siempre en una relación 90:10 con su producto de oxidación **6**. Cuando se realizó la reacción con L o D-Cys OEt.HCl, en los crudos de reacción por 1H -RMN se observó en ambos casos una mezcla de diastereómeros *anti:syn* 56:44. Por cromatografía en columna se logró aislar los cuatro diastereómeros enantioméricamente puros L-*anti*-**7** (42%), L-*syn*-**7** (19%), D-*anti*-**7** (25%) y D-*syn*-**7** (21%).

Por lo tanto, en este objetivo se pudieron preparar cinco nuevos análogos de 2-MMT con sustituciones en C4 (R³) diferentes a un ácido carboxílico.

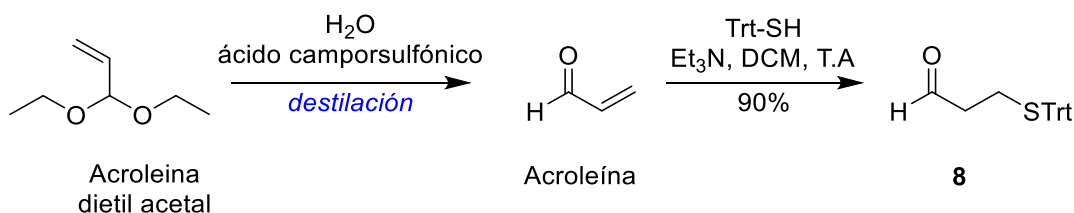
3.3.2B. Homologación de la cadena mercaptometilo en 2-MMT

Planteamos homologar la cadena mercaptometilo, con el fin de observar si al alargar la cadena en un CH₂ y aumentar la flexibilidad, se logra también aumentar la interacción inhibidor- enzima en el sitio activo. Para la síntesis de estos análogos planteamos realizar 2 pasos: 1) ciclocondensación entre L-Cys o L-PNA y el aldehído 3-tiotritil-propanal **8** para obtener las tiazolidinas correspondientes con la cadena mercaptoetilo STrt y 2) desprotección del grupo tritilo para obtener los análogos con la cadena mercaptometilo SH, Esquema 9.



Esquema 9. Secuencia sintética planteada para la obtención de los análogos con la cadena mercaptometilo homologada

El primer paso fue la preparación del aldehído **8** utilizando la metodología descrita por Bhansali *et al*, a partir de acroleína.¹³ La acroleína a su vez se obtuvo por hidrólisis de acroleína dietiléster en H₂O, ácido camporsulfónico y posterior destilación. La adición conjugada de acroleína con trifenilmetanotiol (Trt-SH) permitió obtener **8** con un 90% de rendimiento, Esquema 10.



Esquema 10: Metodología empleada para la preparación del aldehído **8**

Una vez obtenido el aldehído **8**, se procedió a la preparación de los análogos según la secuencia sintética planteada, Tabla 4.

Tabla 4. Síntesis de análogos 2-MMT con la cadena mercaptometil homologada

Entrada	Ciclocondensación	Desprotección
	Producto % (relación <i>anti/syn</i>)	Producto % (relación <i>anti/syn</i>)
1	L- <i>anti/syn</i> -9, 31 (60:40)	L- <i>anti/syn</i> -11, 0 ^a
2	L- <i>anti/syn</i> -10, 59 (60:40)	L- <i>anti/syn</i> -12 53 (60:40) ^b

Las relaciones *anti:syn* fueron determinadas por ¹H-RMN teniendo en cuenta las señales independientes de cada diastéromero. Las condiciones de desprotección fueron: ^a [9]=0.01M, TFA/TIS/DCM (8:8:84), 5 minutos; ^b [10]=0.05M, TFA/TIS/DCM (5:5:90), 15 minutos

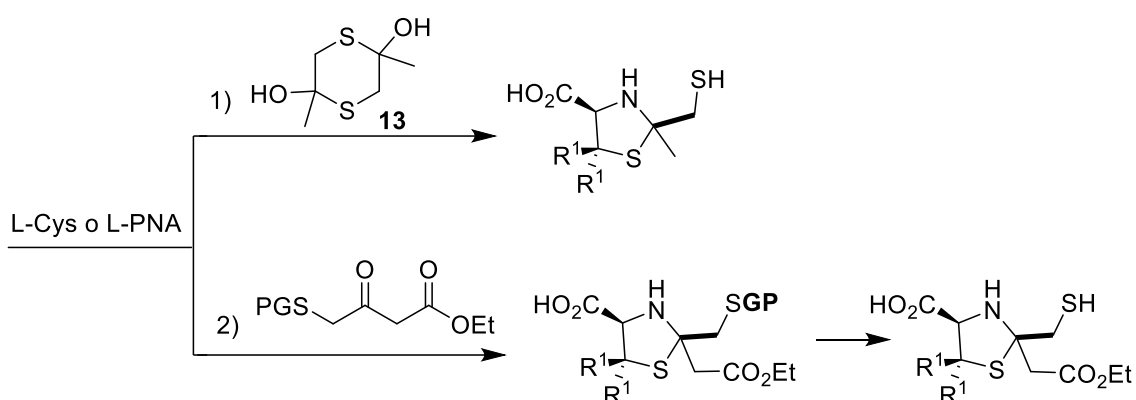
En las reacciones de ciclocondensación se logró obtener los productos L-*anti/syn*-9 y L-*anti/syn*-10 con 31 y 59% de rendimiento respectivamente, ambos como mezclas diastereoméricas inseparables.

La desprotección del grupo tritilo del compuesto L-*anti/syn*-9 se realizó utilizando una concentración de [9] = 0.01 M y se trató con una solución TFA/TIS/DCM (8:8:84) por 5 minutos, Tabla 4, entrada 1. En esas condiciones el producto de partida se descompuso y no se logró obtener el producto de desprotección 11. Para la desprotección de L-*anti/syn*-10 se usó una concentración de [10]= 0.05M, una solución TFA/TIS/DCM (5:5:90) por un período de 15 minutos, Tabla 4, entrada 2. En este caso, sí se logró obtener el compuesto L-*anti/syn*-12 con un rendimiento de 53%, pero resultó ser muy inestable en solución y sólo se pudo caracterizar por ¹H, HSQC y HMBC-RMN.

Por lo tanto, decidimos no seguir trabajando con estos compuestos para su futura evaluación biológica dada su inestabilidad.

3.3.2C. Modificaciones sobre el C2 ($R^2 = \text{Me}, \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$)

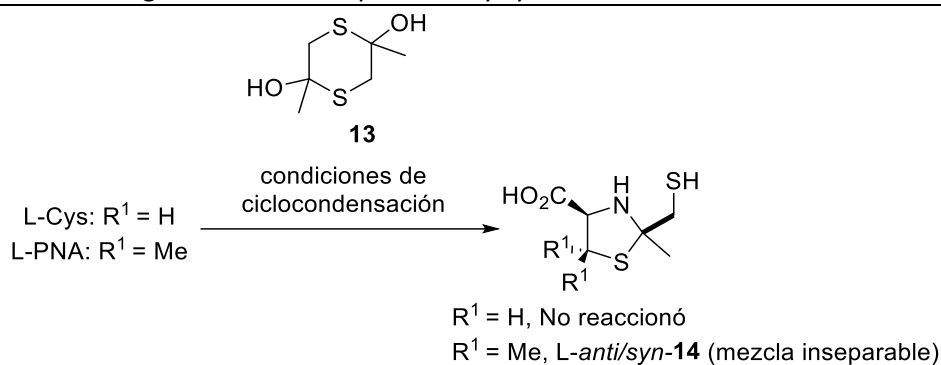
Para preparar los análogos con modificaciones en R^2 , se propuso obtenerlos a partir de la ciclocondensación de los aminotioles Cys o PNA con: 1) 2,5-dimetil-2,5-diol-1,4-ditiano **13** disponible comercialmente, que nos permite obtener análogos con $R^2 = \text{Me}$ y 2) α -mercaptocetonas con el tiol protegido que nos permiten obtener análogos con $R^2 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, Esquema 11. En el caso de la ciclocondensación con α -mercaptocetonas es necesario realizar luego un paso de desprotección para obtener los análogos con el tiol libre.



Esquema 11. Síntesis propuesta para preparar análogos con modificaciones en C2 ($R^2 = \text{Me}, \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$)

3.3.2C.1. Síntesis de Análogos con $R^2 = \text{Me}$

La reacción de ciclocondensación entre Cys o PNA y el ditiano **13** se probó en varias condiciones, los resultados obtenidos se describen en la Tabla 5.

Tabla 5: Síntesis de análogos con R² = Me a partir de Cys y PNA

Entrada	Aminotiol De partida	Condiciones de ciclocondensación	Producto % (relación <i>anti/syn</i>)
1	L-Cys	ác. <i>p</i> -TsOH cat., MeOH, reflujo ^a	0
2	L-Cys	ác. <i>p</i> -TsOH cat., DCM, reflujo ^a	0
3	L-Cys	DABCO cat., MeOH, reflujo ^a	0
4	L-Cys	Piperidina cat., MeOH, reflujo ^a	0
5	L-PNA	ác. <i>p</i> -TsOH cat., MeOH, MW: 60°C, 30 min, 100W	L- <i>anti/syn</i> - 14 , 24 (60:40)
6	L-PNA	ác. <i>p</i> -TsOH cat., MeOH, reflujo ^a	L- <i>anti/syn</i> - 14 , 59 (60:40)
7	D-PNA	ác. <i>p</i> -TsOH cat., MeOH, reflujo ^a	D- <i>anti/syn</i> - 14 , 76 (60:40)

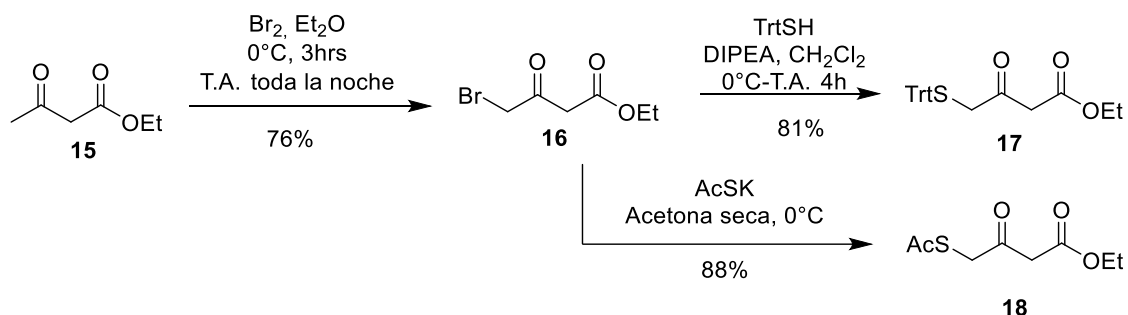
^a El tiempo de reflujo fue de 2 horas; Los catalizadores fueron usados en una concentración 5% Molar respecto al ditiano **13**.

La reacción de ciclocondensación entre L-Cys y **13** se probó en condiciones de catálisis ácida (Tabla 5, entradas 1 y 2) y catálisis básica (Tabla 5, entradas 3 y 4). En ninguna de las condiciones se logró obtener la tiazolidina deseada. La ciclocondensación entre L-PNA y **13** se realizó en MeOH con ác. *p*-TsOH como catalizador en dos condiciones de calentamiento distintas, reflujo y MW (Tabla 5, entradas 5 y 6). En ambos casos se obtuvo el producto esperado **14** y se lo aisló como una mezcla diastereómerica *anti:syn* inseparable con una relación 60:40. El mejor resultado se obtuvo en condiciones de calentamiento a reflujo con un rendimiento de 59%. Dados estos resultados, también se preparó la tiazolidina a partir de D-PNA y se obtuvo el producto D-*anti/syn*-**14** con un muy buen rendimiento, 76% (Tabla 5, entrada 7).

Por lo tanto, en esta etapa se estudió la reacción de obtención de derivados tiazolidinas con R² = Me. La 2-MMT derivada de Cys no se logró obtener y los análogos derivados de L y D-PNA fueron obtenidos como mezclas diastereoméricas inseparables con rendimientos moderados.

3.3.2C.1. Síntesis de Análogos con modificaciones en C2 ($R^2 = CH_2CO_2Et$)

Para preparar los análogos con $R^2 = CH_2CO_2Et$ se preparó primero las α -mercaptocetonas protegidas **17** y **18**. Se sintetizaron a partir de aceto acetato de etilo **15** según la secuencia que se describe en el Esquema 12.

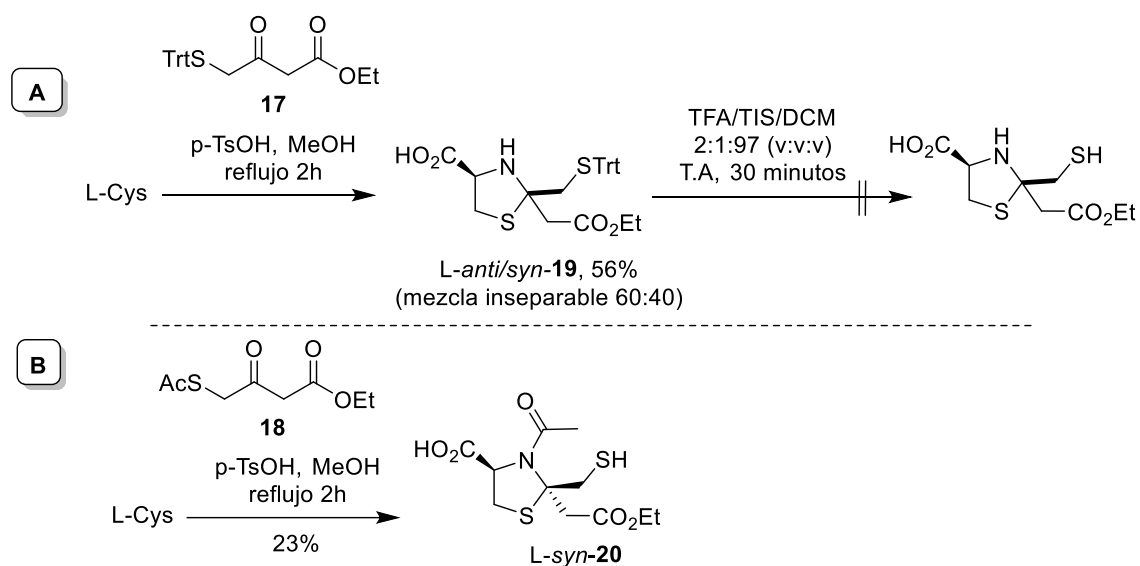


Esquema 12: Síntesis de α -mercaptocetonas tiotritilo **17** y tioacetilo **18** a partir de acetoacetato de etilo

Se logró obtener las dos α -mercaptocetonas con el tiol protegido con dos grupos distintos, con un grupo tritilo **17** (65%) y con un grupo acetilo **18** (88%). Luego de obtenidas se procedió a la síntesis de los análogos derivados de L-Cys y L-PNA.

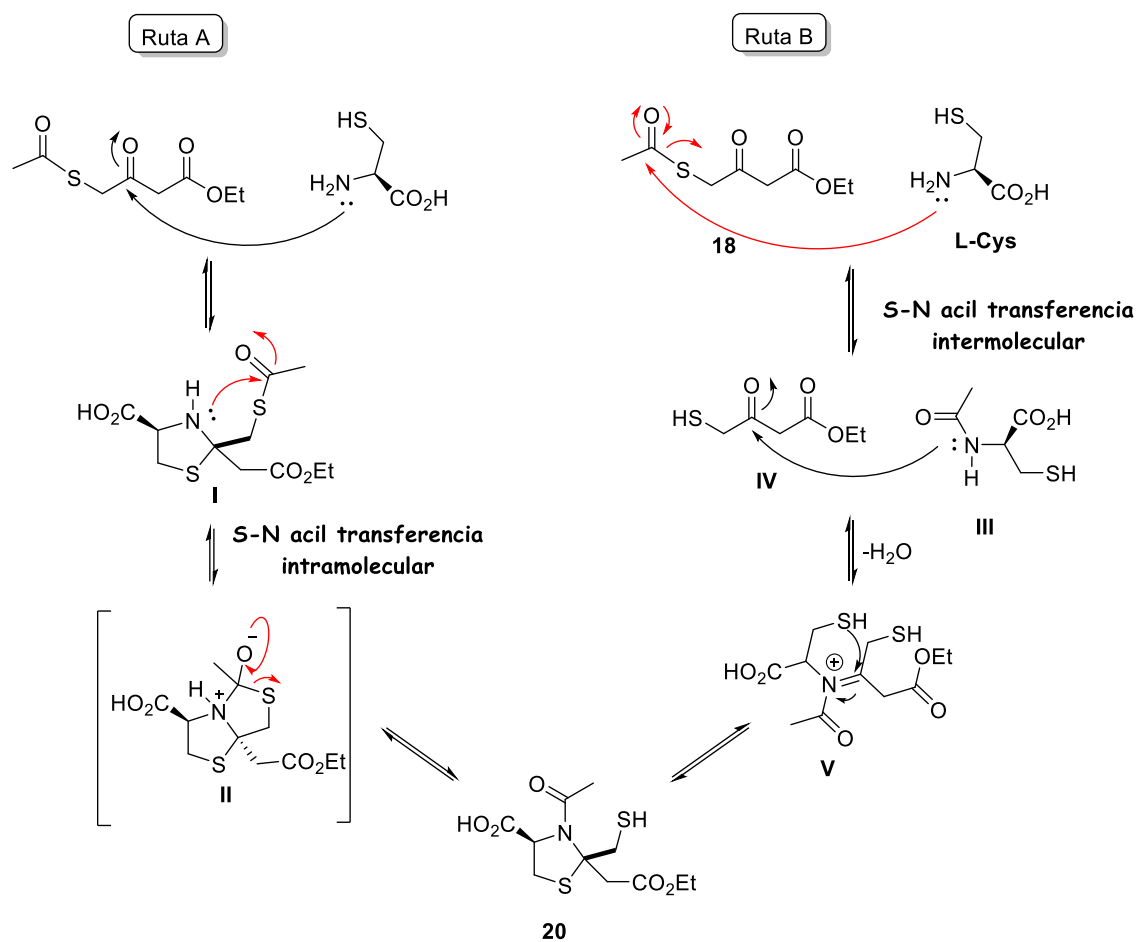
Derivados de L-Cys:

La secuencia sintética para obtener los derivados de L-Cys y las α -mercaptocetonas **17** y **18** se describe en el Esquema 13 A-B.



Esquema 13: Secuencia sintética para preparar derivados de L-Cys y las α -mercaptocetonas A) **17** y B) **18**

La ciclocondensación entre L-Cys y **17**, dio lugar a la tiazolidina tritilada **19** (56%) la cual se aisló como una mezcla inseparable anti:*syn* 60:40, Esquema 13-A. La desprotección del grupo tritilo en **19** se realizó usando una solución TFA/TIS/DCM (2:1:97) a T.A por 30 minutos, pero no se logró obtener el producto de desprotección. Cuando se realizó la ciclocondensación entre L-Cys y la α -mercaptocetona tioacetilada **18**, en las mismas condiciones de reacción en lugar de obtener el producto esperado se obtuvo la tiazolidina N-acetilada como un único diasterómero L-*syn*-**20** (23%), Esquema 13-B. Proponemos que el diasterómero que se forma es el *syn* ya que se encuentra descrito que la N-acilación de una mezcla de diasterómeros (*2R, 4R*) y (*2S, 4R*) se produce de manera preferencial sobre el enantiómero (*2R, 4R*) que en nuestro caso es el diasterómero *syn*^{14,15}. Por otro lado, la formación de la tiazolidina **20** en estas condiciones se puede explicar por una reacción de transferencia del acetilo del S al N. Este tipo de acil transferencia es un proceso químico selectivo de alto rendimiento muy utilizado en la síntesis de péptidos y proteínas para la formación de enlaces amida.¹⁶ El posicionamiento de los grupos amino y tioéster puede permitir que se produzca la transferencia intramolecular selectiva de S a N, particularmente si están en posición 1,2. Existen descritos numerosos estudios sobre el mecanismo de esta transferencia que destacan los factores involucrados en la misma, como el tamaño del anillo en el estado de transición, la conformación, enlaces de puente de H, interacciones NH- π , pH, y solvente, entre otros^{17,18, 19}. Dado que en literatura está descrito que la acil transferencia de S a N se puede dar tanto inter como intramolecular, proponemos dos posibilidades para la formación de **20**, Esquema 14.



Esquema 14: Mecanismo propuesto para la formación de la NAc tiazolidina **20**

La ruta A la cual pensamos sería la más probable, propone que en primer lugar se dé la formación de la tiazolidina **I** y luego una S-N acil transferencia intramolecular. Esta reacción ocurriría mediante el ataque del grupo amino de la tiazolidina al carbonilo del tioacetilo formando el intermedio bicíclico **II**, que luego por un movimiento de electrones evoluciona a la formación de la tiazolidina N-Ac **20**. La ruta B propone que primero se dé la desprotección de la mercaptocetona SAc **17**, mediante una reacción intermolecular entre el N de la cisteína y el grupo acetilo de **17** formando la Cys N-Ac **III**. La reacción de **III** con la mercaptocetona desprotegida **IV**, dando la formación de la tiazolidina **20** vía el intermedio iminio **V**.

Derivados de L-PNA:

Dada la dificultad que ha presentado la desprotección del grupo tritilo en este caso sólo se probó la ciclocondensación entre L-PNA y la α -mercaptocetona **18**, Tabla 6.

Tabla 6: Síntesis de análogos con $R^2 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ derivados de L-PNA

Entrada	Catalizador	disolvente	Conversión <i>anti/syn</i> ^a	Rendimiento (%) ^b	
				L- <i>anti</i> -21	L- <i>syn</i> -21
1	ác. <i>p</i> -TsOH (5% Molar)	EtOH	0	0	0
2	ác. <i>p</i> -TsOH (5% Molar)	MeOH	72:28	9	3
3	ác. <i>p</i> -TsOH (5% Molar)	DCM	75:25	29	6
4	-	BA pH=5	0	0	0

BA: Buffer acetato; ^a Relación *anti:syn* obtenida por ¹H-RMN del crudo de reacción considerando las señales independientes de cada diastereómero; ^b Rendimiento del producto aislado enantioméricamente puro.

La ciclocondensación entre L-PNA y **18** se probó con ác. *p*-TsOH en tres disolventes distintos (Tabla 6, entradas 1, 2 y 3). Cuando se usó EtOH como disolvente (Tabla 6, entrada 1) no se observó la tiazolidina deseada en el crudo de reacción. Sin embargo, cuando se usó MeOH y DCM, por ¹H-RMN se observó la formación de los dos diastereómeros de la tiazolidina **21** en una relación *anti:syn* 72:28 y 75:25 respectivamente, Tabla 6, entradas 2 y 3. En ambos casos se logró aislar los dos diastereómeros enantioméricamente puros, obteniéndose mejor rendimiento cuando se usó DCM como disolvente. En buffer acetato sin catalizador, no se obtuvo el producto deseado, Tabla 6, entrada 4.

Los espectros de ¹H-RMN del crudo de reacción y de los productos enantioméricamente puros se muestran en la Figura 4.

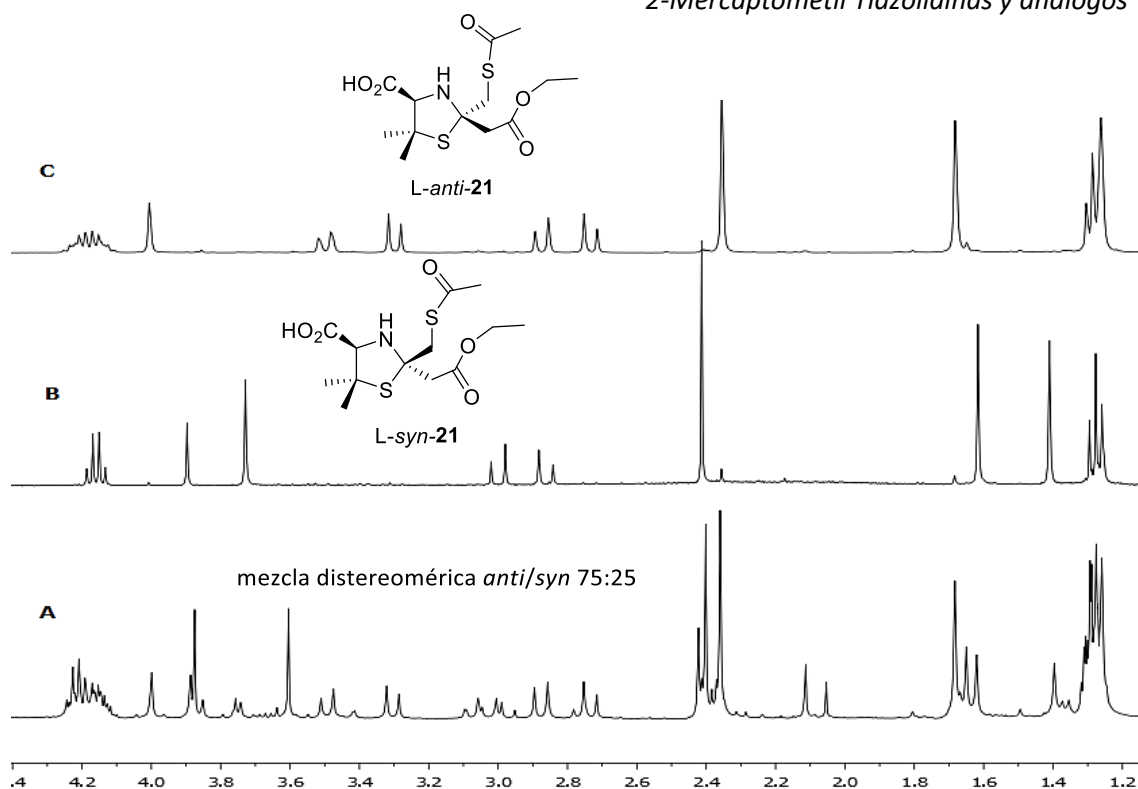


Figura 4. Espectros $^1\text{H-RMN}$ (400MHz, CDCl_3): A) mezcla diastereomérica *anti/syn*-**19** 75:25; B) diastereómero *L-syn*-**19** puro; C) diastereómero *L-anti*-**19** puro

La desprotección del grupo acetilo del diastereómero mayoritario *L-anti*-**21**, se probó en dos condiciones distintas, Tabla 7.

Tabla 7: Condiciones y resultados de la desprotección del grupo acetilo

Entrada	Condiciones desprotección	Rendimiento <i>L-anti</i> - 20 (%)
1	Resina de intercambio (BER), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, MeOH, T.A. 1 h	-
2	CyA.HCl, Buffer fosfato pH = 8, MeOH, T.A. 1 h	24

En primer lugar se probó la metodología de desprotección descrita por Yoon *et al.* usando una resina de intercambio de borohidruro (BER) y una cantidad catalítica de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ en metanol,²⁰ pero no se logró aislar el producto deseado, Tabla 7, entrada 1. La resina BER fue preparada de acuerdo con lo descrito en literatura y el contenido de borohidruro en la resina se analizó por evolución de hidrógeno en la acidificación con

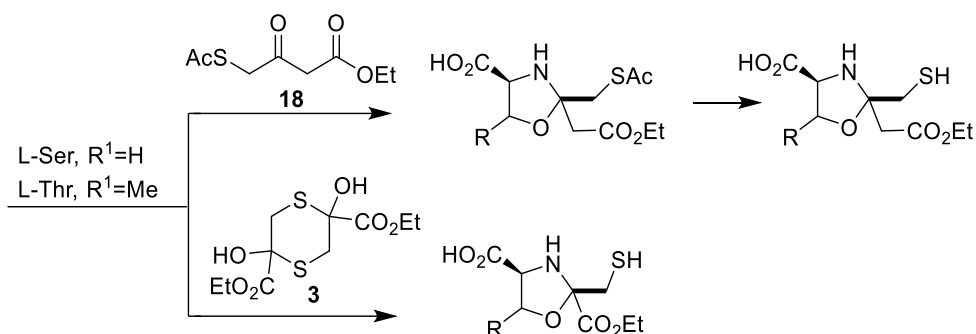
HCl 6M, determinando que el promedio de NaBH_4 era de 3.51 mmoles/g³⁷. Por otro lado, se probó la desprotección del acetilo en buffer fosfato pH = 8 y en presencia de CyA.HCl²¹ y en este caso sí se logró obtener el producto de desprotección L-*anti*-**22** (24%), Tabla 7, entrada 2.

Por lo tanto, cuando se hizo reaccionar L-Cys con la α -mercaptocetona STrt se logró preparar el derivado esperado, pero resultó ser inestable en las condiciones de desprotección. Cuando se usó la α -mercaptocetona SAc en lugar del derivado esperado, se observó una S-N acil transferencia y se obtuvo el producto N-acetilado con el tiol libre L-*syn*-**20**. La reacción entre L-PNA y α -mercaptocetona SAc en cambio dio lugar a la formación de los dos diasterómeros del producto esperado, que se pudieron aislar enantioméricamente puros. El diasterómero mayoritario pudo ser desprotegido con cisteamina y se obtuvo el análogo L-*anti*-**22**.

3.3.2D. Síntesis de análogos oxazolidinas

Existe en literatura varios reportes de la síntesis de oxazolidinas derivadas de aminoalcoholes como serina (Ser) o treonina (Thr) y distintos aldehídos^{22,23}. Estas reacciones se llevan a cabo en distintos disolventes como EtOH o MeOH en presencia de trietilamina²⁴, benceno/trietilamina²⁵, NaOH 2N^{26,27}, o en ausencia de disolvente²⁸. Sin embargo, hay muy poca información sobre oxazolidinas derivadas de cetonas probablemente porque dan reacciones muy lentas dependiendo de la reactividad del grupo carbonilo. Una de las síntesis reportadas a partir de aminoalcoholes y cetonas es la descrita por Bulman Page *et al.*²⁹ en presencia de $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ como ácido de Lewis y utilizando MW como fuente de calentamiento.

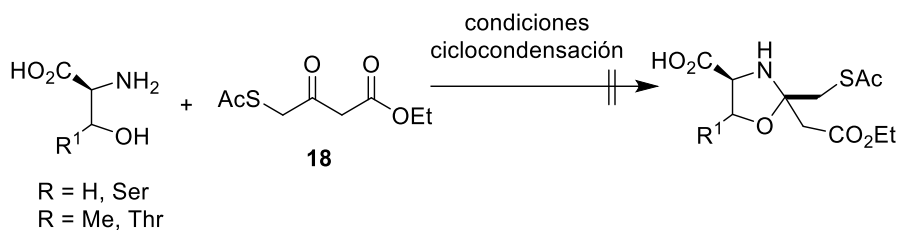
En nuestro caso planteamos preparar dos series de heterociclos 2-mercaptometil oxazolidinas (2-MMO) a partir de los aminoalcoholes como serina (Ser) o treonina (Thr). Una serie derivada de la α -mercaptocetona **18** con el caboxilato homologado en el C2, y otra serie derivada del ditiano **3** con una cadena etil éster unida directamente al C2, Esquema 15.



Esquema 15: Síntesis planteada para preparar análogos oxazolidinas

Derivados de α -mercaptocetona **18:**

Para la preparación de estos análogos se probaron varias condiciones de ciclocondensación, los resultados obtenidos se describen en la tabla 8.

Tabla 8. Síntesis de 2-MMO derivadas de α -mercaptocetona **18**

Entrada	Aminoalcohol	Condiciones ciclocondensación	Rendimiento (%)
1	Ser	ác. <i>p</i> -TsOH cat., EtOH, reflujo, 2.5h	0
2	Ser	ác. <i>p</i> -TsOH cat., MeOH, reflujo 2h	0
3	Thr	ác. <i>p</i> -TsOH cat., MeOH, reflujo, 4h	0

En ninguna de las condiciones ensayadas se logró obtener las 2-MMO deseadas.

Derivados del ditiano **3:**

Estos análogos se probaron preparar a partir de Ser y Thr y sus respectivos ésteres metílicos. Se probaron varias condiciones de ciclocondensación y los resultados obtenidos se describen en la Tabla 9.

Tabla 9: Síntesis de 2-MMO derivadas del ditiano **3**

$$\text{R}^2\text{O}_2\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^1 \xrightarrow[\text{condiciones ciclocondensación}]{\mathbf{3}}$$

$$\text{R}^1\text{O}_2\text{C}-\text{CH}(\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2\text{SH})-\text{CH}(\text{R}^1)-\text{O}-\text{CO}_2\text{Et}$$

$\text{R}^2 = \text{R}^1 = \text{H}$; Ser
 $\text{R}^2 = \text{H}$, $\text{R}^1 = \text{Me}$; Thr
 $\text{R}^2 = \text{Me}$, $\text{R}^1 = \text{H}$; Ser OMe
 $\text{R}^2 = \text{R}^1 = \text{Me}$; Thr OMe

Entrada	aminoalcohol	Condiciones	Rendimiento
			%
1	L-Ser	MeOH, LiCl, MW:65°C, 50W, 20 min.	0
2	L-Thr	EtOH, LiCl, reflujo, 2h	0
3	L-Ser OMe. HCl	EtOH, LiCl, reflujo, 2h	0
4	L-Thr OMe. HCl	EtOH, LiCl, reflujo, 2h	0
5	L-Thr OMe. HCl	BA pH 5	0
6	L-Thr OMe. HCl	Benceno, Et ₃ N, reflujo, Dean-stark, 4h	0
7	L-Thr	NaOH 2N, 0°C-T. A, 7h	0

BA: Buffer acetato

En ninguna de las condiciones ensayadas se logró obtener los productos deseados. El uso de benceno y Et₃N a reflujo con Dean Stark para eliminar el agua formada en la reacción y desplazar el equilibrio hacia la formación de 2-MMO (Tabla 9, entrada 6) y el uso de condiciones básicas como NaOH 2N (Tabla 9, entrada 7) tampoco lograron favorecer la formación de las oxazolidinas.

Por lo tanto, no se logró obtener análogos 2-MMO a partir de los aminoalcoholes Ser y Thr o sus respectivos ésteres por condensación con el ditiano **3** o la α -mercaptocetona **18**.

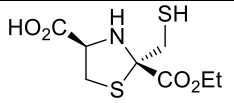
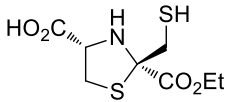
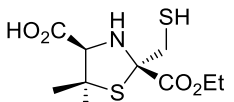
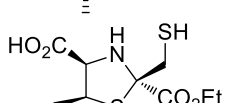
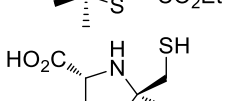
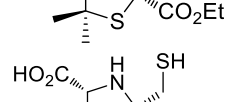
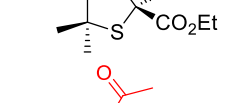
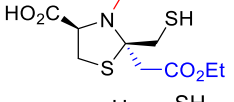
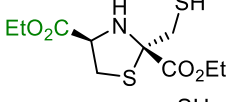
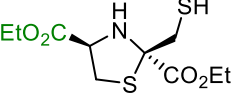
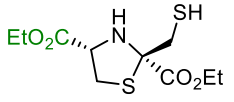
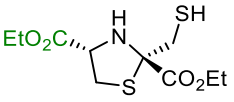
3.3.3 Estudios de evaluación biológica de 2-MMT

3.3.3A. Estudios de inhibición frente a Metallo β lactamasas

Se evaluó la potencia inhibitoria de las dos series de MMT **1** y **2** y de cinco análogos en distintas subclases de MBLs utilizando el carbapenemo Imipenem (IMI) como sustrato de las enzimas³⁰, Tabla 10. Los ensayos de inhibición enzimática estuvieron a cargo del

Prof. Alejandro Vila en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario-Argentina (IBR-CONICET).

Tabla 10: Constantes de inhibición K_i de las 2-MMT frente a MBLs de las tres subclases

Compuesto	Estructura Química	Constante de inhibición K_i (μM)				
		Subclase B1			Subclase B2	Subclase B3
		NDM-1	IMP-1	VIM-2	Sfh-1	L1
L-anti-1		5.2 ± 0.7	1.0 ± 0.2	0.38 ± 0.05	0.16 ± 0.03	10.0 ± 0.8
D-anti-1		2.5 ± 0.5	1.3 ± 0.1	0.39 ± 0.04	20 ± 2	4.0 ± 0.5
L-anti-2		0.44 ± 0.06	0.46 ± 0.05	0.75 ± 0.09	1.3 ± 0.1	20 ± 2
L-syn-2		8 ± 1	6.0 ± 0.6	3.6 ± 0.4	100 ± 10	28 ± 3
D-anti-2		3.1 ± 0.3	0.93 ± 0.08	0.9 ± 0.1	130 ± 10	1.4 ± 0.2
D-syn-2		0.60 ± 0.05	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	4.0 ± 0.6
L-syn-20		2.6 ± 0.6	-	-	NI	20 ± 4
L-anti-7		1.2 ± 0.1	-	-	-	5.6 ± 0.3
L-syn-7		8.2 ± 1	-	-	-	25 ± 2
D-anti-7		1.15 ± 0.06	-	-	-	9 ± 1
-D-syn-7		32 ± 2	-	-	-	55 ± 6
L-24		7 ± 1	8 ± 2	2.9 ± 0.2	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.03

ND: No determinado; NI: No produjo inhibición a una concentración $< 100 \mu\text{M}$

Las seis tiazolidinas **1** y **2** fueron evaluadas y presentaron inhibición frente a las tres subclases de M β L. El compuesto L-*anti-2* fue el que presentó el mejor perfil de inhibición frente a las de subclase B1 resultando casi 10 veces más activa en NDM-1 que el heterociclo bistiazolidina L-**24** reportado anteriormente por nuestro grupo. Los compuestos L y D-*anti-1* mostraron potencias similares frente a cada enzima (por ejemplo, 5,2 y 2,5 μ M contra NDM-1 para L-*anti-1* y D-*anti-1*, respectivamente) a pesar de ser enantiómeros. En el caso de las tiazolidinas **2** que tienen un grupo *gem* dimetilo, la estereoquímica tiene una influencia muy marcada en la inhibición. En NDM-1, los valores de K_i para estos cuatro compuestos variaron entre 0,44 y 8 μ M, siendo L-*anti-2* (0,44 μ M) y D-*syn-2* (0,60 μ M) los inhibidores más potentes, ambos con configuración 2S. En cambio, en los que tienen configuración 2R fueron 7 veces menos activos (D-*anti-2*) y 13 veces menos activo (L-*syn-2*), comparables a los valores de K_i obtenidos para los compuestos de la serie **1**. Frente a la enzima VIM-2, también perteneciente a la subclase B1, los compuestos mostraron un mejor perfil de inhibición, exhibiendo la mayor potencia los compuestos L y D- *anti-1* con valores similares. Respecto a la evaluación frente a IMP-1, enzima perteneciente a la subclase B1, los valores de K_i obtenidos variaron entre 0,46 y 20 μ M. Las tiazolidinas L y D-*anti-2* mostraron valores de K_i generalmente más bajos que sus contrapartes *syn*, tendencia también observada en VIM-2.

En la enzima Sfh-I de la subclase B2 los compuestos D-*anti* y D-*syn-2* además de L-*syn-2* y L-*syn-20* presentaron mala o nula inhibición. Sin embargo, L-*anti-1* presentó el mejor valor de K_i (0.16 μ M) para esta familia de compuestos incluso más bajo que el compuesto de referencia L-CS319.

Para la subclase B3 se evaluaron en la enzima L1, los valores de inhibición se encontraron entre 1.4 y 55 μ M, siendo D-*anti-2* el mejor inhibidor (1,4 μ M), pero aun así no supera la actividad de la referencia L-**CS319** que mostró una inhibición de 0.26 μ M.

Los cuatro análogos L y D-**7** que poseen un éster etílico en lugar del ácido carboxílico en posición C4, fueron evaluados frente a NDM-1 (B1) y L1 (B3). Frente a NDM-1 se observó que L-*anti-7* (1,2 μ M) y D-*anti-7* (1.15 μ M) fueron mejores inhibidores que sus

respectivos diasterómeros *syn* (8.2 y 32 μ M). Comparados con las tiazolidinas de referencia L y D-*anti-1*, los análogos fueron entre 4 y 2 veces más potentes. Frente a L1 (B1) nuevamente los diasterómeros *anti* presentan mejor inhibición que sus diasterómeros *syn*. El análogo L-*anti-7* (5.6 μ M) es casi 2 veces más potente que su análogo de referencia (10 μ M), en cambio D-*anti-7* (9 μ M) es 2 veces menos potente que D-*anti-1* (4 μ M). Por lo tanto, el cambio del ácido carboxílico en C4 por un éster etílico no produjo cambios significativos en la potencia inhibitoria respecto a sus tiazolidinas de referencia L y D-*anti-1* frente a NDM-1 y L1. En general los diasterómeros *syn* presentaron menos inhibición frente a NDM-1 y L1.

El análogo L-*syn-20* que presenta el anillo tiazolidina NAc y el éster etílico en el C2 homologado, también fue evaluado frente a NDM-1 y L1, inhibiendo ambas enzimas. Frente a NDM-1 presentó la mejor inhibición (2.6 μ M), presentando una inhibición similar a los diasterómeros L-*anti-1* y D-*anti-2* de las tiazolidinas de referencia. Por lo cual ninguno de los dos cambios que presenta este análogo mejoraron la inhibición frente a las M β Ls ensayadas.

En general, si comparamos la actividad que exhibieron las 2-MMT frente a la bistiazolidina L-**CS319**, podemos decir que para las 3 enzimas de la subclase B1, las 2-MMT fueron mejores inhibidores, en cambio en las enzimas Sfh-1 (B2) y L1 (B3) fue lo contrario. Excepto L-*anti-1* que presentó una inhibición de 0.16mM frente a Sfh-1 respecto a 0.26 μ M de L-**CS319**.

3.3.3B. IC₅₀ *in vivo* en células de *E. coli* que expresan NDM-1

A las tiazolidinas **1** y **2** que fueron las que presentaron mejor perfil de actividad frente a las M β L B1, se les evaluó la capacidad de penetrar la membrana externa bacteriana e inhibir NDM-1 dentro del periplasma bacteriano. Para ello se siguió por ¹H-RMN la hidrólisis de imipinem (IMI) por células de *E. coli* que expresan NDM-1, en presencia de 2-MMT a diferentes concentraciones, Tabla 11.

Tabla 11: IC₅₀ en célula de *E. coli* que expresa NDM-1

Compuesto	IC ₅₀ en célula (μM) ^a
L- <i>anti</i> -1	54 ± 4
D- <i>anti</i> -1	64 ± 5
L- <i>anti</i> -2	160 ± 10
L- <i>syn</i> -2	230 ± 30
D- <i>anti</i> -2	210 ± 10
D- <i>syn</i> -2	10 ± 1

^a NDM-1 en el periplasma de *E. coli* hidroliza completamente una solución de 500 μM de imipenem en 12-15min.

Según los resultados obtenidos, el inhibidor más potente fue D-*syn*-2 derivado de D-penicilamina, con un valor de IC₅₀ de 10 μM. Sin embargo, L-*syn*-2 derivado de L-penicilamina y los diastereómeros L y D-*anti*-2 mostraron potencias mucho más bajas, entre 16 y 23 veces menor. Estos valores de IC₅₀ relativamente elevados probablemente se debe a diferencias en la penetración celular y en la estabilidad del compuesto en el entorno celular. Los derivados de cisteína L y D-*anti*-1 también fueron menos potentes que D-*syn*-2, pero entre 5 y 6 veces menor. Por lo tanto, en general todas las 2-MMT evaluadas fueron capaces de proteger el IMI de la actividad hidrolítica de NDM-1, siendo D-*syn*-2 el mejor inhibidor.

3.3.3C. Citotoxicidad

Se evaluó la citotoxicidad de las dos series de 2-MMT **1** y **2** contra líneas celulares cultivadas HEK293, L929 y VERO a 260, 355 y 530 μM, Figura 5.

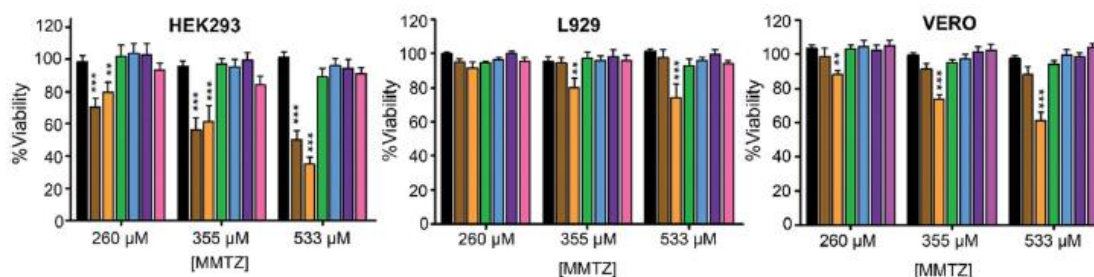


Figura 5. Citotoxicidad para las MMTZ en líneas celulares HEK293, L929 y VERO. Control (Negro), L-*anti*-1 (marrón), D-*anti*-1 (naranja), L-*anti*-2 (verde), L-*syn*-2 (azul claro), D-*anti*-2 (púrpura) y D-*syn*-2 (rosa).

Los derivados 2-MMT **2** con el grupo gem dimetilo no mostraron toxicidad en las condiciones ensayadas. Sin embargo, D-*anti*-1 (naranja) produjo una disminución en los

porcentajes de viabilidad celular en casi todas las condiciones, mientras que L-*anti-1* (marrón) mostró una toxicidad más selectiva hacia la línea celular HEK293.

3.3.3D. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se estudió si las 2-MMT **1**, **2** podían restaurar la actividad antibiótica de Imipenem (IMI) frente a aislados clínicos que producen MBLs de subclase B1. Para ello, se midió la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano luego de su incubación. En nuestro caso se midió la CMI de IMI en ensayos de microdilución a una concentración de 100 µg/ml de los inhibidores 2-MMT, Tabla 12. Estos ensayos estuvieron a cargo del Prof. Roberto Bonomo en Research Service, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, OH, USA.

Tabla 12: CMI de imipenem (IMI) y 2-MMT en aislados clínicos que expresan MBL B1

Aislado clínico	MβL	CMI (mg/L)						
		IMI	IMI + L- <i>anti-1</i>	IMI + D- <i>anti-1</i>	IMI + L- <i>anti-2</i>	IMI + L- <i>syn-2</i>	IMI + D- <i>anti-2</i>	IMI + D- <i>syn-2</i>
<i>K. pneumoniae</i> (1.37)	NDM-1	32	8	8	8	16	8	8
<i>E. coli</i> (8.68)	NDM-1	64	16	16	16	32	16	32
<i>K. pneumoniae</i> (LC 82)	IMP-13	1	0.5	0.25	0.25	1	0.25	0.5
<i>Enterobacter</i> spp. (42713)	IMP	16	16	8	8	16	8	8
<i>P. mirabilis</i> (UNC KPC 170) ^a	IMP	16	8	8	4	16	1	8
<i>K. pneumoniae</i> (6907)	VIM-2	4	2	2	1	4	1	4
<i>K. pneumoniae</i> (6907)	VIM-2	8	4	2	2	4	2	4
<i>K. pneumoniae</i> (5639)	VIM-24	8	8	4	4	8	1	8

^aDebido a la menor susceptibilidad intrínseca al imipenem, las cepas de la familia *Morganellaceae* se probaron con meropenem; b: los inhibidores fueron testeados a 100µg/mL

Todos los compuestos evaluados, lograron inhibir con éxito las MβL de la subclase B1 presentes en Enterobacterias. El compuesto D-*anti-2* fue el mejor inhibidor frente a todos los aislados clínicos, con una reducción de hasta 16 veces en los valores de CMI de IMI (factor de dilución = 4). En ausencia del antibiótico imipenem, ninguna de las 2-MMT mostró un efecto perjudicial sobre el crecimiento bacteriano, esto indica que la reducción de los valores de MIC se debe a la restauración de la susceptibilidad al imipenem mediante la inhibición de las MBL por parte de las tiazolidinas.

Dado los resultados positivos, se decidió probar si concentraciones más bajas de inhibidor seguían potenciando la actividad. Para ello se probaron concentraciones de inhibidor de 50 y 75 $\mu\text{g/ml}$ y se midió la CMI de imipenem frente a *E. coli* DH10B que expresa L1 de subclase B3, Tabla 13.

Tabla 13. Efecto de las 2-MMT 1 y 2 sobre las CMI de IMI frente a L1 que expresa *E. coli* DH10B.

Concentración Inhibidor $\mu\text{g/ml}$	CMI mg/L						
	IMI	IMI+ L- <i>anti</i> -1	IMI+ D- <i>anti</i> -1	IMI+ L- <i>anti</i> -2	IMI+ L- <i>syn</i> -2	IMI+ D- <i>anti</i> -2	IMI+ D- <i>syn</i> -2
50	16	8	8	4	4	8	4
75	16	4	8	4	4	8	4
100	16	4	8	4	4	4	4

Estos datos indican que 50 $\mu\text{g/ml}$ de L-*anti*-2, D-*syn*-2 y L-*syn*-2 causaron una reducción de 4 veces (factor de dilución = 2) en la CMI de IMI, lo que indica que concentraciones más bajas de inhibidor pueden potenciar la actividad de imipenem contra una cepa de *E. coli* que expresa L1 de subclase B3.

Por lo tanto, dado que todas las 2-MMT evaluadas mostraron inhibición frente a diferentes subclases de MBL, el impacto que presentaron en la reducción de las CMI y su falta o baja toxicidad, los convierte en compuestos prometedores para realizar estudios *in vivo*.

3.3.4 Estudios cristalográficos para la determinación estructural de los complejos de metalo- β -lactamasas con 2-MMT M β L: 2-MMT.

Las 2-MMT 1 y 2 demostraron ser inhibidores en las tres subclases de M β L (B1, B2 y B3). Para comprender mejor las interacciones de éstas en el sitio de activo de las enzimas, se obtuvieron las estructuras cristalinas de los complejos 2-MMT con las enzimas di-Zn pertenecientes al subgrupo B1 (NDM-1, VIM-2 y IMP-1), mono-Zn el subgrupo B2 (Sfh-I) y di-Zn del subgrupo B3 (L1). La determinación estructural de los complejos MBL: 2-MMT por difracción de rayos X estuvo a cargo del Dr. Prof. James Spencer en School of Cellular and Molecular Medicine, Universidad de Bristol, Bristol-Reino Unido.

3.3.4A. Estudio de las estructuras cristalinas de los complejos MβL-B1: 2-MMT

Se lograron obtener y estudiar las estructuras cristalinas de 6 complejos de los compuestos *L-anti-2* y *D-syn-2*, con las tres enzimas más relevantes clínicamente de la subclase B1 (NDM-1, VIM-2, IMP-1). Los complejos obtenidos fueron: NDM-1: *L-anti-2*, VIM-2: *L-anti-2*, IMP-1: *L-anti-2*, y NDM-1: *D-syn-2*, VIM-2: *D-syn-2*, IMP-1: *D-syn-2*, con una resolución de 1.4 a 1.87 Å, Figura 6.

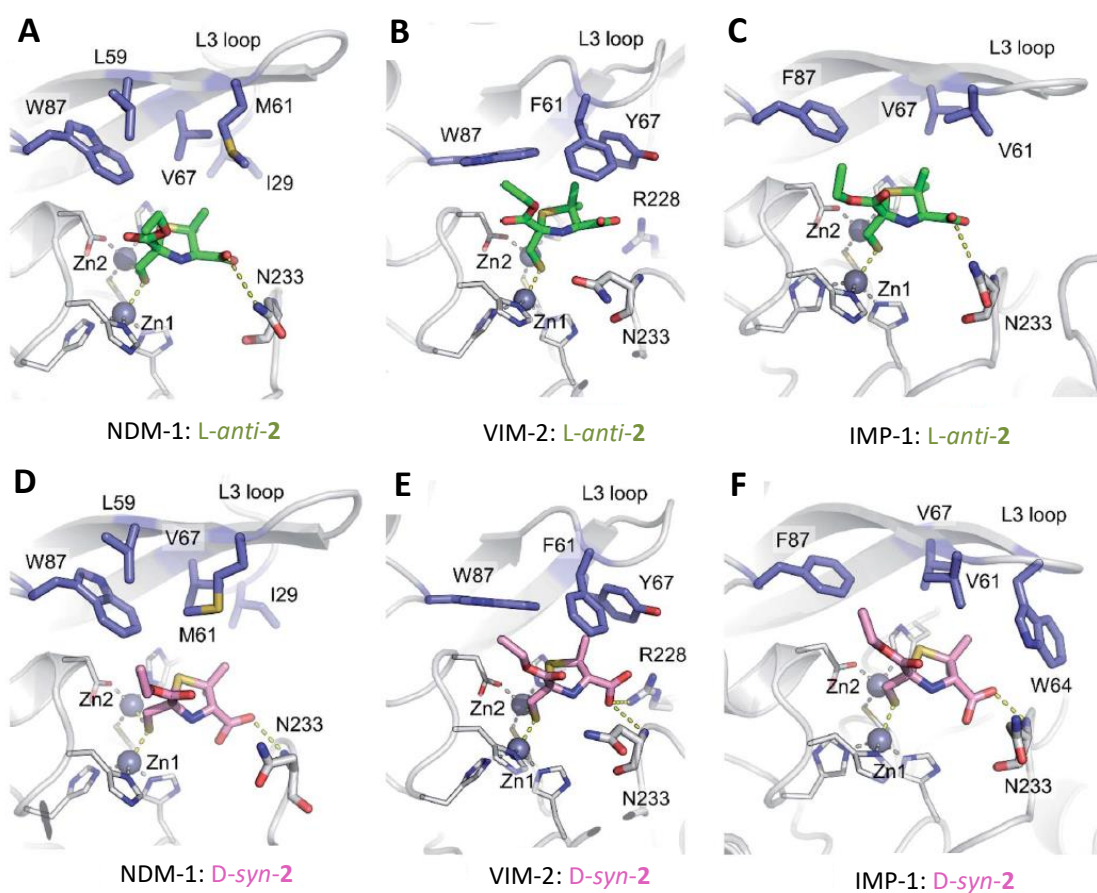


Figura 6: Estructuras cristalinas de los complejos: *L-anti-2* (verde) con NDM-1 (A), VIM-2 (B) e IMP-1 (C); y para complejos de *D-syn-2* (rosa) con NDM-1 (D), VIM-2 (E) e IMP-1 (F). Los iones de zinc se muestran como esferas grises, las cadenas laterales azules son residuos hidrófobos involucrados en las interacciones, enlaces de hidrógeno e interacciones de coordinación con los metales se muestran como líneas punteadas amarillas.

Para las tres enzimas se observó que el resto tiol se une equidistante entre los dos iones de Zn, desplazando el hidróxido hidrolítico y manteniendo una distancia Zn-Zn de 3.57-3.79 Å. También se ve que varios residuos hidrofóbicos en el sitio activo de estas enzimas estabilizan la unión a las 2-MMT. En NDM-1 los residuos que se encuentran en el bucle L3, como Leu59, Met61 y Val67 son los que contribuyen a la unión, mientras

que en VIM-2 son los residuos Phe61 y Tyr67. En IMP-1, debido a un pequeño movimiento conformacional del bucle flexible L3, únicamente el residuo hidrofóbico Met61 estabiliza dicha unión. Además, el residuo del aminoácido Trp87 en NDM-1 y VIM-2 o Phe87 en IMP-1 se coloca cerca (aproximadamente 4\AA) de la cadena lateral etil éster en todos los complejos MBL: **2**, proporcionando una fuerte interacción hidrófoba. Sólo en NDM-1, el residuo hidrofóbico adicional Ile29, situado cerca del extremo N-terminal, también contribuye a la unión. El carboxilato ($-\text{CO}_2\text{H}$) de estos compuestos interactúa débilmente con Asn233 en el bucle L10 en NDM-1 e IMP-1 ($3.46\text{-}3.28\text{\AA}$ respectivamente) pero no en VIM-2.

Para *L-anti-2*, el carboxilato interactúa débilmente con Asn233 en el bucle L10 en NDM-1 e IMP-1 ($3,46$ y $3,28$ \AA , respectivamente), pero esto no se observa en el complejo VIM-2. En complejos con *D-syn-2*, el inhibidor interactúa más estrechamente con la amida de la columna vertebral de Asn233, mientras que en VIM-2 hay una interacción débil adicional con Arg228 (3.39 \AA) que no está presente en NDM-1 e IMP-1.

Las estructuras también destacan cierta flexibilidad de unión para la cadena lateral etil éster, que gira 180° alrededor del carbono carbonilo en la estructura IMP-1: *L-anti-2* en comparación con NDM-1 o VIM-2, en gran parte debido a la falta de enlaces de hidrógeno entre la cadena lateral del inhibidor y la estructura de la proteína. El inhibidor *D-syn-2* se une de manera muy similar a NDM-1 e IMP-1 pero tiene una orientación ligeramente diferente en VIM-2 debido a las interacciones del carboxilato con Arg228.

Sin embargo, a pesar de estas pequeñas diferencias en la unión, tanto *L-anti-2* como *D-syn-2* muestran modos de unión ampliamente consistentes, mostrando pocas y débiles interacciones con la estructura de la proteína, siendo la unión dominante la interacción tiol: zinc.

3.3.4B. Estudio de las estructuras cristalinas de los complejos M β L-B2: 2-MMT y M β L-B3: 2-MMT

También se obtuvieron las estructuras cristalinas de los complejos *L-anti-1*: Sfh-I (B2) y *D-syn-2*: L1 (B3), las cuales se muestran en la Figura 7.

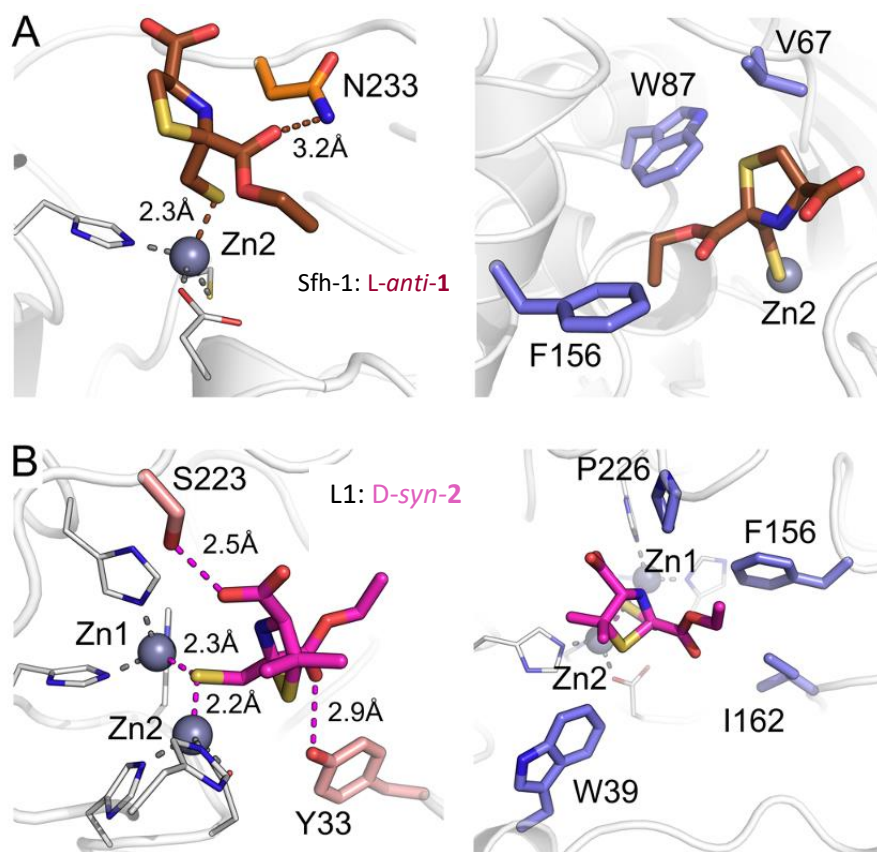


Figura 7. Interacciones de 2-MMT en el sitio activo de L1 y Sfh-I. Izquierda, interacciones TioI-Zn y enlaces de hidrógeno en complejos 2-MMT:MβL; Derecha, interacciones con residuos hidrofóbicos que recubren el sitio activo (A) Unión L-*anti-1* a Sfh-I; (B) Unión D-*syn-2* a L1.

La unión de L-*anti-1* mostró la interacción del tioI de la cadena mercaptometilo directamente con el centro Zn2 de Sfh-I. En el caso de D-*syn-2* este tioI interaccionó tanto con Zn1 como con Zn2 en el centro di-Zn de L1 y en ambos casos se vio desplazado el hidróxido catalítico. En Sfh-I, hay un puente de hidrógeno más débil entre el carbonilo del éster etílico de L-*anti-1* y el nitrógeno de cadena lateral de Asn233 (3.2 Å). Por el contrario, en la unión D-*syn-2*:L1 se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno más fuertes con los oxígenos de cadena lateral de Ser223 (2,5 Å) y Tyr33 (2,9 Å).

El modo de unión de D-*syn-2*:L1 tiene similitudes con su unión a las enzimas di-Zn B1 NDM-1 y VIM-2, particularmente con respecto al posicionamiento de los grupos de tioI y carboxilato. Sin embargo, la cadena lateral del éster etílico se gira 180°, y por lo tanto apunta en la dirección opuesta en L1. Además, en las enzimas B1 se ve solo una sola interacción con el nitrógeno de Asn233, en comparación con los enlaces de hidrógeno que D-*syn-2* forma con los dos residuos de aminoácidos en L1.

Por lo tanto, los datos de cristalografía por rayos X, muestran que las 2-MMT emplean un modo de unión análogo en los diversos sitios activos de las diferentes subclases de MbL.

3.3.4C. Estudio QM/MM de la interacción S – π en la unión de MbL:2-MMT

En las estructuras cristalinas se identificó una interacción S- π conservada entre el S del anillo tiazolidina y residuos aromáticos en el sitio activo en las distintas subclases de MbL (Trp87 en NDM-1/VIM-2 y Sfh-I, Phe87 en IMP-1 y Trp39 en L1). Para entender la importancia que puede tener esta interacción en el sitio activo, se decidió realizar un estudio *in silico* de mecánica cuántica/mecánica molecular QM/MM. Los estudios teóricos de QM/MM estuvieron a cargo del Dr. Diego Moreno del Instituto de Química de Rosario (IQUIR, CONICET-UNR).

Se estudió la interacción S- π en los complejos de L-*anti-2* y D-*syn-2* con las tres enzimas más relevantes de la subclase B1 (NDM1, VIM2 e IMP1) y con las enzimas B2 (Sfh-1) y B3 (L1), Figura 8.

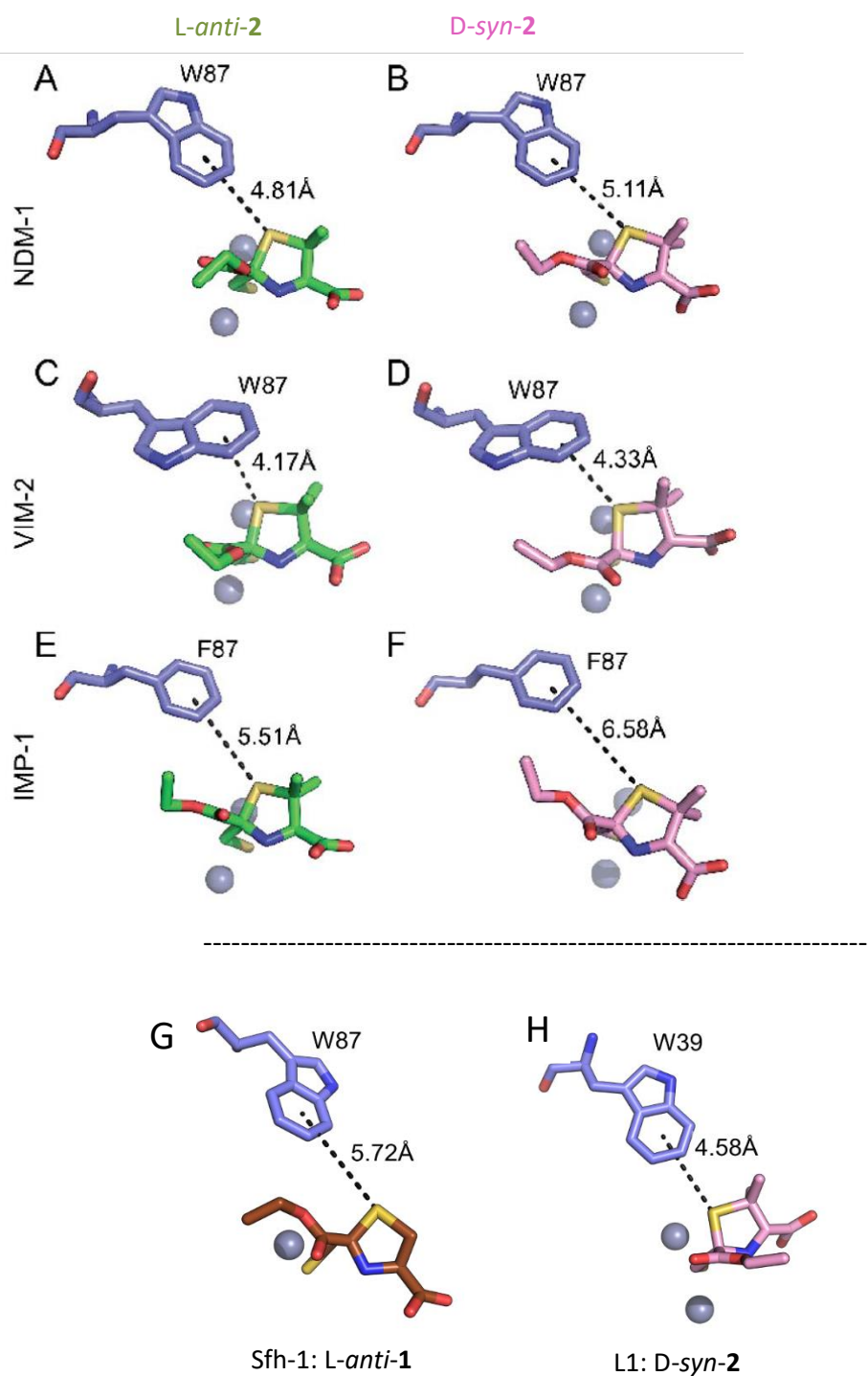


Figura 8: Interacciones del átomo de azufre del anillo tiazolidina con el grupo aromático del residuo en la posición 87 de las enzimas B1 y B2 y con el grupo aromático del residuo en la posición 39 de la subclase B3. Las interacciones se representan como una negra línea punteada. Interacción entre el anillo de benceno de Trp87 de NDM-1 o VIM-2 con L-anti-2 (A y C) y con D-syn-2 (B y D). Interacción entre el anillo de benceno de Phe87 de IMP-1 con L-anti-2 (E) y con D-syn-2 (F). Interacción entre el anillo benceno de Trp87 de Sfh-1 con L-anti-1 (G). Interacción entre el anillo benceno de Trp39 de L1 con D-syn-2 (H). Las distancias en Å se midieron desde el centro del anillo de benceno al átomo de azufre de tiazolidina

Se pudo observar que el átomo de azufre del anillo de tiazolidina de las tiazolidinas está ubicado a 4.81 Å y 5.11 Å del grupo indol de Trp87 en la base del bucle L3 en NDM-1. Se observó una interacción similar S- π con el grupo aromático de Trp87 en VIM-2 (4.17 y 4.33 Å) y con Phe87 en IMP-1 (5.51 y 6.58 Å). En NDM-1 e IMP-1, el átomo de azufre se ubica de manera coplanar al borde del anillo aromático, mientras que en VIM-2, el azufre forma una interacción de apilamiento con Trp87. También se observó esta interacción en las enzimas B2 (Sfh-1) y B3 (L1) con L-*anti*-**1** y D-*syn*-**2** respectivamente. con distancias comparables a las observadas en las enzimas B1. Por lo tanto, podemos indicar que las 2-MMT se unen mediante una interacción sulfur- π conservada entre el átomo de azufre de tiazolidina y un residuo aromático del sitio activo de las distintas subclases de M β L.

Para argumentar la importancia de esta interacción y debido a que los análogos oxazolidina no pudieron ser obtenidos, se estudio por métodos *in silico* la interacción de 2-mercaptometil oxazolidinas (2-MMO) con NDM-1, los modelos estructurales se construyeron basados en las estructuras cristalinas de NDM-1 unida a L-*anti*-**2** y D-*syn*-**2**, Figura 9.

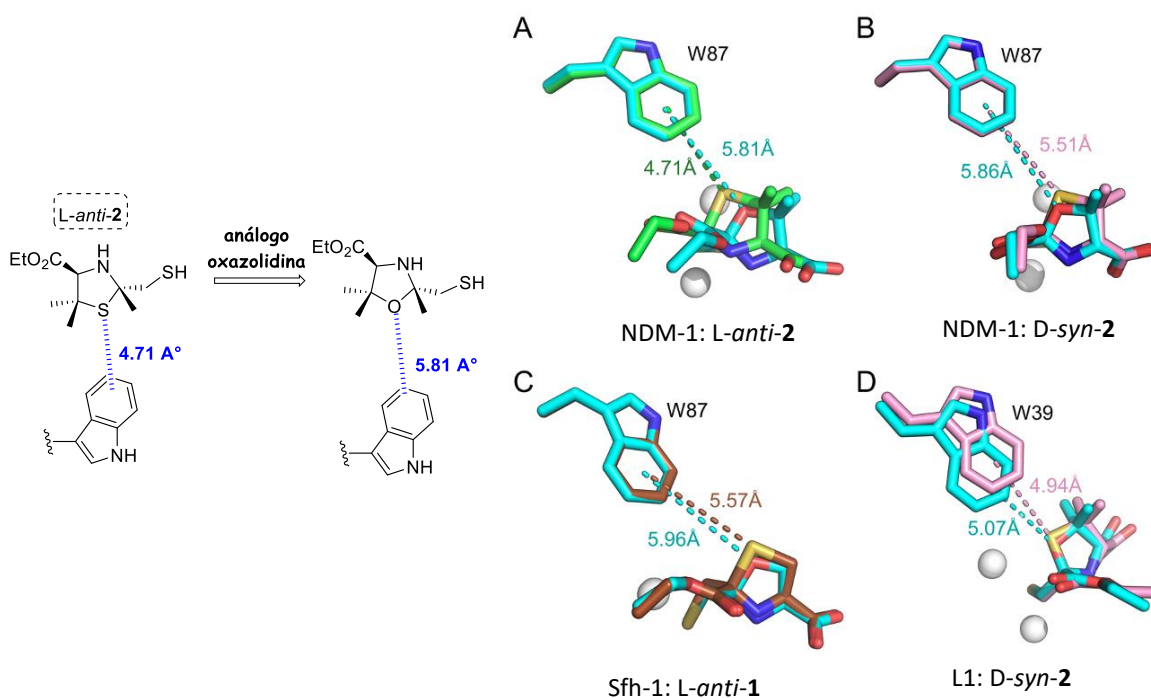


Figura 9: Estructuras optimizadas de los complejos 2-MMT y sus análogos oxazolidinas 2-MMO con diferentes M β L usando QM/MM. Se muestran las superposiciones de los complejos 2-MMT: A) NDM-1: L-*anti-2*, B) NDM-1: D-*syn-2*, C) Sfh-1: L-*anti-1*, D) L1: D-*syn-2* y sus respectivos análogos 2-MMO. Los análogos 2-MMO respectivos se muestran de color celeste

Las geometrías experimentales de las 2-MMT y las geometrías simuladas de las 2-MMO se minimizaron mediante cálculos moleculares de mecánica cuántica híbrida (QM/MM). Los aductos teóricos de 2-MMT con NDM-1, Sfh-1 y L1 produjeron geometrías finales similares a las presentadas en la estructura cristalina y se preservó las distancias S- π . En los complejos teóricos con 2-MMO, se observó un incremento en la distancia O- π entre el átomo de O y el anillo aromático de Trp87 (NDM-1 y Sfh-1) y Trp39 (L1) que va de 0.13 a 1.0 Å. Esto puede explicarse en parte por la distancia de enlace C-O que es más corta en comparación con C-S, lo que hace que el átomo de oxígeno esté más lejos de los residuos aromáticos en el sitio activo. En L1, sin embargo, el aumento de la distancia es mínimo (0,13 Å), lo cual puede deberse a que D-*syn-2* presenta mayor número de enlaces de hidrógeno en el sitio activo, que potencialmente supera el efecto de la interacción O / S- π . Aunque la sustitución del azufre por oxígeno mostró efectos variables in silico, los datos sugieren que la interacción azufre- π ejercería podría contribuir más a la unión de las 2-MMT en el sitio activo. Esta contribución es mayor en enzimas

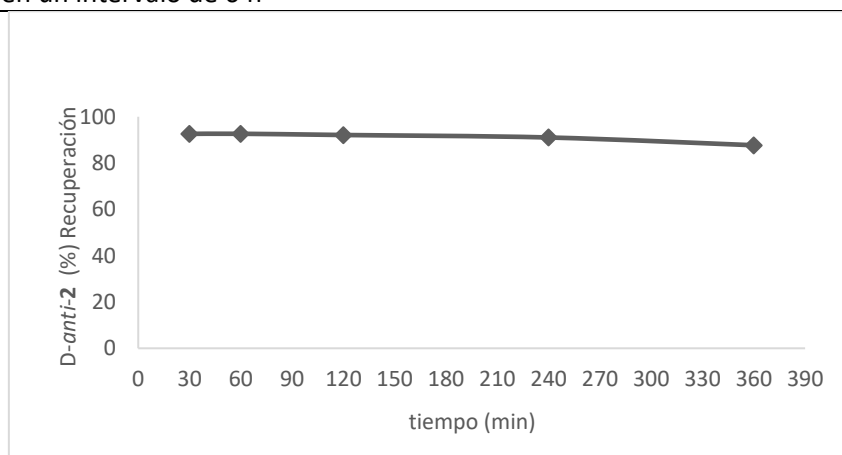
como NDM-1 y Sfh-1 dónde las interacciones por enlaces de hidrógeno en el sitio activo son mínimas, pero tiene una contribución menor cuando la unión inhibidor-enzima se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno más fuertes (L1).

3.3.4D. Estudio de estabilidad química de 2-MMT a pH=7.2

Se decidió estudiar la estabilidad de las 2-MMT en las condiciones de los ensayos de inhibición enzimática (pH 7.2 y 27°C). Se tomó como modelo la tiazolidina *D-anti-2* y el análisis se realizó por HPLC. La metodología analítica fue validada, para lo cual se evaluaron distintos parámetros como: especificidad, linealidad, precisión y exactitud.

Una vez validado el método se procedió a realizar el estudio de estabilidad a diferentes tiempos: 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h. Se utilizó una concentración de *D-anti-2* de 0.194 mg/mL, en un buffer fosfato (BP) pH 7.2 a 27°C. El ensayo se realizó por duplicado. Los % de recuperación de *D-anti-2* y su representación gráfica en los distintos tiempos de monitoreo se describen en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultados y representación gráfica de la recuperación de *D-anti-2* en el estudio de estabilidad en un intervalo de 6 h



% Recuperación ^a	30min	1 h	2 h	4 h	6 h
Ensayo 1	92.63	92.67	92.19	90.92	88.40
Ensayo 2	92.59	92.62	92.06	91.18	86.98
Promedio	92.61	92.645	92.125	91.05	87.69

^a Se hicieron tomas de 50µL a diferentes tiempos las cuales fueron inyectadas y analizadas inmediatamente en el HPLC

En el estudio se puede observar que el % de tiazolidina va disminuyendo hasta llegar a un 88% a las 6h. En ese intervalo de tiempo solo se observa la señal perteneciente a la

tiazolidina ($t_R=5.23$ min) y la aparición y el crecimiento con el tiempo de una señal ($t_R=7.48$ min) (Figura 10).

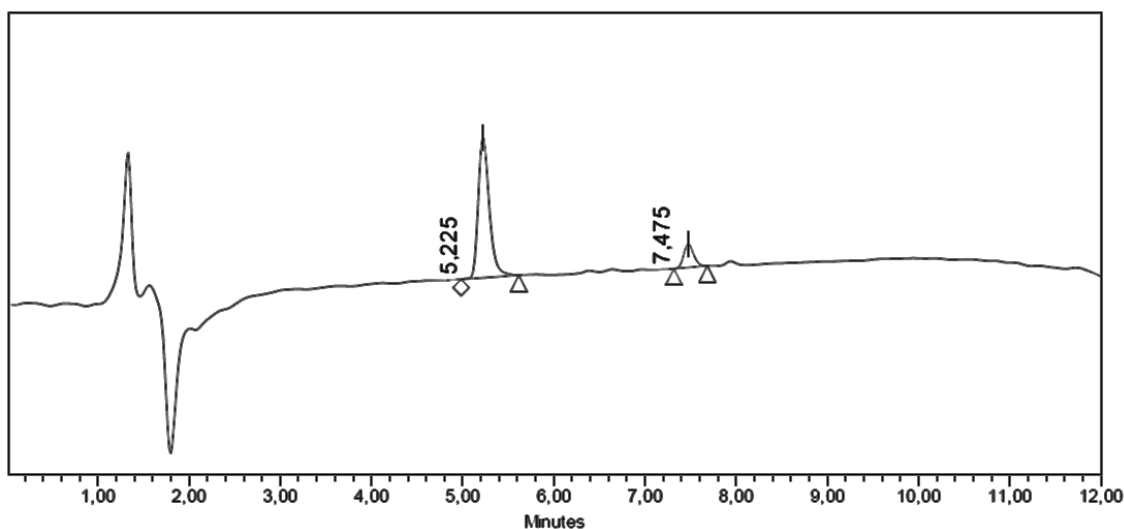


Figura 10. Cromatograma de D-*anti*-2 obtenido luego de 6 h de incubación en un buffer fosfato pH = 7.2, a 27°C

El análisis de esta nueva señal en 7.48 min por LCMS indica que corresponde al producto de oxidación (disulfuro **24**), ver Figura 11.

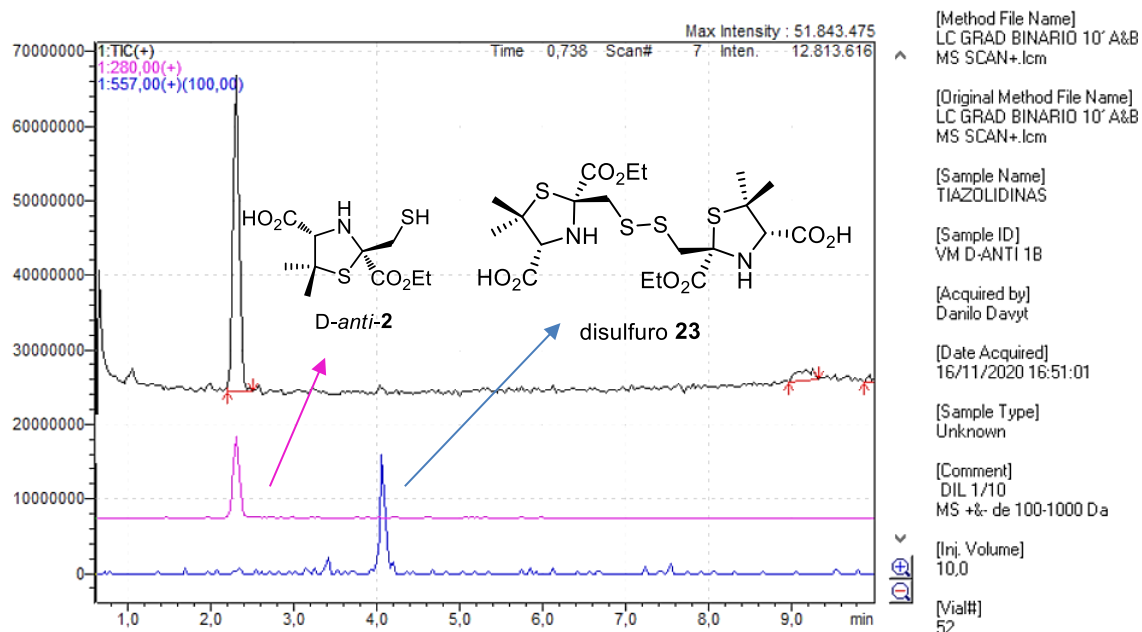


Figura 11. Cromatograma obtenido en un LCMS/MS Shimadzu 8040, Columna Evo C18 5u, 4,6 x150 μ m. A: Ácido Fórmico 0,1%. B: Ácido Fórmico 0,1% in MeCN. Flujo 1.25 mL/min; Split for ESI 1:4, Gradiente T0 B conc = 50%, T10 B conc= 98%, Condiciones ESI: Voltaje de interfase -4,5 kV / flujo de gas neblizador 3 L/min, DL Temp 250°C, Heat block Temp 400°C, Flujo de gas de secado 15 L/min, Rango de adquisición 100-1000Da.

Por lo tanto dado los resultados obtenidos experimentalmente podemos afirmar que el compuesto *D-anti-2* en BP pH 7.2 a 27°C, se degradó sólo un 12% en 6 horas de incubación, siendo el único producto de degradación el disulfuro resultante de la oxidación del grupo tiol. Se planea estudiar en un futuro también la estabilidad de las demás tiazolidinas preparadas.

3.4 Conclusiones

- En este trabajo se logró aislar, caracterizar y evaluar como inhibidores de MβL, los diasterómeros *syn* de la tiazolidina **2** derivada de penicilamina, los cuales no habían sido aislados anteriormente.
- Se logró explorar y adquirir experiencia en la metodología de Experimentación de alto rendimiento. Con esta metodología se probó un amplio número de reacciones (176) para optimizar la obtención de la tiazolidina *L-anti-1* derivada de cisteína, utilizando muy poca cantidad de reactivos y en un período corto de tiempo. Se observó que la reacción ocurre mejor cuando se utilizan alcoholes como disolventes (MeOH o EtOH) y se podría usar LiCl como catalizador. A pesar de que se exploró un amplio espacio químico, el mejor rendimiento obtenido de *L-anti-1* fue 35%.
- Se prepararon cinco análogos con modificaciones en C4 (R³): un análogo derivado de CyA con R³ = H (\pm **5**) y cuatro análogos derivados de L y D-CysOEt con R³ = CO₂Et compuestos L y *D-anti-7* y L y *D-syn-7*. Los derivados R³ = CO₂Et fueron evaluados frente a NDM-1 y L1. Los diasterómeros *anti* no mejoraron significativamente la potencia de inhibición respecto a las tiazolidinas de referencia y en general los diasterómeros *syn* fueron menos activos.
- En cuanto a las modificaciones planteadas sobre la posición C2 (R²), se obtuvieron dos tiazolidinas derivadas de L y D-PNA con un sustituyente R² = Me, ambos compuestos se obtuvieron como mezclas diasterómeras inseparables. Sin embargo los derivados Cys con un sustituyente Me no pudieron ser obtenidos. Respecto a los análogos con R² = CH₂CO₂Et, a partir de la α -mercaptocetona tioacetilada (SAC) **18** y L-PNA se logró preparar y aislar los dos diasterómeros de la tiazolidina tioacetilada y luego

por desprotección del isomero mayoritario se obtuvo el análogo L-*anti*-**22** con el tiol libre. A partir de la misma α -mercaptocetona y L-Cys sin embargo no se obtuvo la tiazolidina esperada y en su lugar se obtuvo una tiazolidina con el N acetilado L-*syn*-**20**. Cuando se usó la α -mercaptocetona tiotritilada **17** con L-Cys se logró obtener la tiazolidina protegida L-*anti*/*syn*-**19** que se descompuso en la desprotección. Los análogos L y D-*anti*/*syn*-**14** y L-*anti*-**22** fueron enviados para su evaluación biológica.

- A la hora de homologar la cadena mercaptometilo se prepararon dos tiazolidinas STrt derivadas de L-Cys y L-PNA, L-*anti*/*syn* **9** y **10** respectivamente. Sin embargo sólo la derivada de L-PNA pudo ser desprotegida, pero el producto con el tiol libre resultó inestable y no pudo ser completamente caracterizado como inhibidor.
- Los análogos oxazolidina no pudieron ser preparados a partir de los aminoalcoholes Ser, Thr o sus ésteres metílicos a pesar de que se ensayaron varias condiciones.
- En el ensayo de inhibición enzimática, todos los compuestos evaluados mostraron constantes de inhibición en el rango de bajo a sub- μ M para las enzimas de las tres subclases. Las 2-MMT presentaron mejor actividad inhibitoria respecto a los bicilos de bistiazolidinas reportados, siendo los mejores inhibidores L-*anti*-**1** y D-*syn*-**2**.
- Se determinó la CMI en aislados clínicos que expresan MBL de subclase B1,y B3. En combinación con antibióticos carbapenémicos, el compuesto D-*syn*- **2** mostró ser el inhibidor más potente de forma generalizada en las diferentes cepas de microorganismos clínicos que expresan M β L -B1. Frente a *E.coli* que expresan B3 el mejor inhibidor fue L-*anti*-**2**, L-*syn*-**2** y D-*syn*-**2** en concentraciones de 50 y 70 μ g/mL de inhibidor. En ausencia del antibiótico carbapenem, ninguno de las 2-MMT mostró un efecto perjudicial sobre el crecimiento bacteriano, por lo cual podemos decir que la reducción de los valores de MIC se debe a la restauración de la susceptibilidad al imipenem mediante la inhibición de las MBL por parte de las 2-MMT.

- Se evaluó el IC₅₀ *in vivo* de las tiazolidinas **1** y **2** en células de *E. coli* que expresan NDM-1 y además la citotoxicidad contra líneas celulares cultivadas HEK293, L929 y VERO. Las 2-MMT **2** no mostraron un perfil de toxicidad en dichas células, solo el compuesto D-*anti-1* posee una leve citotoxicidad en todas las células ensayadas, mientras que L-*anti-1* mostró una toxicidad más selectiva hacia la línea celular HEK293.
- Se logró obtener las estructuras cristalinas de ocho complejos de 2-MMT con enzimas de la subclase B1 (NDM-1, VIM-2, IMP-1), B2 (Sfh-I) y B3 (L1). Las 2-MMT mostraron una forma de unión análoga en el sitio activo de las diferentes subclases de MβL. Además, se identificó una interacción S-π entre el átomo de S del anillo de tiazolidina y aminoácidos aromáticos en el sitio de unión que se conserva en las diferentes subclases de MβL, siendo más importante para las MBLs del subgrupo B1.
- Por último se estudió la estabilidad química de D-*anti-2* en BP a pH 7.2 y 27°C, observándose una degradación del 12% al cabo de 6 horas de incubación, siendo el único producto de degradación el disulfuro resultante de la oxidación del grupo tiol.
- En su conjunto todos estos resultados y observaciones son prometedores para continuar con estudios *in vivo* en ratones para estos compuestos.

Parte de este trabajo se publicó en dos revistas científicas arbitradas:

- 1) M. A. Rossi, V. Martínez, P. Hinchliffe, M.F. Mojica, V. Castillo, D. M. Moreno, R. Smith, B. Spellberg, G. L. Drusano, C. Banchio, R. A. Bonomo, J. Spencer, A. J. Vila, G. Mahler. 2-Mercaptomethyl-thiazolidines use conserved aromatic-S interactions to achieve broad-range inhibition of metallo-β-lactamases. *Chem. Sci.*, **2021**, 12, 2898-2908 <https://doi.org/10.1039/D0SC05172A>
- 2) P. Hinchliffe, D. M. Moreno, M. A. Rossi, M. F. Mojica, V. Martínez, V. Villamil, B. Spellberg, G. L. Drusano, C. Banchio, G. Mahler, R. A. Bonomo, A. J. Vila, J. Spencer. 2-Mercaptomethyl Thiazolidines (MMTZs) Inhibit all Metallo-β-Lactamase classes by maintaining a conserved binding mode, *ACS Infect. Dis.* **2021**, 7, 9, 2697–2706, <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00194>

3.5 Perspectivas

- **Evaluación biológica de análogos 2-MMT y rediseño**

Se plantea realizar el estudio de inhibición enzimática pendiente a los análogos 2-MMT que presentan modificaciones a nivel del carboxílico en C4 ($R^3 = H$) y modificaciones en los sustituyentes en C2 ($R^2 = Me$ y $R^2 = CH_2CO_2Et$), Figura 12. Con los resultados de los ensayos de inhibición se podrá concluir y rediseñar nuevos análogos.

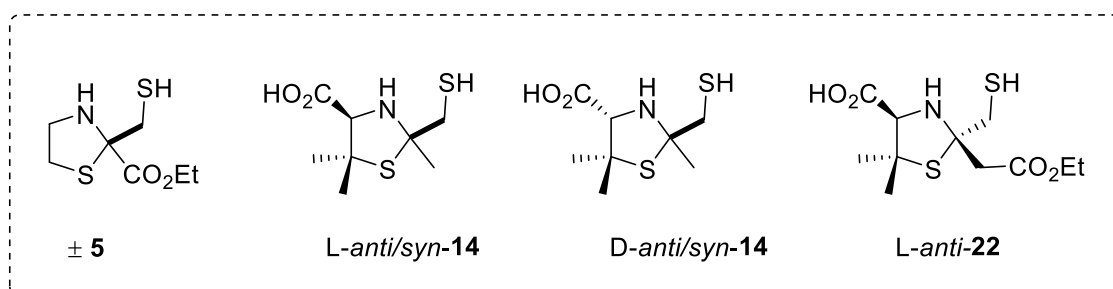


Figura 12. Análogos con evaluación biológica pendiente

Bibliografía

- ¹ N. Sahiba, A. Sethiya, J. Soni, D. K. Agarwal, S. Agarwal. Saturated Five-Membered Thiazolidines and Their Derivatives: From Synthesis to Biological Applications, *Topics in Current Chemistry*, **2020**, 378-434, doi.org/10.1007/s41061-020-0298-4.
- ² Q. Zhang, H. Zhou, S. Zhai, B. Yan, Natural Product-Inspired Synthesis of Thiazolidine and Thiazolidinone Compounds and Their Anticancer Activities, *Curr. Pharm. Des.*, **2010**, 16 (16), 1826–1842, doi.org/10.2174/138161210791208983.
- ³ Z. C. Song, G. Y. Ma, H. L. Zhu. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activities of N-Tert-Butoxycarbonyl-Thiazolidine Carboxylic Acid, *RSC Advances*, **2015**, 5 (32), 24824–32483, doi.org/10.1039/c4ra15284k.
- ⁴ S. N. Sriharsha, S. Satish, S. Shashikanth, K. A. Raveeshab. Design, Synthesis and Antibacterial Activity of Novel 1,3-Thiazolidine Pyrimidine Nucleoside Analogues, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14(22), 7476–81, doi.org/10.1016/j.bmc.2006.07.014.
- ⁵ F. E. O. Bayram, H. Sipahi, E. T. Acar, R. K. Ulugöl, K. Buran, H. Akgün. The Cysteine Releasing Pattern of Some Antioxidant Thiazolidine-4-Carboxylic Acids, *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, 114, 337–344, doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.019.
- ⁶ A. Yu. Ershov, I. V. Lagoda, D. G. Nasledov, M. Yu. Vasil'eva, L. Yu. Kuleshova, L. V. Pavlova, A. V. Yakimanskii. Synthesis of (2R,4R)-2-Alkyl-3-(2-Mercaptobenzoyl)Thiazolidine-4-Carboxylic Acids, *Russ. J. Org. Chem.*, **2017**, 53 (11), 1682–1686, doi.org/10.1134/S1070428017110124.
- ⁷ A. R. E. Mahdy, E. E. Elboray, R. F. Fandy, H. H. Abbas-Temirek, M. F. Aly. New Aspects of the Formation of 2-Substituted Thiazolidine-4-Carboxylic Acids and Their Thiohydantoin Derivatives. *Arkivoc*, **2016**, 6, 105–121, doi.org/10.24820/ark.5550190.p009.861.
- ⁸ H. T. Nagasawa, D. J. W. Goon, D. L. Crankshaw, R. Vince, S. E. Patterson. Novel, Orally Effective Cyanide Antidotes, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50(26), 6462–64, doi.org/10.1021/jm7011497.
- ⁹ A. Bellomo, N. Celebi-Olcum, X. Bu, N. Rivera, R. T. Ruck, C. J. Welch, K. N. Houk, S. D. Dreher. Rapid Catalyst Identification for the Synthesis of the Pyrimidinone Core of HIV Integrase Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 6912–6915. doi.org/10.1002/anie.201201720.
- ¹⁰ K. Burgess, H. J. Lim, A. M. Porte, G. A. Sulikowski. New Catalysts and Conditions for a C-H Insertion Reaction Identified by High Throughput Catalyst Screening, *Ang. Chem. Int. Ed. in Engl.*, **1996**, 35(2), 220–222, doi.org/10.1002/anie.199602201.
- ¹¹ K. W. Bentley, P. Zhang, C. Wolf. Chemistry: Miniature High-Throughput Chemosensing of Yield, Ee, and Absolute Configuration from Crude Reaction Mixtures. *Sci. Adv.*, **2016**, 2, e1501162, doi.org/10.1126/sciadv.1501162.
- ¹² S. M. Mennen, C. Alhambra, C. L. Allen, M. Barberis, A. H. Cherney, M. Christensen, D. B. Damon, E. de Diego, S. Berritt, T. A. Brandt, Andrew D. Campbell, J. Castañón, S. García-Cerrada, P. García-Losada, R. Haro, J. Janey, D. C. Leitch, E. McInturff, S. Monfette, R. J. Post,

D. Schultz, B. J. Sitter, L. Li, F. Liu, P. C. Lobben, D. W. C. MacMillan, J. Magano, J. M. Stevens, I. I. Strambeanu, J. Twilton, K. Wang, M. A. Zajac. The Evolution of High-Throughput Experimentation in Pharmaceutical Development and Perspectives on the Future. *Org. Process. Res. Dev.*, **2019**, 23 (6), 1213–1242, doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00140.

¹³ P. Bhansali, C. L. Hanigan, R. A. Casero Jr., L. M. Viranga Tillekeratne. Largazole and analogues with modified metal-binding motifs targeting histone deacetylases: Synthesis and biological evaluation, *J. Med. Chem.*, **2011**, 54, 7453–7746, doi.org/10.1021/jm200432a.

¹⁴ L. Sala, F. Benedini, F. Ferrario, A. Sala. Synthesis and NMR Studies of Thiazolidine-4-Carboxylic Acid Derivatives Containig a Nitro Ester Function, *J. Heterocyclic Chem.*, 1994, 31, 1343–47, doi.org/10.1002/jhet.5570310608

¹⁵ B. Refouvelet, N. Pellegrini, J. Robert, G. Crini, O. Blacque, M. Kubicki. Synthesis of 2-Substituted (2R,4R)-3-(3-Mercapto-Propionyl)Thiazolidine-4-Carboxylic Acids, *Chem. Heterocycl. Comp.*, **2014**, 50, 1032–1038, doi.org/10.1007/s10593-014-1560-x

¹⁶ Y. Gui, L. Qiu, Y. Li, H. Li, S. Dong. An Internal Activation of Peptidyl Prolyl Thioesters in Native Chemical Ligation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, 14, 4890–4899. doi.org/10.1021/jacs.6b01202

¹⁷ H. M. Burke, L. McSweeney, E. M. Scanlan. Exploring Chemoselective S-to-N Acyl Transfer Reactions in Synthesis and Chemical Biology, *Nat. Commun.*, **2017**, 8, 15655-15671, doi.org/10.1038/ncomms15655

¹⁸ J. C. M. Monbaliu, G. Dive, C. V. Stevens, A. R. Katritzky. Governing Parameters of Long-Range Intramolecular S to N Acyl Transfers within (S)-Acyl Isopeptides, *J. Chem. Theory Comput.*, **2013**, 9, 927–934, doi.org/10.1021/ct300830k.

¹⁹ C. Haase, O. Seitz. Internal Cysteine Accelerates Thioester-Based Peptide Ligation, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 13, 2096–2101, doi.org/10.1002/ejoc.200900024.

²⁰ J. Choi, N. M. Yoon. Synthesis of Thiols via Palladium Catalyzed Methanolysis of Thioacetates with Borohydride Exchange Resin, *Synth. Commun.*, **1995**, 25, 2655-2663, doi.org/10.1080/00397919508011812

²¹ T. Endo, K. Oda, T. Mukaiyama. Facile Conversion of thiolesters into thiols using cysteamine, *Chem. Lett.*, **1974**, 3(5), 443–444, doi.org/10.1246/cl.1974.443.

²² E. D. Bergmann. The Oxazolidines, *Chem. Rev.*, **1953**, 53(2), 309–352, doi.org/10.1021/cr60165a005.

²³ E. D. Bergmann, E. Zimkin, S. Pinchas. Reaction products of primary β -hydroxy-amines with carbonyl compounds. VII. Oxazolidines derived from N-methylethanolamine, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*, **1952**, 53(9) 237–242, doi.org/doi.org/10.1002/recl.19520710304.

²⁴ F. Fülöp, K. Pihlajaa. Ring-Chain Tautomerism of Oxazolidines Derived from Serine Esters, *Tetrahedron*, 1993, 49(30), 6701–6706, doi.org/10.1016/S0040-4020(01)81839-1.

-
- ²⁵ H. Bagum, B. R. Shire, K. E. Christensen, M. Genov, A. Pretsch, D. Pretsch, M. G. Moloney. Bicyclic Lactams Derived from Serine or Cysteine and 2-Methylpropanal, *Synlett*, **2020**, 31 (4), 378–382. doi.org/10.1055/s-0039-1691569.
- ²⁶ L. Feng, K. W. Yang, L. S. Zhou, J. M. Xiao, X. Yang, L. Zhai, Y. L. Zhang, M. W. Crowder. N-Heterocyclic Dicarboxylic Acids: Broad-Spectrum Inhibitors of Metallo- β -Lactamases with Co-Antibacterial Effect against Antibiotic-Resistant Bacteria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 5185–5189. doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.06.074
- ²⁷ M. Falorni, S. Conti, G. Giacomelli, S. Cossu, F. Soccolini. Optically Active 4-Oxaroline Derivatives: New Useful Chiral Synthons Derived from Serine and Threonine, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6 (1), 287–294, doi.org/10.1016/0957-4166(94)00386-P.
- ²⁸ N. S. Khruscheva, N. M. Loim, V. I. Sokolov, V. D. Makhaev. The Solid-State Diastereoselective Formation of Oxazolidines, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 16, 2425–2427. doi.org/10.1039/a700246g.
- ²⁹ P. C. Bulman Page, G. A. Parkes, B. R. Buckley, H. Heaney, M. Gholizadeh, J. S. Wailes. Microwave-Assisted Highly Diastereoselective Synthesis of Oxazolidines Derived from Ketones and Aminoalcohols, *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49 (49), 6951–6954, doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.09.063.
- ³⁰ M. A. Rossi, V. Martinez, P. Hinchliffe, M. F. Mojica, V. Castillo, D. M. Moreno, R. Smith, B. Spellberg, G. L. Drusano, C. Banchio, R. A. Bonomo, J. Spencer, A. J. Vila, G. Mahler. 2-Mercaptomethyl-Thiazolidines Use Conserved Aromatic-S Interactions to Achieve Broad-Range Inhibition of Metallo- β -Lactamases, *Chem. Sci.*, **2021**, 12, 2898–2908, doi.org/10.1039/d0sc05172a.

Capítulo 4

Diseño, Síntesis y Caracterización biológica de análogos a 2-mercaptometil bistiazolidinas

4.1 Antecedentes:

4.1.1. Antecedentes sintéticos de 2-MMBT

Las 2-mercaptometilbistiazolidinas (2-MMBT) son compuestos análogos a penicilina que fueron descritos anteriormente por nuestro grupo como inhibidores de M β L^{1, 2, 3}, Figura 1.

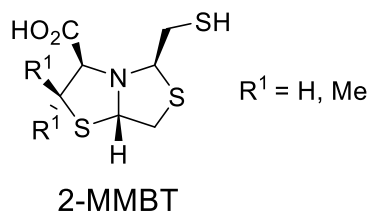
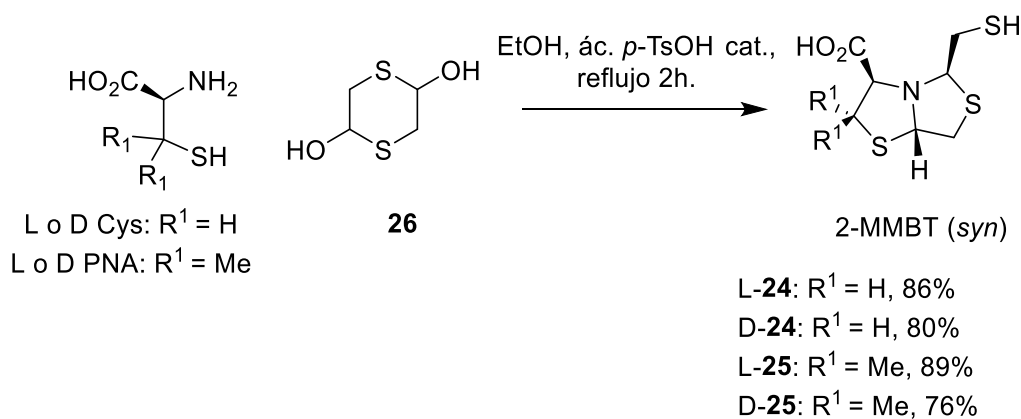


Figura 1: Estructura general de 2-MMBT.

Estos compuestos se preparan por doble ciclocondensación entre un aminotiol como cisteína (Cys) o penicilamina (PNA), y dos moléculas de mercaptoacetaldehído (comercialmente disponible bajo la forma de ditiano 2,5-dihidroxi-1,4-ditiano **26**). Partiendo de los aminotiol L o D, se prepararon cuatro 2-MMBT enantioméricamente puras (*syn*), Esquema 1.



Esquema 1. Síntesis de 2-MMBT **24** y **25**

En estas condiciones las 2-MMBT son obtenidas con muy buenos rendimientos, dando mayoritariamente el diastereómero *syn*.

Dado que estos compuestos presentaron inhibición en todas las subclases de M β L, en este capítulo se plantea como objetivo principal trabajar sobre la estructura química de las bistiazolidinas y preparar nuevos inhibidores.

4.2. Objetivos específicos:

En este capítulo se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1- Diseñar y sintetizar nuevos análogos a partir de la estructura de las 2-MMBT

Figura 2. Para ello se plantea:

- A) realizar dos modificaciones sobre el grupo carboxilato en C8 que incluye: A1) sustitución del ácido carboxílico por un H ($R^2 = H$, $X = S$) y A2) la homologación del carboxilato en un carbono sobre biclos bistiazolidinas y biclos oxazolin-tiazolidina ($R^2 = CH_2CO_2Et$, $X = S, O$)
- B) preparar análogos tricíclicos fusionando el anillo bistiazolidina con un anillo aromático en los carbonos C7-C8
- C) modificar la cadena mercaptometilo presente en C2, homologando la cadena en un carbono

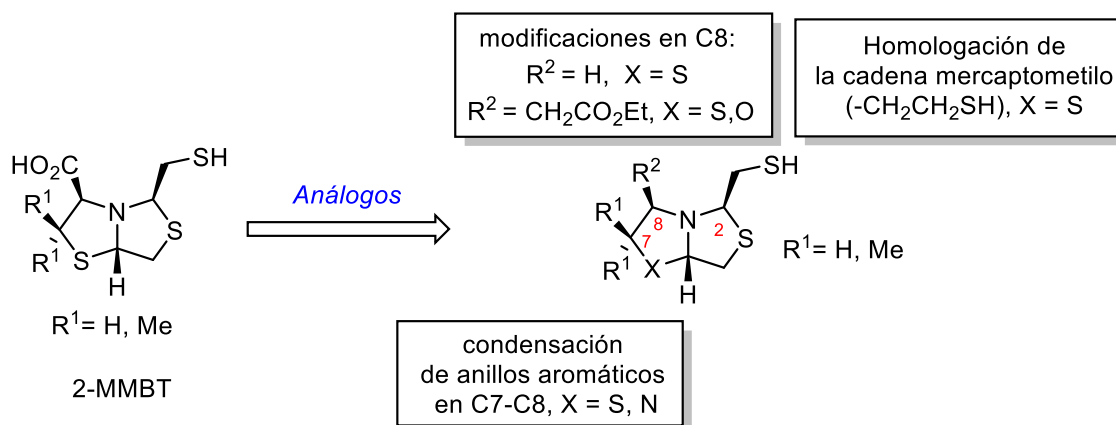


Figura 2. Estructura general de la 2-MMBT y modificaciones planteadas

2- Caracterizar de los análogos preparados como inhibidores de M β L. Para aquellos compuestos con buena actividad inhibitoria se plantea determinar la capacidad de restaurar la actividad de A β L frente a microorganismos resistentes, midiendo la concentración mínima inhibitoria (CMI).

4.3. Resultados y Discusión:

4.3.1. Diseño y síntesis de análogos de 2-MMBT

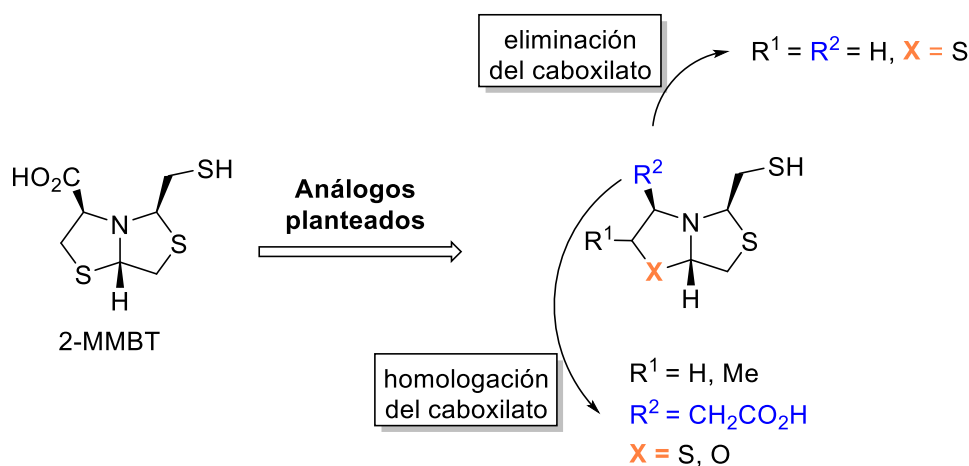
El análisis de los datos cristalográficos publicados anteriormente por nuestro grupo de investigación de los complejos M β L: 2-MMBT^{1,2}, nos inspiró a la hora de diseñar nuevos análogos que presenten mejor interacción con el sitio activo de las M β L y por lo tanto mayor potencia de inhibición. La idea es introducir cambios en el biciclo de 2-MMBT, o en los grupos unidos a él, que puedan mejorar el reconocimiento por la enzima. Los resultados obtenidos en las distintas modificaciones se describen a continuación.

4.3.1.A. Diseño y síntesis de análogos con modificaciones a nivel del grupo carboxilato en C8

En el análisis de las estructuras cristalográficas de M β L:2-MMBT se observó que el carboxilato en posición C8, presenta un modo de unión variable con las enzimas dependiendo de la subclase de M β L y del enantiómero 2-MMBT utilizado. El grupo carboxilato es importante en la unión con el sitio activo de las enzimas de subclase B2 pero no es significativo en la unión del inhibidor con las subclases B1 y B3. Esto nos impulsó a querer explorar distintas modificaciones a nivel del carboxilato de las 2-MMBT. La finalidad es estudiar cómo afectan dichas modificaciones la interacción inhibidor-enzima para obtener nuevos análogos con mejorada potencia inhibitoria.

Las modificaciones planteadas incluyen:

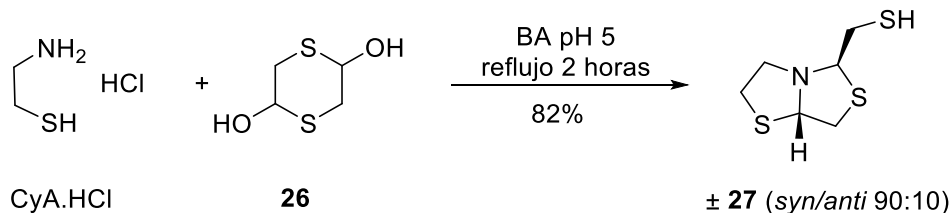
A1) sustituir el carboxilato en C8 por H ($R^2 = H$, $X = S$) cambiando el aminotiol de partida Cys por cisteamina (CyA), Esquema 2; A2) sustituir el carboxilato en C8 por su homólogo en un carbono ($R^2 = -CH_2CO_2H$) cambiando el aminotiol de partida Cys por β^3 -Cys ($X = S$) o por β^3 -aminoalcoholes ($X = O$), Esquema 2.



Esquema 2. Estructura de 2-MMBT y de los análogos con modificaciones a nivel del C8.

4.3.1.A1. Análogo con $R^2 = H, X = S$

La síntesis de este análogo se realizó por analogía con la metodología de síntesis utilizada para preparar las 2-MMBT, (poner ref) utilizando como aminotiol de partida CyA.HCl, Esquema 3.



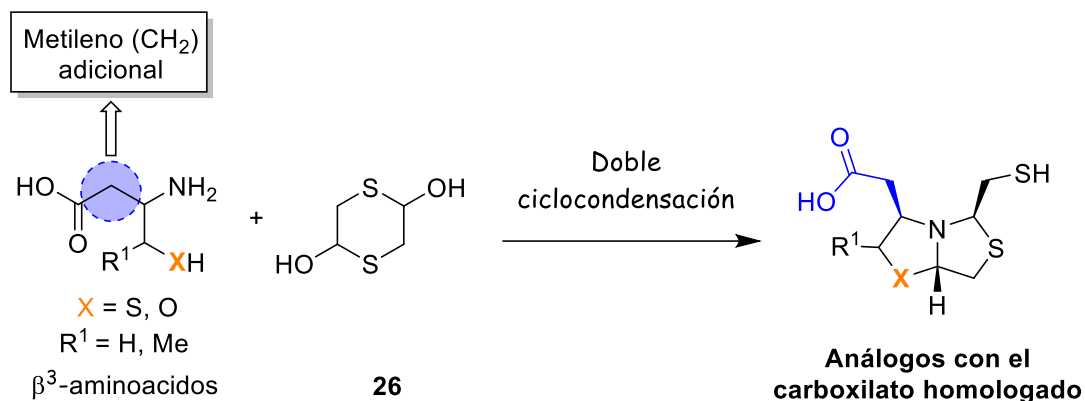
Esquema 3. Síntesis del análogo con $R^2 = H$ ± **27**

La doble ciclocondensación entre CyA.HCl y el ditiano **26** se llevó a cabo en un medio buffer acetato pH 5 a reflujo por 2h. El producto ± **27** se aisló con un 82% de rendimiento, como mezcla diasterómerica *syn/anti* 90:10. Cada uno de los diasterómeros a su vez es una mezcla racémica.

4.3.1.A2. Análogos con $R^2 = CH_2CO_2H, X = S, O$

El objetivo de preparar estos análogos es incorporar flexibilidad conformacional a la cadena carboxilato y estudiar si esto le permite mejorar las interacciones inhibitor-

enzima en el sitio activo. Para la síntesis de los análogos se propone partir de distintos β^3 -aminoácidos y el ditiano **26** mediante una reacción de doble ciclocondensación, Esquema 4.



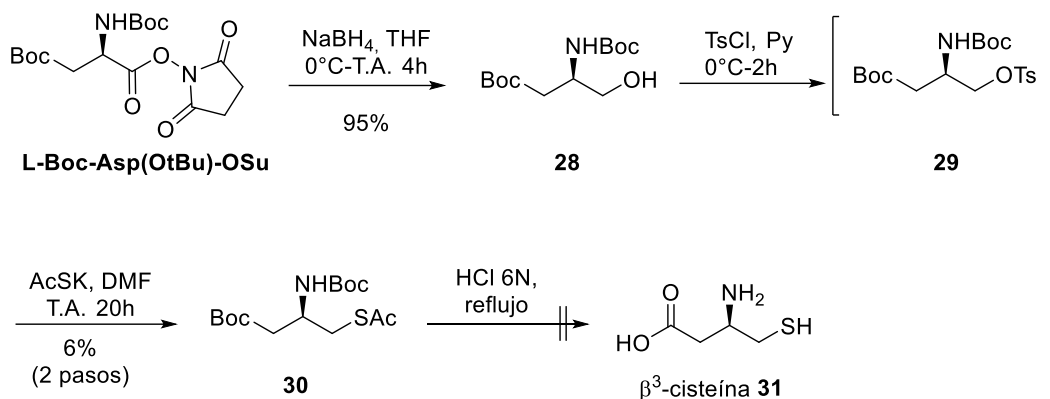
Esquema 4. Síntesis planteada para la obtención de análogos con la cadena carboxilato homologada ($R^2 = CH_2CO_2H$, $X = S, O$)

Los β^3 -aminoácidos son homólogos de los α -aminoácidos con un grupo metileno (CH₂) adicional insertado entre el carbono α (que soporta los distintos grupos laterales de los aminoácidos) y el grupo ácido⁴. El agregado de este metileno al resto aminoacídico proporciona moléculas con distintas posibilidades conformacionales y polaridad. Además, se ha demostrado que generalmente les confiere mayor estabilidad enzimática frente a peptidasas y proteasas⁵, y que es susceptible a una degradación microbiana más lenta⁶. El β^3 -aminoácido de partida define el biciclo que se obtiene. Si se parte de β^3 -aminotioles como β^3 -cisteína ($X = S$), obtenemos el biciclo bistiazolidina, en cambio, si partimos de β^3 -aminoalcoholes como β^3 -treonina o β^3 -serina ($X = O$) se obtiene el biciclo oxazolidin-tiazolidina, Esquema 4.

Derivados de β^3 -cisteína:

En literatura existen descritas varias metodologías para preparar β^3 -cisteína, como por ejemplo a partir de ácido aspártico protegido Boc-Asp(OtBu)-OSu⁷ o a partir de Cys protegida en el azufre con un benzilo y posterior homologación vía diazocetona^{8,9}.

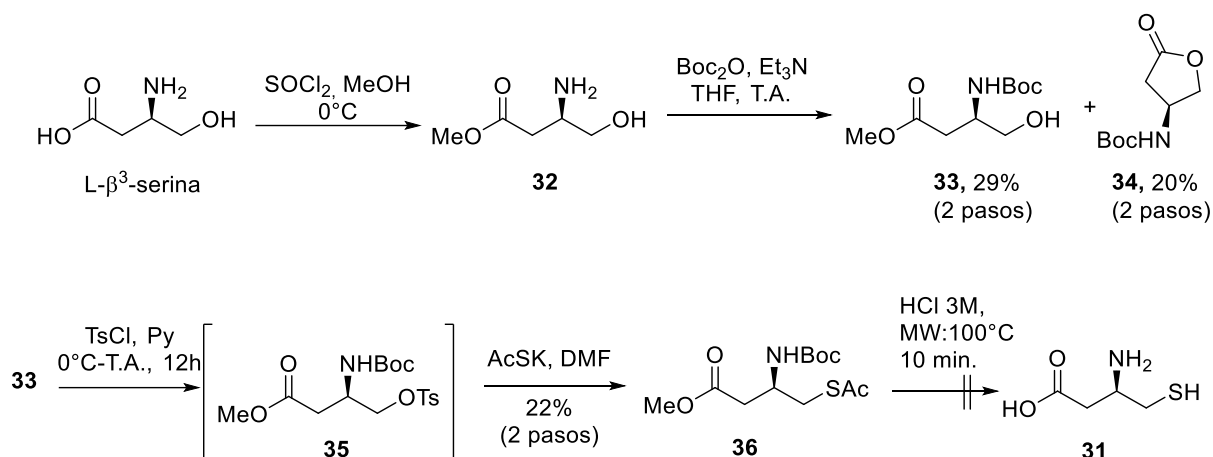
En nuestro caso se intentó preparar β^3 -cisteína a partir del ác. aspártico protegido (Boc-Asp(OtBu)-OSu) siguiendo la secuencia sintética descrita por Bergeron *et al.*⁷, Esquema 5.



Esquema 5. Síntesis de β^3 -cisteína a partir del derivado de aspártico Boc-Asp(OtBu)-OSu

En esta ruta el primer paso fue la reducción del ester N-hidroxisuccinimida del ácido aspártico derivatizado (Boc-Asp(OtBu)-OSu) con NaBH_4 en THF para dar el alcohol **28** con un 95% de rendimiento. La activación del alcohol **28** se hizo con TsCl dando el intermedio tosilado **29**, que luego se procedió a la su sustitución con AcSK para dar el tioacetilo **30**. El rendimiento de estos dos pasos fue muy bajo (6%), y se recuperó el material de partida **28** (63%). La desprotección del producto **30** se llevó a cabo en medio ácido fuerte utilizando HCl 6N a reflujo, pero en esas condiciones se descompuso el material de partida y no se obtuvo el producto deseado **31**.

En otro intento de obtener β^3 -cisteína se probó una ruta similar, pero partiendo del aminoalcohol β^3 -serina, Esquema 6.



Esquema 6. Síntesis de β^3 -cisteína a partir de β^3 -serina

Los dos primeros pasos fueron la protección del ácido carboxílico y del grupo amino de L- β^3 -serina. La protección del ac. carboxílico se llevó a cabo mediante la formación del cloruro de ácido con SOCl_2 en MeOH para obtener el éster metílico **32**. Luego se prosiguió con la protección del grupo amino con Boc_2O para obtener el producto **33** con 29% de rendimiento en los dos pasos y el producto secundario **34** (20% dos pasos). El aminoácido protegido **33** se activó con TsCl para dar el intermedio **35** el cual luego fue sustituido con AcSK, obteniéndose el producto tioacetilado **36** (22% dos pasos). La desprotección de **36** se probó en condiciones ácidas suaves utilizando HCl 3M en MW a 100°C por 10 minutos, pero nuevamente no pudo aislarse el producto desprotegido **31** y se descompuso el material de partida.

En ninguna de las dos rutas ensayadas se logró obtener β^3 -cisteína, el paso crítico fue la desprotección simultánea de todos los grupos funcionales (SH, NH_2 y CO_2H) en condiciones ácidas muy fuertes. Por lo tanto, se deberían probar condiciones de desprotección más suaves.

Derivados de β^3 -aminoalcoholes:

Para preparar estos análogos se probó realizar la doble ciclocondensación entre el ditiano **26** y β^3 -aminoalcoholes disponibles comercialmente como β^3 -L-serina y β^3 -L-treonina. Las reacciones se llevaron a cabo en medio BA pH 5, a reflujo por 2 horas, pero no se logró aislar los productos de ciclocondensación deseados, Esquema 7.

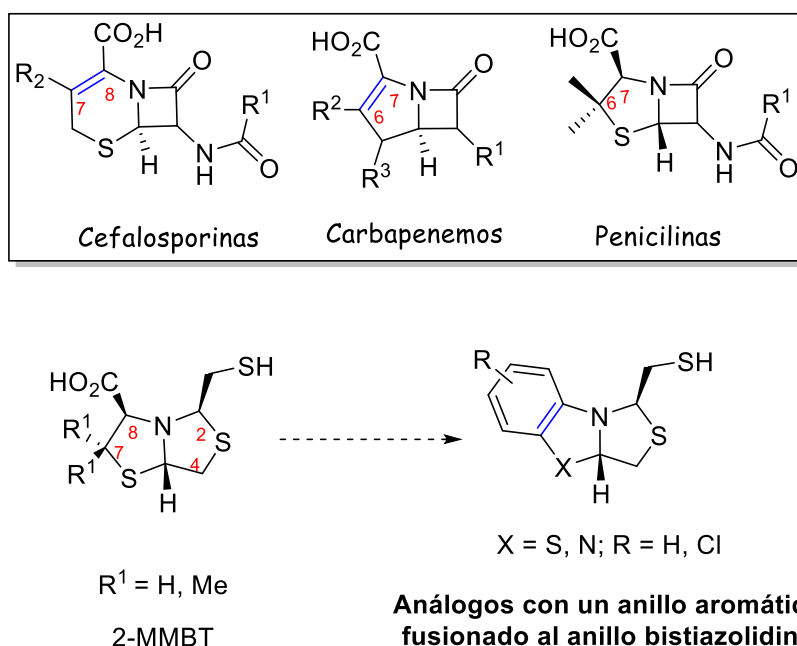


Esquema 7. Síntesis de análogos con $R^2 = CH_2CO_2H$ partiendo de β^3 -aminoalcoholes

En este objetivo específico se intentaron preparar varios análogos con modificaciones a nivel del carboxilato, pero sólo se logró preparar un análogo con $R^2 = H$ (\pm **27**). Los análogos con el carboxilato homologado $R^2 = CH_2CO_2H$, derivados de β^3 -cisteína y β^3 -aminoalcoholes no pudieron ser obtenidos.

4.3.1.B. Diseño y síntesis de análogos conteniendo un anillo aromático fusionado

Se planteó preparar análogos que contengan un anillo aromático fusionado a las bistiazolidinas en los C7 y C8 (X = S, N), Esquema 8.

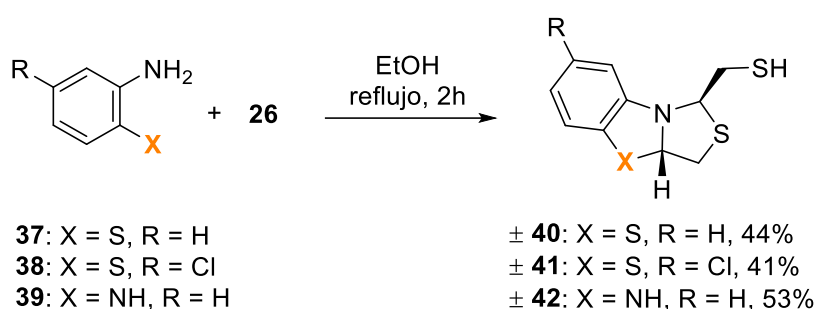


Esquema 8. Estructura de antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenemos). Estructura química de 2-MMBT y de los análogos con anillos aromáticos fusionados

Estos análogos por un lado sustituyen el carboxilato en C8 de las 2-MMBT y por otro lado incorporan una insaturación en el anillo bistiazolidina. La incorporación de un doble

enlace en C7-C8 en el anillo puede ser beneficioso si se tiene en cuenta que las estructuras químicas de las cefalosporinas y carbapenemos son mejores sustratos para las MβL que las penicilinas, Esquema 8. Este doble enlace que no está presente en penicilinas se localiza en C7-C8 del anillo dihidrotiazina en cefalosporinas o en C6-C7 en el anillo pirrolidina en carbapenemos.

Estos análogos se obtuvieron utilizando la misma metodología para preparar 2-MMBT descrita anteriormente. La doble ciclocondensación entre el ditiano **26** y distintos 2-aminotiofenoles o 1,2-fenildiamina se llevó a cabo en EtOH a reflujo por 2 horas, sin catalizador, Esquema 9.



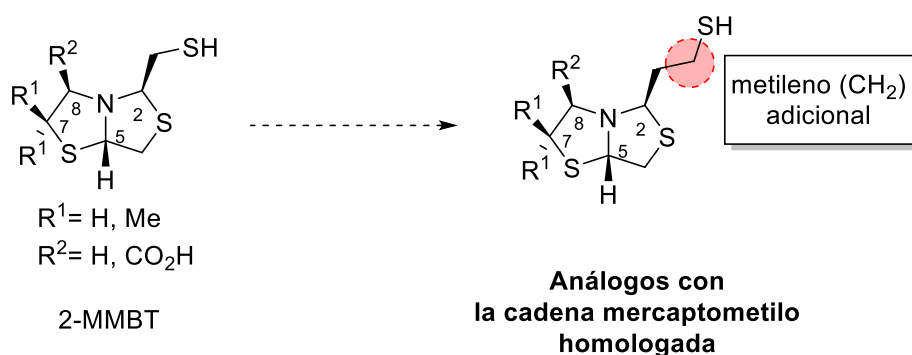
Esquema 9. Síntesis de los análogos con un anillo fusionado al biciclo bistiazolidina

Los análogos benzobistiazolidinas ± **40** (44%) y ± **41** (41%) se prepararon partiendo de 2-aminotiofenol **37** y 4-cloro-2-aminotiofenol **38** respectivamente. Cuando se partió de 2-fenildiamina **39** (X = NH) se obtuvo un análogo benzoimidazolidina-tiazolidina ± **42** con 53% de rendimiento. Todos los análogos fueron obtenidos como mezclas racémicas del diasterómero mayoritario *syn*.

Por lo tanto, siguiendo esta metodología sintética se lograron preparar tres nuevos análogos con un anillo aromático fusionado al biciclo bistiazolidina con rendimientos moderados de 41 a 53%, los cuales fueron evaluados como inhibidores de MβL.

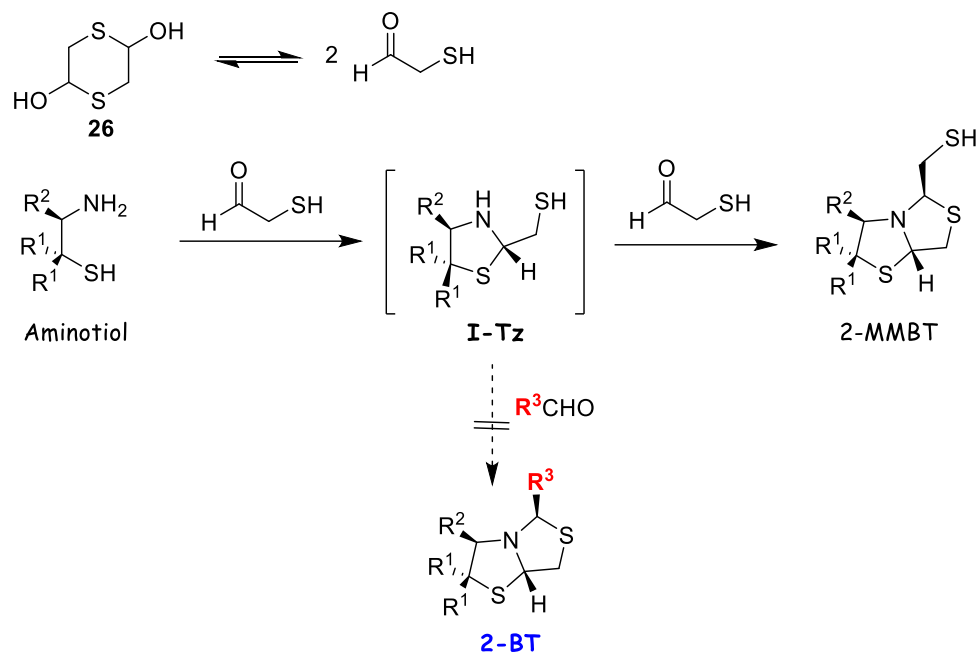
4.3.1.C. Diseño y Síntesis de análogos con modificaciones a nivel de la cadena mercaptometilo

El grupo tiol de la cadena mercaptometilo en C2 de las 2-MMBT demostró ser fundamental en la interacción de estos inhibidores con los iones Zn^{+2} en el sitio activo de la enzima. Por lo tanto, proponemos preparar nuevos análogos con la cadena mercaptometilo homologada en un carbono ($-CH_2CH_2SH$) manteniendo el grupo funcional SH y otorgando más flexibilidad conformacional a la cadena y estudiar cómo influye esta modificación en la interacción inhibidor-enzima, Esquema 10.



Esquema 10. Estructura química de 2-MMBT y de los análogos con la cadena mercaptometilo homologada

Las 2-MMBT, se obtienen por doble ciclocondensación entre un aminotiol y 2 moléculas de mercaptoacetaldehído que se encuentra como dímero en el ditiano **26**, Esquema 11.

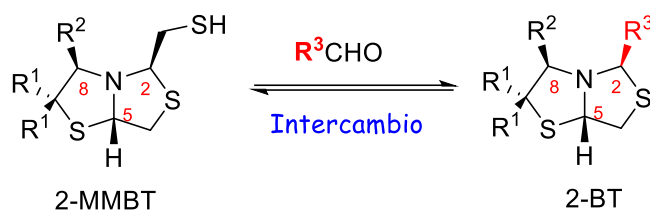


Esquema 11. Ruta sintética para la formación de 2-MMBT y de 2-BT

La doble ciclocondensación se da vía un intermedio tiazolidina **I-Tz**, que reacciona de forma muy rápida con la segunda molécula de mercaptoacetaldehído y no permite que este pueda ser aislado. Al no poder aislar este intermedio **I-Tz** para que pueda reaccionar con otros aldehídos (R^2CHO), se ve limitada la posibilidad de introducir en estos biciclos un sustituyente en posición 2 distinto a la cadena mercaptometilo. Por lo tanto, para preparar los análogos con las modificaciones en la cadena mercaptometilo, es necesario primero desarrollar una metodología de síntesis para preparar bistiazolidinas 2-sustituidas (2-BT).

4.3.1.C1. Desarrollo de una metodología para preparar bistiazolidinas 2-sustituidas

La reversibilidad del enlace imino $\text{C}=\text{N}$ se encuentra ampliamente descrita en literatura^{10,11,12}. Nuestro grupo ha estudiado la capacidad que tienen los heterociclos tiazolidinas de intercambiar en la posición acetálica con diferentes aldehídos¹³, a través de la formación de un intermedio imino $\text{C}=\text{N}$. Teniendo en cuenta estos antecedentes se decidió estudiar una reacción de intercambio de 2-MMBT con diferentes aldehídos como una metodología para la introducción de diferentes cadenas en la posición 2, Esquema 12.



Esquema 12. Reacción de intercambio propuesta para la preparación de 2-BT

El primer paso fue estudiar posibles catalizadores que promovieran la reacción de intercambio entre L-**24** e isobutiraldehído **43a** en MeOH. La reacción se ensayó tanto en ausencia de catalizador como en presencia de ác. *p*-TsOH⁷, L-prolina⁸ y NH₄OAc¹⁴, Tabla 1.

Tabla 1. Reacción de intercambio utilizando diferentes catalizadores

Entrada	catalizador	% Conversión 44a ^a
1	-	0
2	ác. <i>p</i> -TsOH (0.1 eq)	0
3	L-prolina (1.5 eq)	14
4	NH ₄ OAc (1.5 eq)	60

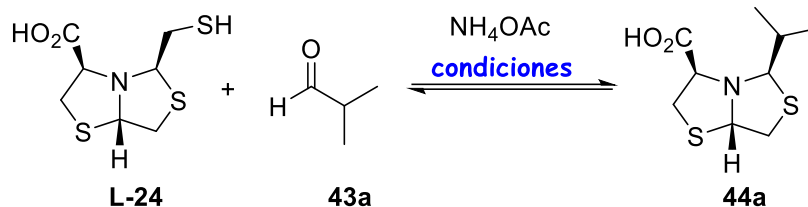
La reacción se llevó a cabo con la relación molar L-**24**: **43a** de 1:2; ^aLa conversión de L-**24** a **44a** fue determinada por ¹H-NMR usando las integrales (In) de las señales de H5 del producto de partida L-**24** y H5 del producto de intercambio **44a**, mediante la fórmula % **44a** = (In_{H5}**44a** / (In_{H5}L-**24** + In_{H5}**44a**)) × 100

Los resultados mostraron que la reacción no transcurre en ausencia de catalizador (Tabla 1, entrada 1) o en catálisis ácida usando ác. *p*-TsOH (Tabla 1, entrada 2). Sin embargo, el intercambio tuvo lugar al usar L-prolina (14%, Tabla 1, entrada 3) y NH₄OAc (60%, Tabla 1, entrada 4), obteniéndose con este último el mejor % de conversión. La reacción de intercambio también se probó en una relación molar L-**24**:aldehído (1:5) para estudiar si se podía aumentar la formación del producto de intercambio, sin embargo, este exceso de aldehído provocó muchos inconvenientes a la hora de purificar el producto final, por lo que decidimos seguir utilizando una relación 1:2.

Una vez identificado el mejor catalizador, se procedió a optimizar las condiciones de intercambio variando el disolvente, el tiempo de reacción y el método de calentamiento. Se emplearon disolventes no polares, polares próticos y apróticos, buffer acetato (BA) pH 5 y también se probó la reacción sin disolvente¹⁵. Los métodos de calentamiento del

intercambio fueron por convección a reflujo y por microondas (MW). Las condiciones ensayadas y los resultados obtenidos se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Optimización de condiciones para la reacción de intercambio



Entrada	Condiciones; solvente, Temperatura, tiempo.	% Conversión ^a	
		44a	% Aislado ^b 44a
1	MeOH, reflujo, 3 h	60	60
2	MeOH, MW 65 °C, 20 min.	60	55
3	BA pH 5, reflujo, 3 h	0	0
4	DCE, MW 65 °C, 20 min.	0	0
5	DCM, MW 65 °C, 20 min.	0	0
6	<i>i</i> PrOH, MW 65 °C, 20 min.	28	20
7	TFE, MW 65 °C, 20 min.	45	45
8	BuOH, MW 65 °C, 20 min.	11	-
9	EtOH, MW 65 °C, 20 min.	65	60
10	MeCN, MW 65 °C, 20 min.	0	0
11	DMF, MW 65 °C, 20 min.	34	23
12	Sin disolvente, MW 65 °C, 5 min.	100	33

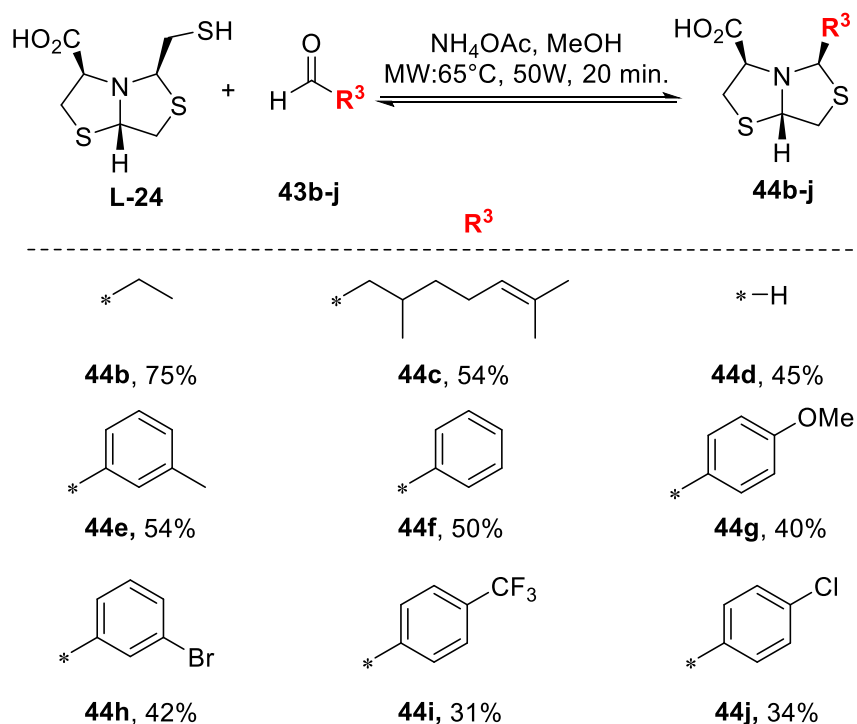
La reacción se llevó a cabo con una relación molar L-**24**:**43a**:NH₄OAc de (1:2:1.5); ^a La conversión de L-**24** a **44a** fue determinada por ¹H-NMR usando las integrales (In) de las señales de H5 del producto de partida L-**24** y H5 del producto de intercambio **44a**, mediante la fórmula % **44a** = (In_{H5}**44a**/(In_{H5}L-**24**+ In_{H5}**44a**))x100; ^b El compuesto aislado se obtuvo por cromatografía en columna.

Según los resultados obtenidos, la reacción de intercambio no ocurrió en BA a pH 5 (Tabla 2, entrada 3) o en MeCN (Tabla 2, entrada 10). En disolventes apolares como DCM y DCE tampoco se dio el intercambio (Tabla 2, entradas 4 y 5 respectivamente). En cambio, la reacción procedió en disolventes polares próticos. Los mejores resultados de intercambio se observaron cuando se utilizó MeOH (Tabla 2, entradas 1 y 2) o EtOH (Tabla 2, entrada 9). Cuando la reacción se ensayó sin disolvente en MW (Tabla 2,

entrada 12) el porcentaje de conversión fue considerado 100% ya que no se observó material de partida L-**24** en el crudo de reacción, pero sin embargo al purificar se obtuvo el compuesto **44a** con un muy bajo rendimiento (33%), esto probablemente se debió a la descomposición del material de partida.

En cuanto a los métodos de calentamiento, ambos resultaron ser eficientes (Tabla 2, entradas 1 y 2), pero el calentamiento por MW presentó una disminución importante del tiempo de reacción, de 3h a 20min, por lo que se lo eligió como método de calentamiento.

Una vez optimizadas las condiciones de reacción para el intercambio entre L-**24** y el aldehído **43a** se probó el alcance de la reacción con otros aldehídos alifáticos **43b-d** y aromáticos **43e-j**, Esquema 13.



Esquema 13. Reacción de intercambio de la bistiazolidina L-**24** con distintos aldehídos **43b-j**; Los rendimientos expresados corresponden al producto aislado

La reacción de intercambio se probó con 9 aldehídos distintos y en todos los casos se obtuvo el producto deseado con rendimientos que oscilan entre 31 y 75%. Se observó que los aldehídos alifáticos intercambiaron de manera más eficiente que los aromáticos con rendimientos que van desde 45 al 75% (**44b-d**). En los aldehídos aromáticos la naturaleza electrónica del sustituyente en el anillo no presentó una clara influencia en

el proceso de intercambio y el mejor rendimiento se obtuvo con *m*-toluenaldehído (54%, **44e**). Por lo tanto, podemos decir que la reacción de intercambio de la bistiazolidina L-**24**, en las condiciones planteadas fue efectiva para diversos aldehídos.

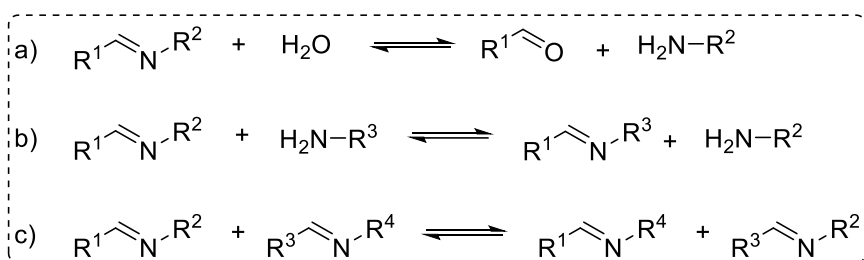
El siguiente paso fue variar 2-MMBT de partida y estudiar el alcance de la reacción, Tabla 3.

Tabla 3. Reacción de intercambio con distintas bistiazolidinas y aldehídos

Entrada	2-MMBT de partida	aldehído	Producto	Rendimiento (%)
1	 ± 27	 43a	 ± 45	65
2	 ± 27	 43k	 ± 46	21
3	 L-25	 43a	 L-47	54
4	 ± 46	 43a	 ± 45	68

Se estudiaron las 2-MMBT **L-25** y \pm **27** con variaciones en los sustituyentes de los C7 y C8 y en ambos casos el intercambio fue exitoso con rendimientos de 21 a 65%. El intercambio a partir de la bistiazolidina \pm **27** funcionó mejor con isobutiraldehído **43a** (\pm **45**, 65%) que con un aldehído de cadena más larga como el hexanal **43k** (\pm **46**, 21%), Tabla 3, entradas 1 y 2 respectivamente. Para probar la reversibilidad del intercambio y si la cadena mercaptometilo influía en el mismo, se utilizó la bistiazolidina \pm **46** como material de partida y el aldehído **43a**, obteniéndose la bistiazolidina \pm **45** con un 68% de rendimiento, Tabla 3, entrada 4. Estos resultados nos permiten afirmar que la cadena mercaptometilo no influye en la reacción de intercambio y que se logró desarrollar una metodología para preparar 2-alkil o aril bistiazolidinas.

A la hora de estudiar el mecanismo de intercambio se consideró que las bistiazolidinas se pudieran comportar como compuestos que contienen grupos imino, capaces de intercambiar reversiblemente sustituyentes R en el enlace $R^1-C=N-R^2$. En literatura está descrito que las iminas intercambian grupos principalmente por tres mecanismos, Esquema 14, 1) por hidrólisis (con agua), 2) por transaminación (imina-amina) o 3) por metátesis de iminas (imina-imina)^{16,17}. Por lo que se decidió monitorear los diferentes pasos de la reacción por RMN en busca de algún intermedio clave que nos permita visualizar y elucidar el mecanismo por el cual procede la reacción de intercambio.

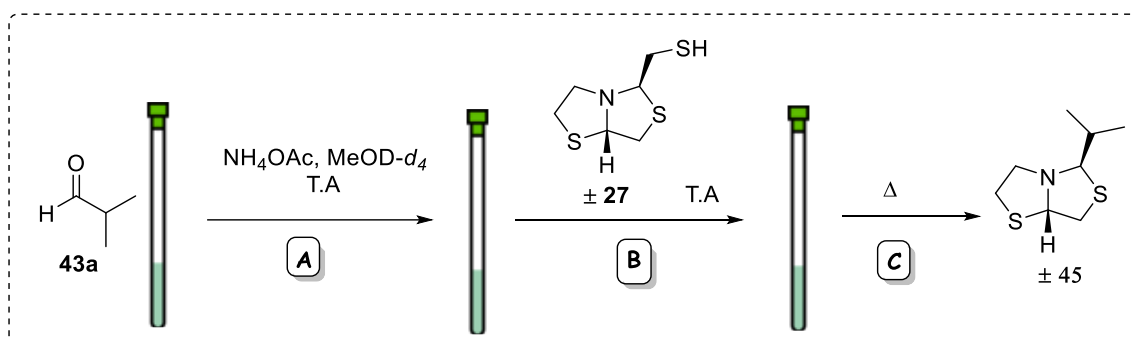


Esquema 14. Posibles mecanismos de intercambio de iminas

4.3.1.C2. Estudio del mecanismo de la reacción de intercambio utilizando RMN y cálculos teóricos

Para estudiar el posible mecanismo de la reacción de intercambio se realizaron experimentos de RMN y cálculos teóricos utilizando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT por sus siglas en inglés).

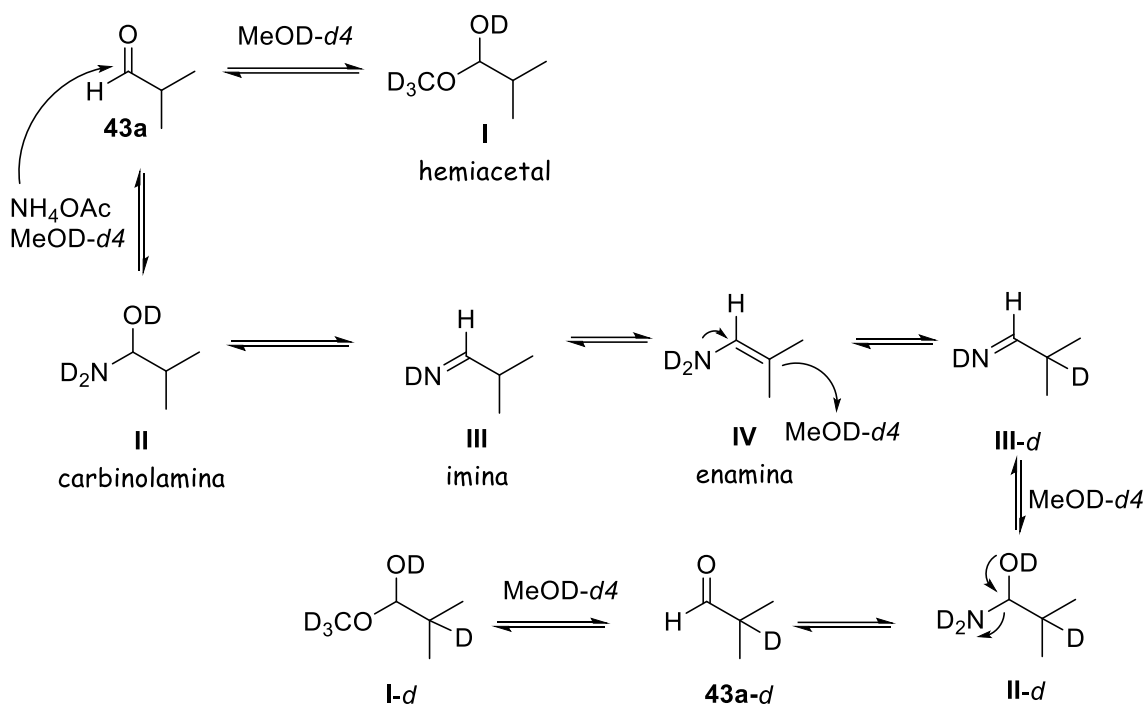
El seguimiento de la reacción por RMN se realizó directamente en un tubo de RMN y se estudiaron las especies que se iban formando en cada etapa de la misma. En cada una de ellas se monitoreó la reacción por un determinado período de tiempo realizando experimentos de ^1H -RMN, HSQC-RMN, ^{13}C -RMN y ^{15}N -RMN (cuando se usó $^{15}\text{NH}_4\text{OAc}$). Se utilizó $\text{MeOD-}d_4$ como disolvente, NH_4OAc sin marcar o marcado con ^{15}N y los reactivos se fueron agregando en dos etapas A y B a TA, Esquema 15. La etapa A corresponde a la mezcla de aldehído **43a** con NH_4OAc para luego en la etapa B agregar la bistiazolidina \pm **27**. La etapa C corresponde al calentamiento a 50°C de la mezcla de reacción, en el equipo de RMN.



Esquema 15. Metodología utilizada para el estudio del mecanismo de intercambio. Etapa A) **43a** (2eq), NH_4OAc (1.5eq), $\text{MeOD-}d_4$ (0.6mL), T.A; Etapa B) agregado de \pm **27** a la etapa A), T.A; Etapa C) calentamiento a 50°C de la etapa B

Etapa A:

Se estudió la reacción entre el aldehído **43a** y NH_4OAc en $\text{MeOD-}d_4$ a T.A. En esta primera etapa se observó la formación de una mezcla compleja de especies que iba variando en función del tiempo, que mediante los distintos experimentos de RMN se logró resolver. Luego del análisis de los espectros de ^1H -RMN en el tiempo se propuso el mecanismo de deuteración y formación de la imina que explica las señales observadas en los espectros, Esquema 16.



Esquema 16. Mecanismo propuesto para la formación de la imina **III** y su deutерación

Se observó que además de la formación de la imina **III** entre el aldehído **43a** y NH_4OAc , el $\text{MeOD-}d_4$ también reaccionaba con el aldehído formando el hemiacetal **I** y a la vez se promovía la deutерación progresiva de las distintas especies presentes en el medio de reacción. El aldehído **43a** en $\text{MeOD-}d_4$ está en equilibrio con el hemiacetal **I**, al agregarle NH_4OAc , se observaron en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ las señales características de los protones que corresponden a la carbinolamina **II**, imina **III** y enamina **IV** en 3,84, 7,64 y 6,39 ppm, respectivamente. Inmediatamente también se observó la aparición de las especies deutерadas y el aumento de su relación con el tiempo, Figura 3. Se observó principalmente un cambio en la multiplicidad de las señales que pasó de un doblete a singulete debido a la presencia de un deuterio en el caso del protón característico del aldehído. Los acoplamientos protón-deuterio típicamente son mucho más pequeños que los acoplamientos protones-protones y no pudieron ser detectados. En la Figura 3 también se pudo observar cómo la señal perteneciente a enamina **IV** iba disminuyendo hasta su desaparición total a las 8 horas de reacción. La deutерación de las especies antes mencionadas fue casi completa después de dos horas de reacción. En ese momento también se realizaron experimentos de ^{13}C y $^{15}\text{N-HMBC-RMN}$, que permitió

determinar los valores de resonancia de ^{13}C (172 ppm) y ^{15}N (-217.1 ppm) para la imina **III-d**.

III-d.

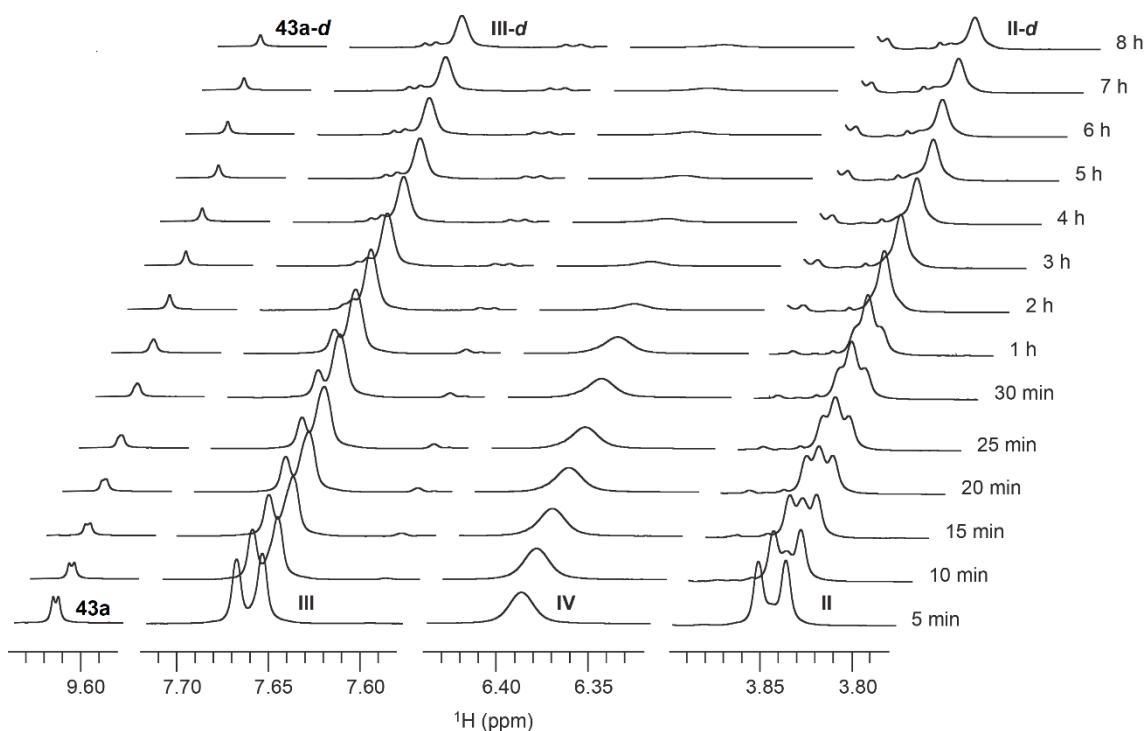


Figura 3. Regiones seleccionadas de los espectros de ^1H -NMR de la reacción del aldehído **43a** con NH_4OAc en $\text{MeOD-}d_4$ a TA, mostrando las regiones de los compuestos **43a** (protón de aldehído), **II** (protón hemiaminal), **III** (protón de imina) y **IV** (protón de enamina) y de sus respectivos homólogos deuterados **43a-d**, **II-d** y **III-d**

Etapa B:

Luego de llegar al equilibrio entre la imina **III** y su homólogo deuterado **III-d** a las dos horas de reacción, se agregó la bistiazolidina \pm **27**. Inmediatamente luego de su agregado, se observa en el espectro de ^1H -RMN, la desaparición completa de la señal de la imina **III-d** (7.63 ppm) y la aparición de dos nuevas señales de imina en 7.58 y 7.55 ppm, además de señales pertenecientes al reactivo \pm **27**. A partir de los experimentos 1D y 2D-RMN realizados se pudo establecer que esas nuevas señales correspondían a dos iminas diastereoméricas del intermedio **27-II-d**, Figura 4.

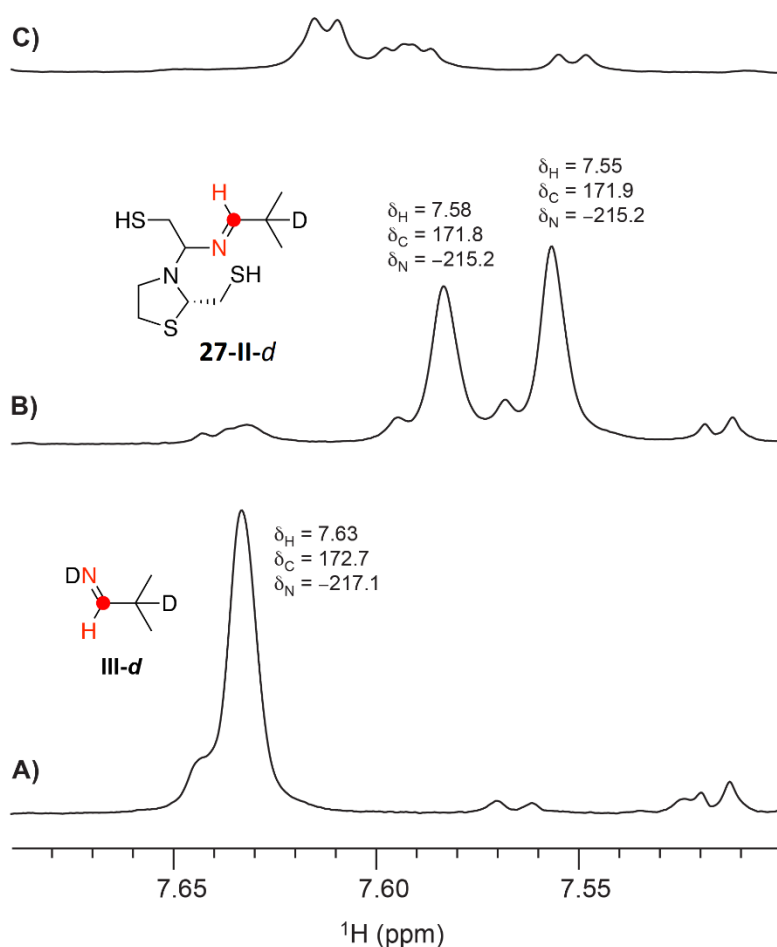


Figura 4. Espectros ^1H -RMN de las mezclas de reacción: A) **43a** (0,21 mmol), NH_4OAc (0,15 mmol) en $\text{MeOD-}d_4$ (0,6 mL), T.A, 2 h, etapa A; B) **43a** (0,21 mmol), NH_4OAc (0,15 mmol), $\pm\mathbf{27}$ (0,10 mmol), $\text{MeOD-}d_4$ (0,6 mL), T.A, $t = 02$ min., etapa B; C) Calentamiento etapa B, 2h 50°C , etapa C

La reacción se siguió monitoreando a T.A por un período de 24 horas, luego de las cuales todavía se observaba el intermedio **27-II-d** y no se vieron señales que pertenecieran al producto de intercambio $\pm\mathbf{45-d}$.

Etapa C:

Luego de calentar el tubo de RMN a 50°C por 120 minutos, en el espectro de ^1H -RMN se pudo observar que las señales de las iminas del intermedio **27-II-d** desaparecieron por completo. Las señales del material de partida $\pm\mathbf{27}$ también desaparecieron y se pudo observar la aparición de señales pertenecientes al producto de intercambio $\pm\mathbf{45-d}$, Figura 4, C. La elucidación de este producto fue confirmada por síntesis preparativa en $\text{MeOD-}d_4$. En la figura 5 se muestra la región del espectro de ^1H -RMN de la etapa C en dónde se encuentran las señales que corresponden al producto $\pm\mathbf{45-d}$.

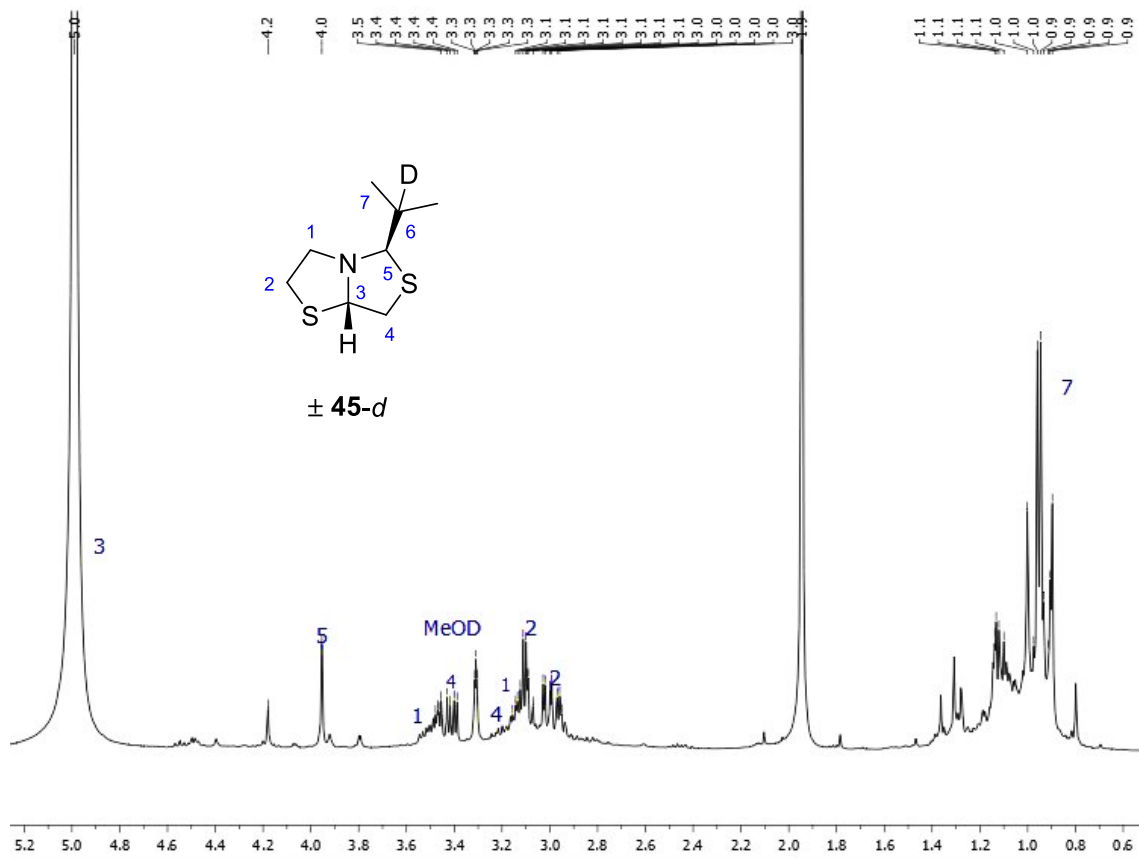
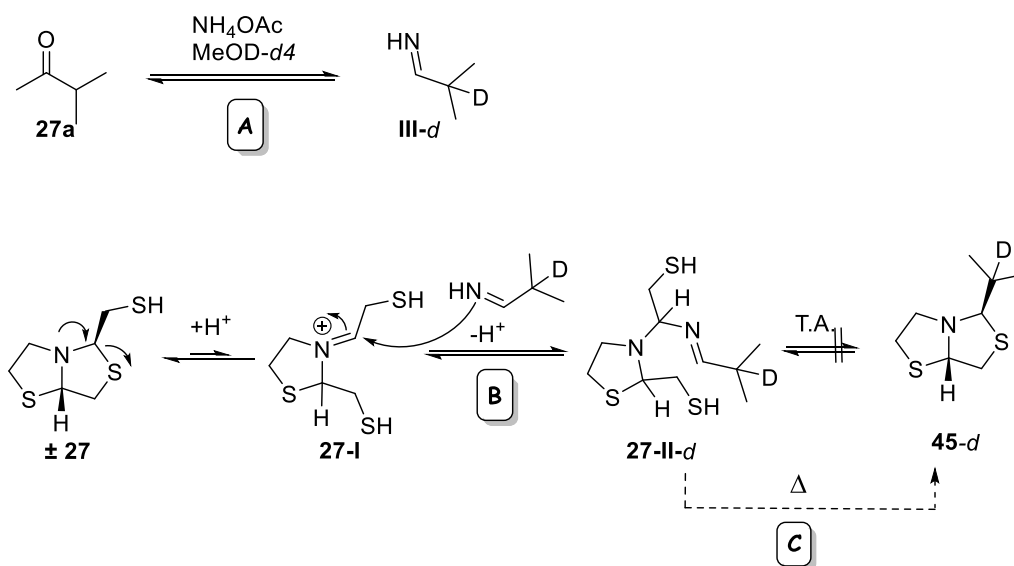


Figura 5. Espectro $^1\text{H-NMR}$ de la etapa C en $\text{MeOD-}d_4$; elucidación del producto de intercambio $\pm 45-d$

En base a la caracterización de la imina III-d y del intermedio 27-II-d , y a los conocimientos previos en cuanto a la formación de las 2-MMBT, planteamos un mecanismo posible para la formación del 27-II-d , ver Esquema 17.

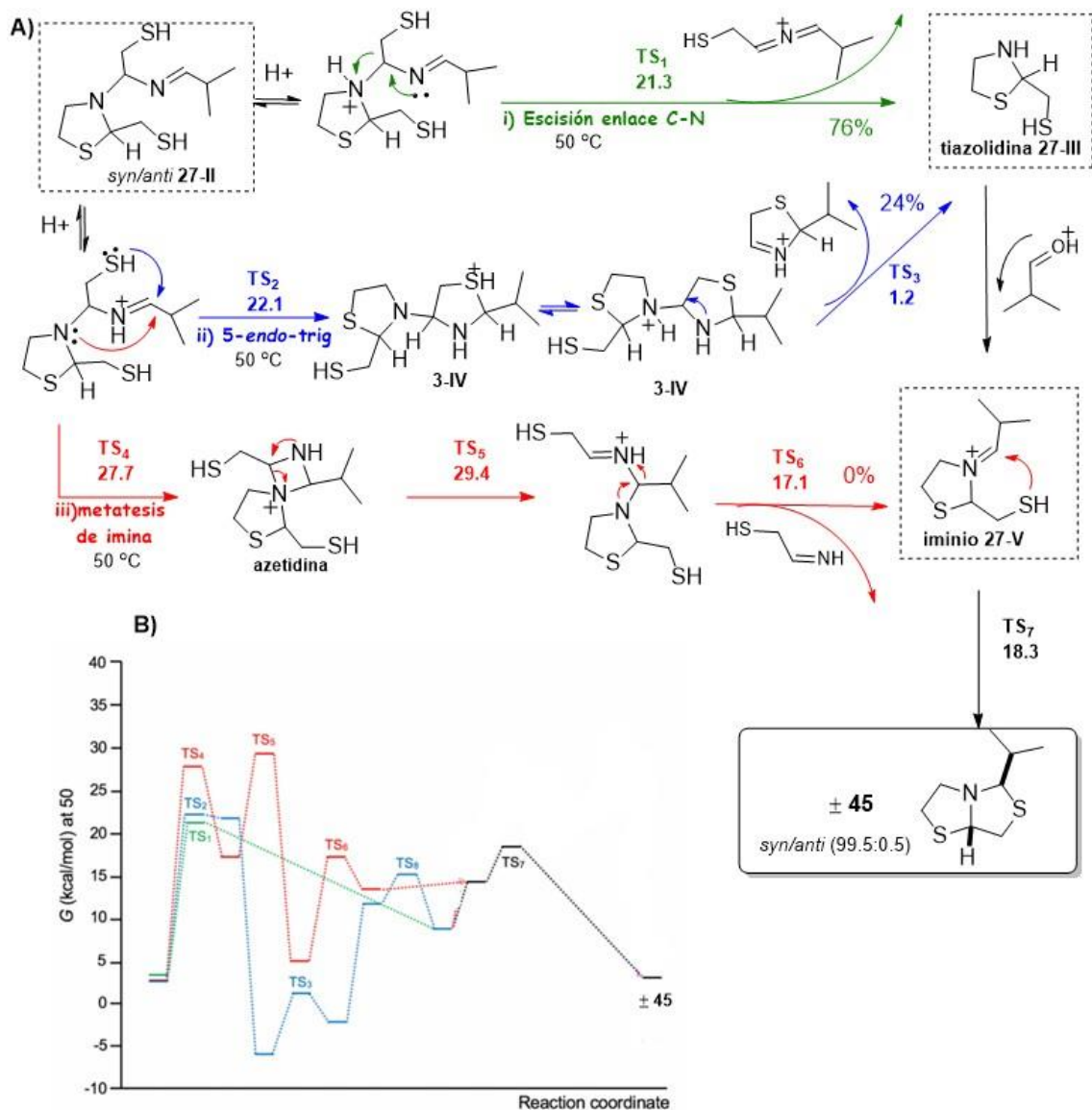


Esquema 17. Mecanismo propuesto para la formación de la bistiazolidina \pm **45-d**

En la etapa A, el aldehído reacciona con NH_4OAc en $\text{MeOD-}d_4$ para dar la imina **III-d**. La bistiazolidina \pm **27** en el medio de reacción está en equilibrio con la imina **27-I**, este intermedio no se observó en el $^1\text{H-RMN}$. El N de la imina **III-d** ataca al carbono del ion iminio en **27-I** formando así el intermedio **27-II-d**. a T.A, la reacción se estanca en este punto y no se observa que avance al producto de intercambio \pm **45-d**. El avance de la reacción hacia el producto de intercambio se observa al calentar la mezcla de reacción por 120 min a 50°C , etapa C. En esta etapa, por RMN se pudo observar que todo el intermedio **27-II-d** se consumía y se formaba el producto \pm **45-d**, aunque no fue posible observar otros intermedios de reacción. Propusimos entonces realizar cálculos teóricos que nos permitieran deducir una secuencia para dicha transformación y proponer un posible mecanismo para la Etapa C.

Cálculos teóricos DFT para la etapa C:

Para realizar los cálculos teóricos DFT se usó un nivel de teoría M062x / 6-31 + G (d, p). Primero se propusieron los diferentes mecanismos por los cuales se podría dar la transformación del intermedio **27-II** hacia el producto de intercambio \pm **45**, teniendo en cuenta todas las posibilidades estereoquímicas de los compuestos involucrados. Los estudios teóricos fueron diseñados en conjunto con el Dr. Nicolas Veiga, del laboratorio de Inorgánica, Facultad de Química, Udelar. En el Esquema 18 se muestra un resumen de los resultados obtenidos por DFT.



Esquema 18. A) Mecanismos propuestos para la formación de ± 45 a partir de **27-II**. Las barreras de activación (ΔG^\ddagger a 50 °C) con respecto al reactivo se incluyen en kcal.mol⁻¹ para las rutas de energía de activación más baja entre las variantes estereoquímicas. El % de distribución bajo control cinético (principio Curtin-Hammett) también se incluye para las diferentes vías. La distribución del diastereómero para el compuesto ± 45 *syn/anti* (99.5:0.5) se determinó en equilibrio; B) predicción de los perfiles de reacción. El proceso de energía de activación más baja implica las vías verdes y negras (a través de TS1 y TS7). Los cálculos DFT se llevaron a cabo a nivel de teoría M062x/6-31+G(d,p)

Los mecanismos propuestos comienzan a partir de la protonación de **27-II** por el catalizador NH₄OAc. Esta protonación se puede dar tanto a nivel del N de la amina como del N de la imina. Esto desencadenaría tres vías posibles para la formación de ± 45 : i) formación de tiazolidina **27-III** por escisión del enlace C-N asistido por N, ii) formación de tiazolidina **27-III** asistida por el grupo tiol de **27-II** a través de una ciclación 5-*endo*-

trig, seguida de la escisión del enlace C-N y iii) metátesis de imina a través de un intermedio de azetidina. Este último paso fue propuesto de acuerdo con lo reportado en literatura por Messmer *et al.* para iminas aromáticas¹⁸, este paso daría lugar a la formación del ion iminio **27-V**, siendo un intermedio común para todas las rutas, su ciclación intramolecular deriva en la formación de la bistiazolidina \pm **45** (*syn/anti* 99.5:0.5).

De acuerdo con las barreras de activación calculadas (ΔG^\ddagger) a 50 ° C (Esquema 18-B), el proceso de menor energía de activación implica la formación de la tiazolidina **27-III** por la vía i) (representada en verde en el Esquema 18-A), seguido de la reacción con el aldehído **43a** para formar el ion iminio **27-V**. Finalmente, su ciclación intramolecular conduce a \pm **45** (mostrado en negro en el Esquema 18-A). Considerando todas las variantes estereoquímicas y las barreras de energía libre de activación (ΔG) para las rutas de energía de activación más baja son 21,3 y 18,3 kcal.mol⁻¹ (TS1 y TS7, respectivamente), Esquema 18-B. La ciclación 5-*endo-trig* seguida de la escisión del enlace C-N (vía ii, que se muestra en azul en el Esquema 18-A también contribuye a la formación del intermedio **27-III** (24%), con una barrera de activación cercana (22,1 kcal.mol⁻¹, ver TS2 en el Esquema 18-B). Sin embargo, se descartó la metátesis de imina (ruta iii, representada en rojo en el Esquema 18-A), ya que presenta estados de transición de mayor energía (TS4 y TS5, mostrados en el Esquema 18-B). La diferencia de energía libre entre las barreras de activación global de las vías i) y iii) es $\Delta TS5-TS1 = 8.1$ kcal.mol⁻¹.

La relación diasterómera teórica predicha para \pm **45** bajo control termodinámico es *syn/anti* 99.5:0.5, lo cual concuerda con el valor experimental *syn/anti* 90:10. Esto valida los métodos computacionales empleados y da evidencia de que se alcanzó el equilibrio. La preferencia termodinámica por los diasterómeros *syn* se puede explicar por sus características estructurales, Figura 6. La disposición hacia el mismo plano de los sustituyentes produce una conformación de flexión o “en forma de libro” del biciclo, separando los sustituyentes, H e isopropilo, de manera de aliviar la repulsión estérica.

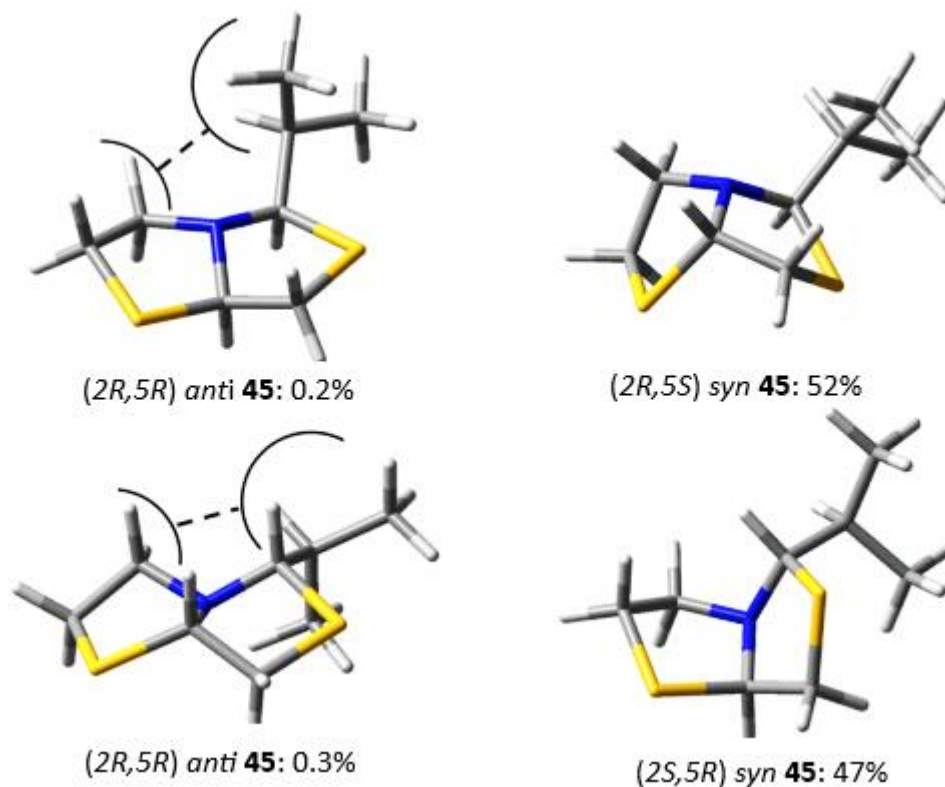


Figura 6. Geometrías optimizadas para DFT de las variantes estereoquímicas para el producto final \pm **45**, (M062x/6-31+G(d,p) nivel de teoría). También se muestra la distribución estereoquímica para cada esteroisómero en equilibrio. Las interacciones repulsivas estéricas se representan como líneas discontinuas. Código de color de átomo: C (gris), H (blanco), N (azul), S (amarillo)

En resumen, se propone que el catalizador juega un papel doble al formar la imina necesaria para el intercambio y al proporcionar el medio ácido para promoverlo. Se identificó y elucidó mediante espectroscopía de RMN un intermedio imina (**29-II**) que resultó clave en el mecanismo. Mediante cálculos de DFT se obtuvieron las energías de activación para la transformación de la imina **29-II** en \pm **45**. Las rutas más favorables implicaron la formación del intermedio tiazolidina **29-III** mediante i) ruptura del enlace N-C asistida por N, y ii) una ciclación 5-*endo-trig* mediada por tiol seguida de una ruptura del enlace C-N. La tiazolidina **29-III** luego reacciona con el aldehído **27a** para dar \pm **45**¹⁹.

Reacción de intercambio catalizada por ácidos de Lewis

Debido a que obtuvimos el producto de intercambio con rendimientos variables decidimos explorar la posibilidad de estudiar la reacción utilizando ácidos de Lewis, con el fin de mejorar los rendimientos. Existen descriptos en bibliografía trabajos en donde

utilizan ácidos de Lewis como Sc(III)^{20,21}, Zn²² en reacciones de transaminación, que podrían ser aplicables a las bistiazolidinas.

Las reacciones de intercambio se ensayaron con distintos ácidos de Lewis: In(OTf)₃, Yb(OTf)₃ y Zn(OTf)₃ en ausencia y presencia de NH₄OAc, y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Reacción de intercambio de L-24 con 43a catalizada por ácidos de Lewis utilizando MW

Entrada	Ác. Lewis	NH ₄ OAc (eq)	29a, Conversión (%)
1	In(OTf) ₃	1.5	52
2	Yb(OTf) ₃	1.5	34
3	Zn(OTf) ₂	1.5	47
4	In(OTf) ₃	-	17
5	Yb(OTf) ₃	-	47
6	Zn(OTf) ₂	-	53

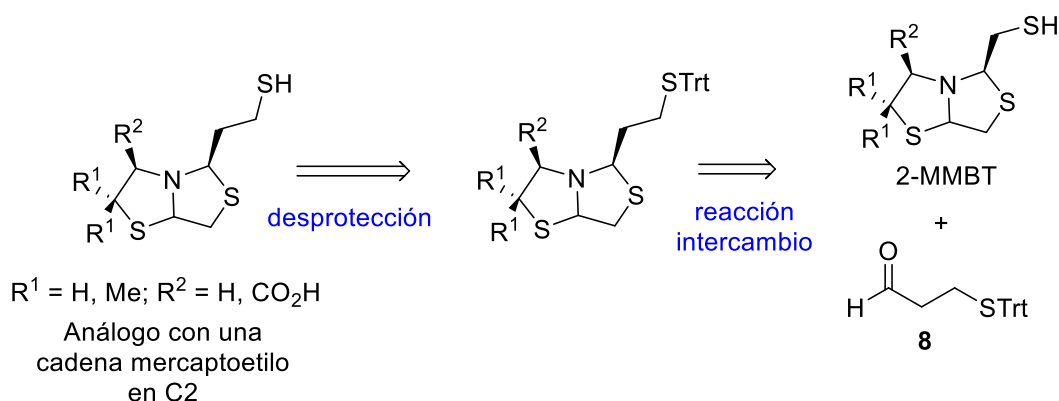
^a La conversión de L-24 a 29a se calculó por ¹H-RMN en el crudo de reacción

La reacción de intercambio con ácidos de Lewis se dio tanto en presencia como en ausencia de NH₄OAc. Cuando se usó In(OTf)₃ como catalizador, la reacción transcurrió mejor en presencia del NH₄OAc que sin NH₄OAc con 52% vs 17% de rendimiento (Tabla 4, entradas 1 y 6). Sin embargo, cuando se usó Yb(OTf)₃ (Tabla 4, entradas 2 y 5) y Zn(OTf)₃ (Tabla 4, entradas 3 y 6), el intercambio se dio con rendimientos levemente superiores en ausencia de NH₄OAc.

Dado que el intercambio transcurre también en ausencia de NH₄OAc, podemos decir que en ese caso el mecanismo transcurriría un mecanismo diferente al estudiado anteriormente, probablemente mediante una hidrólisis de iminas.

4.3.1.C3. Síntesis de homólogos de la cadena mercaptometilo utilizando la metodología desarrollada para la síntesis de 2-BT

La síntesis de los análogos de 2-MMBT con la cadena mercaptometilo homologada, se planteó en dos pasos como lo muestra el Esquema 19. El primer paso i) involucra la metodología de intercambio desarrollada anteriormente, entre distintas 2-MMBT y el aldehído **8** que tiene el SH protegido por un grupo tritilo para evitar su oxidación. El segundo paso ii) es la desprotección del grupo tritilo.



Esquema 19. Esquema retrosintético para la síntesis de los análogos con la cadena mercaptometilo homologada

Reacción de intercambio entre 2-MMBT y el aldehído **8**:

La reacción de intercambio entre distintas 2-MMBT y el aldehído **8**, se ensayó en las condiciones optimizadas para la metodología desarrollada para preparar 2-BT y catalizada con ácidos de Lewis, Tabla 5.

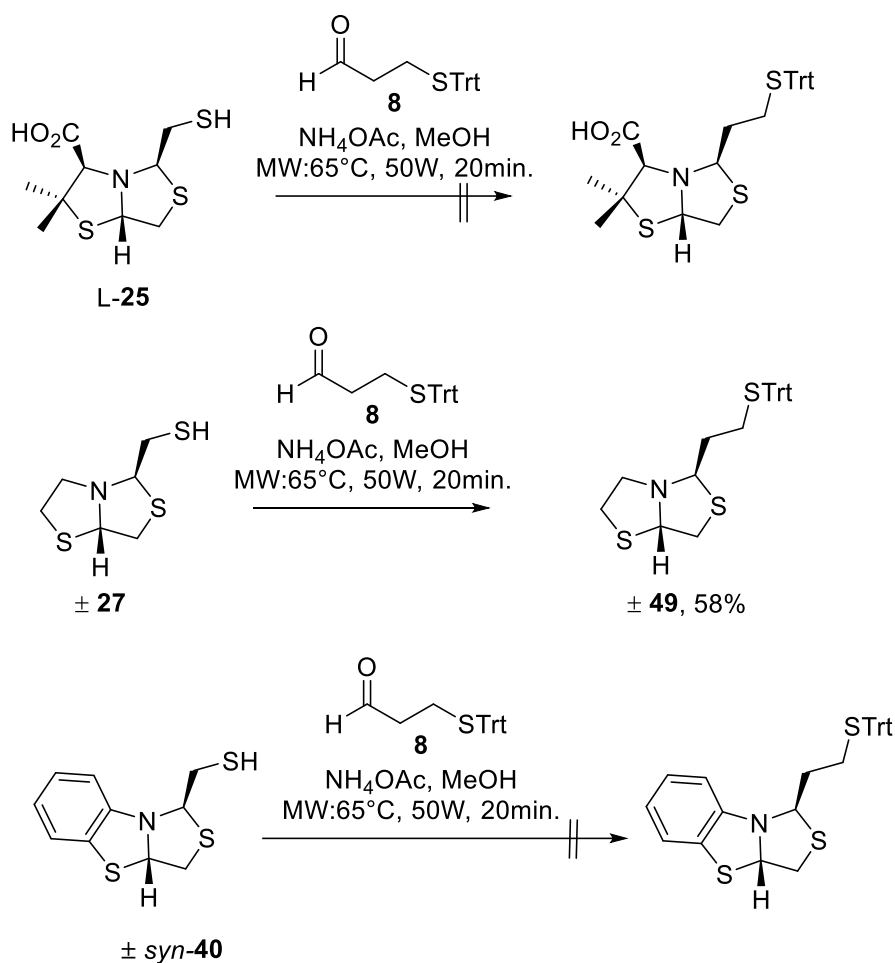
Tabla 5. Reacción de intercambio entre L-24 y el aldehído 8

$\text{L-24} + \text{H-C(=O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-Ph} \xrightleftharpoons[\text{MW:65}^\circ\text{C, 50W, 20min.}]{\text{catalizador, MeOH}} \text{L-48} + \text{H-C(=O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$

Entrada	NH ₄ OAc (eq)	Ácido de Lewis (5 mol %)	L-48, Rendimiento (%)
1	1.5	-	64
2	1.5	In(OTf) ₃	10
3	1.5	Sc(OTf) ₃	23
4	1.5	Zn(OTf) ₃	21
5	-	In(OTf) ₃	15
6	-	Sc(OTf) ₃	9
7	-	Zn(OTf) ₃	4

La reacción de intercambio entre la bistiazolidina L-24 y el aldehído 8 para obtener el producto L-48, se probó con diferentes catalizadores y sus combinaciones. Catalizada sólo por NH₄OAc (Tabla 5, entrada 1), catalizada por NH₄OAc y ácidos de Lewis (Tabla 5, entradas 2-4) y catalizada sólo por ácidos de Lewis (Tabla 5, entradas 5-7). Según los resultados obtenidos, el mejor resultado de intercambio se obtuvo cuando se catalizó la reacción únicamente con NH₄OAc (64%, Tabla 6, entrada 1). El agregado de ácido de Lewis a la reacción con NH₄OAc no mostró mejoras en los rendimientos (10-23%), Tabla 5, entradas 2-4. En estos ejemplos, no hubo sinergia entre los dos tipos de catalizadores para el intercambio. El uso exclusivo de ácido de Lewis como catalizador, logró intercambiar el aldehído 8 para dar el producto L-48 pero con rendimientos muy bajos de (4-15 %), Tabla 5, entradas 5-7.

Dado que los ácidos de Lewis no lograron aumentar el rendimiento de la reacción de intercambio, se decidió probar el intercambio entre las bistiazolidinas L-25 y ± 29 con el aldehído 8 utilizando sólo NH₄OAc como catalizador, Esquema 20.



Esquema 20. Reacciones de intercambio entre el aldehído **8** y las bistiazolidinas L-**25** , \pm **27** y \pm *syn*-**40**

El intercambio del aldehído **8** con las bistiazolidinas L-**25** y \pm **40** no se obtuvo en las condiciones ensayadas. El intercambio con la bistiazolidina \pm **27** dio el producto \pm **49** con buen rendimiento (58%).

En esta etapa, se probó homologar la cadena mercaptometilo con distintas bistiazolidinas utilizando la reacción de intercambio, y se logró obtener sólo dos análogos protegidos en el azufre con tritilo (S*Trt*) y la cadena mercaptometilo homologada L-**48** y \pm **49**. El intercambio entre L-**24** y **8** se probó en varias condiciones de catálisis, siendo el NH₄OAc el mejor catalizador y reafirmando que el NH₄OAc y los ácidos de Lewis no comparten el mismo mecanismo a la hora de catalizar el intercambio de iminas.

Desprotección del grupo tritilo:

Para desproteger el grupo tritilo de L-**48** y \pm **49** se usaron dos condiciones de desprotección. Por un lado las condiciones clásicas con distintas proporciones de TFA:DCM:TIS (v:v:v) y por otro lado las condiciones reportadas por Stetsenko *et al.* que utiliza HCl 0.1N:TFE:TIS (v:v:v)²³, Tabla 6.

Tabla 6. Reacción de desprotección del grupo tritilo L-**48** y \pm **49**

L-48: R² = CO₂H
 \pm **49:** R² = H

L-50: R² = CO₂H
 \pm **51:** R² = H

Entrada	Material de partida [Molaridad]	TFA:DCM:TIS (v:v:v)	HCl 0.1N:TFE:TIS (v:v:v)	Tiempo (min)	Producto, %
1	L- 48 [0.018]	8:84:8	-	60	L- 50 , 5
2	L- 48 [0.075]	5:90:5	-	25	L- 50 , 2
3	L- 48 [0.04]	-	1:90:9	15	L- 50 , 10
4	\pm 49 [0.43]	8:84:12	-	120	\pm 51 , 2
5	\pm 49 [0.04]	-	1:90:9	15	\pm 51 , 26
6	\pm 49 [0.05]	-	1:90:9	30	\pm 51 , 24

En las condiciones ensayadas, la desprotección del grupo tritilo en ambas bistiazolidinas transcurrió más eficientemente con el uso de la mezcla HCl 0.1N:TFE:TIS (v:v:v) (Tabla 6, entradas 3, 5 y 6) que en las condiciones clásicas con TFA:TIS:DCM (v:v:v) (Tabla 6, entradas 1, 2 y 4). El aumento del tiempo de desprotección con HCl 0.1N:TFE:TIS (v:v:v) (Tabla 6, entrada 5 y 6) para el compuesto \pm **49** no influyó en el rendimiento. Los bajos rendimientos obtenidos también se deben a la inestabilidad que presentan estos compuestos.

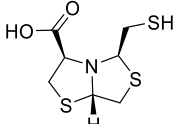
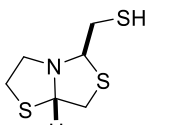
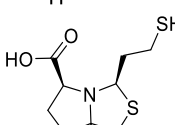
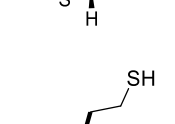
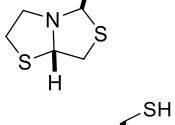
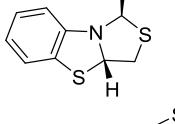
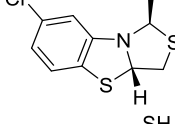
En conclusión, en esta etapa se logró preparar dos nuevos análogos bistiazolidinas con la cadena 2-mercaptometilo homologada en un carbono para ser evaluados como potenciales inhibidores de M β L.

4.3.2. Caracterización biológica de los análogos de 2-MMBT

4.3.2A. Estudios de inhibición enzimática

Se evaluó la potencia inhibitoria de los análogos obtenidos frente a enzimas pertenecientes a las tres subclases de MβLs. La evaluación se realizó utilizando Imipenem (IMI) como sustrato y se compararon con la actividad presentada por L-24, Tabla 7. Los ensayos de inhibición enzimática estuvieron a cargo del Prof. Alejandro Vila en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario-Argentina (IBR-CONICET).

Tabla 7: IC₅₀ de L-24 y de análogos de 2-MMBT frente a distintas MβLs

Compuesto	Estructura Química	IC ₅₀ (μM)				
		Subclase B1			Subclase B2	Subclase B3
		NDM-1	IMP-1	VIM-2	Sfh-1	L1
L-24		13 ± 1	17.3 ± 0.9	8.5 ± 0.3	0.79 ± 0.05	22 ± 1
± 27		1.2 ± 0.1	1.09 ± 0.07	0.88 ± 0.05	7.5 ± 0.7	4.9 ± 0.4
L-50		3.1 ± 0.2	ND	ND	>1000	12.0 ± 0.6
± 51		8.3 ± 0.4	5.8 ± 0.5	1.2 ± 0.1	55 ± 5	7.8 ± 0.5
± 40		0.3 ± 0.1	0.063 ± 0.002	0.088 ± 0.002	1,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1
± 41		1.92 ± 0.2	1.13 ± 0.07	0.26 ± 0.01	7.4 ± 0.8	0.31 ± 0.03
± 42		0.77 ± 0.04	1.40 ± 0.05	1.01 ± 0.06	3.7 ± 0.3	0.62 ± 0.03

Si comparamos la potencia inhibitoria del derivado \pm **27**, que no contiene el ácido carboxílico con la del compuesto de referencia L-**24**, vemos que presentó una potencia diez veces mayor para las enzimas de la clase subclase B1 y cinco veces más potente para L1 (subclase B3). Sin embargo, en Sfh-1 fue 10 veces menos activa. Por lo tanto, podemos confirmar que la presencia del carboxilato no es fundamental a la hora de inhibir las enzimas de subclase B1 y B3 (L1), pero sí frente a Sfh-1 (B2). Esto confirma que la interacción del carboxilato con el sitio activo varía según la enzima.

Si comparamos el análogo con la cadena mercaptometil homologada L-**50** con la bistiazolidina de referencia L-**24** frente a NDM-1 (IC_{50} de 3.1 y 13 μ M respectivamente) y a L1 (IC_{50} de 12 y 22 μ M respectivamente), este análogo mejoró sólo en cuatro y dos veces la potencia respecto a L-**24**. Sin embargo, frente a Sfh-1(B2) la homologación de la cadena mercaptometilo provoca una pérdida total de actividad. En cuanto a la comparación del homólogo sin carboxilato \pm **51** con su 2-MMBT de referencia \pm **27**, se observa que la homologación en este caso disminuye la potencia para todas las subclases de M β L, pero sobre todo para Sfh-1 que disminuye 400 veces, IC_{50} de 55 y 7.5 μ M respectivamente. Por lo tanto, la homologación de la cadena mercaptometilo en L-**50** mejoró la inhibición para las enzimas de la subclase B1 y B3, en cambio, para \pm **51** no resultó un cambio eficaz para aumentar la potencia inhibitoria de este compuesto.

Las benzobistiazolidinas \pm **40**, \pm **41** y la benzoimidazolidina-tiazolidina \pm **42** mostraron una potencia inhibitoria mayor frente a las enzimas de la subclase B1 y L1 (B3) que la bistiazolidina de referencia L-**24**. Frente a NDM-1 presentaron una potencia entre 7 y 42 veces mayor, siendo el mejor inhibidor el análogo \pm **40** frente a todas las enzimas de subclase B1 con un rango de IC_{50} de 60 a 300 nM. Frente a L1 estos compuestos presentan una potencia entre 27 y 70 veces mayor que L-**24** y en este caso el mejor compuesto es \pm **41**. En la enzima Sfh-1 (B2) los tres triciclos presentaron una potencia entre 2 y 9 veces superior que L-**24**.

Si se compara el análogo \pm **40** con el derivado con un Cl en el anillo aromático \pm **41**, se observa una disminución leve de la inhibición frente a la subclase B1 y Sfh-1(subclase B2) y un aumento de la potencia inhibitoria frente a L1 (IC_{50} 0.8 vs 0.3 μ M). Si se compara la benzotiazolidina \pm **40** con la benzoimidazolidina \pm **42** no se observan cambios

significativos, una leve disminución de la potencia respecto a ± 40 , excepto para L1 que aumenta levemente.

En conclusión, se evaluó la potencia inhibitoria de 6 análogos de 2-MMBT frente a distintas subclases de NDM-1 y se logró obtener 2 nuevos inhibidores ± 27 y ± 40 con una potencia de 10 y 42 veces mayor a la bistiazolidina de referencia L-24. Por lo tanto, la sustitución del carboxilato resultó favorable, especialmente cuando se condensó el biciclo bistiazolidina con un anillo aromático en los C7-C8.

4.3.2B. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se probó determinar si la bistiazolidina L-24 y cuatro de los análogos obtenidos podían restaurar la actividad antibiótica de Imipenem (IMI) frente a la bacteria *E.coli* recombinante DH5a que expresa NDM-1. Para ello, se midió la concentración mínima inhibitoria (CMI) de IMI en ensayos de microdilución a una concentración de 100 μ g/ml de los inhibidores, Tabla 8. Estos ensayos estuvieron a cargo del Prof. Alejandro Vila (IBR-CONICET, Rosario, Argentina).

Tabla 8: CMI de IMI, L-24 y los análogos ± 27 , ± 40 , ± 41 y ± 42 frente a *E.coli* DH5 α que expresa NDM-1

<i>Bacteria</i>	MBL	CMI (mg/L)					
		IMI	IMI + L-24	IMI + ± 27	IMI + ± 40	IMI + ± 41	IMI + ± 42
<i>E.coli DH5a</i>	NDM-1	16	2	16	2	0.5	8

Se observó que todos los compuestos excepto el análogo sin el carboxilato ± 27 restauraron la actividad del IMI en la cepa *E.coli* DH5 α que expresa NDM-1. El mejor inhibidor frente a esta enterobacteria fue el triciclo ± 41 el cual tiene el anillo aromático sustituido por un cloro (Cl), con una reducción de más de 32 veces en la susceptibilidad al imipenem (factor de dilución = 5). El análogo ± 42 fue el que presentó mayor dificultad para solubilizarse en las condiciones del ensayo y esto podría explicar la baja reducción de CMI de IMI. Otro factor que puede explicar este comportamiento es una mala penetración en el periplasma bacteriano.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió determinar la CMI frente a aislados clínicos de bacterias que expresan M β L de subclase B1. En este caso se probaron las bistiazolidinas L-24 y L-25, los análogos \pm 27, \pm 40 y \pm 42 y se midió la CMI del antibiótico meropenem (MEM) a una concentración de 100mg/mL de inhibidor, Tabla 8. La medida del análogo \pm 41 para el cual se obtuvo el mejor resultado en el experimento anterior esta pendiente. Estos ensayos estuvieron a cargo del Dr. Prof. Roberto Bonomo en Research Service, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, OH, USA.

Tabla 8: CMI de MEM, L-24, L-25 y los análogos \pm 27, \pm 40 y \pm 42 en aislados clínicos que expresan M β L B1

Aislado clínico	M β L	MEM	CMI (mg/L)				
			MEM + L-24	MEM + L-25	MEM + \pm 27	MEM + \pm 40	MEM + \pm 42
<i>A. baumannii</i> 1.58	NDM-1	64	16	16	32	32	16
<i>K. pneumoniae</i> 1.37	NDM-1	4	0.5	1	2	2	2
<i>P. aeruginosa</i> 0701128	VIM-2	4	2	2	1	2	2
<i>K. aerogenes</i> 619	VIM-2	0.5	0.0625	0.0625	0.125	0.125	0.125

Se observó que todos los compuestos evaluados lograron inhibir las M β L de subclase B1 expresadas por las bacterias en los distintos aislados clínicos. Las 2-MMBT de referencia L-24 y L-25 fueron las que mostraron mejor inhibición frente a la bacterias *K.aerogenes* 619 con una reducción de 8 veces (factor de dilución = 3) la CMI de MEM. Los análogos evaluados mostraron un perfil muy similar en todos los aislados clínicos con una reducción de 2 a 4 veces la CMI de MEM (factor de dilución entre 1 y 2).

En resumen todos los compuestos evaluados mostraron ser inhibidores de las distintas subclases de M β Ls. En general, tanto las 2-MMBT de referencia como los cuatro análogos evaluados en distintas cepas bacterianas restauraron la actividad antibiótica de los antibióticos carbapenémicos (MEM o IMI).

4.3.3. Resolución y separación enantiomérica de los análogos racémicos

Los análogos que presentaron mejor actividad inhibitoria respecto a las bistiazolidinas de referencia L-**24** y L-**25** fueron los análogos \pm **27**, \pm **40**, \pm **41** y \pm **42** que se obtuvieron como mezclas racémicas debido a que se prepararon de materiales de partida no quirales, Figura 7. Dado que esas actividades se midieron usando las mezclas racémicas, decidimos enfocarnos en una posible resolución y separación enantiomérica para evaluar cada enantiómero por separado.

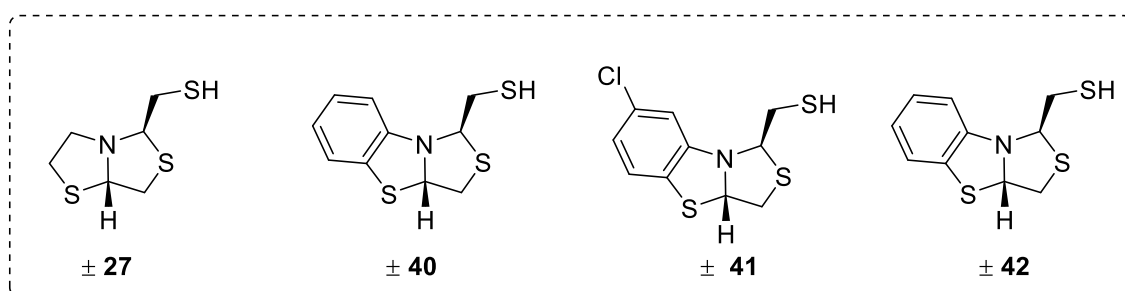


Figura 7. Estructura química de los análogos obtenidos como racematos.

4.3.3.A. Antecedentes:

4.3.3.A1. Estrategias para la resolución y separación enantiomérica de fármacos racémicos:

Más del 50% de los fármacos que están actualmente en uso clínico son quirales y a pesar de que el 88% se administra en forma de racemato, la necesidad de obtener fármacos puros ópticamente activos ha aumentado en las industrias farmacéutica²⁴. Esto se debe a que las enzimas son homoquirales y presentan interacciones estereoespecíficas con los sustratos. Por lo tanto, los enantiómeros de un compuesto pueden presentar una reactividad distinta en un sistema biológico a nivel farmacológico, toxicológico, metabólico, etc^{25,26}.

Las principales estrategias utilizadas para la resolución y separación de los enantiómeros de una mezcla racémica son: A) Resolución química, que consiste en la reacción de una mezcla racémica con un agente de resolución homoquiral para dar dos diastereoisómeros separables, que se tratan después de forma independiente liberando los dos enantiómeros iniciales. B) Resolución por cromatografía líquida de alta resolución, que puede ser una resolución directa usando una fase estacionaria quiral o bien por

formación de diasterómeros con un reactivo de derivatización quiral adecuado. C) Resolución enzimática, se basa en la diferente velocidad de reacción de un enantiómero con una enzima, mientras que el enantiómero que posee menor afinidad permanece inalterado.

4.3.3.A2. Antecedente de resolución de tioles primarios racémicos:

En bibliografía no existe disponible mucha información sobre resolución de compuestos quirales que contengan tioles primarios como el que presentan los análogos de 2-MMBT. Hay reportado el uso del isotiocianato quiral *R*-(2)-DBD-PyNC, que es un agente quiral fluorescente para derivatizar tioles primarios y que forma derivados ditiocarbamatos con buena estabilidad y sensibilidad, que pueden ser detectados y resueltos por fluorescencia y HPLC respectivamente, Figura 8²⁷.

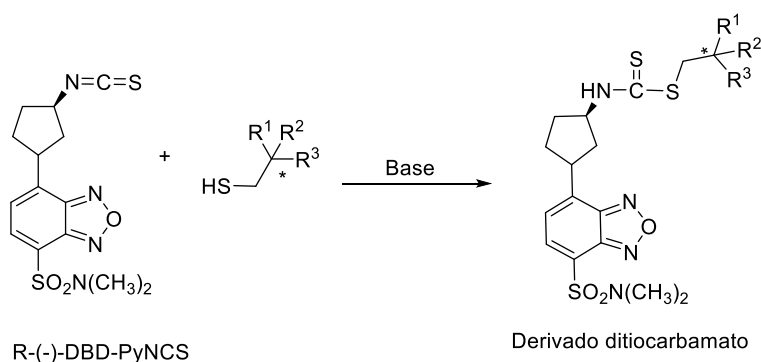


Figura 8: Agente fluorescente descrito para derivatizar tioles primarios racémicos

También se encuentra descrito el uso de lipasas para la resolución enzimática de compuestos racémicos que contienen tioésteres de tioles primarios, que se usan como bloques de construcción para la síntesis de fármacos como el captopril y otros inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)^{28,29,30}. Los tioésteres A, B, C, útiles para la síntesis de captopril han sido resueltos utilizando lipasas, Figura 9.

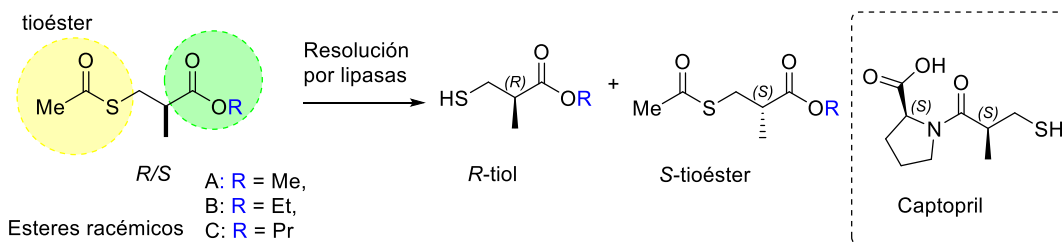


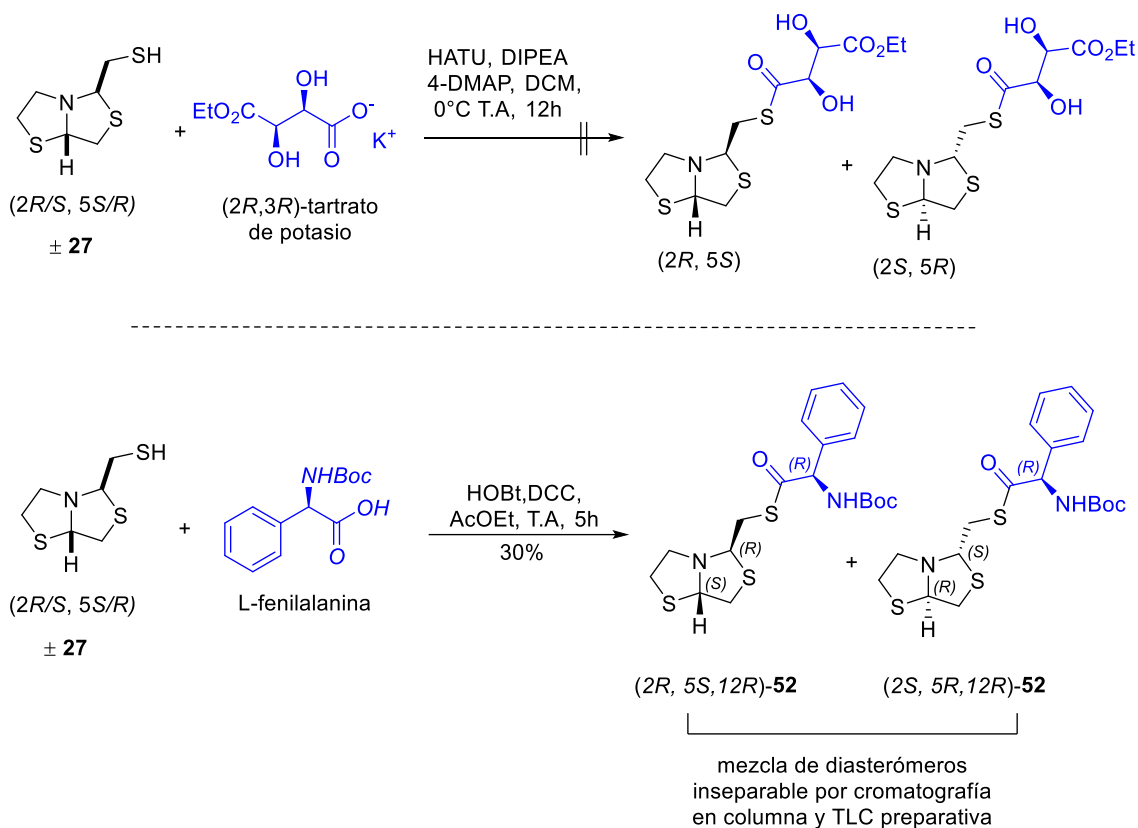
Figura 9. Resolución por lipasas de los esteres racémicos A, B y C; Estructura química del captopril

En estos casos se vio que las lipasas presentan mejor quimio selectividad cuando en el medio de reacción hay solventes orgánicos como propanol, metanol, butanol siendo más reactivos los tioésteres que los esteres carboxílicos (oxoéster). También en presencia de solventes orgánicos estas enzimas resultaron ser enantioselectivas, reaccionando preferentemente con el enantiómero *R*, por lo que al final de la reacción el tioéster restante se encuentra enriquecido en la forma *S*.

4.3.3.B. Resultados en la resolución y separación enantiomérica del compuesto \pm 27

4.3.3.B1. Formación de diasterómeros:

Para la resolución de \pm 27 se planteó derivatizar el grupo tiol mediante la formación de tioésteres con agentes quirales como (2*R*, 3*R*)-tartrato de potasio o L-fenilalanina y así formar diasterómeros los cuales podrían ser separarlos mediante purificación por cromatografía en columna o TLC preparativa, Esquema 21.

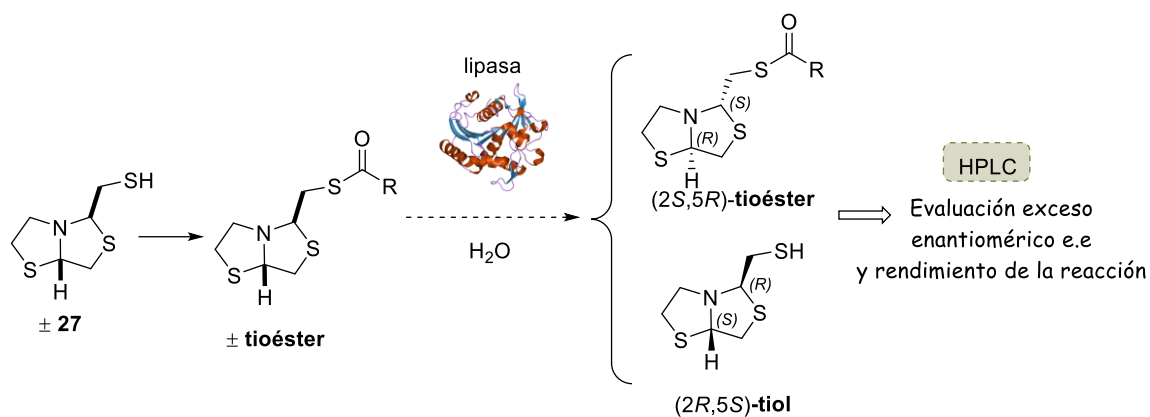


Esquema 21. Reacciones de derivatización de la bistiazolidina ± **27** con (2*R*,3*R*)-tartrato de potasio y L-fenilalanina

Cuando se usó (2*R*,3*R*)-tartrato de potasio como agente quiral en presencia de HATU no se logró obtener los tioésteres derivados. Al cambiar el agente quiral por L-fenilalanina N-Boc y usar HOBt/DCC como acoplante, se logró obtener los productos de derivatización (2*R*, 5*S*, 12*R*)-**52** y (2*S*, 5*R*, 12*R*)-**52** con un 30% de rendimiento. Intentos por separar la mezcla de diasterómeros por cromatografía en columna o TLC preparativa no dieron buenos resultados. Por lo tanto, no se pudo resolver la mezcla racémica del compuesto ± **27** por formación de diasterómeros.

4.3.3.B2. Resolución y separación utilizando lipasas:

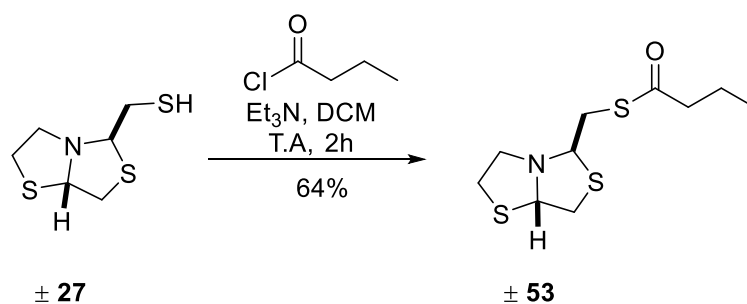
Para este objetivo, se planteó en primer lugar derivatizar el grupo tiol de ± **27** para formar un tioéster y luego hidrolizarlo con distintas lipasas en un medio acuoso y medir la enantioselectividad del proceso y el rendimiento de la reacción mediante HPLC, Esquema 22.



Esquema 22. Metodología planteada para la resolución enzimática de ± 27

Derivatización:

La derivatización del grupo tiorol de ± 27 se realizó con cloruro de butirilo obteniéndose el tioéster butírico ± 53 con un rendimiento moderado de 64%, Esquema 23.

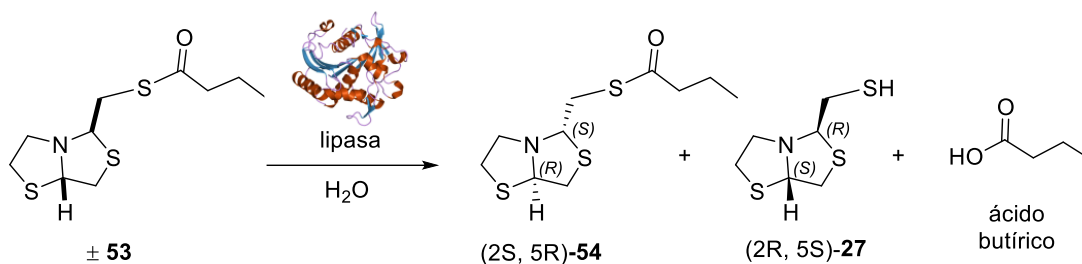


Esquema 23: Reacción de derivatización de ± 27

Resolución por lipasas:

Para el estudio se utilizaron cinco lipasas: lipasa A de *Cándida Antártica* (cal A), lipasa B de *Cándida Antártica* inmovilizada en resina acrílica (cal B), lipasa de *Geobacillus thermocatenolatus* BTL2 wt (LG), lipasa PS Amano de *Pseudomona cepasia* (LPS) y lipasa pancreática porcina tipo II Sigma (LPP). Este trabajo se realizó en colaboración con el BC. Agustín Castilla, Asistente área Bioquímica, Depto. de Biociencias, Facultad de Química, UdelaR

Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo en una concentración de $[\pm 53] = 0,018M$, a $37^\circ C$ en buffer fosfato 25mM, pH 7.0. Se realizaron muestreos a diferentes tiempos y se analizaron por TLC y HPLC para determinar el exceso enantiomérico y el rendimiento de la reacción, Esquema 24.



Esquema 24. Reacción de hidrólisis. Las reacciones fueron realizadas en buffer fosfato de Na 25 mM, pH 7,0, y el tioéster **± 53** se disolvió en hexano (5mg/mL), a 37°C en shaker a 180 rpm.

Análisis por TLC:

En el análisis por TLC se pudo observar que la lipasa cal A presenta hidrólisis de **± 53** a partir de los 30 minutos y a las 24 horas la hidrólisis parece ser total. Las lipasas cal B y LG no mostraron hidrólisis. Las lipasas LPS y LPP tampoco mostraron la presencia del tiol libre, pero se puede ver una mancha a un R_f menor al tiol que también se observa en el patrón del tiol libre, que correspondería al tiol oxidado (dímero) por lo que la hidrólisis se estaría dando.

Análisis por HPLC:

Las reacciones de hidrólisis a los diferentes tiempos se analizaron por HPLC y se determinó el exceso enantiomérico del producto de hidrólisis y el rendimiento de la reacción, Tabla 10.

Tabla 10: Análisis por HPLC de la resolución enzimática de \pm **53** con diferentes lipasas

Enzima	Nucléofilo	tiempo de reacción (min)	conversión (%)	tioéster \pm 53 %	\pm 27 (relación de enantiómeros) %
CAL A	H ₂ O	10	20	80	65/35
		15	20	80	63/37
		20	20	80	70/30
		25	32	68	65/35
		30	38	62	60/40
		60	39	61	64/36
		110	51	49	57/43
		180	63	37	56/44
		24h	71	29	56/44
CAL B	H ₂ O	180	0	100	-
LPP	H ₂ O	150	0	100	-
LG	H ₂ O	150	0	100	-
LP	H ₂ O	90	0	100	-
		150	0	100	-
		19h	15	85	53/47

Para el análisis por HPLC se utilizó una columna quiral Phenomenex lux cellulose 5 μ M, Fase móvil: Hexano/isopropanol 90/10

Por HPLC se pudo observar que Cal A a los 10 minutos hidrolizó un 20% de \pm **53** con una relación de enantiómeros 65/35. Esta relación se mantiene hasta los 60 minutos y luego comienza a disminuir hasta que a las 24 horas la relación es casi de una mezcla racémica 56/44. Para cal B y LG se analizó la toma a los 180 y 150 minutos respectivamente y se comprobó que no había hidrólisis. Para la lipasa LPS a las 19 horas si se observó un 15% de hidrólisis, pero la relación enantiomérica del tiol es 53/47.

Por lo tanto, las únicas lipasas que hidrolizaron el éster fueron Cal A y LPS. Aunque ninguna de las dos resultó eficientes a la hora de separar los enantiómeros, la lipasa Cal A fue la que mejor resolvió la mezcla de enantiómeros 65/35 con un 20 % de hidrólisis entre los 10 y 60 minutos de reacción. Se planea en un futuro estudiar la reacción con estas enzimas en solventes orgánicos como 1-propanol.

4.4. Conclusiones

- En este capítulo se desarrolló una nueva metodología sintética para la preparación de bistiazolidinas 2-sustituídas (2-BT) mediante una reacción de intercambio entre 2-MMBT y distintos aldehídos catalizada por NH_4OAc . Mediante RMN se pudo identificar un intermedio imina clave en el mecanismo de intercambio y se pudo establecer que el NH_4OAc como catalizador juega un rol importante. Luego por cálculos teóricos DFT se pudo determinar dos posibles rutas favorables para obtener el producto final de intercambio a partir del intermedio imina que implican la formación de un intermedio tiazolidina que reacciona finalmente con una nueva molécula de aldehído.
- Por otra parte, se estudio la reacción de intercambio catalizada por distintos ácidos de Lewis en presencia y ausencia de NH_4OAc . En todos los casos se logró obtener el producto de intercambio con rendimientos de 17-53%. Dado que la reacción también transcurrió en ausencia de NH_4OAc , en ese caso la reacción de intercambio se estaría dando mediante un mecanismo diferente al propuesto con NH_4OAc que involucra un intermedio imina.
- Utilizando la metodología desarrollada se logró preparar dos nuevos análogos de 2-MMBT con la cadena mercaptometilo homologada en un carbono (L-50 y \pm 51). La evaluación biológica de estos análogos frente a las distintas subclases de M β L reveló que en el caso de L-50 se mejoró la inhibición frente a las subclases B1 y B3 respecto a su 2-MMBT de referencia (L-24). En cambio, para el análogo \pm 51 se vio disminuida la eficacia en las tres subclases de M β L comparado a su 2-MMBT de referencia (\pm 27).
- Cuando se intentó preparar análogos con modificaciones a nivel del carboxilato en C8, se obtuvo el análogo sin el carboxilato \pm 27 y no se logró preparar los análogos con la cadena carboxilato homologada derivados de β^3 -Cys o β^3 -aminoalcoholes. El compuesto sin el carboxilato \pm 27 fue evaluado frente a las tres subclases de M β L y se pudo observar nuevamente que la interacción de este grupo funcional con el sitio activo de las enzimas es variable según la subclase.

En las subclases B1 y B3 la ausencia del carboxilato en el inhibidor aumentó entre 5 y 10 veces la potencia respecto a la 2-MMBT de referencia (L-24). Sin embargo, como se esperaba frente a la subclase B2 dónde el carboxilato cumple un rol importante en la interacción enzima-inhibidor, la ausencia del carboxilato hizo que este análogo fuera 10 veces menos activo respecto a L-24.

- Se logró preparar dos análogos benzobistiazolidinas \pm **40**, \pm **41** y un análogo benzoimidazolidina tiazolidina \pm **42** como análogos con un anillo aromático fusionado al anillo bistiazolidina. Los tres análogos comparados con L-24 presentaron una potencia inhibitoria de 2 a 70 veces mayor en todas las subclases de MBL. Frente a las B1 el mejor inhibidor fue la benzobistiazolidina \pm **40** que no contiene sustituyentes en el anillo aromático en cambio en B3 (L1) el mejor inhibidor fue el análogo \pm **41** el cual tiene el anillo aromático sustituido por un cloro. El anillo imidazolina en \pm **42** no implica diferencias significativas en la potencia de inhibición respecto a los otros dos análogos.
- También se evaluó la CMI de las 2-MMBT de referencia L-24, L-25 y de los análogos \pm **27**, \pm **40** y \pm **42** en aislados clínicos que expresan M β L de la subclase B1. Los resultados indicaron que todos los compuestos lograron inhibir las M β L expresadas por bacterias en los distintos aislados clínicos. Sin embargo las 2-MMBT de referencia L-24 y L-25 fueron las que mostraron mejor inhibición frente a la bacterias *K.aerogenes 619* y *K. pneumoniae*. La diferencia en los resultados de IC₅₀ y CMI obtenidos para los análogos tricíclicos que presentaron mejor potencia inhibitoria que las bistiazolidinas de referencia, puede deberse a varios factores, como los problemas de solubilidad que presentaron estos compuestos y una baja penetración al periplasma bacteriano. Por lo que sería necesario trabajar sobre estos triciclos para mejorar estas propiedades y obtener mejores inhibidores.
- La resolución y separación enantiomérica del compuesto \pm **27** se probó usando dos metodologías, la derivatización con agentes quirales y la resolución

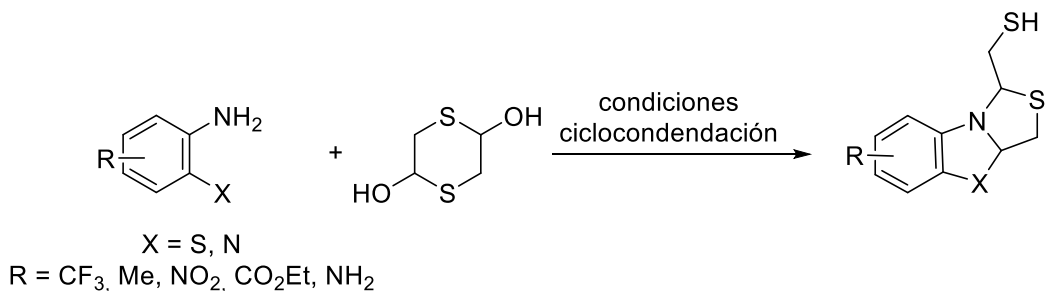
enzimática por lipasas. La lipasa cal A fue la que hidrolizó y resolvió mejor la mezcla racémica, pero es necesario optimizar las condiciones de reacción.

- Parte de este trabajo fue publicado en una revista científica arbitrada: V. Martínez, V. Villamil, D. Duarte, C. Saiz, D. Davyt, C. Fontana, N. Veiga, Graciela Mahler. Preparation and Mechanistic Studies of 2-Substituted Bisthiazolidines by Imine Exchange, *Eur. J. Org. Chem.*, **2020**, 9, 1084–1092, doi.org/10.1002/ejoc.201901677

4.5. Perspectivas

• Síntesis de nuevos análogos con un anillo aromático fusionado en C7-C8

Dado que los análogos con un anillo aromático fusionado en C7-C8 presentaron muy buena inhibición frente a las MβLs, se plantea la síntesis de nuevos análogos con nuevos sustituyentes en el anillo aromático, Esquema 25. Además, el objetivo es lograr análogos que presenten una mejor solubilidad, por esa razón se plantea como sustituyentes en el anillo grupos amino, nitro y carboxilato.



Esquema 25. Estructura Química y síntesis de nuevos análogos planteados con un anillo aromático fusionado en C7-C8

Bibliografía

- ¹ P. Hinchliffe, M. M. González, M. F. Mojica, J. M. González, V. Castillo, C. Saiz, M. Kosmopoulou, C. L. Tooke, L. I. Llarrull, G. Mahler, R. A. Bonomo, A. J. Vila, J. Spencer. Cross-Class Metallo- β -Lactamase Inhibition by Bisthiazolidines Reveals Multiple Binding Modes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2016**, 113(26), E3745–54, doi.org/10.1073/pnas.1601368113
- ² M. M. González, M. Kosmopoulou, M. F. Mojica, Valerie. Castillo, P. Hinchliffe, I. Pettinati, J. Brem, C. J. Schofield, G. Mahler, R. A. Bonomo, L. I. Llarrull, J. Spencer, A. J. Vila. Bisthiazolidines: A Substrate-Mimicking Scaffold as an Inhibitor of the NDM-1 Carbapenemase, *ACS Infect. Dis*, **2016**, 1(11), 544–554, doi.org/10.1021/acsinfectdis.5b00046
- ³ C. Saiz, V. Castillo, S. G. Mahler. Imine Domino Reactions Generate Novel Scaffolds: Fused Bisthiazolidines or Bisthiiranes, *Synlett*, **2012**, 23, 1090–94. doi.org/10.1055/s-0031-1290621
- ⁴ S. Sagan, T. Milcent, R. Ponsinet, O. Convert, O. Tasseau, G. Chassaing, S. Lavielle, O. Lequin. Structural and Biological Effects of a B2- or B3-Amino Acid Insertion in a Peptide: Application to Molecular Recognition of Substance P by the Neurokinin-1 Receptor, *Eur. J. Biochem.*, **2003**, 270(5), 939–949, doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03456.x
- ⁵ J. Frackenpohl, P. I. Arvidsson, J. V. Schreiber, D. Seebach. The Outstanding Biological Stability of β - and γ -Peptides toward Proteolytic Enzymes: An in Vitro Investigation with Fifteen Peptidases, *ChemBioChem*, **2001**, 2(6), 445–455, doi.org/10.1002/1439-7633(20010601)2:6<445::aid-cbic445>3.3.co;2-i
- ⁶ J. V. Schreiber, J. Frackenpohl, F. Moser, T. Fleischmann, H-P. E. Kohler, D. Seebach. On the Biodegradation of β -Peptides, *ChemBioChem*, **2002**, 3(5), 424–432, doi.org/10.1002/1439-7633(20020503)3:5<424::AID-CBIC424>3.0.CO;2-0
- ⁷ R. J. Bergeron, J. Wiegand, W. R. Weimar, J. R. T. Vinson, J. Bussenius, G. W. Yao, J. S. McManis. Desazadesmethyldesferrithiocin Analogues as Orally Effective Iron Chelators, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42(1), 95–108, doi.org/10.1021/jm980340j
- ⁸ S. Wilk, L. S. Thllrston, Inhibition of Angiotensin III Formation by Thiol Derivatives of Acidic Amino Acids, *Neuropeptides*, **1990**, 16(3), 163–168, doi.org/10.1016/0143-4179(90)90129-M
- ⁹ K. Balenovic, D. Fles. Synthesis of L- β -amino- γ -benzylthiobutyric acid. [L- β -amino-S-(benzyl)homocysteine], *J. Org. Chem.*, **1952**, 17(3), 347–49, doi.org/10.1021/jo01137a004
- ¹⁰ P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J-L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto. Dynamic Combinatorial Chemistry, *Chem. Rev.*, **2006**, 106(9), 3652–3711, doi.org/10.1021/cr020452p
- ¹¹ N. Wilhelms, S. Kulchat, J. M. Lehn, Organocatalysis of C=N/C=N and C=C/C=N Exchange in Dynamic Covalent Chemistry, *Helv. Chim. Acta*, **2012**, 95(12), 2635–2651, doi.org/10.1002/hlca.201200515
- ¹² Y. Jin, C. Yu, R. J. Denman, W. Zhang. Recent Advances in Dynamic Covalent Chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(16), 6634–6654, doi.org/10.1039/c3cs60044k

-
- ¹³ C. Saiz, P. Wipf, E. Manta, G. Mahler. Reversible Thiazolidine Exchange: A New Reaction Suitable for Dynamic Combinatorial Chemistry, *Org. Lett.*, **2009**, 11(15), 3170–3173, doi.org/10.1021/ol901104a
- ¹⁴ K. Tanemura, T. Suzuki, Y. Nishida, K. Satsumabayashi, T. Horaguchi. A mild and efficient procedure for α -bromination of ketones using N-bromosuccinimide catalysed by ammonium acetate, *Chem. Commun.*, **2004**, 470–471, doi.org/10.1039/B315340A
- ¹⁵ Michael Shevlin, Practical High-Throughput Experimentation for Chemists, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2017**, 8(6), 601–607, doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00165
- ¹⁶ M. Ciaccia, S. Di Stefano, Mechanisms of Imine Exchange Reactions in Organic Solvents, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 646–654, doi.org/10.1039/C4OB02110J
- ¹⁷ F. Schaufelberger, L. Hu, O. Ramström, Trans-Symmetric Dynamic Covalent Systems: Connected Transamination and Transimination Reactions, *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21(27), 9776–9783, doi.org/10.1002/chem.201500520
- ¹⁸ G. Tóth, I. Pintér, A. Messmer. Mechanism of the Exchange Reaction of Aromatic Schiff Bases, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, 15 (9), 735–738, doi.org/10.1016/S0040-4039(01)82318-2
- ¹⁹ V. Martínez, V. Villamil, D. Duarte, C. Saiz, D. Davyt, C. Fontana, N. Veiga, Graciela Mahler. Preparation and Mechanistic Studies of 2-Substituted Bisthiazolidines by Imine Exchange, *Eur. J. Org. Chem.*, **2020**, 9, 1084–1092, doi.org/10.1002/ejoc.201901677
- ²⁰ N. Giuseppone, J. L. Schmitt, J. M. Lehn. Generation of Dynamic Constitutional Diversity and Driven Evolution in Helical Molecular Strands under Lewis Acid Catalyzed Component Exchange, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43 (37), 4902–4906, doi.org/10.1002/anie.200460343
- ²¹ N. Giuseppone, J. L. Schmitt, E. Schwartz, J. M. Lehn. Scandium(III) Catalysis of Transimination Reactions. Independent and Constitutionally Coupled Reversible Processes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127(15), 5528–5539, doi.org/10.1021/ja042469q
- ²² D. L. Leussing, B. E. Leach. Stabilities, Rates of Formation, and Rates of Transimination in Aqueous Solutions of Some Zinc, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93(14), 3377–3384, doi.org/10.1021/ja00743a013
- ²³ P. Palladino, D. A. Stetsenko. New TFA-Free Cleavage and Final Deprotection in Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: Dilute HCl in Fluoro Alcohol, *Org. Lett.*, **2012**, 14, 24, 6346–6349, doi.org/10.1021/ol303124r
- ²⁴ K. M. Rentsch. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. *J. Biochem Biophys Methods.*, **2002**, 54(1-3), 1-9, doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00124-0
- ²⁵ H. U. Blaser. Chirality and its implications for the pharmaceutical industry. *Rend. Fis. Acc. Lincei.*, **2013**, 24, 213–216, doi.org/10.1007/s12210-012-0220-2
- ²⁶ L.A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy. Chiral drugs: an overview. *Int J Biomed Sci.*, **2006**, 2(2), 85-100, PMID: 2367497

²⁷ D. Jin, T. Toyooka. Indirect resolution of thiol enantiomers by high performance liquid chromatography with a fluorescent chiral tagging reagent, *Analyst*, **1998**, 123, 1271-1277, doi.org/10.1039/A800712H

²⁸ D. Bianchi, P. Cesti. Lipase-Catalysed Stereoselective Thiotransesterification of Mercapto Esters, *J.Org.Chem.*, **1990**, 55, 5657-5659, doi.org/10.1021/jo00308a028

²⁹ Bianchi D. (1991) Process for the enzymatic resolution of the optical isomers of racemic ester derivatives of 3-mercapto-2-alkyl-propionic acid (US 4985366).
patents.google.com/patent/EP0344791A2/en

³⁰ Hawell J. (1995) Process for separation of enantiomeric 3-mercapto-2-substituted alkanic acid using lipase P30 and synthesis of captopril type compounds (US 5,420,037).
patents.google.com/patent/US5420037A/en

Capítulo 5

Síntesis y evaluación de prodrogas derivadas de 2-mercaptometil bistiazolidinas

5.1. Introducción

5.1.1. Aspectos generales de prodrogas

Las prodrogas son derivados biológicamente inactivos, que luego de su administración *in vivo* se convierten mediante reacciones químicas o enzimáticas en compuestos farmacológicamente activos. En la mayoría de los casos, las prodrogas son derivados químicos simples que requieren sólo uno o dos pasos de transformación química o enzimática para producir el fármaco original activo¹.

El uso de prodrogas se ha convertido en una de las estrategias más utilizadas y exitosa para resolver diversos problemas asociados a los fármacos. El enfoque tradicional de prodrogas tiene como objetivo mejorar las propiedades fisicoquímicas/biofarmacéuticas de los fármacos (absorción, permeabilidad, inestabilidad química, solubilidad, etc.). Por otro lado, la revolución molecular actual en la biología y la medicina ha permitido usar estrategias más sofisticadas para el diseño de prodrogas que incluye parámetros moleculares /celulares (transportadores de entrada/salida de membrana y expresión/distribución). Para ello se une covalentemente el fármaco a un promotor que apunta selectivamente a ciertos transportadores de membranas y enzimas. Esto presenta una gran ventaja para el enfoque moderno de prodrogas ya que puede permitir dirigir el fármaco activo al sitio que realmente se necesita.^{2,3} La evaluación de las nuevas drogas aprobadas por la Administración de drogas y alimentos de Estados Unidos en el período 2008-2017 informa que un 12.4% del total de fármacos de pesos moleculares pequeños aprobados son prodrogas^{4,1}.

La mayoría de las estrategias para obtener una prodroga involucra la modificación de algún grupo funcional presente en el fármaco activo. Los grupos funcionales susceptibles de diseño de prodrogas más comunes incluyen grupo polares y/o ionizables como hidroxilos, carboxilos, aminas y tioles^{5,6}. Las prodrogas producidas mediante modificación de estos grupos incluyen ésteres, carbonatos, carbamatos, amidas, oximas; y en el caso de los tioles, tioésteres y tioéteres.

Se las pueden clasificar en tres tipos^{5,7}: (1) el fármaco activo está unido a un transportador o promotor, que mediante una reacción enzimática o química se escinde para liberar el fármaco activo (Figura 1-A); (2) bioprecursores, que genera el fármaco

activo por transformaciones metabólicas (Figura 1-B); y (3) prodrogas dobles (co-fármacos) en el que dos fármacos biológicamente activos están unidos en una sola molécula y que pueden escindirse por diferentes mecanismos⁸ (Figura 1-C)

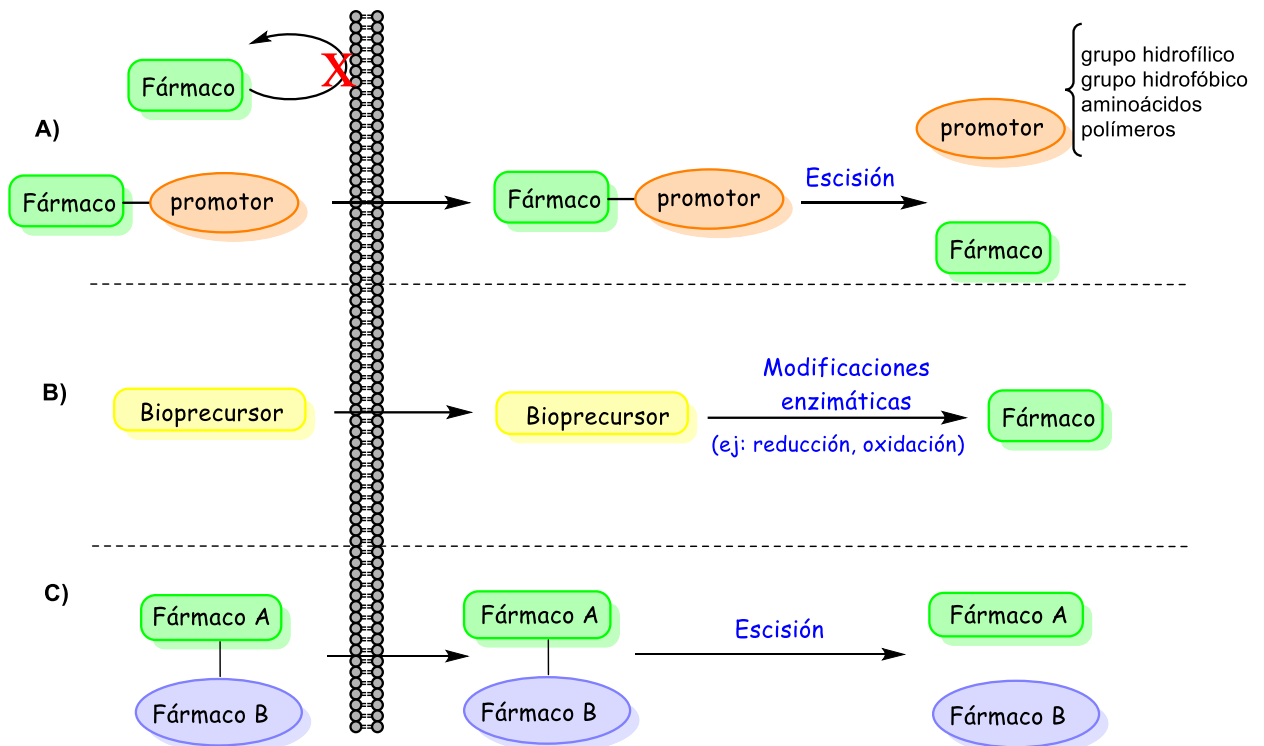


Figura 1. Diagrama ilustrativo de los tres tipos de Prodrogas y su metabolización para liberar el fármaco activo

5.1.2. Prodrogas de fármacos que contienen grupo tiol en su estructura

La inestabilidad química y metabólica de los compuestos que contienen un grupo tiol resulta un desafío a la hora de desarrollar un fármaco que contenga dicho grupo funcional, ya que es muy reactivo y fácilmente oxidable. Por lo que generalmente es necesario lograr una formulación estable con una vida útil y una vida media aceptable.

En bibliografía se encuentran descriptos varios ejemplos en donde se utiliza la estrategia de prodrogas a través de restos tioésteres o tioéteres enfocados en eludir algunos de los problemas asociados con los fármacos que contienen un grupo tiol en su estructura, Figura 2.

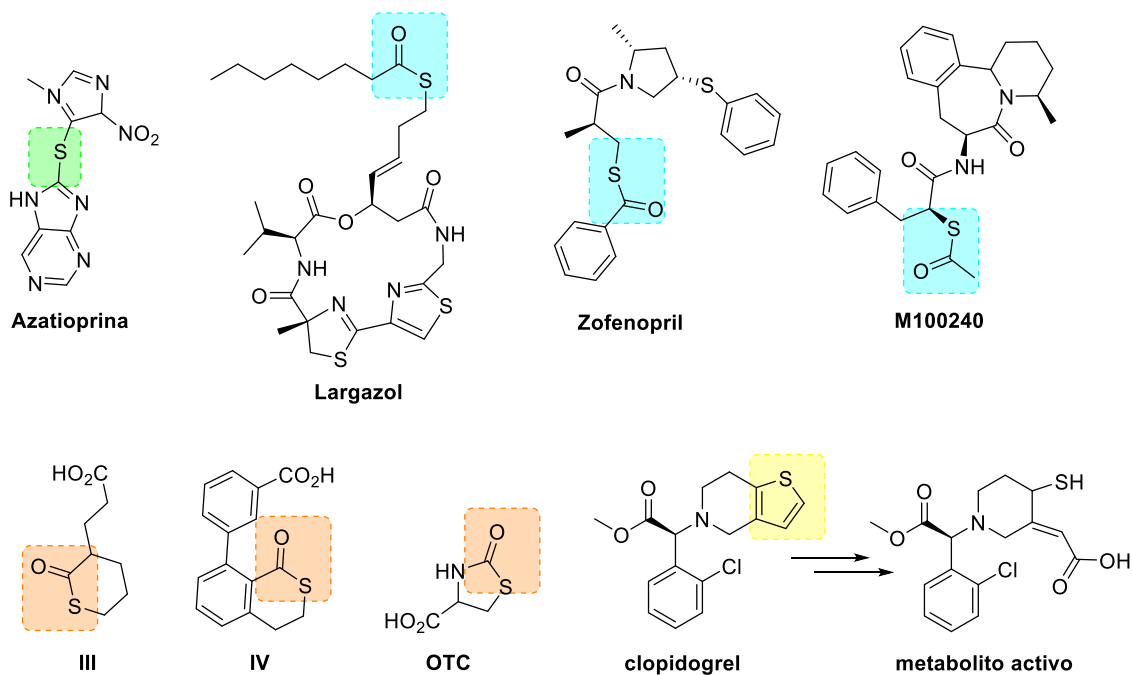


Figura 2. Estructura de prodrogas descritas para fármacos que contienen grupo tiol; el resto tioéter se resalta en verde; el resto tioéster se resalta en celeste; el resto de tiolactona se resalta en rosado; el heterociclo del tipo tiofeno se resalta en amarillo.

Entre los ejemplos que presentamos, se encuentra la prodroga azatioprina con un resto tioéter que libera el inmunosupresor 6-mercaptopurina⁹, Figura 2. Un ejemplo de prodroga con un resto tioéster es el Largazol, que es un producto natural extraído de la cianobacteria marina *Symploca sp*¹⁰, el cual se hidroliza y libera el compuesto activo largazol-tiol con importante actividad antitumoral, Figura 2. Otros tioésteres son el zofenopril prodroga del zofinoprilato, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y el compuesto M100240 una prodroga de un inhibidor dual de las enzimas ECA y endopeptidasa neutral¹¹. También hay descritos tioésteres cíclicos o tiolactonas como el compuesto III y IV que son prodrogas de compuestos capaces de inhibir la enzima glutamato carboxipeptidasa II¹², y la oxotiazolidina (OTC) que es una prodroga de cisteína propuesta para el tratamiento de HIV¹³. Otro ejemplo que se puede citar como prodroga del grupo tiol es el clopidogrel que es un compuesto que contiene un anillo tiofeno, el cual al metabolizarse a través de la CYP450 libera el metabolito activo con el grupo tiol libre y actúa inhibiendo la agregación plaquetaria.

5.1.3. Importancia del grupo tiol y estabilidad de 2-MMBT

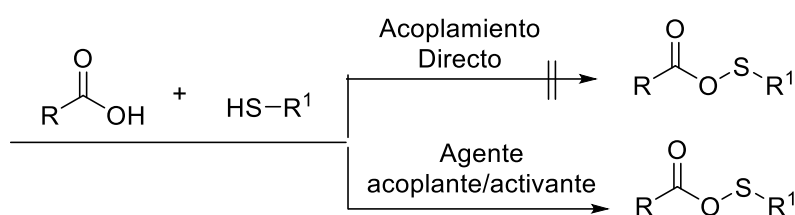
La estructura cristalina de las tres subclases de M β L:2-MMBT, reveló que estos inhibidores se unen de manera dominante a través del tiol libre de la cadena mercaptometilo a los centros di-zinc de las subclases B1 (IMP-1, BcII) y B3 (L1). Sin embargo, el tiol no participa en las interacciones de los inhibidores con la subclase mono-zinc B2 (Sfh-I) y la interacción dominante en el centro activo en este caso es con el carboxilato¹⁴. Por lo tanto, la presencia del grupo tiol en las 2-MMBT es fundamental en la interacción inhibidor-enzima de las subclases B1 y B3. A su vez, el grupo tiol libre SH presenta el inconveniente de ser muy reactivo y fácilmente oxidable a su disulfuro S-S lo cual representa un problema en cuanto a la estabilidad química y metabólica de estos inhibidores. La evaluación por ¹H-RMN de la estabilidad de la bistiazolidina L-24 en un estudio preliminar a pH 7.5 y 27°C, reveló la oxidación del grupo tiol a su correspondiente disulfuro era de 33% y 71% luego de 6 y 24 h de incubación respectivamente¹⁵.

Dado estos resultados y los antecedentes de prodrogas en fármacos que contienen el grupo tiol, en este capítulo vamos a abordar el diseño y preparación de prodrogas de 2-MMBT. Se plantea usar como estrategia la derivatización del grupo tiol a derivados tioésteres como δ -tiolactonas y tioacetilos. La elección de preparar derivados tioésteres se basa en que son muy buenos agentes acilantes y alquilantes, por lo cual ocupan un lugar importante en el metabolismo. Estas propiedades se deben a que el S en el enlace tioéster no participa eficientemente en la deslocalización electrónica del grupo carbonilo. Esto sucede por la escasa superposición entre el orbital 2p del C y el orbital 3p del S, lo que hace que el enlace tioéster sea menos estable y además el SH es un buen grupo saliente. Otra propiedad de los tioésteres es que son buenos sustratos de las enzimas carboxilesterasas presentes en hígado, sangre y otros órganos¹⁶.

5.2. Antecedentes

5.2.1 Antecedentes sintéticos de tioésteres a partir de ácidos carboxílicos y tioles

La formación intermolecular de un enlace tioéster entre un ácido carboxílico y un tiol libre al igual que en la formación del enlace amida no se logra de forma directa y por esa razón la metodología más común es el uso de activantes o un agente acoplante, el cual activa el ácido carboxílico y lo hace más susceptible al ataque nucleofílico por parte del tiol, Esquema 1.

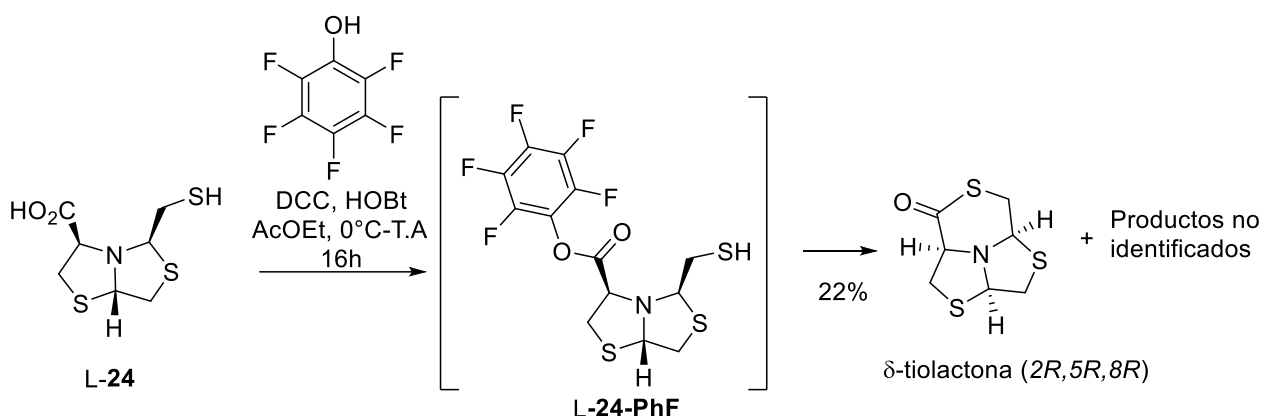


Esquema 1. Reacción de tioesterificación intermolecular

Entre los agentes acoplantes descritos en bibliografía para preparar tioésteres se encuentran 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC)^{17,18}, N-hidroxibenzotriazol (HOBT) y 6-Cl-N-hidroxibenzotriazol (6-Cl-HOBT)¹⁹, también está descrito el uso de HATU y anhídrido tripropilfosfónico (T3P) que es un agente acoplante de elección a la hora de usar condiciones amigables con el ambiente²⁰. Otros agentes activantes del ácido carboxílico utilizados para la preparación de tioésteres son el 1,1'-Oxalildiimidazol²¹ y TsCl y N-metilimidazol²². Sin embargo, Kobayashi *et al.* reportaron la síntesis directa de tioésteres a partir de ácidos carboxílicos y tioles sin necesidad de usar agentes acoplantes, usando como catalizadores ácidos de Bronsted, en tolueno y en condiciones de reflujo azeotrópico²³.

En el caso de la tioesterificación intramolecular, Tsukamoto *et al.* describen la preparación de δ -tiolactonas como derivados prodrogas de inhibidores de glutamato carboxipeptidasa II (GCPII) en condiciones de catálisis con ácido *p*-TsOH en tolueno y reflujo con Dean-Stark. También describe una metodología en la cual primero se bencila el tiol libre y luego se procede a su ciclación con anhídrido trifluoroacético (TFAA) y reflujo¹¹.

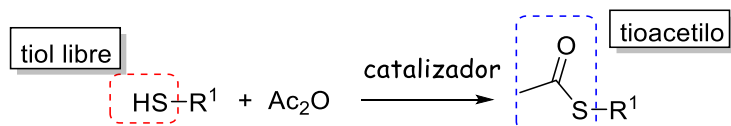
En nuestro grupo existe el antecedente de la formación de una δ -tiolactona a partir de L-24 en un trabajo anterior, cuando se exploraba derivatizar el ácido carboxílico con pentafluorofenol, usando HOBt y DCC como agentes acoplantes¹³, Esquema 2. En esa oportunidad en lugar de obtener el producto deseado L-24-Phf, se observó que el tiol era capaz de atacar al carbonilo activado por HOBt y DCC y formar la δ -tiolactona (2*R*, 5*R*, 8*R*) con 22% de rendimiento. La elucidación y asignación de la configuración absoluta del compuesto se realizó por RMN y difracción de rayos X.



Esquema 2. Síntesis explorada para la preparación del derivado L-24-Phf

5.2.2 Antecedentes sintéticos de acetilación de tioles

La acetilación del grupo tiol es una de las estrategias más utilizada para la protección del grupo tiol. En las últimas décadas se han descrito en literatura una amplia gama de reactivos como catalizadores de la acetilación de tioles para formar tioacetilos, en lugar de la metodología clásica de acetilación con anhídrido acético en medio básico, Esquema 3.



Esquema 3. Reacción de tioacetilación con Ac_2O

Las nuevas metodologías de tioacetilación incluyen catálisis ácida homogénea con ácidos de Lewis como $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ ²⁴ y AgOTf ²⁵, catálisis heterogénea²⁶ y catálisis básica

(DMAP/DCC)²⁷. También se describe la acetilación del grupo tiol y otros grupos en condiciones libres de disolvente y catalizador por calentamiento de las reacciones a 60°C²⁸ o 80-85°C²⁹.

5.3. Objetivos específicos

El objetivo de este capítulo es el diseño y síntesis de prodrogas con el fin de mejorar la estabilidad de 2-MMBT, para ello se plantea:

5.3.1. La síntesis de derivados δ -tiolactona mediante ciclación intramolecular entre el tiol libre de la cadena 2-mercaptometilo y el ácido carboxílico presentes en las 2-MMBT bajo condiciones de acoplamiento.

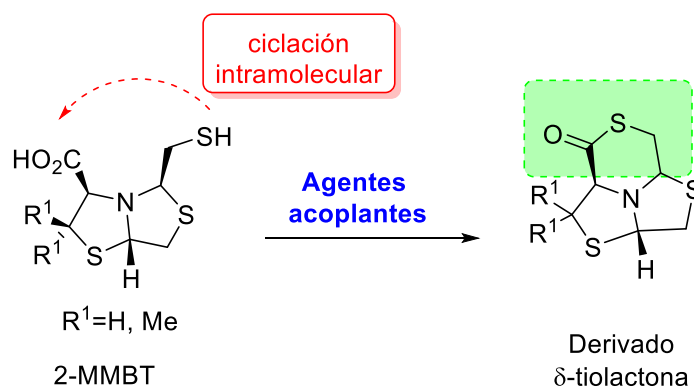
5.3.2. La síntesis de derivados tioacetilos.

5.3.3. Estudiar la potencialidad de los derivados preparados determinando la estabilidad química a diferentes pHs fisiológicos y la estabilidad metabólica en plasma y microsomas de hígado de rata.

5.4. Resultados y Discusión

5.4.1 Síntesis de derivados δ -tiolactonas

Dado los antecedentes, decidimos probar la síntesis las δ -tiolactonas a partir de L-**24** y L-**25** mediante ciclación intramolecular entre el ácido carboxílico y el grupo tiol usando como agentes acoplantes DCC/HOBT y HATU, Esquema 4.



Esquema 4: Síntesis propuesta para preparar δ -tiolactonas a partir de 2-MMBT

Es importante destacar que dada la particularidad que exhiben los enlaces N-C-S en los anillos tiazolidínicos debido a su reversibilidad, es posible obtener cuatro diastereómeros distintos por isomerización de los enlaces N-C2-S y N-C5-S, esto será ampliado más adelante en el punto 4.3.1b. En la Tabla 1 se describen los posibles productos que podrían obtenerse y su porcentaje de obtención según las condiciones de acoplamiento.

Tabla 1. Síntesis de δ -tiolactonas a partir de L-24 y L-25

L-24: R¹=H
 L-25: R¹=Me

55a: R¹=H
 56a: R¹=Me

55b: R¹=H
 56b: R¹=Me

55c: R¹=H
 56c: R¹=Me

55d: R¹=H
 56d: R¹=Me

Entrada	Condiciones	2-MMBT de partida	% Rendimiento							
			55a	55b	55c	55d	56a	56b	56c	56d
1	HOBT, DCC, AcOEt, T.A, 12h	L-24	38	2	5	0				
2		L-25					93	0	0	0
3	HATU, DIPEA, DCM, T.A, 12h	L-24	0	0	14	0				
4		L-25					22	0	2	0

Al preparar la δ -tiolactona usando HOBT y DCC, a partir de L-24 (Tabla 1, entrada 1) en el crudo de reacción por ¹H-RMN observamos un producto mayoritario de reacción. Su posterior purificación nos permitió aislarlo con un 38% de rendimiento y caracterizarlo como la δ -tiolactona (2R,5S,8R) 55a con la misma configuración que la bistiazolidina de partida. La configuración absoluta (2R, 5S, 8R) se asignó mediante difracción de rayos X. De la columna también se logró aislar otras dos δ -tiolactonas, identificadas como (2R,5R,8R) 55b (2%) y (2S,5R,8R) 55c (5%). La configuración (2R,5R,8R) 55b ya había sido confirmada anteriormente por difracción de rayos X¹³ y la configuración de 55c se asignó por NOESY-RMN y cálculos DFT. En las mismas condiciones cuando partimos de L-25 que contiene el gem dimetilo en la cadena lateral (Tabla 1, entrada 2), en el crudo de reacción se observó un solo producto. El cual fue aislado con un 93% de rendimiento y caracterizado por RMN como la δ -tiolactona (2R,5S,8R) 56a con la misma configuración

que la bistiazolidina de partida. La configuración absoluta de este compuesto se asignó por NOESY-RMN.

Al usar HATU como agente acoplante, cuando partimos del derivado de cisteína L-**24**, en el crudo de reacción por ^1H -RMN no se evidenció la formación de la δ -tiolactona **55a**, sino directamente su isómero **55c** (Tabla 1, entrada 3). El cual fue aislado como único producto con 14% de rendimiento. Cuando la bistiazolidina de partida fue L-**25** derivado de penicilamina, en el crudo de reacción se observó la tiolactona **56a** y otro producto minoritario (Tabla 1, entrada 4). Al purificar se aisló **56a** (22%) y el producto minoritario **56c** (5%). Este último compuesto también fue caracterizado por RMN y su configuración asignada como (2*S*,5*R*,8*R*) por NOESY-RMN.

5.4.1A. Determinación de la configuración absoluta de las δ -tiolactonas

La configuración absoluta de las δ -tiolactonas **55c**, **56a** y **56c** fueron asignadas mediante la realización de experimentos RMN bidimensionales de efecto nuclear Overhauser (NOESY) y en el caso de **55c** además se asignó por cálculos teóricos utilizando Teoría del Funcional de la Densidad (DFT).

La optimización de los parámetros de los cálculos teóricos DFT y los experimentos NOESY-RMN, se hizo tomando como modelos representativos las δ -tiolactonas **55a** y **55b**, para las cuales teníamos confirmada por difracción de rayos X sus configuraciones.

En los cálculos teóricos para cada molécula se realizó una búsqueda conformacional (modelo de solvente de Born, cloroformo)³⁰ y al conformero de menor energía se le realizó una optimización inicial en MOE con el campo de fuerza AMBER 12: EHT, seguida del método semiempírico AM1. Para la optimización por DFT se utilizó el método B3LYP con un nivel de teoría 6-311+g(d',p'). La predicción de ^1H y ^{13}C RMN se realizó mediante el método GIAO con modelo de solvente SDM, cloroformo³¹. Los desplazamientos calculados para cada isómero se compararon con los datos experimentales y en base a los coeficientes de correlación de Pearson (r), los coeficientes de determinación (R^2) y el error absoluto medio (EAM) se determinó la configuración que se ajustaba mejor.

En el caso de los experimentos de NOESY RMN, se estudiaron las correlaciones de las señales de los protones H2, H5 y H8 y se observaron cuáles de ellos presentaron interacción por efecto NOE.

Asignación de configuración absoluta de 55c:

El análisis de ^1H y ^{13}C -RMN de las δ -tiolactonas **55a**, **55b** y **55c** obtenidas a partir de L-24 muestra diferencias en los corrimientos químicos de sus protones y carbonos, particularmente en las posiciones 2, 5 y 8. En la Figura 3 se muestra la comparación de los espectros de ^1H -RMN de las tres δ -tiolactonas.

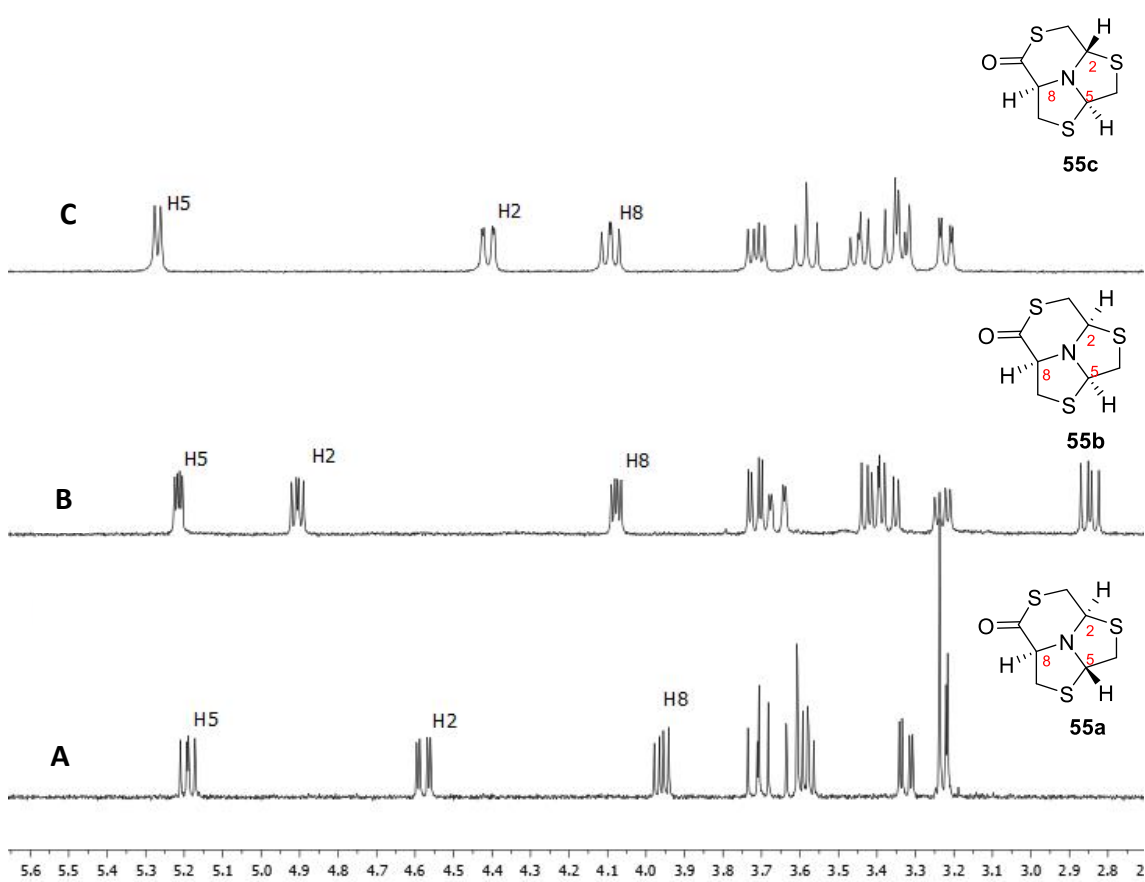
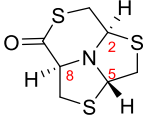
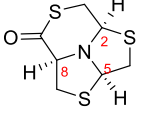
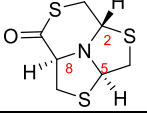


Figura 3. Espectros ^1H -RMN (400MHz, CDCl_3): A) **55a**, B) **55b**, C) **55c**

En la tabla 2 se muestran sólo los corrimientos de los carbonos quirales (C2, C5 y C8) y sus protones correspondientes (H2, H5, H8).

Tabla 2. Señales seleccionadas de ^1H y ^{13}C -RMN de las δ -tiolactonas **55a-55c**

δ -tiolactona	δ ^1H -RMN ppm (J = Hz)			δ ^{13}C -RMN (ppm)		
	H2	H5	H8	C2	C5	C8
 55a	4.89, dd (J = 5.0, 7.4)	5.19, dd (J = 2.6, 5.2)	3.94, dd (J = 5.3, 9.5)	73.8	63.1	69.9
 55b	4.56, dd (J = 3.1, 11.1)	5.17, dd (J = 6.7, 8.5)	3.94, dd (J = 5.3, 9.5)	65.3	70.2	73.7
 55c	4.41, dd (J = 2.1, 10.8)	5.27, d (J = 6.1)	3.94, dd (J = 5.3, 9.5)	59.3	76.8	73.9

La configuración absoluta de los compuestos **55a** y **55b**¹² fue confirmada por difracción de rayos X, Figura 4.

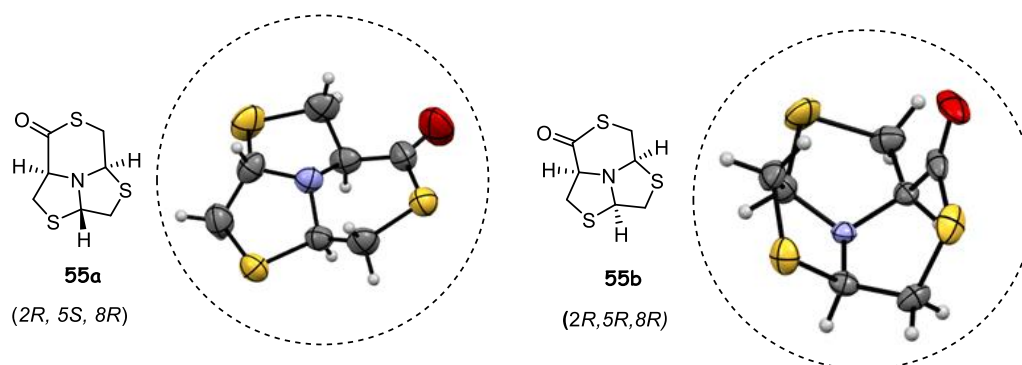


Figura 4. Estructura química de las δ -tiolactonas **55a** y **55b** y sus respectivas estructuras moleculares obtenidas por difracción de rayos X (ORTEP).

El experimento de NOESY-RMN del compuesto **55c** reveló la existencia de una interacción por efecto NOE entre los protones H5 y H8, y no se observaron interacciones entre H5-H2 y H2-H8. Por lo tanto, propusimos la configuración absoluta como (2*S*, 5*R*, 8*R*), Figura 5.

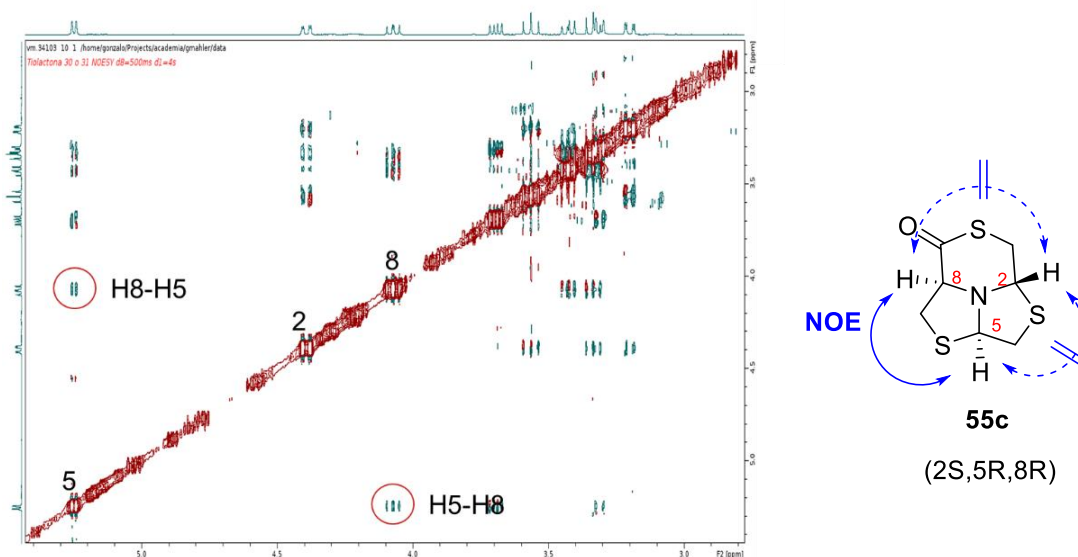
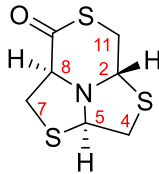
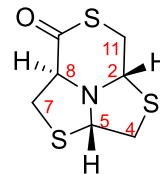


Figura 5. Espectro NOESY-RMN de **55c**

Esta asignación fue validada por cálculos DFT. Los datos experimentales de ^1H -RMN obtenidos para **55c** fueron comparados con datos obtenidos por los cálculos teóricos para las configuraciones absolutas $(2S,5R,8R)$ y $(2S,5S,8R)$, Tabla 3. La comparación de los datos experimentales de ^{13}C RMN con los calculados no se presentan, ya que los datos calculados no aportaron suficiente variabilidad para discriminar entre una configuración u otra, debido a que los corrimientos químicos de los carbonos se predicen en base a su entorno electrónico y los grupos funcionales cercanos que son idénticos.

Tabla 3. Correlación entre los corrimientos químicos de ^1H -RMN experimental de **55c** y los calculados para las configuraciones $(2S,5R,8R)$ **55c** y $(2S,5S,8R)$ **55d**

	 $(2S,5R,8R)$		 $(2S,5S,8R)$		
	δ Experimental 55c (ppm)	$\delta(2S,5R,8R)$ 55c calc. (ppm)	$ \Delta\delta $	$\delta(2S,5S,8R)$ 55d calc. (ppm)	$ \Delta\delta $
H2	4.41	4,50	0,09	5,08	0,67
H4a	3.31	3,83	0,12	3,02	0,68
H4b	3.73	3,28	0,05	3,01	0,32
H5	5.27	5,34	0,07	4,79	0,48
H7a	3.45	3,37	0,02	3,36	0,09
H7b	3.35	3,33	0,12	3,49	0,14
H8	4.09	4,05	0,04	4,11	0,02
H11a	3.22	3,58	0,36	3,59	0,37
H11b	3.58	3,20	0,38	3,30	0,28
EAM ^a	-	-	0.14	-	0.34
CD (R^2) ^b	-	-	0.91	-	0.68
CCP (r) ^c	-	-	0.95	-	0.83

^a EAM = Error absoluto medio; ^b CD = Coeficiente de determinación; ^c CCP = Coeficiente de correlación de Pearson

Según los resultados la configuración que mejor se ajusta con los datos experimentales es la configuración $(2S, 5R, 8R)$ siendo la que presenta menor EAM entre los valores experimental y calculado (0.14) y mejores R^2 y r (0.91 y 0.95 respectivamente).

Por lo tanto, mediante la combinación de técnicas de difracción de rayos X, cálculos teóricos DFT y NOESY-RMN, se logró asignar la configuración absoluta de las tres δ -tiolactonas obtenidas a partir de L-**24**: **55a** $(2R,5S,8R)$, **55b** $(2R,5R,8R)$ y **55c** $(2S,5R,8R)$.

Asignación de la configuración absoluta de **56a** y **56c**:

El análisis de ^1H y ^{13}C -RMN de las δ -tiolactonas **56a** y **56c** obtenidas a partir de L-**25** también muestra diferencias en los corrimientos químicos de los protones y carbonos particularmente en posiciones 2, 5 y 8. En la Figura 6 se muestra la comparación de los espectros de ^1H -RMN de las tres δ -tiolactonas.

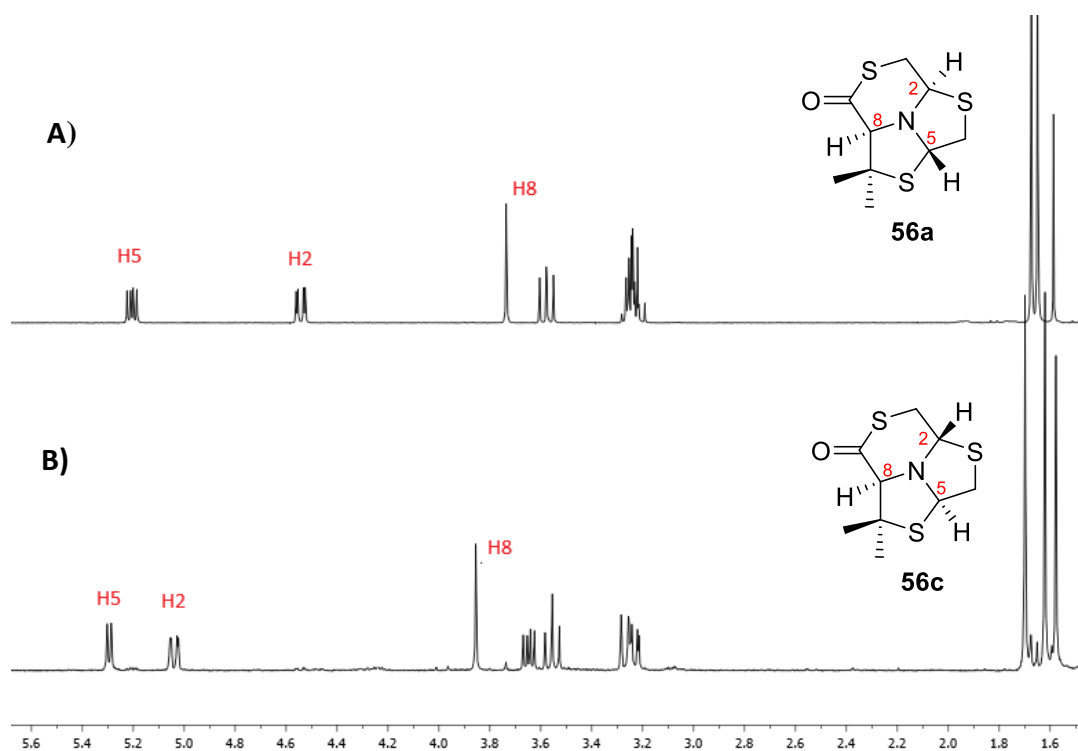
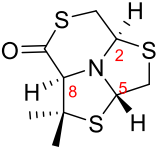
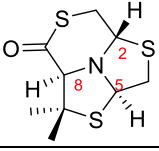


Figura 6. Espectros de ^1H -RMN de las δ -tiolactonas obtenidas a partir de L-25: A) **56a**; B) **56c**

En la tabla 4 se muestran sólo los corrimientos de los carbonos quirales (C2, C5 y C8) y sus respectivos protones (H2, H5, H8).

Tabla 4. Señales seleccionadas de ^1H y ^{13}C -RMN de las δ -tiolactonas **56a** y **55c**

δ -tiolactona	δ ^1H -RMN ppm (J = Hz)			δ ^{13}C -RMN ppm		
	H2	H5	H8	C2	C5	C8
 56a	4.52, dd (J = 2.8, 11.5)	5.19, dd (J = 5.7, 9.5)	3.72, s	67.5	67.6	81.8
 55c	5.02, dd (J = 2.2, 11.1)	5.27, d (J = 6.1)	3.84, s	59.4	74.5	81.8

Al analizar el espectro NOESY-RMN de **56a** se observó sólo una interacción por efecto NOE entre los protones H2-H8, por lo que la configuración absoluta para este compuesto se pudo asignar como (2*R*,5*R*,8*R*), Figura 7-A. El espectro NOESY-RMN del compuesto **56c** presentó una interacción NOE entre los protones H8-H5 y no presentó interacciones

entre los protones H2-H8 y H2-H5, por lo que se propuso la configuración como (2*S*,5*R*,8*R*), Figura 7-B.

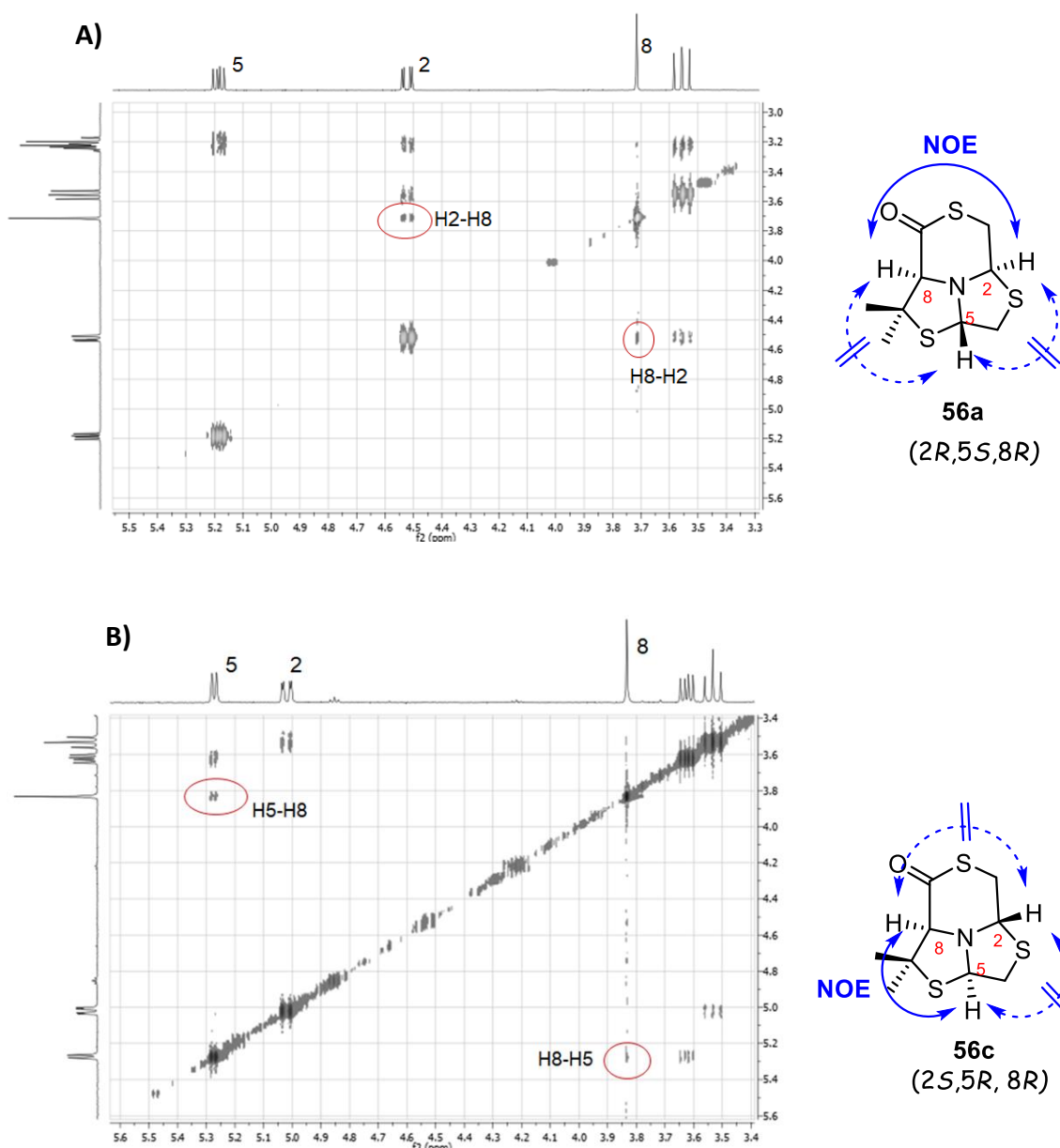


Figura 7. Espectros NOESY-RMN de las δ -tiolactonas A) **56a** y B) **56c**

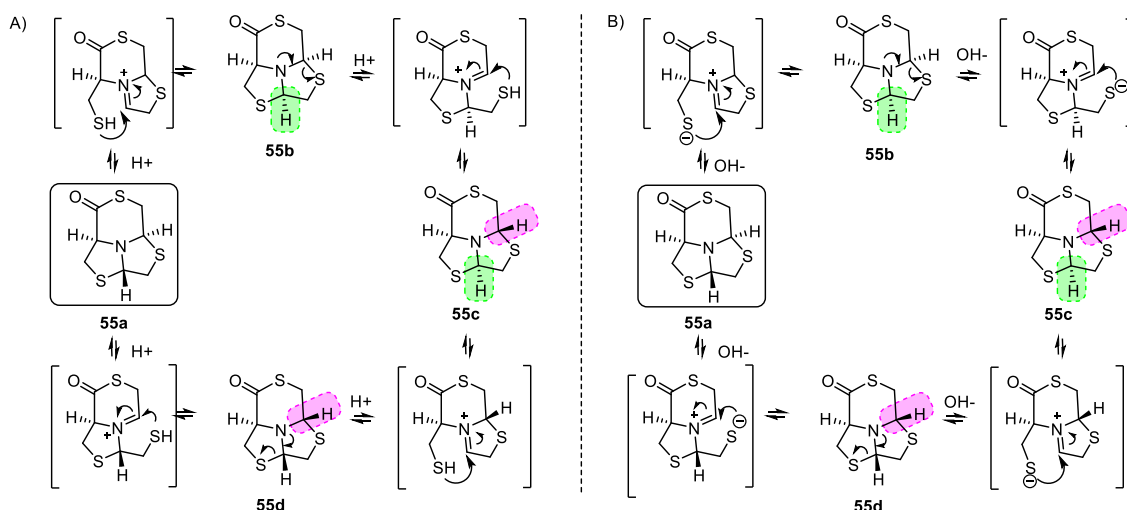
Basados en los experimentos de NOESY-RMN y en la experiencia previa para la asignación de las tiolactonas derivadas de cisteína, pudimos asignar la configuración absoluta de las δ -tiolactonas **56a** y **56c**.

5.4.1B. Isomerización de δ -tiolactonas

Los enlaces acetálicos N-C-S de los anillos tiazolidinas son reversibles mediante mecanismos de apertura y cierre del anillo a través de un intermedio imina o iminio³², tanto en medio ácido como básico. Esta apertura y cierre del anillo es lo que permite la isomerización de esos enlaces generalmente hacia el producto más estable. En base a esta propiedad nuestro grupo ha descrito reacciones de intercambio de aldehídos en los enlaces acetálicos de tiazolidinas³³, oxazolidintiazolidinas³¹ y bistiazolidinas³⁴.

Las δ -tiolactonas son triciclos que contienen en su estructura dos anillos tiazolidinas fusionados presentando dos enlaces acetálicos N-C2-S y N-C5-S que pueden isomerizarse. Como presentan 2 enlaces irreversibles se podrían obtener hasta cuatro posibles diasterómeros. La δ -tiolactona **55a** sería el producto de ciclación cinético, que mantiene la configuración de la 2-MMBT de partida, que luego podría isomerizar a los diasterómeros **55b**, **55c** y **55d**. El producto **55d** no fue detectado por RMN en los crudos de reacción y tampoco fue aislado de las reacciones ensayadas.

Los productos aislados de las reacciones dependieron de las condiciones de obtención y su purificación. Al usar HOBt/DCC en el crudo de reacción sólo se observó por ¹H-RMN el producto cinético **55a**. En la purificación por columna cromatográfica se obtuvo algo de isomerización del producto, el medio débilmente ácido que proporciona la sílica podría ser el responsable de la isomerización a **55b** y **55c**. En cambio, cuando se usó HATU/DIPEA tanto en el crudo de reacción como después de la purificación se observó y se aisló sólo **55c**, lo que sugiere que la isomerización se dio por el medio básico de reacción. Sin embargo, aunque solo se observó **55c** en el crudo de reacción, sólo se obtuvo en un 14%. Por otro lado, la no isomerización de **55c** durante la purificación podría sugerir que se trata del producto termodinámico. En el Esquema 5, se propone los posibles mecanismos de isomerización de **55a**: A) en medio ácido, y B) en medio básico



Esquema 5. Propuesta del mecanismo de isomerización para la δ -tiolactona **55a**: A) en medio ácido; B) en medio básico

Con el fin de confirmar la hipótesis de que **55a** es el producto cinético y **55c** es el producto termodinámico, se realizaron cálculos teóricos de las energías libres (ΔG°) de los cuatro posibles productos, Gráfico 1.

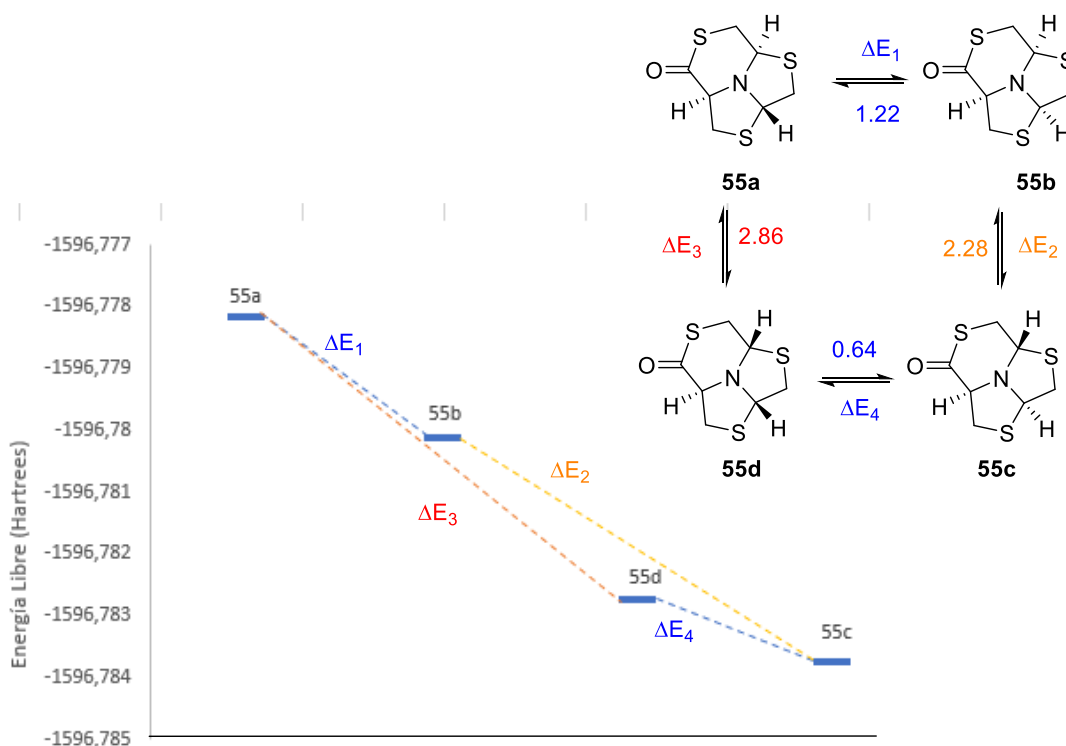


Gráfico 1. Representación gráfica de las energías de los cuatro diastereoisómeros calculadas por DFT.

Estos resultados indicaron que el producto cinético **55a** es el que presenta mayor energía por lo que podría isomerizar al producto termodinámicamente más estable, de

menor energía, que es **55c**, pasando por el diastereómero **55b** tal como se propuso en los mecanismos de isomerización, Figura 5. Como se puede observar la diferencia de energía entre **55b** y **55c** es $\Delta E_2 = -2.28$ Kcal/mol, esta diferencia de energía permite aislar tanto **55b** como **55c**. En cambio, la diferencia de energía entre **55d** y **55c** es sólo $\Delta E_4 = -0.64$ Kcal/mol, por lo que una vez que se favorece la isomerización a **55d** esa pequeña diferencia de energía llevaría a que se forme inmediatamente el producto termodinámicamente más estable **55c**, y no sea posible observar ni aislar **55d**.

5.4.1C. Estudio de isomerización de 55a en medio ácido y básico

Debido a los resultados obtenidos se decidió estudiar la isomerización del compuesto **55a** tanto en condiciones ácidas como básicas, con el fin de optimizar la obtención de los isómeros **55b** y **55c** los cuales fueron obtenidos en bajos rendimientos.

En primer lugar se estudió la isomerización de **55a** en medio básico, usando DIPEA en diferentes condiciones, Tabla 5.

Tabla 5. Estudio de las condiciones de isomerización de **55a** en medio básico (DIPEA)

55a $\xrightleftharpoons{\text{DIPEA}}$ **55b** + **55c**

Entrada	condiciones	t (min)	55a (%)	55b (%)	55c (%)
1	55a (1eq), DIPEA (1.1 eq), DCM, MW: 30°C, 50W	15	79	6	15
		30	69	10	21
		45	69	5	26
		60	61	5	34
2	55a (1eq), DIPEA (1.1 eq), AcOEt, reflujo	90	24	28	48

% de conversión obtenida por $^1\text{H-RMN}$ en base a la integración de señales de H independientes de los diferentes productos

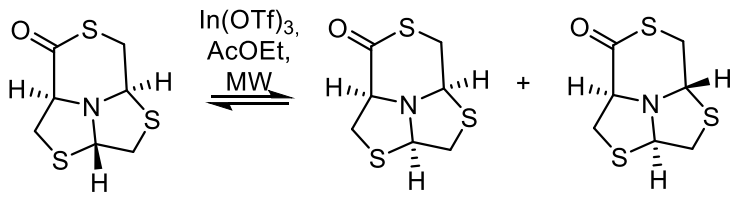
Primero se probó realizar la reacción usando DCM como disolvente, calentamiento por MW, a 30°C y se tomaron muestras de la reacción a diferentes tiempos (15, 30, 45 y 60 min) y se monitorearon por $^1\text{H-RMN}$, Tabla 6, entrada 1. En estas condiciones a los 60

min se observó que la isomerización de **55a** no era completa (39%) obteniéndose **55b** (5%) y **55c** (34%). Luego se probó la reacción con AcOEt como disolvente a reflujo durante 90 minutos, Tabla 6, entrada 2. En estas condiciones el porcentaje total de conversión de **55a** fue mucho mayor (76%), observándose la formación mayoritaria hacia el producto termodinámico **55c** (48%) y el intermedio **55b** (28%) en menor proporción.

Por lo tanto, en medio básico se vio que **55a** isomeriza a **55b** y **55c**, sin embargo, en ninguna de las dos condiciones de isomerización ensayadas se logró desplazar totalmente el equilibrio hacia el producto termodinámico.

Por otro lado también se estudió la isomerización de **55a** en presencia de un ácido de Lewis como $\text{In}(\text{OTf})_3$. La reacción se llevó a cabo en condiciones de MW a 40°C por un período de 40 minutos, y se monitoreó por ^1H -RMN a distintos tiempos, Tabla 6.

Tabla 6. Isomerización de **55a** con $\text{In}(\text{OTf})_3$

				
Condiciones	Tiempo (min)	55a (%)	55b (%)	55c (%)
55a , $\text{In}(\text{OTf})_3$ 10% Molar, AcOEt, MW: 40°C , 50W	0	100	0	0
	5	0	100	0
	10	0	100	0
	15	0	100	0
	20	0	100	0
	40	0	100	0

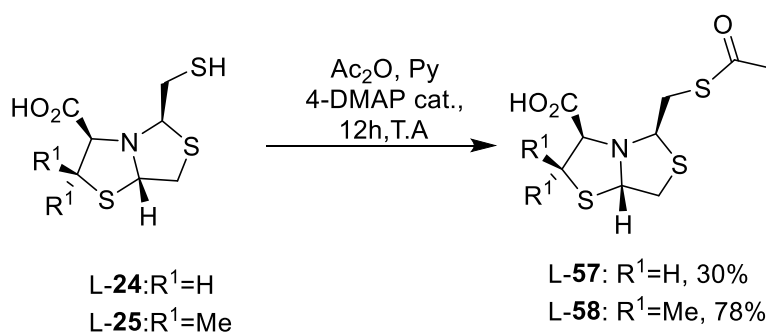
% conversión obtenido por ^1H -RMN en base a la integración de H independientes de los diferentes productos

En este caso a los 5 minutos de reacción ya se observó en una conversión del 100% al producto de isomerización **55b**. La reacción se siguió calentando hasta los 40 minutos con el fin de observar si ocurría la conversión de **55b** al diastereómero más estable **55c**,

pero en ese período no se observó ningún otro producto de isomerización. Por lo tanto, utilizando como catalizador $\text{In}(\text{OTf})_3$ se logró optimizar la preparación del isómero **55b** a partir del isómero **55a**. Queda pendiente escalar la reacción y calcular el rendimiento del producto aislado para validar la metodología.

5.4.2. Síntesis de Derivados tioacetilos

Para la preparación de los derivados tioacetilos a partir de **L-24** y **L-25** se decidió usar la metodología clásica de acetilación con Ac_2O y piridina, catalizada por 4-DMAP a T.A, Esquema 6.



Esquema 6. Reacción de tioacetilación de **L-24** y **L-25**

Al realizar la tioacetilación de la bistiazolidina **L-24**, se obtuvo el producto tioacetilado **L-57** con un bajo rendimiento (30%) y se aisló la δ -tiolactona **55a** como producto secundario (6%). Cuando se realizó la tioacetilación de **L-25** se obtuvo sólo el producto **L-58** con buen rendimiento (78%).

5.4.3 Estabilidad química de las prodrogas

A la hora de evaluar la estabilidad química de las prodrogas obtenidas, se eligió evaluar las δ -tiolactonas **55b**, **55c** y el compuesto tioacetilado **L-57**. Esta elección se hizo en base a su disponibilidad sintética y estabilidad de los productos en solución. La δ -tiolactona **55a** fue descartada ya que en las condiciones de cromatografía de HPLC (FM ACN: H_2O : 0.05% Ác. Fórmico, pH=3), al igual que en la purificación por columna, va isomerizando

a **55b** y **55c**. Los compuestos elegidos fueron evaluados a dos pH, simulando el fluido gástrico sin enzimas pH 1.2 (FGS) y a pH fisiológico 7.4 (solución buffer fosfato SBP). El método utilizado por HPLC fue validado y para la cuantificación se realizaron las curvas de calibración correspondiente a cada compuesto.

5.4.3A. Ensayo de Estabilidad a diferentes pHs

Las soluciones de FGS pH 1.2 y SBP pH 7.4 se prepararon de acuerdo con lo descrito en Farmacopea Argentina^{35,36}. Las prodrogas se incubaron a 37°C en las soluciones de FGS o SBP por 6h. Se tomaron muestras de las mezclas de reacción a los 30, 60, 180 y 360 minutos. Las muestras se filtraron y analizaron por HPLC y se cuantificó los porcentajes remanentes de prodroga y el porcentaje de producto de hidrólisis. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Estabilidad a pH 1.2, 37°C

Los resultados obtenidos para **55b**, **55c** y **57** en FGS pH 1.2, se describen en la Tabla 7 y Gráfico 2.

Tabla 7. Estabilidad de las prodrogas L-**57**, **55b** y **55c** en FGS pH 1.2 a 37°C

Tiempo (min)	Determinación por HPLC (%)					
	55b	L- 24 (a)	55c	L- 24 (b)	L- 57	L- 24 (c)
0	100	0	100	0	100	0
30	84 ± 3	1 ± 2	77 ± 3	16 ± 2	99 ± 2	0
60	70 ± 3	4 ± 1	62 ± 4	25 ± 3	79 ± 6	2 ± 1
180	65 ± 4	8 ± 2	22 ± 1	27 ± 1	55 ± 4	3 ± 1
360	60 ± 4	10 ± 2	5 ± 1	14 ± 2	32 ± 4	3 ± 1

Los % representan el promedio de tres experimentos independientes: (a) % L-**24** producto de hidrólisis a partir de **55b**; (b) % L-**24** producto de hidrólisis a partir de **55c**; (c) % L-**24** producto de hidrólisis a partir de L-**57**

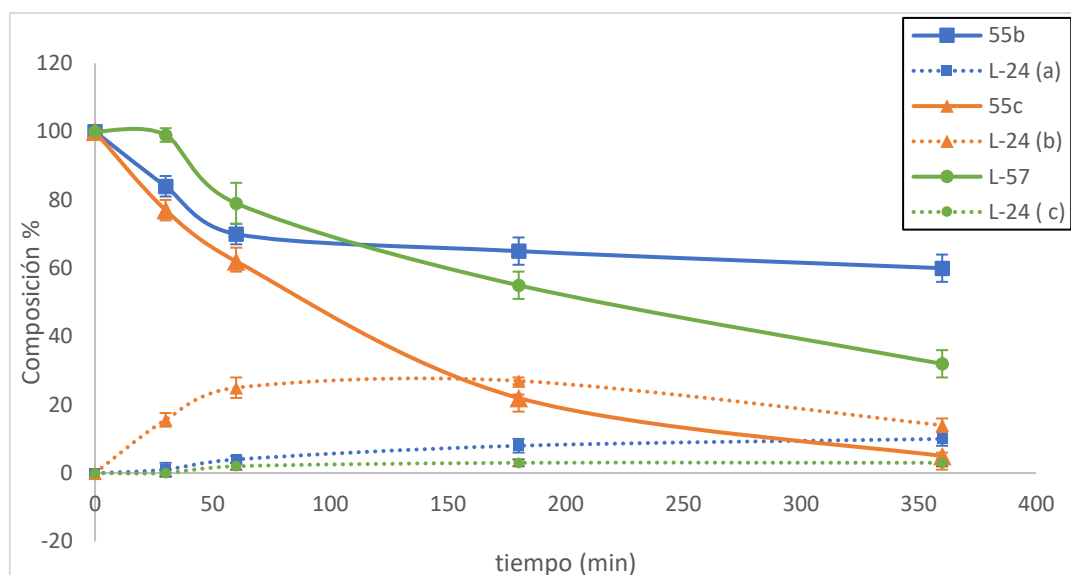


Gráfico 2. Gráfico de la estabilidad de los compuestos **55b**, **55c** y **L-57** en FGS pH 1.2; **L-24 (a)** producto de hidrólisis de **55b**, **L-24 (b)** producto de hidrólisis de **55c** y **L-24 (c)** producto de hidrólisis de **L-57**

Los resultados indicaron que la δ -tio lactona **55c** es la que se degrada más rápido a pH ácido y la que libera mayor cantidad del producto de hidrólisis **L-24**. El compuesto **55b** muestra una degradación rápida en la primer hora de incubación que luego se enlentece hasta llegar al 60% a las 6 horas, siendo el producto que se mantuvo intacto en mayor proporción. Teniendo en cuenta que el paso de la prodroga por el estómago generalmente es entre 0.5 y 2 horas, el compuesto tioacetilado **L-57** y **55b** son los que presentan menor degradación a la hora de incubación (20 y 30% respectivamente), por lo tanto serían los compuesto que estarían más disponible para la absorción intestinal.

Estabilidad a pH= 7.4 y 37°C

Los resultados de estabilidad obtenidos para **55b**, **55c** y **L-57** en SBP pH 7.4 se describen en la Tabla 8 y Gráfico 3.

Tabla 8. Estabilidad de las prodrogas **55b**, **55c** y **L-57** en SBP pH 7.4 a 37°C

Tiempo (min)	Determinación por HPLC (%)					
	55b	L-24 (a)	55c	L-24 (b)	L-57	L-24 (c)
0	100	0	100	0	100	0
30	88 ± 1	0	67 ± 1	34 ± 2	100 ± 6	0
60	83 ± 2	0	48 ± 1	50 ± 2	100 ± 3	0
180	56 ± 2	2 ± 1	10 ± 1	44 ± 3	100 ± 14	0
360	29 ± 1	2 ± 2	0.2 ± 2	15 ± 2	100 ± 4	0

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes: (a) %L-24 producto de hidrólisis de **55b**; (b) %L-24 producto de hidrólisis de **55c**; (c) %L-24 producto de hidrólisis de L-57

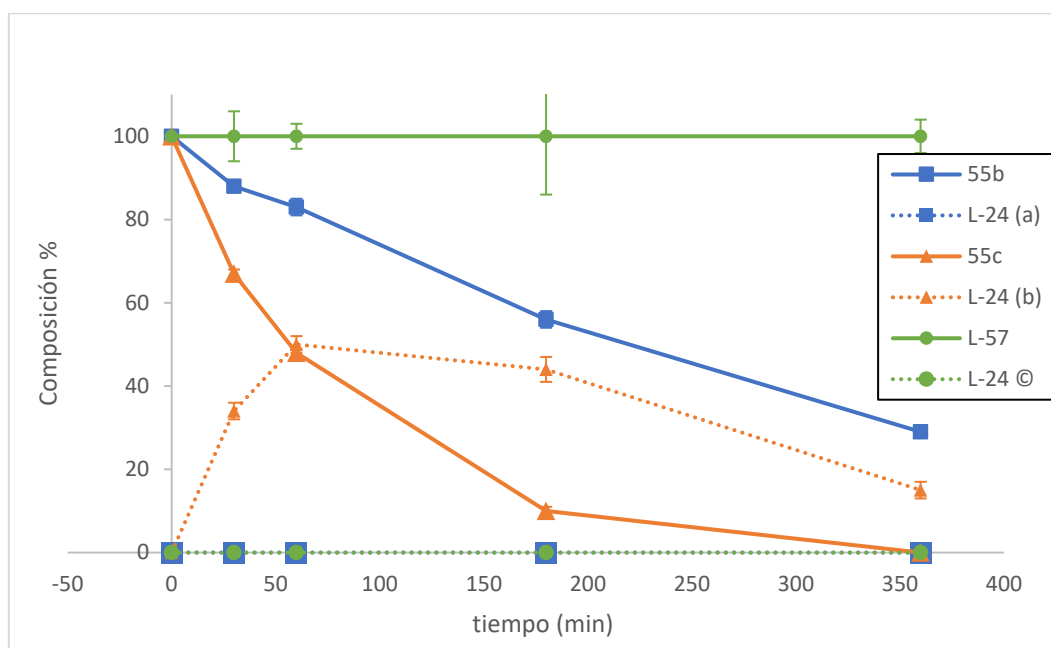
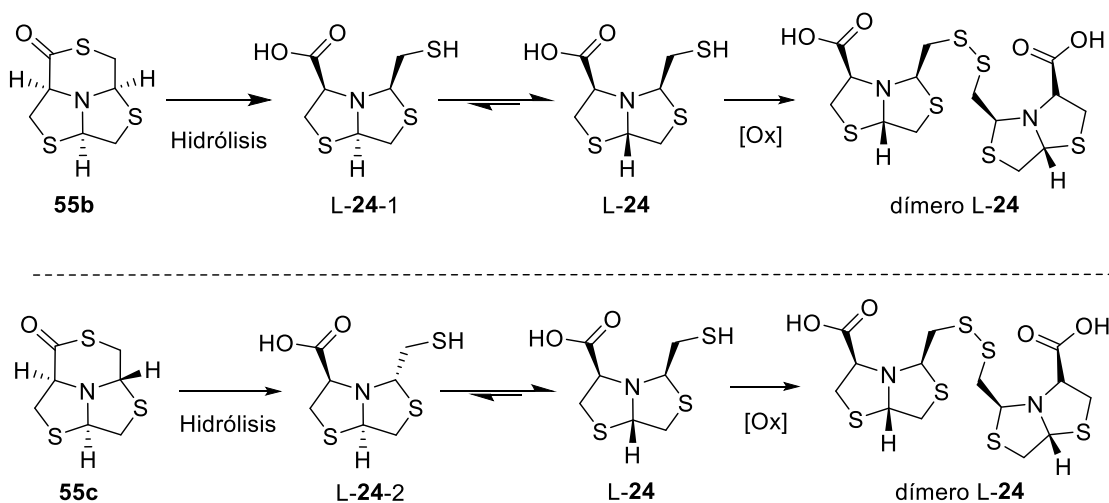


Gráfico 3. Estabilidad de los compuestos **55b**, **55c** y **L-57** a pH 7.4; L-24 (a) producto de hidrólisis de **55b**, L-24 (b) producto de hidrólisis de **55c** y L-24 (c) producto de hidrólisis de **L-57**

En SBP pH 7.4 se observó que la δ -tioactona **55c** es la que se degrada más rápidamente (90% a las 6 h de incubación) al igual que a pH 1.2. También es la que liberó más producto de hidrólisis L-24 (50% en 1 h de incubación). Nuevamente se observa que L-24 proveniente de **55c** se oxida y se degrada con el tiempo. El producto **55b** tiene un comportamiento opuesto al que presentaba a pH 1.2, en este caso se degrada más lentamente la primera hora de incubación (17% a 1 h) y luego decae más rápido hasta permanecer al 29% a las 6 h. El compuesto tioacetilado L-57 fue el que exhibió la mayor estabilidad a ese pH, permaneciendo intacto (100%) las 6 h de incubación, por lo cual puede ser considerado como el mejor candidato a prodroga.

A ambos pH para las δ -tiolactonas **55b** y **55c** por HPLC se detectó directamente como producto de hidrólisis L-**24** (*2R, 5S, 8R*) y no se detectaron los isómeros de bistiazolidinas L-**24**-1 (*2R,5R,8R*) o L-**24**-2 (*2S,5R,8R*), que mantendrían la configuración de sus respectivas δ -tiolactonas de partida, Esquema 7. Esto se debe probablemente a que los isómeros se equilibran rápidamente a la configuración de la bistiazolidina más estable L-**24** (*2R, 5S, 8R*). A su vez se observó que la bistiazolidina L-**24** se oxida con el tiempo a su correspondiente dímero L-**24** (identificado por HPLC-MS) y otro producto de degradación que no pudo ser identificado.



Esquema 7. Secuencia propuesta para la hidrólisis de las δ -tiolactonas **55b** y **55c**; [Ox] oxidación

Por lo tanto, la δ -tiolactona **55c** es la que libera el producto de hidrólisis L-**24** más rápidamente y en mayor proporción tanto a pH ácido como neutro. Estas características la convierten en un pobre candidato para una formulación ya que no cumple con los requisitos de permanecer intacto en el estómago. En cambio, **55b** y L-**57** podrían ser buenos candidatos a prodrogas, siendo el mejor L-**57** ya que se mantiene 100% a pH 7,4 por 6 horas y se degrada sólo un 20% en 1 h de incubación a pH ácido. De todas maneras, para concluir que compuesto se perfila mejor como droga es necesario estudiar cómo se comportarían a pH intestinal 6.8 para ver si a ese pH se mantienen intactas para luego ser absorbido. Dado que luego de ser absorbido debe pasar por el hígado donde se metabolizaría, debería estudiar la estabilidad de las prodrogas en microsomas de hígado

de rata y también en plasma para ver si se hidrolizan al compuesto activo en presencia de las esterasas plasmáticas.

5.5. Conclusiones:

- Mediante tioesterificación intramolecular se preparó dos series de δ -tiolactonas a partir de 2-MMBT. Estos compuestos tienen la particularidad de tener dos enlaces N-C-S reversibles que permiten la formación de cuatro posibles productos de isomerización con diferentes configuraciones absolutas. En el caso de los derivados de cisteína L-**24** se logró identificar y aislar tres de esos diasterómeros y en el caso de los derivados de penicilamina L-**25** sólo dos. Utilizando diferentes técnicas como espectroscopía de RMN, difracción de rayos X y cálculos teóricos DFT fue posible caracterizar y asignar la configuración absoluta de cada uno de los diasterómeros aislados. Además, se prepararon dos derivados tioacetilos como posibles prodrogas.
- A partir del diasterómero cinético **55a** se estudió diferentes condiciones de isomerización utilizando ácidos y bases. El uso de $\text{In}(\text{OTf})_3$ como catalizador permitió la isomerización completa de **55a** al diasterómero **55b** en sólo 5 minutos en condiciones de MW.
- Los estudios de estabilidad química de tres prodrogas seleccionadas **55b**, **55c** y L-**57** en fluido gástrico simulado a pH 1.2 y en medio fisiológico a pH 7.4 , 37°C, mostraron que el mejor candidato a prodroga es el derivado tioacetilado L-**57**, por presentar mayor estabilidad en esas condiciones.

5.6. Perspectivas

• Optimización de la obtención de las δ -tiolactonas

Se plantea optimizar la obtención de las δ -tiolactonas:

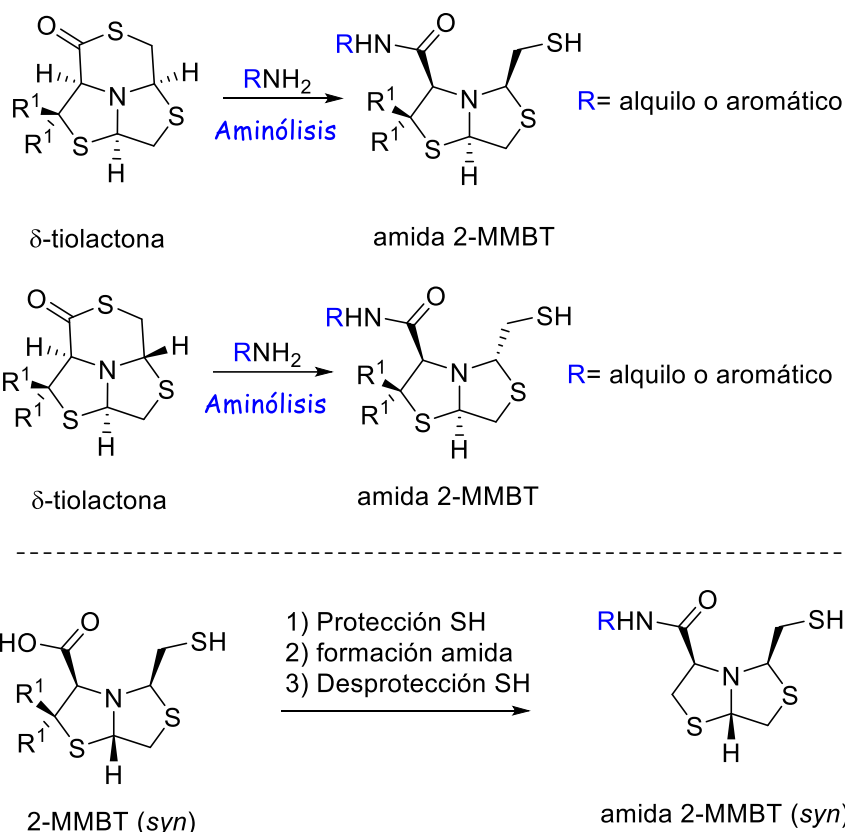
- 1) A partir de 2-MMBT explorando el uso de distintos disolventes y otros agentes acoplantes como las sales de uronio HBTU, HCTU, la Carbodiimida EDCI o la sal de fosfonio PyBOP.
- 2) A partir de la δ -tiolactona cinética explorar distintas condiciones de isomerización en MW. En medio básico con distintas bases (TEA, DABCO, Cs_2CO_3) y en medio ácido con otros ácidos de Lewis como $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, AgOTf y $\text{Zn}(\text{OTf})_2$.

• Estabilidad química a pH 6.8 y estabilidad metabólica de prodrogas

Para finalizar la evaluación de las prodrogas será necesario estudiar su estabilidad de a pH intestinal 6.8 y estudiar la estabilidad metabólica en plasma y microsomas de hígado de rata. También se plantea completar la estabilidad de las prodrogas obtenidas a partir de L-25 derivada de penicilamina en los distintos pHs fisiológicos y su estabilidad metabólica. Una vez estudiada la estabilidad de todas las prodrogas se definirá el compuesto que presenta mejor perfil y en caso de que ninguno de los compuestos sea buen candidato, se hará un rediseño para obtener nuevas prodrogas.

• Aminolisis de δ -tiolactonas

La aminolisis de tiolactonas, sobre todo de las tiolactonas con un anillo de 5 miembros, ha sido en los últimos años de gran interés debido a su uso en la biomedicina^{37,38}, en el diseño de fármacos³⁹ y en la síntesis de péptidos⁴⁰ y polímeros⁴¹. En nuestro caso las tiolactonas forman anillo de 6 miembros y la apertura del anillo tiolactona permitiría la formación de derivados amidas de las 2-MMBT, Esquema1.



Esquema 8. A) Reacción de aminólisis de δ -tiolactonas para obtener amidas y B) reacción de formación de amidas mediante protección/desprotección a partir de 2-MMBT

La aminólisis de las δ -tiolactonas se podría hacer usando un exceso de amina (alquílica o aromática), en THF y en presencia de un reductor para evitar la oxidación del tiol libre⁵ o en presencia de AgOTf y DABCO⁴. Esta metodología evitaría los pasos de protección/desprotección de los grupo ácido carboxílico y tiol si partiéramos de las bistiazolidinas, Esquema 8. Las diferentes δ -tiolactonas nos permitiría preparar estos compuestos con diferentes configuraciones absolutas, algo que no es posible si partimos de 2-MMBT, ya que la única configuración estable en las bistiazolidinas es el diasterómero *syn*.

Bibliografía

- ¹ J. Rautio, N. A. Meanwell, L. Di, M. J. Hageman. The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development, *Nat Rev Drug Discov.*, **2018**, 17, 559–587, doi.org/10.1038/nrd.2018.46
- ² M. Markovic, S. Ben-Shabat, A. Dahan. Prodrugs for Improved Drug Delivery: Lessons Learned from Recently Developed and Marketed Products, *Pharmaceutics*, **2020**, 12(11), 1–12, doi.org/10.3390/pharmaceutics12111031
- ³ A. Dahan, M. Khamis, R. Agbaria, R. Karaman. Targeted Prodrugs in Oral Drug Delivery: The Modern Molecular Biopharmaceutical Approach, *Expert Opin Drug Deliv.*, **2012**, 29 (8), 1001–1013, doi.org/10.1517/17425247.2012.697055
- ⁴ A. Najjar, A. Najjar, R. Karaman. Newly Developed Prodrugs and Prodrugs in Development; an Insight of the Recent Years, *Molecules*, **2020**, 25(4), 1–18, doi.org/10.3390/molecules25040884
- ⁵ J. Rautio, N. A. Meanwell, L. Di, M. J. Hageman. The Expanding Role of Prodrugs and Development, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2018**, 17, 559–587, doi.org/10.1038/nrd.2018.46
- ⁶ J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Järvinen, J. Savolainen. Prodrugs : Design and Clinical Applications, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2008**, 7, 255–270, doi.org/doi.org/10.1038/nrd2468
- ⁷ R. Karaman, Using Prodrugs to Optimize Drug Candidates, *Expert Opin. Drug Dis.*, **2014**, 9 (12), 1405–1419, doi.org/10.1517/17460441.2014.954545.
- ⁸ N. Das, M. Dhanawat, B. Dash, R.C. Nagarwal, S.K. Shrivastava. Codrug : An Efficient Approach for Drug Optimization European Journal of Pharmaceutical Sciences Codrug : An Efficient Approach for Drug Optimization, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2010**, 41(5), 571–88, doi.org/10.1016/j.ejps.2010.09.014
- ⁹ M. C. Dubinsky. Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: Pharmacology, efficacy, and safety, *Clin Gastroenterol Hepatol*, **2004**, 2(9), 731-743, doi.org/10.1016/S1542-3565(04)00344-1
- ¹⁰ K. Taori, V. J. Paul, H. Luesch. Structure and Activity of Largazole, a Potent Antiproliferative Agent from the Floridian Marine Cyanobacterium *Symploca Sp.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130 (6), 1806–7, doi.org/10.1021/ja7110064
- ¹¹ J. F. French, G. A. Flynn, E. L. Giroux, S. Mehdi, B. Anderson, D. C. Beach, J. R. Koehl, R. C. Dage. Characterization of a dual inhibitor of angiotensin I-converting enzyme and neutral endopeptidase, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1994**, 268, 180-186.
- ¹² D. V. Ferraris, P. Majer, C. Ni, C. E. Slusher, R. Rais, Y. Wu, K. M. Ozniak, J. Alt, C. Rojas, B. S. Slusher, T. Tsukamoto. δ -Thiolactones as Prodrugs of Thiol-Based Glutamate Carboxypeptidase II (GCP II) Inhibitors, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 243–247, 243 doi.org/10.1021/jm401703a

-
- ¹³ G. W. Pace, C. D. Leaf. The Role of Oxidative Stress in HIV Disease, *Free Rad. Biol. Med.*, **1995**, 19, 523–528. doi.org/10.1016/0891-5849(95)00047-2
- ¹⁴ P. Hinchliffe, M. M. González, M. F. Mojica, J. M. González, V. Castillo, C. Saiz, M. Kosmopoulou, C. L. Tooke, L. I. Llarrull, G. Mahler, R. A. Bonomo, A. J. Vila, J. Spencer. Cross-Class Metallo- β -Lactamase Inhibition by Bisthiazolidines Reveals Multiple Binding Modes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(26), E3745–54, doi.org/10.1073/pnas.1601368113
- ¹⁵ V. Castillo (2016), Diseño y Síntesis de Heterociclos como posibles Inhibidores de Metallo β -Lactamasas (Tesis Maestría), Facultad de Química, Udelar.
- ¹⁶ A) T. Imai, M. Taketani, M. Shii, M. Hosokawa, K. Chiba. Substrate Specificity of Carboxylesterase Isozymes and Their Contribution to Hydrolase Activity in Human Liver and Small Intestine, *Drug Metab. Dispos.*, **2006**, 34(10), 1734–1741, doi.org/10.1124/dmd.106.00938; B) S. C. Laizure, V. Herring, Z. Hu, K. Witbrodt, R. B. Parker. The Role of Human Carboxylesterases in Drug Metabolism: Have We Overlooked Their Importance?, *Pharmacotherapy*, **2013**, 33(2), 210–222, doi.org/10.1002/phar.1194; C) D. Wang, L. Zou, Q. Jin, J. Hou, G. Ge, L. Yang. Human Carboxylesterases: A Comprehensive Review, *Acta Pharm. Sin. B*, **2018**, 8(5), 699–712, doi.org/10.1016/j.apsb.2018.05.005
- ¹⁷ A. L. Weber. Aqueous Synthesis of Peptide Thioesters from Amino Acids and a Thiol Using 1,1'-Carbonyldiimidazole, *Orig. Life Evol. Biosph.*, **2005**, 35(5), 421–427, doi.org/10.1007/s11084-005-4070-0
- ¹⁸ B. Neises, W. Steglich. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1978**, 17(7), 522–524, doi.org/10.1002/anie.197805221
- ¹⁹ K. Horiki. Synthesis of Thiol Esters with Peptide Coupling Reagents, *Synth. Commun.*, **1977**, 7(4), 251–259, doi.org/10.1080/00397917708050744.
- ²⁰ A. Jordan, H. F. Sneddon. Development of a solvent-reagent selection guide for the formation of thioesters, *Green Chem.*, **2019**, 21, 1900–1906, doi.org/10.1039/C9GC00355J
- ²¹ K. Kawasaki T. Kitagawa, H. Kuroda, H. Sasaki. Facile Conversions of Carboxylic Acids into Amides, Esters, and Thioesters Using 1,1'-Oxalyldiimidazole and 1,1'-Oxalyldi(1,2,4-triazole), *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35(10), 4294–4301
- ²² K. Wakasugi, A. Iida, T. Misaki, Y. Nishii, Y. Tanabe. Simple, Mild, and Practical Esterification, Thioesterification, and Amide Formation Utilizing p-Toluenesulfonyl Chloride and N-Methylimidazole, *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, 345(11), 1209–1214, doi.org/10.1002/adsc.200303093
- ²³ S. Iimura, K. Manabea, S. Kobayashi. Direct thioesterification from carboxylic acids and thiols catalyzed by a Brønsted acid, *Chem. Commun.*, **2002**, 94–95, doi.org/10.1039/B109834A
- ²⁴ P. Saravanan, V. K. Singh. An Efficient Method for Acylation Reactions, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40(13), 2611–2614, doi.org/10.1016/S0040-4039(99)00229-4.
- ²⁵ R. Das, D. Chakraborty. Silver Triflate Catalyzed Acetylation of Alcohols, Thiols, Phenols, and Amines, *Synthesis*, **2011**, 10, 1621–1625, doi.org/10.1055/s-0030-1259999

-
- ²⁶ G. Sartori, R. Ballini, F. Bigi, G. Bosica, R. Maggi, P. Righi. Protection (and Deprotection) of Functional Groups in Organic Synthesis by Heterogeneous Catalysis, *Chem. Rev.*, **2004**, 104(1), 199–250, doi.org/10.1021/cr0200769
- ²⁷ E. F. V. Scriven. 4-Dialkyl Laminopyridines : Super Acylation and Alkylation Catalysts, *Chem. Soc. Rev.*, **1983**, 12, 129–161, doi.org/10.1039/CS9831200129
- ²⁸ N. Anbu, N. Nagarjun, M. Jacob, J.M.V.K. Kalaiarasi, A. Dhakshinamoorthy, Acetylation of Alcohols, Amines, Phenols, Thiols under Catalyst and Solvent-Free Conditions, *Chemistry*, **2019**, 1(1), 69–79, doi.org/10.3390/chemistry1010006
- ²⁹ B. C. Ranu, S. S. Dey, A. Hajra. Highly Efficient Acylation of Alcohols, Amines and Thiols under Solvent-Free and Catalyst-Free Conditions, *Green Chem.*, **2003**, 5(1), 44–46, doi.org/10.1039/b211238h
- ³⁰ A. Onufriev, D. Bashford, D. A. Case. Modification of the generalized Born model suitable for macromolecules, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104(15), 3712–3720, doi.org/10.1021/jp994072s
- ³¹ K. Wolinski, J. F. Hilton, P. Pulay. Efficient Implementation of the Gauge-Independent Atomic Orbital Method for NMR Chemical Shift Calculations, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 8251–8260, doi.org/10.1021/ja00179a005
- ³² J.J. Pesek, J.H. Frost. Decomposition of Thiazolidines in Acidic and Basic Solution, *Tetrahedron*, **1975**, 31(8), 907–913, doi.org/10.1016/0040-4020(75)80099-8
- ³³ C. Saiz, P. Wipf, E. Manta, G. Mahler. Reversible Thiazolidine Exchange: A New Reaction Suitable for Dynamic Combinatorial Chemistry, *Org. Lett.*, **2009**, 11(15), 3170–3173, doi.org/10.1021/ol901104a
- ³⁴ V. Martínez, V. Villamil, D. Duarte, C. Saiz, D. Davyt, C. Fontana, N. Veiga, Graciela Mahler. Preparation and Mechanistic Studies of 2-Substituted Bisthiazolidines by Imine Exchange, *Eur. J. Org. Chem.*, **2020**, 9, 1084–1092, doi.org/10.1002/ejoc.201901677
- ³⁵ Farmacopea Argentina 7° Ed. Vol. IV, pág. 391.
www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/farmacopea_vol_iv/files/assets/basic-html/toc.html
- ³⁶ Farmacopea Argentina 7° Ed. Vol. I, pág. 592.
www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_I/files/assets/basic-html/toc.html
- ³⁷ H. Jakubowski. Molecular Basis of Homocysteine Toxicity in Humans, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2004**, 61(4), 470–487, doi.org/10.1007/s00018-003-3204-7
- ³⁸ J. Garel, D. S. Tawfik. Mechanism of Hydrolysis and Aminolysis of Homocysteine Thiolactone, *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 4144 – 4152, doi.org/10.1002/chem.200501145.
- ³⁹ D. V. Ferraris, P. Majer, C. Ni, C. E. Slusher, R. Rais, Y. Wu, K. M. ozniak, J. Alt, C. Rojas, B. S. Slusher, T. Tsukamoto. δ -Thiolactones as Prodrugs of Thiol-Based Glutamate Carboxypeptidase II (GCP II) Inhibitors, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 243–247, doi.org/10.1021/jm401703a

⁴⁰ S-Y. Jiang, W-T. Hsieh, W-S. Chen, J-S. Liao, P-Y. Chiang, Y. A. Lin. Synthesis of Thiol-Containing Oligopeptides via Tandem Activation of γ -Thiolactones by Silver-DABCO Pair, *Asian J. Org. Chem.*, **2020**, 9(10), 1638–1649, doi.org/10.1002/ajoc.202000310.

⁴¹ P. Espeel, F. E. Du Prez. One-Pot Multi-Step Reactions Based on Thiolactone Chemistry: A Powerful Synthetic Tool in Polymer Science, *Eur. Polym. J.*, **2015**, 62, 247–272, doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.008.

Capítulo 6

Conclusiones Generales

6.1. Conclusiones Generales

En este trabajo de tesis, se trabajó en el diseño y preparación de compuestos que restauren la actividad antibiótica de los A β L, actuando como inhibidores de las M β Ls. Para ello se trabajó en la preparación de análogos de los heterociclos de 2-mercaptometil-tiazolidinas (2-MMT) y 2-mercaptometil-bistiazolidinas (2-MMBT).

Estos heterociclos fueron diseñados en base al conocimiento actual sobre las características comunes de unión e hidrólisis de penicilinas, que son compartidos por las diferentes M β L a pesar de sus diferencias estructurales.

6.1.1. Heterociclos 2-mercaptometil tiazolidinas

En el trabajo con 2-MMT se completó la caracterización de los diastereómeros *syn* de las tiazolidinas derivadas de penicilamina, que no habían podido ser aislados anteriormente. Utilizando Experimentación de alto rendimiento (HTE por sus siglas en inglés) se buscó optimizar la síntesis del enantiómero *anti* de la tiazolidina derivada de L-cisteína. Esto nos permitió introducirnos en una metodología de trabajo nueva para nuestro grupo, que se basa en la miniaturización y aceleración en la optimización de procesos. Con esta metodología se probaron 176 reacciones en concentraciones de los reactivos de 10 μ moles en un período de dos semanas. Estas reacciones incluyeron el screening de 12 disolventes, 32 catalizadores, 2 temperaturas y 2 tiempos de reacción. Por lo tanto, se realizó y analizó un gran número de reacciones en un período corto de tiempo y a microescala. Esto permitió ampliar el espacio químico estudiado para esta reacción utilizando procesos ambientalmente más amigables debido a la disminución de solventes y reactivos que se utilizaron, volviendo este proceso más eficaz y económico.

Se prepararon diez nuevos análogos de 2-MMT con distintas modificaciones, a nivel del C4 (\pm **5**, L-*anti*-**7**, L-*syn*-**7**, D-*anti*-**7**, D-*syn*-**7**), con la cadena homologada (L-*anti/syn*-**12** que resultó muy inestable) y con modificaciones a nivel de C2 (L-*anti/syn*-**14**, D-*anti/syn*-**14**, L-*syn*-**20** y L-*anti*-**22**) y. La estructura química de los análogos de 2-MMT obtenidos en este trabajo se describen en la Figura 1.

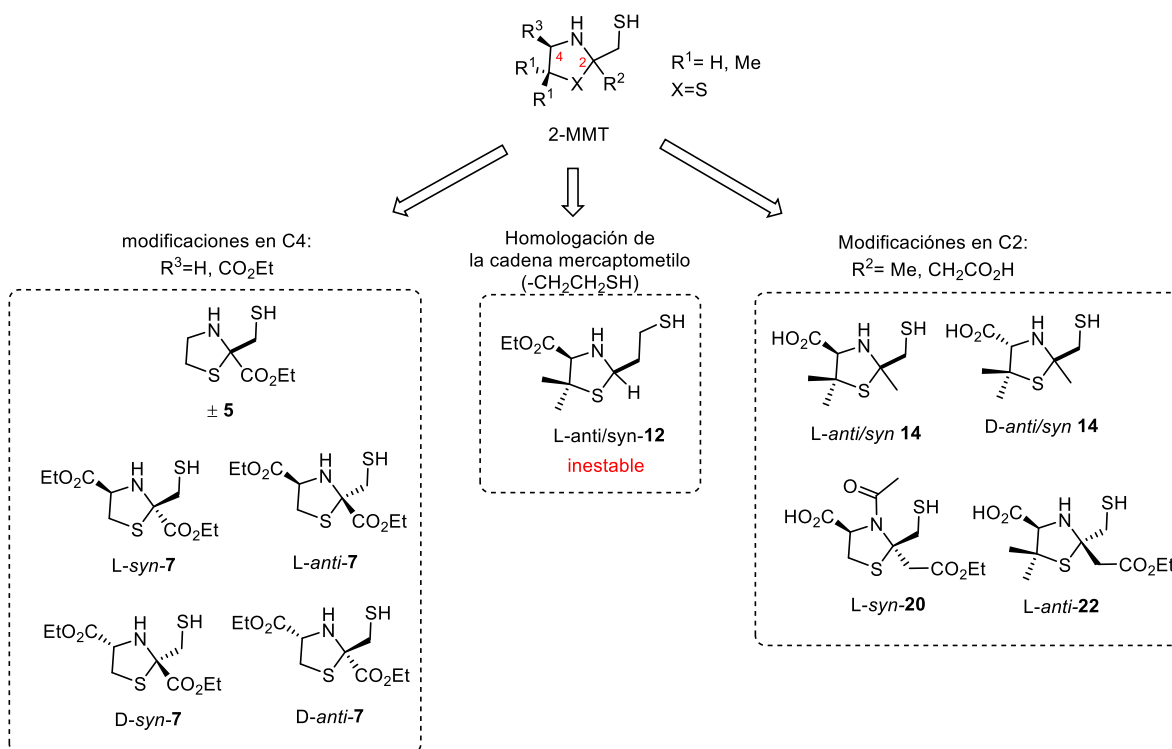


Figura 1. Estructura química de los análogos de 2-MMT obtenidos en este trabajo

Las modificaciones planteadas sobre la estructura de los heterociclos 4-carboxil tiazolidinas 2,2 disustituídas no resultaron sencillas de realizar. El requisito de mantener la cadena mercaptometilo en el C2, limitó el número de aldehídos y cetonas posibles para la ciclocondensación con los aminotioles. La desprotección del grupo tiol cuando se usó como material de partida α -mercaptocetonas con el tiol protegido resultó un paso clave y muy dificultoso en la obtención de los análogos con el tiol libre, sobre todo cuando se utilizó tritilo como grupo protector. La sustitución del S del anillo por un O para preparar análogos 2-mercapto oxazolidinas a partir de aminoalcoholes no fue posible. Probablemente porque los aminoalcoholes son menos reactivos que los aminotioles con el ditiano y la α -mercaptocetona utilizada y el cierre del anillo *5-endo-trig* con el enlace imina se ve desfavorecido. La homologación de la cadena mercaptometilo derivó en análogos muy inestables.

Las 2-MMT de referencia resultaron inhibidores competitivos de las tres subclases de M β Ls, con constantes de inhibición en el rango μM . Los análogos evaluados frente a NDM-1 (B1) y L1 (B3) también inhibieron ambas enzimas. El cambio del ácido carboxílico por un éster etílico en las 2-MMT derivadas de L y D cisteína no presentaron cambios

significativos en la potencia inhibitoria frente a NDM-1 y L1 en los diasterómeros *anti* respecto a la 2-MMT de referencia. Sin embargo, los diasterómeros *syn* disminuyeron entre 3 y 14 veces su potencia frente a L1. El análogo *syn* que presenta el nitrógeno NAc y el carboxilato homologado en C2, mantiene la potencia en NDM-1, pero disminuyó 2 veces la potencia en L1 y no presento inhibición frente a Sfh-1 (B2). Por lo tanto, entre los análogos preparados y evaluados no se encontró ninguno que mejorara la potencia inhibitoria de las 2-MMT de referencia. Las 2-MMT lograron restaurar la eficacia de los A β L en aislados clínicos que expresan M β L B1 y B3. Esto sumado a la falta de toxicidad que presentaron estos compuestos en células eucariotas, posiciona a las 2-MMT como estructuras muy prometedoras en el diseño de inhibidores de M β L.

Se obtuvieron las estructuras cristalinas de los complejos de las tiazolidinas L-*anti-2* y D-*syn-2* con las tres M β L de subclase B1 más importantes desde el punto de vista clínico (NDM-1, VIM-2 e IMP-1) y con Sfh-I (B2) y L1 (B3). La obtención de la estructura cristalina de estos complejos nos permitió comprender como es la unión de las 2-MMT con las enzimas B1, B2 y B3. Se observó que las 2-MMT presentan un patrón de unión similar en las tres enzimas, lo cual las diferencia de las 2-MMBT que exhiben múltiples y variados modos de unión a los sitios activos de las M β Ls. La unión de las 2-MMT implica la coordinación del tiol libre con el Zn(II) en el sitio activo y varias interacciones hidrofóbicas que estabilizan la unión de las 2-MMT con las enzimas. El grupo carboxilato en las 2-MMT no está involucrado fuertemente en las interacciones electrostáticas en el sitio activo. La cristalización de estos complejos y estudios teóricos *in silico* permitieron observar que las 2-MMT presentan una interacción S- π entre el azufre del anillo tiazolidina y residuos aromáticos conservados en el bucle L3 del sitio activo de las enzimas B1 (Trp87 en NDM-1 y VIM-2, Phe87 en IMP-1). Además, esta interacción se conserva en las enzimas B2 (Trp87 en Sfh-I) y B3 (Trp39 en L1). Sin embargo, esta interacción S- π no se observa con los biciclos tiazolidinas 2-MMBT. El descubrimiento de esta interacción S- π que jugaría un papel importante en la unión inhibidor enzima sobre todo en las enzimas B1, nos permitiría diseñar de manera racional nuevos inhibidores de M β L a partir de la estructura de 2-MMT.

6.1.2. Heterociclos 2-mercaptometil bistiazolidinas

Se desarrolló y describió una nueva metodología para introducir sustituyentes alquílicos y arílicos en la posición 2 del anillo de bistiazolidina utilizando una reacción de intercambio con aldehídos. Además, se estudió y caracterizó el mecanismo de intercambio por RMN y cálculos DFT, contribuyendo a una mejor comprensión del mismo. Mediante esta metodología se prepararon nuevos análogos con la cadena mercaptometilo homologada. Por lo tanto, es una metodología útil para preparar nuevos análogos con sustituciones diferentes de la cadena mercaptometilo original.

Se prepararon seis nuevos análogos de 2-MMBT, con modificaciones a nivel del C8 (\pm **27**), análogos con un anillo aromático fusionado en C7-C8 (\pm **40**, \pm **41**, \pm **42**) y análogos con la cadena mercaptometil homologada (L-**50**, \pm **51**). La estructura química de los análogos de 2-MMT obtenidos en este trabajo se describen en la Figura 2.

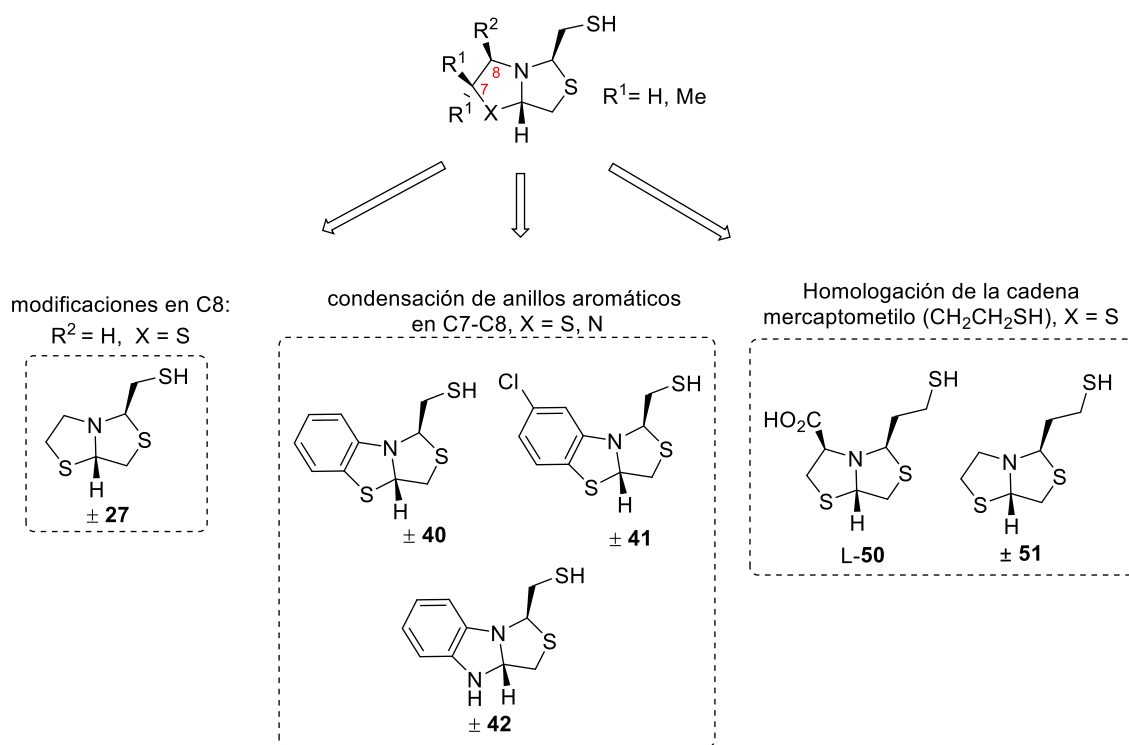


Figura 2. Estructura química de los análogos de 2-MMBT obtenidos en este trabajo

Intentos por preparar análogos de L-**24** con la cadena del ácido carboxílico en C8 homologada, no fueron exitosos debido principalmente a la dificultad de preparar la β^3 -cisteína necesaria para la ciclocondensación. Cuando se intentó preparar análogos

oxazolidin-tiazolidinas también con la cadena del ácido carboxílico utilizando β^3 -aminoalcoholes, tampoco se lograron preparar por ciclocondensación con el ditiano correspondiente.

Los análogos con la cadena mercaptometilo homologada L-50 y \pm 51 pudieron ser preparados mediante la metodología desarrollada para preparar 2-BT, pero nuevamente la desprotección del grupo tritilo resultó un paso clave. La desprotección usando HCl 0.1N/TFE/TIS arrojó mejores resultados frente a las condiciones de desprotección clásica usando TFA que había sido usada en la obtención de tiazolidinas.

Los seis análogos preparados fueron evaluados frente a M β Ls. La condensación de un anillo aromático al anillo bistiazolidina en C7-C8 mejoró la actividad, ya que los tres análogos obtenidos (\pm 40, \pm 41, \pm 42) presentaron una potencia inhibitoria de 2 a 70 veces mayor en todas las subclases de M β L, respecto a las bistiazolidinas de referencia L-24. Frente a las B1 el mejor inhibidor fue el análogo \pm 40 que no contiene sustituyentes en el anillo aromático en cambio en B3 (L1) el mejor inhibidor fue el análogo \pm 41 que tiene el anillo aromático sustituido por un cloro. La eliminación del carboxilato en C8, análogo \pm 27, mejoró entre 4 y 10 veces la potencia frente a las enzimas B1 y B3 en dónde la interacción inhibidor-enzima está dominada por el grupo tiol. Sin embargo, como era de esperarse disminuyó 10 veces la potencia frente a la subclase B2 dónde el carboxilato cumple una función más importante en la unión inhibidor-enzima. La homologación de la cadena mercaptometilo, análogos L-50, \pm 51, no resultó tan efectiva frente a NDM-1 (B1) y L1 (B3) ya que estos análogos aumentaron sólo entre 2 y 4 veces la potencia respecto a la bistiazolidina de referencia. Sin embargo, la homologación de esta cadena resultó muy negativa frente a Sfh-1 (B2). El análogo \pm 51, con la cadena mercaptometilo homologada y sin el carboxilato, disminuyó drásticamente la actividad en B2 (70 veces menor), mientras que el análogo L-50 perdió totalmente la actividad. Por lo tanto, los análogos con el anillo aromático fusionado en C7-C8 resultaron ser los mejores inhibidores y se posicionan como el punto de partida para el diseño y síntesis de nuevos inhibidores.

Además, a tres de los análogos (\pm 27, \pm 40 y \pm 42) se les midió la CMI frente aislados clínicos que expresaban M β L de la subclase B1. Todos lograron inhibir el crecimiento

bacteriano restaurando la acción de IMI, pero ninguno superó la inhibición de la bistiazolidina de referencia L-24. Esto pudo deberse a varios factores como problemas de solubilidad, para los análogos con el anillo aromático \pm 40 y \pm 42, o una baja penetración en el periplasma bacteriano.

6.1.3. Prodrogas

Se prepararon siete tioésteres como potenciales prodrogas de 2-MMBT, las δ -tiolactonas derivadas de L-Cys (**55a**, **55b** y **55c**) y derivadas de L-PNA (**56a** y **55c**), y derivados tioacetilados (L-57 y L-58). La estructura química de las prodrogas de 2-MMT obtenidas en este trabajo se describen en la Figura 3.

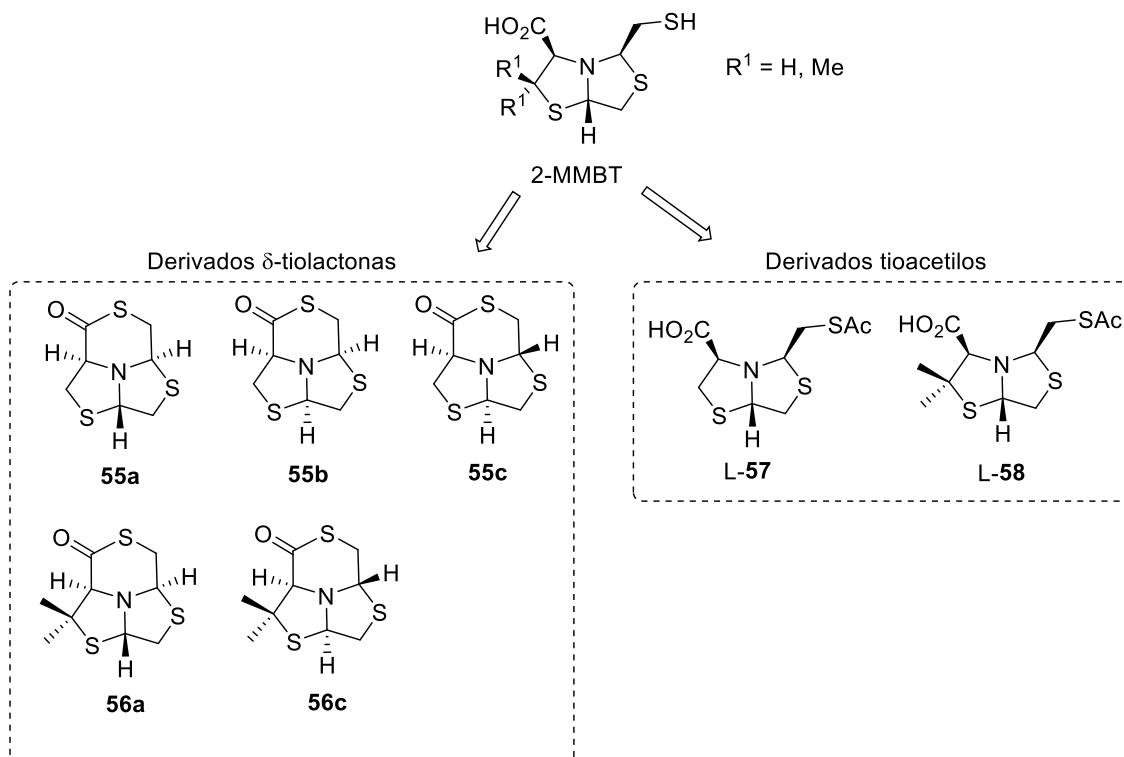


Figura 3. Estructura química de las prodrogas de 2-MMBT obtenidas en este trabajo

Las δ -tiolactonas fueron obtenidas mediante tioesterificación intramolecular de L-24 y L-25, aislándose un total de tres diasterómeros para los derivados de Cys y dos para los de PNA. Se observó para éstos compuestos que los diasterómeros que se obtenían dependía fuertemente de las condiciones de reacción utilizadas. Mediante estudios de difracción de Rayos X, NOESY-RMN y cálculos *ab initio* pudieron asignarse las diferentes configuraciones absolutas de las δ -tiolactonas aisladas.

El estudio de condiciones de isomerización para estos compuestos nos permitió identificar al $\text{In}(\text{OTf})_3$ como un buen catalizador para isomerizar totalmente la δ -tiolactona cinética **55a** en el carbono C5 y obtener su isómero **55b**. Esto nos permitiría obtener con mejor rendimiento **55b** ya que hasta ahora se había obtenido como un producto minoritario. También se realizó el estudio para optimizar la isomerización de **55a** al producto termodinámico **55c** en medio básico y si bien la reacción no fue completa se logró aumentar su proporción, por lo que resta aún optimizar su interconversión.

Se estudió la estabilidad química de las δ -tiolactonas **55b**, **55c** y el compuesto tioacetilado L-**57**, a pH de fluido gástrico 1.2 y a pH 7.4 a 37°C, para evaluar los mejores candidatos a prodrogas. Las δ -tiolactonas **55b** y **55c** a pesar de tener configuraciones absolutas distintas, en ambos pHs dieron como único producto de hidrólisis a la bistiazolidina de partida derivada de L-Cys (L-**24**). La δ -tiolactona **55b** fue la que presentó mayor estabilidad en ambos pH, en cambio **55c** se hidrolizó más rápidamente obteniéndose L-**24** en mayor proporción tanto a pH ácido como neutro. En cuanto al compuesto tioacetilado L-**57** a pesar de que presentó hidrólisis a pH gástrico fue el que se mantuvo intacto con un 20% de hidrólisis a una hora de incubación. A pH 7.4 no se hidrolizó, permaneciendo intacto por seis horas, por lo que se perfila como un buen candidato a prodroga.

Parte del trabajo de esta tesis dio lugar a la publicación en tres revista científicas arbitradas:

M. A. Rossi, V. Martinez, P. Hinchliffe, M.F. Mojica, V. Castillo, D. M. Moreno, R. Smith, B. Spellberg, G. L. Drusano, C. Banchio, R. A. Bonomo, J. Spencer, A. J. Vila, G. Mahler. 2-Mercaptomethyl-thiazolidines use conserved aromatic-S interactions to achieve broad-range inhibition of metallo- β -lactamases. *Chem. Sci.*, **2021**, 12, 2898-2908, doi.org/10.1002/ejoc.201901677

P. Hinchliffe, D. M. Moreno, M. A. Rossi, M. F. Mojica, V. Martínez, V. Villamil, B. Spellberg, G. L. Drusano, C. Banchio, G. Mahler, R. A. Bonomo, A. J. Vila, J. Spencer. 2-Mercaptomethyl Thiazolidines (MMTZs) Inhibit all Metallo- β -Lactamase classes by maintaining a conserved binding mode, *ACS Infect. Dis.* **2021**, 7, 9, 2697–2706, doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00194

V. Martínez, V. Villamil, D. Duarte, C. Saiz, D. Davyt, C. Fontana, N. Veiga, Graciela Mahler. Preparation and Mechanistic Studies of 2-Substituted Bisthiazolidines by Imine Exchange, *Eur. J. Org. Chem.*, **2020**, 9, 1084–1092, doi.org/10.1002/ejoc.201901677

Capítulo 7

Parte experimental

7.1 Consideraciones Generales:

- Todas las reacciones se realizaron a partir de reactivos comerciales y en disolventes destilados en el momento o disolventes anhidros. Los solventes anhidros fueron secados según lo descrito por Perrin *et al.*¹
- El seguimiento de las reacciones y columnas cromatográficas se hizo por cromatografía en capa fina (TLC) usando placas de 0.25 mm Sílica gel (SIL G/UV 254). La detección fue por luz UV ($\lambda=254\text{nm}$), mediante la inmersión o pulverización y posterior calentamiento de reveladores específicos irreversibles, o vapores de I_2 . La purificación de los crudos de reacción se realizó por cromatografía en columna, usando como fase estacionaria SiO_2 60 (40 μm). Los crudos obtenidos por extracción líquido-líquido se obtuvieron luego de concentrar a presión reducida la fase orgánica previo secado con Na_2SO_4 y filtrado.
- Los experimentos de RMN monodimensionales (^1H y ^{13}C) y bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC), fueron realizados en los equipos Bruker Avance Neo de 400 MHz. Todos los experimentos fueron realizados en CDCl_3 , en los casos que se utilizó otro solvente este será informado. Los desplazamientos químicos (δ) son expresados en ppm y referenciados a la señal del estándar interno tetrametilsilano (TMS). Las multiplicidades son indicadas como s (singulete), d (doblete), t (tripleto), c (cuarteto), m (multiplete), sa (singulete ancho).
- Los espectros de IR se realizaron en el espectrofotómetro FT-IR 8101A Shimadzu en film sobre pastilla de NaCl.
- Los espectros de masa de alta resolución (HRMS) fueron realizados en un equipo Xevo G2S Q-TOF (Waters Corp). Los espectros de baja resolución fueron realizados en el espectrómetro de impacto electrónico (MS-EI) GCMS Shimadzu QP 1100-EX. Los cromatogramas LCMS se realizaron en un equipo Shimadzu 8040.

- Las reacciones irradiadas por microondas se realizaron en el equipo CEM Discover, equipado con viales de 10mL.
- Las medidas de la actividad óptica de los compuestos quirales se realizaron en un polarímetro Jasco P-2000.
- Los estudios de estabilidad por HPLC se realizaron en dos equipos. Equipo Waters Alliance (Waters Corporation, MA, USA) equipado con un módulo de suministro de disolvente Waters 2695 y un detector PDA Waters 2669. Equipo Shimadzu con sistema de bomba binario LC-10 y detector UV de longitud de onda variable.

7.2. Procedimientos sintéticos

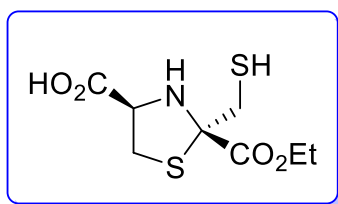
7.2.1. Procedimientos sintéticos para la preparación de Tiazolidinas

Metodología general para la preparación de 2-MMT:

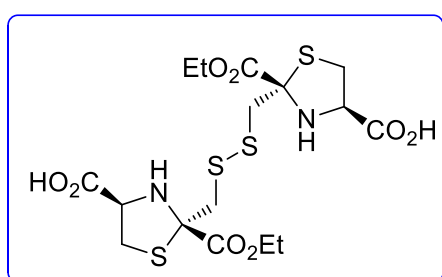
En un balón, bajo atmósfera de nitrógeno, se disuelve el aminotiol correspondiente (3 eq) en MeOH o EtOH seco. Se agrega el ditiano correspondiente (1 eq) y LiCl o ác. *p*-TsOH catalítico (5% molar). La reacción se lleva a reflujo por 2 h. Luego la mezcla de reacción se concentra a presión reducida, se agregan 15 mL H₂O y se extrae con AcOEt (3 x 30 mL). La fase orgánica se seca, filtra y concentra. Los residuos se purifican por cromatografía en columna.

(2S/R,4R) -4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil) tiazolidina (L-*anti*/*syn*-1)

Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de L-Cys y el ditiano **3**. El espectro de ¹H-RMN del crudo de reacción presentó una relación diastereomérica *anti:syn* (60:40). El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (29:70:1) para dar el compuesto L-*anti*-**1** (35%) y el producto secundario **4** (2%).

(2S,4R)-4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)tiazolidina (L-anti-1)

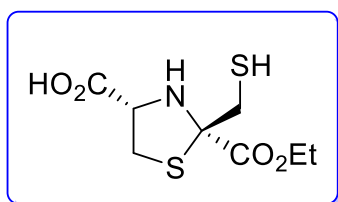
Sólido blanco: PF 99.1-101°C; $^1\text{H-RMN}$ δ 4.32 (m, 2H), 4.11 (dd, $J = 9.0, 6.2$ Hz, 1H), 3.43 (dd, $J = 10.7, 6.2$ Hz, 1H), 3.05 (m, 1H), 3.03 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 1.97 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ δ 174.1, 171.0, 79.3, 65.0, 62.9, 39.2, 33.6, 14.0; $[\alpha]^{21}_{\text{D}} = -94.12^\circ$ (c 2.6, AcOEt); HRMS calculado para $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 274.0184, valor hallado 274.0178; Pureza HPLC: 98.9%.

(2S,2'S,4R,4'R)-4-carboxil-2,2'-(metileno-disulfuro)bis(2-etoxicarbonil)tiazolidina (4)

Aceite color caramelo: $^1\text{H-RMN}$ (Acetona- d_6) δ 4.46 (m, 1H), 4.22 (ddd, $J = 14.1, 7.1, 1.4$ Hz, 2H), 3.74 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 3.58 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H), 3.31 (m, 1H), 3.20 (m, 1H), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 5H); $^{13}\text{C-RMN}$ δ 172.5, 171.7, 80.2, 67.4, 62.6, 50.2, 39.1, 14.4; HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_4$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 499,0337, valor hallado 499,0333.

(2S/R,4S) -4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil) tiazolidina (D-anti/syn-1)

Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de D-Cys y el ditiano **3**. El espectro de $^1\text{H-RMN}$ del crudo de reacción presentó una relación diasteromérica *anti:syn* 60:40. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (29:70:1) para dar el compuesto D-*anti*-1 (38%).

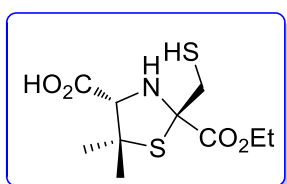
(2S,4R)-4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)tiazolidina (D-anti-1)

Aceite amarillo: Datos espectroscópicos idénticos a los obtenidos para L-*anti*-1; $[\alpha]^{21}_{\text{D}} = +90.35^\circ$ (c 1.2, AcOEt); HRMS calculado para $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}_2$ $[\text{MNa}]^+$ 274.0184, valor hallado 274.0178.

(2R/S,4R)-4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)-5-dimetil tiazolidina
(L-*anti*/*syn*-2)

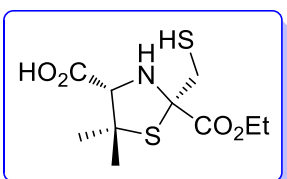
Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de L-PNA y el ditiano **3**. El espectro de ^1H -RMN del crudo de reacción presentó una relación diasterómerica *anti:syn* 60:40. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (29:70:1) para dar los compuestos L-*anti*-**2** (41%) y L-*syn*-**2** (46%).

(2S,4R)-4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)-5-dimetil tiazolidina (L-*anti*-**2**)



Aceite incoloro: ^1H -RMN δ 4.33 (m, 2H), 3.84 (s, 1H), 3.00 (m, 1H), 2.94 (m, 1H), 2.00 (sa, 1H), 1.62 (s, 2H), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.30 (s, 3H); ^{13}C -RMN δ 173.5, 171.3, 76.0, 72.5, 62.6, 60.7, 34.1, 26.5, 26.1, 14.0; $[\alpha]^{21}_{\text{D}} = -49.1^\circ$ (c 1.9, AcOEt); HRMS calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 302.0491, valor hallado 302.0490; Pureza HPLC: 95.2%

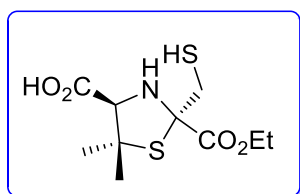
(2R,4R)-4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)-5-dimetil tiazolidina (L-*syn*-**2**)



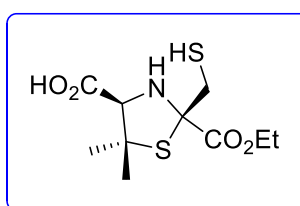
Aceite incoloro: ^1H -RMN δ 4.26(m, 3H), 3.25 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H), 3.11 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); ^{13}C -RMN δ 173.1, 171.3, 76.7, 73.3, 62.1, 59.4, 32.3, 28.1, 27.2, 14.0; $[\alpha]^{21}_{\text{D}} = -124.7^\circ$ (c 1.44, MeOH); HRMS calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO}_4\text{S}_2$ $[\text{M}+2\text{Na}]^+$ 324.0316, valor hallado 324,0314. Pureza HPLC: 95.1%

(2S/R,4S)-4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)-5-dimetil tiazolidina
(D-*anti*/*syn*-2)

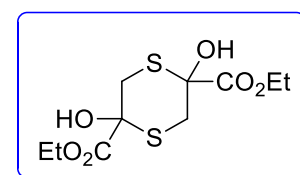
Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de D-PNA y el ditiano **3**. El espectro de ^1H -RMN del crudo de reacción presentó una relación diasteromérica *anti:syn* 60:40. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (29:70:1) para dar los compuestos D-*anti*-**2** (44%) y D-*syn*-**2** (28%).

(2R,4S)-4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)-5-dimetil tiazolidina (D-anti-2)

Aceite color caramelo: Datos espectroscópicos idénticos a los obtenidos para L-*anti*-2; $[\alpha]^{21}_D = +42.5^\circ$ (c 1.6, AcOEt); HRMS calculado para $C_{10}H_{17}NO_4S_2$, $[M+Na]^+$ 302.0491, valor hallado 302.0521; Pureza HPLC: 96.6%

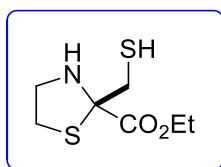
(2S,4S)-4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)-5-dimetil tiazolidina (D-syn-2)

Aceite color caramelo: Datos espectroscópicos idénticos a los obtenidos para L-*syn*-2; $[\alpha]^{21}_D = +129.5^\circ$ (c 1.7, MeOH); HRMS calculado para $C_{10}H_{16}NO_4S_2$ $[M+2Na]^+$ 324.0316, valor hallado 324,0314; Pureza HPLC: 95.6%

2,5-Dihidroxi-1,4-ditiano-2,5- dietil carboxilato (3)

En un balón se disolvió la sal de NaSH (11g, 0.20 mol) en MeOH (125 mL) a 0°C (solución 1). En otro balón se disolvió 3-bromo piruvato de etilo (14 g, 0.071 mol) en MeOH (125 mL) a -10°C (solución 2). Luego se agregó gota a gota la solución 1 sobre la

solución 2. Se agitó por 60 minutos. El precipitado que se formó se filtró por Büchner, se lavó con Et₂O (50mL), se secó a vacío y se obtuvo el compuesto **3** (7.8g, 71%) como un sólido blanco: ¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ 6.98 (s, 2H), 4.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.65 (d, *J* = 14.1Hz, 2H), 2.87 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); los datos espectroscópicos coinciden con lo reportado en bibliografía².

(2R/S) -Etil 2-(mercaptometil) tiazolidina-2-carboxilato (± 5)

Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de cisteamina. HCl y el ditiano **3**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (20:80) para dar el compuesto ± **5** (218 mg, 60%) como una mezcla inseparable con su producto de oxidación

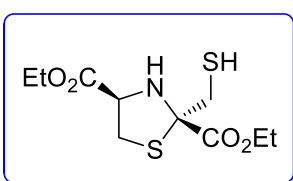
6 en una proporción 90:10, como un aceite incoloro: (compuesto ± **5**) : ¹H-RMN δ 4.29 (m, 2H), 3.64 (dd, *J* = 10.7, 4.8 Hz, 1H), , 3.06 (m, 2H), 2.99 (m, 3), 2.86 (m, 1H) 1.98 (dd, *J* = 9.7, 6.8 Hz, 1H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H); ¹³C-RMN δ 171.5, 80.5, 62.3, 52.1, 37.5, 32.9, 14.0; MS (EI) *m/z* (%) calculado para $C_7H_{13}NO_2S_2$ 207.04, valor hallado 206.95 (82.7), 101.5

(11.7). (compuesto **6**): $^1\text{H-RMN}$ δ 3.46 (m, 2H), $^{13}\text{C-RMN}$ δ 79.8, 79.4, 76.7, 62.4, 52.4, 50.4, 49.8.

(2S/2R, 4R) -2,4- Dietil carboxilato – (2-mercaptometil) tiazolidina (L-anti/syn-7)

Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de L-Cys etil ester. HCl y el ditiano **3**. El espectro de $^1\text{H-RMN}$ del crudo de reacción presentó una relación diastereomérica *anti:syn* 56:44. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (20:80) para dar los compuestos L-*anti*-**7** (42%) y L-*syn*-**7** (19%).

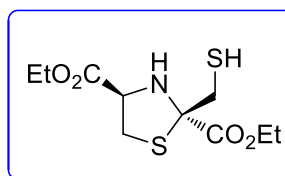
(2S,4R) 2,4- Dietil carboxilato – (2-mercaptometil) tiazolidina (L-anti-7)



Aceite color caramelo: $^1\text{H-RMN}$ δ 4.35 (m, 2H), 4.25 (m, 2H), 3.91 (m, 1H), 3.70 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, NH), 3.35 (dd, $J = 10.2, 5.6$ Hz, 1H), 2.98 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 2.96 (s, 1H), 2.87 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H), 2.01 (dd, $J = 9.5, 7.1$ Hz, 1H), 1.33 (c, $J = 7.3$ Hz, 6H); $^{13}\text{C-RMN}$ δ

170.7, 169.8, 79.4, 65.0, 62.6, 61.8, 40.0, 34.0, 14.1, 14.1; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -69.24^\circ$ (c 1.51, CHCl_3); HRMS calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}_2$ $[\text{MNa}]^+$ 302.0497, valor hallado 302.0494.

(2R,4R) 2,4- Dietil carboxilato – (2-mercaptometil) tiazolidina (L-syn-7)

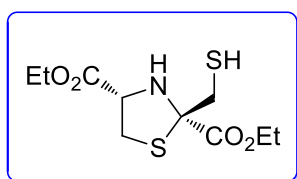


Aceite color caramelo: $^1\text{H RMN}$ δ 4.41 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.25 (m, 4H), 3.27 (m, 1H), 3.20 (m, 2H), 3.10 (m, 1H), 2.01 (dd, $J = 11.5, 5.8$ Hz, 1H), 1.32 (td, $J = 7.1, 1.4$ Hz, 6H); $^{13}\text{C RMN}$ δ 171.4,

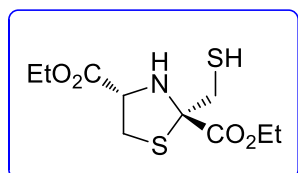
170.9, 80.0, 66.0, 62.3, 61.88, 38.9, 32.9, 14.1, 14.0; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -135.10^\circ$ (c 0.93, CHCl_3); HRMS calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}_2$ $[\text{MNa}]^+$ 302.0497, valor hallado 302.0494.

(2S/2R,4S)- 2,4- Dietil carboxilato –(2-mercaptometil) tiazolidina (D-anti/syn-7)

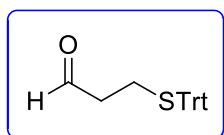
Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de D-Cys etil ester. HCl y el ditiano **3**. El espectro de $^1\text{H-RMN}$ del crudo de reacción presentó una relación diastereomérica *anti:syn* 56:44. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (20:80) para dar los compuestos D-*anti*-**7** (25%) y D-*syn*-**7** (21%).

(2R,4S)-2,4- Dietil carboxilato –(2-mercaptometil) tiazolidina (D-anti-7):

Aceite color caramelo: Datos espectroscópicos idénticos a los obtenidos para L-*anti*-7; $[\alpha]_D^{21} = +63.66^\circ$ (c 1.09, CHCl₃).

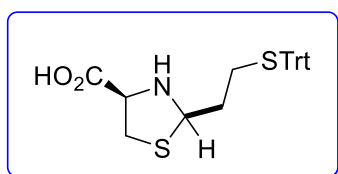
(2S,4S)-2,4- Dietil carboxilato –(2-mercaptometil) tiazolidina (D-syn-7)

Aceite caramelo: Datos espectroscópicos idénticos a los obtenidos para L-*syn*-7; $[\alpha]_D^{21} = +174.97^\circ$ (c 0.26, CHCl₃).

3-(trilitio) propanal (8)

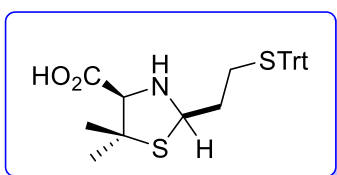
En un balón se disolvió Acroleína dietilacetal (5.85 mL, 38.4 mmol) y ácido camporsulfónico (297 mg, 1.27mmol) en H₂O (1.4 mL), la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos.

Luego se destiló entre 48-60°C y se recogió acroleína (1.71 g, 30.5 mmol). A una solución de TrtSH (4.28 g, 14.4 mmol) en DCM (80 mL) se agregó acroleína (1.21 g, 21.7 mmol) y trietilamina (3.03 mL, 21.7 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 1 hora. La reacción se concentró y el residuo se purificó usando AcOEt:Hex (15:85), para dar el compuesto **8** (6.49 g, 90%) como un sólido blanco: ¹H-RMN δ 9.55 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.42 (m, 6H), 7.29 (m, 5H), 7.22(m, 4H), 2.46 (td, *J* = 6.9, 1.1 Hz, 2H), 2.36 (tt, *J* = 6.7, 1.2 Hz, 2H); los datos espectroscópicos coinciden con lo reportado en bibliografía³.

(2R/S,4R)-4- Carboxil- 2-(2-(trilitio)etil)tiazolidina (L-anti/syn-9)

Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de L-Cys y el aldehído **8**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto L-*anti/syn*-9 (123 mg, 31%) como un

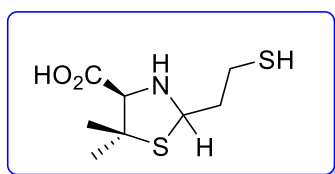
aceite color caramelo: ¹H-RMN (*anti*) δ 4.63 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.15 (t, *J* = 9.8 Hz, 1H), 3.16 (m, 3H), 3.04 (m, 1H), 2.23 (m, 2H); (*syn*) δ 4.48 (t, *J* = 5.3Hz, 1H), 3.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H); ¹³C-RMN (*anti*) δ 173.2, 144.3, 129.6, 127.9, 126.7, 66.8, 66.1, 63.6, 34.2, 35.4, 29.4; (*syn*) 66.9, 64.8

(2R/S,4R)-4-Carboxil-5,5-dimetil-2-(2-(trilitio)etil)tiiazolidina (L-*anti/syn*-10)

Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de L-PNA y el aldehído **8**.

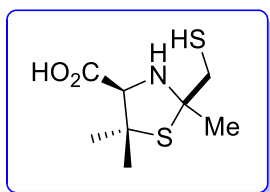
El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (40:60:0.1) para dar el compuesto L-*anti/syn*-**10** (83mg, 59%) con una

relación *anti:syn* 60:40, como un aceite color caramelo: $^1\text{H-RMN}$: (*anti*) δ 7.39 (m, 6H), 7.26 (m, 5H), 7.18 (m, 4H), 4.53 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 3.62 (s, 1H), 2.28 (dd, $J = 15.7, 8.1$ Hz, 2H), 1.79 (m, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.22 (s, 3H); (*syn*) δ 7.39 (m, 6H), 7.26 (m, 5H), 7.18 (m, 4H), 4.63 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.70 (s, 1H), 2.28 (dd, $J = 15.7, 8.1$ Hz, 1H), 1.89 (m, 1H), 1.61 (m, 2H), 1.57 (s, 3H), 1.27 (s, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ (*anti*) δ 171.4, 144.6, 129.6, 128.0, 126.7, 73.5, 67.1, 64.7, 56.8, 35.3, 29.4, 29.3, 26.9 (*syn*) δ 171.0, 144.5, 129.1, 128.2, 127.8, 72.0, 67.0, 64.1, 56.7, 36.0, 29.3, 29.1, 26.8

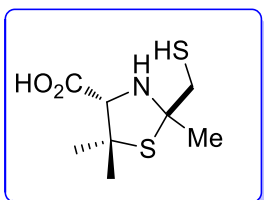
(2R/S,4R)-4-Carboxil-5,5-dimetil-2-(2-mercaptoetil)tiiazolidina (L-*anti/syn*-12)

En un balón se colocó el compuesto L-*anti/syn*-**10** (75 mg, 0,16 mmol), y se agregó una solución de 5%TFA:5%TIS en DCM (15 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente por 15 min. A la mezcla de reacción se le agregó MeOH (20

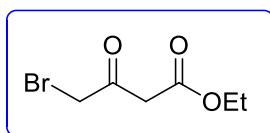
mL) y se concentró. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto L-*anti/syn*-**12** (19mg, 53%, inestable) con una relación *anti:syn* 60:40, como un aceite color amarillo: $^1\text{H-RMN}$ (*anti*) δ 4.87 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 3.80 (s, 1H), 2.67 (m, 2H), 2.33 (m, 1H), 2.08 (m, 1H), 1.69 (s, 3H), 1.38 (s, 3H); (*syn*) δ 4.99 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.97 (s, 1H), 2.67 (m, 2H), 2.33 (m, 1H), 2.08 (m, 1H), 1.68 (s, 3H), 1.42 (s, 3H); $^{13}\text{C-RMN}^*$ (*anti*) δ 170.9, 73.4, 63.2, 56.1, 39.3, 28.9, 28.2, 21.4; (*syn*) δ 170.0, 71.9, 62.2, 55.3, 39.3, 27.4, 25.8, 21.4 (*) Los valores de ^{13}C de ambos diastereómeros fueron obtenidos por HSQC y HMBC porque el producto es inestable en solución, y no resistió el tiempo del experimento de $^{13}\text{C-RMN}$.

(2R/S,4R)-4-Carboxil-2-(mercaptometil)-2,5,5-trimetiltiazolidina (L-anti/syn-14)

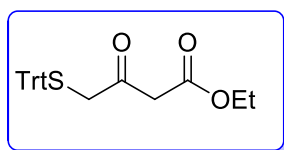
Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de L-PNA y el ditiano **13**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (29:70:1) para dar el compuesto L-*anti/syn*-**14** (219 mg, 59%) con una relación *anti:syn* 60:40, como un aceite amarillo: ^1H RMN (*anti*) δ 4.06 (s, 1H), 3.03 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H), 2.82 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H), 1.70 (s, 6H), 1.36 (s, 3H); (*syn*) δ 3.95 (s, 1H), 2.95 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 2.76 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 1.75 (s, 3H), 1.63 (s, 4H), 1.33 (s, 3H); ^{13}C RMN (*anti*) δ 172.2, 75.5, 72.1, 59.8, 36.0, 31.6, 29.0, 27.5; (*syn*) δ 172.5, 76.7, 72.5, 59.9, 38.3, 28.4, 28.2, 27.7; HRMS calculada para $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 222,0622, valor hallado 222,0636.

(2R/S,4S)-4-Carboxil-2-(mercaptometil)-2,5,5-trimetiltiazolidina (D-anti/syn-14)

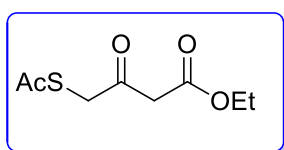
Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de D-PNA y el ditiano **13**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (39:60:1) para dar el compuesto D-*anti/syn*-**14** (282 mg, 76%) con una relación *anti:syn* 60:40, como un aceite caramelo: Datos espectroscópicos idénticos a los obtenidos para L-*anti/syn*-**14**.

Bromo acetoacetato de etilo (16)

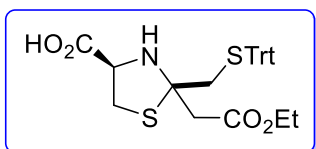
En un balón bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió acetoacetato de etilo **15** (2.0 g, 15.4 mmol) en Et_2O seco (5 mL). En baño de hielo se agregó gota a gota Br_2 (2.95 g, 18.44 mmol) por un período de una hora. La reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. El solvente se concentró a presión reducida, se agregó una solución saturada de NaHCO_3 (30 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (10:90) para dar el compuesto **16** (2.4g, 76%) como un aceite color marrón: ^1H -RMN δ 4.22 (m, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.71 (s, 2H), 1.30 (m, 3H); los datos espectroscópicos coinciden con lo reportado en bibliografía⁴.

4-Tiotrifetilmetano acetoacetato de etilo (17)

En un balón bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió el trifetil metanotiol (379 mg, 1.4 mmol) en DCM seco (5 mL). Se agregó bromo acetoacetato de etilo **16** (285 mg, 1.37 mmol) gota a gota con una jeringa y se dejó agitando a temperatura ambiente 4 horas. El solvente se concentró a presión reducida, se agregó AcOEt (25 mL) y se lavó con H₂O (3 x 10 mL), solución saturada de ácido cítrico (3 x 10 mL), solución saturada de NaHCO₃ (3 x 10 mL) y Brine (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (10:90) para dar el compuesto **17** (264 mg, 65%) como un aceite incoloro: ¹H RMN δ 7.42 (m, 7H), 7.28 (m, 5H), 7.25 (m, 3H), 4.10 (c, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.24 (s, 1H), 3.18 (s, 1H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H); ¹³C RMN δ 198.5, 166.8, 144.0, 129.5, 128.2, 127.0, 67.4, 61.4, 47.3, 42.7, 14.0.

4-Tioacetil acetoacetato de etilo (18)

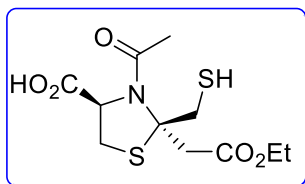
En un balón bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió bromoacetoacetato de etilo **16** (1 g, 4.8 mmol) en acetona seca (5 mL). En baño de hielo se agregó tioacetato de potasio (709 mg, 6.2 mmol) y se agitó por 2 horas. Se agregó H₂O (10 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (4 x 30 mL), la fase orgánica se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (20:80) para dar el compuesto **18** (860 mg, 88%) como un aceite marrón: ¹H RMN δ 4.21 (c, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.59 (s, 2H), 2.40 (s, 3H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

(2S/R,4R)- 4-Carboxi-2-(etoxi etil ester)-2-((trilitio)metil) tiazolidina (L-anti/syn-19)

Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de L-Cys y la α-mercaptocetona **17**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (20:80:1) para dar el compuesto L-anti/syn-**19** (68mg, 56%) con una relación anti:syn 60:40, como un aceite caramelo: ¹H RMN: (*anti*) δ 7.46 (m, 7H), 7.32 (m, 5H), 7.24 (m, 3H), 4.13 (m, 2H), 3.85 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.22 (m, 1H), 3.16 (m, 1H), 2.75 (m, 3H), 2.53 (dd, *J* = 32.0, 14.1 Hz, 1H), 1.26 (m, 3H); (*syn*) δ 7.46 (m, 7H), 7.32 (m, 5H), 7.24 (m, 3H), 4.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.13 (m, 2H), 3.31 (m, 1H); ¹³C-

RMN (*anti*) δ 174.3, 170.2, 144.1, 129.5, 128.1, 127.0, 77.2, 67.1, 64.3, 61.3, 43.5, 38.5, 43.2, 29.6 ; (*syn*) δ 173.4, 129.1, 128.1, 126.9, 64.9, 38.3.

(2R,4R)-4-Carboxil-N-acetyl-2-(2-etoxi-2-oxoetil)-2-mercaptometil) tiazolidina (L-*syn*-20)



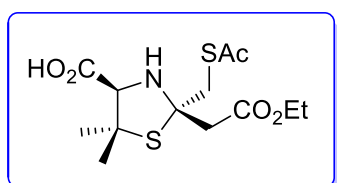
Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de L-Cys y la α -mercaptocetona **18**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (29:70:1) para dar el compuesto L-*syn*-**20** (35

mg, 23%) como un aceite caramelo: $^1\text{H-RMN}$ δ 4.99 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.17 (m, 2H), 3.75 (m, 3H), 3.34 (dd, $J = 13.1, 4.0$ Hz, 2H), 3.27 (dd, $J = 32.0, 10.4$ Hz, 1H), 2.19 (d, $J = 2.9$ Hz, 3H), 1.65 (m, 1H), 1.28 (dt, $J = 11.1, 7.2$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ δ 173.4, 171.5, 170.1, 77.9, 66.4, 61.2, 43.0, 34.3, 32.7, 25.2, 14.1.

(2S/2R,4R)-2-(Metil-tioacetil)-2-(2-etil-carboxietilester)-5,5-dimetiltiazolidina (L-*anti*/*syn*-21)

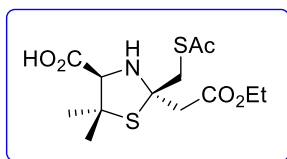
Se preparó siguiendo la metodología general para la preparación de 2-MMT, partiendo de L-PNA y la α -mercaptocetona **18** en DCM. El espectro de $^1\text{H-RMN}$ del crudo de reacción presentó una relación diastérica *anti:syn* 75:25. El residuo se purificó usando DCM:AcOEt (80:20), para dar los compuestos L-*anti*-**21** (29%) y L-*syn*-**21** (6%).

(2S,4R)-2-(Metil-tioacetil)-2-(2-etil-carboxietilester)-5,5-dimetiltiazolidina (L-*anti*-21)

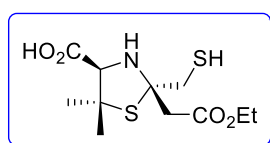


Aceite caramelo: $^1\text{H RMN}$ δ 4.17 (m, 2H), 4.01 (s, 1H), 3.40 (dd, $J = 81.2, 14.2$ Hz, 2H), 2.80 (dd, $J = 56.4, 15.2$ Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.26 (s, 3H); $^{13}\text{C RMN}$ δ 194.9, 174.1, 170.7, 77.2, 76.3, 72.0, 61.4, 61.1,

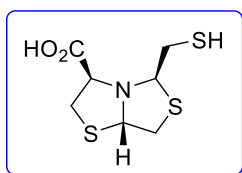
41.3, 30.5, 28.8, 26.9, 14.1; HRMS calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}_5\text{S}_2$ $[\text{M}+2\text{Na}]^+$ 380.0578, valor hallado 380.0579.

(2R,4R)-2-(Metil-tioacetil)-2-(2-etil-carboxietilester)-5,5-dimetiltiazolidina (L-syn-21)

Aceite caramelo: ^1H RMN δ 4.16 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.90 (s, 1H), 3.73 (s, 2H), 3.00 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 2.86 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 2.41 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.28 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); ^{13}C RMN δ 196.2, 172.4, 170.0, 75.2, 72.2, 60.8, 59.5, 45.7, 39.3, 30.5, 27.5, 27.3, 14.1; HRMS calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}_5\text{S}_2$ $[\text{M}+2\text{Na}]^+$ 380.0578, valor hallado 380.0565.

(2S,4R)-4-Carboxil-2-(2-etil-carboxietilester)-2-(mercaptometil)-5,5-dimetiltiazolidina (L-anti-22):

En un balón se disolvió el compuesto L-*anti*-21 (82 mg, 0.24 mmol) en MeOH (2 mL) y buffer fosfato pH 8 (20 mL). Se agregó Cisteamina.HCl (111 mg, 0.98 mmol) y se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se ajustó el pH de la mezcla de reacción con HCl 6M y se llevó a pH 3 para luego extraer con AcOEt (3 x 20 mL). La fase orgánica se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó usando DCM:AcOEt:AcOH (80:20:0.1) para dar el compuesto L-*anti*-22 (17 mg, 24%) como un aceite caramelo: ^1H RMN δ 4.18 (m, 2H), 3.87 (s, 1H), 3.07 (dd, $J = 14.6, 4.1$ Hz, 1H), 2.87 (dd, $J = 80.3, 14.6$ Hz, 2H), 1.65 (s, 3H), 1.30 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.26 (s, 3H); ^{13}C RMN δ 173.9, 171.2, 72.1, 61.3, 61.01, 41.4, 37.8, 28.9, 27.1, 14.3; $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -25.8^\circ$ (c 0.305, CHCl_3); HRMS calculada para $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 316.0653, valor hallado 316.0653.

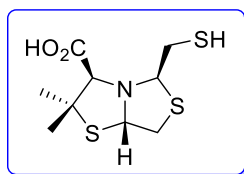
7.2.2. Procedimientos sintéticos para la preparación de Bistiazolidinas**(2R,5S,8R)-8-Carboxil-2-mercaptometil-1-aza-3,6-ditiobicyclo [3.3.0]octano (L-24):**

En un balón se disolvió L-Cys (1 g, 8.3 mmol) en EtOH (20 mL). Se agregó 2,5-dihidroxi-1,4-ditiano **26** y ác. *p*-TsOH catalítico (10% Molar). La mezcla de reacción se calentó a reflujo por 2hs. Luego se concentró y se agregó 15 mL H_2O y se extrajo con AcOEt (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto L-24 (1.3 g, 65 %) como un sólido blanco: ^1H RMN δ 5.05 (dd, $J = 5.8, 4.2$ Hz, 1H), 4.32 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.25 (dd, $J = 7.1, 3.3$ Hz, 1H), 3.55 (dd, $J = 12.0, 5.8$ Hz, 1H), 3.43 (dd, $J = 11.4, 3.3$ Hz, 1H), 3.33 (dd, $J = 11.4, 7.1$ Hz, 1H), 3.11 (dd,

$J = 12.0, 4.2$ Hz, 1H), 2.81 (dd, $J = 8.5, 6.9$ Hz, 2H), 1.86 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H, SH); ^{13}C RMN δ 172.1, 75.6, 74.5, 71.5, 39.2, 34.3, 34.0⁵.

(2R,5S,8R)-8-Carboxil-7-dimetil-2-mercaptometil-1-aza-3,6-ditiobencilo[3.3.0]octano

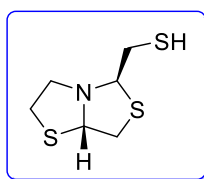
(L-25).



Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación L-24, a partir de L-PNA y el ditiano 26. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto L-25 (1.58 g, 89%) como un sólido blanco: ^1H RMN δ 4.98 (dd, $J =$

6.6, 5.4 Hz, 1H), 3.80 (s, 1H), 4.31 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.43 (dd, $J = 11.7, 6.6$ Hz, 1H), 3.06 (dd, $J = 11.7, 5.4$ Hz, 1H), 1.89 (t, $J = 8.7$ Hz, 1HSH), 2.81 (m, 2H), 1.62 (s, 3H), 1.52 (s, 3H); ^{13}C RMN δ 174.6, 77.0, 70.5, 70.1, 58.6, 40.5, 33.9, 32.9, 25.6⁵.

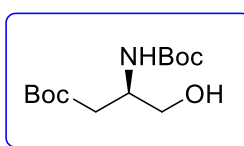
(2RS,5SR)-2-Mercaptometil-1-aza-3,6-ditiobencilo[3.3.0]octano (\pm 27)



En un balón se disolvió cisteamina.HCl (1.0 g, 8.8 mmol) en buffer acetato pH 5 (20 mL). Se agregó el ditiano 26 (1.61 g, 10.56 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo por 2 horas. Se extrajo con AcOEt (3 x 30mL). La fase orgánica se secó, filtró y concentró. El residuo

se purificó usando AcOEt:Hex (20:80) para dar el producto \pm 27 (1.26 g, 74 %) con una relación *syn:anti* (90:10) como un aceite incoloro: ^1H RMN (*syn*) δ 4.97 (dd, $J = 5.2, 3.7$ Hz, 1H), 4.24 (dd, $J = 7.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.54 (ddd, $J = 11.6, 5.2, 0.5$ Hz, 1H), 3.48 (ddd, $J = 11.5, 5.7, 4.8$ Hz, 1H), 3.21 (ddd, $J = 11.5, 7.2, 6.6$ Hz, 1H), 3.12 (m, 1H), 3.08 (m, 2H), 2.82 (ddd, $J = 13.6, 7.6, 7.0$ Hz, 1H), 2.65 (ddd, $J = 13.6, 9.1, 6.0$ Hz, 1H), 1.84 (dd, $J = 9.1, 7.6$ Hz, 1H); ^{13}C RMN (*syn*) δ 74.5, 73.2, 57.1, 38.4, 33.5, 31.8. Las propiedades espectroscópicas coinciden con lo descrito en literatura, dónde fue reportado erróneamente como *anti*⁶.

Tert-butil 3-((tert-butoxicarbonil)amino)-4-hidroxitanoato (28)

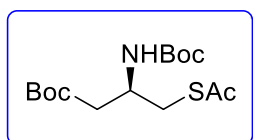


En un balón bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió Boc-Asp(OtBu)-OSu (1.0 g, 2.59 mmol) en THF seco (25 mL). La mezcla se llevó a 0°C y se agregó NaBH_4 (245 mg, 6.5 mmol) y se agitó por

10 min. Luego la mezcla de reacción se agitó a T.A por 4h. La mezcla se volvió a llevar a 0°C y se agregó una solución H_2O :Brine 1:1 y ácido cítrico 0.5M (20 mL). Se extrajo con

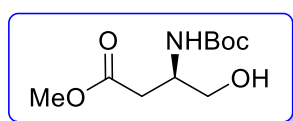
AcOEt (3 x 30 mL). La fase orgánica se lavó con una solución de NaHCO₃ 5% (20 mL) y Brine (20 mL), se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (40:60) para dar el compuesto **28** (680mg, 95%) como un aceite incoloro: ¹H RMN δ 5.24 (sa, 1H, NH), 3.96 (m, 1H), 3.68 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.79 (sa, 1H, OH), 2.52 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.44 (s, 9H); ¹³C RMN δ 171.3, 156.1, 81.5, 79.9, 65.0, 49.8, 37.6, 28.5, 28.2.

Tert-butil 4-(tioacetilo)-3-((tert-butoxicarbonil)amino)butanoato (**30**)



En un balón bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió **28** (660 mg, 2.39 mmol) en piridina (3 mL). La mezcla se llevó a 0°C y se agregó con bomba de jeringa una solución de TsCl (594 mg, 3.12 mmol) en piridina (3 mL) por un período de 5 minutos. La mezcla de reacción se agitó por 2h a T.A y luego se concentró. El residuo se volcó en H₂O (70 mL) y se extrajo con AcOEt (4 x 30 mL). La fase orgánica se lavó con HCl 5% (20 mL), H₂O (15 mL) y brine (15 mL), se secó, filtró y concentró. Bajo atmosfera de N₂ se disolvió el crudo anterior sin purificar en DMF (8 mL). Se agregó AcSK (687 mg, 6 mmol) y se agitó a T.A por 20 h. Se extrajo con AcOEt (4 x 40 mL) y la fase orgánica se lavó con HCl 5% (20mL), H₂O (20 mL), solución saturada de NaHCO₃ (20mL), Brine (20mL), luego se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (20:80) para dar el compuesto **30** (50 mg, 6%) como un aceite amarillento: ¹H RMN 4.15 (m, 1H), 3.13 (m, 2H), 2.49 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.46 (s, 9H). Se recuperó el material de partida **28** (420 mg, 63%).

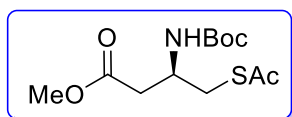
Metil 3-((tert-butoxicarbonil)amino)-4-hidroxi-butanoato (**33**)



En un balón bajo atmósfera de nitrógeno, se suspendió L-β³-serina (1.0 g, 8.4 mmol) en MeOH seco (25 mL). La mezcla se llevó a 0°C y se agregó SOCl₂ (1.5 g, 12.59 mmol) y se agitó a T.A por 12 h. Luego se concentró y el residuo conteniendo el intermedio **32** se disolvió bajo atmósfera de nitrógeno en THF seco (20 mL). La mezcla se llevó a 0°C y se agregó Et₃N (3.35 mL, 24.04 mmol) y Boc₂O (2.9 g, 13.2 mmol) y se agitó por 15 min. Luego la mezcla de reacción se agitó a T.A por 12 h. El disolvente se concentró y el residuo se volcó en una solución saturada de NaHCO₃ (20 mL) y se extrajo con AcOEt (4 x 30 mL). La fase orgánica se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (60:40) para dar el compuesto **33** (560 mg, 29%) como un aceite incoloro y el producto secundario **34** (340 mg, 20%) como un aceite color amarillo: (Compuesto **33**): ¹H RMN δ 5.28 (sa, 1H,

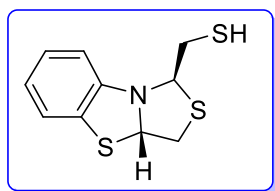
NH), 4.01 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.69 (m, 2H), 2.92 (sa, 1H, OH), 2.64 (d, $J = 6.0\text{Hz}$, 2H), 1.44 (s, 9H); ^{13}C RMN δ 172.4, 156.0, 79.9, 64.5, 52.0, 51.9, 49.5, 36.0, 28.4. (Compuesto **34**): ^1H RMN δ 4.90 (as, 1H, NH), 4.50 (m, 3H), 4.21 (dd, $J = 6.9\text{Hz}$, 1H), 2.84 (dd, $J = 7.7, 17.9$ Hz, 1H), 2.45 (dd, $J = 3.9, 17.9$ Hz, 1H), 1.45 (s, 9H); ^{13}C RMN δ 175.2, 155.2, 80.6, 73.6, 47.7, 35.0, 28.20.

Metil 4-(tioacetilo)-3-((tert-butoxicarbonil)amino)butanoato (**36**)



En un balón bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió **33** (560 mg, 2.44 mmol) en piridina (3 mL). La mezcla se llevó a 0°C y se agregó con bomba de jeringa una solución de TsCl (560 mg, 2.93 mmol) en piridina (3 mL) por un período de 5 minutos. La mezcla de reacción se agitó a T.A por 12 h y luego se concentró. El residuo se volcó en H_2O (20 mL), se extrajo con AcOEt (4 x 35 mL). La fase orgánica se lavó con HCl 5% (20 mL), H_2O (20 mL), Brine (20 mL), se secó, filtró y concentró. Bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió el crudo de reacción anterior conteniendo el compuesto **35** en DMF (5 mL). A 0°C se agregó AcSK (459 mg, 4.02 mmol) y se agitó a T.A. por 23 horas. Se agregó una solución H_2O :Brine 1:1 (20 mL) y se extrajo con AcOEt (4 x 30 mL). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaHCO_3 (10 mL), H_2O (10 mL), HCl 5% (10 mL), H_2O (10 mL), Brine (10 mL), se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (20:80) para dar el compuesto **36** (190 mg, 22%) como un aceite incoloro: ^1H RMN δ 5.13 (sa, 1H, NH), 4.07 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.14 (m, 2H), 2.59 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.43 (s, 9H); ^{13}C RMN δ 195.6, 171.7, 155.3, 79.8, 52.0, 47.7, 37.8, 32.9, 30.7, 28.5.

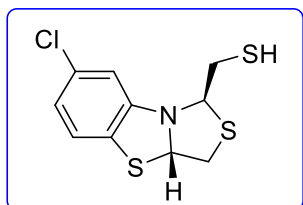
((1R,3aS)-3,3a-Dihidro-1H-benzo[d]tiazol[4,3-b]tiazol-1-yl)metanotiol (\pm **40**)



En un balón se disolvió 2-aminotiofenol **37** (500 mg, 4.59 mmol) en EtOH (15 mL). Se agregó el ditiano **26** y ác. *p*-TsOH (5% molar) y se calentó a reflujo con agitación por 2 h. El solvente se concentró, el residuo se volcó en H_2O (20 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (10:90) para dar el compuesto \pm *syn* **40** (489 mg, 44%) como un aceite incoloro: ^1H RMN δ 7.12 (ddd, $J = 7.6, 1.3, 0.4$ Hz, 1H), 7.09 (ddd, $J = 7.9, 7.4, 1.1$ Hz, 1H), 6.88 (dt, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 1H), 6.86 (ddd, $J = 8.0, 1.1, 0.6$ Hz, 1H), 5.18 (dd, $J = 9.0, 4.8$ Hz, 1H), 5.11 (dd, $J = 9.9, 5.3$ Hz, 1H), 3.22 (dd, $J = 10.6, 5.3$ Hz, 1H), 2.98 (ddd, $J = 13.8, 9.0, 6.2$ Hz, 1H),

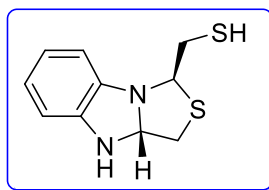
2.93 (dd, $J = 14.8, 9.5$ Hz, 1H), 2.72 (ddd, $J = 13.8, 10.8, 4.8$ Hz), 1.90 (dd, $J = 10.8, 6.3$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 145.3, 126.3, 124.6, 123.1, 122.2, 111.0, 70.5, 70.3, 40.0, 33.5; HRMS (ESI) calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NS}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 242.0132, valor hallado 242.0119.

((1R,3aS)-7-Cloro-3,3a-dihidro-1H-benzo[d]tiazol[4,3-b]tiazol-1-yl)metanotiol
(\pm **41**)



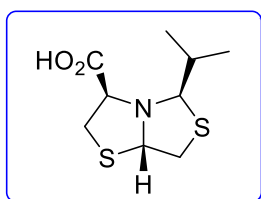
Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de \pm **40**, a partir de 4-cloro-2-aminotiofenol **38** y el ditiano **26**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (70:29:1) para dar el compuesto \pm *syn* **41** (140 mg, 41%) como un aceite color amarillo: ^1H RMN δ ppm 7.00 (m, 1H), 6.86 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 5.14 (dd, $J = 10.0, 5.3$ Hz, 1H), 5.10 (dd, $J = 9.0, 4.8$ Hz, 1H), 3.23 (dd, $J = 10.7, 5.3$ Hz, 1H), 2.94 (m, 2H), 2.72 (m, 1H), 1.89 (dd, $J = 10.8, 6.5$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ ppm 146.7, 132.0, 123.5, 122.0, 111.3, 71.1, 70.0, 39.9, 33.3.

((1R,3aR)-3a,4-Dihidro-1H,3H-benzo[4,5]imidazol[1,2-c]tiazol-1-yl)metanotiol (\pm **42**)



Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de \pm **40**, a partir de 1,2-fenildiamina **39** y el ditiano **26**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (20:80) para dar el compuesto \pm *syn* **42** (120mg, 53%) como un aceite color caramelo: ^1H RMN δ ppm 6.81 (m, 3H), 6.70 (dd, $J = 6.4, 2.4$ Hz, 1H), 5.34 (dd, $J = 7.5, 5.4$ Hz, 1H), 4.97 (dd, $J = 9.0, 4.6$ Hz, 1H), 3.15 (dd, $J = 10.6, 5.4$ Hz, 1H), 2.90 (ddd, $J = 13.7, 9.0, 6.3$ Hz, 1H), 2.82 (dd, $J = 10.6, 7.5$ Hz, 1H), 2.69 (ddd, $J = 13.6, 10.6, 4.7$ Hz, 1H), 1.90 (dd, $J = 10.6, 6.3$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ ppm 140.77, 138.03, 121.89, 121.85, 111.87, 109.95, 83.10, 71.52, 38.90, 33.89; HRMS (ESI) calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 247.0340, valor hallado 247.0341

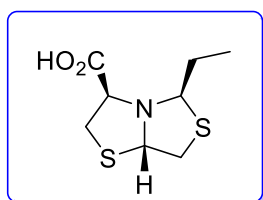
(2R,5S,8R)-8-Carboxyl-2-Isopropyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (**44a**)



En un tubo de MW, se disolvió L-**24** (100 mg, 0.42 mmol) en MeOH seco (1 mL). Se agregó isobutiraldehído **43a** (0.077 mL, 0.84 mmol) y NH_4OAc (48.5 mg, 0.63 mmol) y la mezcla de reacción se llevó al MW a 65°C , 50W por 20 min con agitación. El solvente se concentró y el residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto **44a** (64 mg, 55%) como un aceite incoloro: ^1H RMN δ 5.02 (m, 1H), 4.12

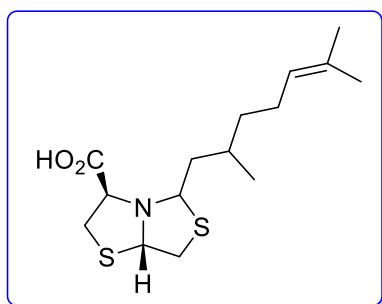
(dd, $J = 7.1, 3.0$ Hz, 1H), 4.06 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 3.46 (dd, $J = 11.9, 5.7$ Hz, 1H), 3.42 (dd, $J = 11.4, 3.0$ Hz, 1H), 3.33 (dd, $J = 11.3, 7.1$ Hz, 1H), 3.02 (dd, $J = 11.9, 4.3$ Hz, 1H), 1.91 (dc, $J = 13.3, 6.7$ Hz, 1H), 1.04 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 173.6, 79.7, 73.9, 71.2, 38.2, 35.3, 33.3, 20.0, 18.5; $[\alpha]_D^{21}$ -31.3° (c 3.2, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_2\text{S}_2$ 234.0617, valor hallado 234.0607.

(2R,5S,8R)-8-Carboxil-2-etil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (44b)

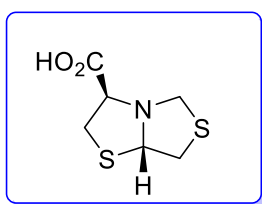


Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a**, a partir de L-**24** y propano aldehído **43b**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto **44b** (69 mg, 75%) como un aceite caramelo: ^1H RMN δ 5.04 (1H, t, $J = 5.6$), 4.18 (dd, $J = 5.4, 8.3$ Hz, 1H), 4.09 (dd, $J = 3.6, 7.1$ Hz, 1H), 3.45 (m, 1H), 3.37 (m, 2H), 3.05 (dd, $J = 5.1, 8.3$ Hz, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.71 (tt, $J = 7.3, 14.3$ Hz, 1H), 1.02 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); ^{13}C RMN δ 172.6, 74.6, 73.2, 70.2, 37.9, 33.3, 31.6, 11.3; $[\alpha]_D^{21}$ $+96.1^\circ$ (c 0.20, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{S}_2$ 220.0466, hallada 220.0432.

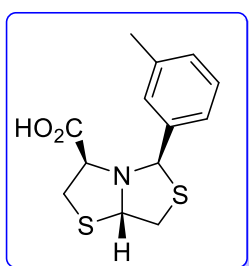
(2R,5S,8R)-8-Carboxil-2-((RS)-2,6-dimetil-5-hepteno)-1-aza-3,6-ditiobicyclo [3.3.0]octano (44c)



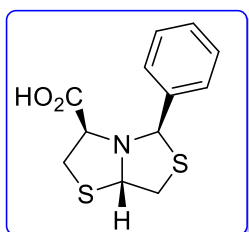
Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a**, a partir de L-**24** y \pm citronellal **43c**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto **44c** (142 mg, 54%) mezcla diasterómerica *2RS syn:2RS anti* 90:10, como un aceite caramelo: (*2RS syn*)-**44c**: ^1H RMN δ 5.07 (m, 2H), 4.32 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.37 (m, 2H), 3.05 (m, 1H), 1.97 (m, 2H), 1.75 (m, 1H), 1.69 (s, 3H), 1.65 (m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.54 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 1.15 (m), 0.92 (q, $J = 6.4$ Hz, 3H); (*2R o 2S syn*)-**44c**: ^{13}C RMN δ 174.1, 131.3, 124.3, 73.1, 71.1, 69.2, 46.1, 38.0, 37.4, 33.5, 30.6, 25.6, 25.2, 19.8, 17.6; (*2R o 2S syn*)-**44c**: ^{13}C RMN δ 174.1, 131.3, 124.2, 72.9, 71.1, 69.11, 45.4, 37.6, 36.1, 33.5, 30.4, 25.6, 25.1, 19.7, 17.5; (*2RS anti*)-**44c**: ^1H RMN δ 4.87 (m, 1H), 4.70 (m, 1H); (*2R o 2S anti*)-**44c**: ^{13}C RMN δ 70.9, 19.1; ^{13}C RMN δ 70.8, 19.0; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_2\text{S}_2\text{Na}$ 352.1375, valor hallado 352.1394.

(8R)-Carboxil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (44d)

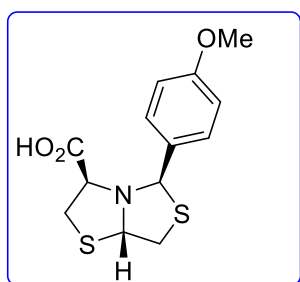
Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a**, a partir de L-**24** y formaldehído **43d**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto **44d** (39 mg, 45%) como un aceite color amarillo: ^1H RMN δ 4.93 (dd, $J = 6.4, 4.4$ Hz, 1H), 4.30 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 4.12 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.41 (m, 3H), 3.06 (dd, $J = 11.8, 4.3$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 173.3, 72.8, 70.0, 58.2, 40.0, 34.2; $[\alpha]_{\text{D}}^{21} +83.6^\circ$ (c 0.43, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{S}_2$ 192.0147, valor hallado 192.0141.

(2R,5S,8R)-8-Carboxil-2-(m-tolyl)-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (44e)

Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a**, a partir de L-**24** y 3-metil benzaldehído **43e**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto **44e** (64 mg, 54%) como un aceite incoloro: ^1H RMN δ 7.31 (m, 2H), 7.28 (m, 1H), 7.16 (m, 1H), 5.28 (dd, $J = 6.3, 4.2$ Hz, 1H), 5.16 (s, 1H), 4.10 (dd, $J = 7.4, 2.8$ Hz, 1H), 3.60 (dd, $J = 11.7, 6.3$ Hz, 1H), 3.52 (dd, $J = 11.5, 2.7$ Hz), 3.40 (dd, $J = 11.5, 7.4$ Hz, 2H), 3.24 (dd, $J = 11.8, 4.2$ Hz, 1H), 2.36 (s, 3H); ^{13}C RMN δ 173.8, 138.8, 138.3, 130.0, 129.0, 128.6, 125.1, 74.18, 72.9, 68.1, 36.9, 33.5, 21.6; $[\alpha]_{\text{D}}^{21} +196.0^\circ$ (c 3.2, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}_2\text{Na}$ 304.0436, valor hallado 304.0433.

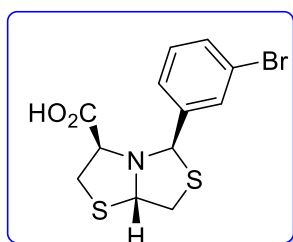
(2R,5S,8R)-8-Carboxil-2-fenil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (44f)

Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a**, a partir de L-**24** y benzaldehído **43f**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto **44f** (56 mg, 50%) como un aceite color caramelo: ^1H RMN δ 7.52 (m, 2H), 7.35 (m, 3H), 5.30 (dd, $J = 6.3, 4.1$ Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.12 (dd, $J = 7.4, 2.8$ Hz, 1H), 3.60 (dd, $J = 11.8, 6.3$ Hz, 1H), 3.45 (m, 1H), 3.24 (dd, $J = 11.8, 4.1$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 173.2, 138.3, 129.0, 128.9, 127.8, 74.0, 72.9, 68.0, 36.9, 33.4; $[\alpha]_{\text{D}}^{21} +199.7^\circ$ (c 2.6, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}_2$ 268.0466, valor hallado 268.0462.

(2R,5S,8R)-8-Carboxil-2-(4-metoxifenil)-1-aza-3,6-ditiobiciclo [3.3.0] octano (44g)

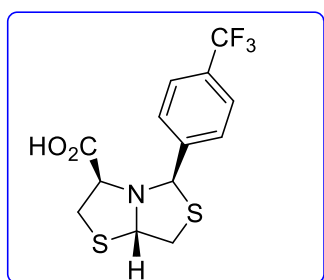
Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a**, a partir de L-**24** y 4-metoxi benzaldehído **43g**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto **44f** (42 mg, 40%) como un aceite color amarillo: ^1H RMN δ 7.46 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.28 (dd, $J = 6.4, 4.1$ Hz, 1H), 5.17 (s, 1H), 4.10 (dd, $J = 7.4,$

2.7 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.62 (dd, $J = 11.8, 6.4$ Hz, 1H), 3.54 (dd, $J = 11.5, 2.7$ Hz, 1H), 3.41 (dd, $J = 11.5, 7.5$ Hz, 1H), 3.26 (dd, $J = 11.8, 4.1$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 171.7, 160.3, 132.0, 129.3, 114.5, 73.6, 72.5, 67.8, 55.4, 36.5, 33.1; $[\alpha]_{\text{D}}^{21} +127.4^\circ$ (c 2.1, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{S}_2$ 298.0572, valor hallado 297.0554.

(2R,5S,8R)-8-Carboxil-2-(3-bromofenil)-1-aza-3,6-ditiobiciclo [3.3.0]octano (44h)

Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a**, a partir de L-**24** y 3-bromo benzaldehído **43h**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto **44h** (62 mg, 42%) como un aceite incoloro: ^1H RMN δ 7.68 (m, 1H), 7.46 (m, 2H), 7.24 (m, 1H),

5.27 (dd, $J = 6.1, 3.3$ Hz, 1H), 5.18 (s, 1H), 4.14 (dd, $J = 6.8, 3.9$ Hz, 1H), 3.59 (dd, $J = 11.7, 6.2$ Hz, 1H), 3.51 (dd, $J = 11.4, 3.3$ Hz, 1H), 3.42 (m, 2H), 3.23 (dd, $J = 11.7, 3.4$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 174.0, 141.5, 131.9, 130.8, 130.4, 126.4, 122.8, 74.0, 72.4, 68.2, 37.2, 33.7; $[\alpha]_{\text{D}}^{21} +115.0^\circ$ (c 3.0, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{BrNO}_2\text{S}_2$ 345.9571, valor hallado 345.9563.

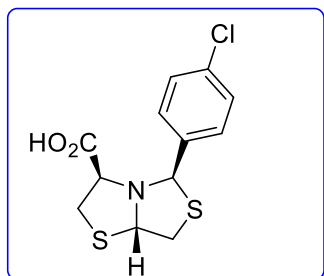
(2R,5S,8R)-8-Carboxil-2-(4-(trifluorometil)-1-aza-3,6-ditiobiciclo [3.3.0]octano (44i)

Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a**, a partir de L-**24** y 4-trifluorometil benzaldehído **43i**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto **44i** (44 mg, 31%) como un aceite incoloro: ^1H RMN δ 7.65 (c, $J = 8.6$ Hz, 4H), 5.29 (m, 2H), 4.13 (dd, $J = 7.0, 3.9$ Hz, 1H), 3.58 (dd, J

$= 11.8, 6.1$ Hz, 1H), 3.46 (m, 2H), 3.25 (dd, $J = 11.8, 3.2$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 174.5, 143.6,

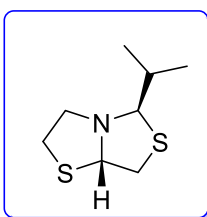
130.3 (c, $J_{CF} = 32.4$ Hz), 128.0, 125.7 (c, $J_{CF} = 3.7$ Hz), 123.9 (c, $J_{CF} = 272.2$ Hz), 74.0, 72.5, 68.3, 37.5, 33.9; $[\alpha]_D^{21} +265.0^\circ$ (c 2.2, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: $[M + H]^+$ calculada para $C_{13}H_{13}F_3NO_2S_2$ 336.0340, valor hallado 336.0351.

(2R,5S,8R)-8-Carboxil-2-(4-clorofenil)-1-aza-3,6-ditiobicyclo [3.3.0]octano (44j)



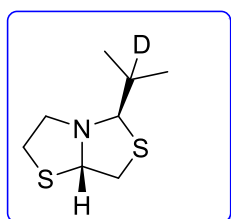
Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a**, a partir de L-**24** y 4-cloro benzaldehído **43j**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto **44j** (43 mg, 34%) como un aceite incoloro: 1H RMN δ 7.47 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 5.29 (dd, $J = 6.2, 3.4$ Hz, 1H), 5.19 (s, 1H), 4.11 (dd, $J = 6.7, 4.0$ Hz, 1H), 3.58 (dd, $J = 11.7, 6.2$ Hz, 1H), 3.43 (m, 2H), 3.23 (dd, $J = 11.7, 3.4$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 174.3, 137.6, 134.8, 129.3, 129.1, 74.1, 72.4, 68.1, 37.1, 33.8; $[\alpha]_D^{21} +173.0^\circ$ (c 2.1, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: $[M + H]^+$ calculada para $C_{12}H_{12}ClNO_2S_2$ 302.0076, valor hallado 302.0071.

(2RS,5SR)-2-isopropil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (\pm 45)



Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a**, a partir de \pm **27** y el aldehído **43a** en condiciones de MW por 40 min. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto \pm **45** como mezcla inseparable *syn:anti* 90:10 (61 mg, 65%), como un aceite incoloro: 1H RMN (*syn*) δ 5.00 (dd, $J = 4.9, 3.1$ Hz, 1H), 3.91 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.14 (m, 2H), 3.02 (m, 2H), 1.82 (m, 1H), 0.99 (dd, $J = 6.6, 4.9$ Hz, 6H); (*anti*) δ 4.56 (dd, $J = 8.4, 7.3$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.25 (m, 2H), 1.94 (m, 1H), 1.16 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 1.05 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H); ^{13}C RMN (*syn*) δ 77.2, 75.8, 57.2, 37.7, 35.5, 31.8, 20.1, 17.8; (*anti*) δ 79.5, 72.0, 45.6, 40.3, 32.7, 31.6, 22.3, 21.0; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: $[M + H]^+$ calculada para $C_8H_{16}NS_2$ 190.0719, valor hallado 190.0718.

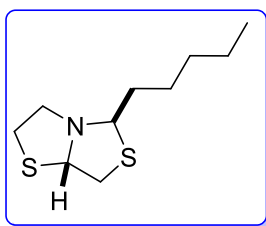
(2RS,5SR)-2-(2-Deuteriopropil)-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (\pm 45-d)



En un balón se disolvió \pm **29** (20 mg, 0.10 mmol) en MeOD- d_4 (0.6 mL). Se agregó el aldehído **43a** (0.018 mL, 0.21 mmol), NH_4OAc (12 mg, 0.15 mmol) y la reacción se llevó a MW a $65^\circ C$, 50W por 10 min. El solvente se concentró y el residuo se purificó usando AcOEt:Hex

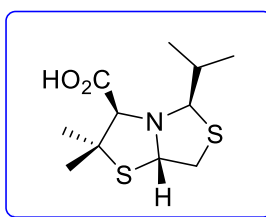
(10:90) para dar el compuesto \pm **45-d** (6 mg, 31 %) mezcla inseparable *syn:anti* 90:10, como un aceite amarillento: ^1H RMN δ 5.01 (dd, $J = 4.7, 3.2$ Hz, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.45 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 3.06 (dd, $J = 11.5, 3.0$ Hz, 1H), 3.01 (m, 1H); ^{13}C RMN δ 77.2, 75.8, 57.1, 37.7, 35.0 (t, $J_{\text{C-D}} = 19.5$ Hz), 31.8, 20.0, 17.7; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NS}_2$ 191.0781, valor hallado 191.0784.

(2RS,5SR)-2-Pentil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (\pm 46)

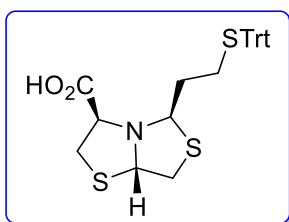


Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a**, a partir de \pm **27** y hexanal **43k** en condiciones de MW por 60 min. . El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (40:60) para dar el compuesto \pm **46** (79mg, 21%) mezcla inseparable *syn:anti* 83:17, como un sólido amarillento; ^1H RMN (*syn*) δ 5.02 (dd, $J = 5.5, 3.3$ Hz, 1H), 4.09 (dd, $J = 8.3, 5.0$ Hz, 1H), 3.50 (dd, $J = 11.4, 5.6$ Hz, 1H), 3.41 (m, 1H), 3.02 (m, 1H), 1.79 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.33 (m, 8H), 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H); (*anti*) δ 4.73 (dd, $J = 8.4, 5.8$ Hz, 1H), 4.53 (m, 1H), 3.17 (m, 4H), 2.82 (m, 1H), 1.99 (m, 1H); ^{13}C RMN (*syn*) δ 75.2, 70.3, 55.5, 38.8, 36.7, 31.6, 26.9, 22.4, 14.0; (*anti*) δ 72.0, 71.7, 46.3, 40.4, 33.7, 31.7, 28.0, 13.4; ESI(+)-LCMS m/z : 218.10 $[\text{M}+\text{H}]^+$

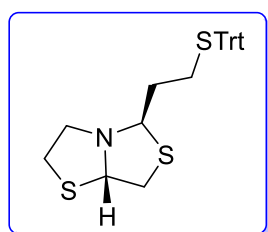
(2R,5S,8R) - 8-Carboxil-2-isopropil-7,7-dimetil-1-aza-3,6-ditiobicyclo [3.3.0] octano (L-47)



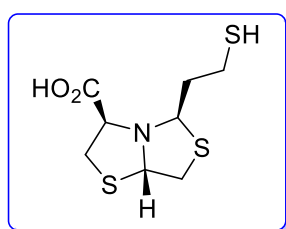
Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a**, a partir de L-**25** y el aldehído **43a**. . El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (30:70:0.1) para dar el compuesto L-**47** (50 mg, 52%) como un aceite color caramelo: ^1H RMN δ 4.87 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.03 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.32 (dd, $J = 11.3, 6.7$ Hz, 1H), 3.00 (dd, $J = 11.3, 6.4$ Hz, 1H), 1.81(m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.05 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H); ^{13}C RMN δ 174.0, 80.7, 77.6, 69.1, 55.1, 40.5, 35.9, 28.9, 28.1, 20.3, 19.6; $[\alpha]_{\text{D}}^{21} +173.0^\circ$ (c 2.1, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{S}_2$ 262.0930; valor hallado 262.0933.

(3R)-5-(2-(Tritilitio)etil)tetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol-3-carboxil (L-48)

Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a** a partir de L-**24** y el aldehído **8**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (20:80:0.1) para dar L-**48** (64%) como un aceite caramelo: $^1\text{H-RMN}$ δ 7.42 (m, 5H), 7.30 (m, 5H), 7.22 (m, 5H), 4.90 (dd, $J = 5.8, 4.4$ Hz, 1H), 4.16 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.99 (dd, $J = 7.2, 2.8$ Hz, 1H), 3.37 (m, 2H), 3.24 (dd, $J = 11.4, 7.2$ Hz, 1H), 2.98 (dd, $J = 12.0, 4.3$ Hz, 1H), 2.39 (m, 1H), 2.27 (m, 1H), 1.65 (m, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ δ 171.5, 144.5, 144.4, 129.54, 128.0, 127.9, 126.8, 73.2, 72.05, 70.9, 67.1, 38.4, 37.2, 33.2, 28.9; HRMS (ESI) calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{NO}_2\text{S}_3$ $[\text{M-H}]^-$ 492.1126, valor hallado 492.1131

(5R,7aS)-5-(2-(Tritilitio)etil)tetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol (\pm 49)

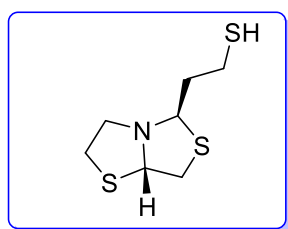
Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de **44a** a partir de \pm **27** y el aldehído **8**. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (10:90) para dar el compuesto \pm **49** (158 mg, 58%) como mezcla diastereomérica *syn:anti* 86:14, como un aceite color caramelo: Rendimiento $^1\text{H-RMN}$ (*syn*) δ 7.42 (m, 5H), 7.31 (m, 5H), 7.23 (m, 5H), 4.84 (dd, $J = 5.4, 3.5$ Hz, 1H), 4.08 (dd, $J = 7.3, 6.0$ Hz, 1H), 3.37 (dd, $J = 11.4, 5.4$ Hz, 1H), 3.00 (m, 5H), 2.28 (m, 2H), 1.70 (m, 1H), 1.58 (m, 1H); (*anti*) 4.62 (m, 1H), 4.44 (m, 1H), 3.21 (m, 5H); (*anti*) δ 4.62 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.44 (dd, $J = 7.8, 7.3$ Hz, 1H), 3.23 (m, 5H); $^{13}\text{C-RMN}$ (*syn*) δ 146.8, 129.6, 127.9, 127.9, 127.2, 82.0, 74.7, 69.3, 55.9, 37.8, 37.5, 31.7, 29.2; (*anti*) δ 144.8, 127.9, 126.6, 66.7. HRMS (ESI) calculada para $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NNaS}_3$ $[\text{M+Na}]^+$ 472,1203, valor hallado 472.1204.

(8R,5RS,2RS)-8-Carboxil-(2-mercaptoetilo)-1-aza-3,6-ditiobiciclo [3.3.0] octano (L-50)

En un balón se disolvió L-**48** (50 mg, 0.10 mmol) en DCM (2mL). Se agregó 1mL de una solución de HCl(0.1N):TFE:TIS (1:90:9) y se agitó a T.A por 15 min. A la mezcla de reacción se le agregó H_2O (5mL) y se extrajo con DCM (3 x 15 mL). La fase orgánica se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó usando AcOEt: Hex (20:80) para dar el compuesto L-**50** (2.5 mg, 10%) mezcla inseparable *syn:anti* 82:18, como un aceite incoloro: $^1\text{H-RMN}$ (*syn*) δ 5.05 (dd, $J = 5.8, 4.9$ Hz, 1H), 4.50 (m, 1H), 4.17 (dd, J

= 6.9, 4.3 Hz, 1H), 3.50 (dd, $J = 11.9, 6.0$ Hz, 1H), 3.39 (m, 2H), 3.10 (dd, $J = 11.9, 4.7$ Hz, 1H), 2.69 (m, 2H), 2.12 (m, 1H), 2.00 (m, 1H), 1.48 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H); (*anti*) δ 4.35 (dd, $J = 8.1, 5.5$ Hz, 1H), 4.24 (dd, $J = 6.8, 3.0$ Hz, 1H), 3.56 (dd, $J = 12.0, 5.9$ Hz, 1H), 3.44 (dd, $J = 6.4, 3.9$ Hz, 2H), 2.85 (m, 2H); ^{13}C -RMN (*syn*) δ 172.0*, 81.4, 73.0, 71.4, 70.2, 42.2, 38.7, 33.5, 29.7, 21.7 (*corroborado por HMBC); HRMS (ESI) calculada para $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{S}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 252,0187, valor hallado 252.0183.

2-((5R,7aS)-Tetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol)etanotiol (\pm 51)



Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de L-50 a partir de \pm 49. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (10:90) para dar el compuesto \pm 51 (4.8 mg, 26%) mezcla *syn:anti* 90:10, como un aceite color caramelo: ^1H -RMN (*syn*) δ 4.98 (dd, $J = 5.4, 3.8$ Hz, 1H), 4.34 (dd, $J = 6.9, 6.2$ Hz, 1H), 3.51 (dd, $J = 11.4, 5.5$ Hz, 1H), 3.42 (dt, $J = 13.4, 4.9$ Hz, 1H), 3.11 (m, 4H), 2.66 (m, 2H), 2.08 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.43 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H); (*anti*) δ 4.89 (dd, $J = 7.7, 6.1$ Hz, 1H), 4.58 (dd, $J = 7.8, 7.2$ Hz, 1H); ^{13}C -RMN (*syn*) δ 74.6, 68.9, 55.9, 42.8, 37.8, 31.7, 21.7; (*anti*) δ 75.6, 64.1, 40.7, 36.1, 23.5; MS (ESI) m/z (%) calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{NaS}_6$ (dímero) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 435,0 valor hallado 435.0 (100)

7.2.3 Procedimientos sintéticos para la preparación de Prodrogas

Metodología general para preparar δ -tiolactonas:

Método A)

En un balón se disuelve 2-MMBT (0.42 mmol) en AcOEt (5 mL). Se agrega HOBt (0.46 mmol) y DCC (0.46 mmol) y se deja agitando toda la noche a T.A. La reacción se concentra y el residuo se purifica usando AcOEt:Hex (10:90), para dar la δ -tiolactona correspondiente.

Método B)

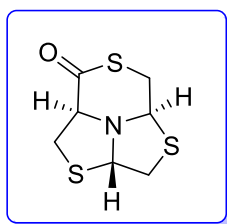
En un balón se disuelve 2-MMBT (0.42 mmol) en DCM seco (5 mL). La mezcla se lleva a 0°C y se agrega HATU (0.51 mmol), DIPEA (0.92 mmol, 0.16 mL) y 4-DMAP (0.04 mmol) y se agita por 30 minutos. Luego se agita toda la noche a T.A. La reacción se concentra y el residuo se vuelca en HCl 5% (10 mL) y se extrae con AcOEt (4 x 20 mL). La fase orgánica

se lava con NaHCO₃ 10% (25 mL), se seca y concentra. El residuo se purifica usando AcOEt:Hex (10:90) para dar la δ -tiolactona correspondiente.

Utilizando la metodología **A** para preparar δ -tiolactonas a partir de L-**24**, se obtuvieron los compuestos **55a** (38%) y **55b** (2%).

Utilizando la metodología **B** para preparar δ -tiolactonas, a partir de L-**24**, se obtuvo el compuesto **55c** (14%)

(2R,5S,8S)-9-Ona-1-aza-3,6,10-tritiotriciclo[3.3.5.0]onceavo (55a)

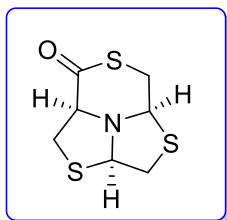


Sólido blanco; PF: 103-107°C; ¹H-RMN δ 5.17 (dd, $J = 6.7, 8.5$ Hz, 1H), 4.56 (dd, $J = 3.1, 11.1$ Hz, 1H), 3.94 (dd, $J = 5.3, 11.5$ Hz, 1H), 3.69 (dd, $J = 9.6, 11.5$ Hz, 1H), 3.60 (t, $J = 11.0$ Hz, 1H), 3.57 (dd, $J = 5.3, 11.5$ Hz, 1H), 3.30 (dd, $J = 3.1, 10.7$ Hz, 1H), 3.20 (m, 2H); ¹³C-RMN δ 196.8, 73.7, 70.2, 65.3, 38.9, 38.8, 37.7; $[\alpha]_D^{21} = -89.7^\circ$ (c 0.345,

CHCl₃); HRMS (ESI) calculada para C₇H₁₀NOS₃ [M+H]⁺ 219,9925, valor hallado 219.9927.

La estructura molecular de **55a** fue obtenida por difracción de Rayos X a un nivel de resolución de 0.0071Å°.

(2R,5R,8S)-9-Ona-1-aza-3,6,10-tritiotriciclo[3.3.5.0]onceavo (55b)

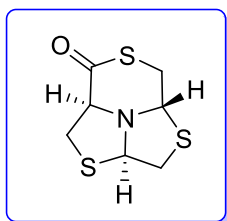


Sólido blanco; PF: 132-136°C; ¹H-RMN δ 5.19 (dd, $J = 2.6, 5.2$ Hz, 1H), 4.89 (dd, $J = 5.0, 7.4$ Hz, 1H), 4.06 (dd, $J = 3.7, 6.5$ Hz, 1H), 3.70 (dd, $J = 3.7, 10.8$ Hz, 1H), 3.64 (dd, $J = 1.8, 14.4$ Hz, 1H), 3.40 (dd, $J = 6.5, 10.8$ Hz, 1H), 3.35 (dd, $J = 5.2, 14.4$ Hz, 1H), 3.21 (dd, $J = 5.0, 11.0$ Hz,

1H), 2.83 (dd, $J = 7.4, 11.2$ Hz, 1H); ¹³C-RMN δ 198.5, 73.9, 69.1, 63.1, 39.0, 35.1, 34.6;

$[\alpha]_D^{21} = -68.8^\circ$ (c 0.335, CHCl₃). La estructura molecular de **55b** fue obtenida por difracción de rayos X a un nivel de resolución de 0.79 Å°.

(2S,5R,8S)-9-Ona-1-aza-3,6,10-tritiotriciclo[3.3.5.0]onceavo (55c)



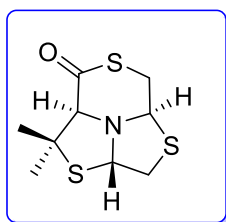
Sólido blanco; PF: 121-125°C; ¹H-RMN δ 5.27 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.41 (dd, $J = 2.1, 10.8$ Hz, 1H), 4.09 (dd, $J = 8.1, 10.0$ Hz, 1H), 3.71 (dd, $J = 6.2, 11.3$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 10.5, 8.1$ Hz, 1H), Hz, 1H), 3.35 (t, $J = 10.3$ Hz, 1H), 3.33 (d, $J = 11.3$ Hz), 3.22 (dd, $J = 11.4, 2.3$ Hz, 1H); ¹³C-RMN δ 197.4, 76.8, 73.9, 59.32, 35.5, 34.7, 34.5; $[\alpha]_D^{21} = +86.8$ (c

0.235, CHCl₃)

Utilizando la metodología **A** para preparar δ -tiolactonas, a partir de L-**25** se obtuvo el compuesto **56a** (93%).

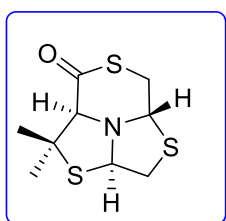
Utilizando la metodología **B** para preparar δ -tiolactonas, a partir de L-**25** se obtuvieron los compuestos **56a** (22%) y **56c** (2%).

(2R,5S,8S)-9-Ona-7-dimetil-1-aza-3,6,10-tritiotriciclo[3.3.5.0]onceavo (56a)



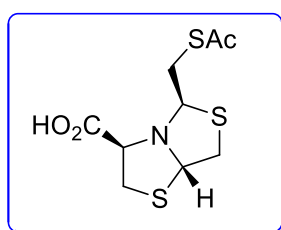
Sólido blanco: PF: 76-78°C; $^1\text{H-RMN}$ δ 5.19 (dd, $J = 5.7, 9.5$ Hz, 1H), 4.52 (dd, $J = 2.8, 11.5$ Hz, 1H), 3.72 (s, 1H), 3.56 (dd, $J = 10.5, 11.4$ Hz, 1H), 3.24 (m, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.63 (s, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ δ 197.0, 82.7, 67.7, 67.4, 62.6, 39.1, 37.3, 26.9, 25.3; $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -222.5^\circ$ (c 0.385, CHCl_3); HRMS (ESI) calculada para $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NOS}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 248,0238, valor hallado 248.0222.

(2S,5R,8S)-9-Ona-7-dimetil-1-aza-3,6,10-tritiotriciclo[3.3.5.0]onceavo (56c)



Sólido blanco; $^1\text{H-RMN}$ δ 5.27 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 5.02 (dd, $J = 2.2, 11.1$ Hz, 1H), 3.84 (s, 1H), 3.63 (dd, $J = 6.4, 11.2$ Hz, 1H), 3.54 (t, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.25 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 3.21 (dd, $J = 2.4, 11.4$ Hz, 1H), 1.67 (s, 3H), 1.60 (s, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ δ 197.2, 81.4, 74.1, 62.7, 59.1, 34.9, 34.5, 33.6, 29.8; HRMS calculada para $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NNaOS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 270,0057, valor hallado 270, 0053.

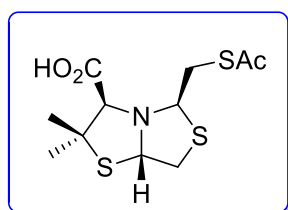
(3R,5R,7aS)-5-((Tioacetilo)metil)tetrahidro-2H-tiazol[4,3-b]tiazol-3-carboxil (L-57)



En un balón se disolvió L-**24** (200 mg, 0.84 mmol) en Py (0.5 ml). La mezcla se llevó a 0°C y se agregó Ac_2O (0.8 mL, 8,4 mmol) y 4-DMAP (10 mg, 0.084 mmol). La reacción se agitó 10 minutos a 0° y luego toda la noche a T.A. Luego se agregó hielo, se agitó 15 minutos, y se se llevó a pH 3, con HCl 5% para luego ser extraída con AcOEt (4 x 20 mL). La fase orgánica se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex (20:80) para dar el compuesto L-**57** (70mg, 30%) como un aceite color caramelo: $^1\text{H RMN}$ δ 5.09 (dd, $J = 5.9, 3.9\text{Hz}$, 1H), 4.38 (dd, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.20 (dd, $J = 7.1, 2.9$ Hz, 1H), 3.60 (dd, $J = 11.4, 5.5$ Hz, 1H), 3.42 (dd, $J = 11.4, 2.9$ Hz, 1H), 3.32 (dd, $J = 11.4, 7.1$ Hz, 1H), 3.21 (dd, $J = 6.8, 4.4$ Hz, 2H), 3.12 (dd, $J = 12.0, 3.9$ Hz, 1H), 2.40 (s, 3H); $^{13}\text{C RMN}$ δ 195.6, 172.6, 73.4, 71.8, 71.4, 39.1, 37.4, 33.6, 30.7; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -38.2^\circ$ (c 1.1,

CH₂Cl₂); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: calculada para C₁₁H₁₆NO₃Na₂S₃ [M+ 2Na-H]⁺ 352.0088, valor hallado 352.0088

(3R,5R,7aS)-5-((Tioacetilo)metil)-2,2-dimetiltetrahidro-2H-tiazol[4,3-b]tiazol-3-carboxil (L-58)



Se preparó de manera análoga a la ruta descrita para la preparación de L-57, a partir de L-25. El residuo se purificó usando AcOEt:Hex:AcOH (20:80:0.1) para dar el compuesto L-58 (78 %) como un aceite color caramelo: ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.05 (dd, *J* = 6.6, 4.9 Hz, 1H), 4.37 (dd, *J* = 8.2, 5.6 Hz, 1H), 3.75 (s, 1H), 3.52 (dd, *J* = 11.8, 6.6 Hz, 1H), 3.30 (dd, *J* = 14.3, 5.6 Hz, 1H), 3.12 (dd, *J* = 14.3, 8.3 Hz, 1H), 3.04 (dd, *J* = 11.8, 4.8 Hz, 1H), 2.40 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.47 (s, 3H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 195.5, 170.5, 79.3, 72.5, 69.4, 55.0, 40.7 36.6, 30.8, 27.9; [α]_D²⁰ -43.0° (c 1.1, AcOEt); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: calculada para C₉H₁₃NO₃NaS₃ [M + Na]⁺ 301.9955, valor hallado 301.9957.

7.3. Métodos Experimentales:

7.3.1. Disfracción de Rayos X

Técnica de cristalización:

La obtención de los cristales se realizó mediante el método de cristalización por difusión de vapor. Se usó una mezcla de disolventes miscibles entre sí. El compuesto se disolvió en la menor cantidad de disolvente en el que es soluble. Luego se agregó una cantidad de disolvente precipitante pero en cantidades tales que permita la disolución del mismo. Para 10mg de compuesto se usó un volumen final de 4-5mL. La solución final se filtró a un vial y se dejó durante 7-10 días, en condiciones de evaporación lenta.

Datos recabados de la estructura molecular de 55a

A colorless parallelepiped-like specimen of C₇H₉NO₃, approximate dimensions 0.595 × 0.134 × 0.103 mm, was used for the X-ray crystallographic analysis. The X-ray intensity data were measured. The frames were integrated with the Bruker SAINT software package using a narrow-frame algorithm. The integration of the data using an orthorhombic unit cell yielded a total of 15886 reflections to a maximum θ angle of 72.31°

(0.0071 Å resolution), of which 3542 were independent (average redundancy 15.886, completeness = 97%, $R_{\text{int}} = 0.0490\%$, $R_{\text{sigma}} = 0.0406\%$). The final cell constants of $a = 11.4682(5)$ Å, $b = 5.3017(3)$ Å, $c = 15.1947(7)$ Å, $923.34(8)$ Å³, are based upon the refinement of the XYZ-centroids of 9466 reflections above $20 \sigma(I)$ with $5.82^\circ < 2\theta < 144.62^\circ$. Data were corrected for absorption effects using the multi-scan method (SADABS). The calculated minimum and maximum transmission coefficients (based on crystal size) are 0.421 and 0.754. The final anisotropic full-matrix least-squares refinement on F² with 109 variables converged at $R1 = 4.25\%$, for the observed data and $wR2 = 10.49\%$ for all data. The goodness-of-fit was 1.305. The largest peak in the final difference electron density synthesis was 0.42 e⁺

Table 1. Sample and crystal data for **55a**

Identification code	cu_200203_AP_VE229_0m_a
Chemical formula	C ₇ H ₉ NOS ₃
Formula weight	219.33 g/mol
Temperature	296 K
Wavelength λ	1.54178 Å
Crystal size	0.595 × 0.134 × 0.103 mm
Crystal habit	colorless parallelepiped
Crystal system	monoclinic
Space group	P 1 21 1
Unit cell dimensions	$a = 11.4682(5)$ Å $\alpha = 90^\circ$ $b = 5.3017(3)$ Å $\beta = 91.900(2)^\circ$ $c = 15.1947(7)$ Å $\gamma = 90^\circ$
Volumen	923.34(8) Å ³
Z	4
Density (calculated)	1.578 g/cm ³
Absorption coefficient	6.941 mm ⁻¹
F (000)	456.0

Table 2. Data collection and structure refinement for **55a**.

Theta range for data collection	5.82 to 144.62 Å°
Index ranges	$-14 \leq h \leq 14$, $-6 \leq k \leq 5$, $-18 \leq l \leq 17$
Reflections collected	15886
Independent reflections	3542 [$R_{\text{int}} = 0.0490$, $R_{\text{sigma}} = 0.0406$]
	sigma
Coverage of independent reflections	97%
Absorption correction	multi-scan

Max. and min. Transmission	0.421 and 0.754
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Refinement program	SHELXL-2014/6 (Sheldrick, 2014)
Function minimized	$S w (F_o^2 - F_c^2)^2$
Data / restraints / parameters	3542/1/217
Goodness-of-fit on F ²	1.062
Final R indices	R ₁ = 0.0387, wR ₂ = 0.1019
	R ₁ = 0.0425, wR ₂ = 0.1049
Weighting scheme	$w=1/[s^2(F_o^2) + (0.0079P)^2 + 1.3470P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
Absolute structure parameter	0.070(12)
Largest diff. peak and hole	0.42 and -0.30 eÅ ⁻³
R.M.S. deviation from mean	0.078 eÅ ⁻³

Datos recabados de la estructura molecular de 55b

A colorless parallelepiped-like specimen of C₇H₉NOS₃, approximate dimensions 0.080 mm x 0.090 mm x 0.380 mm, was used for the X-ray crystallographic analysis. The X-ray intensity data were measured. The total exposure time was 36.58 hours. The frames were integrated with the Bruker SAINT software package using a narrow-frame algorithm. The integration of the data using an orthorhombic unit cell yielded a total of 29583 reflections to a maximum θ angle of 26.60° (0.79 Å resolution), of which 1867 were independent (average redundancy 15.845, completeness = 99.7%, R_{int} = 3.98%, R_{sig} = 1.98%) and 1779 (95.29%) were greater than 2s(F₂). The final cell constants of a = 5.2493(7) Å, b = 12.0624(18) Å, c = 14.1479(16) Å, volume = 895.8(2) Å³, are based upon the refinement of the XYZ-centroids of 9466 reflections above 20 $\sigma(I)$ with 5.757° < 2 θ < 53.18°. Data were corrected for absorption effects using the multi-scan method (SADABS). The ratio of minimum to maximum apparent transmission was 0.866. The calculated minimum and maximum transmission coefficients (based on crystal size) are 0.7570 and 0.9410. The final anisotropic full-matrix least-squares refinement on F₂ with 109 variables converged at R₁ = 3.98%, for the observed data and wR₂ = 9.49% for all data. The goodness-of-fit was 1.305. The largest peak in the final difference electron density synthesis was 0.422 e/Å³-/Å³ and the largest hole was -0.286 e-/Å³. On the basis of the final model, the calculated density was 1.626 g/cm³ with an RMS deviation of 0.078 e- and F(000), 456 e-.

Table 1. Sample and crystal data for **55b**

Identification code	ValerieC_VC269_1829
Chemical formula	C7H9NOS3
Formula weight	219.33 g/mol
Temperature	298(2) K
Wavelength λ	71073 Å
Crystal size	0.080 x 0.090 x 0.380 mm
Crystal habit	colorless paralelepiped
Crystal system	Orthorhombic
Space group	P 21 21 21
Unit cell dimensions	a = 5.2493(7) Å $\alpha = 90^\circ$ b = 12.0624(18) Å $\beta = 90^\circ$ c = 14.1479(16) Å $\gamma = 90^\circ$
Volumen	895.8(2) Å ³
Z	4
Density (calculated)	1.626 g/cm ³
Absorption coefficient	0.774 mm ⁻¹
F (000)	456

Table 2. Data collection and structure refinement for **55b**.

Theta range for data collection	2.88 to 26.60°
Index ranges	-6<=h<=6, -15<=k<=15, -17<=l<=17
Reflections collected	29583
Independent reflections	1867 [R(int) = 0.0398]
Coverage of independent reflections	99.7%
Absorption correction	multi-scan
Max. and min. Transmission	0.9410 and 0.7570
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Refinement program	SHELXL-2014/6 (Sheldrick, 2014)
Function minimized	$\sum w (F_o^2 - F_c^2)^2$
Data / restraints / parameters	1867 / 0 / 109
Goodness-of-fit on F ²	1.305
Final R indices	1779 data; $I > 2s(I)$ R1 = 0.0398, wR2 = 0.0939 all data R1 = 0.0421, wR2 = 0.0949
Weighting scheme	$w = 1 / [s^2(F_o^2) + (0.0079P)^2 + 1.3470P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2) / 3$
Absolute structure parameter	0.0(0)
Largest diff. peak and hole	0.422 and -0.286 eÅ ⁻³
R.M.S. deviation from mean	0.078 eÅ ⁻³

7.3.2. Ensayos de Estabilidad

Validación de la metodología analítica (HPLC):

Especificidad: Para comprobar de que se puede evaluar de manera inequívoca el compuesto de interés, se verificó que el MeCN utilizado como disolvente en la solución stock y posteriores diluciones no presentara señales que interfieran con nuestro analito de interés en el tiempo de desarrollo del cromatograma.

Linealidad: Para verificar la linealidad del sistema se realizó una curva de calibración con cinco niveles de concentración del analito (120%-100%-80%-50%-20%). Cada muestra se inyectó por triplicado, el gráfico de la curva de calibración se obtuvo en función del área vs concentración, y se determinó la ecuación de la recta y su R^2 .

Precisión: La precisión del método se evaluó mediante determinaciones de repetibilidad de la muestra que contiene una concentración igual al 100%. La muestra se inyectó cinco veces consecutivas y se calculó el coeficiente de variación (CV).

Exactitud: Para determinar la exactitud del método se prepararon y analizaron dos muestras independientes de concentración 100% y se calculó la diferencia (%) obtenida entre los análisis.

Curvas de calibración:

Los estándares de calibración de *D-anti-2* se prepararon a concentraciones de 0.039, 0.097, 0.155, 0.194, 0.233 mg /mL a partir de una solución stock de 1 mg /ml mediante dilución con MeCN. Para el análisis por HPLC se usó una columna Phenomenex Luna C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 μ m) a temperatura ambiente y a una longitud de onda de 215 nm. Se usó como fase móvil A una solución 99% MeCN (0.05% ácido fórmico) y como fase móvil B una solución H₂O (ácido fórmico al 0,05%) a un caudal de 1 ml/min. Se corrió en un sistema de gradiente: 50-99% A (0-10 min), 99% A (10-12 min) y 50% A (12.01-15 min).

Los estándares de calibración de las δ -tiolactonas y de la bistiazolidina L-**24** se prepararon a concentraciones de 0.048, 0.040, 0.032, 0.020 y 0.008 mg/mL a partir de una solución stock de 10 mg/mL mediante dilución con una solución MeCN:H₂O (35:65). Se usó una columna Phenomenex kinetex 5 μ m EVO C18 100 A, 150x 4.6mm a temperatura ambiente

y a dos longitudes de onda 215 y 254 nm. El análisis se corrió usando un sistema isocrático 35:65 MeCN:H₂O 0.01% ácido Fórmico a un caudal de 1 mL/min.

Ensayo de estabilidad de 2-MMT:

A 500 µL de una solución stock de D-*anti*-2 (0.194 mg/mL) en MeCN, se agregó a 500 µL de una solución BP a pH 7.2. La mezcla se incubó con agitación a 27°C. Se hicieron tomas de 50 µL a diferentes tiempos: 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h. Las muestras se filtraron y analizaron inmediatamente por HPLC. El ensayo se realizó por duplicado

Ensayo de estabilidad de prodrogas a pH 1.2 y 7.4:

A 40 µL de una solución stock de prodroga (0.040 mg/mL) en DMSO, se le agregó 960 µL de la solución pH 1.2 o 7.4. La mezcla se incubó con agitación a 37°C por 6h. Se hicieron tomas a diferentes tiempos: 30 min, 1 h, 3 h, 6 h. Se tomaron 100 µL de la mezcla de reacción y se llevaron a 1 mL con una solución H₂O:MeCN 65:35. Las muestras se filtraron y analizaron por HPLC. El ensayo se realizó por triplicado

7.3.3. Ensayos Inhibición en MβL

Los ensayos de inhibición que incluyeron la determinación de K_i *in vitro* y de IC_{50} *in vivo* en células de *E. coli* que expresan NDM-1, estuvieron a cargo del Prof. Alejandro Vila en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario-Argentina (IBR-CONICET). La determinación de la concentración mínima inhibitoria estuvo a cargo del Dr. Prof. Roberto Bonomo en Research Service, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, OH, USA.

Preparación de proteínas para las determinaciones de K_i in vitro: Las enzimas NDM-1 y VIM-2 se clonaron en una versión modificada del pET28b+(TEV)⁷, con el sitio de corte TEV en lugar del correspondiente a trombina y pET28b+ respectivamente. El N-terminal His6-MBLs fue expresado en *E. coli* BL21(DE3) e inducido con 0,2 µM IPTG y 0,5 µM ZnSO₄ durante 16 hs a 18 °C. Las células fueron inactivadas por sonicación y el extracto crudo fue purificado en una columna de Ni-Sepharose, las proteínas obtenidas fueron cortadas con TEV (NDM-1) o proteasas de trombina (VIM-2). Para purificar el IMP-1 se empleó el plásmido pET26-blalIMP-1. La proteína se expresó en *E. coli* BL21(DE3) con 0,5 mM IPTG y

0,5 μM ZnSO_4 durante 16 hs a 20 °C. La lisis celular se realizó mediante sonicación y la fracción soluble fue dializada por 16 hs contra 50 μM Tris-Cl pH 7.5, 100 μM ZnSO_4 y 10 μM β -mercaptoethanol y luego aclarada por centrifugación. Esta fracción fue cargada en una columna de intercambio catiónico equilibrado con 50 μM Tris-Cl pH 7.5, IMP-1 fue eluida con un gradiente NaCl de 0-500 μM en 50 μM Tris-Cl pH 7.5. Todas las preparaciones de proteínas tienen una pureza >95%, según lo determinado por el protocolo SDS-PAGE.

Determinación de K_i in vitro: La hidrólisis de Imipenem frente a las distintas M β L fue monitoreada con un espectrofotómetro JascoV-670, con $\Delta\epsilon_{300} = -9000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y a una longitud de onda $\lambda = 300 \text{ nm}$. Las reacciones se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo de 0,1 cm de longitud, a una concentración final enzimática de 1 nM (NDM-1) y 3 nM (IMP-1 y VIM-2) en 10 μM HEPES pH 7,5, 200 μM NaCl, 50 mg/L BSA y 20 μM ZnSO_4 a 30 °C. Las tiazolidinas se disolvieron en DMSO a una concentración final de 100 μM y se diluyeron en el amortiguador de reacción a la concentración deseada. Las reacciones se iniciaron con la adición enzimática a una mezcla de sustrato-inhibidor. Se observó la fase inicial lineal de los cursos de tiempo para todas las condiciones. En presencia del inhibidor se midió una disminución de la tasa de hidrólisis con respecto a la reacción en su ausencia. Las constantes de inhibición (K_i) fueron determinadas por el ajuste de datos al modelo de inhibición competitiva implementado en GraphPad Prism 5.0.

Preparación de las células bacterianas para los estudios de inhibición in vivo (IC_{50}): Las células de E. coli portadoras del vector pMBLe o pMBLe-NDM-12 se inocularon en 10 ml de medios LB complementados con 25 mg/L de gentamicina y se cultivaron a 37 °C hasta que las células alcanzaron un OD₆₀₀ de 0,6. Para la inducción NDM-1, se añadió 100 μM IPTG y el cultivo fue incubado por otras 2 hs a la misma temperatura. Las células se sedimentaron mediante centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de fosfato sódico de 50 mM pH 7.0 con 5 μM ZnSO_4 . Este proceso se repitió 3 veces; finalmente, las células fueron resuspendidas en el mismo buffer en un OD₆₀₀ de 0.15. Para realizar los experimentos de ^1H -RMN, se tomó 500 μL de la suspensión celular (con 10 % D₂O) y se agregaron diferentes concentraciones de cada compuesto y/o 500 μM imipenem y se colocaron en un tubo de RMN para la adquisición de datos. Los sobrenadantes de las

suspensiones celulares se recogieron por centrifugación y luego se filtraron a través de filtros de 0,22 μM para los controles.

Análisis y mediciones por ^1H -RMN:

Todos los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker Avance de 600 MHz equipado con una sonda TXI. Todos los experimentos se realizaron a 25 $^{\circ}\text{C}$ y se adquirieron con 64 escanes y un tamaño de datos de 32K, utilizando técnicas estándar. Los espectros ^1H -RMN fueron procesados y analizados con TopSpin 3.2 (Bruker). Todos los espectros de una serie determinada se trazaron con la misma relación de escala.

Análisis y mediciones de IC_{50} in vivo en células de E- coli que expresan NDM-1:

Para la estimación del IC_{50} en la célula seguimos el procedimiento publicado en literatura^{8,9}. Las células de *E. coli* que expresan NDM-1, ancladas a la membrana externa, fueron expuestas a Imipenem y después de 9 a 15 min el antibiótico se degradó por completo. En presencia del inhibidor, esta tasa de hidrólisis fue más lenta y después de 30 minutos de incubación en el imán, la célula de *E. coli* seguía siendo viable. También se confirmó por ^1H -RMN que el Imipenem es estable en el buffer empleado y en presencia de células *E. coli* que carecen de carbapenemases. No se observó enzima libre en el medio de medida, confirmando que la reacción ocurrió dentro de la periplasma bacteriano. Con el fin de evaluar la potencia de los inhibidores en las células bacterianas, calculamos el porcentaje de inhibición 15 min después del inicio de la reacción empleando la siguiente ecuación (Ecuación 1):

$$\%_{\text{inhibición}} = 100 - 100 \times \frac{S_T - S_1}{S_T - S_2} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde [S1] y [S2] corresponden a la concentración de sustrato, en presencia y ausencia de inhibidor respectivamente, y se obtienen por la integral de la señal entre 1,22-1,18 ppm. [ST] es la suma de [S2] y [P2] o [S1] y [P1], donde [P1] y [P2] son concentración de producto obtenida por las integrales de señales comieron 1,17-1,12 ppm en presencia y ausencia del inhibidor, respectivamente. Los valores IC_{50} se obtienen ajustando la concentración en el % de inhibición en la ecuación 2:

$$\%_{\text{inhibición}} = 100 - \frac{100}{1 + \left(\frac{[I]}{\text{IC}_{50}}\right)^n} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde [I] es la concentración del inhibidor y n es el factor de cooperatividad.

Ensayos de susceptibilidad a los antimicrobianos (CMI):

En estos experimentos se utilizaron ocho aislados clínicos de diferentes especies dentro del orden Enterobacterales, expresando MBLs NDM-1, VIM-2 o IMP-1. Las CMI fueron determinadas por el método de microdilución de caldo de acuerdo con las directrices del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI).¹⁰ Se prepararon diluciones seriadas de imipenem (imipenem-cilastatina, Merck &CO, Whitehouse Station, NJ, USA) y meropenem (Zuventus Healthcare Ltd., Bari-Brahmana, Jammu, India) de 64 mg/L a 0,03 mg/L. Las 2-MMT fueron probadas a una concentración constante de 100 µg/L. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Cultivo celular y Ensayo de Toxicidad:

Las líneas celulares Vero (de riñón de mono verde africano), HEK293 (riñón embrionario humano) y L929 (fibroblasto de ratón) fueron cultivadas en un medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco) complementado con 10 % suero bovino fetal, penicilina G (100 unidades/ml, Sigma), y estreptomycin (100 mg/L, Sigma) y mantenido en una incubadora humidificada de CO₂ al 5 % a 37 °C. La viabilidad celular se analizó utilizando el ensayo MTT.¹¹ Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 4500 células por pocillo. Los compuestos sintetizados se disolvieron en DMSO (Merck) a 114,6 mM y luego se diluyeron en el medio de cultivo para lograr la concentración final para los diferentes tratamientos. Después de 24 hs de incubación, se agrega bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolyl)-2,5-difenilo-2H-tetrazolium (MTT) (0,5 mg/ml; Sigma) y se incubó durante 4 hs a 37 °C. Después de la eliminación del medio de cultivo, los cristales formados se disolvieron en DMSO y la absorbancia se midió a 562 nm utilizando un lector de microplacas. Como controles negativos, se incubaron las células con la concentración correspondiente de DMSO (Merck), según la dilución.

7.3.4. Cristalización de complejos 2-MMT 2:MBL:

La determinación estructural de los complejos MBL:2-MMT por difracción de rayos X estuvieron a cargo del Dr. Prof. James Spencer en School of Cellular and Molecular Medicine, Universidad de Bristol, Bristol-Reino Unido.

Para los estudios cristalográficos, las formas recombinantes de NDM-1, VIM-2 e IMP-1 se produjeron según lo descrito anteriormente.^{12,13,14} La cristalización de IMP-1 y NDM-1

también fue descrita anteriormente^{9, 10}. VIM-2 se cristalizó a 19 °C mezclando 1 µL de proteína (8 mg/ml en 50 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP y 0,1 mM ZnCl₂) con 2 µL de reactivo de cristalización (0,1 M Mg(HCO₂)₂, 25 % PEG 3350) y equilibrado con 500 µL de reactivo de cristalización. Los complejos NDM-1 se obtuvieron añadiendo a los cristales 2 mM de inhibidor L-*anti-2* o D-*syn-2* (disueltos en reactivo de cristalización) mediante goteo por 90 min y 120 min respectivamente; los cristales fueron entonces crio-protegidos por una breve exposición al glicerol acuoso del 20 % (v/v) y posteriormente refrigerados en nitrógeno líquido. Los complejos IMP-1 y VIM-2 se obtuvieron remojando cristales en una solución crio-protectora (solución diluida al 25 % (v/v) con glicerol acuoso) complementado con 4mM de inhibidor durante 60 min; posteriormente, los cristales se enfriaron repentinamente en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción se recogieron a 100 K en Diamond Light Source en líneas de haz I04 (IMP-1: D-*syn-2*), I04-1 (IMP1: L-*anti-2*; VIM-2: L-*anti-2*; VIM-2: D-*syn-2*) o I03 (NDM-1: L-*anti-2*; NDM-1: D-*syn-2*). Los datos IMP-1: L-*anti-2*, IMP-1: D-*syn-2* y NDM-1: L-*anti-2* se integraron en DIALS14 y se escalaron y fusionaron en Aimless (CCP4 suite15). Los datos VIM-2: L-*anti-2* se integraron en iMosflm16 y se escalaron y fusionaron en Aimless. Los datos VIM-2: D-*syn-2* y NDM-1: D-*syn-2* se integraron en XDS17 y se escalaron y fusionaron en XSCALE como parte de la canalización xia218. Las fases se calcularon mediante reemplazo molecular en Phaser19, utilizando PDB IDs 4bz31 (VIM-2), 6rmf12 (NDM-1) o 5hh420 (IMP-1). Las estructuras se completaron mediante rondas iterativas de construcción manual de modelos en Coot21 y refinamiento en Phenix22. Los datos de VIM-2: L-*anti-2* se hermanaron según lo determinado por Xtriage (h, -k, -l; 0,15 fracción gemela). Las estructuras de ligando y las restricciones geométricas se calcularon con Phenix eLBOW22. La validación de la estructura fue asistida por Molprobity23 y Phenix. Las figuras fueron creadas en PyMol (www.pymol.org).

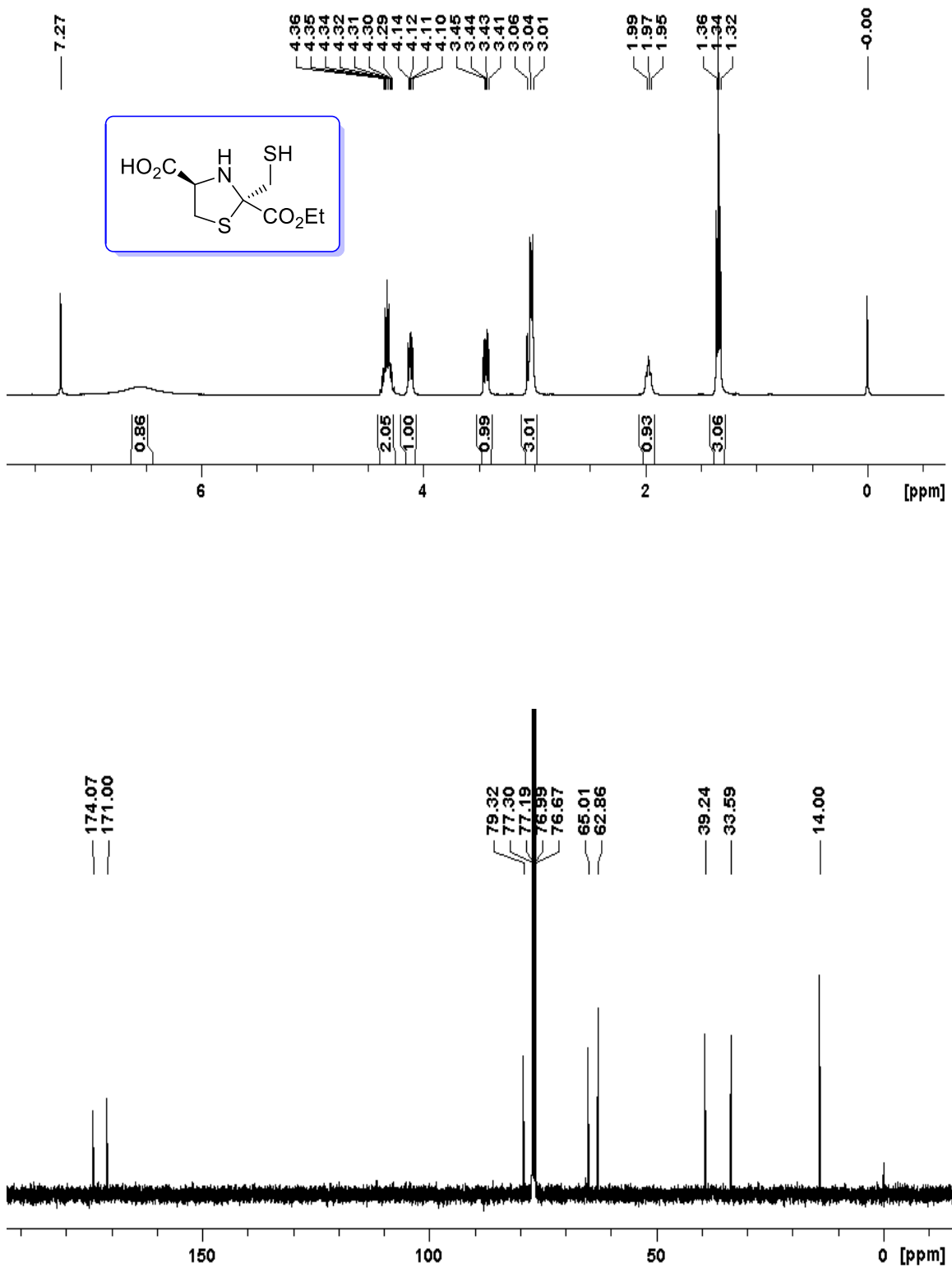
7.3.5. Determinación estructural mediante cálculos QM-MM

Para los cálculos híbridos de Mecánica Cuántica-Mecánica Molecular (QM-MM), se utilizó la Unión Funcional Ajustada de Densidad de Carga Autoconsensante (SCC-DFTB) para describir la región QM y el campo de fuerza ff14SB para describir la región MM implementada en Amber16. Las estructuras iniciales se tomaron de las estructuras

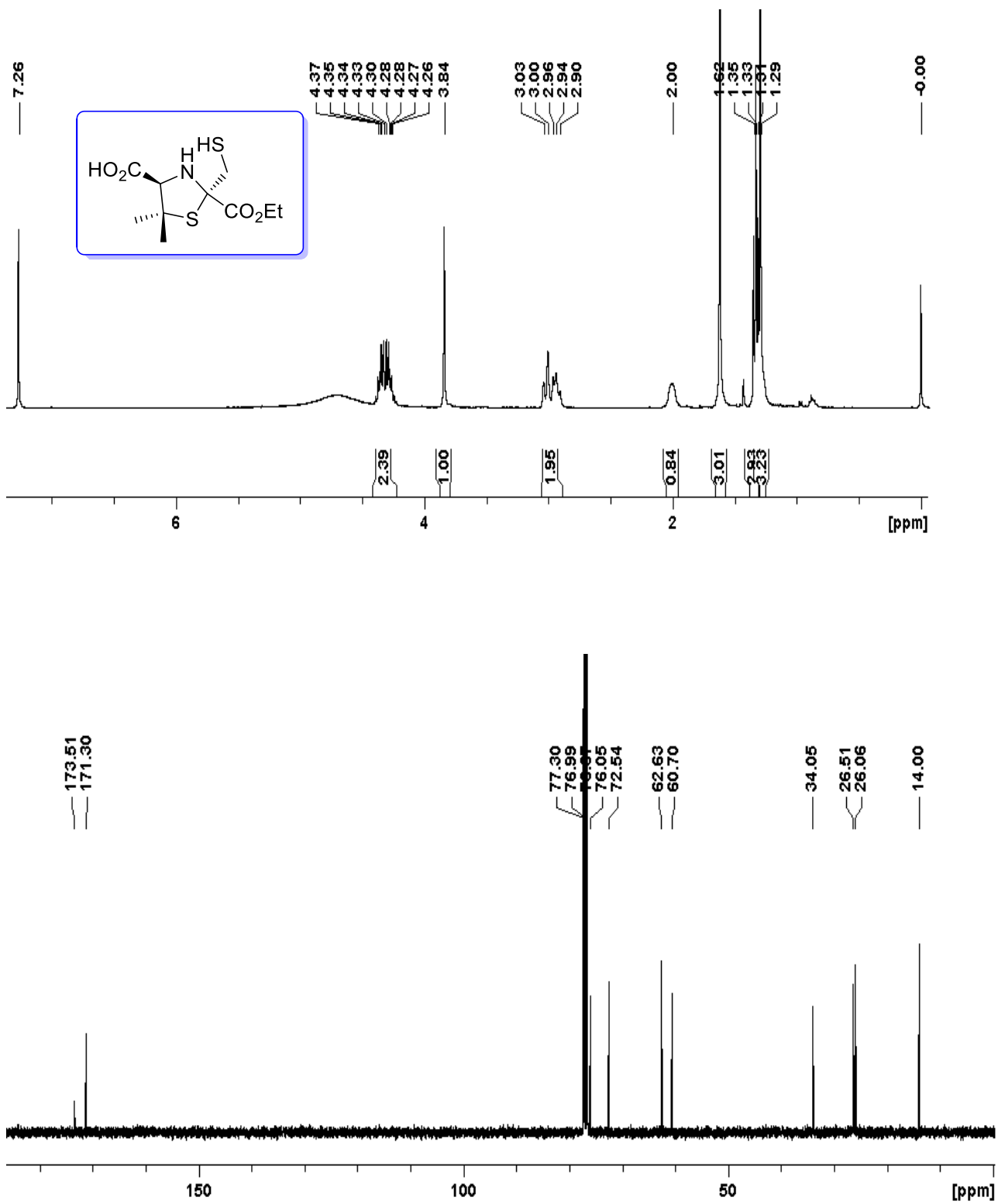
cristalinas de NDM-1 en complejo con L-*anti-2* y D-*syn-2*, y se construyeron in-silico para los análogos de oxazolidina reemplazando el átomo de azufre con un oxígeno. Se añadieron átomos de hidrógeno, y cada proteína se sumergió en una caja periódica octaédrica truncada con una distancia mínima soluto-pared de 8 Å, llena de moléculas de agua TIP3P explícitas²⁸, utilizando el módulo de salto AMBER1627. El radio de van der Waals, las constantes de fuerza y las distancias de equilibrio, los ángulos diédros para L-*anti-2* y D-*syn-2* se tomaron de la base de datos gaff y las cargas parciales se calcularon con cargas RESP utilizando el método Hartree-Fock y el conjunto de bases 6-31G*. Para acomodar las moléculas de disolvente y los posibles choques, se realizó una minimización inicial a nivel mecánico molecular de cada estructura compleja, seguida de una optimización de la geometría QM-MM. La región QM consistió en iones Zn (II) más las cadenas laterales coordinadas de residuos Trp87, His116, His118, Asp120, His196, Cys221, Asn233, His263 y el compuesto L-*anti-2* o D-*syn-2*.

7.4 Espectroscopía de ^1H y ^{13}C -RMN de compuestos seleccionados:

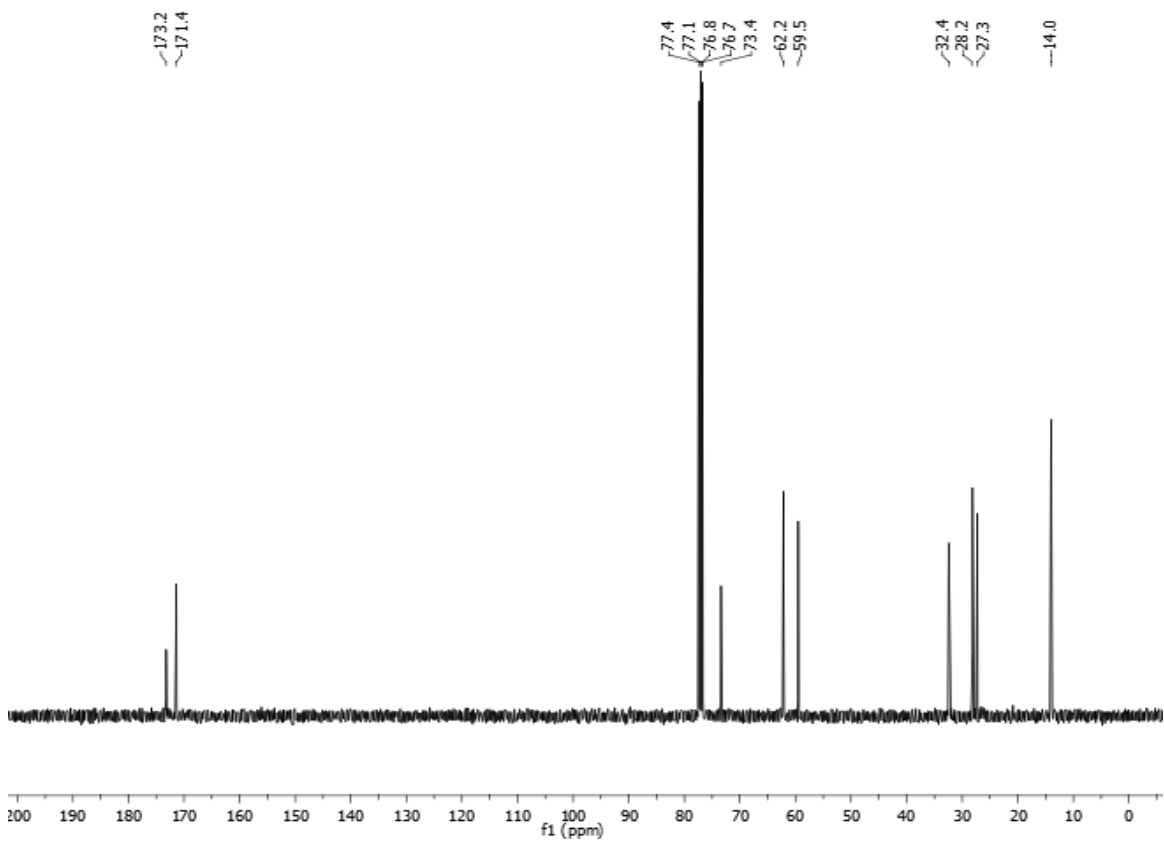
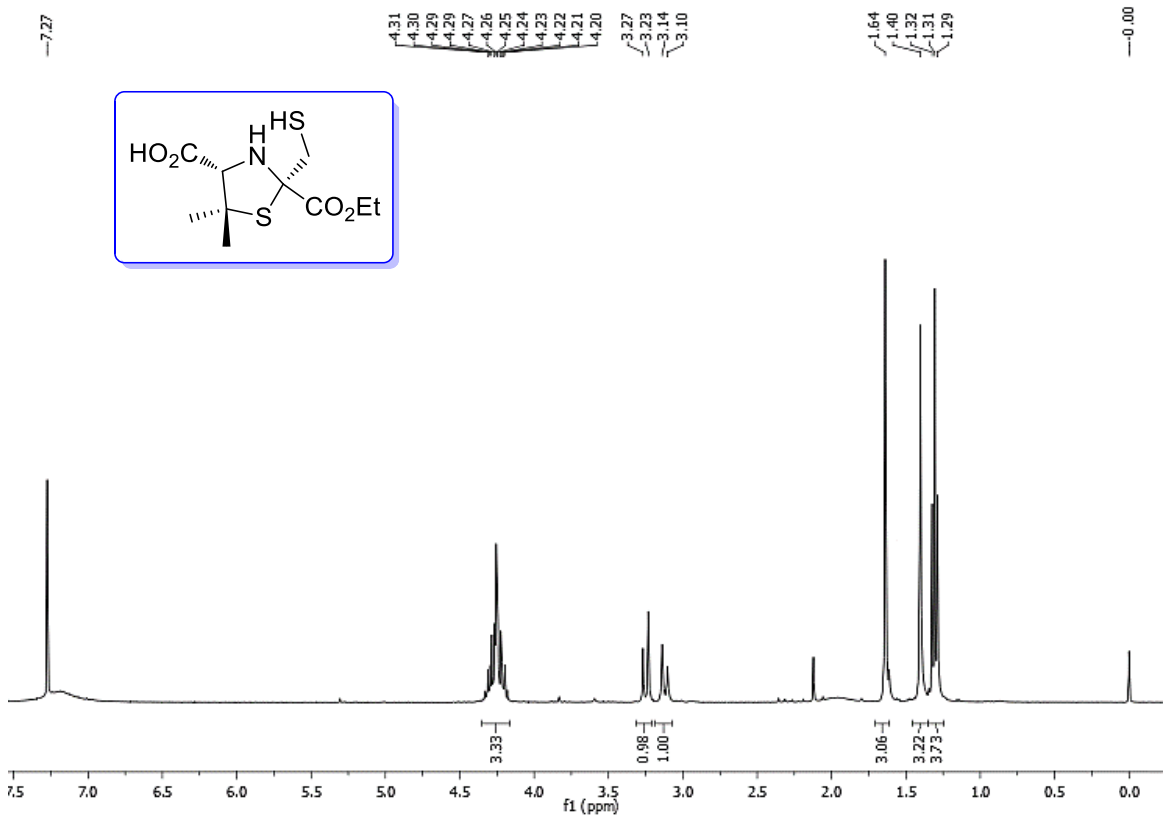
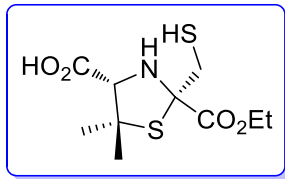
Compuesto L-*anti*-1:



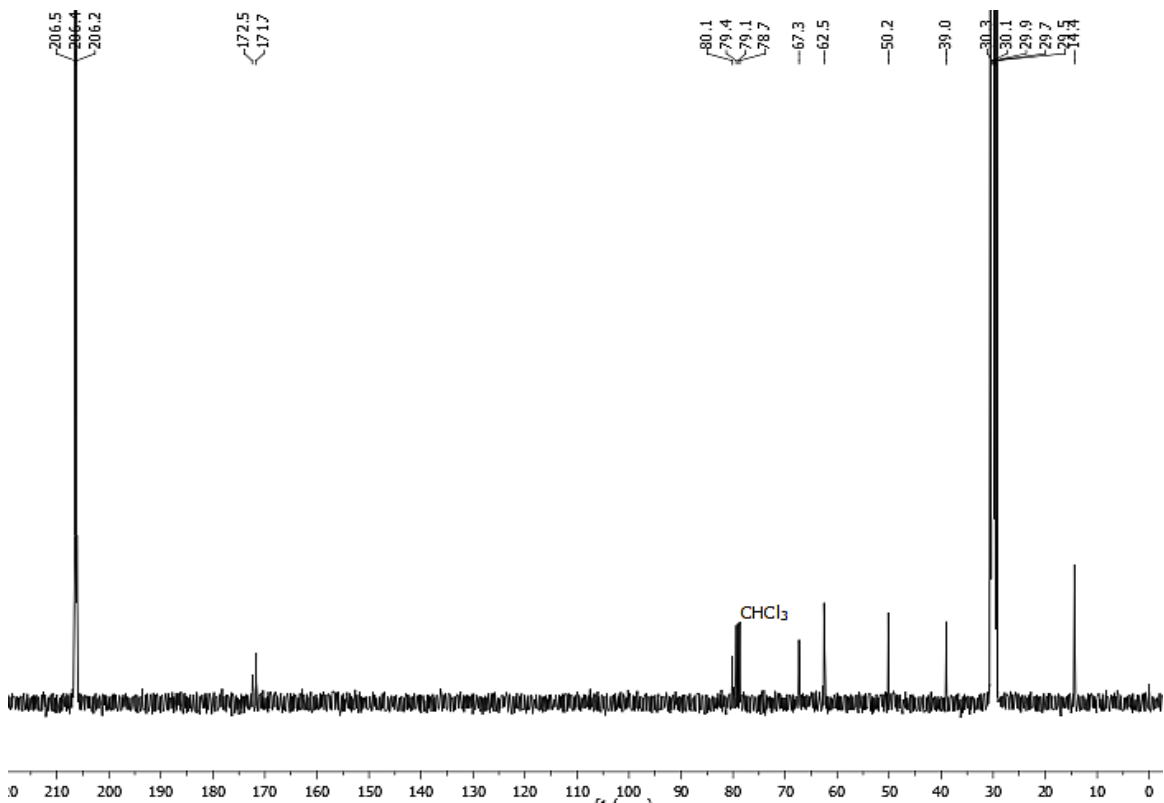
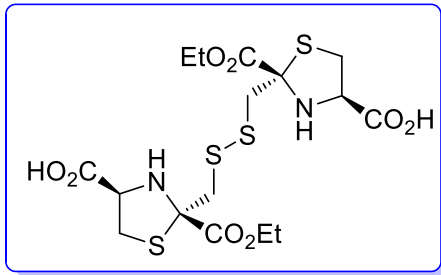
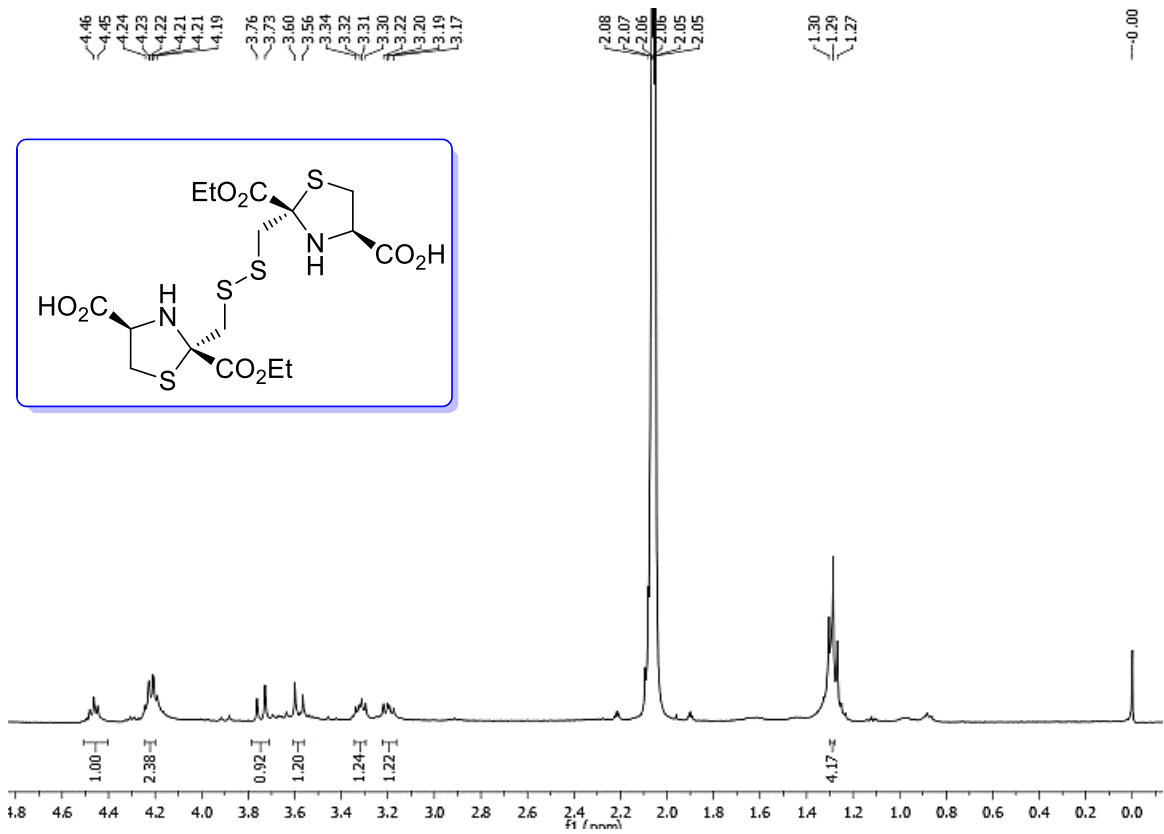
Compuesto L-anti-2:



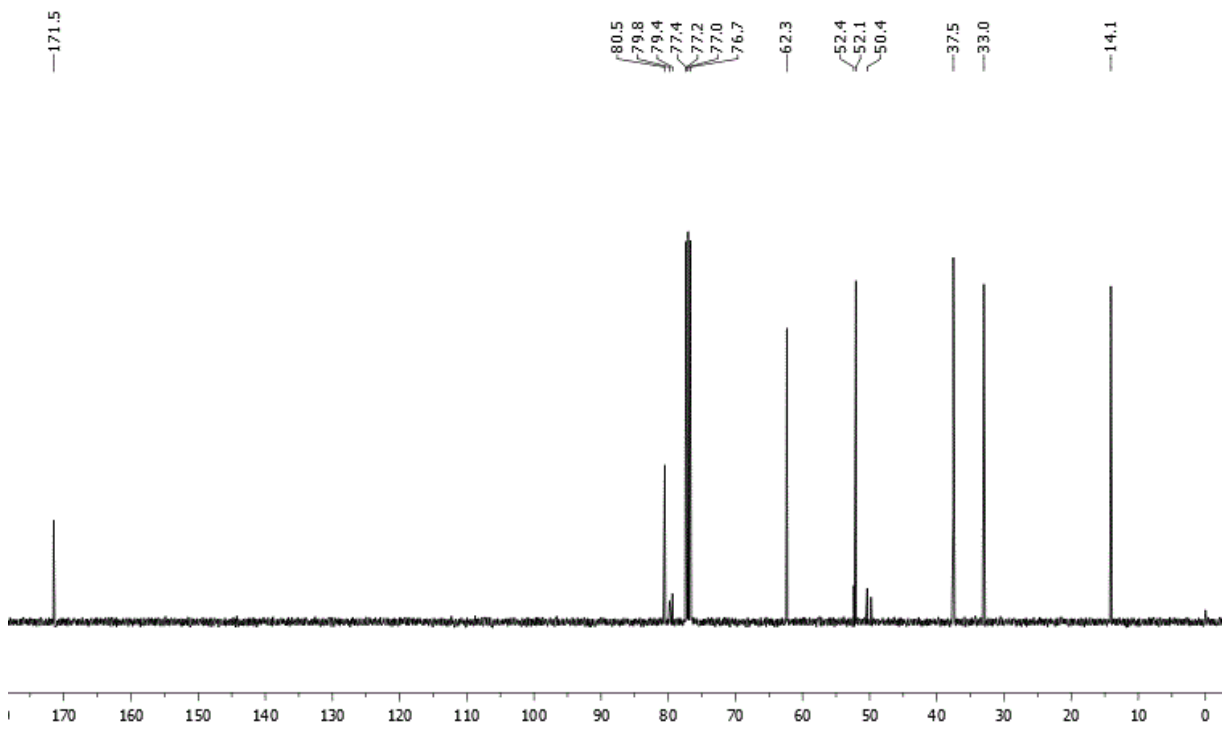
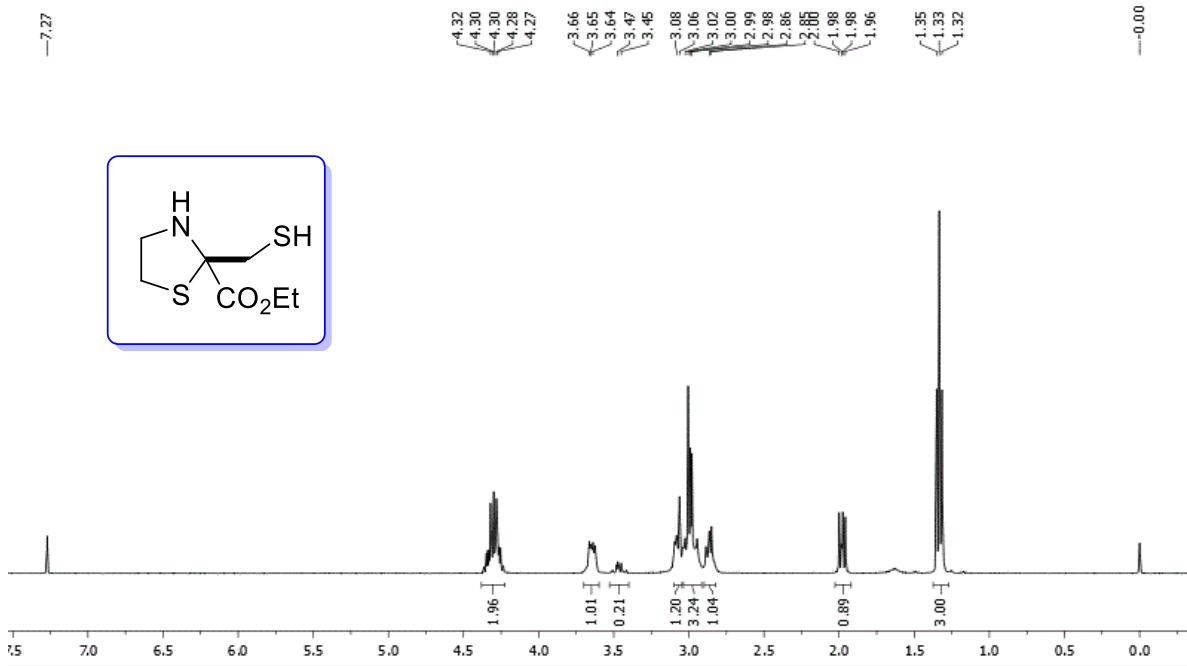
Compuesto L-syn-2:



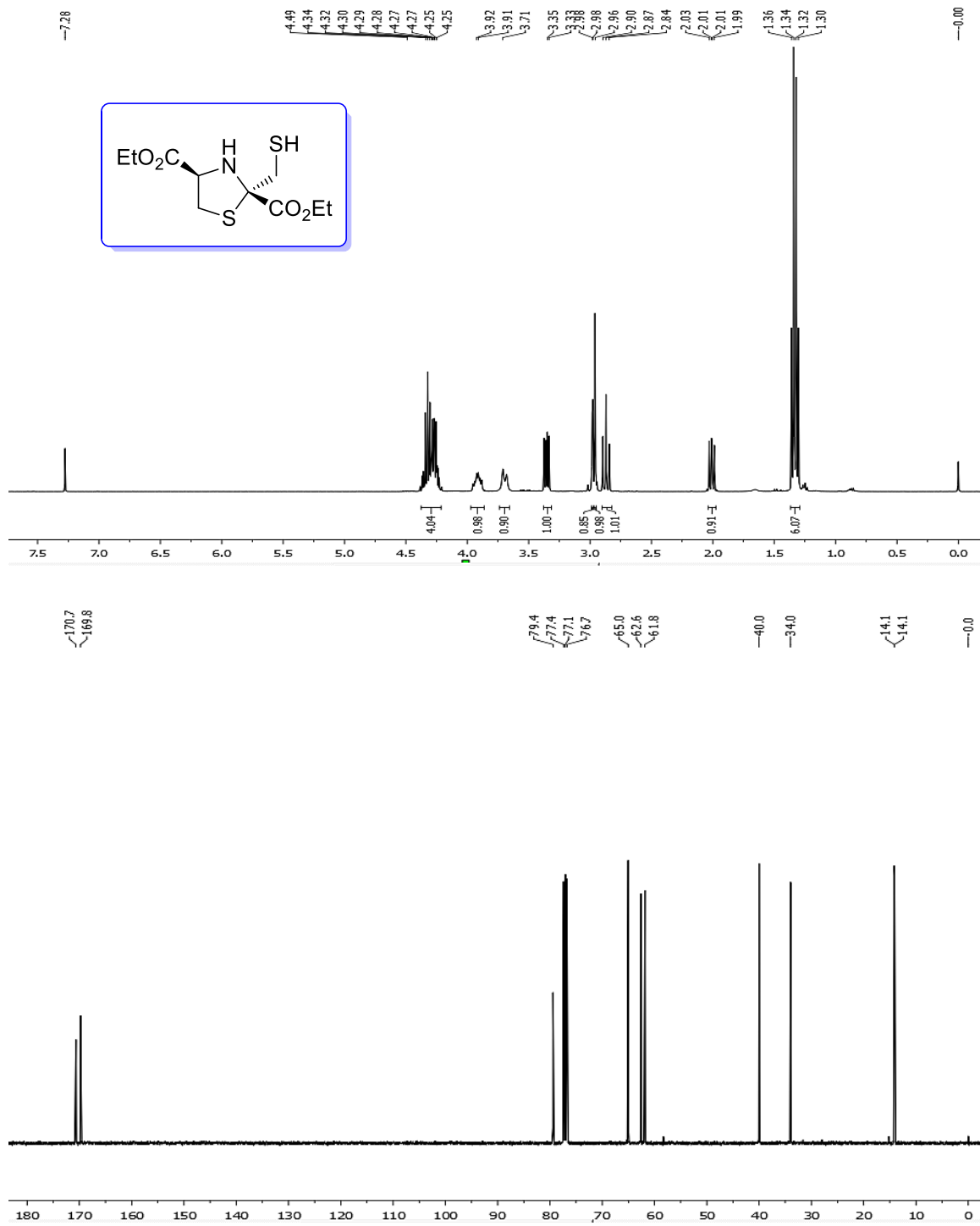
Compuesto 4:



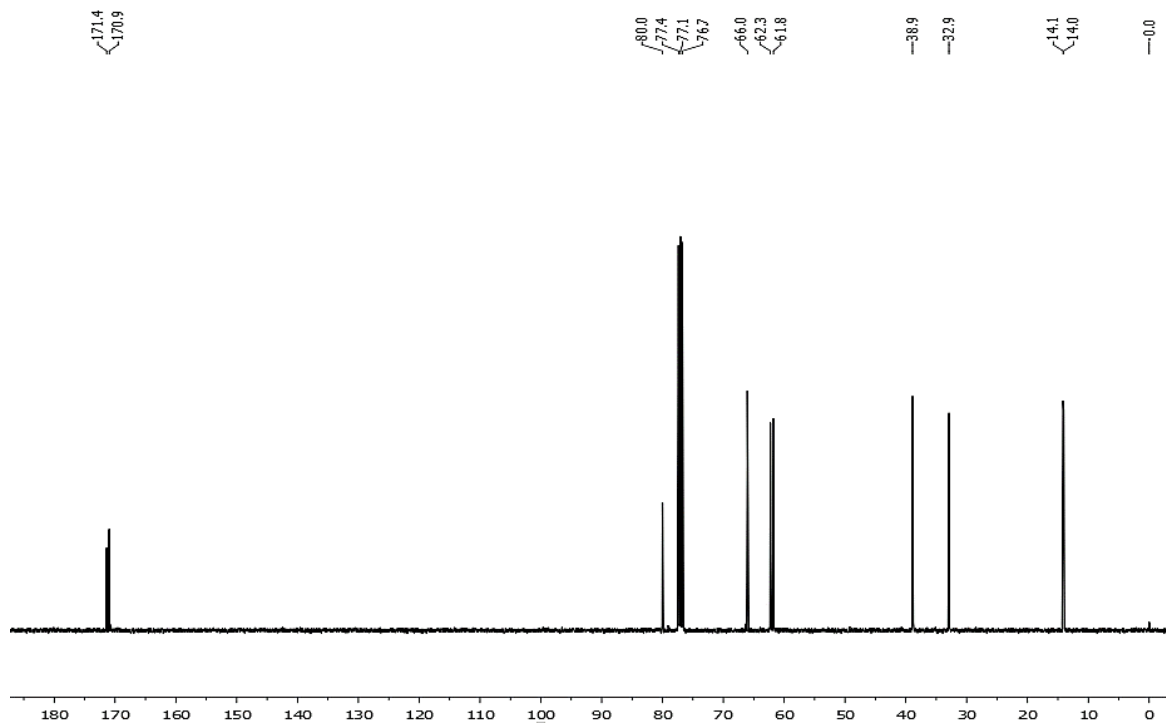
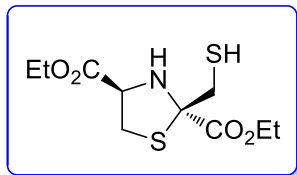
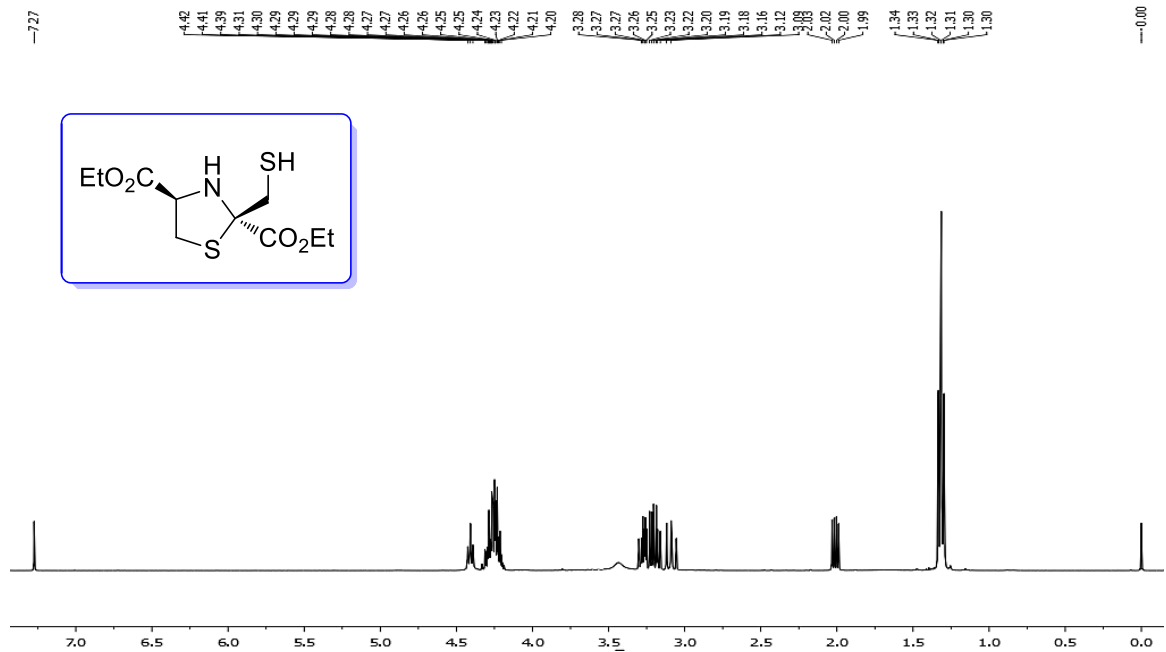
Compuesto **± 5** (mezcla **± 5:6** 90:10)



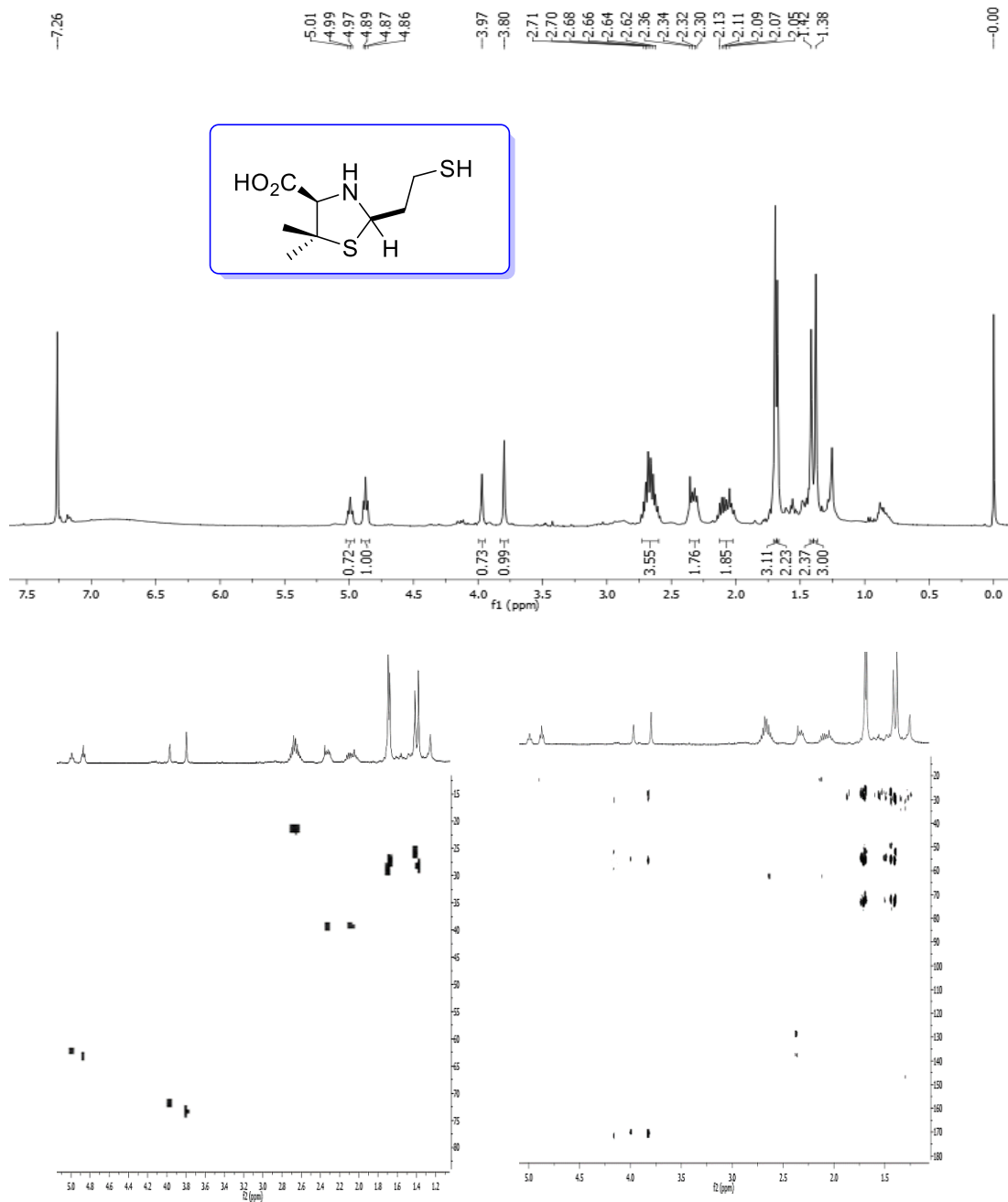
Compuesto L-anti-7:



Compuesto L-syn-7:

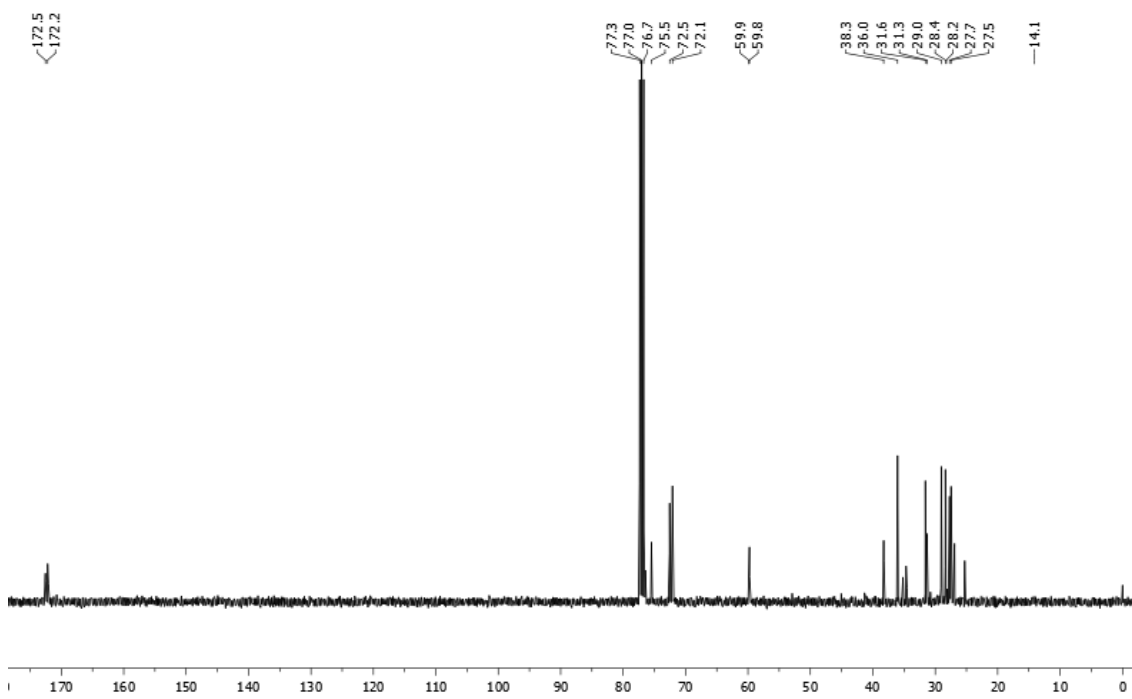
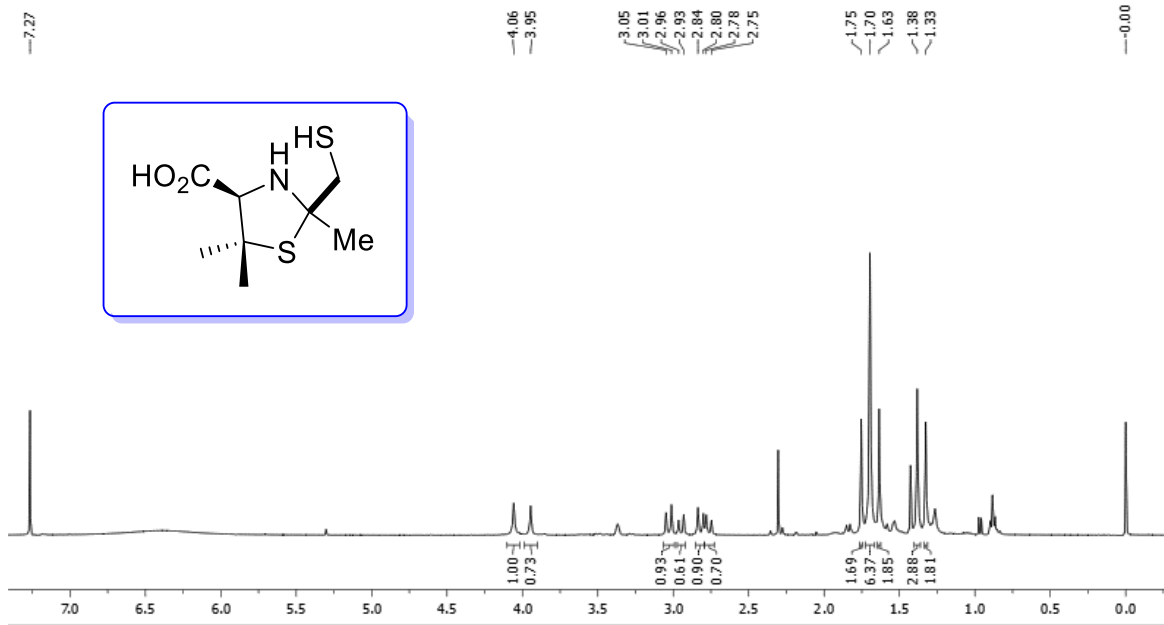


Compuesto L-anti/syn **12** (relación 60:40):

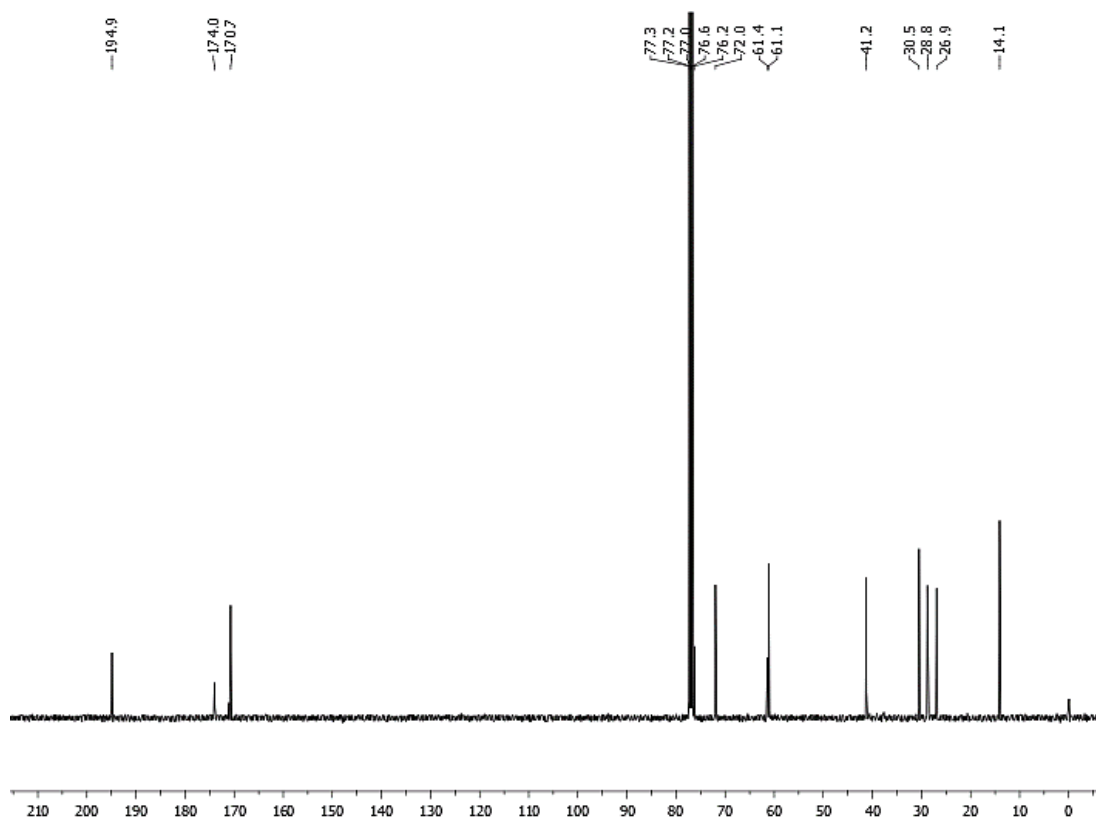
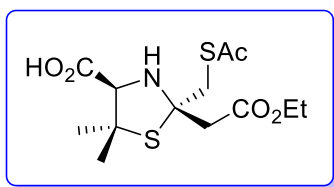
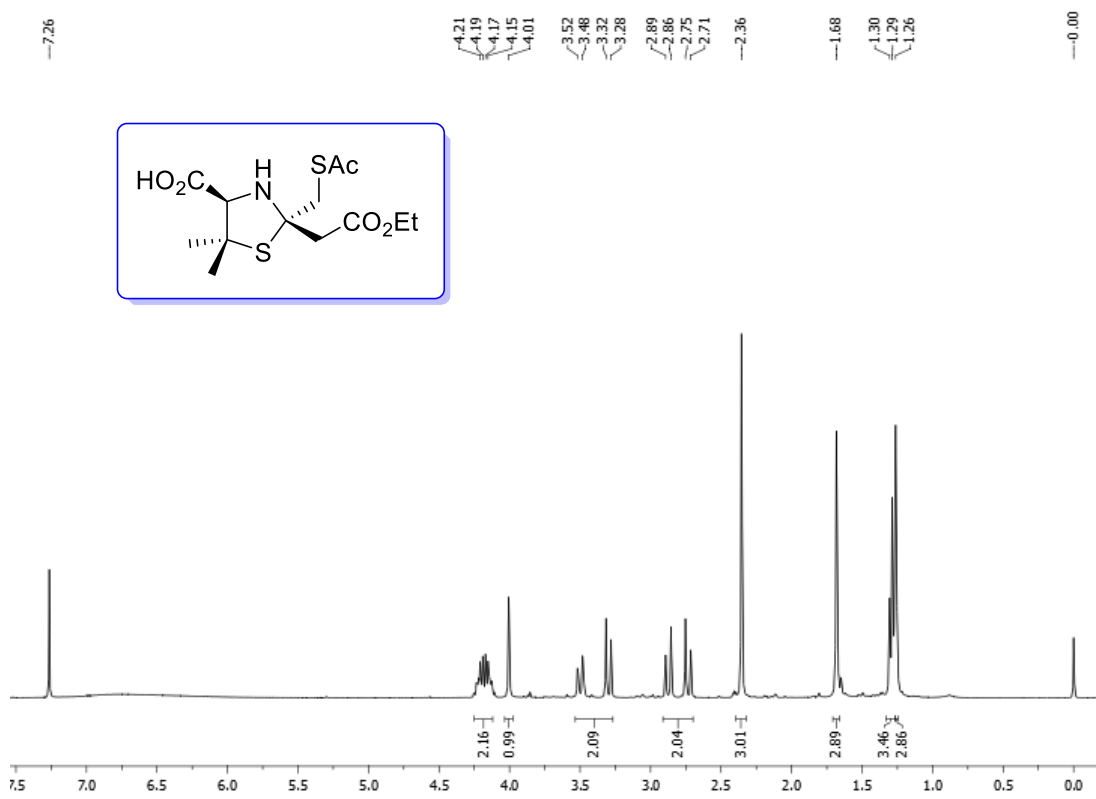


Espectros bidimensionales: HSQC-RMN (Izquierda); HMBC -RMN (Derecha)

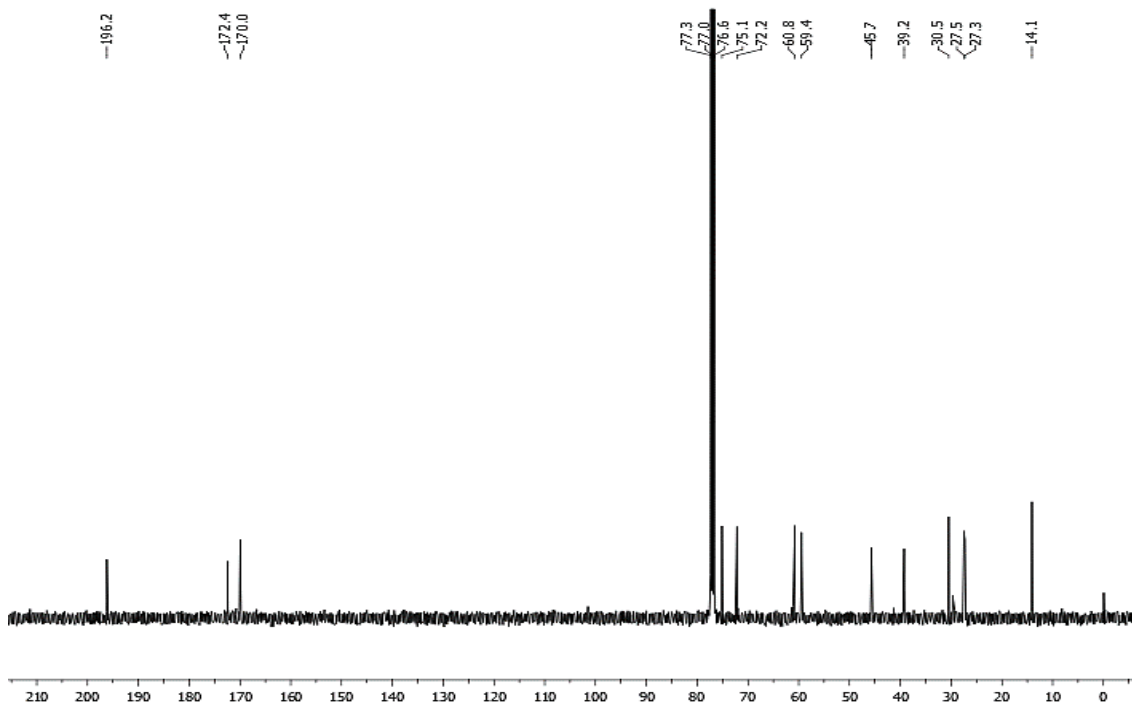
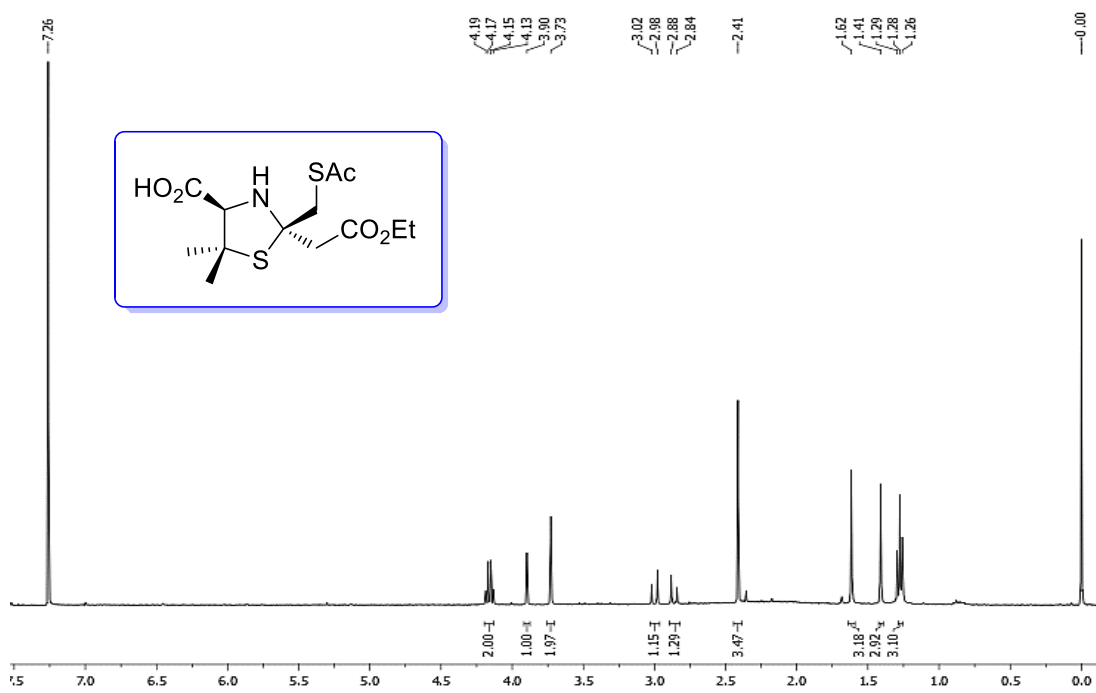
Compuesto L-*anti*/syn-14 (relación 60:40):



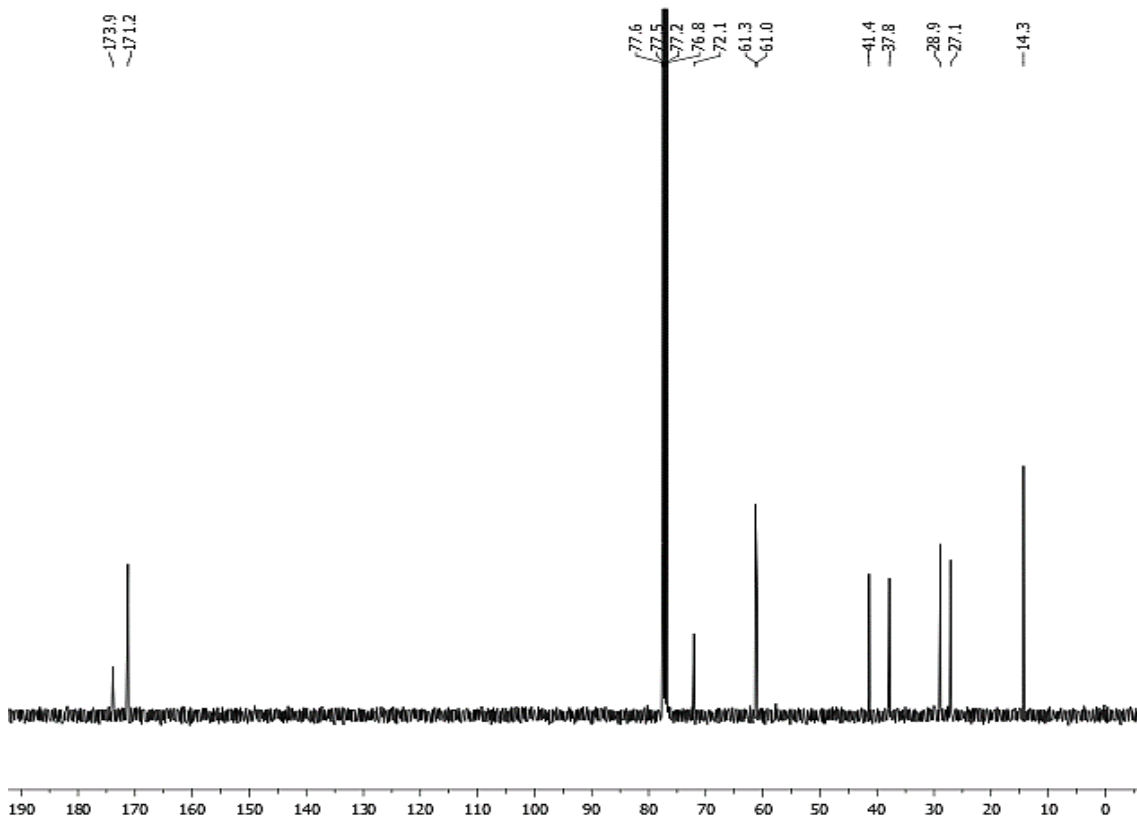
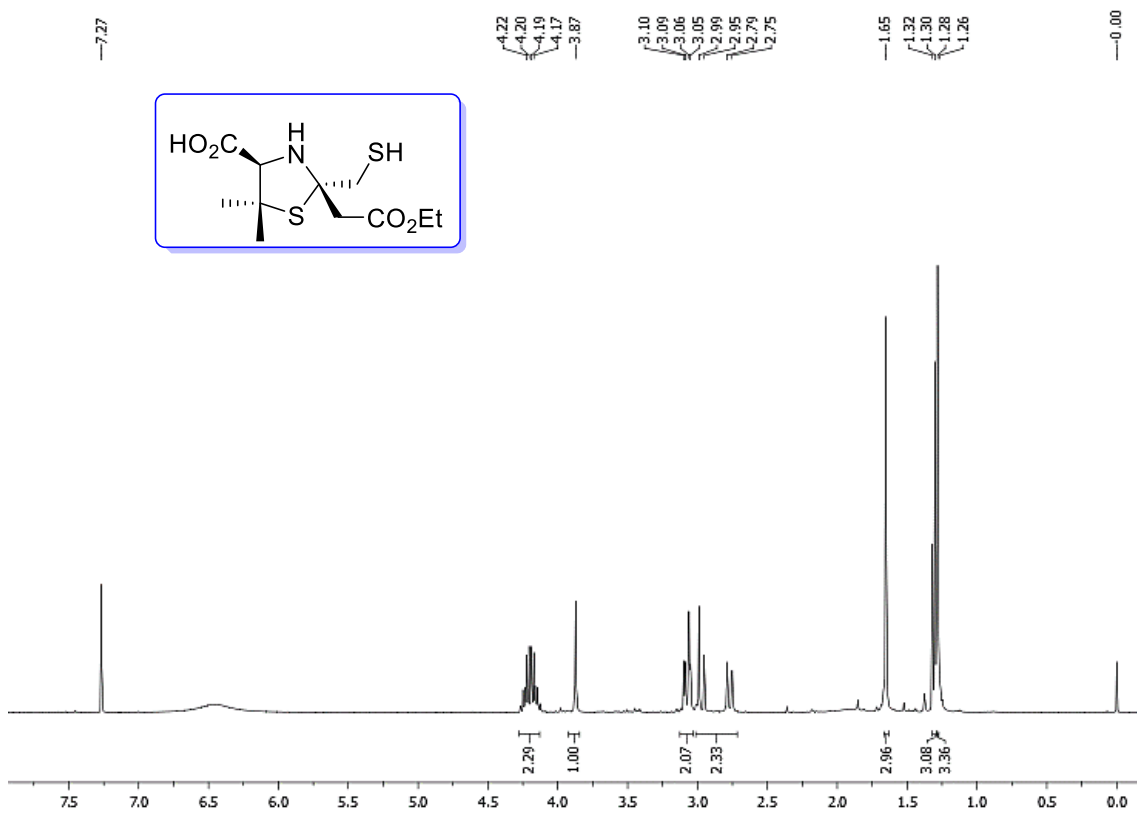
Compuesto L-*anti*-21:

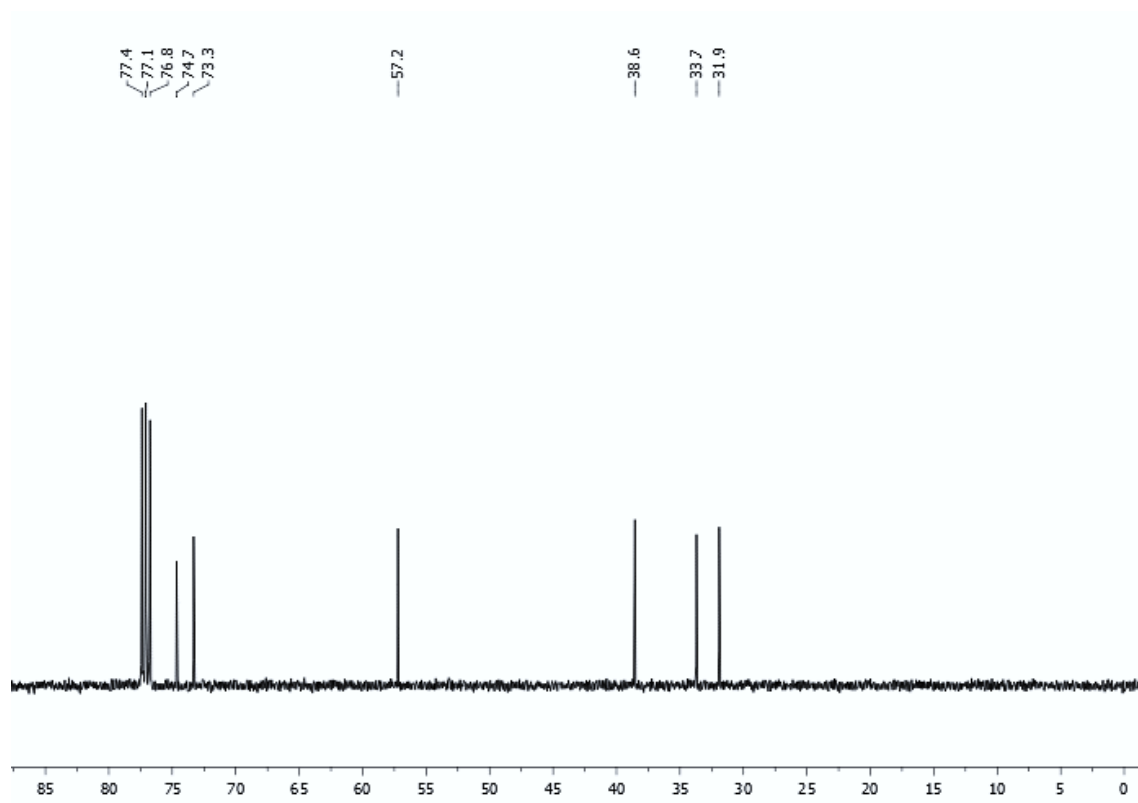
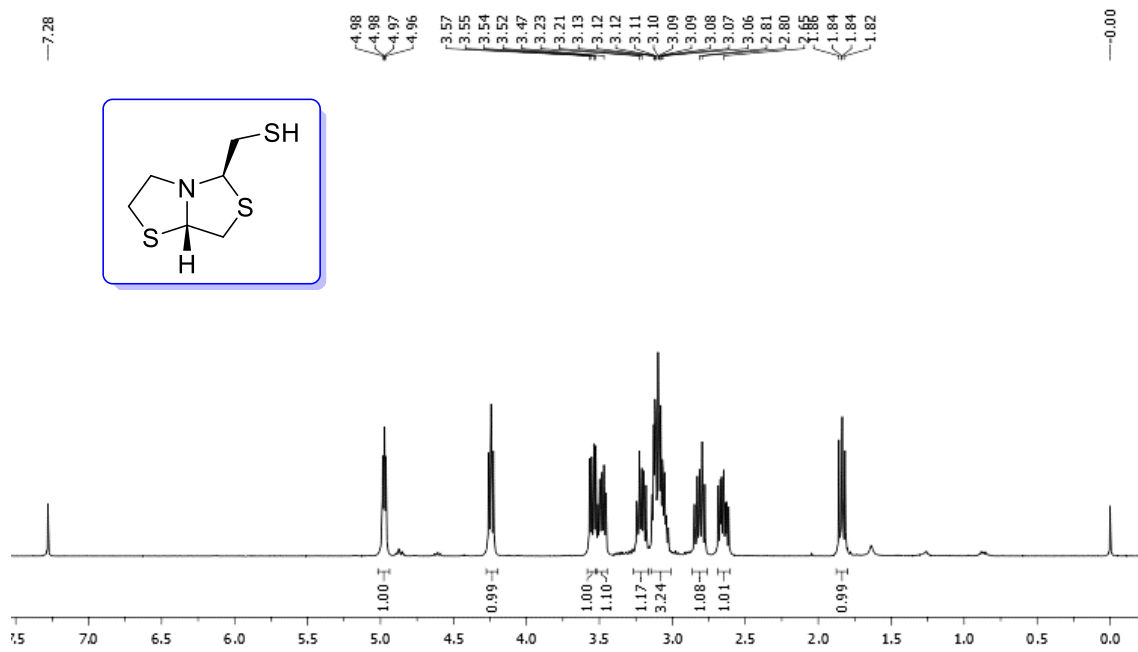


Compuesto L-syn-21:

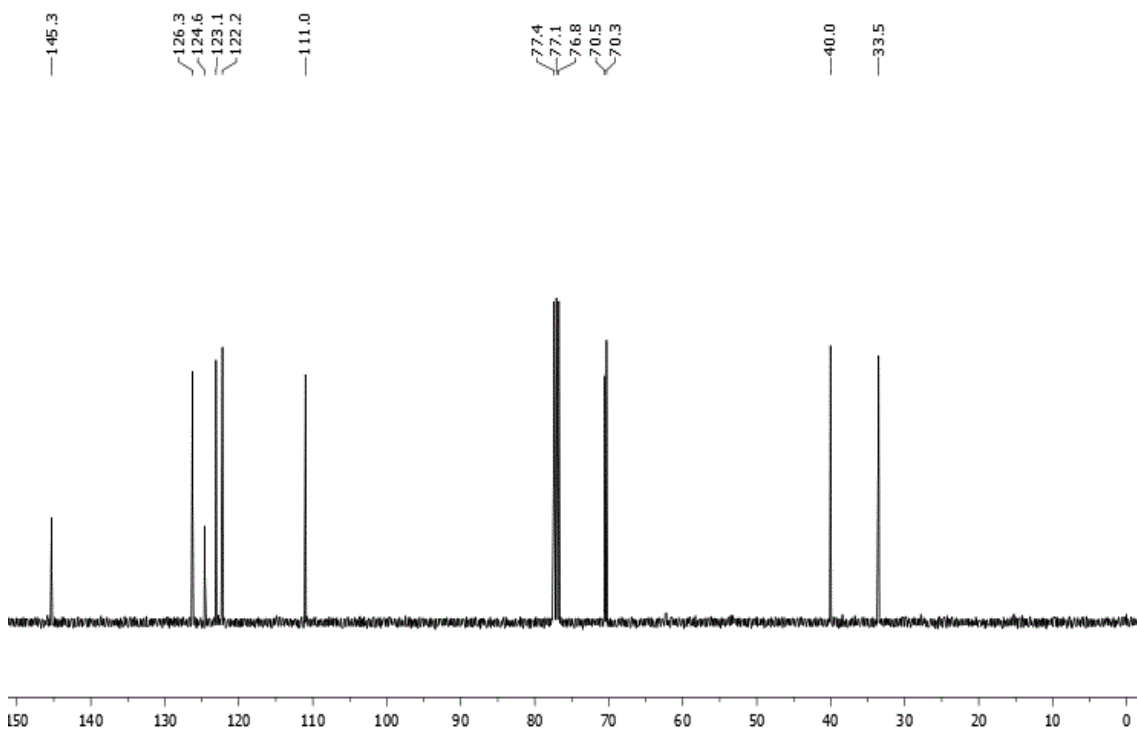
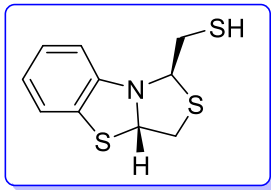
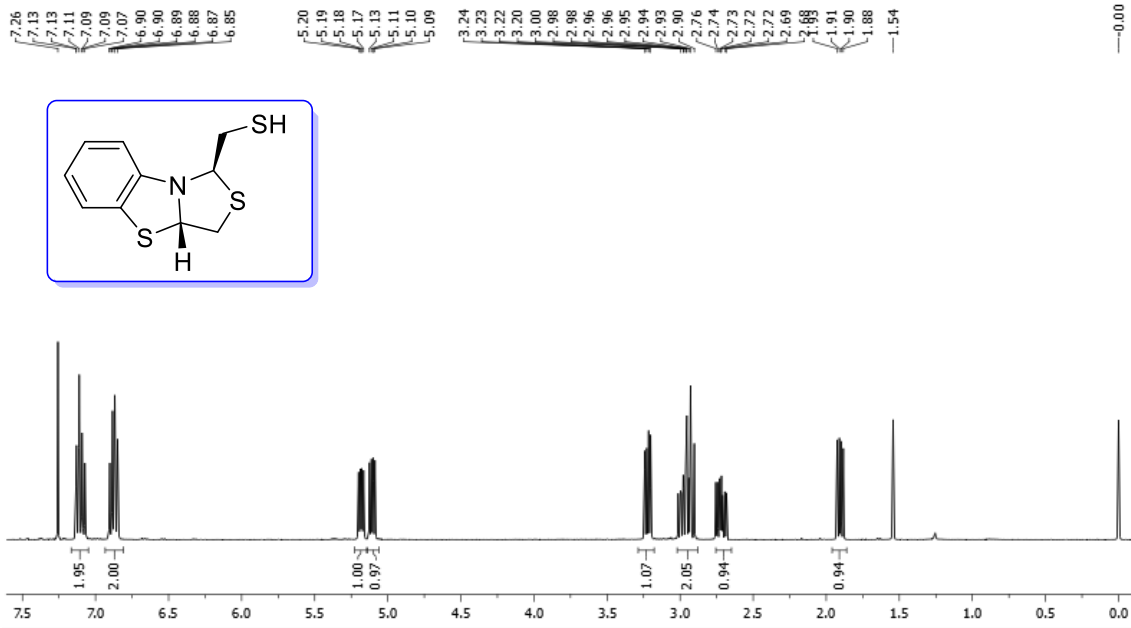


Compuesto L-anti-22:

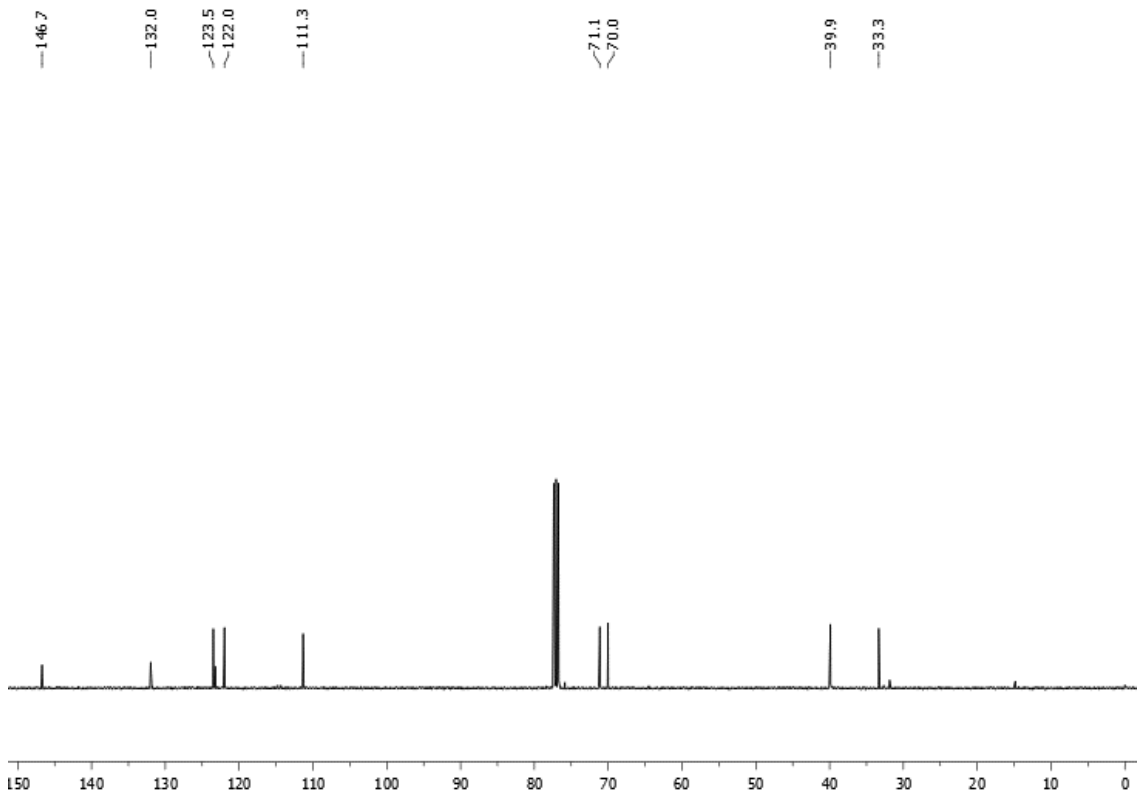
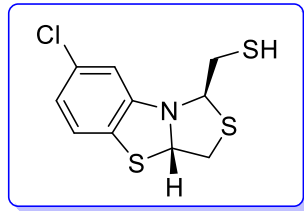
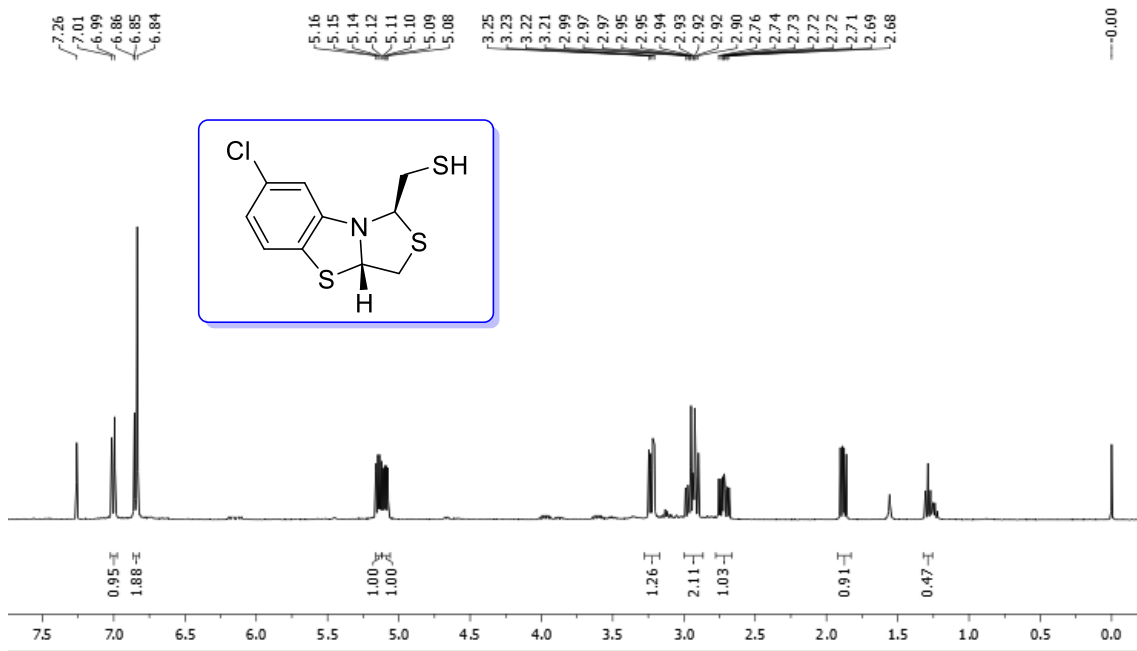


Compuesto \pm **27** (*syn/anti* 90:10):

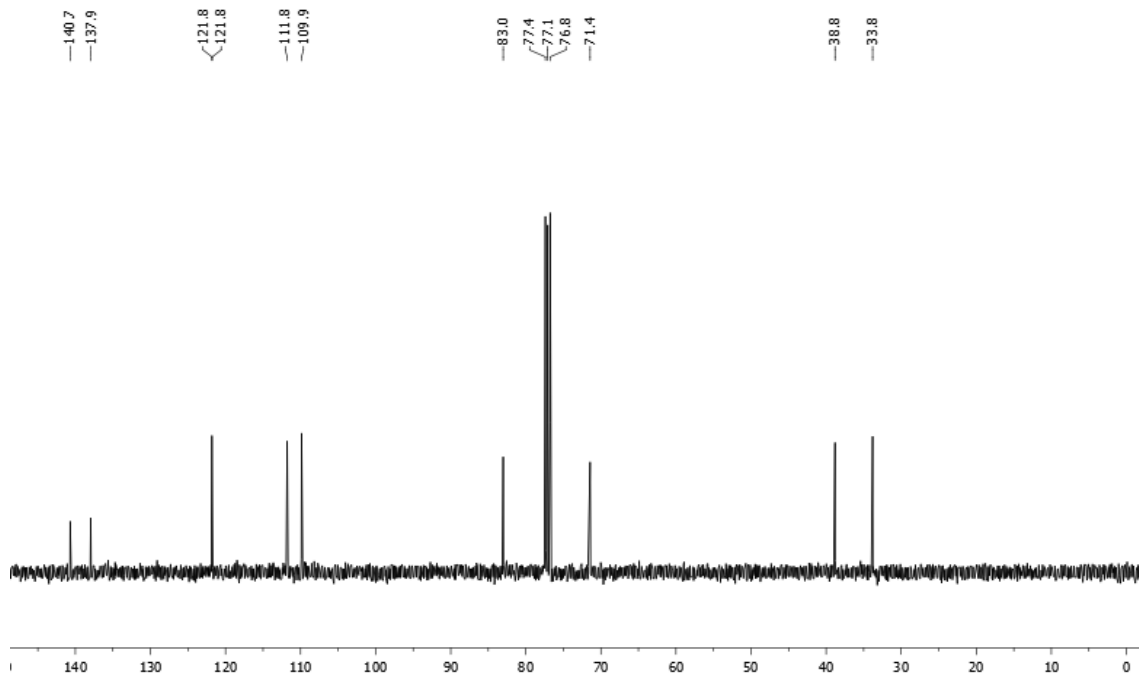
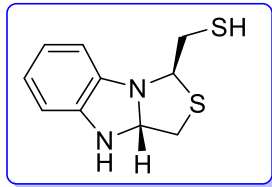
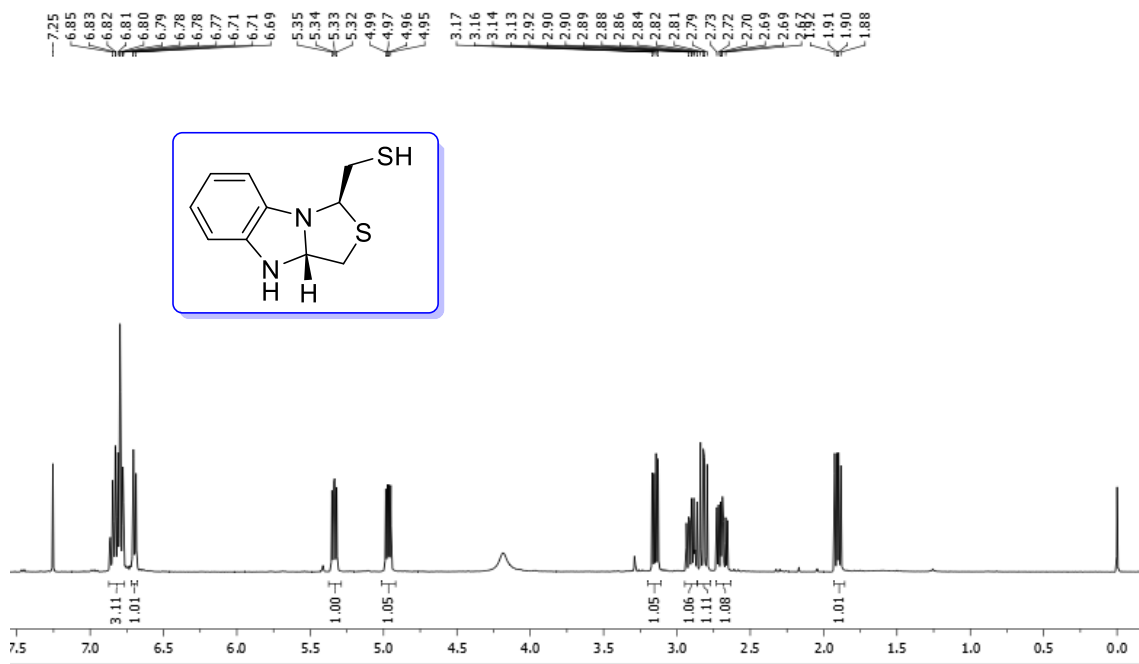
Compuesto \pm 40:



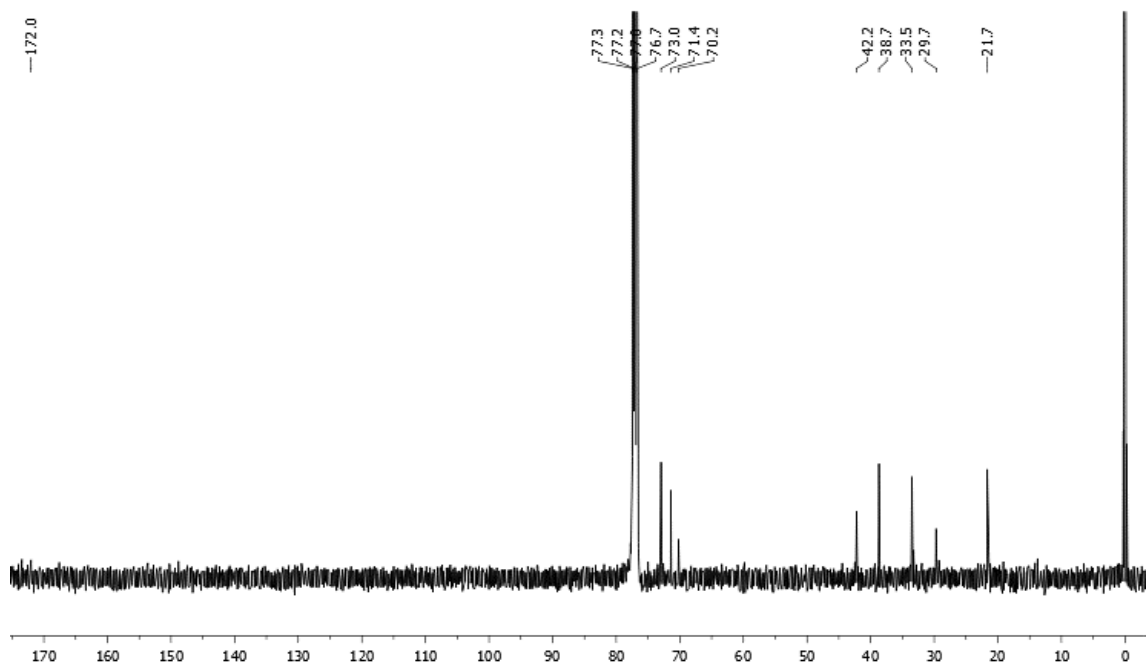
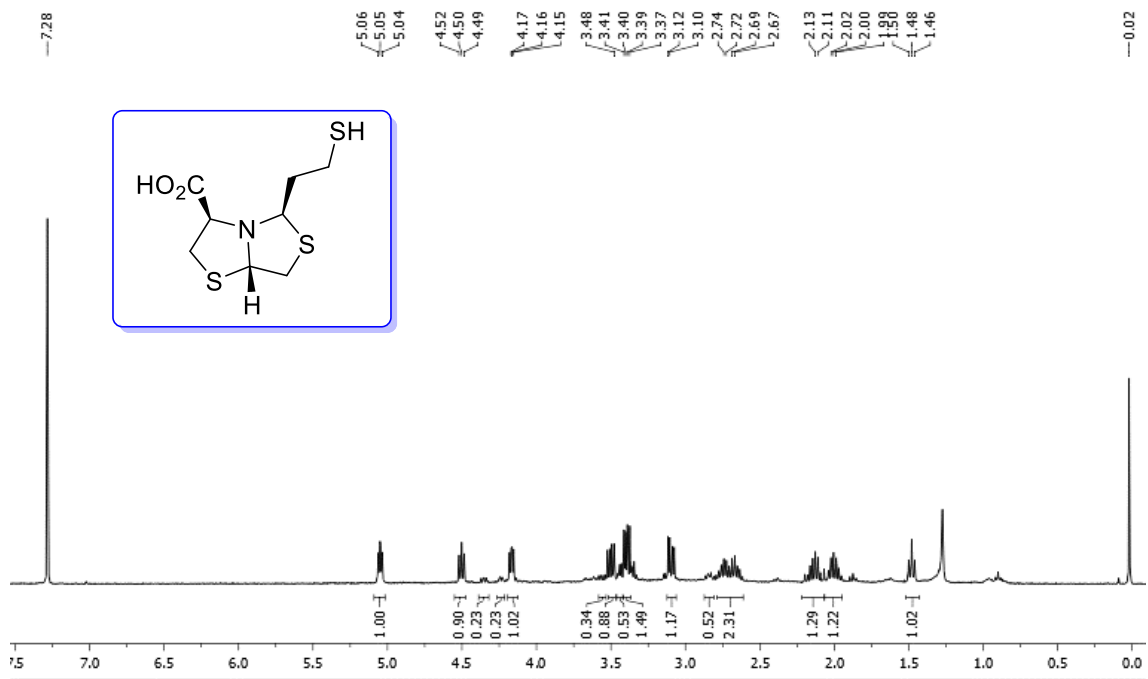
Compuesto \pm 41:



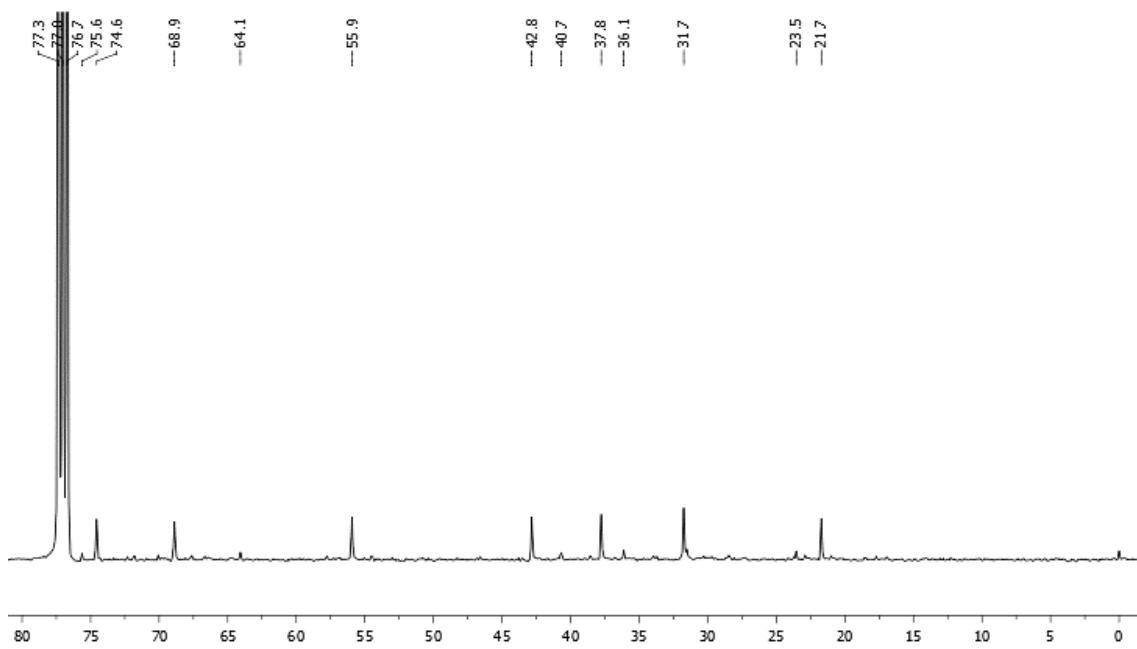
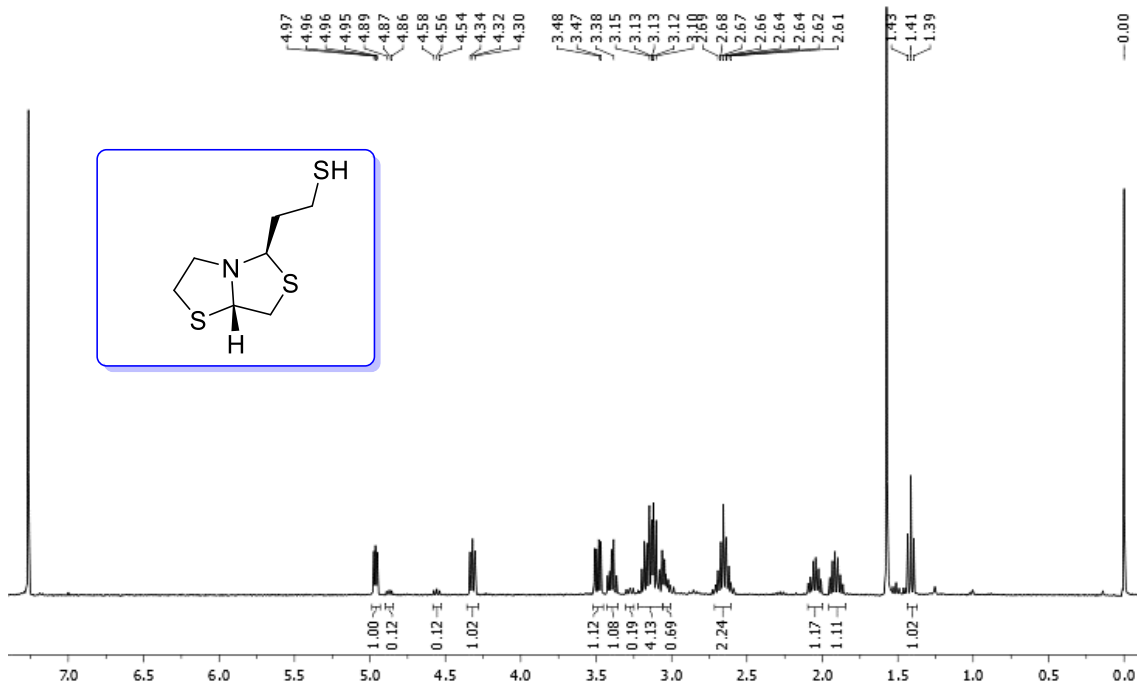
Compuesto \pm 42:



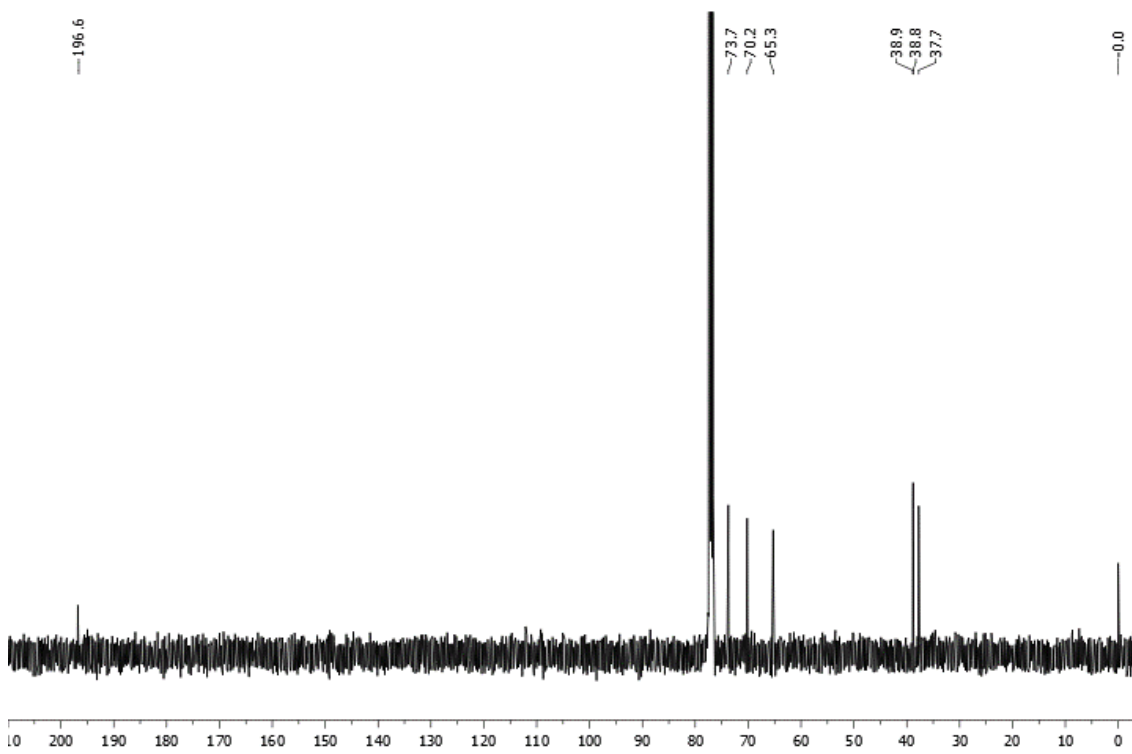
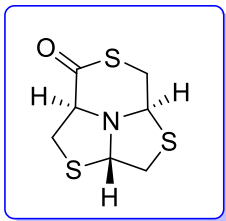
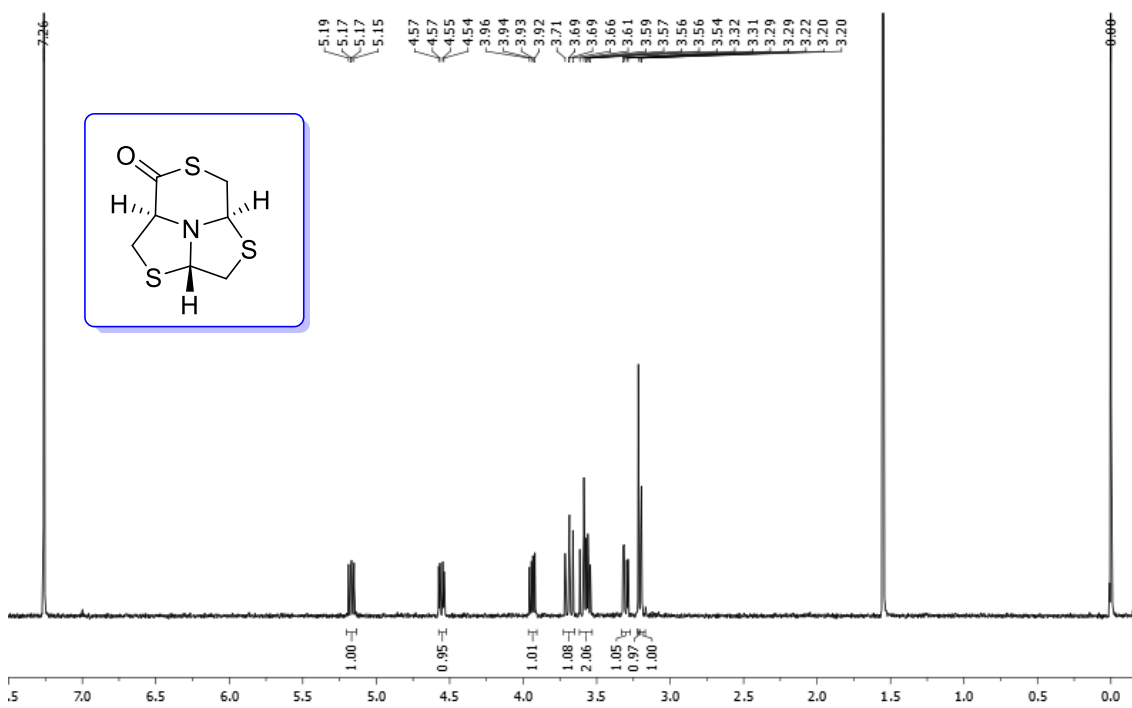
Compuesto L-50 (*syn/anti* 82:18):



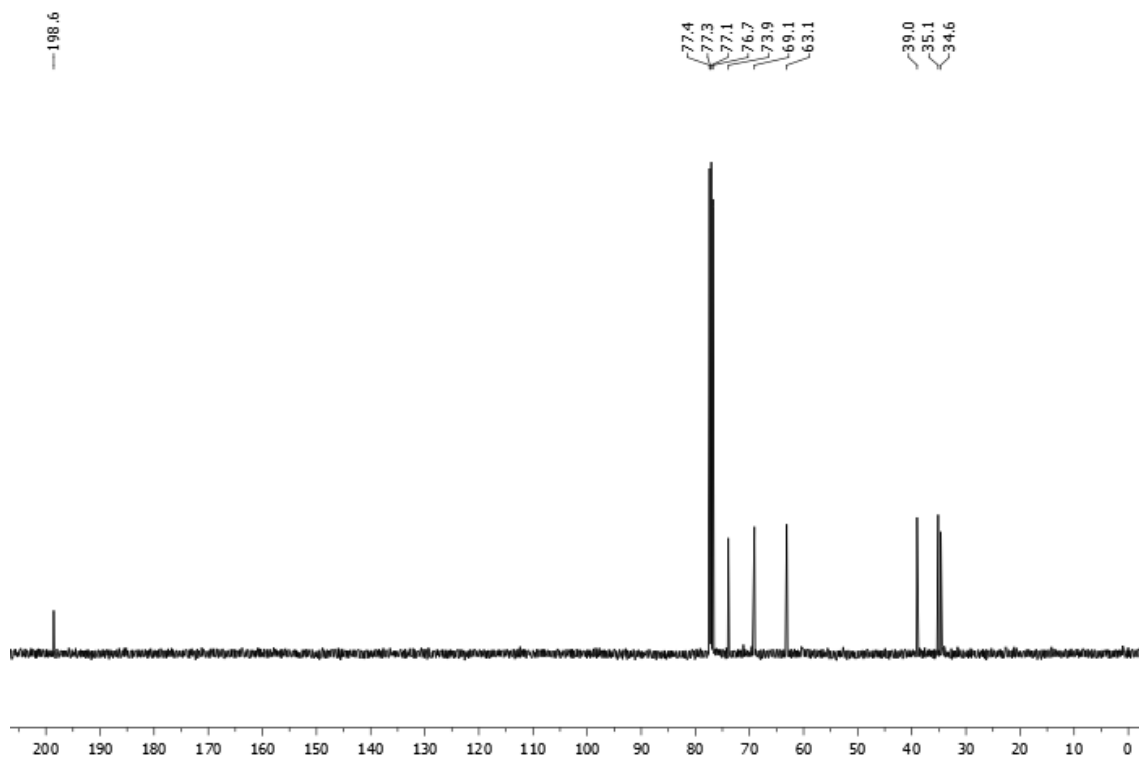
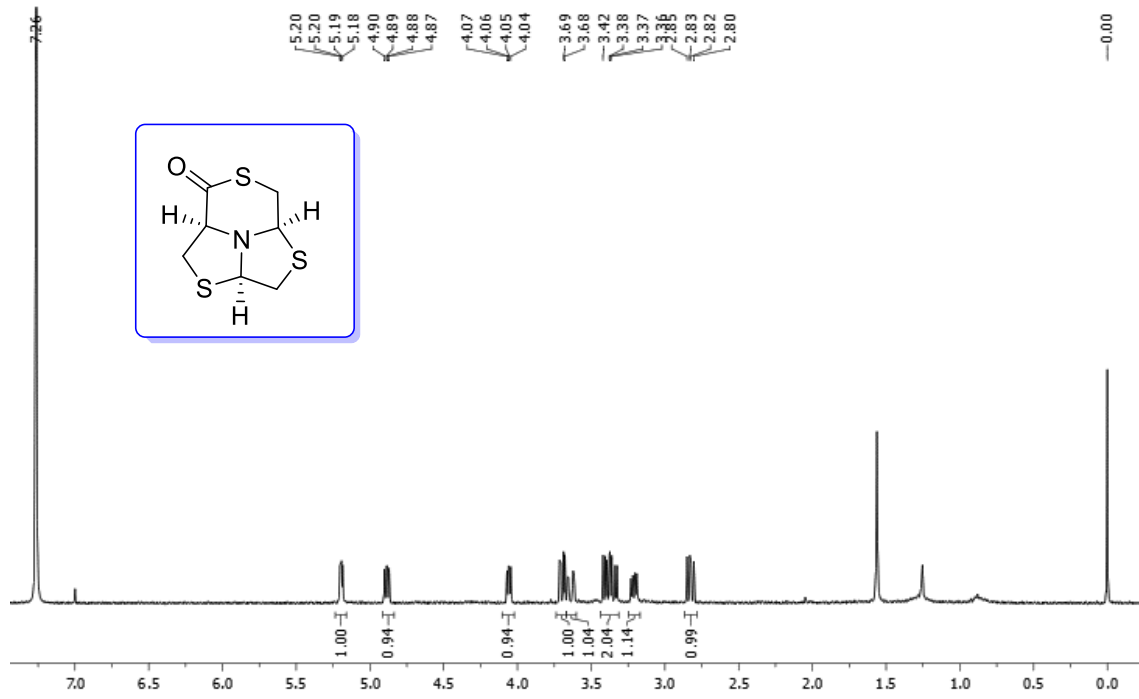
Compuesto \pm 51:



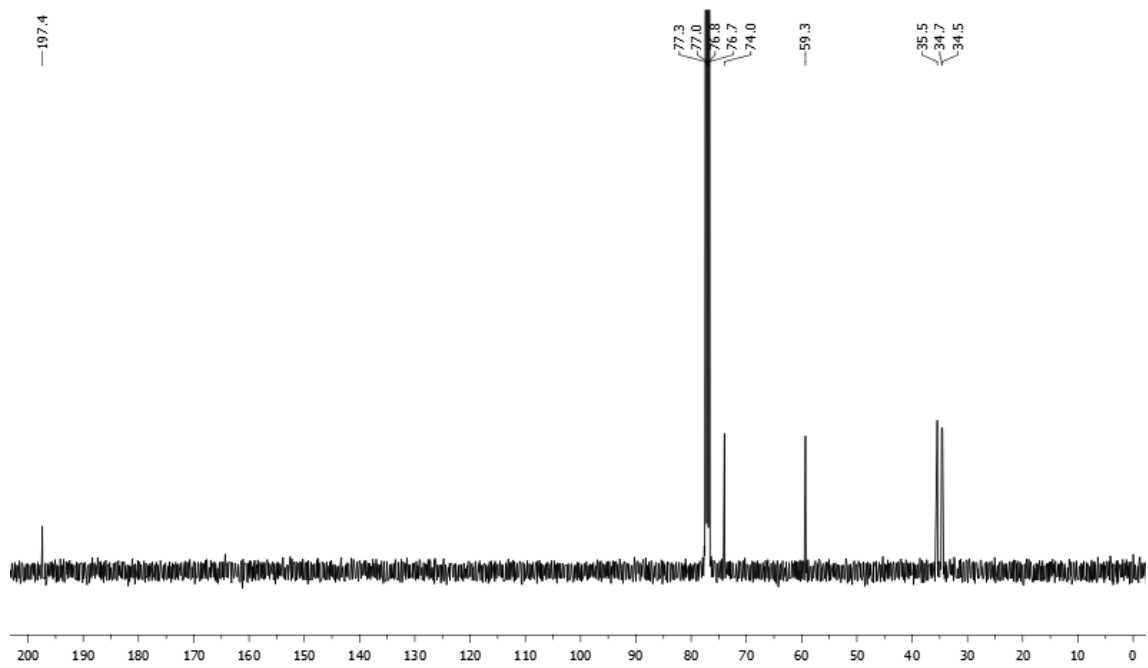
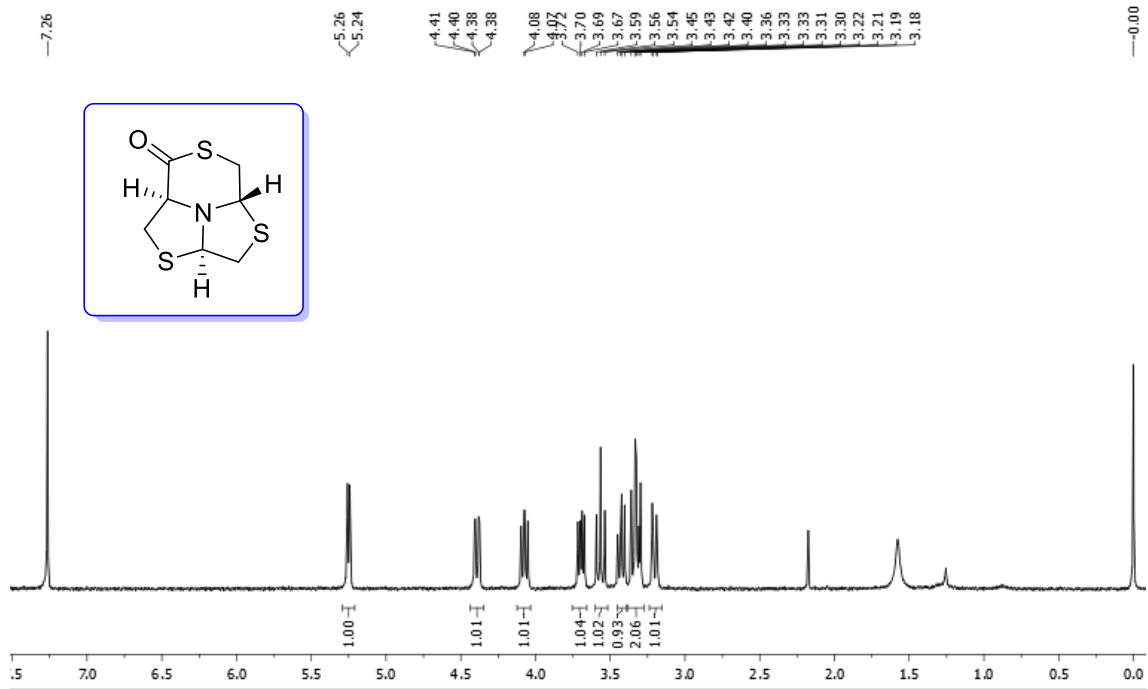
Compuesto 55a:



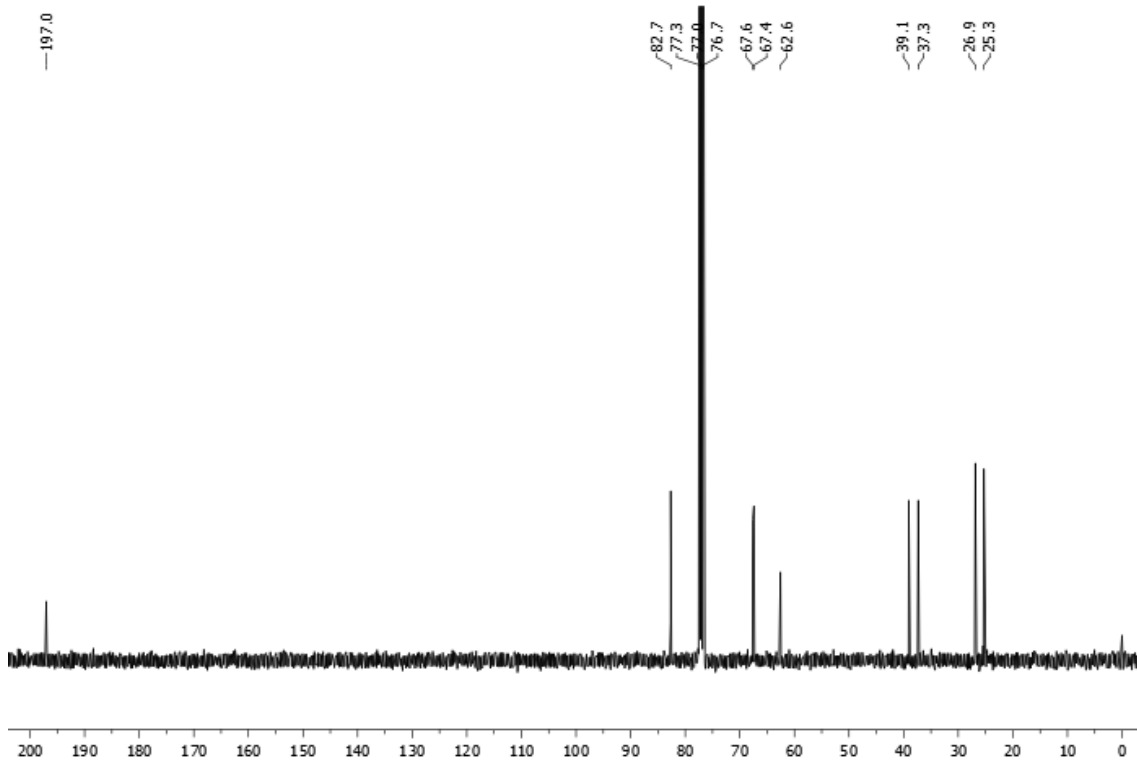
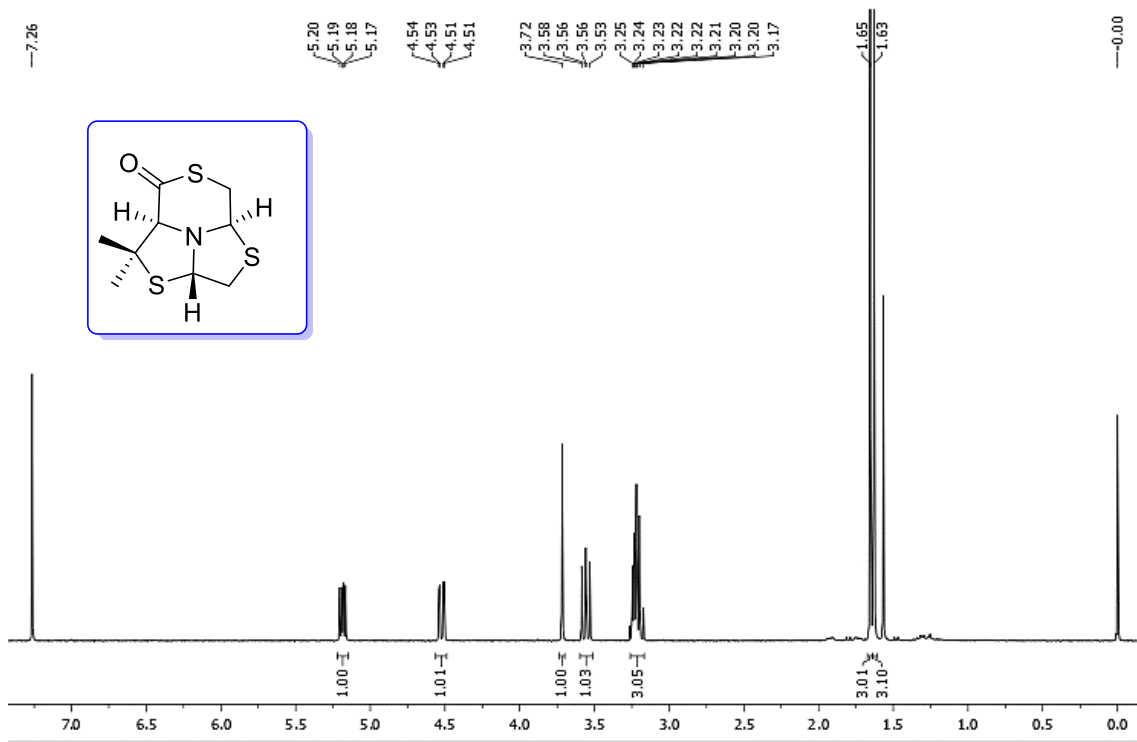
Compuesto **55b**:



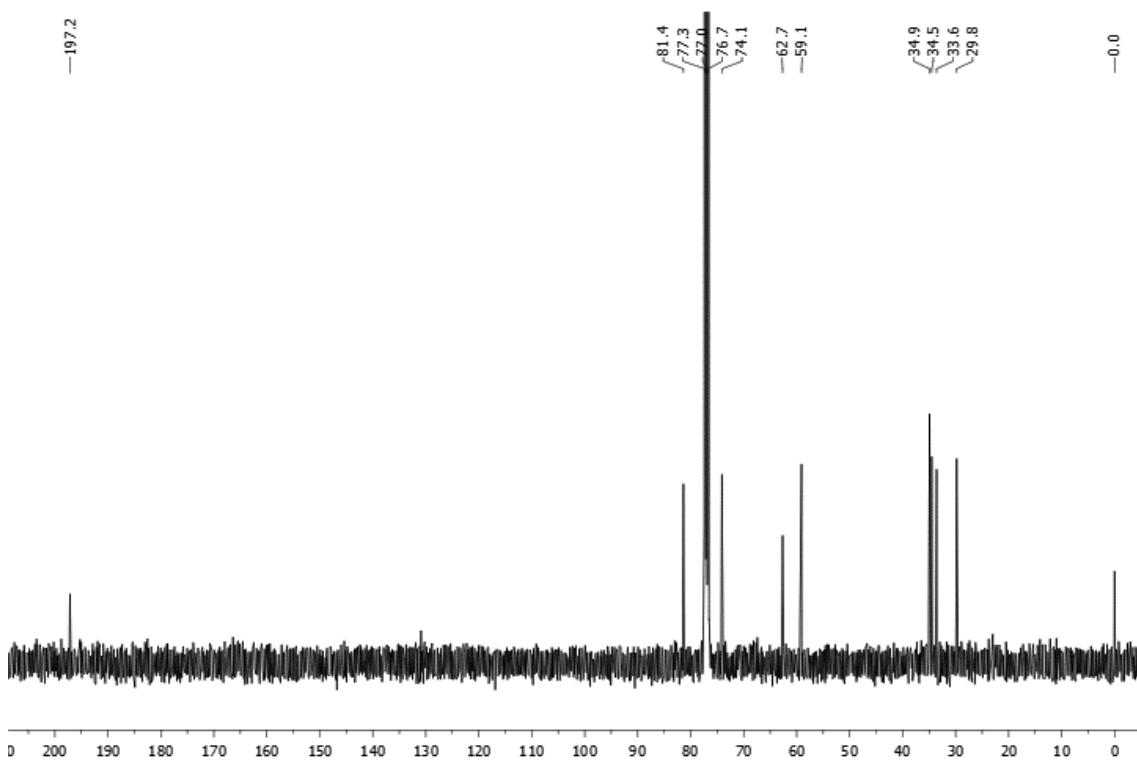
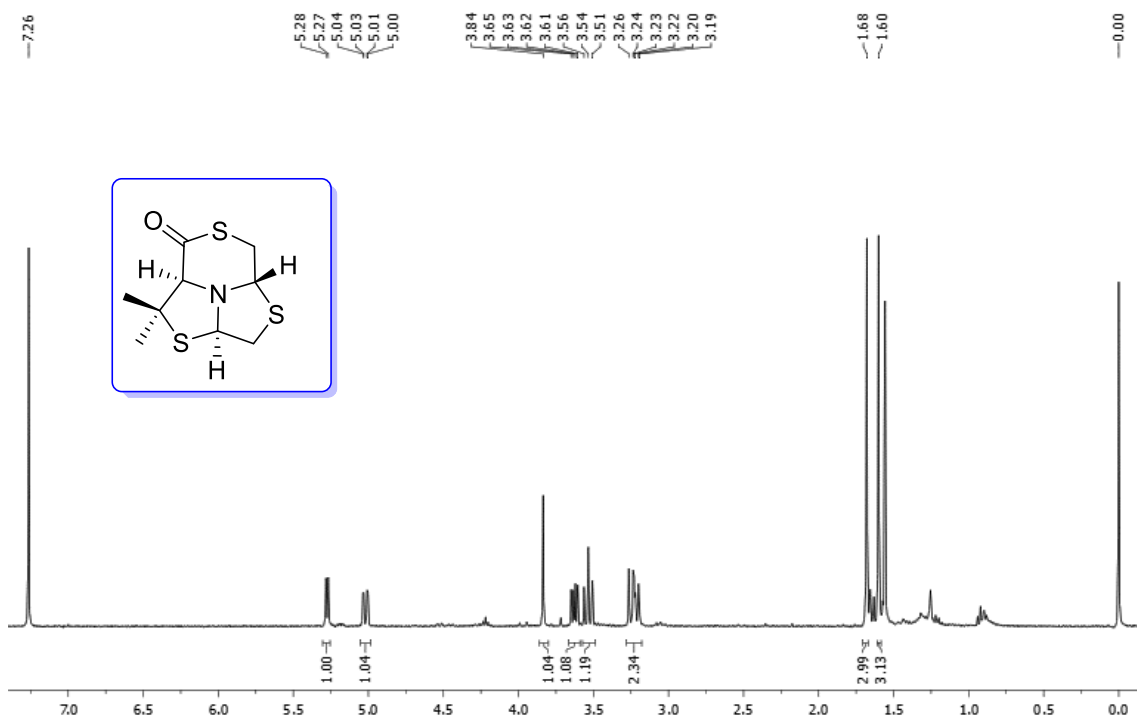
Compuesto 55c:



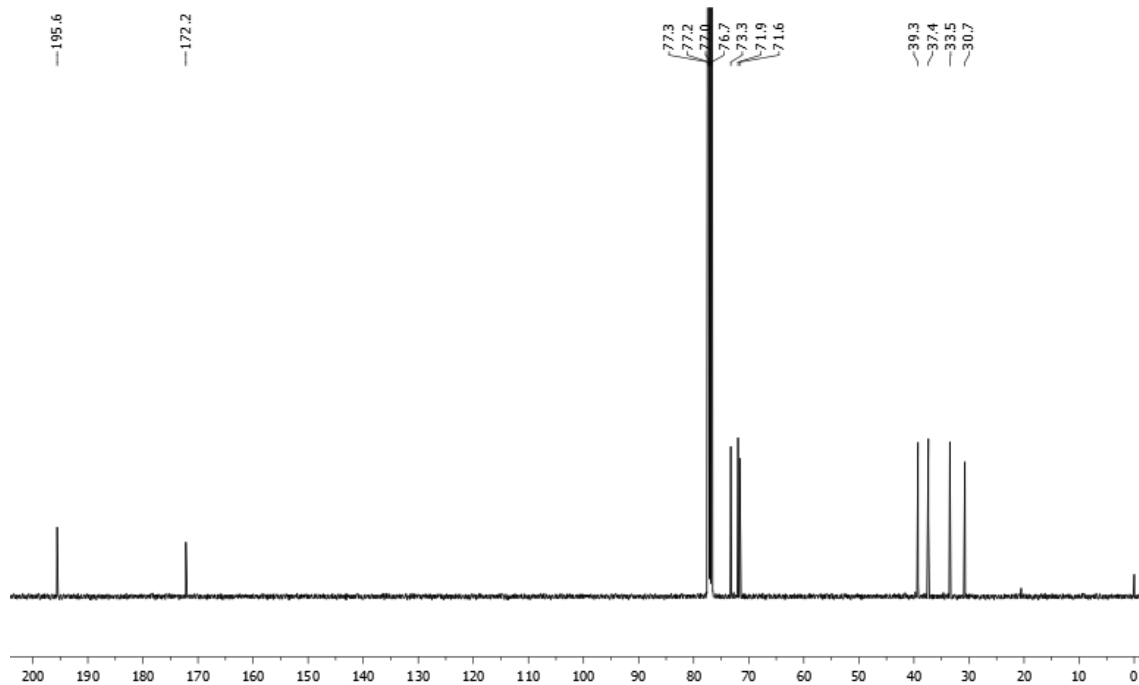
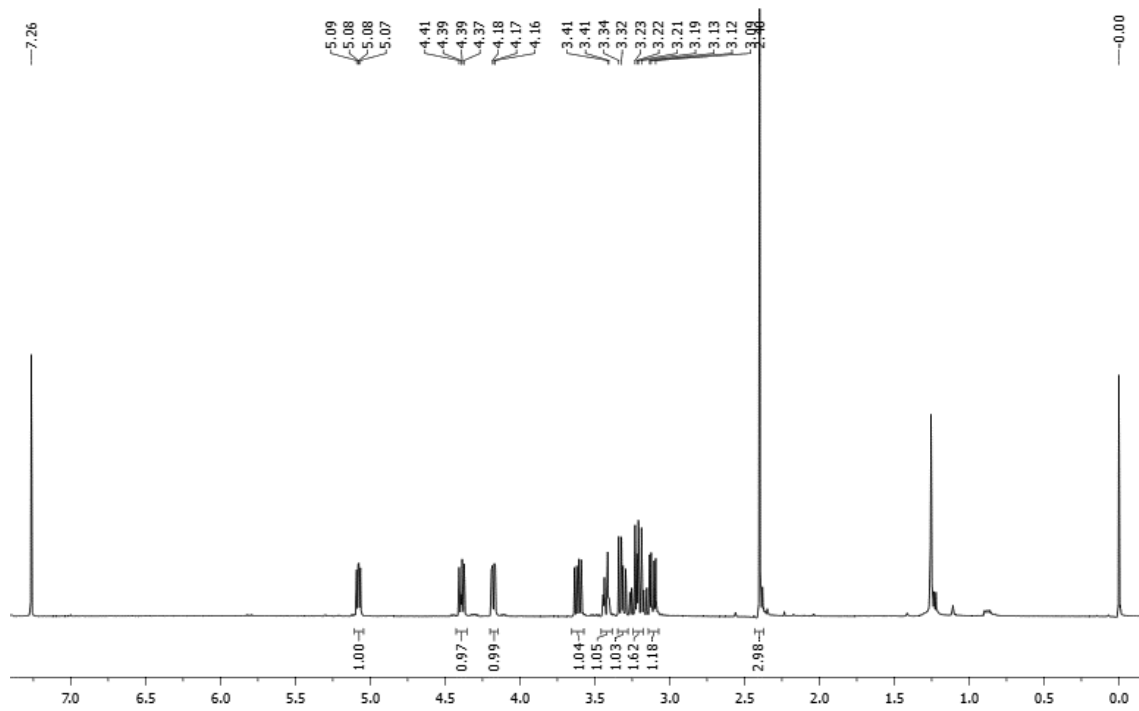
Compuesto 56a:



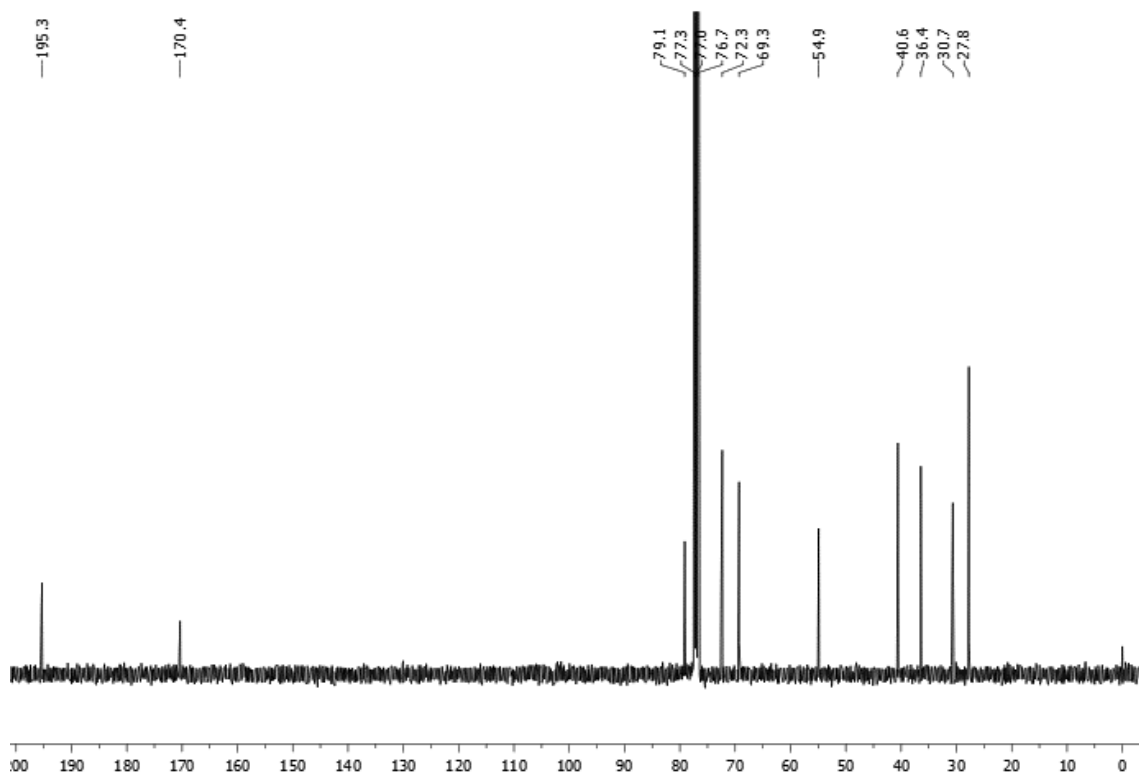
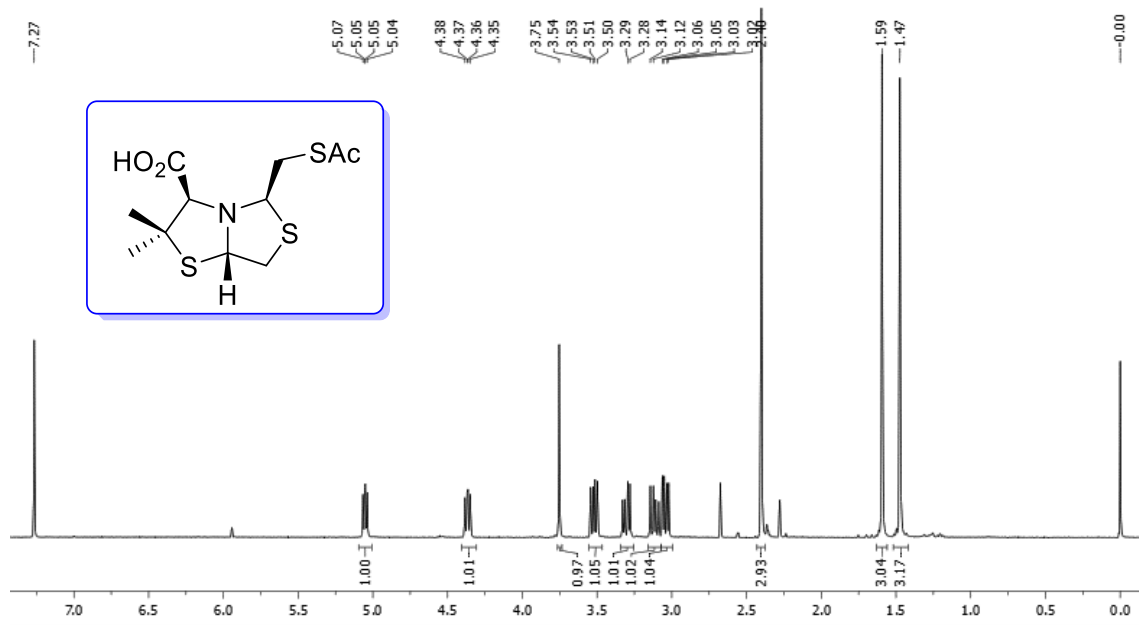
Compuesto 56c:



Compuesto L-57:



Compuesto L-58:



Bibliografía

- ¹ Perrin D., Amarengo W., (1988) Purification of Laboratory Chemicals, Pergamon Press, Oxford
- ² H. T. Nagasawa, D. J. W. Goon, D. L. Crankshaw, R. Vince, S. E. Patterson. Novel, Orally Effective Cyanide Antidotes, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50(26), 6462–6464, doi.org/10.1021/jm7011497
- ³ B. Zhang, G. Shan, Y. Zheng, X. Yu, Z-W. Ruan, Y. Li, X. Lei. Synthesis and Preliminary Biological Evaluation of Two Fluoroolefin Analogs of Largazole Inspired by the Structural Similarity of the Side Chain Unit in Psammaphin A, *Mar. Drugs*, **2019**, 17(6), 333, doi.org/10.3390/md17060333
- ⁴ C. M. Sousa, J. Berthet, S. Delbaere, P. J. Coelho. Photochromic Fused-Naphthopyrans without Residual Color, *J.Org. Chem.*, **2012**, 77, 3959–3968, doi.org/10.1021/jo3003216
- ⁵ P. Hinchliffe, M. M. González, M. F. Mojica, J. M. González, V. Castillo, C. Saiz, M. Kosmopoulou, C. L. Tooke, L. I. Llarrull, G. Mahler, R. A. Bonomo, A. J. Vila and J. Spencer. Cross-class metallo- β -lactamase inhibition by bisthiazolidines reveals multiple binding modes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2016**, 113, E3745–E3754, doi.org/10.1073/pnas.1601368113
- ⁶ C. Saiz, V. Castillo, P. Fontán, M. Bonilla, G. Salinas, A. Rodríguez-Haralambides, S. G. Mahler. Discovering Echinococcus granulosus thioredoxin glutathione reductase inhibitors through site-specific dynamic combinatorial chemistry, *Mol. Divers.*, **2014**, 18, 1-12, doi.org/10.1007/s11030-013-9485-3
- ⁷ M. M. González, M. Kosmopoulou, M. F. Mojica, V. Castillo, P. Hinchliffe, I. Pettinati, J. Brem, C. J. Schofield, G. Mahler, R. A. Bonomo, L. I. Llarrull, J. Spencer, A. J. Vila. Bisthiazolidines: A Substrate-Mimicking Scaffold as an Inhibitor of the NDM-1 Carbapenemase, *ACS Infect. Dis.*, **2015**, 1(11), 544–554, doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00046
- ⁸ C. Dalvit, E. Ardini, G. P. Fogliatto, N. Mongelli, M. Veronesi, Reliable high-throughput functional screening with 3-FABS, *Drug Discov. Today*, **2004**, 9, 595–602, doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03161-7
- ⁹ J. Ma, S. McLeod, K. MacCormack, S. Sriram, N. Gao, A. L. Breeze, J. Hu. Real-Time Monitoring of New Delhi Metallo- β -Lactamase Activity in Living Bacterial Cells by 1H NMR Spectroscopy, *Angew Chem Int Ed Engl*, **2014**, 53, 2130–2133, doi.org/10.1002/anie.201308636
- ¹⁰ CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019, vol. 29th ed.
- ¹¹ T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55–63, doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4

¹³ A. Krajnc, J. Rgen Brem, P. Hinchliffe, K. Calvopiña, T. D. Panduwawala, P. A. Lang, J. J. A. G. Kamps, J. M. Tyrrell, E. Widlake, B. G. Saward, T. R. Walsh, J. Spencer, C. J. Schofield. Bicyclic Boronate VNRX-5133 Inhibits Metallo- and Serine- β -Lactamases, *J Med Chem*, **2019**, 26, 8544–8556, doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00911

¹⁴ S. S. Van Berkel, J. Brem, A. M. Rydzik, R. Salimraj, R. Cain, A. Verma, R. J. Owens, C. W. G. Fishwick, J. Spencer, C. J. Schofield. Assay Platform for Clinically Relevant Metallo- β -lactamases, *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 6945–6953, doi.org/10.1021/jm400769b

Capítulo 8

Anexo

Cite this: *Chem. Sci.*, 2021, 12, 2898

All publication charges for this article have been paid for by the Royal Society of Chemistry

2-Mercaptomethyl-thiazolidines use conserved aromatic–S interactions to achieve broad-range inhibition of metallo- β -lactamases[†]

Maria-Agustina Rossi,^{†a} Veronica Martinez,^{†b} Philip Hinchliffe,^{†c} Maria F. Mojica,^{†def} Valerie Castillo,^b Diego M. Moreno,^{†g} Ryan Smith,^c Brad Spellberg,^h George L. Drusano,ⁱ Claudia Banchio,^{aj} Robert A. Bonomo,^{eklm} James Spencer,^{†c} Alejandro J. Vila^{†*aj} and Graciela Mahler^{†*b}

Infections caused by multidrug resistant (MDR) bacteria are a major public health threat. Carbapenems are among the most potent antimicrobial agents that are commercially available to treat MDR bacteria. Bacterial production of carbapenem-hydrolysing metallo- β -lactamases (MBLs) challenges their safety and efficacy, with subclass B1 MBLs hydrolysing almost all β -lactam antibiotics. MBL inhibitors would fulfil an urgent clinical need by prolonging the lifetime of these life-saving drugs. Here we report the synthesis and activity of a series of 2-mercaptomethyl-thiazolidines (MMTZs), designed to replicate MBL interactions with reaction intermediates or hydrolysis products. MMTZs are potent competitive inhibitors of B1 MBLs *in vitro* (e.g., $K_i = 0.44 \mu\text{M}$ vs. NDM-1). Crystal structures of MMTZ complexes reveal similar binding patterns to the most clinically important B1 MBLs (NDM-1, VIM-2 and IMP-1), contrasting with previously studied thiol-based MBL inhibitors, such as bisthiazolidines (BTZs) or captopril stereoisomers, which exhibit lower, more variable potencies and multiple binding modes. MMTZ binding involves thiol coordination to the Zn(II) site and extensive hydrophobic interactions, burying the inhibitor more deeply within the active site than D/L-captopril. Unexpectedly, MMTZ binding features a thioether- π interaction with a conserved active-site aromatic residue, consistent with their equipotent inhibition and similar binding to multiple MBLs. MMTZs penetrate multiple Enterobacterales, inhibit NDM-1 *in situ*, and restore carbapenem potency against clinical isolates expressing B1 MBLs. Based on their inhibitory profile and lack of eukaryotic cell toxicity, MMTZs represent a promising scaffold for MBL inhibitor development. These results also suggest sulphur- π interactions can be exploited for general ligand design in medicinal chemistry.

Received 18th September 2020
Accepted 28th December 2020

DOI: 10.1039/d0sc05172a

rsc.li/chemical-science

^aInstituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET-UNR), Ocampo and Esmeralda, S2002LRK Rosario, Argentina. E-mail: vila@ibr-conicet.gov.ar

^bLaboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelAR), Avda. General Flores 2124, CC1157, Montevideo, Uruguay. E-mail: gmahler@fq.edu.uy

^cSchool of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Biomedical Sciences Building, University Walk, Bristol BS8 1TD, UK

^dInfectious Diseases Department, School of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA

^eResearch Service, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, OH, USA

^fGrupo de Resistencia Antimicrobiana y Epidemiología Hospitalaria, Universidad El Bosque, Bogotá, DC, Colombia

^gInstituto de Química de Rosario (IQUIR, CONICET-UNR), Suipacha 570, S2002LRK Rosario, Argentina

^hLos Angeles County and University of Southern California (LAC + USC) Medical Center, Los Angeles, CA, USA

ⁱCenter for Pharmacometrics and Systems Pharmacology, Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida, Orlando, FL, USA

^jFacultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, S2002LRK Rosario, Argentina

^kDepartments of Medicine, Pharmacology, Molecular Biology and Microbiology, Biochemistry, and Proteomics and Bioinformatics, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, OH, USA

^lMedical Service, GRECC, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, OH, USA

^mCWRU-Cleveland VAMC Center for Antimicrobial Resistance and Epidemiology (Case VA CARES), Cleveland, OH, USA

[†] Electronic supplementary information (ESI) available: Materials and methods for protein preparation, inhibitory measurements *in vitro* and *in-cell*, antimicrobial susceptibility testing, cell toxicity and protein crystallization and structure determination. X-ray data collection and structure refinement data, NMR spectra of the synthesized inhibitors, and additional figures. CCDC 2017238. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/d0sc05172a

[‡] These authors contributed equally to this work.



Introduction

β -Lactams are the most frequently prescribed antibiotics as they are well tolerated, bioavailable and broadly active against multiple Gram-positive and -negative bacteria.^{1,2} Despite their unrivalled therapeutic efficacy, the increasing occurrence of multidrug-resistant (MDR) bacteria in clinical environments has become a major public health problem.³ This situation is aggravated by growing numbers of susceptible, compromised patients, including patients with COVID-19 for whom coinfections with antibiotic-resistant bacteria are frequently reported.^{4,5}

Carbapenems are highly potent anti-infective agents that are often used to treat MDR Gram-negative bacteria.⁶ Among Gram-negative bacteria, the main mechanism of carbapenem resistance is the expression of β -lactamases, enzymes that hydrolyse the β -lactam ring, rendering these compounds inactive against their targets.^{1,7,8} Presently, the most worrisome β -lactamases are the metallo- β -lactamases (MBLs), Zn(II)-dependent enzymes that display a broad substrate profile, being capable of inactivating penicillins, cephalosporins and carbapenems.^{9–12} Furthermore, these enzymes are refractory to the action of all currently available β -lactamase inhibitors, including mechanism-based compounds such as clavulanic acid, tazobactam and sulbactam, the diazabicyclooctane avibactam, and the boronate vaborbactam.^{1,7} MBLs are becoming increasingly widespread in clinically relevant Gram-negative pathogens including diverse Enterobacterales species, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp., on which they confer carbapenem resistance.¹³ Since carbapenem resistant Gram-negative bacteria are usually also extensively drug resistant (XDR), the World Health Organization (WHO) has assigned them the “highest priority for antibacterial drug research and development”.¹⁴ The worldwide dissemination of genes encoding for MBLs, and the continuing emergence of new enzymes and variants, is rapidly making them leading contributors to the global antibiotic resistance crisis.

MBLs are classified into three subclasses, with the most clinically relevant enzymes of subclass B1 active with two Zn(II) ions bound to their active site.^{10,15} Although the metal coordination sphere is conserved in all B1 enzymes, little homology is present between the active sites of different enzymes even within this subclass. For example, the most important B1 enzymes (those of the IMP, VIM and NDM families) share approximately 30% sequence identity.^{9,10,16} This structural diversity makes the development of a universal MBL inhibitor an exceptionally challenging task.^{17–19} As a result, the use of chelating compounds as MBL inhibitors has been pursued,^{20,21} despite the risk of off-target activity arising from indiscriminate chelation of metal ions.

One strategy to address the challenge of MBL inhibition is to exploit our current knowledge regarding common features of β -lactam antibiotic binding and hydrolysis that are shared by different MBLs despite their structural differences.^{19,22} Based on this approach, we recently reported a series of bithiazolidines (BTZs), bicyclic substrate mimics decorated with a zinc-binding

thiol moiety (Fig. 1), that are cross-class MBL inhibitors active *in vitro* and against bacterial pathogens expressing MBLs.^{23–25} X-ray crystallographic analyses of MBL:BTZ complexes revealed that this scaffold mimics the structure of bicyclic substrates, and that different stereochemistries can elicit different coordination modes within the active site, that nevertheless result in equally effective inhibition.²⁵

Common mechanistic features of MBLs are identified by kinetic, spectroscopic and structural studies. MBLs of multiple subtypes have been shown to hydrolyse carbapenems *via* a common catalytic intermediate, in which the β -lactam ring has already been cleaved, that interacts with the metal site in a manner that is consistent across different enzyme targets.^{19,22} The binding mode of these intermediates resembles that reported for several enzyme-product adducts described by X-ray crystallography.^{7,26} Capturing features of the interactions of hydrolytic intermediates, and related hydrolysed products, with MBLs, can therefore guide the design of compounds aimed at inhibiting multiple MBL targets.

Based on this knowledge, we here report a novel 2-mercaptomethyl-thiazolidine (MMTZ) scaffold, a prototype that partially resembles MBL-bound intermediates and product species, whilst retaining the metal-binding thiol group present in the BTZs. This “second advanced” series of inhibitors displays more potent inhibitory activity than the earlier, “first generation” BTZs and can restore the activity of imipenem against MBL-producing carbapenem resistant Enterobacterales (MBL-CRES). Importantly, 2-mercaptomethyl-thiazolidines

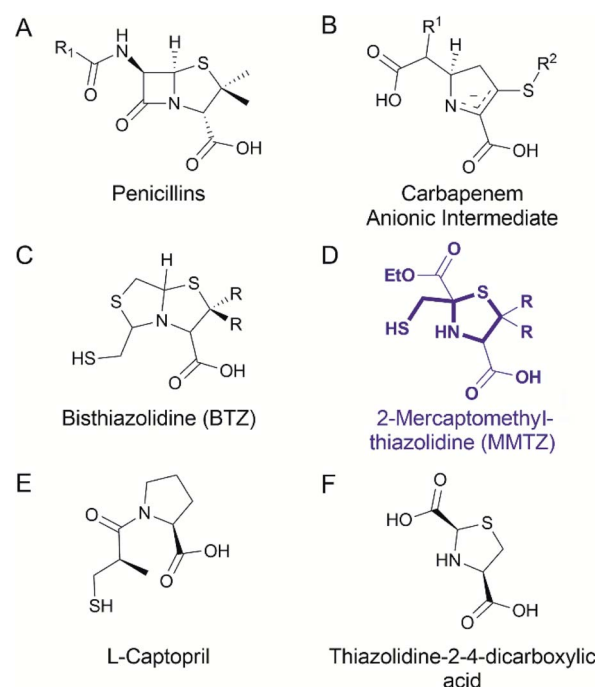


Fig. 1 Chemical structure of the (A) penicillins, (B) carbapenem anionic intermediate, (C) bithiazolidine (BTZ), (D) MMTZ scaffold herein designed, (E) L-captopril reported in ref. 30 and 31 as an MBL inhibitor, (F) thiazolidine-2-4-dicarboxylic acid reported in ref. 32 as an MBL inhibitor.



(MMTZs) represent a synthetically accessible series of pharmacophores that can be easily prepared by a condensation reaction of aminothiols with mercapto-carbonyl compounds masked under a dithiane form. All synthesised and tested MMTZs show similar inhibitory potency against different B1 MBLs, consistent with a conserved mode of binding. MMTZ stereoisomers display a less variable range of potencies than stereoisomers of a chemically related compound, *D/L*-captopril, a clinically approved anti-hypertensive agent previously investigated²⁷ as an MBL inhibitor.^{28,29} Crystal structures of NDM-1, VIM-2 and IMP-1 complexed with MMTZs reveal that this is likely due to the reduced conformational flexibility of MMTZs, compared to the captopril series, and to the presence of a conserved interaction between the sulphur atom of the thiazolidine (TZ) ring and an aromatic residue present at the base of a mobile active site loop present in the different B1 enzymes. Thus, MMTZs represent a novel scaffold able to inhibit the clinically relevant B1 MBLs *in vitro* and *in situ* through a conserved binding mode and constitute a promising new avenue in the continuing search for MBL inhibitors.

Results

Design and synthesis of MMTZs

BTZs are bicyclic MBL inhibitors, designed as substrate mimics, decorated with two zinc binding groups: a thiol and a carboxylate (Fig. 1).²³ Based on these features we envisioned that a simpler, monocyclic compound, mimicking the reaction intermediate or hydrolysis product, could allow us to better explore stereochemical preferences in the in the MBL active site, retaining the main binding features of the BTZs, but being more versatile with respect to stereochemistry. In this regard, *L*-captopril captures these features (Fig. 1), partially mimicking the five-membered ring present in hydrolysed penicillins and conserving the carboxylate moiety, with the thiol group providing an anchoring point to the metal binding site.²⁹ However, different captopril stereoisomers demonstrate a range of inhibitory potencies towards B1 MBLs.^{30,31} We reasoned that a TZ scaffold bearing a thiol group and carboxylate moiety (Fig. 1) could outperform or improve upon captopril due to the shorter thiol-bearing side chain, that would restrict conformational mobility within the active site and provide a more rigid metal-binding scaffold. Since a TZ containing two carboxylate groups was shown to be a potent inhibitor of the B1 enzyme CcrA (Fig. 1),³² we hypothesised that a MMTZ molecule would elicit even more potent inhibition due to the presence of the zinc-binding thiol moiety.

Thiazolidines are versatile motifs broadly used in medicinal chemistry³³ that can be easily obtained by the condensation between carbonyls and 1,2-aminothiols. Based on the required structural features, two series of 2-ethoxycarbonyl-2-mercaptomethyl thiazolidine-4-carboxylic acids were designed (Fig. 2), **1a** with R = H, and **1b** with R = Me, thus including the *gem* dimethyl group present in penicillins. For each series, we prepared the *L* and *D* enantiomers starting from the corresponding *L* and *D* amino acids **2**. The mercapto-ketone needed for its preparation was used under the dithiane form **3**, and

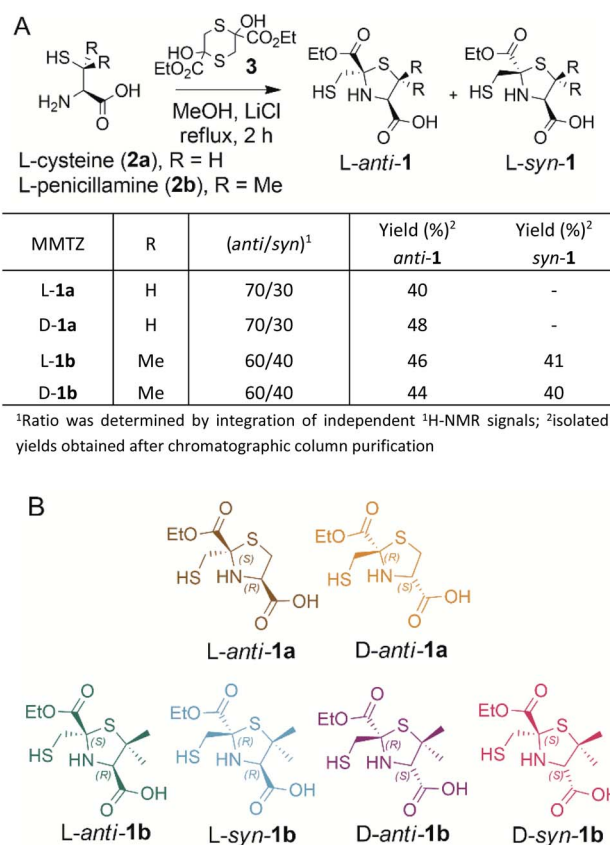


Fig. 2 (A) Synthetic scheme of 2-mercaptomethyl-thiazolidines (MMTZs) and reaction yields. (B) Chemical structure of the MMTZ inhibitors: *L-anti-1a* (brown), *D-anti-1a* (orange), *L-anti-1b* (green), *L-syn-1b* (light blue), *D-anti-1b* (purple) and *D-syn-1b* (pink). The stereocentres of the thiazolidine ring are labelled according to their absolute configuration as *S* or *R*.

synthesised as previously reported.³⁴ MMTZs were next prepared by cyclocondensation of 1,2-aminothiols **2** and dithiane **3** (Fig. 2), affording the *syn/anti* diastereomeric mixtures, that were easily purified and evaluated as pure compounds. In the case of MMTZ **1a**, only the *anti* diastereomer could be isolated, although both isomers were observed in NMR spectra of the crude reaction. The two diastereomers of thiazolidine **1b** were isolated and characterised independently. MMTZs (*L-anti-1a*, *D-anti-1a*, *L-anti-1b*, *D-anti-1b*, *L-syn-1b*, *D-syn-1b*) were prepared and isolated (Fig. 2). The stability of the compound *D-anti-1b* was assessed in PBS (pH 7.2, 27 °C). We observed that, under these conditions, 88% of intact MMTZ remains after 6 hours (Fig. S1†). Analysis by LCMS indicates that the MMTZ did not hydrolyse to penicillamine and the main degradation product was the disulphide derivative (Fig. S2†).

MMTZs are potent MBL inhibitors

We assessed the inhibitory potency of the synthesised MMTZs against three representatives, clinically important, subclass B1 MBLs: NDM-1, IMP-1, and VIM-2.¹⁷ Hydrolysis rates for the carbapenem imipenem were determined under steady-state conditions in the presence of MMTZs, with progress curves



Table 1 Inhibition potencies of MBLs inhibitors. K_i of MMTZs and BTZs and IC_{50} of captopril compounds

Inhibition potency (μM)					
Inhibitor	Chemical structure	NDM-1	IMP-1	VIM-2	Ref.
L- <i>anti</i> -1a		5.2 ± 0.7	1.0 ± 0.2	0.38 ± 0.05	This work
D- <i>anti</i> -1a		2.5 ± 0.5	1.3 ± 0.1	0.39 ± 0.04	This work
L- <i>anti</i> -1b		0.44 ± 0.06	0.46 ± 0.05	0.75 ± 0.09	This work
L- <i>syn</i> -1b		8 ± 1	6.0 ± 0.6	3.6 ± 0.4	This work
D- <i>anti</i> -1b		3.1 ± 0.3	0.93 ± 0.08	0.9 ± 0.1	This work
D- <i>syn</i> -1b		0.60 ± 0.05	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.1	This work
L-BTZ-1		7 ± 1	8 ± 2	2.9 ± 0.4	23 and 25
D-BTZ-1		19 ± 3	6 ± 1	3.2 ± 0.4	23 and 25
L-BTZ-2		18 ± 3	15 ± 3	6 ± 1	23 and 25
D-BTZ-2		12 ± 1	14 ± 3	10 ± 2	23 and 25
L-Captopril		157 ± 1	23 ± 1	4.4 ± 0.8	31
D-Captopril		20 ± 2	7 ± 1	0.07 ± 0.01	31
L- <i>epi</i> -Captopril		>500	436 ± 1	6 ± 2	31
D- <i>epi</i> -Captopril		65 ± 1	173 ± 1	5.5 ± 0.7	31

able to be fitted to a competitive inhibition model (Fig. S3 and S4†) yielding inhibition constants (K_i) in the low-to sub- μM range (Table 1).

All MMTZs were potent inhibitors of all three assayed MBLs, with K_i values ranging between 0.38 and 8 μM . The two *anti*-

enantiomers of MMTZ 1a showed similar potencies against each enzyme (*e.g.* 5.2 and 2.5 μM against NDM-1 for L-*anti*-1a and D-*anti*-1a, respectively) despite their differing enantiomeric configurations. In contrast, for the MMTZs 1b, bearing a *gem*-dimethyl group, the stereochemistry has an impact (though



modest) upon inhibition. In the case of NDM-1, K_i values for these four compounds varied between 0.44 and 8 μM . Of the six compounds tested, the two most potent NDM-1 inhibitors are *L-anti-1b* (0.44 μM) and *D-syn-1b* (0.60 μM), both with the *gem*-dimethyl group. Within the series of compounds **1b**, the heterocycles with the mercaptomethyl group in the *2S* configuration (*L-anti-1b* and *D-syn-1b*) were better inhibitors than those in the *2R* configuration: MMTZ *L-anti-1b* was 7-fold more active against NDM-1 than its enantiomer *D-anti-1b*; and *D-syn-1b* was 13 times more active than the enantiomer *L-syn-1b*. The potencies displayed by MMTZs with an *R* stereocentre were comparable to the K_i values of compounds from the **1a** series.

The MMTZ inhibitors performed best against VIM-2 (K_i values between 0.38 and 3.6 μM), with the two **1a** compounds showing the highest potency. For IMP-1, K_i values ranged between 0.46 and 6 μM . Among compounds containing the *gem*-dimethyl group (series **1b**), MMTZs with an *anti* configuration showed generally lower K_i values than their *syn* counterparts for both VIM-2 and IMP-1. MMTZ *L-anti-1b* showed the best inhibition profile against all three MBLs. Overall, the inhibitory activity against MBLs is clearly better than that of BTZs against the B1 enzymes (Table 1). In the case of NDM-1, *L-anti-1b* and *D-syn-1b* are 12-fold more potent inhibitors than *L-BTZ-1* (the best compound within the BTZ series), with all other MMTZs displaying equal lower or lower K_i values to those measured for *L-BTZ-1* (Table 1).

We then assessed the ability of these compounds to penetrate the bacterial outer membrane and inhibit NDM-1 within the bacterial periplasm.³⁵ To this end, we used ¹H NMR to follow imipenem hydrolysis by *E. coli* cells expressing NDM-1 in the presence of the different inhibitors (Fig. S5†). NDM-1 in the *E. coli* periplasm hydrolyses a solution of 500 μM imipenem completely in 12–15 min (Fig. S5†). All MMTZs were able to protect imipenem from the hydrolytic activity of NDM-1. Table 2 summarises the *in-cell* IC_{50} values for *E. coli* cells expressing NDM-1. In *E. coli*, *D-syn-1b* was the most potent inhibitor (*in-cell* IC_{50} = 10 μM , Fig. S5 and S6†). MMTZs lacking the *gem* dimethyl group, *L-anti-1a* and *D-anti-1a*, were 5 and 6 times less potent than *D-syn-1b*. However, MMTZs bearing the *gem* dimethyl group and different stereochemistry than *D-syn-1b* displayed lower potencies. These relatively elevated IC_{50} values likely arise from differences in cell penetration and in the stability of the inhibitor thiol in the cellular environment. In comparison, *L-BTZ-1*, displayed an *in-cell* IC_{50} for NDM-1-catalysed imipenem

hydrolysis of 23 μM ,²³ in the equivalent low micromolar range to the value for *D-syn-1b*.

MMTZs adopt a uniform binding mode to class B1 MBLs

To understand the interactions of MMTZs with the different B1 MBLs, we obtained the crystal structures of NDM-1, VIM-2 and IMP-1 in complex with both *L-anti-1b* and *D-syn-1b* (resolutions 1.4–1.87 Å, Table S1†), the most potent compounds in the inhibition studies. In all cases clear positive $F_o - F_c$ difference density was observed in electron density maps derived from inhibitor-exposed crystals. Compounds could be modelled into these features (Fig. S7†) with real space correlation coefficients (RSCC values, calculated during PDB submission) ≥ 0.91 (Table S2†) giving high confidence in the presence and correct fitting of bound inhibitor.^{36,37} For all enzymes inhibitors were modelled into all molecules of the asymmetric unit (ASU), with the exception of NDM-1:*L-anti-1b*, in which the inhibitor was modelled in only one of the two chains in the ASU. Evidence of inhibitor dimerization in the active sites was not present.

In all cases, the thiol moiety of the inhibitors binds equidistant between the two zinc ions, displacing the hydrolytic water/hydroxide (Fig. 3 and Table S3†), and maintaining a Zn–Zn distance of 3.57–3.79 Å (Table S3†). This distance is consistent with that reported for the uncomplexed forms of MBLs and for some complexes with products and inhibitors.^{25,30,38–40} Additionally, several hydrophobic residues lining the active site significantly stabilise inhibitor binding. These include residues on the mobile L3 loop, with NDM-1 Leu59, Met61 and Val67 contributing to binding in both inhibitor complexes (Fig. 3A and B), while in VIM-2 Phe61 and Tyr67 at the base of the L3 loop are in close proximity to both inhibitors (Fig. 3C and D). In IMP-1, due to a small conformational change in the flexible L3 loop,²⁵ either two (Val61, Phe87, *L-anti-1b*, Fig. 3E) or three (Val61, Trp64, Phe87, *D-syn-1b*, Fig. 3F) hydrophobic residues stabilise binding. Furthermore, the residue Trp87 (in NDM-1 and VIM-2) or Phe87 (IMP-1) is positioned close (approximately 4 Å) from the ethoxy sidechain in all the MBL:MMTZ complexes, providing a strong hydrophobic interaction. In NDM-1 only, an additional hydrophobic residue, Ile29 situated close to the N-terminus, also contributes to binding.

The inhibitors form few hydrogen bonds within the active site (Table S3†). For *L-anti-1b*, the carboxylate interacts weakly with Asn233 on the L10 loop in NDM-1 and IMP-1 (3.46 and 3.28 Å, respectively), but this is not observed in the VIM-2 complex. In complexes with *D-syn-1b* the inhibitor interacts more closely with the backbone amide of Asn233 (2.56–3.07 Å, Table S3†), while in VIM-2 there is an additional weak interaction with Arg228 (3.39 Å) that is not present in NDM-1 and IMP-1.

Overlays of complexes of *L-anti-1b* with NDM-1, VIM-2 and IMP-1 highlight the similarities in binding (Fig. S8A†), particularly between NDM-1 and IMP-1, with differences in the positioning of the L10 loop in VIM-2 resulting in a slightly different orientation for the bound inhibitor. The structures also highlight some flexibility of binding for the ethoxy carbonyl side chain, which is rotated 180° about the carbonyl carbon in the IMP-1:*L-anti-1b* structure compared to NDM-1 or VIM-2, largely

Table 2 *In-cell* IC_{50} . Imipenem hydrolysis by *E. coli* cells expressing NDM-1 was followed in the presence of different concentration of the MMTZs

Inhibitor	<i>In-cell</i> IC_{50} (μM)
<i>L-anti-1a</i>	54 \pm 4
<i>D-anti-1a</i>	64 \pm 5
<i>L-anti-1b</i>	160 \pm 10
<i>L-syn-1b</i>	230 \pm 30
<i>D-anti-1b</i>	210 \pm 10
<i>D-syn-1b</i>	10 \pm 1



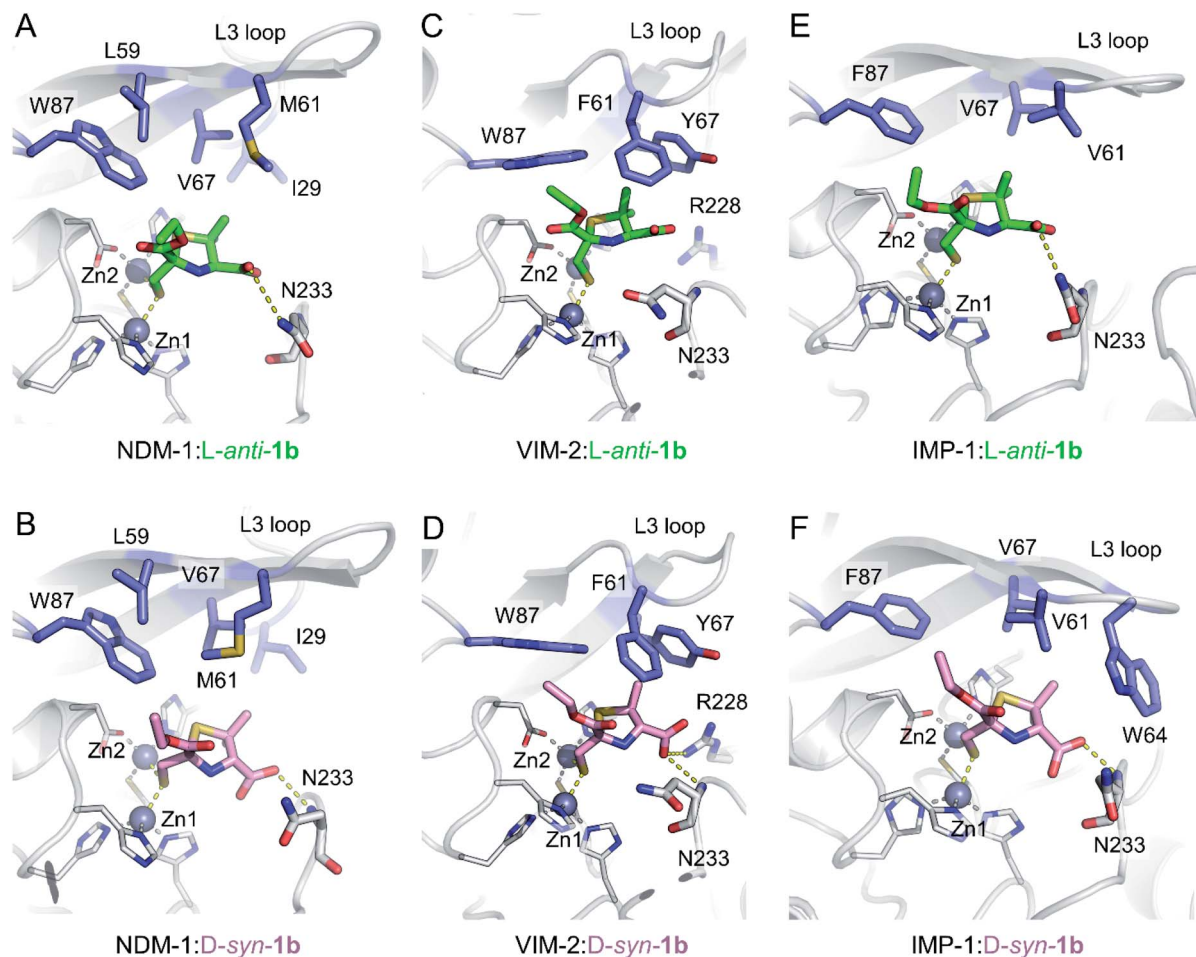


Fig. 3 Interactions of MMTZs in the active sites of B1 MBLs. Crystal structures for complexes of *L-anti-1b* (green) with NDM-1 (A), VIM-2 (B) and IMP-1 (C); and for complexes of *D-syn-1b* (pink) with NDM-1 (D), VIM-2 (E) and IMP-1 (F). Zinc ions are shown as grey spheres, blue side chains denote hydrophobic residues involved in inhibitor interactions, thick sticks denote residues involved in hydrogen bonding interactions with inhibitor, hydrogen bonding and metal-coordinating interactions are shown as yellow dashed lines. Zinc-coordinating residues are shown as thin sticks.

due to the lack of hydrogen bonds between the inhibitor side chain and the protein backbone. This flexibility is also apparent in the electron density, which is more poorly defined for the ethoxy $-\text{CH}_3$ atoms in the NDM-1 structures (Fig. S7[†]).

The inhibitor *D-syn-1b* binds very similarly to NDM-1 and IMP-1 (Fig. S8B[†]) but has a slightly different orientation in VIM-2 due to interactions of the carboxylate with Arg228. Despite these small differences in binding, however, both *L-anti-1b* and *D-syn-1b* display broadly consistent binding modes, making few (and weak) interactions with the protein backbone and with the thiol:zinc interaction dominating binding.

Role of a common S- π interaction on MMTZ binding

Notably, the sulphur atom of the thiazolidine ring of MMTZs is located at 3.8 Å from the edge of the indole group of NDM-1 Trp87, at the base of loop L3 (Fig. 4). A similar sulphur- π interaction with an aromatic group at this position (Trp in NDM-1 and VIM-2, Phe in IMP-1) is observed in all 6 complex structures with the two MMTZs (Fig. 4 and Table S3[†]). In NDM-1

and IMP-1, the sulphur atom is located in a coplanar manner to the edge of the aromatic ring, while in VIM-2, the sulphur forms a stacking interaction with Trp87. The conservation of this interaction does not seem to be incidental. Unfortunately, attempts to test its role by preparing oxazolidine analogs, using the same synthetic methodology, were unsuccessful (data not shown). Therefore, we decided to explore its role *in silico*. Based on the crystal structures of NDM-1 bound to *L-anti-1b* and *D-syn-1b*, we constructed structural models of the analogous 2-mercaptopmethyl oxazolidines (MMOZs) bound to NDM-1 by replacing the sulphur atom of the thiazolidine ring with an oxygen atom. The experimental geometries of the bound MMTZs and the simulated geometries of the bound MMOZs were minimised by hybrid quantum mechanics molecular calculations (QM/MM). The adducts of MMTZs with NDM-1 yielded final geometries similar to those in the crystal structure, *i.e.*, preserving the S- π distances (Fig. S9A and B[†]). Instead, in the theoretical complexes with MMOZs, the interaction distance between the O atom and Trp87 was increased upon geometry optimization (Fig. S9C and D[†]). The difference is



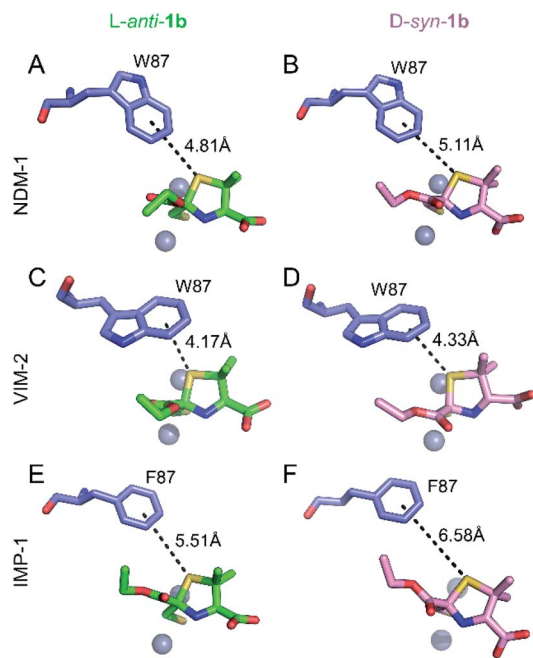


Fig. 4 Interactions of the thiazolidine ring sulphur atom with the aromatic group of the residue at position 87. Interactions (black dashes) between the benzene ring of Trp87 or Phe87 (blue sticks) and the thiazolidine sulphur of *L-anti-1b* (top, green sticks) or *D-syn-1b* (bottom, pink sticks) in the active sites of NDM-1 (A and B), VIM-2 (C and D) and IMP-1 (E and F). Distances shown in Å are measured from the centre of the benzene ring to the thiazolidine sulphur atom.

most prominent in the NDM-1:*L-anti-1b* complex which showed an increase of 1.10 Å when the O is present and significant movement of the ligand. In the NDM-1:*D-syn-1b* adduct, the O- π distance is 0.34 Å longer than the S- π distance. We conclude that the presence of the thioether S favours the interaction with the aromatic groups in all studied MBLs, contributing to binding.

MMTZs restore the action of imipenem against Enterobacterales and are not toxic against eukaryotic cells

We analysed the activity of MMTZs against clinical isolates producing MBLs by measuring their impact on the minimal

inhibitory concentration (MICs) of imipenem (Table 3). MMTZs, particularly compound *D-anti-1b*, were able to successfully inhibit the MBLs present in Enterobacterales, as evident by a reduction of up to 16-fold in MIC values. In the absence of the carbapenem antibiotic, none of the MMTZs inhibitors has a detrimental effect on the bacterial growth, indicating that reduction of the MIC values is due to the restoration of susceptibility to imipenem through inhibition of the MBLs by the MMTZ inhibitors.

Finally, we evaluated the cytotoxicity of the six MMTZs against cultured HEK293, L929 and VERO cell lines at 260, 355 and 530 μ M (Fig. 5). Encouragingly, compounds bearing the *gem* dimethyl group did not show any toxicity under the assayed conditions. However, MMTZ *D-anti-1a* induced a decline in cell viability percentages in almost all conditions, while *L-anti-1a* was more selectively toxic towards the HEK293 cell line. Overall, however, the combined impact of MMTZs in lowering the MICs of MBL-CRE, and their lack of or low toxicity, make them promising compounds for development as MBL inhibitors.

Discussion

Here we report a series of MMTZs as potent inhibitors of B1 MBLs. These compounds showed comparable potencies against the three representative MBLs enzymes (NDM-1, VIM-2 and IMP-1, the most clinically important resistance determinants). MMTZs were able to enter the periplasm of *E. coli*, as evidenced by inhibition of NDM-1 catalysed imipenem hydrolysis *in situ*, and restore the antimicrobial effect of imipenem against clinical Enterobacterales. The discrepancies between the K_i and *in-cell* IC_{50} values can be attributed either to the stability of the thiol groups in the different strains or to differences in permeability between the clinical strains. Despite differences in the stereochemistry of individual inhibitors, the MMTZ scaffold utilises a similar binding mode to bind to the active site of the different MBLs tested.

As previously reported for most thiolate MBL inhibitors,^{25,30} the driving force for MMTZ binding to the active site is the interaction with the metal centre of the thiolate, that bridges the two Zn(II) ions and replaces the hydroxide/water nucleophile. MMTZs share this binding mode with the related BTZs and with the captopril stereoisomers. Notably, however, MMTZs

Table 3 Minimum inhibitory concentrations of imipenem (IMI) and MMTZs for a panel of clinical isolates expressing B1 MBLs

MIC (mg L ⁻¹)								
Isolate	MBL	IMI	IMI + <i>L-anti-1a</i>	IMI + <i>D-anti-1a</i>	IMI + <i>L-anti-1b</i>	IMI + <i>D-syn-1b</i>	IMI + <i>D-anti-1b</i>	IMI + <i>D-syn-1b</i>
<i>K. pneumoniae</i> (1.37)	NDM	32	8	8	8	16	8	8
<i>E. coli</i> (8.68)	NDM-1	64	16	16	16	32	16	32
<i>K. pneumoniae</i> (LC 82)	IMP-13	1	0.5	0.25	0.25	1	0.25	0.5
Enterobacter spp. (42713)	IMP	16	16	8	8	16	8	8
<i>P. mirabilis</i> (UNC KPC 170) ^a	IMP	16	8	8	4	16	1	8
<i>K. pneumoniae</i> (6907)	VIM-2	4	2	2	1	4	1	4
<i>K. aerogenes</i> (6915)	VIM-2	8	4	2	2	4	2	4
<i>K. pneumoniae</i> (5639)	VIM-24	8	8	4	4	8	1	8

^a Due to intrinsic reduced susceptibility to imipenem, strains from the Morganellaceae family were tested using meropenem.



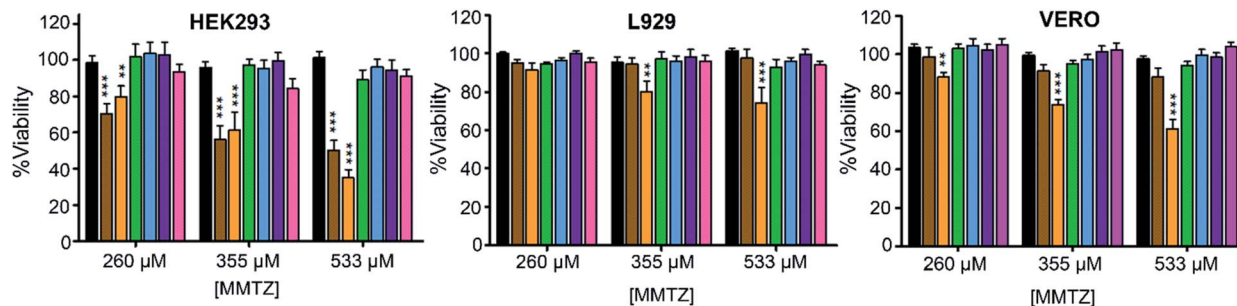


Fig. 5 Cytotoxicity for the MMTZs in HEK293, L929 and VERO cell lines. Control (black), L-*anti-1a* (brown), D-*anti-1a* (orange), L-*anti-1b* (green), L-*syn-1b* (light blue), D-*anti-1b* (purple), and D-*syn-1b* (pink).

differ from these compound classes through the absence of electrostatic interactions, such as those of the carboxylate groups of BTZs or captopril stereoisomers with Asn233 (conserved in most B1 MBLs) and Lys224 (NDM-1 and IMP-1) or Arg228 (VIM-2) (Fig. S10 and S11†). These interactions have been also identified as critical for substrate recognition by MBLs. Notwithstanding, MMTZs show better inhibition potencies against the B1 MBLs tested than BTZs or captopril stereoisomers. Most importantly, our data reveal that the different MMTZs adopt a similar, common binding mode to their different B1 MBL targets, contrasting with other thiol-based inhibitors where binding is both enzyme and stereospecific.^{25,30}

MMTZs were designed to mimic product-like reaction intermediates (Fig. 1) or replicate enzyme:product interactions, with the addition of a thiol to strengthen binding to the bi-Zn(II) site. Therefore, we compared the binding modes of MMTZs with some reported enzyme:product complexes, such as those of NDM-1 with hydrolysed meropenem (PDB 5ypm⁴¹), cefuroxime (PDB 5o2e⁴²) and ampicillin (PDB 5zgr³⁹). The five-membered rings of the MMTZs lies perpendicular in the active site with respect to the rings of the hydrolysed antibiotics (Fig. S12†) as a result of the electrostatic interactions of the β -lactam carboxylate group with Lys224 that are not replicated by MMTZs.

The conserved sulphur- π interaction (Fig. 4) plays a significant role in enhancing MMTZ binding, as confirmed by QM/MM calculations. This interaction is not present in the enzyme-product complexes of penicillins with MBLs,⁴³ since the thiazolidine ring of ampicillin is perpendicular to the MMTZ thiazolidine ring (Fig. S12†). Therefore, MMTZs provide stronger sulphur-aromatic interactions than penicillins hydrolysis products.

In the case of the complex with the cephalosporin cefuroxime, the six-membered dihydrothiazine ring lies perpendicular to the five-membered ring of MMTZs. However, the geometry of the cefuroxime dihydrothiazine ring enables the interaction of the sulphur with Trp87 to be maintained (Fig. S12†). It is also notable that, in MMTZ complexes with NDM-1, the position of the L3 loop more closely resembles that observed in the complex with hydrolysed meropenem than in those with either ampicillin or cefuroxime. This may reflect the absence in MMTZs of a group equivalent to the relatively bulky C6/C7

substituents of these substrates (as opposed to the much smaller C6 hydroxyethyl group of meropenem), and the consequent avoidance of possible steric clashes.

MMTZs also resemble the captopril stereoisomers (Table 1), since both families of compounds have a carboxylate group bound to a five-membered ring (mimicking the intermediate/product of penicillin hydrolysis) and an additional thiol moiety. However, the different captopril stereoisomers exhibit a wide range of inhibitory potencies towards B1 MBLs (Table 1). For example, *epi-D*- and *epi-L*-captopril are only efficient inhibitors of VIM-2, while showing greatly reduced potency against NDM-1 and IMP-1.³⁰ The adducts of D- and L-captopril with B1 MBLs show a similar binding mode in the active site, but the D isomer is much more potent and targets a wider range of MBLs. This is not the case for the different stereoisomers of the MMTZs reported here, whose potencies across the range of targets fall consistently within the low- to sub- μ M range. Selectivity of captopril D isomers has been explained by appreciating the more extensive electrostatic interactions of the carboxylate moiety with Lys224 (NDM-1, IMP-1) or Arg228 (VIM-2) (Fig. S10†).³⁰ A comparison of the binding modes of the MMTZs with captopril reveals that the five-membered ring of MMTZs is positioned more deeply within the active site (*i.e.* closer to the metal centre), despite the smaller number of electrostatic interactions and hydrogen bonds formed by MMTZs (Fig. S10†). This finding confirms our prediction that a shorter side chain connecting the thiol group with the five-membered ring could enhance binding with respect to the captopril variants.

We conclude that the consistent involvement in binding of sulphur- π interactions (not possible for the pyrrolidine ring of captopril) explains the better and more uniform inhibitory potency of MMTZs against the range of B1 MBLs, compared to the more variable potency of the different captopril isomers.

Similarly, although the related, but less potent, BTZs show more consistent inhibitory potency across different MBL targets, they do so by means of different binding modes that, while overall conserving the electrostatic interactions of the carboxylate group with residues at positions 224, 228 and 233, vary markedly between MBL target and BTZ stereoisomer. Due to their rigid bicyclic scaffold, none of the BTZs tested can adopt a mode of binding that shows significant sulphur- π



interactions, supporting our hypothesis that such an interaction both enhances inhibitory potency and controls the conformation in the MBL active site of bound MMTZ.

Thioether–aromatic interactions can stabilise ligand binding by up to *ca.* 3.2 kcal mol⁻¹, an energy comparable to a salt bridge, with the further advantage of being insensitive to pH changes.^{44–46} The distances and orientations observed in these MBL:MMTZ complexes (Fig. 4) are, based on previous experimental and theoretical studies, expected to maximise these interactions.⁴⁶ This interaction orients the five-membered ring of the MMTZ within the active site, overriding the steering effect of the electrostatic interactions that may be formed by the carboxylate group. We conclude that the MMTZ scaffold improves the affinity of the thiol binding group by favouring hydrophobic contacts with the active site of B1 MBLs, specifically by means of a sulphur– π interaction with the conserved aromatic residue at position 87.

Conclusions

MMTZs were iteratively designed as a novel chemical scaffold to inhibit B1 MBLs. The six purified inhibitors displayed inhibition constants in the low- to sub- μ M range for the B1 enzymes, with *D-syn-1b* as overall the most consistently potent inhibitor of both the different purified enzymes *in vitro* and, in combination with carbapenem antibiotics, in antibacterial assays against MBL-expressing strains of clinical microorganisms such as *E. coli*. These compounds are versatile and can be easily prepared with high yields. Since we report that the carboxylate group of MMTZs is not involved in significant electrostatic interactions, the possibility of introducing other substituents at the 4-position could result in even more potent inhibitors to improve the development of this scaffold. Furthermore, our discovery that the sulphur– π interaction apparently plays a key role in inhibitor binding strongly supports the suggestion that this feature can be exploited as a general concept both in MBL inhibition, taking advantage of the availability of conserved hydrophobic residues in accessible positions across multiple target enzymes, and more widely in ligand design in medicinal chemistry.

Experimental methods

General methods

Reactions were monitored by analytical thin layer chromatography (TLC) on 0.25 mm silica gel coated plastic sheets (SIL G/UV 254). Flash chromatography on silica gel 60 (40 μ m average particle diameter) was used to purify the crude reaction mixtures. All NMR spectra were recorded in CDCl₃, at 300 K on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer equipped with a 5 mm QXI probe and on an Avance III 400 MHz spectrometer equipped with a 5 mm BBO probe. Chemical shifts (δ) are expressed in ppm using tetramethylsilane (TMS) as internal reference, and multiplicities are indicated as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), br (broad). All reactions were carried out in dry, freshly distilled solvents under anhydrous conditions unless otherwise stated. HRMS-ESI spectra were recorded on MicroTOF-QTM (Bruker Daltonics) mass spectrometers. Optical

rotation was measured using a Kruss Optronic GmbH P8000 polarimeter with a 0.5 mL cell (concentration *c* given as g/100 mL). The purity of final tested compounds was \geq 95% as determined by ¹H-NMR, and HPLC.

Synthesis of diethyl 2,5-dihydroxy-1,4-dithiane-2,5-dicarboxylate 3

To a stirred solution of ethyl 3-bromopyruvate (14 g, 0.071 mol) in MeOH (125 mL) cooled at –10 °C, was added a cooled (0 °C) suspension of NaHS (11 g, 0.20 mol) in MeOH (125 mL) at 2 mL per minute. A white solid is formed during the addition, and cooling with stirring was continued for 1 h. The solid was collected, washed with Et₂O (50 mL) and dried to give 3 as white solid (7.8 g, yield 73%). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.98 (s, 2H), 4.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.65 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H), 2.87 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H) according to reported values in literature.³⁴

Synthesis of (2*S*,4*R*)-2-(ethoxycarbonyl)-2-(mercaptomethyl)thiazolidine-4-carboxylic acid (*L-anti-1a*)

To a stirred suspension of *L*-cysteine (*L-2a*) (1 g, 8.3 mmol) in MeOH (20 mL) was added under N₂, dithiane 3 (1.4 g, 2.76 mmol), LiCl (35 mg, 0.82 mmol) and heated at reflux for 2 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was poured into H₂O (60 mL), the pH was adjusted to 3 with HCl 1 M, and extracted with AcOEt (3 \times 60 mL). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated. A crude reaction was obtained as a diastereomeric mixture of *L-anti/syn-1a* 70 : 30. The crude was purified by SiO₂ using *n*Hex : AcOEt : AcOH (70 : 29 : 1) to afford *L-anti-1a* as white solid (0.32 g, yield 40%), mp 99.1–101 °C. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.36–4.29 (m, 2H), 4.11 (dd, *J* = 9.0, 6.2 Hz, 1H), 3.43 (dd, *J* = 10.7, 6.2 Hz, 1H), 3.06–3.01 (m, 1H), 3.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 1.97 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.86 (br, NH). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.1, 171.0, 79.3, 65.0, 62.9, 39.2, 33.6, 14.0. [α]_D²¹ = –94.12 (*c* 2.6, AcOEt).

Synthesis of (2*R*,4*S*)-2-(ethoxycarbonyl)-2-(mercaptomethyl)thiazolidine-4-carboxylic acid (*D-anti-1a*)

Prepared in analogous route as described for *L-anti-1a*, starting from *D*-cysteine *D-2a* and dithiane 3. The crude was purified by SiO₂ using *n*Hex : AcOEt : AcOH (70 : 29 : 1) to afford *D-anti-1a* as a white solid, yield 48%. The spectroscopic properties were identical to those obtained for *L-anti-1a*. HRMS calculated for C₈H₁₃NO₄S₂ [MNa]⁺ 274.0184, found 274.0178.

Synthesis of (2*S*/*R*,4*R*)-2-(ethoxycarbonyl)-2-(mercaptomethyl)-5,5-dimethylthiazolidine-4-carboxylic acid (*L-anti/syn-1b*)

Prepared in analogous route as described for *L-anti-1a*, starting from *L*-penicillamine *L-2b* and dithiane 3. A crude reaction was obtained as a diastereomeric mixture (*L-anti/syn-1b* 60 : 40). The crude was purified by SiO₂ using *n*Hex : AcOEt : AcOH (70 : 29 : 1) to afford *L-anti-1b* 46% yield, and *L-syn-1b* 41% yield.

(2*S*,4*R*)-2-(Ethoxycarbonyl)-2-(mercaptomethyl)-5,5-dimethylthiazolidine-4-carboxylic acid (*L-anti-1b*). Colourless oil, yield



46%. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.37–4.26 (m, 2H), 3.84 (s, 1H), 3.03–3.00 (m, 1H), 2.96–2.90 (m, 1H), 2.00 (s, 1H, br), 1.62 (s, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.30 (s, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.5, 171.3, 76.1, 72.5, 62.6, 60.7, 34.1, 26.5, 26.1, 14.0. HRMS calculated for C₁₀H₁₇NO₄S₂ [MNa]⁺ 302.0491, found 302.0490; [α]_D²¹ = −49.1 (*c* 1.9, AcOEt).

(2R,4R)-2-(Ethoxycarbonyl)-2-(mercaptomethyl)-5,5-dimethylthiazolidine-4-carboxylic acid (L-syn-1b). Colourless oil, yield 41%. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.31–4.20 (m, 3H), 3.25 (d, *J* = 14.4 Hz, 1H), 3.11 (d, *J* = 14.4 Hz, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.1, 171.3, 76.7, 73.3, 62.1, 59.4, 32.4, 28.1, 27.2, 13.9. C₁₀H₁₇NO₄S₂ [MNa]⁺ 302.0491, found 302.0490. [α]_D²¹ = −124.7 (*c* 1.44, CH₃OH).

Synthesis of (2S/R,4S)-2-(ethoxycarbonyl)-2-(mercaptomethyl)-5,5-dimethylthiazolidine-4-carboxylic acid (D-anti/syn-1b)

Prepared in analogous route as described for L-anti-1a, starting from D-penicillamine D-2b, and dithiane 3. The residue was purified by SiO₂ using *n*Hex : AcOEt : AcOH (60 : 40 : 0.5) to afford D-anti-1b 44% yield, and D-syn-1b 40% yield.

(2R,4S)-2-(Ethoxycarbonyl)-2-(mercaptomethyl)-5,5-dimethylthiazolidine-4-carboxylic acid (D-anti-1b). Colourless oil, yield 44%; the spectroscopic properties were identical to those obtained for L-anti-1b, [α]_D²¹ = +42.5 (*c* 1.6, AcOEt). HRMS calculated for C₁₀H₁₇NO₄S₂, [MNa]⁺ 302.0491, found 302.0521.

(2S,4S)-2-(Ethoxycarbonyl)-2-(mercaptomethyl)-5,5-dimethylthiazolidine-4-carboxylic acid (D-syn-1b). Colourless oil, yield 40%; the spectroscopic properties were identical to those obtained for L-syn-1b. [α]_D²¹ = +129.5 (*c* 1.7, CH₃OH). HRMS calculated for C₁₀H₁₆NO₄S₂ [M₂Na]⁺ 324.0316, found 324.0314.

Author contributions

MAR purified the proteins and performed the K_i determination and *in-cell* IC₅₀ measurements. VM and VC synthesised, purified and characterised the MMTZ compounds. MAR and CB performed the eukaryotic cell cultures and cytotoxicity assays. PH and RS purified the proteins and performed the crystallisation and structure determination. DMM performed the QM/MM calculations. MFM performed the antimicrobial susceptibility test. GM and AJV designed the compounds. MAR, PH, MFM, BS, GLD, RAB, JS, AJV and GM analysed and discussed the data. MAR, PH, MFM, RAB, JS, AJV and GM wrote the paper, and all authors discussed the results and commented on the manuscript.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health (NIH) to R. A. B. under Award Numbers R01AI063517 and R01AI072219, to R. A. B., G. M., J. S. and A. J. V. under Award Number

R01AI100560 and to B. S. under Award Numbers R01 AI130060 and AI117211. This study was also supported in part by funds and/or facilities provided by the Cleveland Department of Veterans Affairs, Award Number 1I01BX001974 to R. A. B. from the Biomedical Laboratory Research & Development Service of the VA Office of Research and Development, and the Geriatric Research Education and Clinical Center VISN 10. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NIH or the Department of Veterans Affairs. GM thanks M. Macías and L. Suescun from Cryssmat-Lab/DETEMA for the single crystal X-ray diffraction structure determination and data deposition. VM is recipient of a fellowship from Comisión Académica de Posgrado (CAP-Udelar). We thank Diamond Light Source for beamtime (proposal MX17212), and the staff of beamlines I03 and I04 for assistance with crystal testing and data collection. Funding for R. S. was provided by the University of Bristol. This work was supported by grant PICT-2016-1657 from ANPCyT to A. J. V. C. B., D. M. M. and A. J. V. are staff members from CONICET. M. A. R. is recipient of a fellowship from CONICET.

Notes and references

- 1 K. Bush and P. A. Bradford, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2019, **17**, 295–306.
- 2 E. Y. Klein, T. P. Van Boeckel, E. M. Martinez, S. Pant, S. Gandra, S. A. Levin, H. Goossens and R. Laxminarayan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2018, **115**, E3463–E3470.
- 3 P. Nordmann, L. Dortet and L. Poirel, *Trends Mol. Med.*, 2012, **18**, 263–272.
- 4 S. Reardon, *Science*, 2020, DOI: 10.1126/science.abc2995.
- 5 Antimicrobial resistance in the age of COVID-19, *Nat. Microbiol.*, 2020, **5**, 779.
- 6 K. M. Papp-Wallace, A. Endimiani, M. A. Taracila and R. A. Bonomo, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, **55**, 4943–4960.
- 7 C. L. Tooke, P. Hinchliffe, E. C. Bragginton, C. K. Colenso, V. H. A. Hirvonen, Y. Takebayashi and J. Spencer, *J. Mol. Biol.*, 2019, **431**, 3472–3500.
- 8 M. S. Wilke, A. L. Lovering and N. C. J. Strynadka, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2005, **8**, 525–533.
- 9 T. Palzkill, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2013, **1277**, 91–104.
- 10 M. W. Crowder, J. Spencer and A. J. Vila, *Acc. Chem. Res.*, 2006, **39**, 721–728.
- 11 C. Bebrone, *Biochem. Pharmacol.*, 2007, **74**, 1686–1701.
- 12 M.-R. R. Meini, L. I. Llarrull and A. J. Vila, *FEBS Lett.*, 2015, **589**, 3419–3432.
- 13 CDC, *Antibiotic Resistance Threats in the United States*, U.S. Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, GA, 2019.
- 14 E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D. L. Monnet, C. Pulcini, G. Kahlmeter, J. Kluytmans, Y. Carmeli, M. Ouellette, K. Outtersen, J. Patel, M. Cavaleri, E. M. Cox, C. R. Houchens, M. L. Grayson, P. Hansen, N. Singh, U. Theuretzbacher, N. Magrini, A. O. Aboderin, S. S. Al-Abri, N. Awang Jalil, N. Benzonana, S. Bhattacharya, A. J. Brink, F. R. Burkert,



- O. Cars, G. Cornaglia, O. J. Dyar, A. W. Friedrich, A. C. Gales, S. Gandra, C. G. Giske, D. A. Goff, H. Goossens, T. Gottlieb, M. Guzman Blanco, W. Hryniewicz, D. Kattula, T. Jinks, S. S. Kanj, L. Kerr, M. P. Kieny, Y. S. Kim, R. S. Kozlov, J. Labarca, R. Laxminarayan, K. Leder, L. Leibovici, G. Levy-Hara, J. Littman, S. Malhotra-Kumar, V. Manchanda, L. Moja, B. Ndoye, A. Pan, D. L. Paterson, M. Paul, H. Qiu, P. Ramon-Pardo, J. Rodríguez-Baño, M. Sanguinetti, S. Sengupta, M. Sharland, M. Si-Mehand, L. L. Silver, W. Song, M. Steinbakk, J. Thomsen, G. E. Thwaites, J. W. van der Meer, N. Van Kinh, S. Vega, M. V. Villegas, A. Wechsler-Fördös, H. F. L. Wertheim, E. Wesangula, N. Woodford, F. O. Yilmaz and A. Zorzet, *Lancet Infect. Dis.*, 2018, **18**, 318–327.
- 15 K. Bush, *J. Infect. Chemother.*, 2013, **19**, 549–559.
- 16 M. R. Meini, L. I. Llarrull and A. J. Vila, *Antibiotics*, 2014, **3**, 285–316.
- 17 M. F. Mojica, R. A. Bonomo and W. Fast, *Curr. Drug Targets*, 2016, **17**, 1029–1050.
- 18 C. M. Rotondo and G. D. Wright, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2017, **39**, 96–105.
- 19 A. R. Palacios, M.-A. Rossi, G. S. Mahler and A. J. Vila, *Biomolecules*, 2020, **10**, 854.
- 20 R. Wang, T. P. Lai, P. Gao, H. Zhang, P. L. Ho, P. C. Y. Woo, G. Ma, R. Y. T. Kao, H. Li and H. Sun, *Nat. Commun.*, 2018, **9**, 439.
- 21 A. M. King, S. A. Reid-yu, W. Wang, D. T. King, G. De Pascale, N. C. Strynadka, T. R. Walsh, B. K. Coombes and G. D. Wright, *Nature*, 2014, **510**, 503–506.
- 22 M.-N. Lisa, A. R. Palacios, M. Aitha, M. M. González, D. M. Moreno, M. W. Crowder, R. A. Bonomo, J. Spencer, D. L. Tierney, L. I. Llarrull and A. J. Vila, *Nat. Commun.*, 2017, **8**, 538.
- 23 M. M. González, M. Kosmopoulou, M. F. Mojica, V. Castillo, P. Hinchliffe, I. Pettinati, J. Brem, C. J. Schofield, G. Mahler, R. A. Bonomo, L. I. Llarrull, J. Spencer and A. J. Vila, *ACS Infect. Dis.*, 2016, **1**, 544–554.
- 24 M. F. Mojica, S. G. Mahler, C. R. Bethel, M. A. Taracila, M. Kosmopoulou, K. M. Papp-Wallace, L. I. Llarrull, B. M. Wilson, S. H. Marshall, C. J. Wallace, M. V. Villegas, M. E. Harris, A. J. Vila, J. Spencer and R. A. Bonomo, *Biochemistry*, 2015, **54**, 3183–3196.
- 25 P. Hinchliffe, M. M. González, M. F. Mojica, J. M. González, V. Castillo, C. Saiz, M. Kosmopoulou, C. L. Tooke, L. I. Llarrull, G. Mahler, R. A. Bonomo, A. J. Vila and J. Spencer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016, **113**, E3745–E3754.
- 26 D. T. King, L. J. Worrall, R. J. Gruninger and N. C. J. J. Strynadka, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 11362–11365.
- 27 D. W. Cushman and M. A. Ondetti, *Nat. Med.*, 1999, **5**, 1110–1112.
- 28 I. García-Sáez, P. S. Mercuri, C. Papamicael, R. Kahn, J. M. Frère, M. Galleni, G. M. Rossolini and O. Dideberg, *J. Mol. Biol.*, 2003, **325**, 651–660.
- 29 U. Heinz, R. Bauer, S. Wommer, W. Meyer-Klaucke, C. Papamichaels, J. Bateson and H.-W. Adolph, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 20659–20666.
- 30 J. Brem, S. S. Van Berkel, D. Zollman, S. Y. Lee, O. Gileadi, P. J. McHugh, T. R. Walsh, M. A. McDonough and C. J. Schofield, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, **60**, 142–150.
- 31 Y. Yusof, D. T. C. Tan, O. K. Arjomandi, G. Schenk and R. P. McGeary, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016, **26**, 1589–1593.
- 32 L. Feng, K.-W. Yang, L.-S. Zhou, J.-M. Xiao, X. Yang, L. Zhai, Y.-L. Zhang and M. W. Crowder, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 5185–5189.
- 33 N. Sahiba, A. Sethiya, J. Soni, D. K. Agarwal and S. Agarwal, *Top. Curr. Chem.*, 2020, **378**, 34.
- 34 H. T. Nagasawa, D. J. W. W. Goon, D. L. Crankshaw, R. Vince and S. E. Patterson, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 6462–6464.
- 35 J. Ma, S. McLeod, K. MacCormack, S. Sriram, N. Gao, A. L. Breeze and J. Hu, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 2014, **53**, 2130–2133.
- 36 O. S. Smart, V. Horský, S. Gore, R. S. Vařeková, V. Bendová, G. J. Kleywegt and S. Velankar, *Acta Crystallogr., Sect. D: Struct. Biol.*, 2018, **74**, 228–236.
- 37 M. C. Deller and B. Rupp, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 2015, **29**, 817–836.
- 38 J. Spencer, J. Read, R. B. Sessions, S. Howell, A. G. Michael Blackburn and S. J. Gamblin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 14439–14444.
- 39 H. Zhang, G. Ma, Y. Zhu, L. Zeng, A. Ahmad, C. Wang, B. Pang, H. Fang, L. Zhao and Q. Hao, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2018, **62**, e01579.
- 40 M. Aitha, A. R. Marts, A. Bergstrom, A. J. Möller, L. Moritz, L. Turner, J. C. Nix, R. A. Bonomo, R. C. Page, D. L. Tierney and M. W. Crowder, *Biochemistry*, 2014, **53**, 7321–7331.
- 41 H. Feng, X. Liu, S. Wang, J. Fleming, D. C. Wang and W. Liu, *Nat. Commun.*, 2017, **8**, 2242.
- 42 J. E. Raczynska, I. G. Shabalin, W. Minor, A. Wlodawer and M. Jaskolski, *Drug Resist. Updates*, 2018, **40**, 1–12.
- 43 H. Zhang and Q. Hao, *FASEB J.*, 2011, **25**, 2574–2582.
- 44 E. A. Meyer, R. K. Castellano and F. Diederich, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 1210–1250.
- 45 B. R. Beno, K. S. Yeung, M. D. Bartberger, L. D. Pennington and N. A. Meanwell, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 4383–4438.
- 46 A. L. Ringer, A. Senenko and C. D. Sherrill, *Protein Sci.*, 2007, **16**, 2216–2223.



2-Mercaptomethyl Thiazolidines (MMTZs) Inhibit All Metallo- β -Lactamase Classes by Maintaining a Conserved Binding Mode

Philip Hinchliffe,[△] Diego M. Moreno,[△] Maria-Agustina Rossi,[△] Maria F. Mojica, Veronica Martinez, Valentina Villamil, Brad Spellberg, George L. Drusano, Claudia Banchio, Graciela Mahler, Robert A. Bonomo, Alejandro J. Vila, and James Spencer*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.1c00194>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



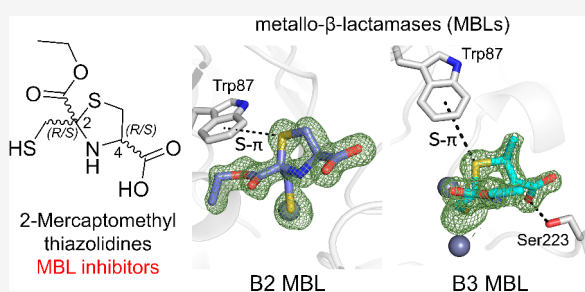
Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Metallo- β -lactamase (MBL) production in Gram-negative bacteria is an important contributor to β -lactam antibiotic resistance. Combining β -lactams with β -lactamase inhibitors (BLIs) is a validated route to overcoming resistance, but MBL inhibitors are not available in the clinic. On the basis of zinc utilization and sequence, MBLs are divided into three subclasses, B1, B2, and B3, whose differing active-site architectures hinder development of BLIs capable of “cross-class” MBL inhibition. We previously described 2-mercaptomethyl thiazolidines (MMTZs) as B1 MBL inhibitors (e.g., NDM-1) and here show that inhibition extends to the clinically relevant B2 (Sfh-I) and B3 (L1) enzymes. MMTZs inhibit purified MBLs *in vitro* (e.g., Sfh-I, K_i 0.16 μ M) and potentiate β -lactam activity against producer strains. X-ray crystallography reveals that inhibition involves direct interaction of the MMTZ thiol with the mono- or dizinc centers of Sfh-I/L1, respectively. This is further enhanced by sulfur- π interactions with a conserved active site tryptophan. Computational studies reveal that the stereochemistry at chiral centers is critical, showing less potent MMTZ stereoisomers (up to 800-fold) as unable to replicate sulfur- π interactions in Sfh-I, largely through steric constraints in a compact active site. Furthermore, *in silico* replacement of the thiazolidine sulfur with oxygen (forming an oxazolidine) resulted in less favorable aromatic interactions with B2 MBLs, though the effect is less than that previously observed for the subclass B1 enzyme NDM-1. In the B3 enzyme L1, these effects are offset by additional MMTZ interactions with the protein main chain. MMTZs can therefore inhibit all MBL classes by maintaining conserved binding modes through different routes.

KEYWORDS: antibiotic resistance, β -lactamases, inhibitors, carbapenemase



INTRODUCTION

β -Lactams are the most prescribed antibiotic class worldwide, but their efficacy is increasingly challenged by the growing problem of antibiotic resistance.¹ The production of β -lactamases in Gram-negative bacteria is the major resistance mechanism in the clinic, as members of this large enzyme family are capable of inactivating all β -lactam antibiotics.² β -Lactamases can be divided into two mechanistic groups: the serine- β -lactamases (Ambler classes A, C, and D,^{3,4} SBLs) and the zinc ion dependent metallo- β -lactamases (class B,⁴ MBLs). SBL-catalyzed hydrolysis involves the attack of a nucleophilic serine on the β -lactam ring and occurs with formation and resolution of a covalent acyl-enzyme intermediate via labile tetrahedral species.⁵ Conversely, MBLs utilize an active site water/hydroxide to hydrolyze the β -lactam ring without formation of a covalent intermediate (Figure 1A).⁵

MBLs can be further subdivided into the B1, B2, and B3 subclasses, based on active site architecture and zinc utilization.^{5,7} The B1 enzymes,⁸ such as NDM-1, VIM-2, and IMP-1, are plasmid mediated and widespread, produced in Gram-negative bacteria such as *Klebsiella pneumoniae*, *Escher-*

ichia coli, and *Pseudomonas aeruginosa*. B1 enzymes have a wide substrate specificity and can hydrolyze almost all β -lactam antibiotics, including the carbapenems, such as imipenem and meropenem, that were once considered antibiotics of last-resort. The active site of B1 enzymes is conserved, containing two Zn(II) ions, termed Zn1 and Zn2, that are coordinated by three amino acids each. Zn1 is coordinated by three histidine residues (His116, His118, and His196; standard MBL numbering throughout⁹) and Zn2 by Asp120, Cys221, and His263. The Zn(II) ions are bridged by a water/hydroxide that is thought to act as the nucleophile in β -lactam hydrolysis. B2 MBLs are monozinc enzymes, containing a zinc ion coordinated as in the Zn2 site of B1 MBLs. To date, they

Received: April 10, 2021

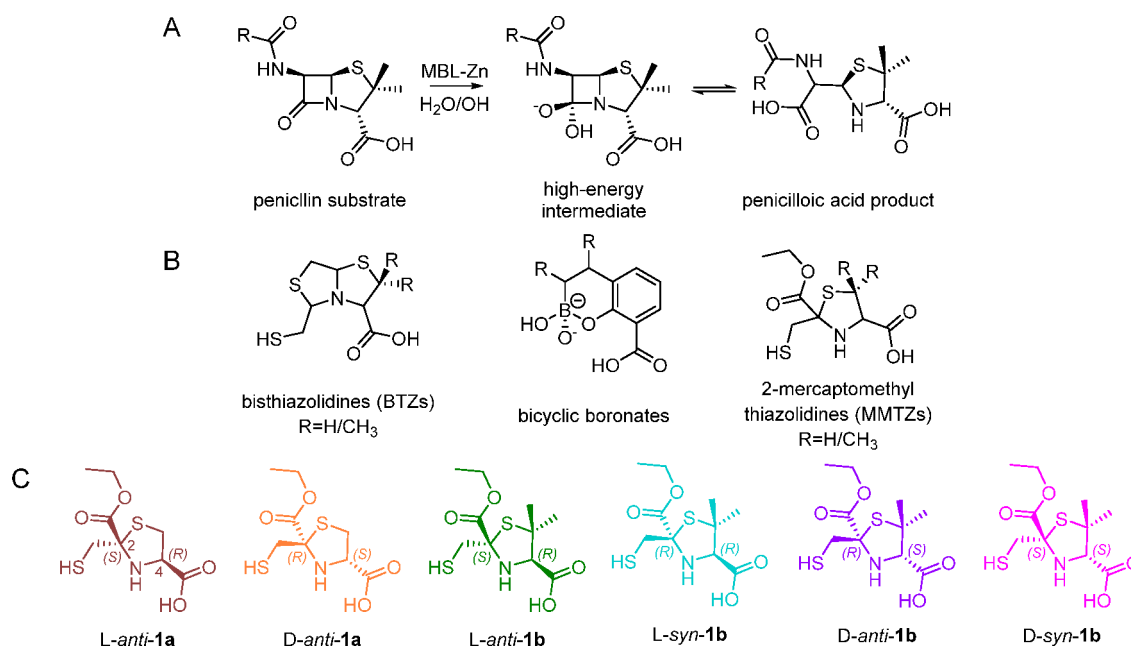


Figure 1. MBL-catalyzed β -lactam breakdown and MBL inhibitors. (A) Penicillin breakdown by MBLs, resulting in penicilloic acid product formation via a proposed high-energy tetrahedral intermediate. (B) Inhibitors based on proposed species in β -lactam hydrolysis. *Left*, bithiazolidine (BTZ) scaffold, R = H/CH₃; *middle*, bicyclic boronates (e.g., taniborbactam, QPX7728); *right*, 2-mercaptomethyl thiazolidine (MMTZ) scaffold, R = H/CH₃. (C) 2-Mercaptomethyl thiazolidines studied here. The absolute R/S configurations of the chiral carbon centers (C-2 and C-4, labeled) are shown. L-anti-1a (brown), D-anti-1a (orange), L-anti-1b (green), L-syn-1b (cyan), D-anti-1b (purple) and D-syn-1b (pink). Part C is adapted from Rossi et al.⁶

have been identified on the chromosomes of the *Serratia fonticola* (Sfh-I¹⁰), *Aeromonas* sp. (CphA¹¹), and *Pseudomonas* sp. (PFM¹²), organisms capable of causing a range of opportunistic infections in the clinic. B2 MBLs are carbapenemases but have a narrower substrate profile than the B1 enzymes, as they are unable to hydrolyze most penicillins and cephalosporins.^{13–16} In contrast, in the dizinc B3 enzymes, Zn1 is coordinated as in B1 MBLs but Zn2 is coordinated by Asp120, His121, and His263, resulting in a different active site architecture to the B1 and B2 MBLs. They are found on the chromosomes of numerous environmental and pathogenic Gram-negative bacteria, including *Stenotrophomonas maltophilia* (L1^{17,18}), *Elizabethkingia meningoseptica* (GOB^{19,20}), and *Pseudomonas otitidis* (POM-1²¹). Some have now been shown to be incorporated into the chromosomes of pathogenic bacteria via a mobile genetic element,^{22,23} indicating the potential for wide dissemination. Taken together with their wide substrate spectrum that includes efficient carbapenem hydrolysis, B3 enzymes could pose an increasing clinical concern.

Inhibitors closely mimicking β -lactam molecules (e.g., clavulanic acid and tazobactam), diazabicyclooctanes (DBOs, e.g. avibactam) and vaborbactam (a cyclic boronate), are now used in the clinic to inactivate some SBLs through covalent attachment to the nucleophilic serine.^{24–26} However, the mechanistically distinct MBLs are not inhibited and can hydrolyze the β -lactam based inhibitors.²⁷ This has prompted extensive investigations into MBL inhibitor development, with bicyclic boronates currently representing the most promising compounds (Figure 1B).^{28,29} For example, taniborbactam (formerly VNRX-5133), currently in late-stage clinical development, is a potent inhibitor of most SBLs and B1 MBLs.^{28–31} In addition, QPX7728 is in phase 1 clinical trials and has an improved spectrum of activity compared to

taniborbactam, particularly against SBLs and the B1 MBL IMP-1.^{32,33} Despite these significant advances in MBL inhibitor development, there remains a need for further exploration of compounds active against all MBL subclasses that will increase our available armamentarium to combat antibiotic resistance and guard against the possible future dissemination of enzymes beyond subclass B1.

We considered that common features of species populated during antibiotic hydrolysis by diverse MBLs could be exploited for inhibitor development.^{34,35} To this end, we previously reported on the synthesis of a series of bithiazolidines (BTZs) that were designed as bicyclic substrate mimics, containing a carboxylate and additional free thiol as a zinc-binding moiety (Figure 1B).³⁶ We demonstrated that BTZ stereoisomers inhibited all MBL subclasses by adopting multiple binding modes in the structurally different active sites.³⁷

More recently, we described a series of 2-mercaptomethyl thiazolidines (MMTZs) that were designed to exploit common features of the binding of hydrolyzed β -lactam products to the MBL active site (Figure 1B).⁶ These compounds contain a thiazolidine ring and two chiral carbon centers with carboxylate and free thiol groups (Figure 1C). Some MMTZs also include a *gem*-dimethyl group that is also present in penicillins and some BTZs. They inhibit the clinically important B1 enzymes NDM-1, VIM-2, and IMP-1 by adopting consistent binding modes that exploit thiol-Zn coordination and an interaction of the thiazolidine sulfur with a conserved aromatic residue in the active site.

Here, we utilize enzyme kinetics, microbiology, X-ray crystallography, and computational chemistry techniques to demonstrate that MBL inhibition by MMTZs extends to the subclass B2 and B3 enzymes, Sfh-I and L1. These data further explore the roles of conserved interactions in the active site,

Table 1. MMTZ Inhibition Constants (K_i , μM) against Purified, Recombinant Metallo- β -Lactamases

Inhibitor	B2 MBL		B3 MBL		B1 MBLs ^{a,b}	
	Sfh-I	L1	NDM-1	VIM-2	IMP-1	
L-anti-1a	0.16 ± 0.03	10.0 ± 0.8	5.2 ± 0.7	0.38 ± 0.05	1.0 ± 0.2	
D-anti-1a	20 ± 2	4.0 ± 0.5	2.5 ± 0.5	0.39 ± 0.04	1.3 ± 0.1	
L-anti-1b	1.3 ± 0.1	20 ± 2	0.44 ± 0.06	0.75 ± 0.09	0.46 ± 0.05	
L-syn-1b	100 ± 10	28 ± 3	8 ± 1	3.6 ± 0.4	6.0 ± 0.6	
D-anti-1b	130 ± 10	1.4 ± 0.2	3.1 ± 0.3	0.9 ± 0.1	0.93 ± 0.08	
D-syn-1b	1.0 ± 0.1	4.0 ± 0.6	0.6 ± 0.05	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.2	
L-BTZ-1 ^b	0.26 ± 0.03	12 ± 1	7 ± 1	2.9 ± 0.4	8 ± 2	
D-BTZ-1 ^b	26 ± 3	10 ± 1	19 ± 3	3.2 ± 0.4	6 ± 1	
L-BTZ-2 ^b	0.36 ± 0.04	11 ± 2	18 ± 3	6 ± 1	15 ± 3	
D-BTZ-2 ^b	29 ± 3	10 ± 1	12 ± 1	14 ± 3	10 ± 2	

^aB1 MMTZ data are from Rossi et al.⁶ following the same protocol as used here. ^bAll BTZ data are from Hinchliffe et al., calculated following the same protocol as used here.³⁷ BTZs -1 and -2 are with and without a *gem*-dimethyl group, respectively. See Figure S3A for chemical structures of the L/D-BTZ stereoisomers.

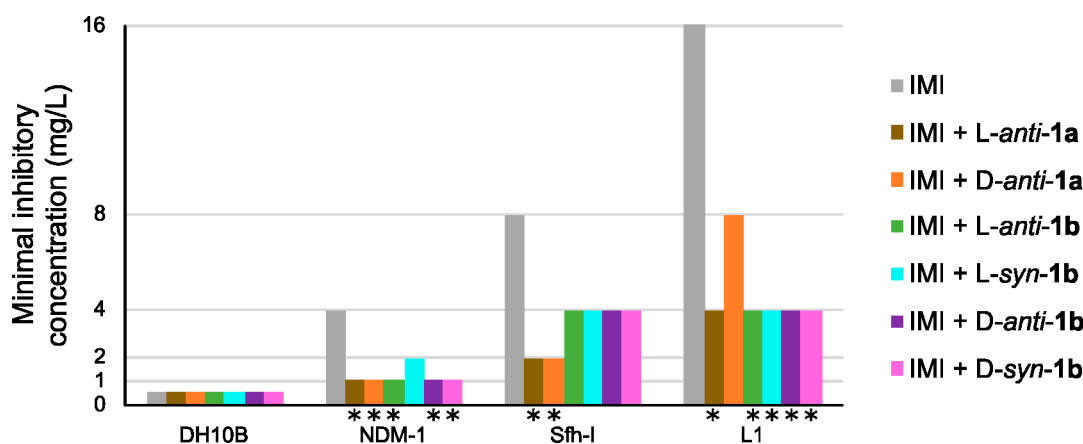


Figure 2. Effect of MMTZs on imipenem minimum inhibitory concentrations of MBL-expressing *E. coli*. The minimum inhibitory concentration of imipenem (IMI) ± 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MMTZ was determined for the *E. coli* strain DH10B expressing NDM-1, Sfh-I or L1 (see Methods for details). At this concentration, in the absence of antibiotic, MMTZs do not have a detrimental effect on bacterial growth. An asterisk denotes the inhibitor had a 4-fold effect on MIC (i.e., two dilutions). A 2-fold effect (i.e., one dilution factor) is not considered significant. Results are the mode of three biological replicates.

including the sulfur- π interaction, in maintaining a conserved binding mode. The results highlight that exploiting common features of the MBL active site can represent a tractable route toward achieving cross-class inhibition and new drug development.

RESULTS AND DISCUSSION

MMTZs are Cross-Class MBL Inhibitors *In Vitro*. To determine the inhibition profile of MMTZs against MBLs, we first measured inhibitory constants (K_i values) against the clinically relevant B2 and B3 enzymes Sfh-I and L1 by monitoring imipenem hydrolysis in the presence of MMTZs (Figures S1 and S2). Inhibition profiles could then be compared with our previously collected K_i data for the B1 MBLs (Table 1).

Our results show that MMTZs potently inhibit all MBL subclasses, although there are clear differences between different enantiomers. This is most apparent with Sfh-I for which K_i values range from 0.16 μM to 130 μM , an \sim 800-fold difference. In particular, there are \sim 100-fold reductions in K_i between L/D-anti-1a, L/D-anti-1b, and L/D-syn-1b. Further, compounds in which C-2 of the thiazolidine ring is in the (R)-configuration have poor potency compared to the (S)-isomer, with K_i values of 20, 100, or 130 μM (D-anti-1a, L-syn-1b, and

D-anti-1b, respectively). We also found BTZs to be 100-fold less potent against Sfh-I when the chiral carbon center bearing the mercaptomethyl group is in the (S)-configuration, i.e., the D-enantiomer (Figure S3A). However, unlike the BTZs, the presence of a *gem*-dimethyl group in MMTZs also adversely affects their potency against Sfh-I, with a *c.* 10-fold reduction in K_i between L-anti-1a/1b and D-anti-1a/1b. Variation in the inhibitory activity of MMTZs against L1 is less apparent (as is also the case for BTZs), although a slight preference for the D-over the L-isomer is observed (2.5-/7-/14-fold K_i increases for anti-1a, anti-1b and syn-1b L/D stereoisomers, respectively). The two compounds most active against the range of MBLs tested here, and previously,⁶ are L-anti-1a and D-syn-1b. In contrast, D- and L-captopril, compounds with a free thiol and pyrrolidine ring (Figure S3B), display particularly poor potency against a B2 enzyme (K_i 's 72/950 μM against CphA), and are up to 20-fold less potent than MMTZs against B3 enzymes (K_i 's 20/8.8 μM against L1/SMB-1) (Table S1).

We next sought to determine whether MMTZs could potentiate antibiotic activity against recombinant *E. coli* expressing NDM-1, Sfh-I, and L1 by measuring their effect on the minimal inhibitory concentration (MIC) of imipenem (chosen as Sfh-I predominantly hydrolyzes carbapenems and

for consistency with our previous work⁶) in broth microdilution assays (Figure 2).

At a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MMTZs display variable effectiveness in lowering the imipenem MIC of MBL-expressing *E. coli* DH10B. Although some of the compounds only cause a 2-fold reduction in imipenem susceptibility, a number result in a more significant 4-fold reduction (i.e., a factor of 2 dilutions, see asterisks in Figure 2). Indeed, compound *L-anti-1a* was the most effective, causing a 4-fold MIC reduction against *E. coli* producing NDM-1, Sfh-I or L1. The compound that was most potent against purified, recombinant MBLs, *D-syn-1b*, surprisingly showed the least effect against these MBL-expressing bacteria. To test whether lower concentrations of inhibitor could potentiate activity, we tested the effect of 50 and 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on the imipenem MIC against the L1-expressing *E. coli* DH10B (Table S2). These data indicate that 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *L-anti-1b*, *D-syn-1b*, and *L-syn-1b* all caused a 4-fold reduction in imipenem MIC, indicating lower concentrations of inhibitor can potentiate imipenem activity against a lab strain carrying an efficient carbapenemase. However, we note that concentrations of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were required for effective imipenem potentiation against a number of clinical strains expressing B1 MBLs.⁶

We have previously reported that MMTZs are relatively stable in solution (PBS), with 12% forming disulfides after 6 h and 88% remaining intact.⁶ It is possible that over the time course of an MIC assay this may have a small, but limited, effect on the MIC profiles, contributing to the discrepancy between K_i values and MICs, but we consider it unlikely that this is the sole explanation. We note that penetration into the bacterial periplasm may also be a contributing factor, as our previously determined in cell IC_{50} values against NDM-1 were also slightly elevated compared to *in vitro* K_i values.⁶

MMTZs therefore inhibit all MBL subclasses and can potentiate carbapenem activity against recombinant *E. coli* expressing enzymes from all three MBL classes. These *in vitro* data also highlight the importance of considering inhibitor stereochemistry for cross-class inhibition, with stereochemical preferences particularly marked in the case of the B2 enzymes which have a narrower substrate specificity. In contrast, inhibition of the B1 MBLs was less affected by stereochemistry, with the B3 enzymes displaying moderate selectivity toward the different stereoisomers.

X-ray Crystallography. Having previously established that MMTZs adopt a consistent binding mode to B1 MBLs,⁶ we next sought to determine how they interact with the active sites of both Sfh-I and L1 by X-ray crystallography. We therefore soaked preformed MBL crystals in MMTZs and obtained high-resolution structures of *L-anti-1a* bound to Sfh-I and *D-syn-1b* to L1 (Table S3). These represent the two compounds that can be considered the most potent over all three MBL subclasses tested (Table 1). Sfh-I crystallized in space group $P2_1$ with two molecules in the asymmetric unit (ASU) and L1 in space group $P6_422$ with one molecule in the ASU. In both cases, bound MMTZ could be modeled into clearly defined $F_o - F_c$ electron density (Figure S4) with real space correlation coefficients calculated by the PDB after refinement of 0.96/0.97 (Sfh-I, chains A and B) and 0.95 (L1).

MMTZ binding involves interaction of the thiol directly with the monozinc center of Sfh-I, or bridging the dizinc center of L1 and displacing the catalytic water/hydroxide (Figure 3). In Sfh-I, there is a weak hydrogen bond between the ethyl ester carbonyl of *L-anti-1a* and the side chain nitrogen of Asn233

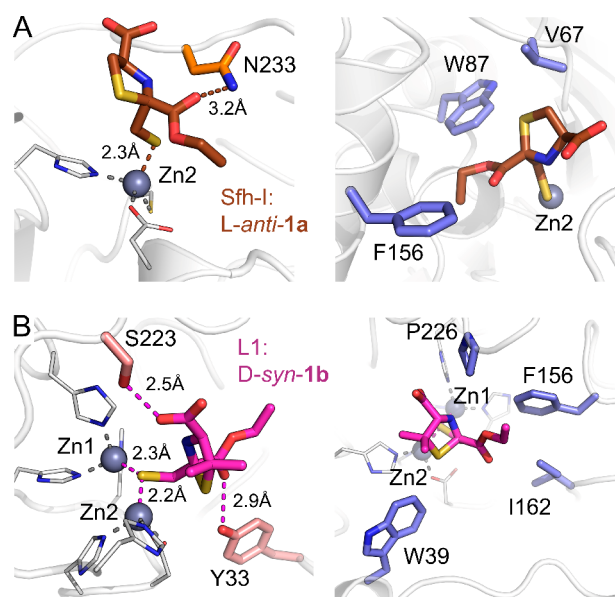


Figure 3. Interactions of MMTZs in the active site of L1 and Sfh-I. *Left*, thiol-Zn interactions and hydrogen bonds in MMTZ:MBL complexes (distance labeled). *Right*, interactions with hydrophobic residues lining the active site (blue sticks). (A) *L-anti-1a* (brown) binding to Sfh-I; (B) *D-syn-1b* (pink) binding to L1.

(3.2 Å). In contrast, *D-syn-1b* binding to L1 is stabilized by stronger hydrogen bonds with the side chain oxygens of Ser223 (2.5 Å) and Tyr33 (2.9 Å).

The binding mode of *D-syn-1b* to L1 has similarities with its binding to the dizinc B1 enzymes NDM-1 and VIM-2, particularly with respect to the positioning of the thiol and carboxylate groups (Figure S5). However, the C-2 ethyl ester side chain is rotated 180° and therefore points in the opposite direction in L1. Furthermore, in the B1 enzymes, there is only a single (c. 2.6–3 Å) interaction with the backbone nitrogen of Asn233 in comparison to the hydrogen bonds *D-syn-1b* makes with two amino acid residues in L1.

Structure–Activity Relationships and Conserved Sulfur- π Interactions. X-ray-crystallographic data, both presented here and previously,⁶ therefore indicate that MMTZs employ a consistent binding mode to the active sites of diverse MBLs, especially when compared with the diverse modes of binding previously observed for complexes of the bicyclic BTZs. This is highlighted by the identification that in B1 MBLs, MMTZ binding utilizes a conserved sulfur- π interaction between the thiazolidine sulfur atom and an active site aromatic residue (Trp87 in NDM-1/VIM-2 or Phe87 in IMP-1). We note that this interaction is conserved in the B2 and B3 enzymes Sfh-I and L1, with distances comparable to those observed in the B1 enzymes (Figure 4).

Notably, the sulfur- π interaction is not conserved for the bicyclic thiazolidine stereoisomers (bisthiazolidines, BTZs) for which diverse binding modes allowed cross-class inhibition.³⁷ Indeed, in comparison with their respective MMTZ analogues, *L/D*-BTZs bind very differently to both Sfh-I and L1 (Figure S6): the BTZ carboxylate, rather than the thiol, interacts with the Zn(II) ion in Sfh-I, and in L1, the BTZ thiazolidine ring is flipped in comparison to that of the MMTZ. These differences, that are also observed for the B1 enzymes,⁶ perhaps reflect the more constrained bicyclic ring scaffold of BTZs which does not

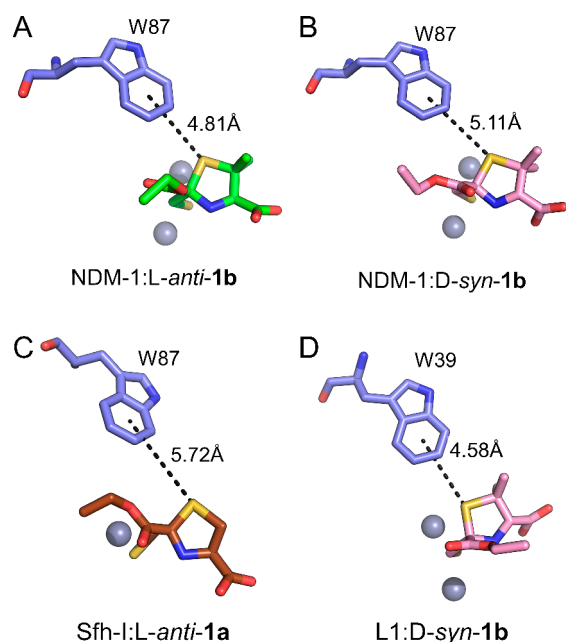


Figure 4. Sulfur- π interactions of MMTZs in MBL active sites. Views from the active sites of MBLs with dashes showing the interaction (distances labeled) of the MMTZ sulfur with an active site tryptophan (blue sticks) in (A) NDM-1:*L-anti-1b* (PDB 6zyp⁶), (B) NDM-1:*D-syn-1b* (PDB 6zyq⁶), (C) Sfh-I:*L-anti-1a* (PDB 7bj9) and (D) L1:*D-syn-1b* (PDB 7bj8).

afford these compounds the flexibility to adopt consistent binding modes that exploit the sulfur- π interaction.

Furthermore, based on comparisons with X-ray crystal structures of biapenem bound to the B2 enzyme CphA (PDB 1x8i³⁸) and hydrolyzed penicillin G bound to L1 (PDB 6u0z³⁹) (Figure S7), MMTZ binding does not closely reflect that of β -lactam-derived hydrolysis products. To date, there are no crystal structures available for B2 MBLs in complex with penicillin-derived products as penicillin is not hydrolyzed by these enzymes, so direct comparisons cannot be made between the orientations of the biapenem-derived product in the CphA complex points in the opposite direction to the MMTZ carboxylate in Sfh-I, indicative of likely differing binding modes adopted by MMTZs and β -lactams (Figure S7A). The pyrroline ring of hydrolyzed biapenem lies in the same plane as the MMTZ thiazolidine, although interactions of the pyrroline N with Zn2 place the ring more deeply in the active site and closer to the Zn(II) ion than for the MMTZ. In the case of L1 (Figure S7B), both MMTZ and hydrolyzed penicillin G hydrogen bond with active site residues Tyr33 and Ser223. However, the thiazolidine rings lie at 90° to one another, resulting in a much weaker sulfur- π interaction for the hydrolyzed antibiotic, compared to that possible for the MMTZ. We previously observed the same relationship when comparing MMTZ/antibiotic binding in NDM-1.⁶

To understand the importance of these conserved interactions, and particularly the structure-activity relationships apparent for Sfh-I, we modeled *in silico* the MMTZs *D-anti-1a*, *L-syn-1b*, and *D-anti-1b* that are ~125–800-fold less potent against Sfh-I than *L-anti-1a*. We first generated structures of MMTZs docked in the active site as their anion (see Methods) and subsequently optimized these with quantum mechanical/molecular mechanics (QM/MM) simu-

lations. This procedure was validated by closely reproducing the *L-anti-1a* binding mode to Sfh-I determined crystallographically, particularly maintaining sulfur- π and thiol-Zn interactions (Figure S8). These optimized, crystallographically intractable complexes resulted in an increase of the sulfur- π interaction from 6.11 Å in the QM/MM optimized crystal structure (PDB 7bj9, *L-anti-1a*) to 7.50 Å (*D-anti-1a*) and 6.72 Å (*L-syn-1b*) (Figure S9A,B, respectively). These binding modes most likely arise due to limited space in the active site for the ligand to occupy, preventing conformations that maintain the sulfur- π interaction. This also results in a conformationally constrained *L-syn-1b* (625-fold less potent than *L-anti-1a*), in which its carbonyl oxygen is in an energetically unfavorable position, 1.7 Å from the thiol sulfur, further contributing to the poor potency of this MMTZ isomer. In contrast, *D-anti-1b* binds to the active site with the thiazolidine sulfur pointing away from Trp87 and in the opposite direction to the other docking modes (and the crystallographic structure of the *L-anti-1a* complex), further highlighting that the sulfur- π interaction cannot be maintained (Figure S9C). These constraints on the ligand geometry are consistent with the narrower substrate profile of Sfh-I compared with most B1 or B3 enzymes. These structural data rationalize the significant structure-activity relationships, particularly the impact of the stereochemistry on inhibitory potency, for MMTZs against Sfh-I, where K_i values for compounds with C-2 in the (*R*)-configuration were significantly poorer than those when C-2 is in the (*S*)-configuration. Furthermore, our crystallographic data support these observations by showing that the addition of a *gem*-dimethyl group to MMTZs can result in steric clashes with Val67 (Figure 3A, right), contributing to the ~10-fold reduction in potency of the **1b** compounds against Sfh-I (Table 1).

It has previously been shown that potency can be less for inhibitors which have an oxazolidine/triazole rather than thiazolidine/thiadiazole ring,⁴⁰ highlighting the potential importance of the sulfur atom for inhibition. Therefore, to further explore the role of the sulfur- π interaction in B2 and B3 MBLs, we selectively replaced the thiazolidine sulfur with an oxygen atom *in silico* and optimized the complexes with resultant isosteric 2-mercaptomethyl oxazolidines (MMOZs) with QM/MM. This *in silico* approach was necessary as the oxazolidine compounds were synthetically intractable due to instability issues. Our previous QM/MM simulations with NDM-1⁶ using the same methodology revealed that MMOZs caused an increase in the interaction distance between the O/S of the MMOZ/MMTZ and the conserved active site aromatic residue Trp87 (Figure 5A,B). Here, we note that the effect in Sfh-I and L1 is less prominent than that in the B1 NDM-1:*L-anti-1a* complex (Figure 5 and Table S4). In the case of NDM-1:*L-anti-1a*, the larger effect was caused by significant movement of the MMOZ in the NDM-1 active site, which is not observed in the Sfh-I and L1 simulations or in the NDM-1:*D-syn-1b* complex.

Although MMOZ movement in the NDM-1:*D-syn-1b* and Sfh-I:*L-anti-1a* complexes is limited, the distance of the heteroatom to Trp87 still increases compared to its equivalent in the MMTZ complexes. This can be partly explained by the shorter C–O, compared to C–S, bond distance, resulting in the oxygen atom being further from Trp87 than is the sulfur. In L1, however, the distance increase is minimal (0.13 Å), which can be explained by the increased number of hydrogen bonds formed by *D-syn-1b* in the active site, potentially outweighing

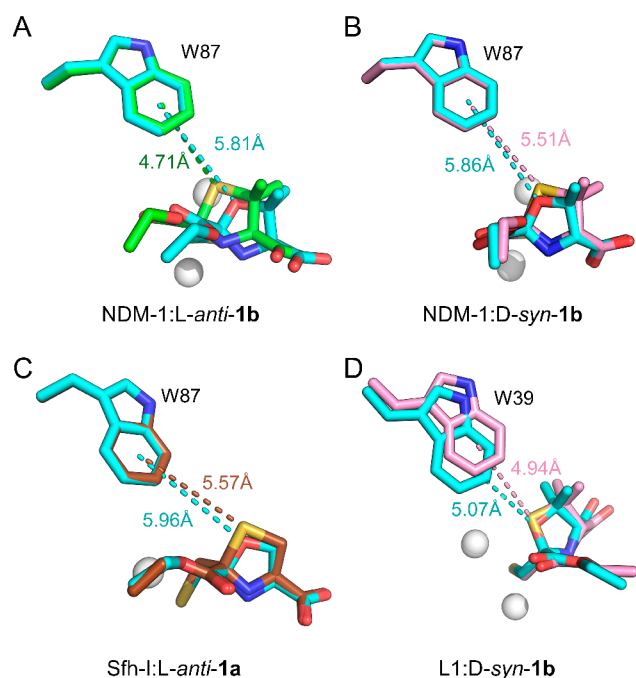


Figure 5. QM/MM optimized structures of MMTZs and their analogous oxazolidinones in MBLs. Views from the active show overlays of QM/MM optimized complex structures for MMTZs (colored as in Figure 3) and their MMOZ analogues (cyan) bound in MBLs. NDM-1 simulations were performed previously.⁶ (A) NDM-1:L-anti-1a; (B) NDM-1:D-syn-1b; (C) Sfh-I:L-anti-1a; (D) L1:D-syn-1b.

the effect of the O/S-aromatic interaction. Substitution of the sulfur with an oxygen therefore has variable effects *in silico*, but the data are suggestive that the sulfur- π interaction exerts greatest influence in the NDM-1:L-anti-1a complex. Indeed, the S to O substitution appears to only affect structures in which the hydrogen bonds in the active site are minimal (NDM-1 and Sfh-I) but has a less substantive contribution when inhibitor binding is stabilized by stronger hydrogen bonds (L1). Further, inhibitor binding in Sfh-I is more likely driven by constraints imposed by the narrow active site, with a reduced contribution from sulfur- π interactions.

CONCLUSIONS

In summary, our analysis demonstrates, and provides the basis for, cross-class inhibition of MBLs by MMTZs. Although sulfur- π interactions contribute to MMTZ:MBL interactions in all cases, our data suggest that different factors are responsible for establishing the broadly similar binding modes in the three structurally different active sites. In B1 MBLs such as NDM-1, sulfur- π interactions most likely dominate; B2 enzymes (e.g., Sfh-I) have a constrained active site that can sterically clash with MMTZs, particularly those with a *gem*-dimethyl group or C-2 in the (*S*)-configuration, whereas in B3 enzymes, the contribution of hydrogen bonds to binding appears to override the sulfur- π interaction. Differences in potency and the potential for steric clashes with the active site highlight the need to consider alternative inhibitor stereoisomers to achieve cross-class MBL inhibition and more generally in future inhibitor development. MMTZs therefore represent a promising MBL inhibitor scaffold that is synthetically accessible, allowing for the design of future iterations that improve potency in bacterial cells.

MATERIAL AND METHODS

Synthesis of 2-Mercaptomethyl Thiazolidines.

MMTZs were synthesized as previously described.⁶ Purity was determined by HPLC to be >95% as described in Rossi et al.⁶

Inhibition Constants. Inhibition constants were determined as previously described.⁶ In detail, K_i values were determined under steady-state conditions by following imipenem hydrolysis by Sfh-I and L1 at 30 °C. Imipenem breakdown was measured as a decrease in absorbance at 300 nm ($\Delta\epsilon_{300} = -9000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in a Jasco V-670 spectrophotometer. Reactions were setup in a 0.1 cm path length quartz cuvette with a final volume of 300 μL . Final enzyme concentration was 2 nM. Reaction buffer contained 10 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl and 50 mg/L BSA. Reaction buffer for L1 was supplemented with 20 μM ZnSO₄. MMTZs were dissolved in DMSO at a final concentration of 100 mM and diluted in the reaction buffer to the desired concentration. The DMSO concentration (0.07%) does not affect the enzyme activity (data not shown). The reactions were started and monitored with the addition of the MBLs to a substrate and inhibitor mixture. Linear time courses were observed for all the conditions and less than 5% of the substrate was consumed after 300 s (Figure S1). Reaction rates were obtained from the slope of these time courses and fitted with the Competitive Inhibition model in GraphPad Prism 5.0, from which the inhibition constant (K_i) could be calculated (Figure S2).

The same protocol was followed for the previously published K_i determination of the MMTZ compounds with B1 enzymes⁶ and the BTZ compounds with B1,³⁶ B2, and B3 enzymes.³⁷

Microbiology. Minimal inhibitory concentrations (MICs) for imipenem were determined by the broth microdilution method in cation-adjusted Mueller Hinton broth according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.⁴¹ Imipenem was chosen as a representative carbapenem as Sfh-I is predominantly a carbapenemase. *E. coli* DH10B cells were transformed with pMBLe (containing *bla*_{NDM-1} or *bla*_{Sfh-1}) or pBC-SK (containing *bla*_{L1}). NDM-1 and Sfh-I expression was induced with 0.1 mM IPTG. MMTZs were dissolved to 250 mM in DMSO before dilution to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in serial doubling dilutions of imipenem (from 64 mg/L to 0.025 mg/L). Results presented are the mode of three biological replicates.

X-ray Crystallography. L1 and Sfh-1 were produced, purified, and crystallized as previously described.^{37,42} L1 was crystallized by mixing 1 μL protein (23 mg/mL in 10 mM Tris pH 7, 5 mM ZnSO₄, 100 mM NaCl) with 1 μL crystallization reagent [0.1 M HEPES pH 7.75, 1.5% PEG400, 2 M (NH₄)₂SO₄].³⁷ Sfh-I was crystallized by mixing, in a 3:2 ratio, protein (15 mg/mL, in 50 mM HEPES pH 7.5, 10% glycerol) with 0.2 M sodium acetate and 27 wt %/vol PEG 3350.⁴² MMTZs were dissolved in crystallization buffer at 5 mM and soaked into preformed crystals for 1 h 20 m (L1) or 1 h (Sfh-I). Diffraction data were collected at Diamond I03 (Sfh-I) or I04-1 (L1). Reflections were indexed and integrated in Mosflm (L1) or Dials⁴³ (Sfh-I) and scaled in Aimless.⁴⁴ Phases were calculated with molecular replacement in Phaser⁴⁵ using Sevd³⁷ or Sew0³⁷ as search models for L1 and Sfh-I, respectively. Structural models were completed with iterative rounds of refinement in Coot⁴⁶ and Phenix.⁴⁷ Ligand restraints were calculated in eLBOW^{47,48} and modeled into clearly

defined F_o-F_c electron density. Figures were created in PyMol.⁴⁹

Computational Calculations. *Starting structure preparation.* All ligands were prepared as thiolate anions, with the carboxylate also deprotonated. Oxazolidine complexes were built *in silico* by replacing the sulfur atom with an oxygen atom in the corresponding L1 and Sfh-I crystal structures, PDBs 7bj8 and 7bj9, respectively.

Sfh-I complexes with crystallographically intractable MMTZs were initially docked in Autodock 4.2.6⁵⁰ using the solvent sites biased Autodock4 docking method (SSBMD).⁵¹ Using information from the available crystal structures, we modified the Autodock4 scoring function by adding an energy term for the thiol sulfur atom to the original function. The Sfh-I crystal structure (PDB 7bj9) was used as the receptor protein with hydrogen atoms added by AutoDockTools4.⁵⁰ Structures of compounds *D-anti-1b*, *L-syn-1b*, *D-anti-1a* were optimized in vacuum at Hartree–Fock/6-31G* level using Gaussian 09⁵² and subsequently prepared in pdbqt format using AutoDockTools4.⁵⁰ The grid map was set to 40 × 40 × 40 points with a grid spacing of 0.375 Å centered on the catalytic site. For each calculation, 100 different docking runs were performed, and the resulting 100 poses were clustered according to a ligand RMSD cutoff of 2 Å. The predicted binding free energy score (ΔG) and population were the criteria used to choose the correct ligand pose, further considering the crystallographic information on similar compounds.

Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) optimizations. All starting structures were geometrically optimized at the Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) level. For hybrid QM/MM calculations, we used a semiempirical method PM6⁵³ to describe the QM region and the ff14SB force field⁵⁴ to describe the MM region as implemented in Amber16.^{55,56} Hydrogen atoms were added, and each protein was immersed in a truncated octahedral periodic box with a minimum solute-wall distance of 8 Å, filled with explicit TIP3P water molecules,⁵⁷ using the AMBER16 leap module.⁵⁵ The van der Waals radius, force constants, and equilibrium distances, angles, and dihedral of the studied inhibitors were taken from the gaff database, and partial charges were RESP charges computed using the Hartree–Fock method and 6-31G* basis set.^{55,58} To accommodate solvent molecules and possible clashes, an initial minimization at the molecular mechanic level of each complex structure was performed, followed by QM/MM geometry optimization. The QM region consisted of both Zn(II) ions plus the coordinated side chains of residues of the first coordination sphere and the inhibitor compound.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.1c00194>.

D-captopril inhibition constants, effect of MMTZs on imipenem, X-ray crystallographic data, reaction curves of imipenem hydrolysis, determination of MMTZ inhibition constants, chemical structures of selected thiol-containing inhibitors, binding images and comparisons (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

James Spencer – School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, U.K.; orcid.org/0000-0002-4602-0571; Email: jim.spencer@bristol.ac.uk

Authors

Philip Hinchliffe – School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, U.K.; orcid.org/0000-0001-8611-4743

Diego M. Moreno – Instituto de Química de Rosario (QUIR, CONICET-UNR), S2002LRK Rosario, Argentina; Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, S2002LRK Rosario, Argentina; orcid.org/0000-0001-5493-8537

Maria-Agustina Rossi – Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET-UNR), S2002LRK Rosario, Argentina

Maria F. Mojica – Infectious Diseases Department, School of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio 44106, United States; Research Service, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, Ohio 44106, United States; Grupo de Resistencia Antimicrobiana y Epidemiología Hospitalaria, Universidad El Bosque, Bogotá 11001 DC, Colombia

Veronica Martinez – Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo 11800, Uruguay

Valentina Villamil – Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo 11800, Uruguay

Brad Spellberg – Los Angeles County and University of Southern California (LAC + USC) Medical Center, Los Angeles, California 90033, United States

George L. Drusano – Center for Pharmacometrics and Systems Pharmacology, Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida, Orlando, Florida 32827-7400, United States

Claudia Banchio – Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, S2002LRK Rosario, Argentina; Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET-UNR), S2002LRK Rosario, Argentina

Graciela Mahler – Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo 11800, Uruguay; orcid.org/0000-0003-0612-0516

Robert A. Bonomo – Research Service, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, Ohio 44106, United States; Departments of Medicine, Pharmacology, Molecular Biology and Microbiology, Biochemistry, and Proteomics and Bioinformatics, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio 44106, United States; Medical Service, GRECC, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, Ohio 44106, United States; CWRU-Cleveland VAMC Center for Antimicrobial Resistance and Epidemiology (Case VA CARES), Cleveland, Ohio 44106, United States; orcid.org/0000-0002-3299-894X

Alejandro J. Vila – Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, S2002LRK

Rosario, Argentina; Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET-UNR), S2002LRK Rosario, Argentina

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/10.1021/acsinfecdis.1c00194>

Author Contributions

△These authors contributed equally to this work

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Diamond Light Source for beamtime (proposals mx12342 and mx17212), and the staff of beamlines I03 and I04-1 for assistance with crystal testing and data collection. This work was supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health (NIH) to R. A. B. under Award Numbers R01AI063517 and R01AI072219, to R. A. B., G. M., J. S. and A. J. V. under Award Number R01AI100560 and to B. S. under Award Numbers R01 AI130060 and AI117211. This study was also supported in part by funds and/or facilities provided by the Cleveland Department of Veterans Affairs, Award Number 1I01BX001974 to R. A. B. from the Biomedical Laboratory Research & Development Service of the VA Office of Research and Development, and the Geriatric Research Education and Clinical Center VISN 10. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NIH or the Department of Veterans Affairs. V. M. and V. V. are recipients of a fellowship from Comisión Académica de Posgrado (CAP-Udelar). This work was supported by grant S2021INIC2019 from Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) to V. M. and G. M. and grant PICT-2016-1657 from ANPCyT to A. J. V., C. B. and D. M. M. and A. J. V. are staff members from CONICET. M. A. R. is recipient of a fellowship from CONICET.

ABBREVIATIONS

ASU	asymmetric unit
BLI	β -lactamase inhibitor
BTZ	bisthiazolidine
DBO	diazabicyclooctane
MBL	metallo- β -lactamase
MIC	minimum inhibitory concentration
MMOZ	2-mercaptomethyl oxazolidine
MMTZ	2-mercaptomethyl thiazolidine
QM/MM	quantum mechanics/molecular mechanics
SBL	serine- β -lactamase

REFERENCES

- (1) Bush, K.; Bradford, P. A. beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **2016**, *6* (8), a025247.
- (2) Bush, K. Past and Present Perspectives on beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62* (10), 1076 DOI: 10.1128/AAC.01076-18.
- (3) Ambler, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **1980**, *289* (1036), 321–31.
- (4) Bush, K.; Jacoby, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (3), 969–76.
- (5) Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E. C.; Colenso, C. K.; Hirvonen, V. H. A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J. beta-Lactamases and

beta-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431* (18), 3472–3500.

- (6) Rossi, M. A.; Martinez, V.; Hinchliffe, P.; Mojica, M. F.; Castillo, V.; Moreno, D. M.; Smith, R.; Spellberg, B.; Drusano, G. L.; Banchio, C.; Bonomo, R. A.; Spencer, J.; Vila, A. J.; Mahler, G. 2-Mercaptomethyl-thiazolidines use conserved aromatic-S interactions to achieve broad-range inhibition of metallo- β -lactamases. *Chemical Science* **2021**, *12* (8), 2898–2908.
- (7) Palzkill, T. Metallo-beta-lactamase structure and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, *1277*, 91–104.
- (8) Mojica, M. F.; Bonomo, R. A.; Fast, W. B1-Metallo-beta-Lactamases: Where Do We Stand? *Curr. Drug Targets* **2016**, *17* (9), 1029–50.
- (9) Garau, G.; Garcia-Saez, I.; Bebrone, C.; Anne, C.; Mercuri, P.; Galleni, M.; Frere, J. M.; Dideberg, O. Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (7), 2347–9.
- (10) Saavedra, M. J.; Peixe, L.; Sousa, J. C.; Henriques, I.; Alves, A.; Correia, A. Sfh-I, a subclass B2 metallo-beta-lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47* (7), 2330–3.
- (11) Massidda, O.; Rossolini, G. M.; Satta, G. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. *J. Bacteriol.* **1991**, *173* (15), 4611–7.
- (12) Poirel, L.; Palmieri, M.; Brillante, M.; Masseron, A.; Perreten, V.; Nordmann, P. PFM-Like Enzymes Are a Novel Family of Subclass B2Metallo-beta-Lactamases from *Pseudomonas synxantha* Belonging to the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64* (2), 1700 DOI: 10.1128/AAC.01700-19.
- (13) Walsh, T. R.; Gamblin, S.; Emery, D. C.; MacGowan, A. P.; Bennett, P. M. Enzyme kinetics and biochemical analysis of ImiS, the metallo- β -lactamase from *Aeromonas sobria* 163a. *J. Antimicrob. Chemother.* **1996**, *37* (3), 423–431.
- (14) Gonzalez, L. J.; Stival, C.; Puzzolo, J. L.; Moreno, D. M.; Vila, A. J. Shaping Substrate Selectivity in a Broad-Spectrum Metallo-beta-Lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62* (4), 2079 DOI: 10.1128/AAC.02079-17.
- (15) Rasmussen, B. A.; Bush, K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41* (2), 223–232.
- (16) Crowder, M. W.; Spencer, J.; Vila, A. J. Metallo-beta-lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39* (10), 721–8.
- (17) Mojica, M. F.; Rutter, J. D.; Taracila, M.; Abriata, L. A.; Fouts, D. E.; Papp-Wallace, K. M.; Walsh, T. J.; LiPuma, J. J.; Vila, A. J.; Bonomo, R. A. Population Structure, Molecular Epidemiology, and beta-Lactamase Diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates in the United States. *mBio* **2019**, *10* (4), 405 DOI: 10.1128/mBio.00405-19.
- (18) Crossman, L. C.; Gould, V. C.; Dow, J. M.; Vernikos, G. S.; Okazaki, A.; Sebahia, M.; Saunders, D.; Arrowsmith, C.; Carver, T.; Peters, N.; Adlem, E.; Kerhornou, A.; Lord, A.; Murphy, L.; Seeger, K.; Squares, R.; Rutter, S.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Harris, D.; Churcher, C.; Bentley, S. D.; Parkhill, J.; Thomson, N. R.; Avison, M. B. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol.* **2008**, *9* (4), R74.
- (19) Bellais, S.; Aubert, D.; Naas, T.; Nordmann, P. Molecular and biochemical heterogeneity of class B carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in *Chryseobacterium meningosepticum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44* (7), 1878–86.
- (20) Moran-Barrio, J.; Lisa, M. N.; Larrieux, N.; Drusin, S. I.; Viale, A. M.; Moreno, D. M.; Buschiazio, A.; Vila, A. J. Crystal Structure of the Metallo-beta-Lactamase GOB in the Periplasmic Dizinic Form Reveals an Unusual Metal Site. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (10), 6013–22.
- (21) Thaller, M. C.; Borgianni, L.; Di Lallo, G.; Chong, Y.; Lee, K.; Dajcs, J.; Stroman, D.; Rossolini, G. M. Metallo-beta-lactamase production by *Pseudomonas otitidis*: a species-related trait. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (1), 118–23.

- (22) Wachino, J.; Yoshida, H.; Yamane, K.; Suzuki, S.; Matsui, M.; Yamagishi, T.; Tsutsui, A.; Konda, T.; Shibayama, K.; Arakawa, Y. SMB-1, a novel subclass B3 metallo-beta-lactamase, associated with ISCR1 and a class I integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (11), 5143–9.
- (23) Yong, D.; Toleman, M. A.; Bell, J.; Ritchie, B.; Pratt, R.; Ryley, H.; Walsh, T. R. Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo-beta-lactamase gene, blaAIM-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (12), 6154–9.
- (24) Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23* (1), 160–201.
- (25) Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. New β -Lactamase Inhibitors in the Clinic. *Infectious Disease Clinics of North America* **2016**, *30* (2), 441–464.
- (26) Bush, K.; Bradford, P. A. Interplay between beta-lactamases and new beta-lactamase inhibitors. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17* (5), 295–306.
- (27) Prosperi-Meys, C.; Llabres, G.; de Seny, D.; Soto, R. P.; Valladares, M. H.; Laraki, N.; Frere, J. M.; Galleni, M. Interaction between class B beta-lactamases and suicide substrates of active-site serine beta-lactamases. *FEBS Lett.* **1999**, *443* (2), 109–11.
- (28) Brem, J.; Cain, R.; Cahill, S.; McDonough, M. A.; Clifton, I. J.; Jimenez-Castellanos, J. C.; Avison, M. B.; Spencer, J.; Fishwick, C. W.; Schofield, C. J. Structural basis of metallo-beta-lactamase, serine-beta-lactamase and penicillin-binding protein inhibition by cyclic boronates. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12406.
- (29) Calvopina, K.; Hinchliffe, P.; Brem, J.; Heesom, K. J.; Johnson, S.; Cain, R.; Lohans, C. T.; Fishwick, C. W. G.; Schofield, C. J.; Spencer, J.; Avison, M. B. Structural/mechanistic insights into the efficacy of nonclassical beta-lactamase inhibitors against extensively drug resistant *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Mol. Microbiol.* **2017**, *106* (3), 492–504.
- (30) Krajnc, A.; Brem, J.; Hinchliffe, P.; Calvopina, K.; Panduwawala, T. D.; Lang, P. A.; Kamps, J.; Tyrrell, J. M.; Widlake, E.; Seward, B. G.; Walsh, T. R.; Spencer, J.; Schofield, C. J. Bicyclic Boronate VNRX-5133 Inhibits Metallo- and Serine-beta-Lactamases. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (18), 8544–8556.
- (31) Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Krajnc, A.; Mulholland, A. J.; Brem, J.; Schofield, C. J.; Spencer, J. Cyclic boronates as versatile scaffolds for KPC-2 β -lactamase inhibition. *RSC Medicinal Chemistry* **2020**, *11* (4), 491–496.
- (32) Hecker, S. J.; Reddy, K. R.; Lomovskaya, O.; Griffith, D. C.; Rubio-Aparicio, D.; Nelson, K.; Tsvikovski, R.; Sun, D.; Sabet, M.; Tarazi, Z.; Parkinson, J.; Totrov, M.; Boyer, S. H.; Glinka, T. W.; Pemberton, O. A.; Chen, Y.; Dudley, M. N. Discovery of Cyclic Boronic Acid QPX7728, an Ultrabroad-Spectrum Inhibitor of Serine and Metallo-beta-lactamases. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (14), 7491–7507.
- (33) Tsvikovski, R.; Totrov, M.; Lomovskaya, O. Biochemical Characterization of QPX7728, a New Ultrabroad-Spectrum Beta-Lactamase Inhibitor of Serine and Metallo-Beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64* (6), 130 DOI: 10.1128/AAC.00130-20.
- (34) Palacios, A. R.; Rossi, M. A.; Mahler, G. S.; Vila, A. J. Metallo-beta-Lactamase Inhibitors Inspired on Snapshots from the Catalytic Mechanism. *Biomolecules* **2020**, *10* (6), 854.
- (35) Lisa, M. N.; Palacios, A. R.; Aitha, M.; Gonzalez, M. M.; Moreno, D. M.; Crowder, M. W.; Bonomo, R. A.; Spencer, J.; Tierney, D. L.; Llarrull, L. I.; Vila, A. J. A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo-beta-lactamases. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 538.
- (36) Gonzalez, M. M.; Kosmopoulou, M.; Mojica, M. F.; Castillo, V.; Hinchliffe, P.; Pettinati, I.; Brem, J.; Schofield, C. J.; Mahler, G.; Bonomo, R. A.; Llarrull, L. I.; Spencer, J.; Vila, A. J. Bisthiazolidines: A Substrate-Mimicking Scaffold as an Inhibitor of the NDM-1 Carbapenemase. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1* (11), 544–54.
- (37) Hinchliffe, P.; Gonzalez, M. M.; Mojica, M. F.; Gonzalez, J. M.; Castillo, V.; Saiz, C.; Kosmopoulou, M.; Tooke, C. L.; Llarrull, L. I.; Mahler, G.; Bonomo, R. A.; Vila, A. J.; Spencer, J. Cross-class metallo-beta-lactamase inhibition by bisthiazolidines reveals multiple binding modes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (26), E3745–54.
- (38) Garau, G.; Bebrone, C.; Anne, C.; Galleni, M.; Frere, J. M.; Dideberg, O. A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J. Mol. Biol.* **2005**, *345* (4), 785–95.
- (39) Kim, Y.; Maltseva, N.; Wilamowski, M.; Tesar, C.; Endres, M.; Joachimiak, A. Structural and biochemical analysis of the metallo- β -lactamase L1 from emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* revealed the subtle but distinct di-metal scaffold for catalytic activity. *Protein Sci.* **2020**, *29* (3), 723–743.
- (40) Feng, L.; Yang, K. W.; Zhou, L. S.; Xiao, J. M.; Yang, X.; Zhai, L.; Zhang, Y. L.; Crowder, M. W. N-heterocyclic dicarboxylic acids: broad-spectrum inhibitors of metallo-beta-lactamases with co-antibacterial effect against antibiotic-resistant bacteria. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (16), 5185–9.
- (41) CLSI *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2019, Vol. 29th ed.
- (42) Fonseca, F.; Arthur, C. J.; Bromley, E. H.; Samyn, B.; Moerman, P.; Saavedra, M. J.; Correia, A.; Spencer, J. Biochemical characterization of Sfh-I, a subclass B2 metallo-beta-lactamase from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (11), 5392–5.
- (43) Winter, G.; Waterman, D. G.; Parkhurst, J. M.; Brewster, A. S.; Gildea, R. J.; Gerstel, M.; Fuentes-Montero, L.; Vollmar, M.; Michels-Clark, T.; Young, I. D.; Sauter, N. K.; Evans, G. DIALS: implementation and evaluation of a new integration package. *Acta Crystallographica. Section D, Structural biology* **2018**, *74* (2), 85–97.
- (44) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (4), 235–42.
- (45) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40* (4), 658–674.
- (46) Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (12), 2126–32.
- (47) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkoczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (2), 213–21.
- (48) Moriarty, N. W.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D. electronic Ligand Builder and Optimization Workbench (eLBOW): a tool for ligand coordinate and restraint generation. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2009**, *65* (10), 1074–80.
- (49) Schrödinger, L. *PyMOL Molecular Graphics System*. Vol. Version 1.8.
- (50) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–91.
- (51) Arcon, J. P.; Modenutti, C. P.; Avendano, D.; Lopez, E. D.; Defelipe, L. A.; Ambrosio, F. A.; Turjanski, A. G.; Forli, S.; Marti, M. A. AutoDock Bias: improving binding mode prediction and virtual screening using known protein-ligand interactions. *Bioinformatics* **2019**, *35* (19), 3836–3838.
- (52) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.

Janesko, B. G., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H. P., Ortiz, J. V., Izmaylov, A. F., Sonnenberg, J. L., Williams, Ding, F., Lipparini, F., Egidi, F., Goings, J., Peng, B., Petrone, A., Henderson, T., Ranasinghe, D., Zakrzewski, V. G., Gao, J., Rega, N., Zheng, G., Liang, W., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Throssell, K., Montgomery, Jr., J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M. J., Heyd, J. J., Brothers, E. N., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Keith, T. A., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A. P., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Millam, J. M., Klene, M., Adamo, C., Cammi, R., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Farkas, O., Foresman, J. B., Fox, D. J. *Gaussian 16 Rev. C.01*, Wallingford, CT, 2016.

(53) Stewart, J. J. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* **2007**, *13* (12), 1173–213.

(54) Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (8), 3696–713.

(55) Case, D. A., Betz, R. M., Cerutti, D. S., Cheatham, III, T. E., Darden, T. A., Duke, R. E., Giese, T. J., Gohlke, H., Goetz, A. W., Homeyer, N., Izadi, S., Janowski, P., Kaus, J., Kovalenko, A., Lee, T. S., LeGrand, S., Li, P., Lin, C., Luchko, T., Luo, R., Madej, B., Mermelstein, D., Merz, K. M., Monard, G., Nguyen, H., Nguyen, H. T., Omelyan, I., Onufriev, A., Roe, D. R., Roitberg, A. E., Sagui, C., Simmerling, C. L., Botello-Smith, W. M., Swails, J., Walker, R. C., Wang, J., Wolf, R. M., Wu, X., Xiao, L., Kollman, P. A., 2016, *AMBER 2016*; University of California, San Francisco.

(56) de, M. S. G.; Walker, R. C.; Elstner, M.; Case, D. A.; Roitberg, A. E. Implementation of the SCC-DFTB method for hybrid QM/MM simulations within the amber molecular dynamics package. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111* (26), 5655–64.

(57) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.

(58) Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (40), 10269–10280.

Metathesis

Preparation and Mechanistic Studies of 2-Substituted Bisthiazolidines by Imine Exchange

Verónica Martínez,^[a] Valentina Villamil,^[a] Diego Duarte,^[a] Cecilia Saiz,^[a] Danilo Davyt,^[a] Carolina Fontana,^[b] Nicolás Veiga,^[c] and Graciela Mahler*^[a]

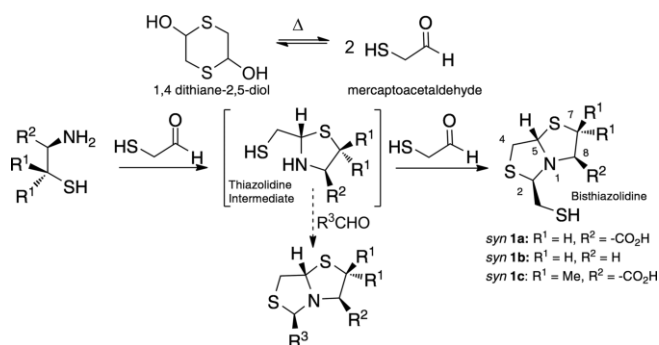
Abstract: Bisthiazolidines (BTZ) are bicyclic compounds considered as penicillin analogs that inhibit the full range of Metallo- β -Lactamases (MBLs) and potentiate β -lactam activity against resistant bacteria. Herein, we present a new methodology to prepare 2-substituted bisthiazolidines by aldehyde exchange. Thirteen new bisthiazolidines were prepared using this methodology, with yields ranging from 31 to 75 %. The reaction is based on in situ imines formation, which are able to exchange side chains. The reaction intermediates were studied based on NMR experiments, and a key imine **1b-II** could be detected in the reaction mixture. Furthermore, a DFT computational analysis

was performed to gain insights into the reaction mechanism, allowing us to unveil the different pathways and their activation barriers within the synthetic route. The results suggest that the most favorable route involve the formation of the thiazolidine **1b-III** by i) a N-assisted N–C bond cleavage, and ii) a thiol-mediated 5 *endo*-trig cyclization followed by a C–N bond cleavage. In contrast with previously reported evidence, the imine metathesis was discarded as a plausible pathway. Finally, the reaction of **1b-III** with aldehyde **2a** leads to bicycle **4a** via the iminium ion **1b-V**.

Introduction

Bisthiazolidines^[1] (**1**) are enantiomerically pure bicycles previously prepared in high yields (Scheme 1).^[2] Interestingly, they display activity against Metallo- β -Lactamases (MBLs), a diverse set of enzymes that catalyze the hydrolysis of a broad range of β -lactam drugs including carbapenems.^[3,4] These compounds have been recently characterized as cross-class inhibitors against seven different MBLs, some of clinical relevance like NDM-1, VIM-2, and L1.^[2,5–7]

Bicycles **1** are obtained in a tandem reaction by double condensation of L-aminothiols with two molecules of mercaptoacetaldehyde. Attempts to isolate the thiazolidine intermediate failed and the bicyclic 2-mercaptomethyl bisthiazolidines products were always obtained in high yields (Scheme 1). Therefore, the possibility to introduce a different substituent in the position 2 of the heterocycle was limited, since it was not possible to isolate the thiazolidine intermediate that could react with a different aldehyde ($R^3\text{CHO}$).



Scheme 1. Synthesis of mercaptomethyl bisthiazolidines **1**.

Thiazolidines are imino-type compounds, having the ability to exchange at the acetalic position with different aldehydes.^[8–11] Imine exchange is a process triggered by acid catalysis,^[12] amine^[13,14] or transition metal complexes containing a metal-imido group $\text{M}=\text{NR}$ ($\text{M} = \text{Zr}$,^[15] Mo ,^[16] Nb ,^[17] Ti ,^[18] Hf ^[19]). We envisioned the potentiality of this phenomenon in bisthiazolidines as well.

The present work explores the synthesis of 2-substituted bisthiazolidines with alkyl or aryl chains by exchanging 2-mercaptomethyl bisthiazolidines with different aldehydes. The mechanistic details of the synthetic route were unraveled using a combined NMR spectroscopic and *in silico* techniques.

Results and Discussion

Bisthiazolidine **1a**, and isobutyraldehyde **2a** were selected as a model for the exchange reaction. We first assayed the reaction

[a] Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Avda. General Flores 2124, CC1157, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay
E-mail: gmahler@fq.edu.uy

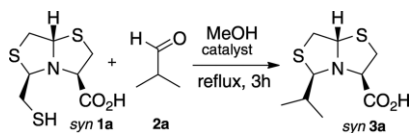
[b] Laboratorio de Espectroscopia y Físicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte (S.R.A. Facultad de Química), Ruta 3 km 363, UdelaR, Paysandú, Uruguay

[c] Química Inorgánica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, General Flores 2124, CC1157, UdelaR, Montevideo, Uruguay

Supporting information and ORCID(s) from the author(s) for this article are available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/ejoc.201901677>.

in MeOH, both in absence of catalyst or using additives as *p*TsOH ac.,^[20] NH₄OAc,^[21] and L-Proline,^[22] (see Table 1). The results showed that a catalyst is needed for the reaction to proceed, and the best conversion was obtained when using NH₄OAc.

Table 1. Results of the exchange reactions using different catalysts.

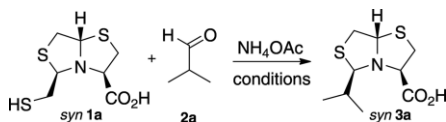


Entry	Catalyst	1a to 3a conversion [%] ^[a]
1	–	0
2	<i>p</i> TsOH (0.1 equiv.)	0
3	NH ₄ OAc (1.5 equiv.)	60
4	L-Pro (1.5 equiv.)	14

[a] The conversion of **1a** to **3a** was determined by ¹H-NMR spectroscopy using the formula % = (I_{3a}/(I_{1a} + I_{3a}))100; where I is the integral value of the corresponding compounds.

Once the best catalyst was established, the use of microwave (MW) and conventional heating was explored to perform the exchange reaction. The results revealed that both heating methods gave similar yields but when using MW the reaction time was shorter (see entries 1 and 2 in Table 2). Consequently, we selected it as a source of heating to explore the optimal solvent for the exchange reaction.

Table 2. Solvent reaction screening for the conversion.



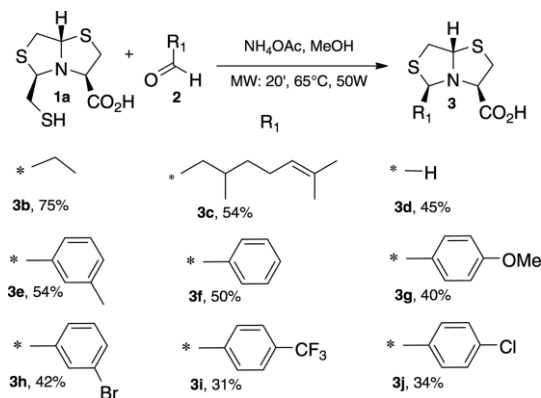
Entry	Conditions:solvent, Temperature, time	1a to 3a conversion [%] ^[a]	3a yield [%] ^[b]
1	MeOH, reflux, 3 h	60	60
2	MeOH, MW 65 °C, 20 min.	60	55
3	BA ^[d] pH 5, reflux, 3 h	0	nd ^[c]
4	DCE, MW 65 °C, 20 min.	0	nd ^[c]
5	DCM, MW 65 °C, 20 min.	0	nd ^[c]
6	<i>i</i> PrOH, MW 65 °C, 20 min.	28	20
7	TFE, MW 65 °C, 20 min.	45	45
8	BuOH, MW 65 °C, 20 min.	11	nd ^[c]
9	EtOH, MW 65 °C, 20 min.	65	60
10	MeCN, MW 65 °C, 20 min.	0	nd ^[c]
11	DMF, MW 65 °C, 20 min.	34	23
12	Neat, MW 65 °C, 5 min.	100	33

[a] The conversion of **1a** to **3a** was determined by ¹H-NMR spectroscopy using the formula % = (I_{3a}/(I_{1a} + I_{3a}))100; where I is the integral value of the corresponding compound. [b] Isolated yield obtained after chromatographic purification. [c] Nd = not determined. [d] BA = buffer acetate pH 5.

Different organic solvents, including nonpolar, polar protic and aprotic, as well as aqueous buffer or neat conditions, were employed to study the effect over the reaction.^[23] The results are compiled in Table 2. The reaction did not proceed in aqueous buffer at pH 5 or in MeCN (see entries 3 and 10, respectively), or in nonpolar solvents like DCM and DCE (see entries 5

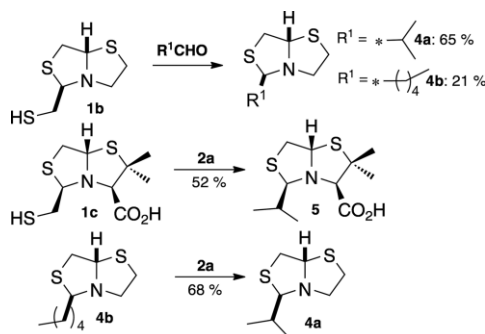
and 4, respectively). The results evidenced that among the different solvents tried, MeOH and EtOH (entries 2 and 9, respectively) gave the best results in terms of reaction time and yield (55 and 60 %, respectively). Solvent free conditions led to lower yield (33 %), probably due to decomposition of starting material.

The ability of **1a** to exchange with aliphatic and aromatic aldehydes was studied using general conditions previously assayed, aldehyde (2 equiv.), NH₄OAc (1.5 equiv.), MeOH, MW, 20 min (Scheme 2). The reaction was carried out with a diverse group of aldehydes, with yields ranging from 31 % to 75 %. Aliphatic aldehydes exchanged more efficiently than the aromatic ones, with yields ranging from 45 % to 75 %. Aromatic aldehydes were able to exchange only using MW heating, leading to the products in moderate yields (from 31 to 54 %). Interestingly, conventional heating led to decomposition products, and the desired products could not be isolated. The electronic nature of the substituent in the aromatic ring did not present a clear influence in the exchange process and in this case, the best yield was obtained with *m*-tolualdehyde (54 %).



Scheme 2. Preparation of 2-substituted bisthiazolidines.

Mercaptomethyl bisthiazolidines **1b** and **1c**, which bear different substituents at positions 7 and 8, were used to study the scope of the metathesis reaction (Scheme 3). The compounds were submitted to exchange conditions with aldehyde R¹CHO (**2** (2 equiv.)), and NH₄OAc (1.5 equiv.) in MW for 20 min. Both heterocycles **1b–c** were able to exchange, leading to products **4a**, **4b** and **5** (65 %, 21 % and 52 % yield respectively). The need



Scheme 3. Compounds **1b**, **1c**, and **4b** were used for the exchange under the following conditions R¹CHO (2 equiv.), NH₄OAc (1.5 equiv.), MeOH, MW, at 65 °C and 50 W for 20 min.

of mercaptomethyl group for the exchange process was evaluated using 2-pentyl bisthiazolidine **4b**, with aldehyde **2a** (see Scheme 3). The formation of the expected product **4a** was observed, indicating that 2-mercaptopmethyl is not essential for the reaction.

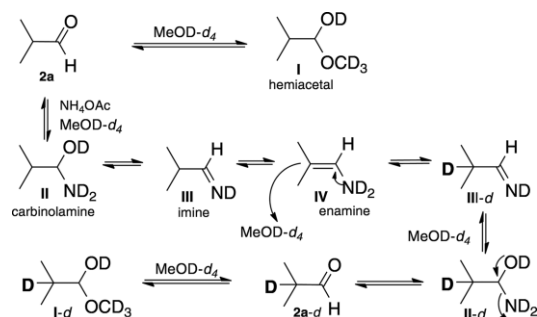
Mechanistic Studies

Bisthiazolidines are imino-type compounds, potentially able to reversible exchange a C=N linkage. Initially, the mechanism was thought to proceed through an imine exchange process involving imines formed in situ. Basically, imine equilibration process is described to occur by three main types of reactions, hydrolysis, amine-imine exchange (transimination), or imine-imine exchange (imine metathesis).^[24] We propose an exchange of species formed in situ.

To study the reaction, we performed time-course NMR experiments of the different reaction steps, aiming to identify key intermediate products. The reactions were performed in [D₄]MeOD, and monitored using 1D ¹H and 2D ¹H,¹³C-HSQC and ¹H,¹⁵N-HMBC NMR spectra.

Isobutylimine Formation, (Step A)

First, we studied the initial equilibration process of aldehyde **2a** (2 equiv.) with NH₄OAc (1.5 equiv.) in MeOD-*d*₄, in an NMR tube at room temperature. During this reaction we observed the formation of a complex mixture of species. Progressive deuteration of the α-position of the starting aldehyde took place, as well as formation of the imine **III** and of the intermediate product (carbinolamine **II**). Based on the NMR analyses we proposed the deuteration mechanism shown in Scheme 4.



Scheme 4. Proposed deuteration mechanism of aldehyde **2a** and imine **III** at the α-position of the carbonyl and imine functions, respectively, in MeOD-*d*₄.

When the aldehyde **2a** is dissolved in MeOD-*d*₄, an equilibrium is established with the hemiacetal **I**. Upon addition of NH₄OAc, key proton resonances corresponding to the carbinolamine **II**, imine **III**, and enamine **IV** could be observed at 3.84, 7.64 and 6.39 ppm, respectively. The equilibrium between compounds **II** and **III** is confirmed by the observation of an exchange peak in the 1D ¹H,¹H-NOESY spectrum of the imine proton of compound **III** to the proton attached to the hemiaminal carbon in compound **II** (Figure 1).

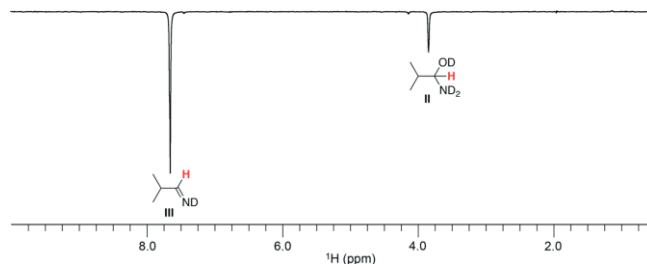


Figure 1. 1D ¹H,¹H-NOESY spectrum ($\tau_m = 500$ ms) recorded by selective irradiation of the imine protons of compounds **III** and **III-d**, 20 min after the addition of NH₄OAc to the aldehyde **2a** in MeOD-*d*₄. An exchange peak can be observed from the imine proton of compounds **III** and **III-d** to the protons attached to the hemiaminal carbon of compounds **II** and **II-d**.

The formation of the deuterated species started immediately after the addition of NH₄OAc, observed mainly as a change in the signal multiplicity from doublet to singlet due to the presence of a deuterium. The proton-deuterium couplings are typically much smaller than proton-proton couplings and therefore they are not observed herein. A gradual increase of the ratio of the aldehyde protons of **2a-d** (9.59 ppm, s, $\nu_{1/2} = 0.9$ Hz) and **2a** (9.59 ppm, d, $^3J_{H,H} = 1.1$ Hz) could be observed through time (Figure 2). The same process occurred for the imine protons of **III-d** (7.63 ppm, s, $\nu_{1/2} = 2.9$ Hz) and **III** (7.64 ppm, d, $^3J_{H,H} = 5.6$ Hz), as well as the carbinolamine protons of **II-d** (3.82 ppm, s, $\nu_{1/2} = 2.9$ Hz) and **II** (3.82 ppm, d, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz). The deuteration of the aforementioned species is almost complete after two hours of reaction. A gradual decrease in the intensity of the enamine proton resonance of compound **IV** (6.36 ppm, s) could also be observed, leading to a nearly complete disappearance of the signal after eight hours of reaction. An increase in the intensity of the hemiacetal proton resonance of the deuterated compound **I-d** (4.17 ppm, s) can also be observed in the ¹H-NMR spectra (data not shown), with a concomitant drop of the respective signal of **I** (4.17 ppm, d, $^3J_{H,H} = 5.7$ Hz).

Imine Intermediate Formation, (Step B)

After a two-hour reaction of aldehyde **2a** with NH₄OAc in MeOD-*d*₄, the imine proton resonance of deuterated **III-d** was observed as a singlet at 7.63 ppm (Figure 3 B). The ¹³C and ¹⁵N resonances of the imine moiety of compound **III-d** were observed at 172.7 ppm and -217.1 ppm, respectively. These chemical shifts were obtained from the corresponding ¹H,¹³C-HSQC and ¹H,¹⁵N-HMBC spectra, and the nitrogen chemical shift is informed using MeNO₂ as external reference.^[25]

The resonance of the imine **III-d** disappeared immediately after the addition of bisthiazolidine **1b** (1 equiv.), and two new resonances (both broad singlets) can be observed at 7.58 and 7.55 ppm (Figure 3B), corresponding to two diastereomers of **1b-II-d**. In the ¹H,¹³C-HSQC spectrum these protons correlate to carbon resonances at 171.8 and 171.9 ppm, respectively, whereas the ¹H,¹⁵N-HMBC spectrum revealed two-bond correlations from the aforementioned protons to nitrogen resonances located at -215.2 ppm. The signals of the starting material **1b** were still observed in the reaction mixture, (Figures S4).

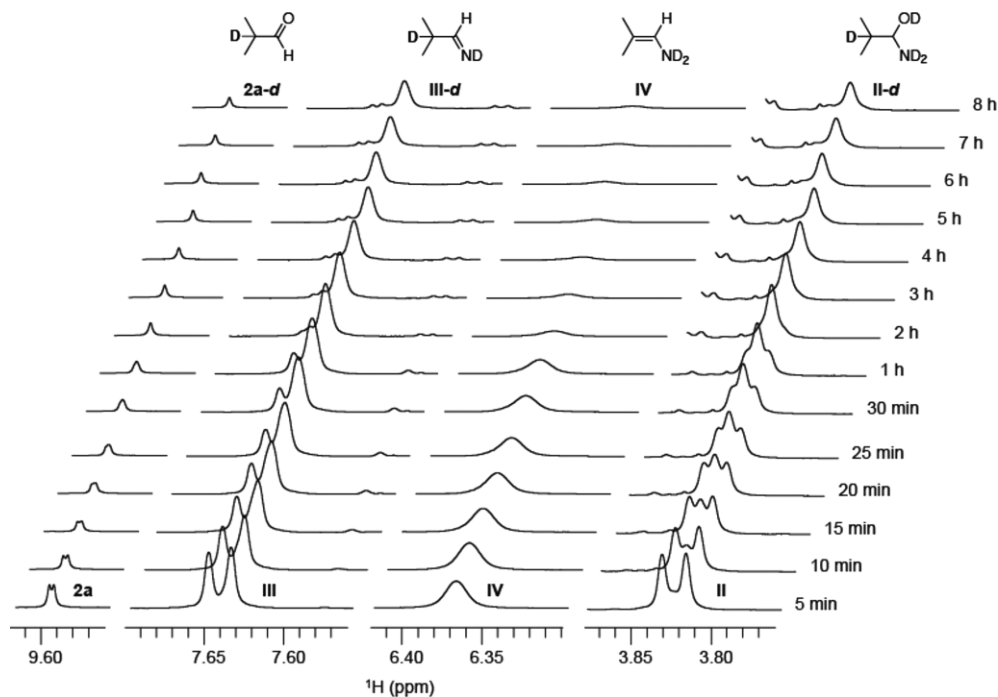


Figure 2. Selected regions of the time-course ^1H -NMR spectra of the reaction of aldehyde **2a** with NH_4OAc in $\text{MeOD-}d_4$, showing selected resonances of compounds **2a** (aldehyde proton), **II** (hemiaminal proton), **III** (imine proton), and **IV** (enamine proton), and their respective deuterated counterparts [D]-**2a**, **II-d** and **III-d**.

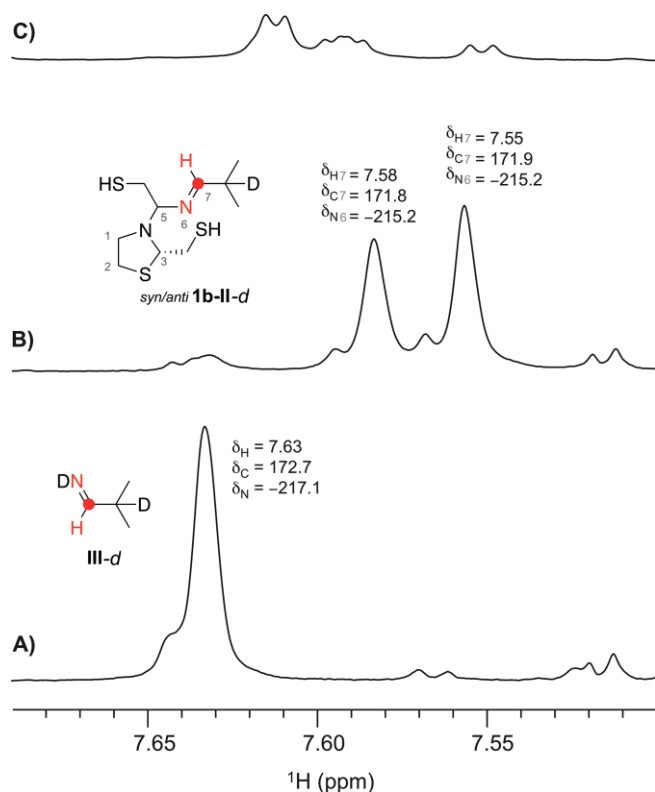
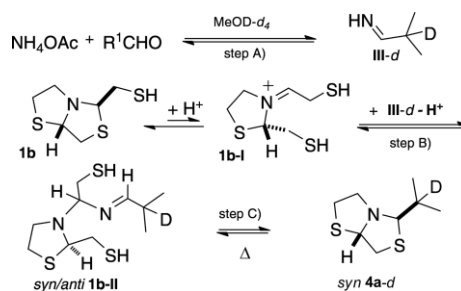


Figure 3. ^1H -NMR spectra of the reaction mixtures: A) **2a** (0.21 mmol), NH_4OAc (0.15 mmol) in $\text{MeOH-}d_4$ (0.6 mL), r.t., 2 h, step A; B) **2a** (0.21 mmol), NH_4OAc (0.15 mmol), bisthiazolidine **1b** (0.10 mmol), $\text{MeOH-}d_4$ (0.6 mL), r.t., $t = 2$ min, step B; C) idem B) after 2 h at $50\text{ }^\circ\text{C}$, step C. The ^{13}C and ^{15}N chemical shift of the atoms highlighted in red color were obtained from ^1H , ^{13}C -HSQC and ^1H , ^{15}N -HMBC correlations to the respective imine protons.

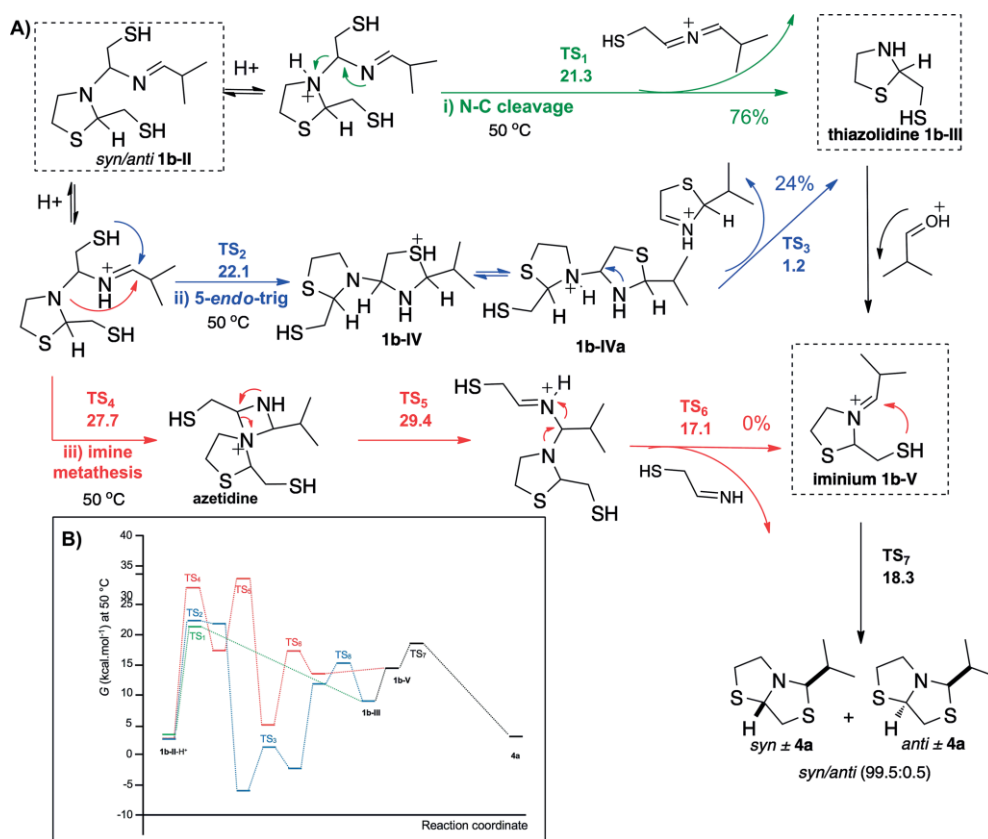
Product Formation, (Step C)

After heating the reaction in the NMR tube at $50\text{ }^\circ\text{C}$ for 120 min, the signals of the intermediate **1b-II d** (7.58 and 7.55 ppm) completely disappeared and just a few minor signals were observed in the imine region between 7.62–7.44 ppm (Figure 3 C). The signals of the starting material **1b** also disappeared and the exchanged product **4a-d** could be observed, see Figure S9. Its presence was confirmed by independent preparative synthesis in $\text{MeOH-}d_4$.

Based on the above-mentioned ^1H -NMR analysis we proposed the mechanism depicted in Scheme 5. The imine **III-d** is formed in the reaction media, as observed by NMR, step A). The iminium specie **1b-I** could be formed by bisthiazolidine **1b** opening, which was not observed in the ^1H -NMR spectrum. Imine nitrogen of **III-d** would attack the iminium carbon of compound **1b-I** to produce a new imine intermediate **1b-II**, observed in the NMR spectra as a diastereomeric mixture, step B). The structure of **1b-II** was proposed, based on spectroscopic analysis on chemical shifts of ^1H (7.58 bs and 7.55 bs), ^{13}C (171.8



Scheme 5. Proposed exchange process mechanism.



Scheme 6. A) Mechanistic proposal. The activation barriers (ΔG^\ddagger at 50 °C) with respect to the reactant are included in kcal mol⁻¹ for the lowest-activation-energy paths among the stereochemical variants. The distribution % under kinetic control (Curtin–Hammett principle) are also included for the different pathways. Diastereomer distribution for compound **4a** *syn/anti* (99.5:0.5) was determined at equilibrium. B) Predicted reaction profiles. The lowest-activation-energy process involves the green and black pathways (through TS₁ and TS₇). The DFT calculations were carried out at M062x/6-31+G(d,p) level of theory.

and 171.9), and ¹⁵N (–215.2), see Figure 3B and Figures S4–S7 in the supporting information. When the reaction was heated at 50 °C for 2 h, the exchange took place. Intermediate **1b-II** then led to the product **4a-d** as the main reaction product.

Theoretical Calculations

To gain insights into the mechanism of step C, we conducted DFT calculations to the exchange process on the intermediate **1b-II**. The level of theory used was M062x/6-31+G(d,p). All the stereochemical possibilities were taken into account (see Figure S11 and S12 for details). The summarized results are depicted in Scheme 6.

The mechanistic proposal begins with the protonation of **1b-II** at the amine or imine N atoms, mediated by NH₄OAc catalyst. This triggers three different mechanistic pathways to form **4a**: i) thiazolidine **1b-III** formation by N-assisted N-C bond cleavage, ii) thiazolidine **1b-III** formation assisted by the thiol group of **1b-II** via a 5-*endo-trig* cyclization, followed by the C-N bond cleavage, and iii) imine metathesis via an azetidine intermediate, as proposed by Messmer et al. for aromatic imines,^[12] giving rise to the formation of iminium ion **1b-V**.

The iminium ion **1b-V** is a common intermediate for all the routes, its intramolecular cyclization led to bithiazolidine **4a**.

According to the computed activation barriers (ΔG^\ddagger) at 50 °C (Scheme 6 B), the lowest-activation-energy process involves the formation of the thiazolidine **1b-III** by pathway i) (depicted in green in Scheme 6A), followed by the reaction with aldehyde **2a** to form the iminium ion **1b-V**. Finally its intramolecular cyclization leads to **4a** (shown in black in Scheme 6 A). Considering all the stereochemical variants, the activation free energy barriers for the lowest-activation-energy paths are 21.3 and 18.3 kcal mol⁻¹ (TS₁ and TS₇, respectively; see Scheme 6 B and S12). The 5-*endo-trig* cyclization followed by the C-N bond cleavage (pathway ii, shown in blue in Scheme 6) also contribute to the formation of intermediate **1b-III** (24%), with a close activation barrier (22.1 kcal mol⁻¹, see TS₂ structure in Scheme 6 B). Nevertheless, the imine metathesis (route iii, depicted in red in Scheme 6 A) was ruled out, since it exhibits higher energy transition states (TS₄ and TS₅, shown in Scheme 6 B and S11). Indeed, the free-energy difference between the global activation barriers of pathways i) and iii) is $\Delta_{TS_5-TS_1} = 8.1$ kcal mol⁻¹.

Finally, the theoretical diastereomeric ratio predicted for **4a** under thermodynamic control is *syn/anti* (99.5:0.5), in accordance to the experimental value *syn/anti* (90:10). This validates the computational methods employed and gives evidence that the equilibrium was reached. The thermodynamic preference for the *syn* diastereomers can be accounted for by their structural features (Figure S13). The *syn* arrangement of the groups

triggers a bending or “book-like” conformation of the bicycle, pulling apart the H and isopropyl substituents, and relieving the steric repulsion.

Conclusions

In summary, we have developed a new methodology to introduce alkyl and aryl substituents at position 2 of bithiazolidine ring with yields up to 75 %. These findings could be useful to prepare new analogs of bithiazolidines as MBLs inhibitors. The reaction occurs by the in situ formation of imines followed by exchange, using NH_4OAc as promoter. The catalyst plays a dual role by forming the necessary imine for the exchange and giving the acidic media to promote it. A key imine intermediate (**1b-II**) was identified by NMR spectroscopy and chemical shifts of the different ^{15}N -imine were reported. DFT calculations allowed us to furnish a clear picture of the mechanism and activation barriers for the transformation of imine **1b-II** into **4a**. The most favorable routes involve the formation of thiazolidine **1b-III** by i) N-assisted N-C bond cleavage, and ii) a thiol-mediated 5 *endo*-trig cyclization followed by a C-N bond cleavage. Thiazolidine **1b-III** then reacts with aldehyde **2a** to give **4a**. Altogether these results contribute to a better understanding of the exchange process, adding new information to the scarce data available.

Experimental Section

1. General Methods: Reactions were monitored by analytical thin layer chromatography (TLC) on 0.25 mm silica gel coated plastic sheets (SIL G/UV 254). Flash chromatography on Silica gel 60 (40 μm average particle diameter) was used to purify the crude reaction mixtures. All NMR spectra were recorded in $[\text{D}]\text{CDCl}_3$ at 300 K on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer equipped with a 5 mm QXI probe and on Avance III 400 MHz spectrometer equipped with a 5 mm BBOF plus probe. Chemical shifts (δ) are expressed in ppm using tetramethylsilane (TMS) as internal reference, and multiplicities are indicated as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), b (broad). The assignments of ^1H and ^{13}C -NMR resonances were made based on a combination of ^1H , ^1H -COSY, ^1H , ^{13}C -HSQC, and ^1H , ^{13}C -HMBC spectra. The ^{15}N chemical shifts were determined using ^1H , ^{15}N -HMBC experiments, and referenced to MeNO_2 . Microwave reactions were performed using a single-mode from CEM Discover. All microwave reactions were performed in a sealed tube reaction condition. Reaction temperatures were monitored by an internal probe, and the temperature was maintained in each experiment. All reactions were carried out in dry, freshly distilled solvents under anhydrous conditions unless otherwise stated. Yields are reported for chromatographic and spectroscopic (^1H and ^{13}C NMR) pure compounds unless otherwise stated. HRMS spectra were recorded on Xevo G2S Q-TOF (Waters Corp) and MicrOTOF-QTM (Bruker Daltonics) mass spectrometers. ESI(+)-LCMS spectra were recorded on LTQ XL Thermo. Optical rotation was measured using a Kruss Optronic GmbH P8000 polarimeter with a 0.5 mL cell (concentration *c* given as g/100 mL). C, H, N and S analyses were carried out with a Thermo Scientific Flash 2000 elemental analyzer.

2. Synthetic Procedures

(2R,5S,8R)-8-Carboxyl-2-mercaptopmethyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (syn 1a): To a stirred solution of L-cysteine (1 g,

8.3 mmol) in buffer acetate pH 5 (100 mL), was added 1,4-dithiane-2,5-dithiol (1.5 g, 9.9 mmol). The mixture was heated at reflux for 2 h. Then, it was cooled and poured into a saturated aqueous solution of NaCl (30 mL), extracted with EtOAc (5 \times 30 mL), dried (Na_2SO_4) and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by chromatography on SiO_2 (*n*Hex/EtOAc/AcOH, 7:3:0.1) to give compound **1a** (1.3 g, 65 %, *syn/anti*, 92:08) as a white solid: ^1H -NMR δ = 5.05 (dd, *J* = 5.8, 4.2 Hz, 1H), 4.32 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 7.1, 3.3 Hz, 1H), 3.55 (dd, *J* = 12.0, 5.8 Hz, 1H), 3.43 (dd, *J* = 11.4, 3.3 Hz, 1H), 3.33 (dd, *J* = 11.4, 7.1 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 12.0, 4.2 Hz, 1H), 2.81 (dd, *J* = 8.5, 6.9 Hz, 2H), 1.86 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H_{SH}). The spectroscopic properties were identical as described in literature.^[5]

(2RS,5SR)-2-Mercaptomethyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (\pm syn 1b): Prepared in analogous route as described for **1a**, starting from cysteamine-HCl, to give **1b** (2.6 g, 74 %, *syn/anti*, 92:08) as a yellow oil: ^1H -NMR δ = 4.97 (dd, *J* = 5.2, 3.7 Hz, 1H), 4.24 (dd, *J* = 7.0, 6.0 Hz, 1H), 3.54 (ddd, *J* = 11.6, 5.2, 0.5 Hz, 1H), 3.48 (ddd, *J* = 11.5, 5.7, 4.8 Hz, 1H), 3.21 (ddd, *J* = 11.5, 7.2, 6.6 Hz, 1H), 3.12 (m, 1H), 3.08 (m, 2H), 2.82 (ddd, 13.6, 7.6, 7.0 Hz, 1H), 2.65 (ddd, *J* = 13.6, 9.1, 6.0 Hz, 1H), 1.84 (dd, *J* = 9.1, 7.6 Hz, 1H); ^{13}C -NMR δ = 74.5, 73.2, 57.1, 38.4, 33.5, 31.8. The spectroscopic properties were identical as described in literature, erroneously reported as *anti*.^[1]

(2R,5S,8R)-8-Carboxyl-7-dimethyl-2-mercaptopmethyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (syn 1c): Prepared in analogous route as described for **1a**, starting from L-penicillamine to give **1c** as a white solid: ^1H -NMR 4.98 (dd, *J* = 6.6, 5.4 Hz, 1H), 4.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.43 (dd, *J* = 11.7, 6.6 Hz, 1H), 3.06 (dd, *J* = 11.7, 5.4 Hz, 1H), 1.89 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H_{SH}), 2.81 (m, 2H), 1.62 (s, 3H), 1.52 (s, 3H); m.p. 89–97 °C. The spectroscopic properties were identical as described in literature.^[5]

(2R,5S,8R)-8-Carboxyl-2-Isopropyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (syn 3a): To a solution of bithiazolidine **1a** (100 mg, 0.42 mmol) in dry MeOH (1 mL) was added isobutyraldehyde **2a** (0.077 mL, 0.84 mmol) and NH_4OAc (48.5 mg, 0.63 mmol). The reaction mixture was stirred at 65 °C for 20 min. under microwave irradiation (50 W). The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on flash silica gel (*n* Hex/EtOAc, 7:3 + 0.1 % AcOH) to give **3a** (64 mg, 55 %) as colorless oil: ^1H -NMR δ = 5.02 (t, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.12 (dd, *J* = 7.1, 3.0 Hz, 1H), 4.06 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.42 (m, 2H), 3.33 (dd, *J* = 11.3, 7.1 Hz, 1H), 3.02 (dd, *J* = 11.9, 4.3 Hz, 1H), 1.91 (dq, *J* = 13.3, 6.7 Hz, 1H), 1.04 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H); ^{13}C -NMR δ = 173.6, 79.7, 73.9, 71.2, 38.2, 35.3, 33.3, 20.0, 18.5; IR (NaCl) ν 2851–3006 (br), 2958, 2931, 2870, 1718 (s), 1440, 1381, 1219, 1193, 1085 cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -31.3° (*c* 3.2, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_2\text{S}_2$ 234.0617, found 234.0607.

(2R,5S,8R)-8-Carboxyl-2-ethyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (syn 3b): Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and propionaldehyde **2b** to give **3b** (69 mg, 75 %) as colorless oil: ^1H -NMR δ = 5.04 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J* = 5.4, 8.3 Hz, 1H), 4.09 (dd, *J* = 3.6, 7.1 Hz, 1H), 3.45 (m, 1H), 3.37 (m, 2H), 3.05 (dd, *J* = 5.1, 8.3 Hz, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.71 (tt, *J* = 7.3, 14.3 Hz, 1H), 1.02 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H); ^{13}C -NMR δ = 172.6, 74.6, 73.2, 70.2, 37.9, 33.3, 31.6, 11.3; IR (NaCl) ν 2840–3076 (br), 2964, 2931, 2873, 1722 (s), 1625, 1438, 1377, 1267, 1212, 734, 702 cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ $+96.1^\circ$ (*c* 0.20, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: $[\text{M} - \text{H}]^-$ Calcd for $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{NO}_2\text{S}_2$ 218.0315, found 218.0309.

Epimeric mixture (2R,5S,8R)-8-Carboxyl-2'-((RS)-2,6-dimethylhept-5-en-1-yl)-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (syn 3c): Prepared in an

analogous route as described for **3a**, starting from **1a** and \pm citronellal **2c** to give an epimeric mixture of *syn/anti* **3c** diastereomers (12 mg, 54 %, epimeric mixture *syn/anti*, 90:10) as colorless oil: (*2' RS*) **3c**: $^1\text{H-NMR}$ δ = 5.07 (m, 2H), 4.87* (m, 1H), 4.70* (m, 1H), 4.32 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.37 (m, 2H), 3.05 (m, 1H), 1.97 (m, 2H), 1.75 (m, 1H), 1.69 (s, 3H), 1.65 (m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.54 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 1.15 (m), 0.92 (q, J = 6.4 Hz, 3H); δ = 174.1, 131.3, 124.3, 124.2, 73.1, 72.9, 71.1, 70.9*, 70.8*, 69.2, 69.1, 46.1, 45.4, 38.0, 37.6, 36.1, 37.4, 33.5, 30.6, 30.4, 25.6, 25.2, 25.1, 19.8, 19.7, 19.1*, 19.0*, 17.6, 17.5* (* denotes minor diastereomer); IR (NaCl) ν 2758–3154 (br), 2960, 2924, 2870, 2854, 1722 (s), 1624, 1444, 1379, 1211, 1145, 735 cm^{-1} ; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_2\text{NaS}_2$ 352.1375, found 352.1394.

(5S,8R)-Carboxyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (syn 3d): Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and formaldehyde **2d** to give **3d** (39 mg, 45 %) as yellow oil: $^1\text{H-NMR}$ δ = 4.93 (dd, J = 6.4, 4.4 Hz, 1H), 4.29 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 4.11 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 4.08 (m, 1H), 3.41 (m, 3H), 3.06 (dd, J = 11.8, 4.3 Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 173.3, 72.8, 69.9, 58.2, 40.0, 34.2; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ +83.6 (c 0.43, MeOH); IR (NaCl) ν 2798–3100 (br), 2931, 2864, 1720 (s), 1622, 1438, 1215, 732 cm^{-1} ; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{S}_2$ 192.0147, found 192.0141.

(2R,5S,8R)-8-Carboxyl-2-(m-tolyl)-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (syn 3e): Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and 3-methylbenzaldehyde **2e** to give **3e** (64 mg, 54 %) as colorless oil: $^1\text{H-NMR}$ δ = 7.40 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.18 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 5.30 (dd, J = 6.1, 3.8 Hz, 1H), 5.16 (s, 1H), 4.10 (dd, J = 7.3, 3.0 Hz, 1H), 3.60 (dd, J = 11.7, 6.3 Hz, 1H), 3.47 (dd, J = 11.5, 3.0 Hz, 1H), 3.41 (dd, J = 11.4, 7.3 Hz, 1H), 3.23 (dd, J = 11.8, 3.7 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 174.4, 139.9, 134.9, 129.6(2C), 127.8(2C), 73.9, 72.6, 67.9, 36.6, 33.3, 21.1; IR (NaCl) ν 2846–3075 (br), 3024, 2937, 2922, 2860, 1718 (s), 1511, 1440, 1228, 1150, 1105, 912, 809, 732 cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ +196.0° (c 3.2, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}_2\text{Na}$ 304.0436, found 304.0433.

(2R,5S,8R)-8-Carboxyl-2-phenyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (syn 3f): Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and benzaldehyde **2f** to give **3f** (56 mg, 50 %) as yellow oil: $^1\text{H-NMR}$ δ = 7.52 (m, 2H), 7.35 (m, 3H), 5.30 (dd, J = 6.3, 4.1 Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.12 (dd, J = 7.4, 2.8 Hz, 1H), 3.60 (dd, J = 11.8, 6.3 Hz, 1H), 3.45 (m, 2H), 3.24 (dd, J = 11.8, 4.1 Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 173.2, 138.3, 129.0, 128.9, 127.8, 74.0, 72.9, 68.0, 36.9, 33.4; IR (NaCl) ν 2885–3075 (br), 3059, 3030, 2933, 1718 (s), 1490, 1448, 1400, 1207, 914, 734, 698 cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ +199.7° (c 2.6, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{S}_2$ 268.0466, found 268.0462.

(2R,5S,8R)-8-Carboxyl-2-(4-methoxyphenyl)-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (syn 3g): Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and 4-methoxybenzaldehyde **2g** to give **3g** (42 mg, 40 %) as yellow oil: $^1\text{H-NMR}$ δ = 7.44 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.91 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.26 (dd, J = 6.4, 4.1 Hz, 1H), 5.15 (s, 1H), 4.08 (dd, J = 7.4, 2.7 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.60 (dd, J = 11.8, 6.4 Hz, 1H), 3.52 (dd, J = 11.5, 2.7 Hz, 1H), 3.39 (dd, J = 11.5, 7.5 Hz, 1H), 3.24 (dd, J = 11.8, 4.1 Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 171.7, 160.3, 132.0, 129.3, 114.5, 73.6, 72.5, 67.8, 55.4, 36.5, 33.1; IR (NaCl) ν 2886–3088 (br), 3001, 2933, 2837, 1737, 1722 (s), 1608, 1512, 1440, 1240, 1174, 1031, 833, 736 cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ +127.4° (c 2.1, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{S}_2$ 298.0572, found 298.0554.

(2R,5S,8R)-8-Carboxyl-2-(3-bromophenyl)-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (syn 3h): Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and 3-bromobenzaldehyde **2h** to

give **3h** (62 mg, 42 %) as colorless oil: $^1\text{H-NMR}$ δ = 7.68 (m, 1H), 7.47 (m, 2H), 7.24 (m, 1H), 5.27 (dd, J = 6.1, 3.3 Hz, 1H), 5.18 (s, 1H), 4.14 (dd, J = 6.8, 3.9 Hz, 1H), 3.59 (dd, J = 11.7, 6.2 Hz, 1H), 3.51 (dd, 11.4, 3.3 Hz, 1H), 3.42 (dd, J = 11.4, 7.3 Hz, 1H), 3.23 (dd, J = 11.7, 3.4 Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 173.3, 141.3, 131.9, 130.8, 130.4, 126.4, 122.8, 74.0, 72.4, 68.2, 37.2, 33.6; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ +115.0° (c 3.0, MeOH); IR (NaCl) ν 2834–3095 (br), 3064, 2940, 2927, 2850, 1728 (s), 1701, 1431, 1330, 1282, 1213, 997, 860, 785 cm^{-1} ; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{BrNO}_2\text{S}_2$ 345.9571, found 345.9563.

(2R,5S,8R)-8-Carboxyl-2-(4-(trifluoromethyl)-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (syn 3i): Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and 4-(trifluoromethyl)benzaldehyde **2i** to give **3i** (44 mg, 31 %) as colorless oil: $^1\text{H-NMR}$ δ = 7.65 (q, J = 8.6 Hz, 4H), 5.29 (t, J = 4.0 Hz, 2H), 4.13 (dd, J = 7.0, 3.9 Hz, 1H), 3.58 (dd, J = 11.8, 6.1 Hz, 1H), 3.46 (m, 2H), 3.25 (dd, J = 11.8, 3.2 Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 174.4, 143.6, 130.7 (q, J_{CF} = 32.4 Hz), 129.9, 129.4, 128.0, 125.7 (q, J_{CF} = 3.7 Hz), 123.9 (q, J_{CF} = 272.2 Hz), 74.0, 72.5, 68.2, 37.4, 33.8; IR (NaCl) ν 3135–3600 (br), 2929, 2857, 1720 (s), 1637, 1417, 1325, 1124, 1016, 847, 738 cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ +265.0° (c 2.2, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{NO}_2\text{S}_2$ 336.0340, found 336.0351.

(2R,5S,8R)-8-Carboxyl-2-(4-chlorophenyl)-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (syn 3j): Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and 4-chlorobenzaldehyde **2j** to give **3j** (43 mg, 34 %) as colorless oil: $^1\text{H-NMR}$ δ = 7.47 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 5.29 (dd, J = 6.2, 3.4 Hz, 1H), 5.19 (s, 1H), 4.11 (dd, J = 6.7, 4.0 Hz, 1H), 3.58 (dd, J = 11.7, 6.2 Hz, 1H), 3.43 (m, 2H), 3.23 (dd, J = 11.7, 3.4 Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 174.1, 137.4, 134.6, 129.1, 129.0, 74.0, 72.3, 67.9, 37.0, 33.6; IR (NaCl) ν 2831–2998 (br), 2922, 2850, 1718 (s), 1685, 1489, 1226, 1145, 829, 735 cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ +173.0° (c 2.1, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2\text{S}_2$ 302.0076, found 302.0071.

(2RS,5SR)-2-isopropyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (\pm syn 4a): Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1b** and isobutyraldehyde **2a**, microwave irradiation was 40 min, to give **4a** as inseparable diastereomeric mixture (61 mg, 65 %, *syn/anti*, 90:10) as colorless oil: *syn-4a*: $^1\text{H-NMR}$ δ = 5.00 (dd, J = 4.9, 3.1 Hz, 1H), 3.91 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.44 (m, 2H), 3.13 (m, 2H), 3.06 (dd, J = 11.6, 3.1 Hz, 1H), 3.01 (dt, J = 7.4, 3.7 Hz, 1H), 1.82 (m, 1H), 0.97 (dd, J = 6.6, 4.9 Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 77.2, 75.8, 57.1, 37.7, 35.5, 31.8, 20.1, 17.8; *anti-4a*: $^1\text{H-NMR}$ 4.56 (dd, J = 8.4, 7.3 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 3.25 (m, 2H), 1.94 (m, 1H), 1.14 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 1.03 (d, J = 6.6 Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 79.5, 72.0, 45.6, 40.3, 32.7, 31.6, 22.3, 21.0; IR (NaCl) ν 2956, 2931, 2868, 1606, 1465, 1307, 1203, 1157, 1066, 750 cm^{-1} HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NS}_2$ 190.0719, found 190.0718.

(2RS,5SR)-2-(2-Deuteropropan-2-yl)-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (\pm syn 4a-d): To a solution of \pm (2RS,5SR)-2-Mercapto-methyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane **1b** (20 mg, 0.10 mmol) in MeOD- d_4 (0.6 mL) was added isobutyraldehyde **2a** (0.018 mL, 0.21 mmol) and NH_4OAc (12 mg, 0.15 mmol). The reaction mixture was stirred at 65 °C for 10 min. under microwave irradiation (50 W). The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on flash silica gel (nHex/EtOAc, 9:1) to give **4a-d** as a diastereomeric mixture (6 mg, 31 %, *syn/anti*, 90:10) as yellow oil. *syn 4a-d*: $^1\text{H-NMR}$ δ = 5.01 (dd, J = 4.7, 3.2 Hz, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.45 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 3.06 (dd, J = 11.5, 3.0 Hz, 1H), 3.01 (m, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 77.2, 75.8, 57.1, 37.7, 35.0 (t, $J_{\text{C-D}}$ = 19.5 Hz), 31.8, 20.0, 17.7; IR (NaCl) ν 2916, 2852, 1684, 1566, 1312, 1261, 945. 745 cm^{-1} ; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{DNS}_2$ 191.0781, found 191.0784.

(2RS,5SR)-2-pentyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (± syn 4b): Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1b** and hexanal, microwave irradiation was 60 min, to give **4b** as a diastereomeric mixture (79 mg, 21 %, *syn/anti*, 83:17) as yellow oil: ¹H-NMR δ = 5.02 (dd, *J* = 5.5, 3.3 Hz, 1H), 4.73* (dd, *J* = 8.4, 5.8 Hz, 1H), 4.53* (m, 1H), 4.09 (dd, *J* = 8.3, 5.0 Hz, 1H), 3.50 (dd, *J* = 11.4, 5.6 Hz, 1H), 3.41 (m, 1H), 3.17* (m, 4H), 3.02 (m, 1H), 2.82* (m, 1H), 1.99* (m, 1H), 1.79 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.33 (m, 8H), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H); ¹³C-NMR δ = 75.2, 72.0*, 71.7*, 70.3, 55.5, 46.3*, 40.4*, 38.8, 36.7, 33.7*, 31.7*, 31.6(2C), 28.00*, 26.9, 22.6, 22.4*, 14.0, 13.9*(*minor *anti* diastereomer); IR (NaCl) ν 2929, 2854, 1458, 1442, 1301, 1246, 1122, 1072, 730 cm⁻¹; ESI(+)-LCMS *m/z*: [M + H]⁺ Calcd for C₁₀H₂₀NS₂ 218.10, found 218.10; elemental analysis calcd. for C₁₀H₁₉NS₂: C 55.25, H 8.81, N 6.44, S 29.50, found: C 55.41, H 8.63, N 6.48, S 29.48.

(2R,5S,8R)-8-Carboxyl-2-isopropyl-7,7-dimethyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (syn 5): Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1c** and isobutyraldehyde **2a**. The reaction mixture was stirred at 65 °C for 60 min under microwave irradiation (50 W). The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on flash silica gel to give **5** (50 mg, 52 %) as colorless oil: ¹H-NMR δ = 4.87 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.32 (dd, *J* = 11.3, 6.7 Hz, 1H), 3.00 (dd, *J* = 11.3, 6.4 Hz, 1H), 1.81(m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.05 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); ¹³C-NMR δ = 174.0, 80.7, 77.6, 69.1, 55.1, 40.5, 35.9, 28.9, 28.1, 20.3, 19.6; IR (NaCl) ν 2838–3078 (br), 2964, 2929, 2868, 1720 (s), 1462, 1367, 1190, 1134, 741 cm⁻¹; [α]_D²¹ +173.0° (c 2.1, MeOH) HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z* [M + H]⁺ Calcd for C₁₁H₁₉NO₂S₂ 262.0930, Found 262.0933.

3. Sample preparation for Mechanistic Studies

Step A)

A solution of isobutyraldehyde (15 mg, 0.20 mmol), NH₄OAc (12 mg, 0.15 mmol) in CD₃OD (0.6 mL) was prepared in an NMR tube. The reaction was monitored by 1D ¹H, and 2D ¹H,¹H-COSY, ¹H,¹³C-HSQC, ¹H,¹³C-HMBC NMR experiments, for 2 h at room temperature and the Imine **III-d** was identified: ¹H-NMR δ = 7.63 (s), 0.81 (s); ¹³C-NMR δ = 172.7, 33.5, 16.2.

Step B)

The bisthiazolidine **1b** (20 mg, 0.10 mmol) was added to the NMR tube of step A). The reaction was monitored at room temperature by 1D ¹H and ¹³C experiments and 2D ¹H,¹H-COSY, ¹H,¹³C-HSQC, ¹H,¹³C-HMBC spectra, the Intermediate **1b-II** (dr 60:40) was identified: ¹H-NMR δ = 7.58 (s), 7.56* (s) 4.32 (dd, *J* = 7.6, 5.7 Hz), 4.27* (m), 4.19 (bs), 4.14* (bs), 3.36 (m), 3.16* (m), 3.12 (m), 3.03* (m), 2.75 (m), 2.50 (m), 2.67 (m), 2.47 (m); ¹³C-NMR δ = 171.9, 171.8*, 80.5*, 80.3, 71.1, 70.4*, 56.4*, 56.3, 38.8, 38.3, 33.5 (t, *J* = 19.4 Hz), 30.9, 30.8*, 18.4 (*minor diastereomer)

Step C)

The NMR tube of step B) was warming at 50 °C for 2 h. The reaction was monitored by 1D ¹H, and 2D ¹H,¹H-COSY, ¹H,¹³C-HSQC, ¹H,¹³C-HMBC NMR experiments.

4. Sample Preparation for ¹⁵N Experiments

To perform the 2D ¹H,¹⁵N-HMBC experiments the procedure described above was followed using ¹⁵NH₄OAc in step A).

5. Computational Calculations

Initial geometries of all the stereoisomers were pre-optimized by molecular mechanics (MMFF94X forcefield; energy gradient = 0.01 kcal/mol/Å³), as implemented in MOE.^[26] The solvent (meth-

anol) was modeled by means of the Generalized Born model (ε = 33.1). In order to explore the potential energy surface, a conformational search was performed using the LowModeMD search method,^[27] with the same forcefield and solvation method, without cut-offs, and with a RMS gradient = 0.005 kcal/mol/Å³ (rejection limit = 100; RMSD limit = 0.25 Å; energy window = 7 kcal/mol; iteration limit = 10000).

The most stable conformations were selected and fully optimized by means of the density functional theory method (DFT),^[28] employing the M06-2x functional,^[29] which has been reported to have excellent across-the-board average performance in general thermochemistry and kinetics.^[29] To represent the electronic wave function, the 6-31+G(d,p) basis set^[30] was used, since 6-31+G(d) has showed satisfactory performance for similar systems.^[31] The extra *p* polarization functions were added to hydrogen atoms to enhance the computational description of the hydrogen-mediated interactions.^[32] The calculations were carried out without symmetry constraints and with an ultrafine integration grid, employing the Gaussian 09 code.^[33] All the stereochemical variants were considered during the calculations. The influence of the solvent (methanol) was simulated by an IEFPCM method (implicit solvation), with radii and non-electrostatic terms from Truhlar and co-workers' SMD solvation model.^[34] To verify the nature of each stationary state, the Hessian matrix was analytically calculated. The optimized geometries of the intermediates were found to have only real vibrational frequencies, whereas the transition states exhibited a single negative eigenvalue. This negative normal mode was animated and examined in each case, confirming that it reflects the structural change in going from reactants to products. The computational results were rendered with Gaussview 5.0.^[35]

Zero-point energies and thermal corrections were taken from unscaled analytical vibrational frequencies. The yield under kinetic control was estimated by means of the Transition State Theory,^[36] using the Curtin-Hammett principle.^[37]

Acknowledgments

This work was supported by funds from National Institutes of Health USA (AI100560) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación Uruguay (ANII) (FMV_1_2014_1_104234). VM and VV are grateful for a fellowship from CSIC -CAP-2019, and VM is grateful for a fellowship from ANII (POS_FMV_2015_5_1005275). We greatly appreciate the helpful NMR discussion of PhD Gonzalo Hernández and Horacio Pezzaroglo for performing special NMR experiments. The authors are grateful to Prof. Göran Widmalm and Carin Larsson (Stockholm University) for recording the HR-MS spectra of compounds **3a-e**, **3h-i**, **4a-b**, **4a-d** and **5**.

Keywords: Bisthiazolidines · Imine exchange · Metathesis · Microwave chemistry

- [1] C. Saiz, V. Castillo, P. Fontán, M. Bonilla, G. Salinas, A. Rodríguez-Haralambides, G. Mahler, *Mol. Diversity* **2014**, *18*, 1–12.
- [2] C. Saiz, V. Villamil, M. G. M., M. A. Rossi, L. Martínez, L. Suescun, A. J. Vila, G. Mahler, *Tetrahedron* **2017**, *28*, 110–117.
- [3] K. Bush, P. A. Bradford, *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 295–306.
- [4] K. H. M. E. Tehrani, N. I. Martin, *Med. Chem. Commun.* **2018**, *9*, 1439–1456.
- [5] M. M. González, M. Kosmopoulou, M. F. Mojica, V. Castillo, P. Hinchliffe, I. Pettinati, J. Brem, C. J. Schofield, G. Mahler, R. A. Bonomo, et al., *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 544–554.

- [6] M. F. Mojica, S. G. Mahler, C. R. Bethel, M. A. Taracila, M. Kosmopoulou, K. M. Papp-Wallace, L. I. Llarrull, B. M. Wilson, S. H. Marshall, C. J. Wallace, et al., *Biochemistry* **2015**, *54*, 3183–3196.
- [7] P. Hinchliffe, M. M. González, M. F. Mojica, J. M. González, V. Castillo, C. Saiz, M. Kosmopoulou, C. L. Tooke, L. I. Llarrull, G. Mahler, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E3745–E3754.
- [8] L. Szilagy, Z. Gyorgydeak, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 427–432.
- [9] R. G. Kallen, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 6236–6248.
- [10] Z. Song, G. Ma, H. Zhu, *RSC Adv.* **2005**, *5*, 24824–24833.
- [11] C. Saiz, P. Wipf, E. Manta, G. Mahler, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3170–3173.
- [12] G. Toth, I. Pinter, A. Messner, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *9*, 735.
- [13] M. Ciaccia, R. Cacciapaglia, P. Mencarelli, L. Mandolini, S. Di Stefano, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2253–2261.
- [14] M. Ciaccia, S. Pilati, R. Cacciapaglia, L. Mandolini, S. Di Stefano, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3282–3287.
- [15] K. E. Meyer, P. J. Walsh, R. G. Bergman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2669–2670.
- [16] G. K. Cantrell, T. Y. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8035–8042.
- [17] J. N. Bruno, X. J. Li, *Organometallics* **2000**, *19*, 4672–4674.
- [18] M. McInnes, A. J. Blake, P. Mountford, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, *21*, 3623–3628.
- [19] M. A. Aljuhani, S. Barman, E. Abou-Hamad, A. Gurinov, S. Ould-Chikh, E. Guan, A. Jedidi, L. Cavallo, B. C. Gates, J. D. A. Pelletier, et al., *ACS Catal.* **2018**, *8*, 9440–9446.
- [20] C. Saiz, V. Castillo, S. G. Mahler, *Synlett* **2012**, *23*, 1090–1094.
- [21] K. Tanemura, T. Suzuki, Y. Nishida, K. Satsumabayashi, T. Horaguchi, *Chem. Commun.* **2004**, 470–471.
- [22] N. Wilhelms, S. Kulchat, J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **2012**, *95*, 2635–2651.
- [23] M. Shevlin, *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *86*, 601–607.
- [24] M. Ciaccia, S. Di Stefano, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 646–654.
- [25] The nitrogen chemical shift is informed using MeNO₂ as external reference, see P. R. Srinivasan, R. L. Lichter, *J. Magn. Reson.* **1977**, *28*, 227–234.
- [26] P. Labute, **2014.09.01** ed., Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbrooke St. West, Suite 910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2014**.
- [27] P. Labute, *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 792–800.
- [28] E. G. Lewars, in *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*, Springer International Publishing, Cham, **2016**, pp. 101–191.
- [29] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241.
- [30] M. M. Francl, W. J. Pietro, W. J. Hehre, J. S. Binkley, M. S. Gordon, D. J. DeFrees, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 3654–3665.
- [31] Z.-C. Song, G.-Y. Ma, H.-L. Zhu, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 24824–24833.
- [32] a) J. I. García, J. A. Mayoral, L. Salvatella, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 658–664; b) H. Faustino, M. J. S. A. Silva, L. F. Veiros, G. J. L. Bernardes, P. M. P. Gois, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5052–5058.
- [33] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision ABCD.0123*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
- [34] A. V. Marenich, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378–6396.
- [35] R. Dennington, T. Keith, J. Millam, 5.0 ed., Semichem Inc., Shawnee Mission KS, **2009**.
- [36] J. N. Harvey, in *Modeling of Molecular Properties*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2011**, pp. 17–28.
- [37] J. I. Seeman, *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, 42.

Received: November 15, 2019