



*Diseño y Síntesis de Heterociclos como
posibles Inhibidores de
Metallo β -Lactamasas*

Tesis presentada por la QF. Valerie Castillo para aspirar al título de Maestría en
Química

Director de Tesis: Dra. S. Graciela Mahler

Co-Director de Tesis: Dra. Cecilia Saiz

Tribunal: Dr. Guillermo Moyna, Dr. Diver Sellanes, Dra Natalia Lisa



Laboratorio de Química Farmacéutica
Departamento de Química Orgánica
Facultad de Química, UdelaR
Montevideo, Agosto 2016

Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecerle a mi tutora *Graciela Mahler* y a mi co-tutora *Cecilia Saiz* por su dedicación y empeño en esta tesis. Gracias por el esfuerzo y las ganas de enseñarme a lo largo de este proyecto.

También quiero agradecer a las instituciones que brindaron su apoyo económico para mi maestría:

Agencia Nacional de Investigación e Innovación por mi beca de posgrado bajo el código POS_NAC_2013_1_11638 y por el Fondo María Viñas bajo el código FMV_1_2014_1_104234.

National Institutes of Health (R01AI100560).

Me gustaría agradecer al *Grupo I + D de CSIC* por el apoyo recibido para asistir a congresos internacionales.

Quiero agradecer a *PEDECIBA Química* por los fondos recibidos para asistir a congresos internacionales, material de laboratorio e impresión de esta tesis.

Además quiero agradecer a nuestros colaboradores, que hicieron posible este proyecto de tesis:

Prof. Alejandro Vila, Dr. Mariano Gonzalez y Lic. Agustina Rossi, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario-Argentina (IBR-CONICET).

Prof. James Spencer y su grupo de trabajo, School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol-UK.

Prof. Roberto Bonomo y su grupo de trabajo, 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.

Q.F. Lucía Castellano por su apoyo y trabajo a lo largo de su licenciatura, Laboratorio de QF, Facultad de Química, Universidad de la República.

Prof. Leopoldo Suescun y al Dr. Mario Macias, Laboratorio de Cristalografía, Estado Sólido y Materiales, DETEMA, Facultad de Química, Universidad de la República.

Prof. Alejandra Rodriguez y su grupo de trabajo, Química BioAnalítica Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República.

Prof. Guillermo Moyna por los experimentos de RMN, Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República.

Verónica Martínez, Horacio Pezaroglo y Guillermo Gil por los experimentos de RMN, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Laboratorio de *Química Orgánica, Farmacognosia, LBB, Bioquímica y Química Inorgánica* por reactivos y equipos proporcionados, Facultad de Química, Universidad de la República.

Esta Tesis además es el resultado del gran apoyo de todos ustedes, mis compañeros y amigos de la Cátedra de Química Farmacéutica: **Laurita, Danilo, Gloria, Graciela, Chelo, Diver, Eduardo, Stella, Chiara, Ceci, Cathe, Vero, Lucía, Jaime, Guille** y **Carlitos**. Quiero agradecerles su inmensa dedicación a ayudar al otro, a enseñar, dar palabras de aliento, tanto a nivel profesional y personal. Todos y cada uno de ustedes han aportado a mi formación en todos los aspectos. He disfrutado inmensamente estos años con ustedes, hemos formado un lindo grupo de amigos y trabajo! GRACIAS!!

Los chiquilines que han pasado por nuestra cátedra y hemos compartido lindos momentos, **Anderson** y **Leo**, muchas gracias!

Los nuevos integrantes, **Valentina, Laura, Pipo** y **Martin** muchas gracias por todo, las mismas palabras que el resto! GRACIAAAASSS

Mi lindo grupo de Farmacéutica! De corazón Obrigado por tudo!

Quiero agradecer enormemente a mi familia, por su apoyo incondicional! (**padres, hermana, tíos, primos, abuelos, mi amor**). A mi madre una grande!! Gracias!!! espero que mi calidad de persona refleje el ejemplo que haz sido y eres en mi vida. Mi hermana la mimosa de la casa gracias por todo! Mi amor Ro gracias por ser mi compañero, amigo en todos estos años, gracias mi vida! Mi familia todos ustedes suman a lo que soy! así que gracias.

Sofi mi chiquita gracias por estar!

Laura y **Pedro** muchas gracias por todo! son de fierro! Lo que me han ayudado en este tiempo..no hay palabra de agradecimientos.

Los quiero mucho!

∞ MUCHAS GRACIAS ∞

A mi familia

Índice

Abreviaturas.....	1
1. Introducción	3
1.1. Aparición de resistencia bacteriana a los antibióticos β -lactámicos: Metallo- β -lactamasas	3
1.2. Clasificación y diversidad de las metalo- β -lactamasas	4
1.3. Mecanismo hidrolítico propuesto para las metalo- β -lactamasas	10
1.4. Inhibidores de metalo- β -lactamasas	12
2. Diseño y síntesis de bistiazolidinas como inhibidores de metalo- β -lactamasas	22
2.1. Introducción	22
2.2. Objetivo General	23
2.2.1. Objetivo Específico.....	23
2.3. Antecedentes	23
2.3.1. Nomenclatura	23
2.3.2. Antecedentes sintéticos	24
2.4. Análisis retrosintético.....	26
2.5. Resultados y Discusión	26
2.5.1. Síntesis de la serie L de las bistiazolidinas- 1a-b	26
2.5.2. Síntesis de la serie D de las bistiazolidinas- 1a-b	32
2.5.3. Evaluación biológica	33
2.5.3.1. Ensayos de inhibición enzimática: Caracterización del mecanismo de inhibición y determinación de la constante de Inhibición (K_i) de las bistiazolidinas- 1 en las diferentes subclases de metalo- β -lactamasas	34
2.5.3.2. Monitoreo en tiempo real de la hidrólisis de imipenem en células <i>Escherichia coli</i> resistentes en presencia de las bistiazolidinas- 1 . Determinación de la concentración inhibitoria del 50% (IC_{50}).....	39
2.5.3.3. Actividad inhibitoria de las bistiazolidinas- 1 frente a patógenos resistentes aislados de casos clínicos hospitalarios (Time Kill Cells).....	41
2.5.3.4. Selectividad de L- 1a frente a las metalo- β -lactamasas bacterianas	42
2.5.3.5. Ensayos de citotoxicidad de L- 1a	43
2.5.3.6. Determinación estructural de los complejos de metalo- β -lactamasas con las bistiazolidinas- 1 : estudios cristalográficos.....	43
2.5.4. Ensayo de estabilidad de L- 1a	51
2.5.5. Síntesis y evaluación biológica de derivados de L- 1a	52
2.6. Conclusiones	55
3. Diseño y síntesis de bistiazolidinas sustituidas con grupos funcionales isómeros del tiol y su evaluación biológica	59

3.1. Introducción	59
3.2. Objetivo Especifico	60
3.3. Resultados y Discusión	60
3.3.1. <i>Análisis retrosintético de las bistiazolidinas-11</i>	63
3.3.2. <i>Síntesis del ditiano 14</i>	64
3.3.3. <i>Síntesis de tiazolidinas 13</i>	66
3.3.4. <i>Síntesis de bistiazolidinas 11</i>	67
3.3.5. <i>Evaluación biológica</i>	79
3.4. Conclusiones	85
4. Conclusiones generales y perspectivas	89
5. Parte experimental	91
5.1. Consideraciones generales	91
5.2. Síntesis	92
5.3. Difracción de Rayos X de los compuestos preparados	105
5.4. Ensayo de estabilidad de L-1a	112
5.5. Preparación y purificación de las metalo-β-lactamasas a evaluar.....	112
5.6. Preparación de células <i>E. coli</i> que expresan NDM-1 utilizada en los estudios de ¹ H RMN	115
5.7. Ensayos biológicos.....	115
5.8. Estructura cristalina de los complejos metalo-β-lactamasa: L-1a	126
6. Anexo	129

Abreviaturas

^{13}C RMN Resonancia magnética nuclear de carbóno

^1H RMN Resonancia magnética nuclear de protón

AcOEt Acetato de etilo

Ac₂O Anhídrido acético

AcOH Ácido acético

Arg Arginina

Asp Aspartato

Atm N₂ Atmósfera de nitrógeno

BuOH Butanol

COOEt Éster etílico

COOH Ácido carboxílico

Cys Cisteína

DCC Diciclohexil carbodiimida

DMSO Dimetil sulfóxido

DNAsa Desoxiribonucleasa

EtOH Etanol

Gln Glutamina

HCl Ácido clorhídrico

HEPES Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico

Hex Hexano

His Histidina

HOBt *N*-hidroxibenzotriazol

KSAc Tioactato de potasio

Lys Lisina

MeCN Acetonitrilo

MeOH Metanol

NaOEt Etóxido de sodio

PF Punto de fusión

PHB *p*-hidroxibenzaldehído

PhH Benceno

PhMe Tolueno

PNA Penicilamina

p-TsOH Ácido *p*-toluen sulfónico

Ser Serina

SH Tiol

SO₃.py Sulfur trioxide pyridine

T.A. Temperatura ambiente

TFA Ácido trifluoroacético

THF Tetrahidrofurano

TRIS Trihidroximetilaminometano

TrtCl Cloruro de tritilo

α D Rotación óptica específica

Capítulo 1

Introducción

1. Introducción

1.1 Aparición de resistencia bacteriana a los antibióticos β -lactámicos: Metallo- β -lactamasas

El descubrimiento de los antibióticos dio lugar al comienzo de una nueva era en el tratamiento de enfermedades infecciosas, reduciendo la morbi-mortalidad de afecciones consideradas letales hasta la tercera década del siglo XX. En particular, el uso de los antibióticos β -lactámicos (A β L) ha sido uno de los acontecimientos más revolucionarios en medicina que permitió el desarrollo de la profilaxis y el tratamiento de las infecciones bacterianas como se conoce hoy en día. Los A β L se caracterizan por presentar en su estructura un anillo de β -lactama y un grupo ácido carboxílico, perteneciendo a este grupo las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos y monobactamas, ver Figura 1¹.

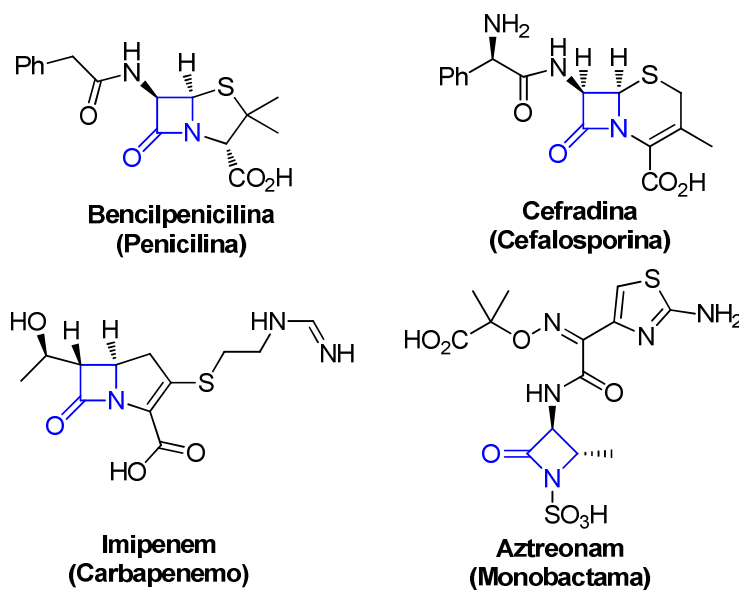


Figura 1. Ejemplo de antibióticos- β -lactámicos. El anillo β -lactámico se representa en azul.

El mecanismo de acción a nivel molecular de los β -lactámicos es mediante la acilación irreversible de un residuo de serina de las transpeptidasas o enzimas llamadas proteínas de anclaje de penicilinas (PBPs, por sus siglas en inglés). Las PBPs son las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular bacteriana o peptidoglicano¹. La resistencia bacteriana frente a los A β L ha ido en aumento debido al uso indiscriminado de los mismos en el tratamiento de infecciones a nivel de la salud humana y animal. Este mal uso de los antibióticos ha acelerado el proceso de selección

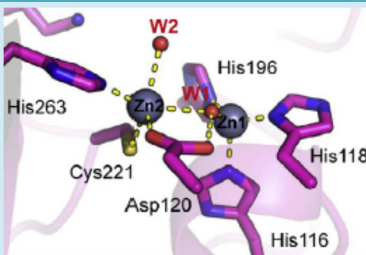
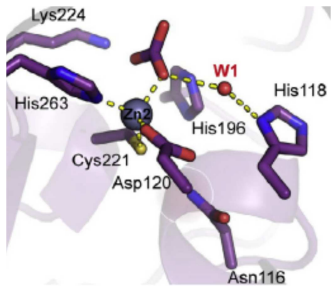

natural de las cepas bacterianas resistentes, lo que ha generado el abrupto aumento de la resistencia bacteriana a este tipo de fármacos.

Las bacterias han implementado varios mecanismos de resistencia frente a los AβL, como la sobre-expresión de bombas de eflujo, cambios en la membrana celular (porinas) o del sitio activo de las PBPs. El principal mecanismo de resistencia ocurre mediante la producción de enzimas capaces de hidrolizar el anillo β-lactámico, las que se denominan β-lactamasas². Se ha observado que hay bacterias que cuentan con estas enzimas en forma intrínseca y que otras las adquieren a través de plásmidos, mediante transferencia horizontal. Según la clasificación de Ambler, las β-lactamasas se agrupan en cuatro clases (A, B, C y D), de acuerdo a la homología de la secuencia aminoacídica. Las enzimas de clase A, C y D se denominan serina-β-lactamasas debido a que es un residuo de serina del sitio activo de la enzima el responsable de la hidrólisis de la β-lactama. La clase B o metalo-β-lactamasas (MβL) son metaloenzimas dependientes de uno o dos iones zinc que intervienen en la hidrólisis del anillo β-lactámico utilizando una molécula de agua³.

1.2 Clasificación y diversidad de las metalo-β-lactamasas

Las MβL se clasifican en tres subclases B1, B2 y B3 según su homología aminoacídica y la coordinación de iones Zn²⁺, ver Tabla 1⁴. En la Tabla 1 se muestran las variantes de MβL que conforman a cada subclase, indicando el número de iones Zn²⁺ que presentan y los aminoácidos del sitio activo que coordinan con ellos. También se muestra el porcentaje de homología de la secuencia aminoacídica dentro de cada subclase y entre ellas. Al observar los porcentajes de homología aminoacídica de cada subclase se puede apreciar la gran diversidad de las MβL, en particular las subclases B1 y B3 presentan un porcentaje mínimo de homología en el entorno del 20% mientras que la subclase B2 es de un 55%. A pesar de la baja homología aminoacídica, estas metaloenzimas presentan determinadas similitudes estructurales que permitieron su clasificación en las tres subclases mencionadas anteriormente.

Las enzimas que pertenecen a la *subclase B1* son metaloproteínas con dos iones Zn²⁺. Dicha subclase está compuesta por las MβL intrínsecas de *Bacillus Cereus* (BcII) y de *Bacillus fragilis* (CcrA). Además pertenecen a esta subclase las MβL adquiridas Imipenemasa (IMP), Verona Imipenemasa (VIM) y New Delhi Metalo-β-lactamasa (NDM) que se identificaron en patógenos Gram (-)⁶. En 1966 se detectó el primer caso de resistencia por MβL en *Bacillus Cereus* (Sabbath y col.⁷) y fue en 1990 cuando se identificó la transferencia horizontal entre las distintas especies bacterianas, aislándose MβL de la bacteria Gram (-) *Pseudomona aeruginosa*⁸.

Sub-clase	MβL	Sitio de Coordinación Zn ²⁺	Homología de la subclase	Homología entre las subclases
B1	BclI, CcrA, IMP-1, BlaB, IND-7, VIM-2, VIM-4, VIM-7, VIM-31, SPM-1, GIM-1, NDM-1	 <p>Cys221</p>	Zn1 o sitio 3H: His116 His118 His 196 Zn2 o sitio DCH: Asp120 His263	20–99% 14–24% con B2 2–15% con B3
B2	CphA, Sfh-1		Zn2 o sitio DCH: Asn120 Cys221 His263	55–96% 14–24% con B1 2–16% con B3
B3	L1, FEZ-1, BJP-1, SMB-1, AIM-1, GOB-1	 <p>Asp120</p>	Zn1 o sitio 3H: His116 His118 His196 Zn2 o sitio DHH: His121 His263	21-94% 2–15% con B1 2–16% con B2

*Aminoácido aspartato (Asp) se denomina con el código de una letra como D, para el caso de cisteína como C y histidina como H.

Tabla 1. Clasificación de las metalo-β-lactamasa en las subclases B1, B2 y B3, de acuerdo a la coordinación iones Zn²⁺ y la homología aminoacídica ^{5, 6}.

La *subclase B2* se caracteriza por presentar un solo ion Zn²⁺ y está constituida por las enzimas producidas por las especies de *Aeromonas*. Las más estudiadas son CphA, enzima producida por *A. hydrophila* y Sfh-1, enzima producida por *Serratia fonticola*.

La *subclase B3* está formada por metaloenzimas di-zinc e incluyen a las metalo-β-lactamasas L1 y las variantes de GOB-1 expresadas por *S. maltophilia* y *E. meningoseptica*, respectivamente.

Estructura de las metalo-β-lactamasas

A pesar de la baja similitud de las secuencias aminoacídicas, las MβL poseen semejanzas estructurales. En particular, la estructura terciaria de esta familia de metaloenzimas está compuesta por los motivos α-hélices y hojas β plegadas según αββα, ver Figura 2.

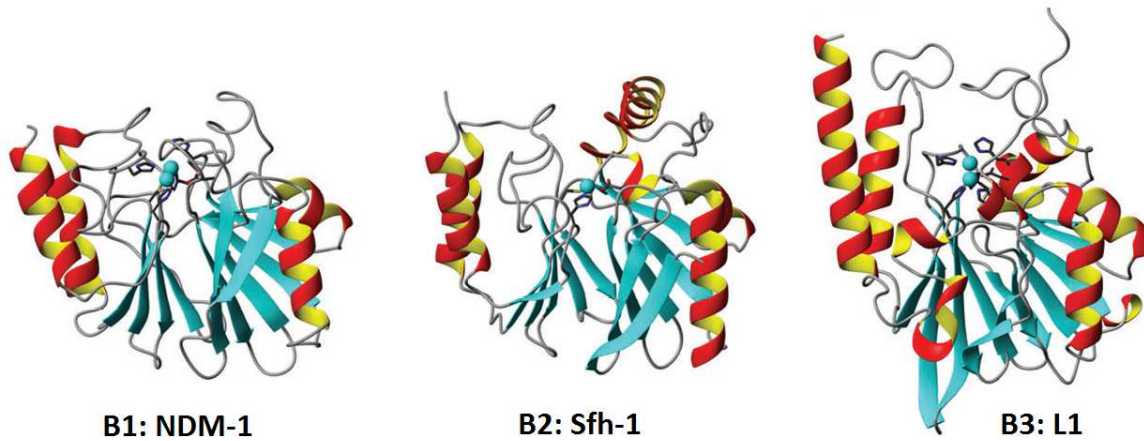


Figura 2. Ejemplos de la estructura terciaria de las tres subclases de metalo-β-lactamasas: B1, B2 y B3. Se representa las α-hélices con color rojo, las hojas β en celeste y los bucles en gris. Los iones zinc se representan como esferas de color celeste ⁴.

En la Figura 2 se puede apreciar como los motivos de las hojas β se organizan en el centro de la proteína (sándwich ββ) y las α-hélices se ubican rodeando a las mismas ⁴.

Subclase B1:

La subclase B1 presenta en el sitio activo dos iones Zn^{2+} ($Zn1$ y $Zn2$), posicionados en el borde externo del sándwich ββ. La cavidad del sitio activo está constituida por dos bucles extensos conformados por los residuos 60-66 y 223-241. El bucle de los residuos 60-66 se denomina loop 3 (L3). En la conformación nativa el L3 es un bucle flexible que al interactuar con el sustrato se mueve de manera tal de bloquearlo en el sitio activo. Además los residuos de L3 están altamente conservados en estas variantes B1. En particular, la MβL SPM-1 carece del bucle 60-66 (L3) pero presenta una α-hélice extendida con la inserción de 24 aminoácidos (α3), ver Figura 3 ^{4,6}.

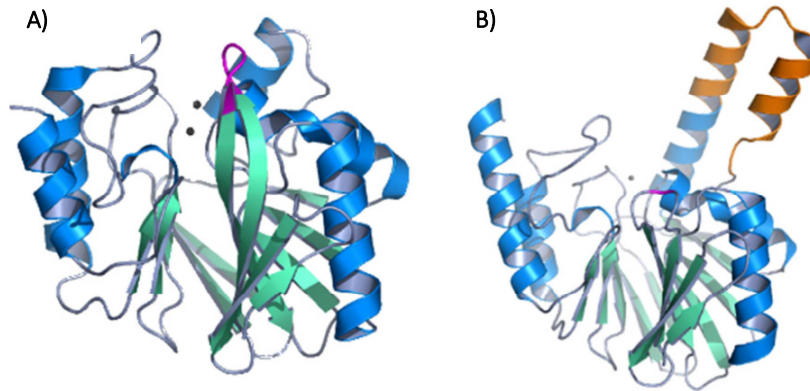


Figura 3. Estructura terciaria de las metalo-β-lactamasas B1 **A)** BclI, se representa el bucle L3 (residuos 60-66) con color lila **B)** SPM-1, se representa el α-hélice extendida con color naranja (α3). Se señalan a las α-hélices en azul, las hojas β en verde y los bucles en gris. Los iones zinc se representan como esferas ⁶.

En la subclase B1 se han identificado variantes mono-zinc como es el caso de BclI o SPM-1, pero la máxima actividad de estas enzimas se observa cuando son especies que contienen dos Zn^{2+} . Se plantea incluso que estas enzimas son activas *in vivo* solo bajo esta forma ⁴.

Subclase B2:

La subclase B2 se caracteriza por presentar en el sitio activo un solo ion Zn^{2+} . Otra característica de B2 es la sustitución del bucle flexible L3 por la extensión de α3, como sucede en la MβL SPM-1 (subclase B1) descrita anteriormente. Esta extensión de la α-hélice brinda una superficie hidrofóbica continua a la curvatura del sitio activo de la proteína, ver Figura 4 ⁴.

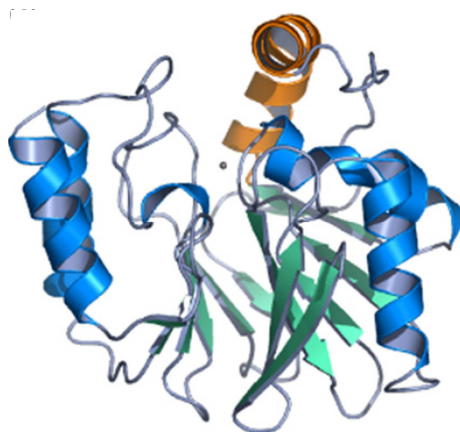


Figura 4. Estructura terciaria de la metalo-β-lactamasa B2 CphA. Se representa con color naranja la extensión del α-hélice (α3). Se señalan las α-hélices en azul, las hojas β en verde y los bucles en gris. El ion zinc se representa como una esfera ⁶.

El sitio activo de las B2 se caracteriza por ser una cavidad muy profunda y estrecha respecto a las otras subclases. En este caso las especies di-zinc de estas MβL son inactivas.

Subclase B3:

La subclase B3 posee especies di-zinc que se caracterizan por presentar un bucle flexible más reducido que las B1 (residuos 155-166). Además, presentan un puente intramolecular disulfuro, característico de la subclase ⁴. En particular, la MβL L1 perteneciente a esta subclase se caracteriza por ser un tetrámero a diferencia del resto de las MβL que son monoméricas.

Sitio de coordinación de los iones zinc

Una característica importante de las metalo-β-lactamasas es la coordinación de los iones Zn^{2+} en el sitio activo de la enzima, que varía de acuerdo a cada subclase.

Subclase B1:

En la subclase B1 la coordinación con los iones Zn^{2+} está altamente conservada. El primer ion Zn^{2+} (Zn1) coordina con tres residuos de histidina His116, His118 y His196, por lo que se lo denomina sitio 3H (según el código de aminoácidos de una letra) ^{4,6}. El Zn1 tiene una geometría tetraédrica ya que presenta una cuarta interacción con una molécula de agua o hidróxido, que a su vez tiene una interacción puente con el segundo ion zinc (Zn2), ver Figura 5. En la Figura 5 se representa el puente H_2O/OH^- como una esfera de color rojo denominada W1.

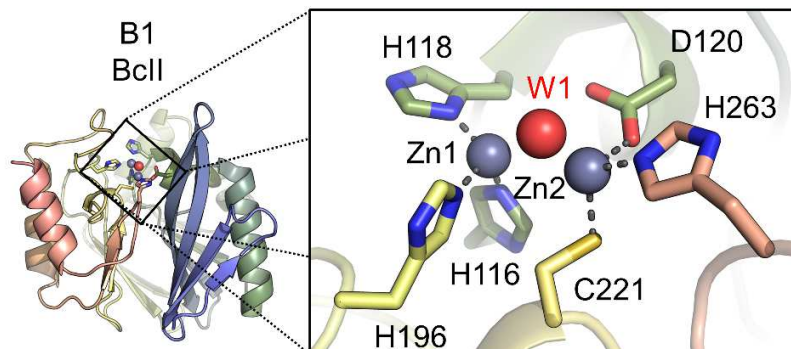


Figura 5. Ejemplo de coordinación de los iones Zn^{2+} de la metalo-β-lactamasa subclase B1 BclI (PDB 4C09). Se señalan las moléculas de agua y los iones zinc como esferas de color rojo y gris, respectivamente. Se representa con línea punteada gris las interacciones de coordinación de los iones zinc con los residuos aminoácidos de la enzima. Los átomos de lo aminoácidos se representan con su color respectivo (nitrógeno azul y oxígeno en rojo).

El segundo ion Zn^{2+} (Zn2) además de presentar la interacción puente H_2O/OH^- con Zn1, coordina con tres residuos de aminoácidos Asp120, Cys221 y His263 (sitio DCH). A su vez tiene como quinto ligando una molécula de agua apical (W2) por lo que el Zn2 presenta una geometría distorsionada bipirámide trigonal, ver Figura 5. La distancia entre los dos iones Zn^{2+} es variable, en el entorno de 3.5 a 4.6 Å⁴. En estructuras cristalinas de especies mono-zinc de la subclase B1, el ion se encuentra posicionado en el sitio 3H (Zn1) y coordina con una molécula de agua.

Subclase B3:

La subclase B3 también está constituida por enzimas di-zinc y presenta al ion Zn1 coordinando con los tres residuos conservados de histidina 116, 118 y 196 (sitio 3H). Además, el ion Zn1 presenta la interacción puente con una molécula de agua o hidróxido entre el ion Zn2. Se representa el puente H_2O/OH^- como W1, ver Figura 6⁴. El ion Zn1 coordina de la misma forma que la subclase B1.

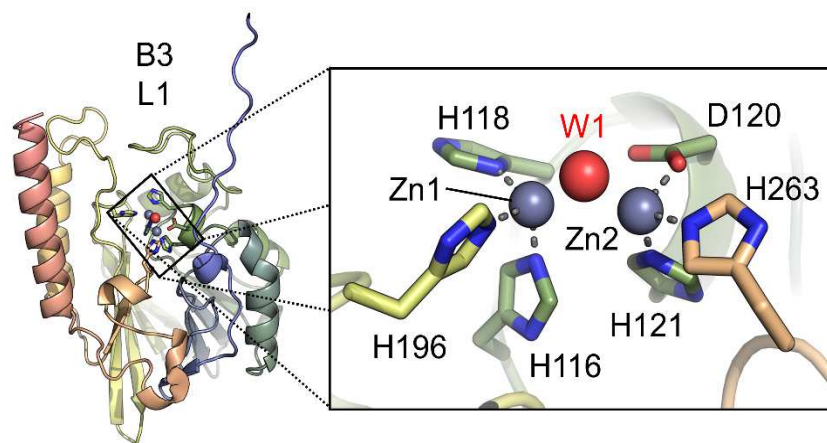


Figura 6. Ejemplo de coordinación de los iones Zn^{2+} de la metalo- β -lactamasa subclase B3 L1 (PDB 1SML). Se señalan las moléculas de agua y los iones zinc como esferas de color rojo y gris, respectivamente. Se representa con línea punteada gris las interacciones de coordinación de los iones zinc con los residuos aminoacídicos de la enzima. Los átomos de los aminoácidos se representan con su color respectivo (nitrógeno azul y oxígeno en rojo).

El ion Zn2 tiene coordinación con los residuos conservados de Asp120 y His263 y un tercer residuo no conservado de His121 (sitio DHH). Además el Zn2 presenta la coordinación apical con una molécula de agua (W2), por lo que mantiene una geometría distorsionada bipirámide trigonal, que se observa también en la subclase B1, ver Figura 6. La única diferencia de coordinación que presenta el Zn2 de la subclase B3 respecto a la B1, es el residuo de His121 en lugar de Cys221. Una excepción de la subclase B3 es la M β L GOB que sustituye en el sitio 3H a la His116 por un residuo de glutamina^{4,6}.

Subclase B2:

La subclase B2 son enzimas mono-zinc y se caracterizan por tener al ion zinc en el sitio DCH (Zn₂), ver Figura 7.

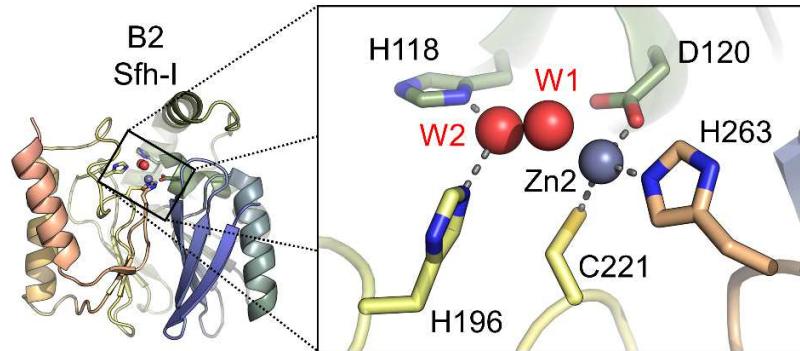


Figura 7. Ejemplo de coordinación del ion Zn²⁺ de la metalo-β-lactamasa subclase B2 Sfh-I (PDB 3SD9). Se señalan las moléculas de agua y los iones zinc como esferas de color rojo y gris, respectivamente. Se representa con línea punteada gris las interacciones de coordinación de los iones zinc con los residuos aminoácidos de la enzima y los enlaces de hidrógeno con la molécula de agua. Los átomos de lo aminoácidos se representan con su color respectivo (nitrógeno azul y oxígeno en rojo).

En esta subclase se observa en el sitio 3H una molécula de agua (W1)⁴.

1.3 Mecanismo hidrolítico propuesto para las metalo-β-lactamasas

Las metalo-β-lactamasas de la *subclase B1* y *B3* son capaces de hidrolizar un amplio espectro de antibióticos-β-lactámicos, incluidos los carbapenemos. Se debe mencionar que la *subclase B3* tiene menor actividad frente a los carbapenemos respecto a las penicilinas y cefalosporinas. Por otro lado la *subclase B2* es capaz de hidrolizar solo a los carbapenemos ya que tiene muy baja o nula actividad frente a las penicilinas y cefalosporinas. El espectro reducido de las MβL B2 se asocia a la profundidad y estrechez de su sitio activo⁴. La actividad hidrolítica de las MβL sobre los carbapenemos es de gran preocupación ya que son antibióticos considerados como última opción en el tratamiento de infecciones por microorganismos resistentes. Por otro lado es importante destacar que los antibióticos monobactámicos no son reconocidos por ninguna de las tres subclases de metalo-β-lactamasas B1-3.

Se ha demostrado que los microorganismos son capaces de adquirir las MβL a través de elementos genéticos móviles (transposones o plásmidos) de otra especie bacteriana y se la denomina MβL adquirida. La transferencia horizontal de MβL se ha observado particularmente en enzimas de la

subclase B1, que son de mayor relevancia en clínica y ha provocado la diseminación mundial de las metalo- β -lactamasas, ver Figura 8⁹.

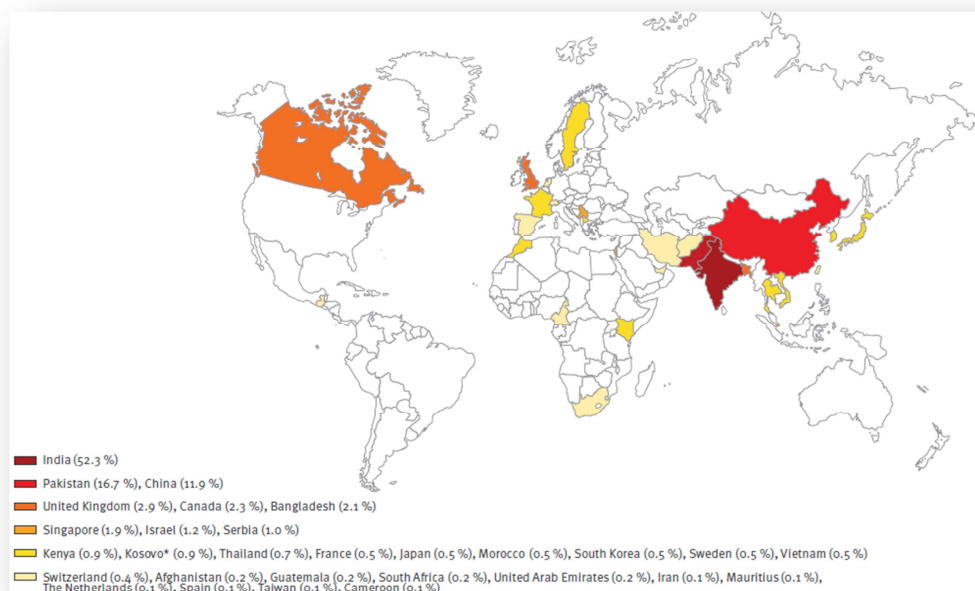


Figura 8. Distribución mundial de New Delhi metalo- β -lactamasa, NDM-1 (2009 a 2012), una de las últimas metalo- β -lactamasas adquiridas¹⁰.

Actualmente las M β L son consideradas una amenaza para la salud ya que no se ha logrado desarrollar inhibidores para estas metaloenzimas^{11, 12}. Se debe mencionar que desde el año 2011 la Organización Mundial de la Salud plantea a la resistencia microbiana como una emergencia global. Actualmente la OMS lleva a cabo un plan de acción frente a la resistencia, denominado “Antibiotics: Handle with care”^{11, 12}.

Se han realizado numerosos estudios sobre el mecanismo molecular de hidrólisis de las M β L. La mayoría de las propuestas discuten si es una hidrólisis por un mecanismo concertado o mediante intermediarios de reacción. También está en discusión cuál es el nucleófilo responsable de la hidrólisis de anillo β -lactámico y la implicancia de los iones Zn^{4, 5}. A continuación se muestra el mecanismo propuesto por Vila y *col.*⁵, que plantea la existencia de un intermediario de reacción aniónico en base a estudios espectroscópicos. Se representa en la Figura 9 el mecanismo propuesto para las especies de M β L di-Zn (B1 y B3) al hidrolizar el sustrato Nitrocefina (derivado de cefalosporina cromogénico). Se propone como nucleófilo responsable de la hidrólisis del anillo β -lactámico a una molécula de agua presente en el medio, la que se activa al interactuar con el ion Zn1, ver intermedio ES, Figura 9.

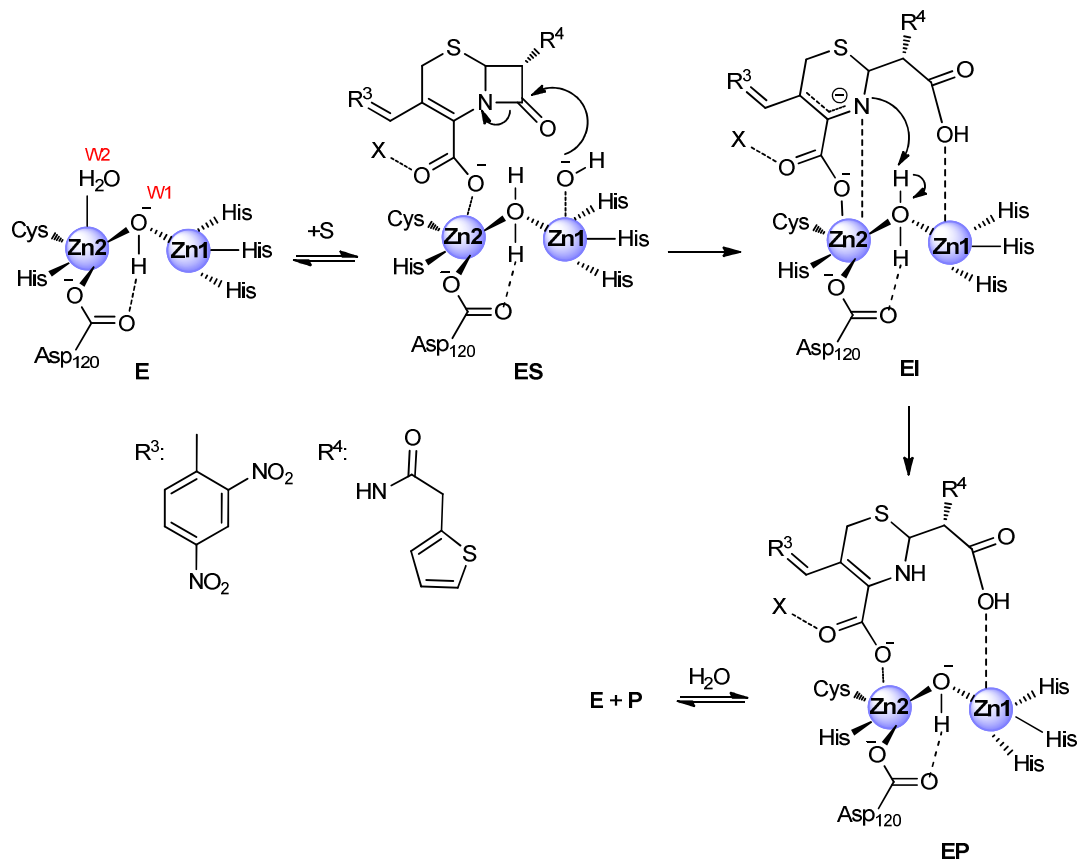


Figura 9. Propuesta de Vila y *col.* del mecanismo de hidrólisis de un derivado penicilina por di-Zn metalo-β-lactamasas de la subclase B1. Se representa con X el residuo 224 de las enzimas B1 (en la mayoría es Lys224) y en las enzimas B3 X es el residuo Ser223 o Ser221⁵.

Luego de la apertura de la β-lactama, se plantea la formación de un intermediario de reacción que posee al nitrógeno con carga negativa (EI) y el que se estabiliza por la interacción con el ion Zn²⁺, ver intermediario EI, Figura 9. La presencia de este intermediario aniónico EI se justifica por estudios espectroscópicos en la región UV durante la hidrólisis de nitrocefina por una MβL di-Zn^{13, 14}. El grupo dador de un protón, necesario para neutralizar el producto de hidrólisis, es el puente H₂O/OH⁻ entre los dos Zn²⁺, ver intermedio EP, Figura 9⁵.

1.4 Inhibidores de metalo-β-lactamasas

En bibliografía se describe a los agentes quelantes como inhibidores de metaloenzimas ya que estos secuestran los iones metálicos del medio, como por ejemplo el EDTA. Estos agentes son inhibidores reversibles de estas enzimas ya que al aumentar la concentración del ion se recupera la actividad enzimática. Es importante destacar que éstos son inhibidores no específicos, por lo que su utilidad se restringe a los estudios mecanísticos de las metaloenzimas.

Los candidatos a inhibidores de metalo- β -lactamasas deben ser compuestos que interaccionen con los residuos del sitio activo de la enzima y a la vez coordinen con los iones Zn^{2+} . En literatura se encuentran descritos varios ejemplos de compuestos con actividad inhibitoria frente a las M β L^{15, 16}.

Inhibidores que poseen grupo tiol o tioéter

Se ha descrito en bibliografía varios ejemplos de compuestos que poseen en su estructura un grupo tiol. En particular, se han estudiado compuestos sencillos que además de presentar un grupo tiol poseen un ácido carboxílico, por ejemplo D-captopril^{17, 18, 19} y el ácido tiomandélico²⁰, ver Figura 10. Estos compuestos son buenos inhibidores frente a las especies de M β L que contienen dos iones Zn^{2+} , como son las enzimas pertenecientes a la subclase B1 y B3, ver Figura 10. Para éstos últimos se determinó que el grupo tiol coordina entre los dos Zn^{2+} y el ácido carboxílico interacciona por puentes de hidrógeno con un residuo Lys para D-captopril¹⁶ y Arg para el tiomandélico²⁰.

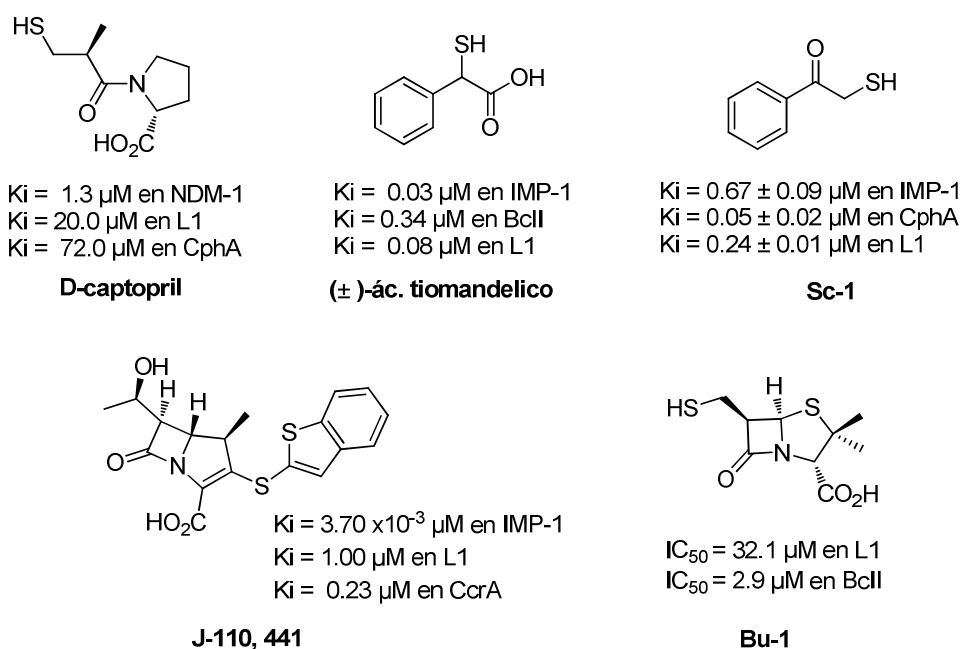


Figura 10. Ejemplos de inhibidores de M β L que presentan un grupo tiol o tioéter. Las enzimas NDM-1, IMP-1, BclI, CcrA son B1, la enzima CphA es B2 y L1 es B3.

Se han descrito otros derivados sencillos sin el grupo $-COOH$ como la α -mercaptoacetofenona **Sc-1**, ver Figura 10²¹. El compuesto **Sc-1** es activo frente a las enzimas di-zinc IMP-1, L1 y mono-zinc CphA, ver Figura 10. Por otro lado, se plantearon compuestos con mayor complejidad estructural, como derivados de carbapenemos **J-110,441**²² y de penicilinas **Bu-1**²³, ver Figura 10. Estos son análogos a los antibióticos β -lactámicos (A β L), sustratos de las M β L presentando una β -lactama y un

grupo –COOH. Además estos derivados poseen en su estructura un grupo tioéter en **J-110,441** o un grupo tiol en **Bu-1**, ver Figura 10. El metilcarbapenemo **J-110, 441** y el derivado de penicilina **Bu-1**, son activos frente a las MβL di-zinc y también frente a las serina-β-lactamasas.

Inhibidores dicarboxílicos.

Otro grupo de inhibidores descritos en literatura son los derivados dicarboxílicos, como el compuesto 2,3-sustituido del ácido succínico **Yi-1**. El dicarboxilato **Yi-1** se identificó como buen inhibidor frente IMP-1 realizando un screening sobre una base de datos de Merck, ver Figura 11²⁴. Se determinó la estructura cristalina del complejo IMP-1:**Yi-1** por difracción de rayos X, en la que se observa que los dos grupos carboxilatos coordinan con los Zn²⁺ y uno de ellos interacciona por puente de hidrógeno con un residuo del sitio activo de la enzima²⁴. A partir de estos resultados se prepararon otros compuestos como potenciales inhibidores, como por ejemplo derivados de ácido ftálico **Hi-1**²⁵, furanos **Fi-1**²⁶ y derivados de piridina **Ga-1**²⁷, ver Figura 11.

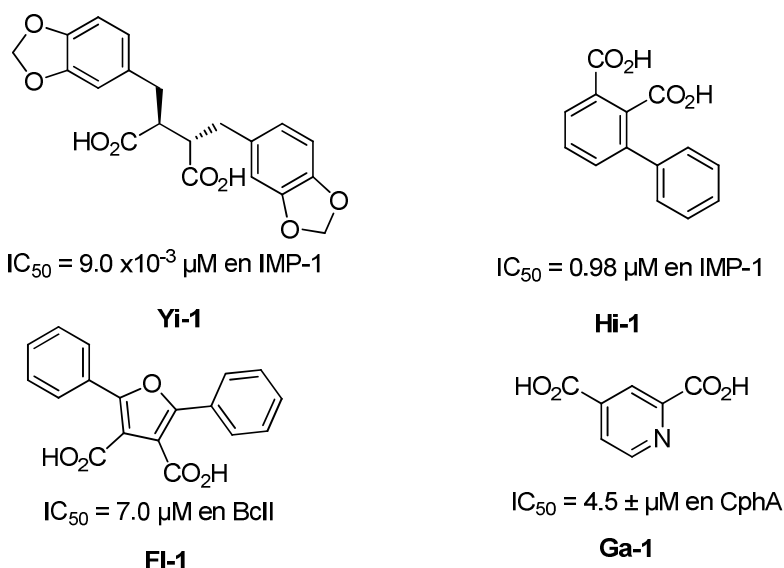


Figura 11. Ejemplos de inhibidores dicarboxílicos. Las enzimas IMP-1, BclI son B1 y la enzima CphA es B2.

En el caso del derivado piridina **Ga-1**, se evaluó frente a la especie mono-zinc CphA y se determinó la estructura cristalina del complejo CphA:**Ga-1** por difracción de rayos X. En dicha estructura se observa que uno de los grupos carboxilatos y el nitrógeno de la piridina son los que interaccionan con el ion Zn²⁺, mientras que el otro –COOH no participa en la interacción de unión²⁷. Los derivados dicarboxílicos no son inhibidores de amplio espectro de todas las subclases de MβL.

Inhibidores con otros grupos capaces de interactuar con los iones zinc

Se han descrito en literatura inhibidores de MβL que presentan otros grupos funcionales con capacidad de coordinar iones Zn^{2+} , como por ejemplo hidroxamatos, tetrazoles y sulfonilhidrazonas¹⁶. Se han identificado hidroxamatos realizando un screening sobre una base de datos de Merck. En la Figura 12 se muestra a modo de ejemplo el compuesto **Li-1**²⁸. Se estudió las interacciones de unión presentes en éstos derivados utilizando modelado molecular y se propone que el carbonilo y el hidroxilo del ácido hidroxámico coordinan con los Zn^{2+} . Pero al evaluar los derivados hidroxamatos frente a las MβL de la subclase B1, estos no fueron buenos inhibidores. Esto se puede apreciar en el valor de IC_{50} de **Li-1**, ver Figura 12.

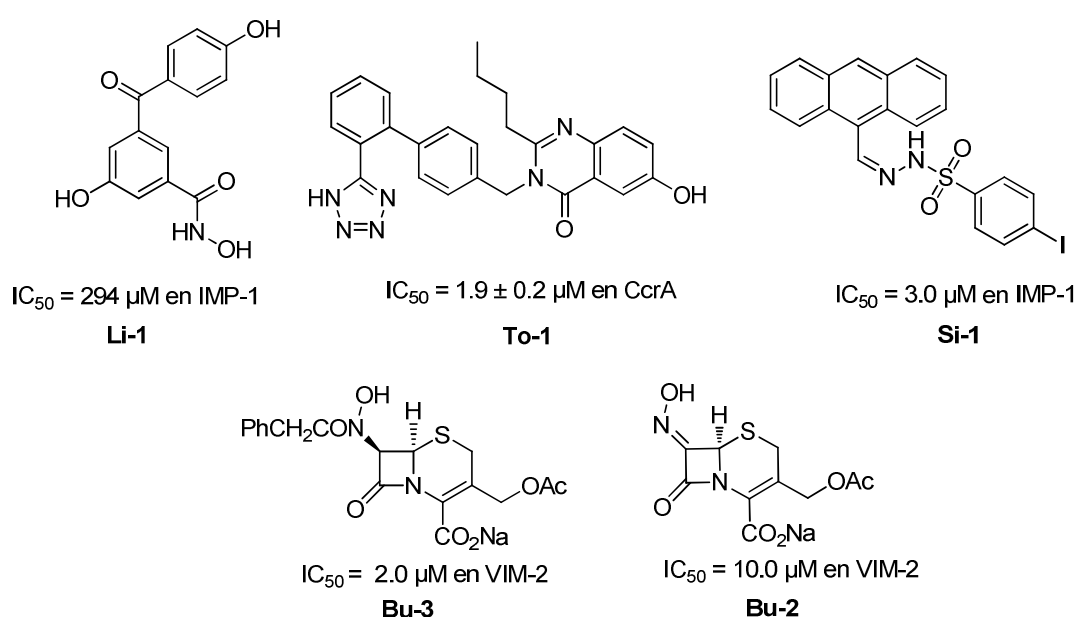


Figura 12. Ejemplos de derivados con otros grupos funcionales con capacidad de coordinar Zn^{2+} . Las enzimas IMP-1, VIM-2 y CcrA son B1.

El derivado tetrazol **To-1** también se identificó como inhibidor realizando un screening sobre la base de datos de Merck, ver Figura 12²⁹. Para dicho derivado se obtuvo la estructura cristalina del complejo CcrA:**To-1**, siendo el grupo tetrazol el responsable de las interacciones con los Zn^{2+} ²⁹. Los derivados sulfonilhidrazonas, como por ejemplo **Si-1**, se propusieron como inhibidores de IMP-1, ver Figura 12³⁰. Se estudiaron las interacciones de unión por modelado molecular y se propuso que el nitrógeno de la hidrazona interactúa con los Zn^{2+} y que el oxígeno de la sulfona interactúa por puentes de hidrógeno con los residuos del sitio activo. También se prepararon derivados de cefalosporinas que presentan en su estructura una hidroxamato reverso **Bu-3** o una oxima **Bu-2**, ver Figura 12³¹. Los derivados de cefalosporinas se propusieron con el objetivo de que fueran inhibidores tanto de serina y metalo β -lactamasas. Los derivados oximas no fueron buenos

inhibidores de β -lactamasas en general. En el caso de los hidroxamatos, se observó que son inhibidores de baja potencia frente a las serina β -lactamasas y buenos inhibidores frente a la M β L IMP-1, ver Figura 12.

Productos naturales

Se han descrito en bibliografía productos naturales como inhibidores de M β L. Recientemente se describió el Aspergillomarasmine A **AMA** como inhibidor de estas enzimas, se trata de un producto natural aislado del extracto del hongo *Aspergillus versicolor*, ver Figura 13 ³².

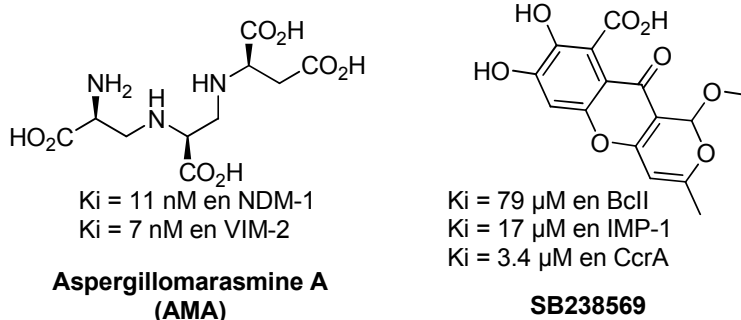


Figura 13. Producto natural descrito como inhibidor de las metalo- β -lactamasas.

El **AMA** presentó muy buena actividad inhibitoria frente a NDM-1 ($K_i = 11 \text{ nM}$) y VIM-2 ($K_i = 7\text{nM}$), subclase B1.

Se han descrito a su vez inhibidores naturales tricíclicos **SB238569**, aislados del hongo *Chaetomium funicola* ³³. Estos derivados tricíclicos son buenos inhibidores frente a las enzimas de la subclase B1, ver Figura 13. Se determinó la estructura cristalina del complejo CcrA:triciclo, siendo el grupo $-\text{COOH}$ quién coordina con los Zn^{2+} y además establece puente de hidrógeno con un residuo del sitio activo de la enzima. También participan en las interacciones de unión uno de los grupos hidroxilo y el grupo carbonilo de la cetona del triciclo ³³.

De todos los inhibidores que se han descrito en literatura, los más destacados son los que posee un grupo tiol o tioéter en su estructura. Estos se caracterizan por ser inhibidores de amplio espectro frente a las tres subclases de M β L y por presentar los mejores valores de K_i .

La búsqueda y el hallazgo de inhibidores de metalo- β -lactamasas es un gran desafío ya que deben inhibir las tres subclases de M β L B1-3, las cuales presentan un sitio activo muy variable inclusive dentro de cada subclase. Además deben ser inhibidores específicos frente a las M β L bacterianas careciendo de actividad en la superfamilia de M β L humana u otros tipos de metaloenzimas humanas (ej. ECA) ⁶. Probablemente por estas razones, hasta la fecha no existen aún inhibidores

aprobados para su uso en clínica. El desarrollo de nuevos inhibidores de M β L se encuentra ampliamente justificado ya que podrían revertir la resistencia de los microorganismos al utilizarse en combinación con los antibióticos β -lactámicos.

Bibliografía

- (1) Seija, V.; Vignoli, R. Control de poblaciones microbianas. In *Temas de Bacteriología y Virología médica*; Facultad de Medicina UdelaR, D. de B. y V., Ed.; 2006; pp 631–648.
- (2) Sánchez, J. S. Resistencia a antibióticos. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **2006**, *48* (2), 105–112.
- (3) Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. Three Decades of Beta-Lactamase Inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23* (1), 160–201 DOI: 10.1128/CMR.00037-09.
- (4) Karsisiotis, A. I.; Damblonb, C. F.; Roberts, G. C. K. A variety of roles for versatile zinc in metallo-beta-lactamases. *Metallomics* **2014**, *6* (7), 1181–1197 DOI: 10.1039/c4mt00066h.
- (5) Meini, M. R.; Llarull, L. I.; Vila, A. J. Overcoming Differences: The Catalytic Mechanism of metallo-beta-lactamases. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **2015**, *589* (22), 3419–3432 DOI: 10.1016/j.febslet.2015.08.015.
- (6) Bebrone, C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1686–1701 DOI: 10.1016/j.bcp.2007.05.021.
- (7) L. D. Sabath and E. P. Abraham. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochem. J.* **1966**, *98* (1), 11–13 DOI: 10.1042/bj0980011C.
- (8) Watanabe, M.; Iyobe, S.; Inoue, M.; Mitsunashi, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35* (1), 147–151.
- (9) Cornaglia, G.; Giamarellou, H.; Rossolini, G. M. Metallo-beta-lactamases: A last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect. Dis.* **2011**, *11* (5), 381–393 DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70056-1.
- (10) Berrazeg, M.; Diene, S.; Medjahed, L.; Parola, P.; Drissi, M.; Raoult, D.; Rolain, J. New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: An eReview using Google Maps. *Euro Surveill.* **2014**, *19* (20), 1–14 DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.20.20809.
- (11) Hsu, L. Y.; H, K. T. World Health Day 2011 : Combating Antimicrobial Resistance. *Singapore Med. J.* **2011**, *52* (4), 230–231.
- (12) Antibiotic resistance <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>.
- (13) Wang, Z.; Fast, W.; Benkovic, S. J. On the Mechanism of the Metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry* **1999**, *38* (31), 10013–10023 DOI: 10.1021/bi990356r.

- (14) Peraro, M. D.; Vila, A. J.; Carloni, P.; Klein, M. L. Role of Zinc Content on the Catalytic Efficiency of B1 Metallo- β -Lactamases. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (10), 2808–2816 DOI: 10.1021/ja0657556.
- (15) Faridoo; Islam, N. U. An Update on the Status of Potent Inhibitors of Metallo- β -Lactamases. *Sci. Pharm.* **2013**, *81*, 309–327 DOI: 10.3797/scipharm.1302-08.
- (16) Fast, W.; Sutton, L. D. Metallo-beta-lactamase: Inhibitors and reporter substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834* (8), 1648–1659 DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.04.024.
- (17) Heinz, U.; Bauer, R.; Wommer, S.; Meyer-Klaucke, W.; Papamichaels, C.; Bateson, J.; Adolph, H. W. Coordination geometries of metal ions in D- or L-captopril-inhibited metallo-beta-lactamases. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (23), 20659–20666 DOI: 10.1074/jbc.M212581200.
- (18) Nauton, L.; Kahn, R.; Garau, G.; Hernandez, J. F.; Dideberg, O. Structural Insights into the Design of Inhibitors for the L1 Metallo- β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Mol. Biol.* **2008**, *375* (1), 257–269 DOI: 10.1016/j.jmb.2007.10.036.
- (19) King, D. T.; Worrall, L. J.; Gruninger, R.; Strynadka, N. C. J. New Delhi Metallo- β -Lactamase : Structural Insights into β -Lactam Recognition and Inhibition. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11362–11365 DOI: 10.1021/ja303579d.
- (20) Mollard, C.; Moali, C.; Papamicael, C.; Damblon, C.; Vessilier, S.; Amicosante, G.; Schofield, C. J.; Galleni, M.; Frère, J. M.; Roberts, G. C. K. Thiomandelic acid, a broad spectrum inhibitor of zinc beta-lactamases. Kinetic and spectroscopic studies. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (48), 45015–45023 DOI: 10.1074/jbc.M107054200.
- (21) Liénard, B. M. R.; Garau, G.; Horsfall, L.; Karsisiotis, A. I.; Damblon, C.; Lassaux, P.; Papamicael, C.; Roberts, G. C. K.; Galleni, M.; Dideberg, O.; et al. Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo-beta-lactamases by thiols. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (13), 2282–2294 DOI: 10.1039/b802311e.
- (22) Nagano R, Adachi Y, Imamura H, Yamada K, Hashizume T, M. H. Carbapenem derivatives as potential inhibitors of various β -lactamases, including class B metallo- β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (10), 2497–2503.
- (23) Buynaka, J. D.; Chena, H.; Vogetia, L.; Gadhachandaa, V. R.; Buchananb, C. A.; Palzkillc, T.; Shawd, R. W.; Spencere, J.; Walshe, T. R. Penicillin-derived inhibitors that simultaneously target both metallo- and serine- β -lactamases. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (5), 1299–1304 DOI: 10.1016/j.bmcl.2003.12.037.

- (24) Toney, J. H.; Hammond, G. G.; Fitzgerald, P. M. D.; Sharma, N.; Balkovec, J. M.; Rouen, G. P.; Olson, S. H.; Hammond, M. L.; Greenlee, M. L.; Gao, Y. D. Succinic Acids as Potent Inhibitors of Plasmid-borne IMP-1 Metallo-beta-lactamase. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (34), 31913–31918 DOI: 10.1074/jbc.M104742200.
- (25) Hiraiwa, Y.; Morinaka, A.; Fukushima, T.; Kudo, T. Metallo-β-lactamase inhibitory activity of phthalic acid derivatives. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 5162–5165 DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.07.018.
- (26) Olsen, L.; Jost, S.; Adolph, H. W.; Pettersson, I.; Hemmingsen, L.; Jørgensen, F. S. New leads of metallo-β-lactamase inhibitors from structure-based pharmacophore design. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, 14 (8), 2627–2635 DOI: 10.1016/j.bmc.2005.11.046.
- (27) Horsfall, L. E.; Garau, G.; Liénard, B. M. R.; Dideberg, O.; Schofield, C. J.; Frère, J. M.; Galleni, M. Competitive inhibitors of the CphA metallo-β-lactamase from *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51 (6), 2136–2142 DOI: 10.1128/AAC.00866-06.
- (28) Liénard, B. M. R.; Horsfall, L. E.; Galleni, M.; Frère, J. M.; Schofield, C. J. Inhibitors of the FEZ-1 metallo-β-lactamase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (4), 964–968 DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.11.053.
- (29) Toney, J. H.; Fitzgerald, P. M.; Grover-Sharma, N.; Olson, S. H.; May, W. J.; Sundelof, J. G.; Vanderwall, D. E.; Cleary, K. a; Grant, S. K.; Wu, J. K.; et al. Antibiotic sensitization using biphenyl tetrazoles as potent inhibitors of *Bacteroides fragilis* metallo-beta-lactamase. *Chem. Biol.* **1998**, 5 (4), 185–196 DOI: 10.1016/S1074-5521(98)90632-9.
- (30) Siemann, S.; Evanoff, D. P.; Marrone, L.; Clarke, A. J.; Viswanatha, T.; Dmitrienko, G. I. N-Arylsulfonyl Hydrazones as Inhibitors of IMP-1 Metallo-β-Lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46 (8), 2450–2457 DOI: 10.1128/AAC.46.8.2450.
- (31) Ganta, S. R.; Perumal, S.; Pagadala, S. R. R.; Samuelsen, O.; Spencer, J.; Pratt, R. F.; Buynak, J. D. Approaches to the Simultaneous Inactivation of Metallo- and Serine-Beta-lactamases. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, 19 (6), 1618–1622 DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.02.018.
- (32) King, A. M.; Reid-yu, S. A.; Wang, W.; King, D. T.; De Pascale, G.; Strynadka, N. C.; Walsh, T. R.; Coombes, B. K.; Wright, G. D. Aspergillomarasmine A overcomes metallo- beta -lactamase antibiotic resistance. *Nature* **2014**, 510 (7506), 503–506 DOI: 10.1038/nature13445.
- (33) Payne, D. J.; Hueso-Rodríguez, J. A.; Boyd, H.; Concha, N. O.; Janson, C. A.; Gilpin, M.; Bateson, J. H.; Cheever, C.; Niconovich, N. L.; Pearson, S.; et al. Identification of a Series of

Tricyclic Natural Products as Potent Broad-Spectrum Inhibitors of Metallo- β -Lactamases.
Antimicrob. Agents Chemother. **2002**, *46* (6), 1880–1886 DOI: 10.1128/AAC.46.6.1880.

Capítulo 2

Diseño y Síntesis de Bistiazolidinas como
Inhibidores
de Metallo- β -lactamasas

2. Diseño y síntesis de bistiazolidinas como inhibidores de metalo- β -lactamasas

2.1. Introducción

Los antibióticos β -lactámicos (A β L) son fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento de infecciones microbianas, los cuales inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana. En la actualidad estos antibióticos presentan resistencia bacteriana lo que ha provocado el aumento de la morbi-mortalidad nosocomial. El principal mecanismo de resistencia observado es la producción de β -lactamasas capaces de hidrolizar a los A β L ^{1, 2}. En particular, la resistencia de los patógenos presentes en los centros nosocomiales es debido a la producción de metalo- β -lactamasas (M β L). Los patógenos Gram (-) tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia* han sufrido un incremento rápido de su virulencia debido a la transferencia horizontal de estas enzimas ^{1, 2}. La extensa dispersión de microorganismos que portan el gen *bla*_{M β L} (responsable de dicha transferencia) es alarmante ya que además de estar presentes en los centros nosocomiales, se han identificado en muestras ambientales de aguas residuales ³.

Las M β L son enzimas capaces de hidrolizar la mayoría de los antibióticos- β -lactámicos, incluyendo a los carbapenemos. Estos últimos son utilizados como último recurso para tratar infecciones graves. Por otra parte las M β L hidrolizan los inhibidores de serina- β -Lactamasas como ácido clavulánico y sulfonas del ácido penicilánico, que habitualmente se utilizan en combinación con los A β L para el tratamiento de infecciones resistentes. Esta gran capacidad de hidrólisis de las M β L se debe a que poseen una cavidad hidrolítica amplia y profunda ¹.

Los A β L que son sustratos de las M β L se caracterizan por ser biciclos que contienen un anillo beta-lactámico, un nitrógeno cabeza de puente tetraédrico y un grupo carboxilato, ver Figura 1. Las M β L inactivan a estos antibióticos por hidrólisis del anillo β -lactámico.

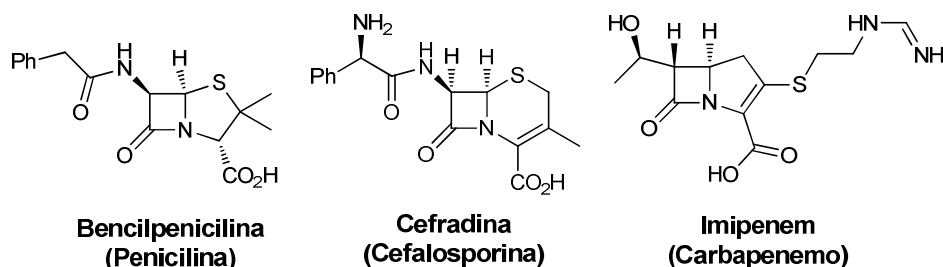


Figura 1. Ejemplos de antibióticos β -lactámicos que son sustratos de las metalo- β -lactamasas.

Una estrategia para la búsqueda de inhibidores de M β L fue el diseño de compuestos análogos a estos sustratos, que contengan un grupo adicional capaz de coordinar con Zn⁴. Debido a que el tiol es un grupo funcional con reconocida capacidad para este tipo de coordinación y está presente en varios inhibidores descritos en literatura⁴, se decidió incluirlo en el diseño de nuestros compuestos. En la Figura 2 se muestran algunos ejemplos de inhibidores de M β L que poseen en su estructura un grupo tiol.

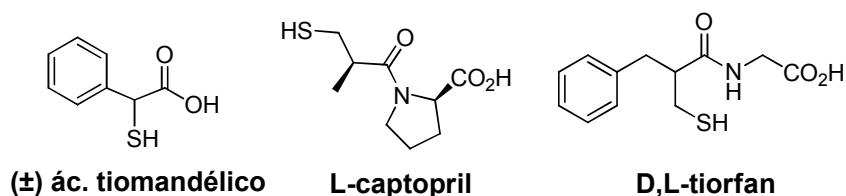


Figura 2. Ejemplos de tio-derivados inhibidores de metalo- β -lactamasas.

Al tener en cuenta estas consideraciones, se trabajó en el diseño racional de nuevas estructuras como potenciales inhibidores de M β L. Los inhibidores propuestos se caracterizan por ser análogos de los A β L presentando en su estructura **i) N** cabeza de puente **ii) grupo ácido carboxílico**, así como también por poseer en su estructura un grupo tiol.

2.2. Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es el diseño y preparación de heterociclos fusionados de cinco miembros, análogos a penicilinas, para su evaluación como potenciales inhibidores de metalo- β -lactamasas.

2.2.1. Objetivo Específico

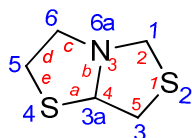
Diseño y síntesis de heterociclos fusionados de tiazolidinas con grupo tiol y su evaluación biológica como potenciales inhibidores enzimáticos de las metalo- β -lactamasas.

2.3. Antecedentes

2.3.1. Nomenclatura

Las bistiazolidinas están compuestas por dos heterociclos fusionados de tiazolidina. Estos biciclos, de acuerdo a las recomendaciones IUPAC, se pueden nombrar mediante la nomenclatura de sistemas fusionados. Esta nomenclatura emplea letras y números para nombrar al esqueleto del

biciclo y una numeración periférica para indicar la posición de los átomos y los sustituyentes del mismo, ver Figura 3⁵.



1H,3H,5H,6H-[1,3]tiazolo[4,3-*b*][1,3]tiazol

Figura 3. Denominación del biciclo según la nomenclatura de fusión. En rojo se indican los indicadores de letras y números para nombrar a esqueleto del biciclo y en azul se representa la numeración periférica del anillo para indicar átomos, hidrógenos o sustituyentes.

En algunos heterociclos fusionados esta nomenclatura IUPAC es confusa para plantear y discutir variaciones estructurales, ya que utiliza dos numeraciones en un mismo nombre (por un lado la numeración del esqueleto y por otro la de los sustituyentes). Por esta razón en bibliografía, para este tipo de sistemas, se utiliza ampliamente la nomenclatura por remplazo (Skeletal Replacement “a”) y en particular el método de von Baeyer, aunque no sea el recomendado por IUPAC. La metodología de von Baeyer utiliza una única numeración para el anillo, permitiendo nombrar a los compuestos de manera más sencilla, ver Figura 4^{7,8}.

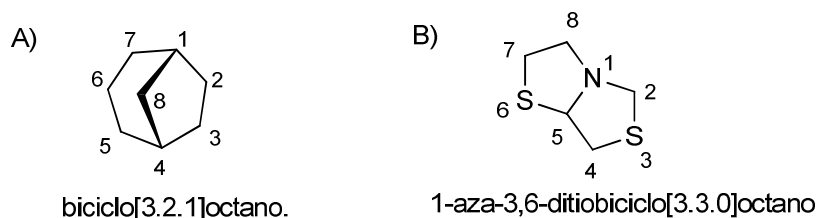


Figura 4. Denominación de biciclos según nomenclatura de remplazo. **A)** Biciclo típico para la nomenclatura de von Bayer según IUPAC. **B)** Nomenclatura de bistiazolidinas según método de von Baeyer.

En esta tesis utilizaremos la nomenclatura de remplazo para nombrar las bistiazolidinas preparadas debido a que es más sencilla para discutir variantes y sustituciones en estos anillos.

2.3.2 Antecedentes sintéticos

Las bistiazolidinas son estructuras que se encuentran poco descritas en literatura, se presentan solo dos ejemplos de síntesis^{9,10}. En ambos casos, la estrategia sintética para la formación del

biciclo se basa en ciclaciones vía iones iminio ¹⁰. Se forma primero un heterociclo de 5 miembros, tiazolidina ⁸ o tiazolina ⁹, para luego dar lugar a una segunda ciclación vía ion iminio obteniendo la bistiazolidina propuesta. Según las reglas de Baldwin, estas ciclaciones de cinco miembros se ven desfavorecidas en el modo *endo* respecto a la ciclaciones de modo *exo*, ver Figura 5 ¹¹. Frecuentemente el azufre desobedece las reglas de Baldwin y permite las ciclaciones de modo *endo*, por otra parte el oxígeno en menor proporción también puede permitir este tipo de ciclaciones ⁸.

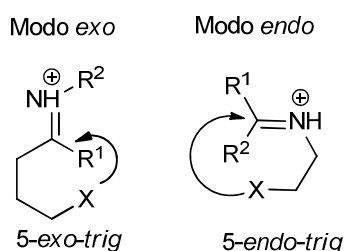


Figura 5. Modo *exo* y *endo* de las ciclaciones para cinco miembros con geometría trigonal (*trig*).

En particular, la síntesis descrita por Stojanovic y col. ⁸ consiste en la formación de un ion iminio activado ya que posee en posición α al N un grupo electrón atrayente. Para formar este segundo ion iminio es necesario realizar cuatro pasos previos de síntesis para luego obtener las bistiazolidinas de interés. La síntesis comienza con la formación de una 2-viniltiazolidin-4-ona mediante la condensación de cianoacetato de etilo y α -mercaptoacetato de etilo, catalizada en medio básico, ver Figura 6.

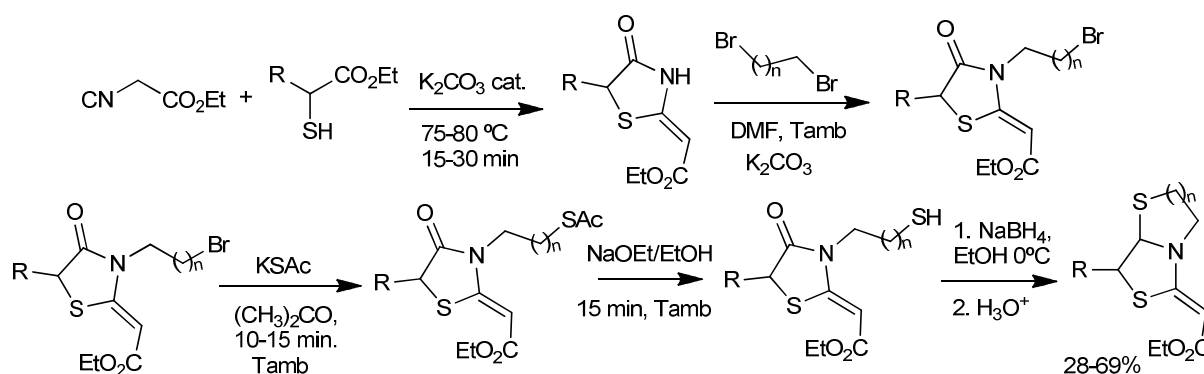


Figura 6. Ruta sintética descrita Stojanovic y col. ⁸

Luego se realiza una N-alkilación de la tiazolidinona con un derivado dibromado y a continuación se sustituye el bromuro por un tioacetato. Este grupo tiol acetilado se desprotege con NaOEt, previo a la formación del ion iminio. Para la preparación del ion iminio primero se reduce el grupo carbonilo de la tiazolidinona utilizando NaBH₄ y luego se forma el ion iminio *in situ* en medio ácido.

La ciclación *5-endo-trig* se da espontáneamente, obteniéndose las bistiazolidinas con rendimientos de moderados a buenos (28-69%), en seis pasos de síntesis.

En el presente trabajo se plantea el desarrollo de una nueva metodología para la obtención de estos bisheterociclos basada en una doble ciclación vía iones iminio en una reacción en cascada.

2.4. Análisis retrosintético

Las bistiazolidinas planteadas como objetivo principal, a las que denominaremos bistiazolidinas-1 (BTZ-1), se pueden sintetizar a partir de la ciclocondensación de aminotioles (cisteína: Cys o penicilamina: PNA) y mercaptoacetaldehído, con una relación estequiométrica (1:2), ver Figura 7.

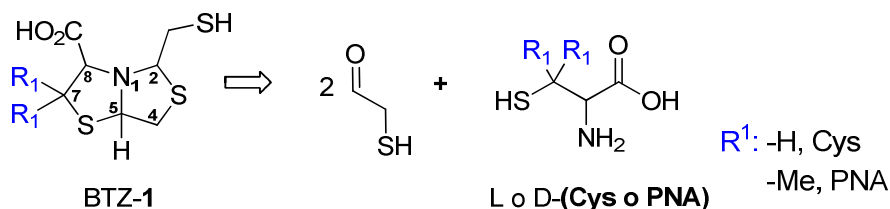


Figura 7. Análisis retrosintético de las bistiazolidinas-1.

El aminotiol de partida va a definir la estereoquímica del C8 de la BTZ-1 dependiendo si la configuración absoluta es L o D. Además el centro quiral de C8 puede influir en la estereoquímica de los dos nuevos centros quirales que se forman en el C2 y C5. A su vez el aminoácido de partida va a definir los sustituyentes R^1 , siendo $R^1 = H$ cuando el aminotiol de partida es Cys o $R^1 = Me$ cuando se parte de PNA.

Todos los materiales de partida se encuentran comercialmente disponibles, particularmente el mercaptoacetaldehído esta bajo su forma dimérica ciclica 1,4-ditiano-2,5-diol (**2**).

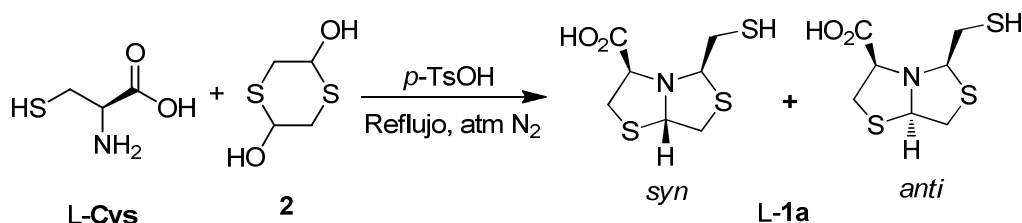
2.5. Resultados y Discusión

2.5.1. Síntesis de la serie L de las bistiazolidinas-1a-b

La reacción de ciclocondensación para la formación de las BTZ-1 está catalizada en medio ácido, utilizándose ácido *p*-TsOH.

Síntesis de L-1a

En primera instancia para la síntesis de L-1a se empleó como disolvente de reacción MeOH a reflujo por 3 h, ver Tabla 1. En dichas condiciones se obtuvo el producto en un 46% pero también se aisló el éster metílico de L-1a con un rendimiento del 24%.



Condiciones		Rendimiento (%)	r.d.* <i>syn:anti</i> (%)
Solvente	Tiempo reflujo (h)		
MeOH	3	46	76:0
MeCN	2	86	95:5

* r.d.: relación diastereomérica según integración de señales independientes del ^1H RMN del crudo de reacción.

Tabla 1. Secuencia sintética y condiciones de reacción para la obtención de L-1a.

Para evitar esta reacción secundaria de esterificación se cambió el disolvente de reacción a MeCN, mejorando el rendimiento de la bistiazolidina deseada a un 86%. En estas condiciones ensayadas se obtuvieron los diastereómeros *syn:anti* con una relación 95:5. Se realizaron experimentos de NOESY unidimensionales del diastereómero mayoritario de L-1a con el objetivo de determinar la estereoquímica relativa del compuesto.

El experimento de NOESY se utiliza para observar las correlaciones de los protones en el espacio y no a través de los enlaces químicos. Por lo tanto este experimento puede ser útil para conocer la configuración relativa de los átomos que están en estrecha proximidad entre sí.

En la Figura 8 se comparan los espectros de ^1H RMN y NOESY de la bistiazolidina L-1a, representándose en **A)** ^1H RMN, **B)** NOESY al irradiar el protón H2 y **C)** NOESY al irradiar el protón H5. En el espectro NOESY que se irradia a H2 (4.3 ppm) solo se observa acople escalar con los protones vecinos H9 y H9', por lo que no se puede determinar su posición relativa con respecto a otros protones, ver espectro B, Figura 8. Se debe mencionar que en el espectro NOESY de H2 se observa que H8 presenta un efecto NOESY de signo negativo lo que indica que este protón fue irradiado junto con H2 debido a sus desplazamientos químicos cercanos, ver espectro A y B, Figura 8. Este resultado no se puede considerar como efecto NOESY. A su vez en el espectro NOESY que se irradia a H5 (5.1 ppm) se observa únicamente el acople escalar con sus protones vecinos H4 y H4',

por lo que tampoco se pudo determinar su estereoquímica relativa respecto a otros centros estereogénicos, ver espectro C, Figura 8.

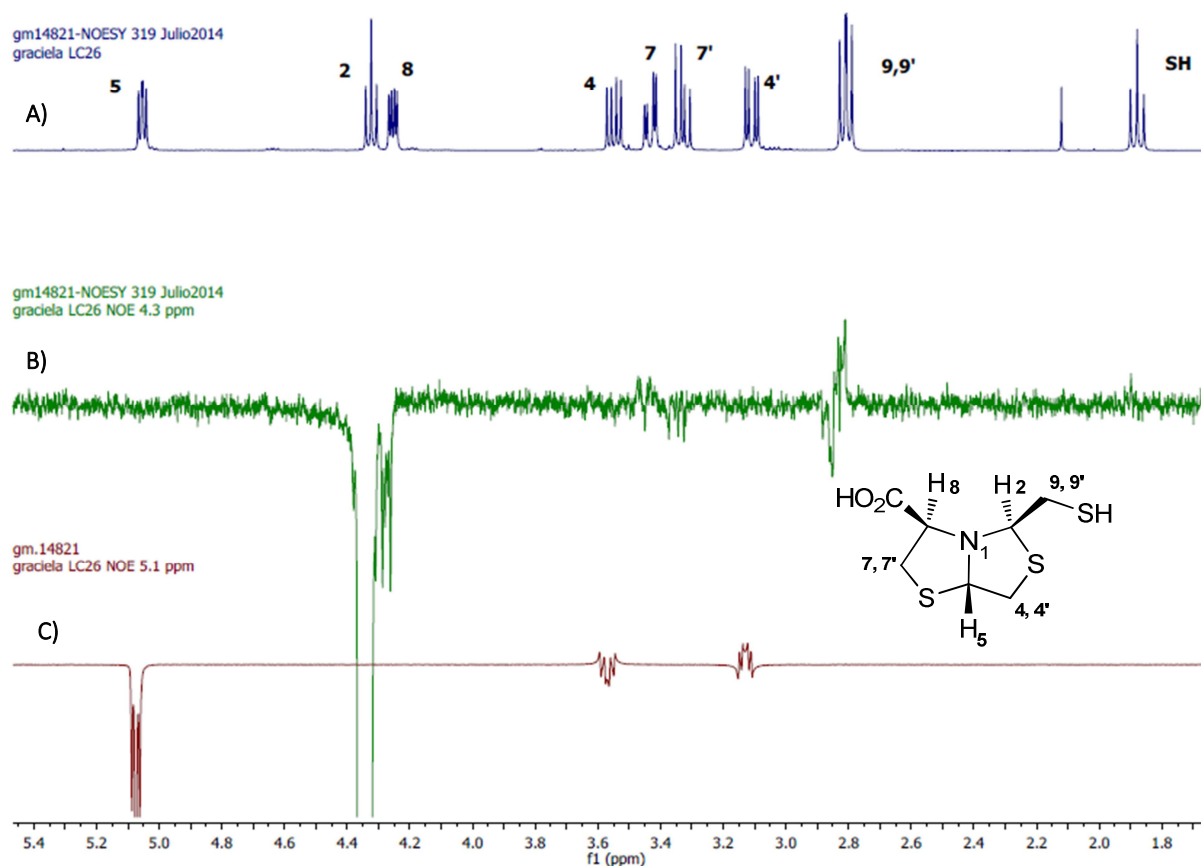


Figura 8. Espectros de RMN de *syn*-L-1a. A) ^1H RMN, B) NOESY irradiando a 4.3 ppm (H2) y C) NOESY irradiando a 5.1 ppm (H5).

Es importante destacar que se realizó un experimento NOESY irradiando a H8 pero tampoco se observó efecto NOESY con H2 ni con H5 (ver espectro en anexo). Debido a los resultados obtenidos no fue posible determinar la configuración relativa del diastereómero mayoritario L-1a en base a los experimentos de NOESY. Teniendo en cuenta la experiencia previa del grupo en la preparación de heterociclos fusionados del tipo tiazolidinil-oxazolidinas, se podría proponer al diastereómero mayoritario con la configuración relativa *syn* porque sería el termodinámicamente más estable¹². Finalmente la configuración absoluta del diastereómero mayoritario L-1a pudo ser asignada por difracción de rayos X del complejo NDM-1:L-1a, asignándose como *syn*-L-1a (2R, 5S, 8R), ver Figura 9.

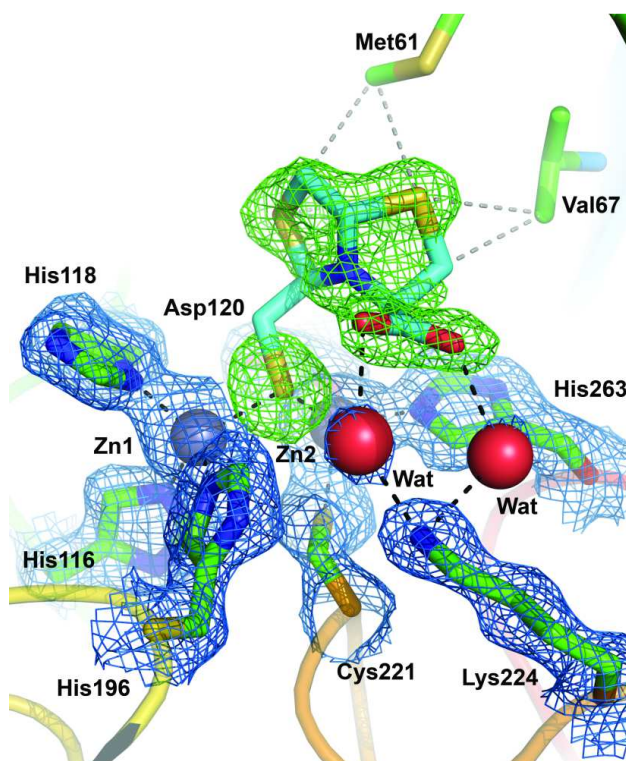


Figura 9. Mapa de densidad electrónica del complejo NDM-1:L-1a. El compuesto L-1a se superpuso con una densidad $|F_o|-|F_c|. \phi_{calc}$ (verde, contorno de 3.0 Å). El sitio activo de NDM-1 se superpuso con una densidad $2|F_o|-|F_c|. \phi_{calc}$ (azul, contorno de 1.2 Å). Los colores de los residuos aminoácidos del sitio activo están dados por el tipo átomo que presentan. Los iones zinc y las moléculas de agua se representan como esferas de color gris y rojo, respectivamente. Esta Figura se obtuvo a través de pymol (www.pymol.org).

Síntesis de L-1b

La síntesis de la bistiazolidina L-1b se llevó a cabo de manera análoga a las condiciones ensayadas para L-1a, a partir de L-PNA, ver Figura 10.

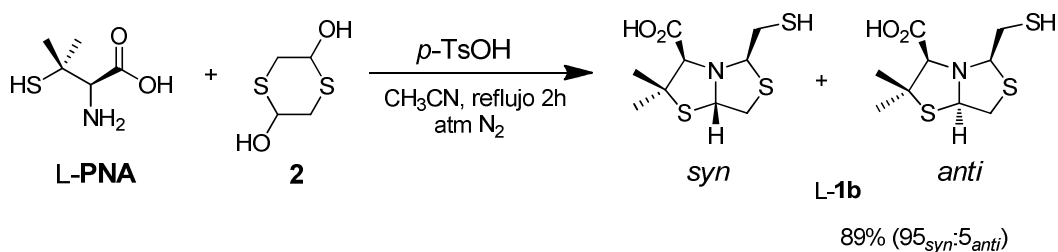


Figura 10. Síntesis de L-1b.

La bistiazolidina **1b** se sintetizó con un rendimiento del 89% y una relación diastereomérica (r.d.) *syn:anti* 95:5, la misma se calculó en base a la integración de señales independientes del ^1H RMN del crudo de reacción. La estereoquímica de los diastereómeros L-**1b** fue asignada a través de experimentos de NOESY unidimensionales. En la Figura 11 se comparan los espectros de ^1H RMN y NOESY del diastereómero mayoritario *syn*-L-**1b**. Se representa en **A)** ^1H RMN y **B)** NOESY al irradiar el protón H2 y **C)** NOESY al irradiar el protón H5.

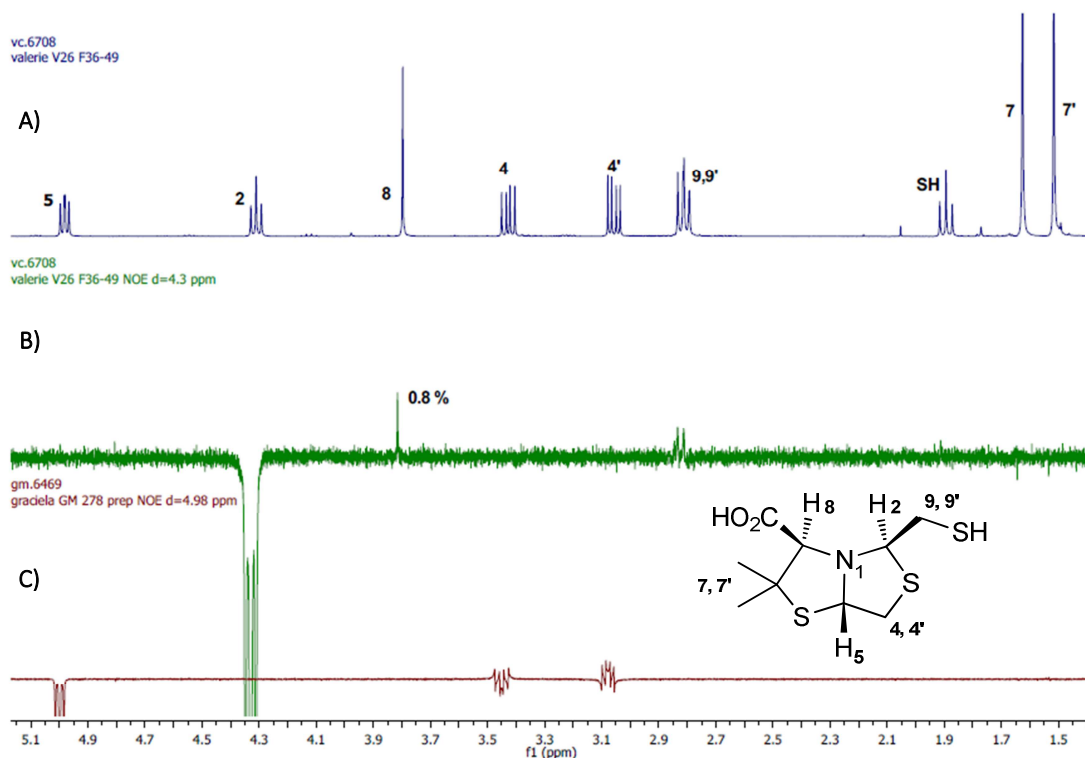


Figura 11. Espectros de RMN de *syn*-L-**1b**. **A)** ^1H RMN, **B)** NOESY irradiando a 4.30 ppm (H2) y **C)** NOESY irradiando a 4.98 ppm (H5).

Al irradiar a H2 se observó un efecto NOESY con H8 del 0.8%, indicando que dichos protones se encuentran cercanos en el espacio, ver espectro B Figura 11. Al ser conocida la configuración de C8, ya que se partió de L-PNA, se puede asignar la estereoquímica absoluta de H2.

Al irradiar a H5 no se observó ningún efecto NOESY con H2 o H8. Se observó el acople escalar con sus protones vecinos H4 y H4', ver espectro C, Figura 11. A su vez se realizó experimento de NOESY al irradiar a H8 pero no se observó efecto NOESY con H5; por lo que tampoco se puede afirmar la estereoquímica relativa de H5 (ver espectro en anexo). A partir de los resultados obtenidos no se pudo asignar la configuración absoluta de C5.

El diastéromero minoritario de la bistiazolidina L-**1b** fue aislado y caracterizado. Se realizaron los experimentos NOESY para definir su estereoquímica. En la Figura 12 se comparan los espectros de ^1H RMN y NOESY de *anti*-L-**1b**, se representa en **A)** ^1H RMN, **B)** NOESY al irradiar el protón H5 y **C)** NOESY al irradiar el protón H2.

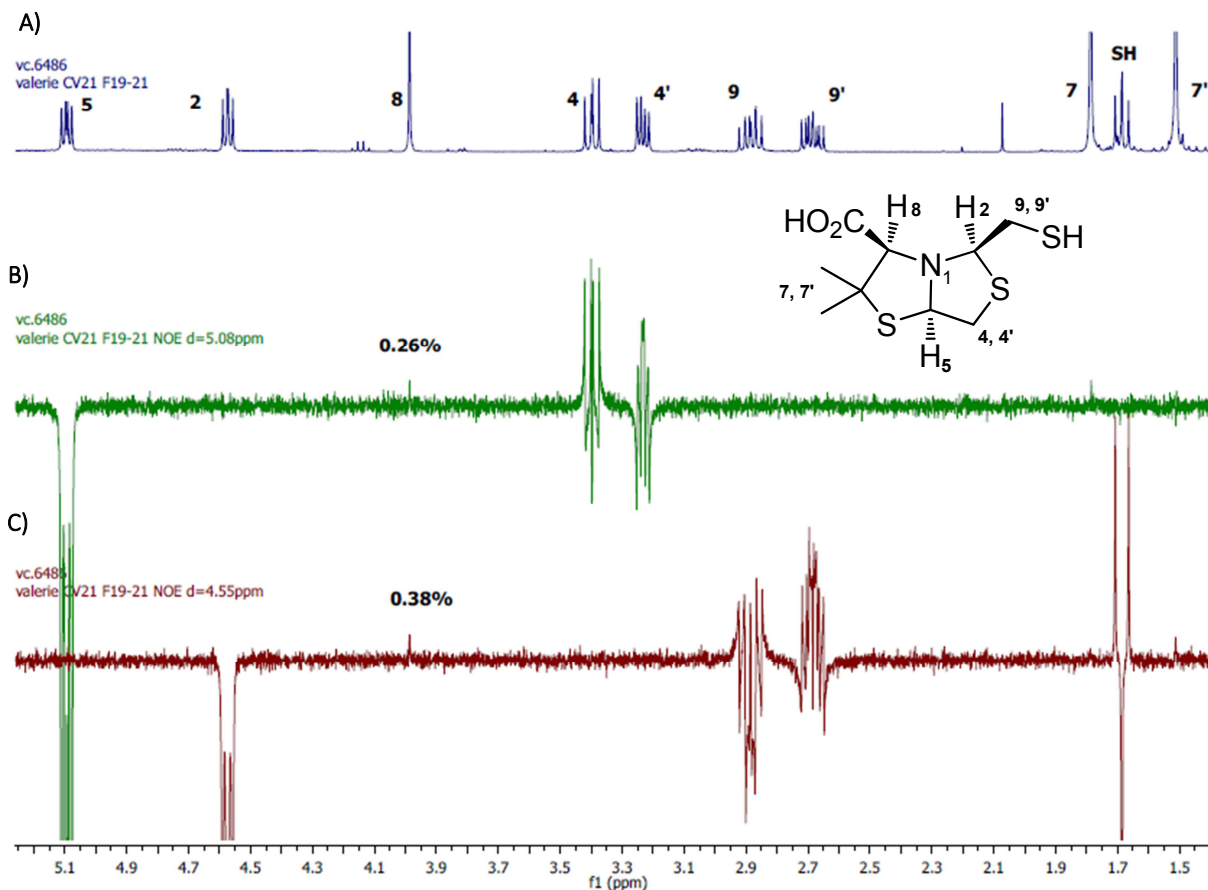


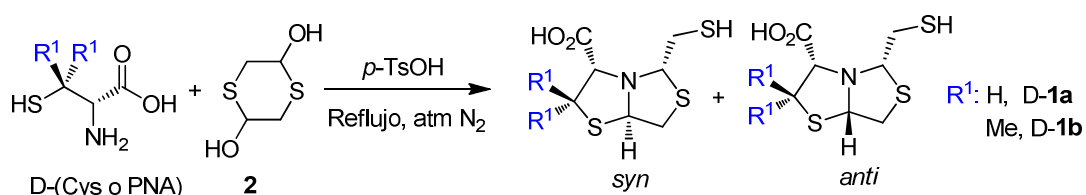
Figura 12. Espectros de RMN de *anti*-L-**1b**. **A)** ^1H RMN, **B)** NOESY irradiando a 5.08 ppm (H5) y **C)** NOESY irradiando a 4.55 ppm (H2).

En este caso tanto H5 y H2 presentaron un efecto NOESY con H8, de 0.26% y 0.38%, respectivamente, ver Figura 12. La configuración absoluta del C8 es conocida, ya que se partió de L-PNA y se observó que H2 y H5 están cercanos en el espacio, por lo que se pudo asignar las configuraciones absolutas del C2 y C5 del diastéromero minoritario como *anti*-L-**1b** (2*R*, 5*R*, 8*R*). El experimento NOESY de *anti*-L-**1b** es un claro ejemplo de cómo a partir de una configuración absoluta conocida de un centro quiral del compuesto y las configuraciones relativas que se observan en el NOESY, se puede deducir y asignar la configuración absoluta del compuesto. Al considerar la configuración absoluta asignada para el diastéromero minoritario *anti*-L-**1b** y la información recabada del experimento NOESY para el diastéromero mayoritario L-**1b** (H2 tiene

efecto NOESY con H8), se puede afirmar la configuración absoluta del diasterómero mayoritario como *syn*-L-**1b** (2*R*, 5*S*, 8*R*).

2.5.2. Síntesis de la serie D de las bistiazolidinas-**1a-b**

Para la síntesis de la serie D de BTZ-**1** se procedió de manera análoga a las condiciones optimizadas para la serie L de BTZ-**1**, partiendo de los amiontiolos D, ver Tabla 2.



Serie D	Condiciones		Rendimiento (%)	r.d. * <i>syn:anti</i> (%)
	Solvente	Tiempo reflujo (h)		
1a	MeCN	2	80	95:5
1b	EtOH	4	76	99:1

* r.d.: relación diastereomérica según integración de señales independientes ¹H RMN del crudo de reacción.

Tabla 2. Secuencia sintética y condiciones de reacción de D-**1a-b**.

La bistiazolidina D-**1a** se preparó utilizando como disolvente MeCN con un rendimiento del 80%. Se debe destacar que para la D-**1b** se empleó como solvente EtOH y se obtuvo con un rendimiento del 76% por lo que no se ensayaron otras condiciones de optimización. En ambos casos se obtuvo una alta diastereoselectividad, ver Tabla 2.

En resumen, se logró sintetizar cuatros derivados de bistiazolidinas-**1** con rendimientos de moderados a buenos (46-89%). Se obtuvieron los productos *syn* con altos excesos enantioméricos en el entorno del 95 al 100%.

Mecanismo de formación de los biciclos

La propuesta del mecanismo de formación de las BTZ-**1** se basa en una doble ciclación vía iones iminio, como se describe a continuación en la Figura 13.

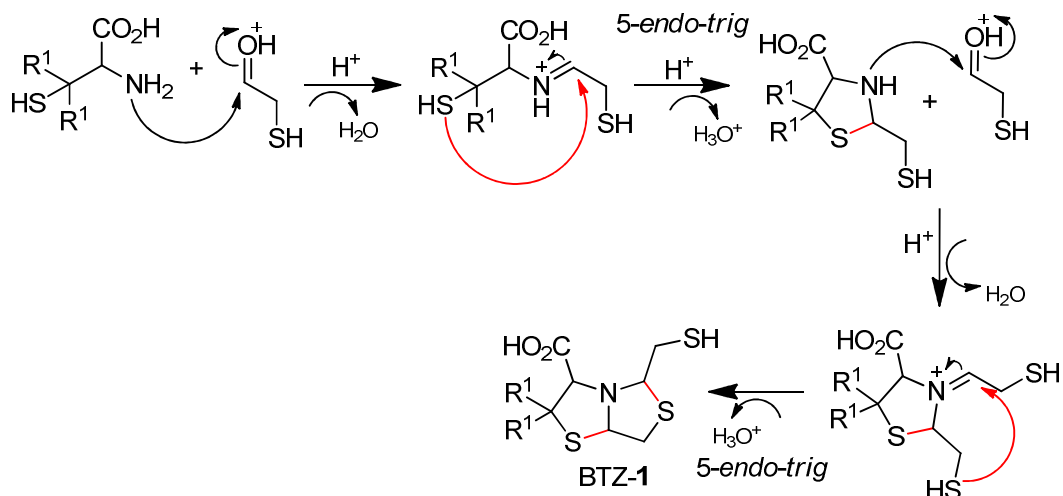


Figura 13. Propuesta mecanística para la formación de bistiazolidinas-1.

Se representa con color rojo el enlace formado a través de la ciclación del anillo por el modo *5-endo-trig*. Esta ciclación de cinco miembros se da a través del ataque nucleofílico intramolecular del átomo de azufre al ion iminio, obteniéndose de esta manera las respectivas tiazolidinas fusionadas.

2.5.3. Evaluación biológica

Los ensayos biológicos fueron realizados en colaboración con varios laboratorios. La caracterización de la inhibición de las BTZ-1 frente a tres metalo-β-lactamasas (NDM-1, IMP-1 y BclI) se realizó 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). Se caracterizó la inhibición de las BTZ-1 frente a la MβL Verona Imipenemasa (VIM) y la actividad inhibitoria de las bistiazolidinas-1 frente a patógenos resistentes aislados de casos clínicos hospitalarios (Time Kill Cells) a cargo del Dr. Prof. Roberto Bonomo en 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. También se caracterizó la inhibición de las BTZ-1 frente a las MβL Sfh-1 y L1 y se realizó la determinación estructural de los complejos MβL:BTZ-1 por difracción de rayos X a cargo del Dr. Prof. James Spencer en School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol-UK. Para los estudios biológicos se utilizaron MβL recombinantes. Las MβL se clonaron con el plásmido que contiene el gen *bla_{MβL}* de interés y fueron expresadas en células de *Escherichia coli*. La preparación detallada de cada MβL se describe en el punto 5.5 de la parte experimental.

2.5.3.1. Ensayos de inhibición enzimática: Caracterización del mecanismo de inhibición y determinación de la constante de Inhibición (K_i) de las bistiazolidinas-1 en las diferentes subclases de metalo- β -lactamasas

Se determinó el modo de inhibición y las constantes de inhibición (K_i) para cada una de las bistiazolidinas-1 preparadas frente a siete metalo- β -lactamasas (M β L), pertenecientes a las tres subclases B1, B2 y B3. Todas las BTZ-1 presentaron un modo de inhibición competitivo frente a las siete M β L evaluadas.

A continuación se va a detallar como ejemplo la caracterización del modo de inhibición para las M β L clase B1 NDM-1 y VIM-2.

New Delhi Metalo- β -lactamasa, NDM-1.

Para establecer el modo de inhibición de las bistiazolidinas-1 frente a NDM-1 se monitoreó la hidrólisis del sustrato imipenem (0-1700 μ M) a diferentes concentraciones de inhibidor (0-60 μ M) y a una concentración fija de enzima (1 nM). El seguimiento de la hidrólisis de imipenem se realizó a través de un ensayo espectrofotométrico a una longitud de onda de 300 nm a lo largo del tiempo. Se verificó previamente la no interferencia de los inhibidores a la longitud de onda de medida¹³. Al monitorear la concentración de imipenem en función del tiempo, en ausencia o presencia de los distintos inhibidores, se observó un descenso lineal de la misma. En presencia del inhibidor se observa una disminución de la velocidad de hidrólisis del sustrato con respecto al tiempo, ver Figura 14. En la Figura 14 se muestra el gráfico (Abs₃₀₀ vs t) a distintas concentraciones del inhibidor L-1a, como ejemplo de los datos obtenidos para cada BTZ-1 ensayadas.

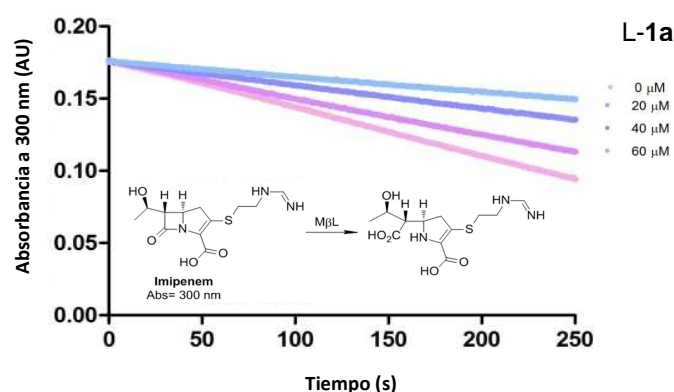


Figura 14. Gráfico absorbancia de imipenem en función del tiempo (s) en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de L-1a (20-40 μ M). Concentración inicial de imipenem 200 μ M.

En el gráfico se puede apreciar el descenso lineal de la velocidad de hidrólisis de imipenem en presencia del inhibidor, el cual es más notorio a mayores concentraciones de L-1a. De acuerdo a estos ensayos se definió la fase lineal inicial de la reacción de hidrólisis hasta una concentración de imipenem del 95% (condiciones estacionarias). Una vez definida las condiciones estacionarias se calculó la velocidad inicial de reacción (v_o).

Al graficar v_o en función de la concentración de imipenem la curva se ajustó a un modo de inhibición competitivo según la ecuación $v_o = (v_{max} \times [S]) / K_M \times (1 + [I]/K_i) + [S]$, como se muestra en la Figura 15.

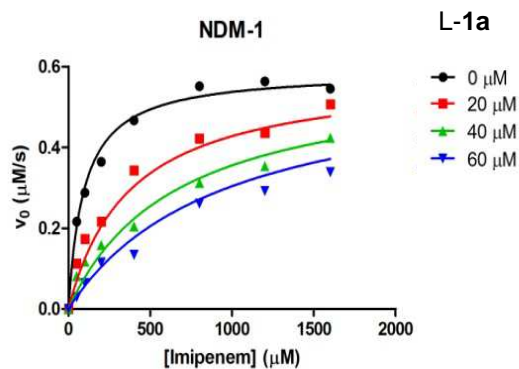


Figura 15. Gráficos de L-1a según ecuación del modo competitivo: $v_o = (v_{max} \times [S]) / K_M \times (1 + [I]/K_i) + [S]$.

Nuevamente, solo se muestra el gráfico obtenido para L-1a como ejemplo del ajuste al modo competitivo que fue observado para todas las BTZ-1 ensayadas.

Además se realizó la ecuación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk, $1/[\text{Imipenem}]$ vs $1/v_o$ para hacer más aparente los parámetros cinéticos (K_M , v_{max}), que son útiles para diagnosticar el modo de inhibición, ver Figura 16.

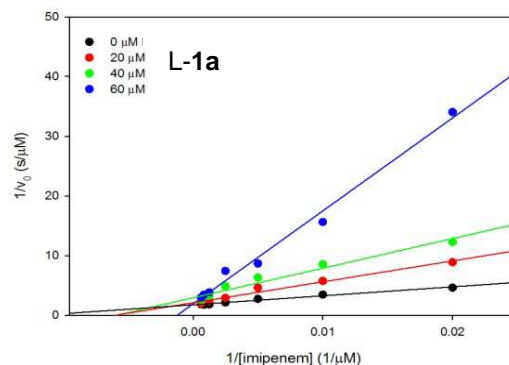


Figura 16. Gráficos de L-1a según la ecuación de dobles recíprocos de Lineweaver–Burk, $1/v_o = 1/v_{max} \times (1/[S] \times K_M \times (1 + [I]/K_i) + 1)$.

En los dobles recíprocos es notorio que la constante K_M ($x=-1/K_M$, $y=0$) depende de la concentración del inhibidor, a diferencia de v_{max} ($y=1/v_{max}$, $x=0$) que permanece constante, comportamiento típico de un inhibidor competitivo, ver Figura 16¹⁴.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que las cuatro BTZ-1 ensayadas (L-1a, D-1a, L-1b y D-1b) son inhibidores competitivos frente a NDM-1.

Verona Imepenemasa Metalo-β-lactamasa 2, VIM-2.

Para definir el modo de inhibición en VIM-2 se procedió de manera análoga al ensayo realizado para NDM-1 pero utilizando como sustrato nitrocefina (50 μM) y una concentración de enzima 3 nM. Se monitoreó el producto de hidrólisis de nitrocefina a una longitud de onda de 480 nm, ver Figura 17¹⁵.

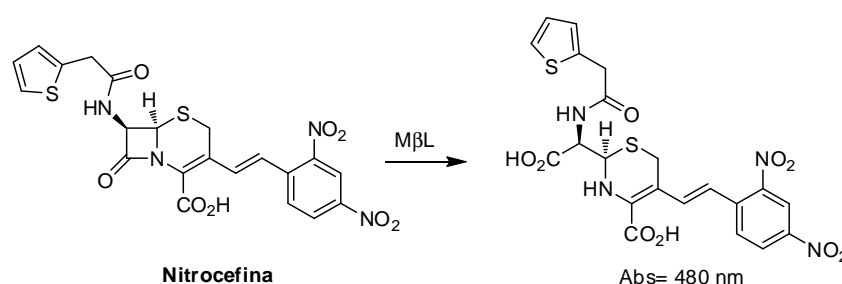


Figura 17. Hidrólisis del derivado β-lactámico nitrocefina por las metalo-β-lactamasas.

Al analizar el comportamiento de hidrólisis de nitrocefina a lo largo del tiempo en presencia de los inhibidores, se observa el decaimiento de la velocidad de hidrólisis, pero a diferencia de lo que ocurre con NDM-1, la fase inicial de la reacción no es lineal sino que presenta una curvatura, ver Figura 18.

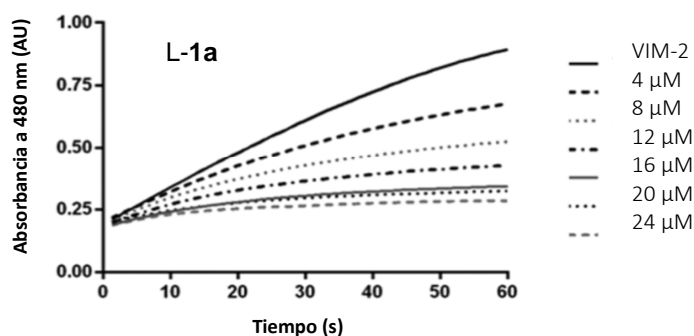
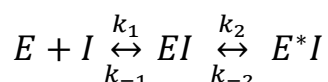


Figura 18. Gráfico Abs_{480} vs t (s). Monitoreo de la concentración de nitrocefina en presencia de L-1a y VIM-2. La reacción de hidrólisis se inicia con el agregado de la enzima (3 nM) a la mezcla de L-1a (0-24 μM) con nitrocefina (50 μM).

En la Figura 18 se muestra el gráfico (Abs₄₈₀ vs t) en ausencia o presencia de L-1a a modo de ejemplo de los gráficos obtenidos para las cuatro BTZ-1 ensayadas. En dicho gráfico se puede apreciar la curvatura al iniciar la hidrólisis de nitrocefina, lo que indica la participación de más de una velocidad inicial en la formación del complejo enzima-inhibidor. Por esta razón se realizó un estudio más detallado del modo de inhibición competitivo de las BTZ-1 frente a VIM-2. De este estudio se concluyó que las BTZ-1 son inhibidores competitivos a través de un proceso lento de formación del complejo enzima-inhibidor que implica dos pasos de unión. Esto se representa en el siguiente equilibrio:



Este comportamiento de inhibición se verificó con el monitoreo de la concentración de nitrocefina al incubar previamente la enzima con el inhibidor en ausencia de sustrato, ver Figura 19.

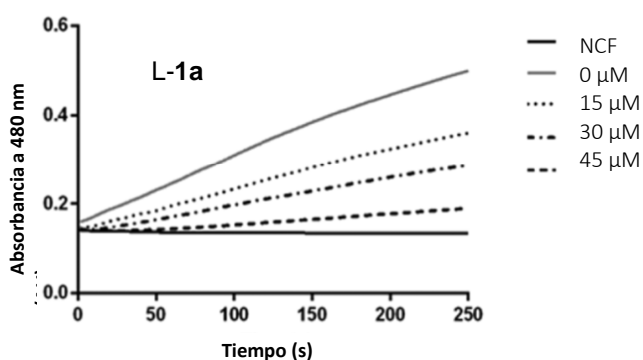


Figura 19. Gráfico Abs₄₈₀ vs t. Monitoreo de la concentración de nitrocefina en presencia de L-1a y VIM-2. Se pre-incubó la enzima (0.5 μM) con el inhibidor L-1a (0-45 μM) por 5 minutos y se inició la reacción de hidrólisis con el agregado del sustrato (50 μM).

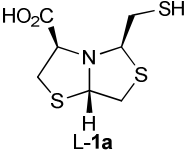
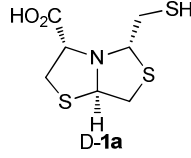
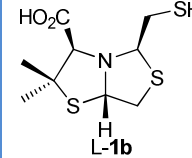
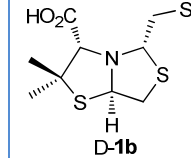
Como se puede apreciar en el gráfico (Abs₄₈₀ vs t (s)), se obtiene una fase inicial lineal con las condiciones de pre-incubación, lo que confirma que es un modo de inhibición competitivo a través de dos etapas de unión enzima-inhibidor, ver Figura 19¹⁵. Por esta razón se puede afirmar que la inhibición de las BTZ-1 es dependiente del tiempo frente a VIM-2.

Al considerar ambos ensayos realizados para NDM-1 y VIM-2 se concluye que las cuatro BTZ-1 son inhibidores competitivos, pero frente a VIM-2 se da una inhibición dependiente del tiempo. Se debe destacar que para VIM-2, al tratarse de un modo de inhibición dependiente del tiempo, la reacción de hidrólisis está definida por dos valores de constantes de inhibición: uno asociado al primer complejo enzima-inhibidor (K_i) y otra constante de disociación del complejo de mayor

afinidad (K_i^*). Las discusiones de las constantes de inhibición se van a basar en la primera constante de disociación K_i .

Constantes de inhibición (K_i)

Luego de definido los modos de inhibición se calcularon las constantes de inhibición (K_i) para las dos BTZ-**1a-b** y sus enantiómeros frente a las siete M β L ensayadas^{13, 15, 16}. Los resultados indican que todas las BTZ-**1** preparadas son inhibidores frente a la gran diversidad estructural de las M β L, presentando valores de K_i en el rango de 0.26 a 84 μ M, ver Tabla 3. En particular, estos compuestos resultaron ser inhibidores de NDM-1, VIM-2 y IMP-1, que son M β L clínicamente relevantes.

Constantes de inhibición K_i (μ M)						
Compuestos:						
1	M β L B1	NDM-1 ^a	7 \pm 1	19 \pm 3	18 \pm 3	12 \pm 1
		VIM-2 ^b	$K_i=3.7 \pm 0.3$ $K_i^*=0.04 \pm 0.01$	$K_i=5.4 \pm 0.4$ $K_i^*=0.18 \pm 0.02$	$K_i=3.8 \pm 0.2$ $K_i^*=0.25 \pm 0.01$	$K_i=14 \pm 1$ $K_i^*=0.10 \pm 0.03$
		IMP-1 ^a	8 \pm 2	6 \pm 1	15 \pm 3	14 \pm 3
		BclI ^a	36 \pm 2	53 \pm 5	32 \pm 3	84 \pm 6
2	M β L B2	Sfh-1 ^a	0.26 \pm 0.03	26 \pm 3	0.36 \pm 0.04	29 \pm 3
3	M β L B3	L1 ^a	12 \pm 1	10 \pm 1	11 \pm 2	10 \pm 1
		GOB-18 ^a	41 \pm 4	30 \pm 2	31 \pm 2	10 \pm 1

^a Modo de inhibición competitivo independiente del tiempo. ^b Modo de inhibición competitivo dependiente del tiempo:
 $K_i^*=K_i/(1+k_2/k_1)$.

Tabla 3. Constantes de inhibición de las bistiazolidinas **1a-b** frente a siete metalo- β -lactamasas ensayadas.

Si se observan los valores de K_i de la serie L y D de las BTZ-**1** ante las M β L de subclase B1 y B3 (di-Zn), estas son del mismo orden de actividad, ver entrada 1 y 3, Tabla 3. Esto muestra que la estereoquímica de los compuestos no influye la afinidad de unión frente a estas enzimas. En el caso de la subclase B2 (mono-Zn) hay una preferencia de unión por los compuestos con la estereoquímica de la serie L, ya que su afinidad es 100 veces mayor respecto a la serie D de BTZ-**1** ensayadas, ver entrada 2, Tabla 3.

Si comparamos los compuestos sustituidos en C7 con un gem dimetilo (**1b**) con respecto a los que no lo presentan (**1a**), dentro de cada serie, se observa que los valores de K_i son del mismo orden de

actividad. Esto permite concluir que el *gem*-dimetilo en el C7 no afecta la afinidad de unión al sitio activo de estas enzimas.

El compuesto de mayor afinidad frente a todas las MβL ensayadas fue el compuesto L-1a, con constantes de inhibición en el rango de 0.26 a 41 μM.

Un hecho destacable de estos compuestos es su capacidad de inhibir un amplio espectro de MβL pertenecientes a las tres subclases. Esta versatilidad queda en evidencia al lograr inhibir a la enzima GOB-18, la cual presenta un sitio activo atípico (Zn1 coordina con un residuo de Gln en lugar de His116) y cuyo Zn2 se incorpora *in vitro*¹⁶.

2.5.3.2. Monitoreo en tiempo real de la hidrólisis de imipenem en células *Escherichia coli* resistentes en presencia de las bistiazolidinas-1. Determinación de la concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀)

Recientemente se ha desarrollado una técnica que permite monitorear en tiempo real la hidrólisis de los antibióticos β-lactámicos por la enzima NDM-1 dentro de la célula bacteriana, utilizando ¹H RMN¹⁷. Este ensayo permite evaluar la potencia del inhibidor según su capacidad de atravesar la membrana celular y de ejercer su acción inhibitoria a nivel intracelular. Las MβL producidas en microorganismos Gram (-) se ubican en el periplasma celular.

En este estudio se monitoreó la hidrólisis de imipenem en células de *E. coli* con el gen *bla*_{NDM-1}, en ausencia o presencia de distintas concentraciones del inhibidor, ver Figura 20. El seguimiento de hidrólisis se llevó a cabo por ¹H RMN de 0 a 30 minutos.

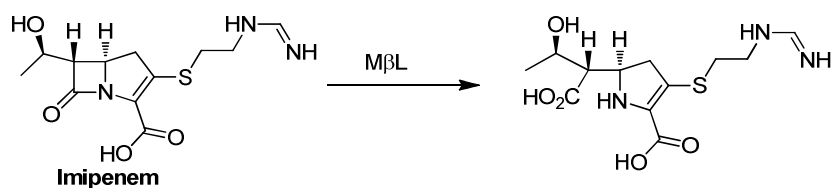


Figura 20. Hidrólisis del antibiótico β-lactámico imipenem por las metalo-β-lactamasas.

Se determinó la concentración remanente de imipenem mediante la integración de una señal aislada y característica del mismo en el espectro de ¹H RMN de la suspensión celular. Esta señal es un doblete en 1.19 ppm que corresponde al grupo metilo del imipenem sin hidrolizar, ver Figura 21.

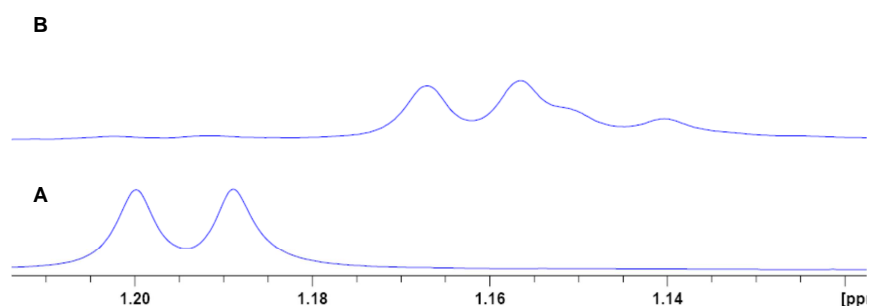


Figura 21. Espectro de ^1H RMN de la hidrólisis de imipenem en células *E. coli*, en ausencia de inhibidor. **A)** *E. coli* sin el gen $bla_{\text{NDM-1}}$ en presencia de imipenem (500 μM) luego de transcurrido 60min. **B)** *E. coli* con gen $bla_{\text{NDM-1}}$ codificando la expresión de NDM-1, en presencia de imipenem (500 μM) y luego de transcurrido 30 min del ensayo (hidrólisis total de imipenem).

En este estudio, se comprobó la ausencia de metaloenzima extracelular durante el ensayo para demostrar que la inhibición enzimática de las BTZ-1 frente a NDM-1 fue a nivel intracelular. A su vez se evaluó la estabilidad del cultivo celular en las condiciones de medida de ^1H RMN ¹³.

Una vez demostrado esto, se procedió a calcular los porcentajes de inhibición de las BTZ-1. Estos porcentajes se determinaron a los 15 min por ^1H RMN utilizando la metodología de Dalvit y col. ¹⁸, obteniéndose los valores de la concentración inhibitoria del 50% (IC_{50}). Los valores IC_{50} se presentan con sus respectivos errores en la Tabla 4 ¹³.

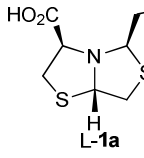
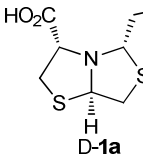
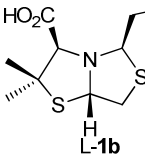
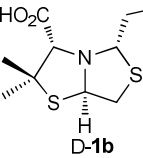
Concentración inhibitoria del 50%: IC_{50} (μM)				
Compuestos:				
Subclase B1 de M β L: NDM-1	23 ± 2	109 ± 9	200 ± 10	180 ± 10

Tabla 4. Determinación de la concentración inhibitoria del 50% por RMN de las cuatro bistiazolidinas **1a-b** frente a células *E. coli* que expresan NDM-1.

Según los valores de IC_{50} la bistiazolidina L-1a fue la que presentó mayor potencia inhibitoria frente a NDM-1. La bistiazolidina L-1a presenta un valor de IC_{50} (23 μM) de 4 a 9 veces menor respecto a las otras BTZ-1 ensayadas, ver Tabla 4. Se puede concluir que la estereoquímica de **1a** influye a nivel celular ya que la serie L presenta un valor de IC_{50} cuatro veces menor respecto a la serie D de la

BTZ-**1a**. Al considerar los valores de K_i e IC_{50} de las BTZ-**1**, se observa que **1a** es el compuesto que presenta mejor afinidad (menor K_i) y mayor potencia inhibitoria intracelular (menor IC_{50}) frente a NDM -1.

2.5.3.3. Actividad inhibitoria de las bistiazolidinas-**1** frente a patógenos resistentes aislados de casos clínicos hospitalarios (Time Kill Cells)

En este ensayo se estudió el comportamiento de las BTZ-**1** en medios de cultivo de patógenos resistentes, aislados de casos clínicos hospitalarios. Este estudio permitió evaluar la capacidad de los compuestos de restaurar la actividad del antibiótico β -lactámico.

Las cuatro BTZ-**1** fueron ensayadas frente a tres patógenos Gram (-) que poseen el gen bla_{NDM-1} codificando la expresión de NDM-1: *Klebsiella pneumoniae* Ca01.37, *Acinetobacter baumannii* 1.58 y *Providencia rettgeri* Ch01.27. Se realizaron los experimentos de crecimiento bacteriano en diferentes condiciones: i) blanco con bacterias resistentes (control del crecimiento), ii) blanco con DMSO al 0.4% (control del crecimiento). iii) agregando concentraciones subletales de imipenem (*K. pneumoniae*: 4 $\mu\text{g/ml}$; *A. baumannii*: 16 $\mu\text{g/ml}$; *P. rettgeri*: 16 $\mu\text{g/ml}$), agregando inhibidor (100 $\mu\text{g/ml}$) y iv) agregando concentraciones subletales de imipenem e inhibidor (100 $\mu\text{g/ml}$)¹³.

De cada medio de cultivo se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-2} a 10^{-8} y se evaluó el crecimiento de los mismos a distintos tiempo de incubación (100, 300 y 500 minutos), mediante el conteo de células viables, ver Figura 22.

Luego del tratamiento de datos se observa que las BTZ-**1** no presentan efecto antimicrobiano, ya que no se detectó diferencias en el crecimiento celular en el experimento blanco y el medio con 100 $\mu\text{g/ml}$ de BTZ-**1**. Por otro lado se observó que estos compuestos, en presencia de concentraciones subletales de imipenem, provocan un descenso del crecimiento celular de 3 a 7 órdenes respecto al blanco de control crecimiento. Un aspecto a destacar es que presentan actividad contra el patógeno *Acinetobacter baumannii* que posee una baja permeabilidad frente a los antibióticos, siendo este un resultado prometedor¹³.

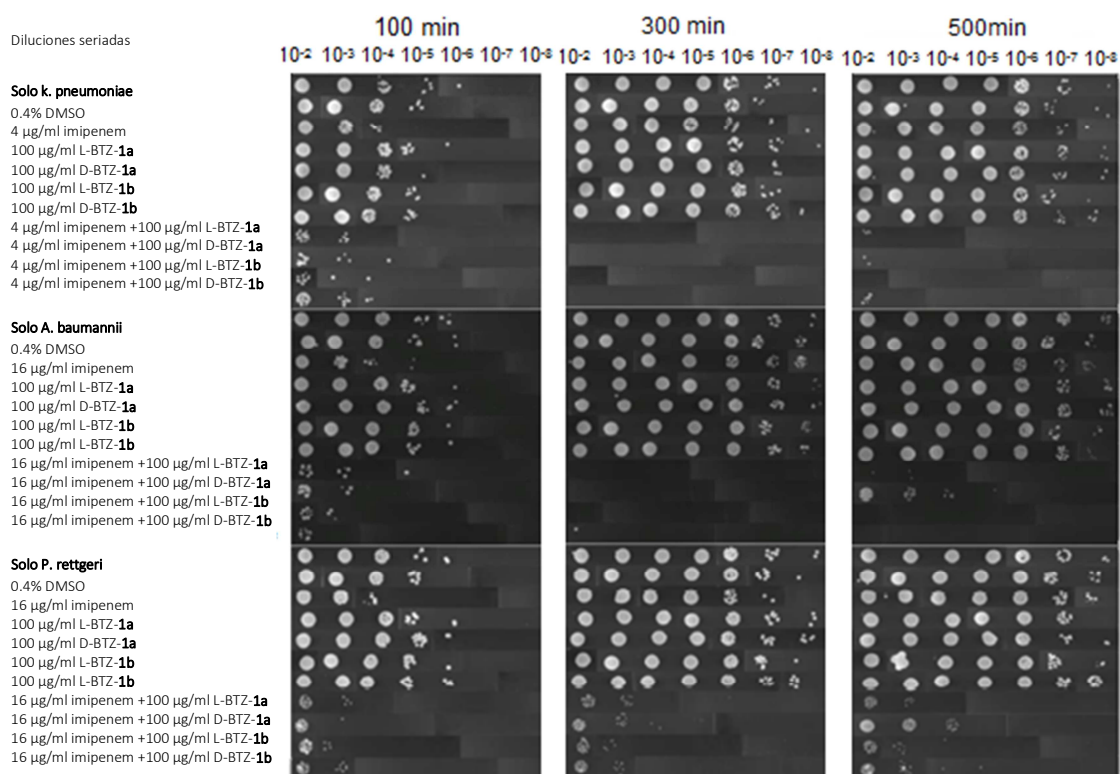


Figura 22. Time kill cell de bistiazolidinas **1a-b** frente a tres patógenos Gram (-) que expresan NDM-1.

Además se realizaron estudios de time kill contra el patógeno *S. maltophilia* aislado de casos clínicos hospitalarios¹⁶. La *S. maltophilia* es un organismo multirresistente capaz de producir la MβL L1 y la serina β-lactamasa L2. En este caso, las cuatro BTZ-1 no fueron antimicrobianos y sí fueron capaces de recuperar la actividad del antibiótico (ticarcilina-ácido clavulánico), reduciendo el recuento de bacterias ($> 10^3$). Ese resultado es particularmente interesante ya que *S. maltophilia* es un patógeno Gram negativo que presenta cepas ampliamente resistentes a múltiples fármacos, debido a la expresión de dos β-lactamasas y la presencia de una membrana con varias bombas de eflujo.

2.5.3.4. Selectividad de L-1a frente a las metalo-β-lactamasas bacterianas

Una vez identificado el compuesto con mayor capacidad inhibitoria, L-1a, es necesario evaluar su actividad frente a metaloenzimas humanas ya que presentamos en nuestro pool enzimático este tipo de enzimas. Como por ejemplo la glioxilasa perteneciente a la superfamilia de MβL u otro tipo de metaloenzimas como la enzima convertidora de angiotensina (ECA)¹⁹. Para ello se evaluó a L-1a frente a una glioxilasa humana responsable de la degradación de oxalaldehído Glioxilasa II (hGlx2), no observándose inhibición por encima de 100 µM de L-1a¹³.

2.5.3.5. Ensayos de citotoxicidad de L-1a

Se ensayó la citotoxicidad de L-1a frente a células mamíferos, HeLa y Hek 293 y no se observó citotoxicidad a concentraciones mayores de 500 μM de L-1a.

2.5.3.6. Determinación estructural de los complejos de metalo- β -lactamasas con las bistiazolidinas-1: estudios cristalográficos

Las BTZ-1 evaluadas presentaron valores de K_i similares frente a las tres subclases de M β L ensayadas (B1, B2 y B3). Para comprender como estos bicíclicos son inhibidores equivalentes frente a esta diversidad de enzimas, se obtuvieron las estructuras cristalinas de los complejos enzima-inhibidor (M β L:BTZ-1), que permitieron analizar las interacciones de unión presente en dichos complejos. Se logró determinar la estructura cristalográfica en alta resolución de los complejos de NDM-1 con L-1a, VIM-2 con L-1a, IMP-1 con D-1a y L-1b, BclI con D-1a, Sfh-1 con L-1a y de L1 con L-1a, D-1a y D-1b. Los complejos preparados se resumen en la Tabla 5, con sus respectivos valores de K_i ¹⁶.

Complejos M β L:BTZ-1				
	M β L	BTZ-1	Resolución (Å)	K_i (μM)
B1	NDM-1	L-1a	1.90	7 \pm 1
	VIM-2	L-1a	1.25	3.7 \pm 0.3
	IMP-1	D-1a	2.30	6 \pm 1
		L-1b	2.30	15 \pm 3
	BclI	D-1a	1.80	53 \pm 5
B2	Sfh-1	L-1a	1.30	0.26 \pm 0.03
B3	L1	L-1a	1.63	12 \pm 1
		D-1a	1.84	10 \pm 1
		D-1b	1.80	11 \pm 1

Tabla 5. Tabla de datos de los complejos cristalográficos (metalo- β -lactamasa:bistiazolidinas-1) preparados.

Se obtuvieron los complejos cristalográficos con la mayoría de los inhibidores pertenecientes a ambas series L y D, aunque para Sfh-1 no se logró obtener el complejo con D-1a. Esto puede deberse a que la afinidad de unión de D-1a es 100 veces menor respecto a su enantiómero L-1a. A modo de ejemplo de este trabajo se van a describir las interacciones de unión de los heterociclos L-1a y D-1a presentes en los complejos de M β L de la subclase B1 (NDM-1, VIM-2, IMP-1 y BclI), B3 (L1) y para la subclase B2 el complejo Sfh-1:L-1a.

*Interacciones de unión de L-1a con las MβL de la subclase B1**Complejo NDM-1: L-1a*

La NDM-1 es una MβL de la subclase B1 por lo que presenta dos iones Zn^{2+} (Zn1 y Zn2), con una interacción puente H_2O/OH^- entre ellos. En la conformación nativa del sitio activo de la enzima el Zn1 se posiciona en el sitio 3H (His116, His118 y His196) y el Zn2 en el sitio DCH (Asp120, Cys221 y His263). El Zn2 presenta una coordinación adicional con una molécula de agua, por lo que este ion tiene una geometría bipirámide trigonal a diferencia del ion Zn1 que es tetraédrica (4 ligandos coordinantes). La descripción de las interacciones del complejo NDM-1:L-1a va a utilizar como punto de referencia la conformación nativa del sitio activo. La estructura cristalina del complejo NDM-1:L-1a se obtuvo con una resolución de 1.90 Å, ver Figura 23.

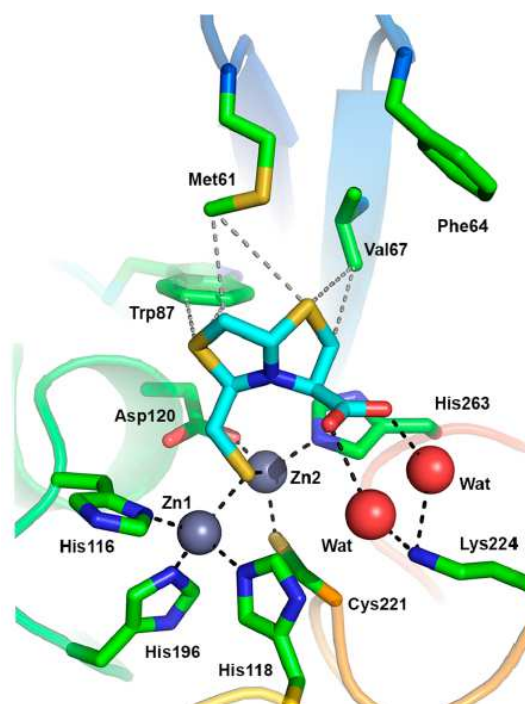


Figura 23. Estructura cristalina del complejo NDM-1:L-BTZ-1a. Las moléculas de agua se representan como esferas en color rojo (Wat) y los iones zinc se representan como esferas en color gris (Zn1, Zn2). Los enlaces de hidrógeno y las interacciones de coordinación de los iones zinc se representan con línea punteada negra. Las interacciones hidrofóbicas se representan con línea punteada gris. Los colores de los residuos aminoacídicos del sitio activo están dados por el tipo de átomo que representan. Esta figura se obtuvo a través de pymol (www.pymol.org). PDB 4U4L

En el complejo NDM-1:L-**1a** se puede apreciar que se mantiene la coordinación de Zn1 y Zn2 con los aminoácidos de los sitios 3H y DCH de la enzima nativa, ver Figura 23. El grupo tiol de **1a** coordina de manera equidistante con los dos iones zinc, lo que genera un leve aumento de la distancia entre ellos y provoca el desplazamiento del puente H₂O/OH⁻ necesario para la hidrólisis de la β-lactama, ver Figura 23. Además, la interacción del grupo tiol provoca el desplazamiento de la molécula de agua coordinante del Zn2, pasando a una geometría tetraédrica en lugar de una geometría bipirámide trigonal como en la enzima nativa. Es importante destacar que el complejo NDM-1:L-**1a** se encuentra estabilizado por enlaces de hidrógeno entre el grupo carboxilo de **1a** y el residuo Lys224. Este enlace de hidrógeno se da a través de dos moléculas de agua del sitio activo de la enzima, ver Figura 23. En el complejo también se observan interacciones hidrofóbicas entre el biciclo L-**1a** y los residuos de Met61 y Val67 del loop 3 (L3) de la enzima. La interacción con L3 es muy importante porque bloquea al sustrato en el sitio activo y además es un bucle altamente conservado para las MβL de la subclase B1¹⁹. A su vez L-**1a** tiene interacciones hidrofóbicas con el residuo de Trp87 del loop 5 de la enzima, ver Figura 23.

Complejo VIM-2: L-**1a**

La enzima VIM-2 pertenece a la misma subclase que NDM-1, presentando la misma conformación nativa del sitio activo. La estructura cristalina del complejo VIM-2:L-**1a** se obtuvo con una resolución de 1.25 Å, ver Figura 24.

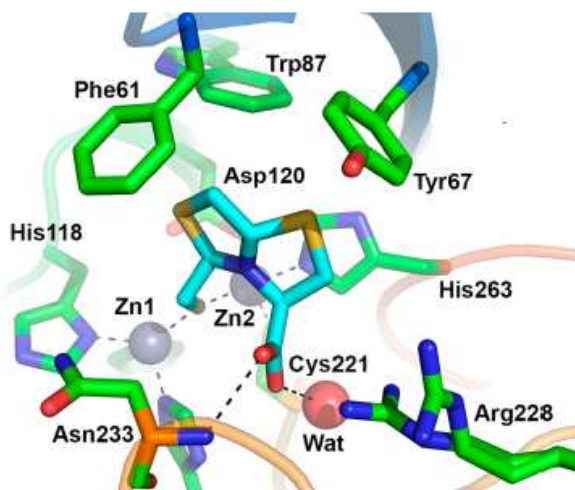


Figura 24. Estructura cristalina del complejo VIM-2:L-**1a**. Las moléculas de agua se representan como esferas en color rojo (Wat) y los iones zinc se representan como esferas en color gris (Zn1, Zn2). Los enlaces de hidrógeno se representan con línea punteada negra. Las interacciones de coordinación de los iones zinc se representan con línea punteada gris. Los colores de los residuos aminoacídicos del sitio activo están dados por el tipo átomo que presentan. Esta figura se obtuvo a través de pymol (www.pymol.org)¹⁵. PDB 4UA4

Al igual que en NDM-1, los iones Zn1 y Zn2 del complejo VIM-2:L-1a se mantienen ubicados en los sitios 3H y DCH respectivamente, ver Figura 24. Además en el complejo se observa la coordinación del grupo tiol de L-1a equidistante con los dos iones Zn²⁺. El grupo carboxilato de L-1a presenta enlaces de hidrógeno con un residuo Asn233 y también con una molécula de agua que se posiciona coordinando a su vez con el residuo de Cys221, ver Figura 24. En el complejo también se observan interacciones hidrofóbicas entre el biciclo L-1a y los residuos Phe61, Tyr67 y Trp87 (a mayor distancia). Se observan nuevamente interacciones hidrofóbicas con los bucles L3 y L5 de la enzima, al igual que con NDM-1, ver Figura 24.

Comparación de los complejos NDM-1:L-1a y VIM-2:L-1a

Una vez obtenidos los complejos de L-1a con NDM-1 y VIM-2 se analizaron las estructuras cristalinas superpuestas, para observar semejanzas y diferencias entre los modos de unión. En la Figura 25 se pueden apreciar la superposición de ambos complejos, en L-1a:NDM-1 se representa el compuesto en color celeste y la enzima en color verde y en L-1a:VIM-2 se representa el compuesto y la enzima en color azul.

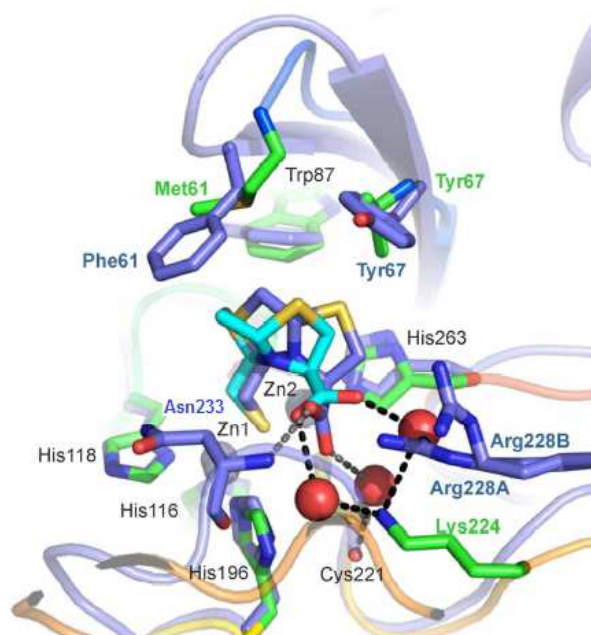


Figura 25. Superposición de las estructuras cristalinas de los complejos de NDM-1 y VIM-2 con L-1a. Se representa en verde a NDM-1 y en azul a VIM-2; para el caso de L-1a se representa en celeste frente a NDM-1 y en azul para VIM-2. Los iones zinc junto con las moléculas de agua se representan como esferas de color gris (Zn1, Zn2) y rojo, respectivamente. Los enlaces de hidrógeno y las interacciones con los iones zinc se representan con líneas punteadas negras para NDM-1 y gris para VIM-2. Los colores de los residuos aminoacídicos del sitio activo están dados por el tipo átomo que presentan. Esta figura se obtuvo a través de pymol (www.pymol.org).

Al comparar las interacciones de unión de los complejos NDM-1:L-**1a** y VIM-2:L-**1a**, se observa que ambas son muy similares, ver Figura 25. La coordinación del grupo tiol con los dos iones Zn^{2+} es equidistante y el grupo carboxilato de L-**1a** forma enlaces de hidrógeno con residuos del sitio activo de la enzima, ver Figura 25. También se determinaron las estructuras cristalinas de L-**1a** con las M β L B1 IMP-1 y BclI (datos no mostrados), presentando las mismas interacciones descritas anteriormente. Toda esta información estructural nos permite concluir que el biciclo L-**1a** interactúa con la subclase B1 mediante la coordinación del grupo tiol entre los dos Zn^{2+} y el -COOH interactúa con un residuo del sitio activo de la enzima. En el caso de NDM-1, IMP-1 y BclI este residuo es Lys224, mientras que para VIM-2 el residuo que participa es Asn233.

Interacciones de unión de L-1a con las M β L de la subclase B3

Complejo L1:L-1a

La enzima L1 pertenece a la subclase B3, su complejo con L-**1a** muestra interacciones similares a las observadas para los complejos de M β L de la subclase B1 (NMD-1 y VIM-2). En el cual se observan las interacciones del grupo tiol con los iones zinc y la interacción del grupo carboxilato por enlace de hidrógeno con el residuo de Ser223. En la Figura 26 se muestra la comparación del complejo L1:L-**1a** con los complejos de NDM-1 y VIM-2. En la figura se representa en A) la superposición de L1:L-**1a** con NDM-1:L-**1a** y en B) la superposición con VIM-2:L-**1a**, ya que de esta manera se puede apreciar la similitud de los mismos.

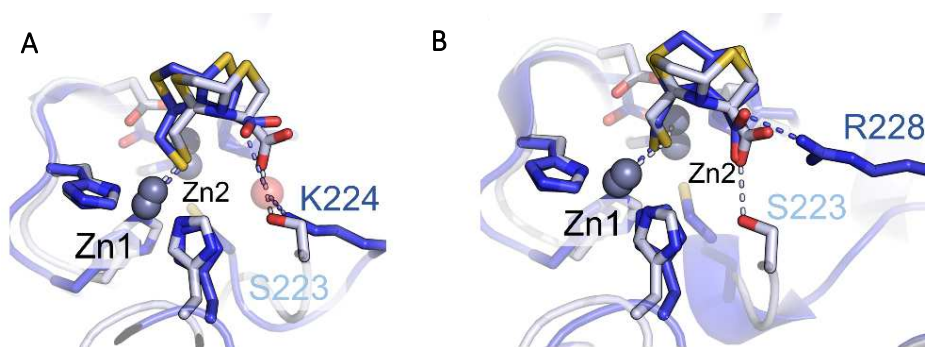


Figura 26. Superposición de las estructuras cristalinas del complejo L1:L-**1a** con: **A)** NDM-1:L-**1a** y **B)** VIM-2:L-**1a**. Se representa los complejos de L-**1a** con NDM-1 y VIM-2 en azul y con L1 en gris. Los iones zinc junto con las moléculas de agua se representan como esferas de color gris (Zn1, Zn2) y rojo, respectivamente. Los enlaces de hidrógeno se representan con líneas punteadas azules (NDM-1 y VIM-2) y gris para L1, al igual que las interacciones con los iones zinc. Los colores de los residuos aminoacídicos del sitio activo están dados por el tipo átomo que presentan. Esta figura se obtuvo a través de pymol (www.pymol.org).

El complejo además se encuentra estabilizado por las interacciones hidrofóbicas del biciclo L-**1a** con los residuos de Trp38 y la Pro226 de la enzima. La estructura cristalina del complejo L1:L-**1a** se obtuvo con una resolución de 1.63 Å.

Interacciones de unión de L-1a con las MβL de la subclase B2

Complejo Sfh-1:L-1a

La MβL Sfh-1, perteneciente a la subclase B2, es una mono metaloenzima. El ion zinc de esta subclase presenta similitudes de coordinación con el Zn2 de las otras subclases B1 y B3, ya que se posiciona en el sitio DCH (Asp120, Cys221 y His263). Además el ion zinc interacciona con una molécula de agua, por lo que presenta una geometría tetraédrica. La estructura cristalina del complejo Sfh-1:L-**1a** se obtuvo con una resolución de 1.30 Å. El análisis del complejo evidencia un escenario diferente a los descritos anteriormente, ya que es el grupo carboxilato quien coordina con el Zn²⁺, interaccionando también con los residuos de His118 y Asn233, ver Figura 27. La capacidad del grupo –COOH de coordinar con el ion Zn²⁺ y además formar enlaces de hidrógeno con otros residuos del sitio activo podría justificar su preferencia como grupo coordinante del ion respecto al grupo –SH, que se observa en las otras MβL.

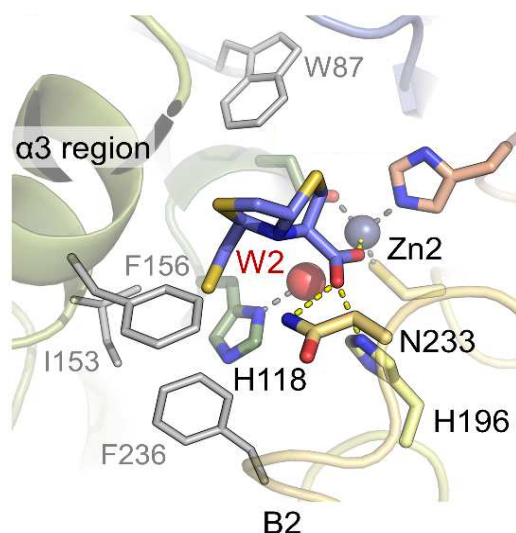


Figura 27. Estructura cristalina del complejo Sfh-1:L-**1a**. La molécula de agua (W2) y el ion Zn (Zn2) se representan con esferas de color rojo y gris, respectivamente. Las interacciones de coordinación del ion Zn2 se representan con línea punteada gris y los enlaces de hidrógeno con línea punteada amarilla. Los colores de los residuos aminoacídicos del sitio activo están dados por el tipo átomo que presentan. Esta figura se obtuvo a través de pymol (www.pymol.org).

En este complejo se observa que el grupo tiol queda inmerso en la cavidad hidrofóbica de Sfh-1 (región $\alpha 3$). Los residuos que participan en la misma son Trp87, Phe156, Ile153, Phe236, ver Figura 27. Esta interacción es importante debido a que en la subclase B2 los residuos de la región $\alpha 3$ son conservados y además se cree que participan en la selectividad que presentan estas M β L hacia los carbapenemos. Se considera que esta interacción es la responsable de la preferencia estereoquímica de la enzima Sfh-1 por la serie L de las BTZ-1.

Es importante destacar que la coordinación del ion Zn^{2+} mediante el grupo $-COOH$ del biciclo es un resultado prometedor para el diseño de inhibidores con otros grupos coordinantes de Zn^{2+} .

Interacciones de unión de D-1a con las M β L de la subclase B1

Se logró resolver la estructura cristalina de algunos complejos con los inhibidores de la serie D BTZ-1. En particular, se obtuvieron los complejos de las M β L IMP-1 y BclI (B1). La estructura cristalina del complejo IMP-1:D-1a se obtuvo con una resolución de 2.30 Å y la del complejo BclI:D-1a con una resolución de 1.80 Å, ver figura 28.

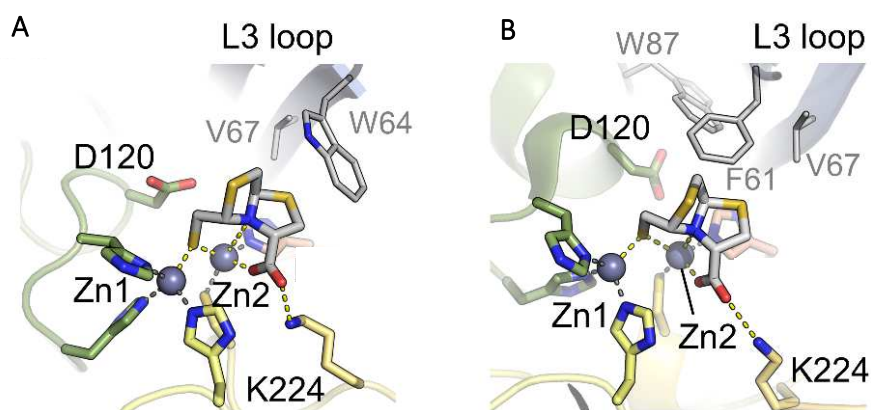


Figura 28. Estructuras cristalinas de los complejos: **A)** IMP-1:D-1a y **B)** BclI:D-1a. Los iones zinc se representan como esferas de color gris (Zn1, Zn2). Los enlaces de hidrógeno y las interacciones de coordinación con los Zn^{2+} de D-1a se representan con línea punteada amarilla. Los colores de los residuos aminoacídicos del sitio activo están dados por el tipo átomo que presentan. Esta figura se obtuvo a través de pymol (www.pymol.org).

En estos complejos se da la coordinación del ion $Zn2$ con el nitrógeno del biciclo y el carboxilato, hecho que no se observa con la serie L. Estas interacciones generan el desplazamiento del Asp120 del sitio DCH, ver Figura 28.

Al igual que para la serie L, en estos complejos el tiol coordina con los dos iones Zn^{2+} y el $-COOH$ interactúa con un residuo Lys224 del sitio activo de la enzima, ver Figura 28.

Interacciones de unión de D-1a con las MβL de la subclase B3

Otro de los complejos de la serie D resuelto fue el complejo L1:D-1a con una resolución de 1.84 Å. En este complejo se observa, como en la mayoría, el tiol interaccionando entre los dos iones Zn^{2+} . La particularidad de dicho complejo está dada por la interacción del grupo $-COOH$ con un residuo no conservado de Tyr32. Esta interacción provoca que D-1a gire 90° respecto a la posición del biciclo L-1a en el complejo con L1. Para observar claramente el cambio de posición del biciclo, se muestra a continuación la superposición de ambos complejos de L1 con L-1a (azul) y D-1a (gris), ver Figura 29.

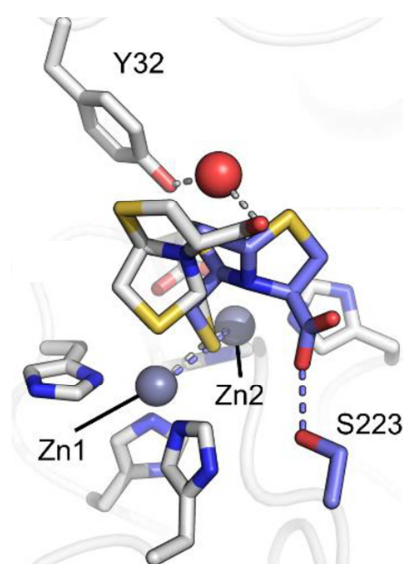


Figura 29. Superposición de las estructuras cristalinas de los complejos L1:L-1a y L1:D-1a. Se representa a L-1a en azul y D-1a en gris. Los iones zinc junto con las moléculas de agua se representan como esferas de color gris (Zn1, Zn2) y rojo, respectivamente. Los enlaces de hidrógeno y las interacciones con los iones zinc se representan con líneas punteadas azules para L-1a y gris para D-1a. Los colores de los residuos aminoacídicos del sitio activo están dados por el tipo átomo que presentan. Esta figura se obtuvo a través de pymol (www.pymol.org).

El giro del biciclo D-1a permite que el mismo interactúe con tres residuos hidrofóbicos Pro226, Phe156 y Ile162, a diferencia de L-1a que interactúa solo con el residuo Pro226 de L1.

Los distintos modos de unión descritos anteriormente para la serie L y D de 1a frente a las tres subclases de MβL, son los mismos que se observaron para la serie L y D de la bistiazolidina 1b.

En resumen, se obtuvieron las estructuras cristalinas de alta resolución de distintos complejos de M β L:BTZ-**1**, lo que permitió comprender como estos bicíclicos superan la variabilidad estructural de las M β L, logrando inhibir a las mismas. Las BTZ-**1** presentan múltiples modos de unión frente al amplio espectro de enzimas ensayadas.

A modo de resumen se ha observado que las BTZ-**1** de la serie L presentan dos modos de interacción, uno frente a la subclase B1 y B3 y otro para la subclase B2. En las enzimas di-zinc (B1 y B3) se destaca al grupo tiol coordinando entre los dos iones Zn²⁺ y al ácido carboxílico interaccionando con un residuo del sitio activo de la M β L (Lys 224 en NDM-1, IMP-1 y BclI; Asn233 en VIM-2 y Ser223 en L1). En la especie mono-zinc Sfh-1 (B2) es el grupo –COOH que interacciona con el ion Zn²⁺, mientras que el –SH interacciona con la región hidrofóbica α 3 de la enzima.

Las interacciones de unión de la serie D, a diferencia de las L-BTZ-**1**, son diferentes para la subclase B1 y B3. En la clase B1 si bien el grupo –SH coordina equidistante entre los dos Zn²⁺, el grupo –COOH y el N del bicíclico coordinan con el Zn2 de la enzima. Estas últimas interacciones desplazan al residuo Asp120 del sitio DCH. En el caso de la subclase B3 el grupo –SH coordina entre los Zn²⁺ y el grupo –COOH forma enlaces de hidrógeno con un residuo de Tyr32 no conservado, lo que provoca que el bicíclico se posicione a 90° respecto a la posición de los bicíclicos de la serie L.

Las BTZ-**1** presentan cuatro modos de unión frente a las M β L evaluadas. En todos ellos se observa la participación de los grupos –SH y –COOH, ya sea mediante la coordinación de iones Zn²⁺ o por interacciones con residuos del sitio activo que son claves en el reconocimiento del inhibidor.

2.5.4. Ensayo de estabilidad de L-**1a**

Al realizar la determinación de K_i para L-**1a**, se observó experimentalmente que los valores de K_i aumentaban con el transcurso del tiempo. Una de las razones atribuidas a este hecho fue la inestabilidad química del tiol del compuesto. Por esta razón se monitoreó la estabilidad de L-**1a** en las condiciones del ensayo de determinación de K_i. El estudio de estabilidad se realizó solo con L-**1a** ya que es el compuesto con mejor potencia inhibitoria. Además, el comportamiento de L-**1a** va a ser representativo del grupo de BTZ-**1** ya que todos estos compuestos presentan un grupo tiol en su estructura.

Para realizar la evaluación de la estabilidad del compuesto se utilizó una concentración de L-**1a** de 10 mM en buffer NaH₂PO₄:Na₂HPO₄ (10 mM, pH 7.56, 200 mM NaCl, 20 μ M ZnSO₄, 50 μ g/mL BSA) a 27 °C. El seguimiento de oxidación de la bistiazolidina **1a** se realizó por ¹H RMN.

Se analizaron los espectros de ¹H RMN de las L-**1a** a distintos tiempos y se observó la formación del disulfuro de L-**1a** (dímero) en un 33 % al cabo de 6 h, 71 % luego de 24 h y 100 % 48 h. Para disolver

la L-1a en el buffer acuoso fue necesario utilizar DMSO al 4%, se observó la aparición del solvente en el crudo de reacción, complicando el análisis de las señales en el ^1H RMN, ver Figura 30.

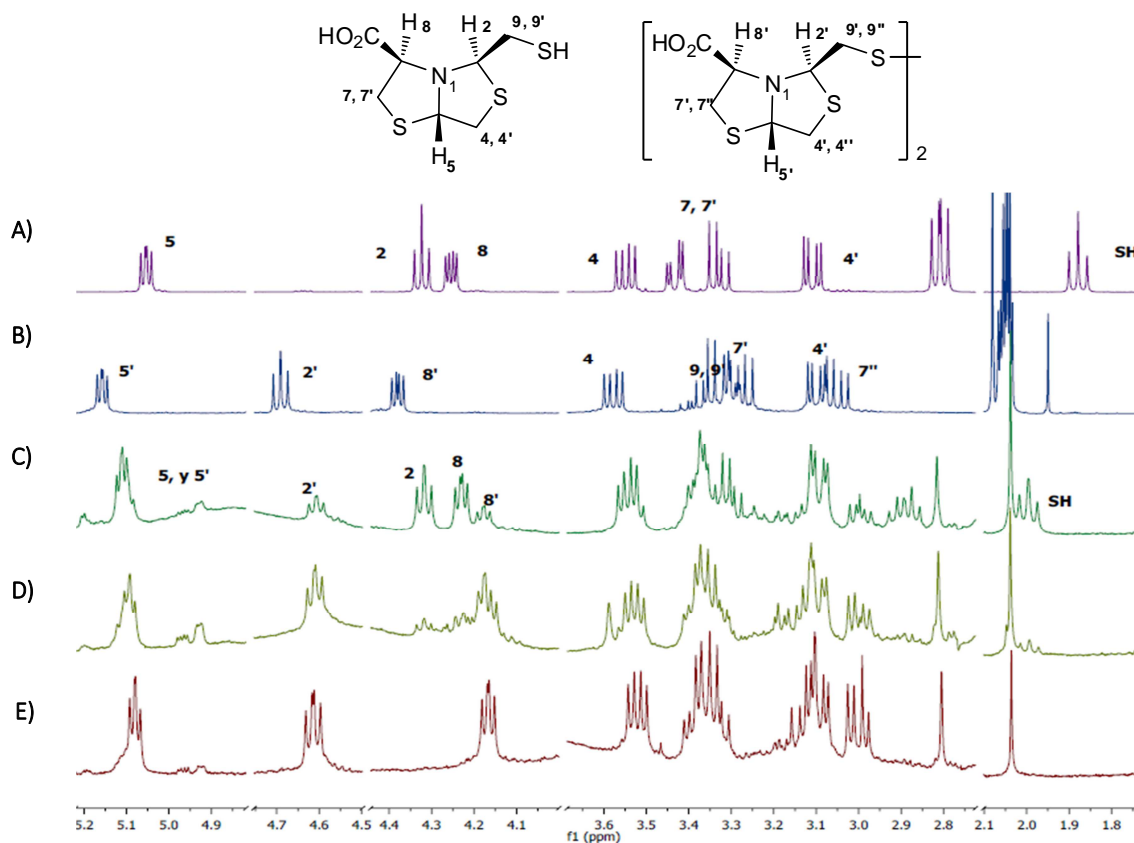


Figura 30. Espectros de L-1a en buffer de actividad. **A)** ^1H RMN de L-1a **B)** ^1H RMN del dímero de L-1a **C)** ^1H RMN de L-1a en 6 h de buffer de actividad **D)** ^1H RMN de L-1a en 24 h de buffer de actividad **E)** ^1H RMN de L-1a en 48 h de buffer de actividad. En esta superposición de espectros se eliminaron regiones de ppm que no eran de interés, en todos ellos se utilizó como solvente deuterado CDCl_3 .

Se puede concluir que las BTZ-1 son compuestos inestables en el buffer acuoso de reacción.

2.5.5 Síntesis y evaluación biológica de derivados de L-1a

Con el fin de mejorar la estabilidad de L-1a, la cual está asociada a la presencia del tiol libre, se planteó la síntesis de posibles prodrugs o análogos del compuesto L-1a. Para ello se propuso la síntesis de tres derivados tioéster, tioéter y derivado pentafluorofenol. Estos se describen a continuación.

Síntesis de bistiazolidina **1c**

Se describe en bibliografía a los tioésteres como prodrugas de tioles, como es el caso del producto natural Largazol²⁰. Por esta razón se propuso sintetizar y evaluar un derivado tioéster de L-**1a** como prodruga. En particular, se sintetizó el derivado tioacetal **1c** a partir de L-**1a** utilizando Ac₂O en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente. Dicho derivado se obtuvo con un rendimiento del 40%, ver Figura 31.

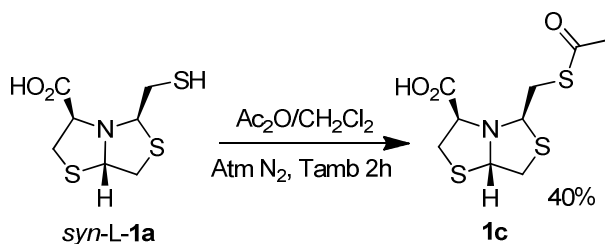


Figura 31. Síntesis de la bistiazolidina **1c**

El compuesto **1c** presentó una IC₅₀ superior a 100 μM por lo que podemos afirmar que no es un inhibidor enzimático de NDM-1. Al utilizarse microsomas para desacetilar al tioéster **1c**, se logró obtener acción inhibitoria frente a NDM-1, ver Figura 32.

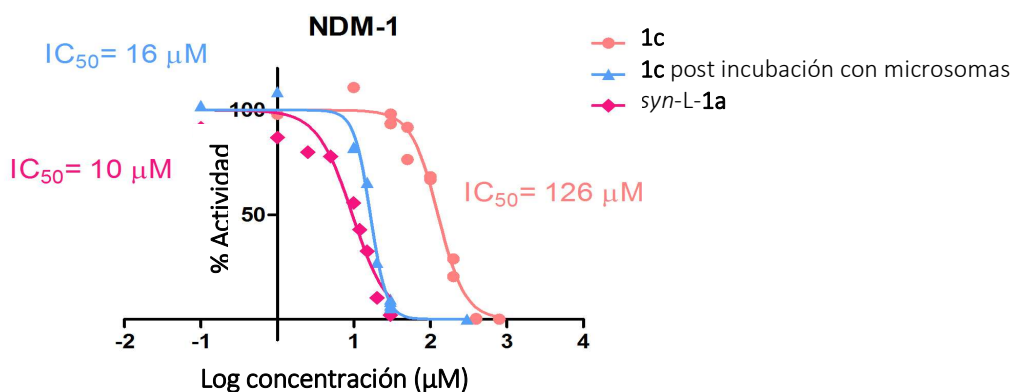


Figura 32. Gráfico % Actividad vs Log (μM) para el compuesto **1c** (pre y post tratamiento con microsomas) y para el compuesto *syn-L-1a*.

Se puede apreciar en el gráfico de la Figura 32 que el compuesto **1c** es un buen candidato a prodruga ya que el mismo presentó una IC₅₀ = 16 μM al desacetilarse con los microsomas, en lugar de una IC₅₀ = 126 μM (evaluación del compuesto **1c** sin tratamiento con microsomas).

Síntesis de bistiazolidina 1d

Con el fin de evaluar si el grupo tiol es necesario para la acción inhibitoria, se preparó el metiltioéter **1d** a partir de L-**1a**. Para su síntesis se utilizó MeI, como agente de metilación en medio básico. La reacción se realizó a temperatura ambiente y durante 30 min, para prevenir la reacción de oxidación del tiol ya que se ve favorecida en medio básico. Este derivado **1d** se obtuvo con un rendimiento del 65%, ver Figura 33.

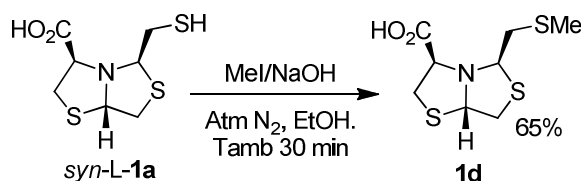


Figura 33. Síntesis de bistiazolidina **1d**

La bistiazolidina **1d** se evaluó frente a la MβL BclI (B1), presentando una IC₅₀ de 1mM por lo que no es un inhibidor enzimático. Esto permite concluir que el grupo tiol es fundamental en el biciclo L-**1a** para poder ser un inhibidor de MβL.

Síntesis del derivado pentafluorofenol

Recientemente se ha descrito en literatura un derivado que posee un éster pentafluorado, el cual es un inhibidor irreversible de NDM-1. Este derivado permite la formación de una unión covalente enzima-inhibidor debido a una sustitución nucleofílica entre un residuo de la enzima y dicho aril éster²¹. Por esta razón se propuso la síntesis de un derivado aril éster pentafluorado PhF-**1a**. En las condiciones de reacción ensayadas se observó que el tiol es capaz de atacar al carbonilo activado obteniéndose de esta manera el triciclo **1e**, no logándose aislar el producto de interés. El compuesto **1e** se obtuvo con un rendimiento del 22%, las condiciones de reacción se describen en la Figura 34.

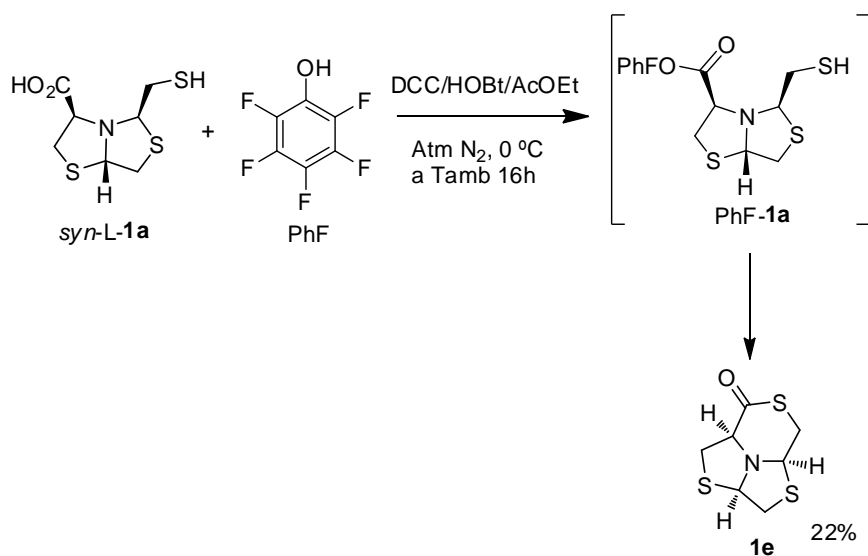


Figura 34. Síntesis del tricyclo **1e**.

La estructura del tricyclo se pudo confirmar por difracción de rayos X. La configuración absoluta se asignó como (2*R*, 5*R*, 8*R*), ver Figura 35.

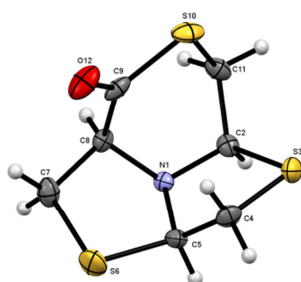


Figura 35. ORTEP. Estructura molecular del tricyclo **1e** obtenida por difracción de rayos X de monocestral.

Al confirmar la estructura del tioéster tricyclíco **1e** y al conocer que los tioésteres son activos frente a estas metaloenzimas fue de interés evaluar su actividad inhibitoria ⁴, sin embargo no fue posible medir su actividad debido a la baja solubilidad del producto.

2.6. Conclusiones

Se logró desarrollar una nueva metodología sintética para la preparación de heterociclos fusionados del tipo bistiazolidinas, mediante una reacción en cascada vía iones iminio. Se trata de una metodología sencilla y eficiente, ya que permite en un solo paso de reacción la formación de cuatro nuevos enlaces con altos rendimientos. Los materiales de partida se encuentran comercialmente

disponibles. Además si se parte de un aminoácido enantioméricamente puro es una técnica diastereoselectiva.

Se logró preparar dos derivados bistiazolidinas-**1** y sus correspondientes enantiómeros, con rendimientos de moderados a buenos (46-89%) y altos excesos enantioméricos (95-100).

Las cuatro BTZ-**1** preparadas fueron evaluadas frente a una gran variedad de metalo- β -lactamasas (B1, B2 y B3), presentando constantes de inhibición (K_i) en el orden μM (0.26-84 μM). Además, se demostró su capacidad de restaurar la actividad del imipenem en tres patógenos resistentes que expresan el gen $\text{Bla}_{\text{NDM-1}}$ aislados de casos clínicos hospitalarios (*Klebsiella pneumoniae* Ca01.37, *Acinetobacter baumannii*, *Providencia rettgeri* Ch01.27) y así como también fueron capaces de recuperar la actividad de la ticarcilina-ácido clavulánico frente al patógeno multiresistente *S. maltophilia* aislado de casos hospitalarios.

Se obtuvieron las estructuras cristalinas de nueve complejos de $\text{M}\beta\text{L}:\text{BTZ-1}$ y se logró observar los distintos modos de unión que presentan estos compuestos frente a las enzimas. Estas múltiples interacciones justifican la capacidad de las BTZ-**1** de inhibir el amplio espectro de $\text{M}\beta\text{L}$ ensayadas (un total de siete $\text{M}\beta\text{L}$). Estas características de unión se podrían argumentar por su analogía a los sustratos $\text{A}\beta\text{L}$ y por presentar dos grupos coordinantes de iones Zn^{2+} (-SH y -COOH). Las BTZ-**1** presentaron un total de cuatro modos de inhibición. Las subclases B1 y B3 presentaron múltiples modos de unión, lo que concuerda con la capacidad de éstas enzimas de unirse a diferentes sustratos. En la subclase B2, que es activa solo frente a los carbapenemos, existe una preferencia de unión hacia los diastereómeros de la serie L. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se puede concluir que las BTZ-**1** son un buen punto de partida para diseñar inhibidores eficaces frente al amplio espectro de $\text{M}\beta\text{L}$.

Teniendo en cuenta los estudios de inhibición K_i e IC_{50} , el mejor candidato a inhibidor frente a las $\text{M}\beta\text{L}$ es L-**1a**. Este compuesto a su vez demostró ser específico para las $\text{M}\beta\text{L}$ bacterianas ya que carece de acción inhibitoria frente a la superfamilia de $\text{M}\beta\text{L}$ humana y además no resultó ser tóxico frente a células de mamíferos. El grupo tiol de L-**1a**, si bien le brinda la capacidad de coordinar con los iones zinc de la enzima, por otra parte lo vuelve un compuesto químicamente inestable debido a la tendencia del tiol a oxidarse formando puentes disulfuro. Por esta razón se sintetizaron diferentes derivados de L-**1a**, donde el compuesto **1c** es un buen candidato a prodroga de L-**1a**.

Se logró ampliar el conocimiento sobre la interacción enzima-inhibidor en las metalo- β -lactamasas y se puede considerar a las bistiazolidinas-**1** como un buen punto de partida para el diseño de inhibidores eficientes frente a la gran diversidad de $\text{M}\beta\text{L}$.

Este trabajo ha sido publicado en dos revistas científicas arbitradas^{13, 16}.

Bibliografía

- (1) Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. Three Decades of Beta-Lactamase Inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23* (1), 160–201 DOI: 10.1128/CMR.00037-09.
- (2) Bush, K. Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, *13* (5), 558–564 DOI: 10.1016/j.mib.2010.09.006.
- (3) Walsh, T. R.; Weeks, J.; Livermore, D. M.; Toleman, M. A. Dissemination of NDM-1 Positive Bacteria in the New Delhi Environment and Its Implications for Human Health: An Environmental Point Prevalence Study. *Lancet Infect. Dis.* **2011**, *11* (5), 355–362 DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70059-7.
- (4) Faridoo; Islam, N. U. An Update on the Status of Potent Inhibitors of Metallo- β -Lactamases. *Sci. Pharm.* **2013**, *81*, 309–327 DOI: 10.3797/scipharm.1302-08.
- (5) IUPAC. Fused and bridged fused systems. In *IUPAC Preferred Names*; 2004; pp 73–108.
- (6) IUPAC. Constructing preferred IUPAC names. In *IUPAC Preferred Names*; 2004; pp 1–14.
- (7) IUPAC. Parent Hydrides. In *IUPAC Preferred Names*; 2004; pp 27–35.
- (8) Stojanovic', M.; Markovic', R.; Kleinpeter, E.; Baranac-Stojanovic', M. Endo -Mode cyclizations of vinylogous N -acyliminium ions as a route to the synthesis of condensed thiazolidines. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 9541–9554 DOI: 10.1016/j.tet.2011.10.011.
- (9) Kopper, S.; Linder, K.; Martens, J. Die anlagerung von mercaptocarbonsäuren an 3-thiazoline und anschließende lactamisierung. *Tetrahedron* **1992**, *48* (47), 10277–10292.
- (10) Royer, J.; Bonin, M.; Micouin, L. Chiral Heterocycles by Iminium Ion Cyclization. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (5), 2323–2330 DOI: 10.1021/cr020083x.
- (11) Baldwin, J. E. Rules for Ring Closure. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**, 734–736 DOI: 10.1039/C39760000734.
- (12) Saiz, C.; Wipf, P.; Manta, E.; Mahler, G. Reversible thiazolidine exchange: A new reaction suitable for dynamic combinatorial chemistry. *Org. Lett.* **2009**, *11* (15), 3170–3173 DOI: 10.1021/ol901104a.
- (13) González, 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

- Carbapenemasa. *Am. Chem. Soc. Infect. Dis.* **2015**, *1* (11), 544–554
DOI: 10.1021/acsinfecdis.5b00046.
- (14) Copeland, R. A. Reversible Modes of inhibitor Interactions with Enzymes. In *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*; A John Wiley & Sons, Inc, Publication, 2005; pp 48–55.
- (15) Mojica, M. F.; Mahler, S. G.; Bethel, C. R.; Taracila, M. A.; Kosmopoulou, M.; Papp-wallace, K. M.; Llarrull, L. I.; Wilson, B. M.; Marshall, S. H.; Wallace, C. J.; et al. Exploring the Role of Residue 228 in Substrate and Inhibitor Recognition by VIM Metallo- β -lactamases. *Biochemistry* **2015**, *54* (20), 3183–3196 DOI: DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00106.
- (16) Hinchliffe, P.; González, M. M.; Mojicac, M. F.; González, J. M.; Castillo, V.; Saiz, C.; Kosmopoulou, M.; Tooke, C. L.; Llarrull, L. I.; Mahler, G.; Bonomoc, R. A.; Vila, A. J.; Spencer, J. Cross-class metallo- β -lactamase inhibition by bisthiazolidines reveals multiple binding modes Philip. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016** DOI: 10.1073/pnas.1601368113.
- (17) Ma, J.; Mcleod, S.; Maccormack, K.; Sriram, S.; Gao, N.; Breeze, A. L.; Hu, J. Real-Time Monitoring of New Delhi Metallo- beta -Lactamase activity in living bacterial cells by 1H NMR Spectroscopy. *Angewandte* **2014**, *53* (8), 2130–2133 DOI: 10.1002/anie.201308636.
- (18) Dalvit, C.; Ardini, E.; Fogliatto, G. P.; Mongelli, N.; Veronesi, M. Reliable high-throughput functional screening with 3-FABS. *Drug Discov. Today* **2004**, *9* (14), 595–602
DOI: 10.1016/S1359-6446(04)03161-7.
- (19) Bebrone, C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1686–1701
DOI: 10.1016/j.bcp.2007.05.021.
- (20) Salvador, L. A.; Park, H.; Al-Awadhi, F. H.; Liu, Y.; Kim, B.; Zeller, S. L.; Chen, Q.; Hong, J.; Luesch, H. Modulation of Activity Profiles for Largazole-Based HDAC Inhibitors through Alteration of Prodrug Properties. *Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (8), 905–910
DOI: 10.1021/ml500170r.
- (21) Kurosaki, H.; Yamaguchi, Y.; Higashi, T.; Soga, K.; Matsueda, S.; Yumoto, H.; Misumi, S.; Yamagata, Y.; Arakawa, Y.; Goto, M. Irreversible Inhibition of Metallo- β -lactamase (IMP-1): A Crystallographic and Kinetic Study of the Mechanism of Irreversible Inhibition by 3-(3-Mercapto-propionylsulfanyl)propionic acid pentafluorophenyl ester. *Angewandte* **2005**, *44*, 3861–3864 DOI: 10.1002/anie.200500835.

Capítulo 3

Diseño y Síntesis de Bistiazolidinas
Sustituidas con
Grupos Funcionales Isósteros del Tiol
y su Evaluación Biológica

3. Diseño y síntesis de bistiazolidinas sustituidas con grupos funcionales isómeros del tiol y su evaluación biológica

3.1. Introducción

En el capítulo anterior se diseñaron, prepararon y evaluaron heterociclos fusionados de bistiazolidinas-1 (BTZ-1) que resultaron ser buenos inhibidores de MβL pertenecientes a las tres subclases B1, B2 y B3, ver Figura 1^{1, 2}.

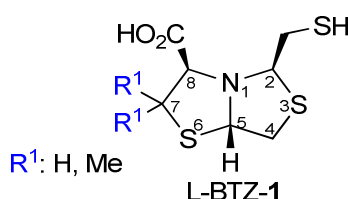


Figura 1. Estructura de la serie L de las bistiazolidinas-1 preparadas.

Estos derivados BTZ-1 son inhibidores de MβL en el orden micromolar, con actividad *in vitro* frente a patógenos resistentes aislados de casos clínicos hospitalarios¹. Si bien estos compuestos presentan características inhibitorias importantes, tienen como desventaja ser compuestos metabólicamente inestables debido a la presencia del grupo tiol. En el capítulo anterior se describió la tendencia del grupo tiol de las BTZ-1 a oxidarse, formando los derivados diméricos. Por esta razón se decidió explorar el remplazo del tiol por otros grupos funcionales isómeros del mismo. En bibliografía se encuentran descritos varios grupos alternativos capaces de interactuar con iones Zn^{2+} como son los carboxilatos, hidroxamatos y tetrazoles, entre otros. La mayoría de estos grupos funcionales ya se encuentran descritos en varios inhibidores de MβL, ver Figura 2^{3, 4}.

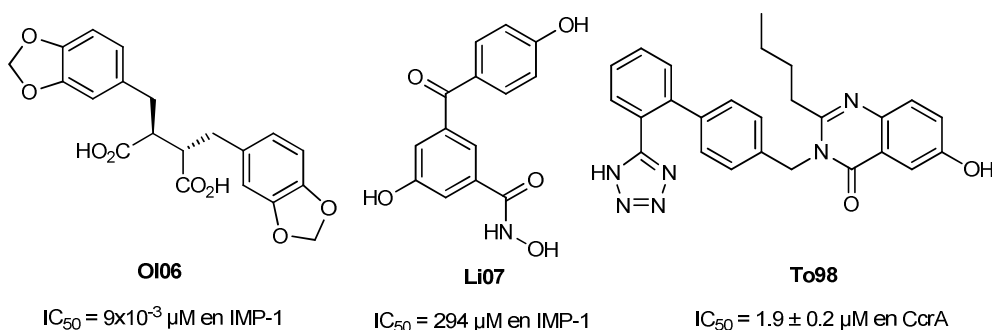


Figura 2. Ejemplos de inhibidores de metalo-β-lactamasas

En la Figura 2 se representan algunos ejemplos de inhibidores en los que se propone la participación de estos grupos funcionales en la interacción con los iones Zn^{2+} . El compuesto **O106** es un derivado del ácido succínico 2,3-sustituido que fue descrito por Olsen y *col.* Se determinó la estructura cristalina del complejo IMP-1:**O106** lo que permitió identificar el modo de unión al sitio activo de la enzima, en el que ambos grupos carboxilatos coordinan con los iones Zn ⁵. También se ha descrito un derivado hidroxima **Li07** como inhibidor de IMP-1 (B1), los autores proponen en base a cálculos teóricos de modelado molecular, que el grupo hidroxamato es quien coordina con los iones Zn^{2+} del sitio activo de la enzima. En particular, se propone que participan en esta interacción el carbonilo y el hidroxilo del ácido hidroxámico ⁶. El compuesto **To98** es un derivado bifeniltetrazol que fue descrito por Toney y *col.* como inhibidor de la enzima CcrA (B1). La determinación de la estructura cristalina del complejo CcrA:**To98** permitió observar que el tetrazol es el grupo que interacciona con los Zn^{2+} de la enzima ⁷.

Por otra parte se describe en bibliografía al grupo difluorometil ($-CHF_2$) como isómero del tiol, este ejemplo está descrito para una proteasa dependiente de Zn^{2+} . Los autores reemplazan un tiol por un $-CHF_2$ y logran mejorar la potencia inhibitoria del derivado ⁸.

Al considerar los distintos grupos funcionales capaces de sustituir al grupo tiol se llevó a cabo el diseño de análogos a BTZ-**1** como potenciales inhibidores enzimáticos.

3.2. Objetivo específico

Diseño y síntesis de heterociclos del tipo bistiazolidina, sustituidas con grupos funcionales isómeros del tiol y su evaluación biológica como potenciales inhibidores de metalo- β -lactamasas.

3.3. Resultados y discusión

Teniendo en cuenta la metodología desarrollada para las BTZ-**1**, la preparación de derivados sustituidos en la posición 2 con diferentes grupos funcionales implicaría una ruta sintética en dos etapas de ciclación. Para lograr esto sería necesario encontrar condiciones de reacción que permitieran aislar la tiazolidina intermedia I, la cual se obtiene en la primera reacción de ciclación, ver Figura 3. Los primeros intentos de síntesis en dos etapas de heterociclos del tipo BTZ-**1** sustituidos en C2 fueron infructuosos, ya que nunca se logró aislar la tiazolidina I sino el producto de doble ciclación BTZ-**1a**.

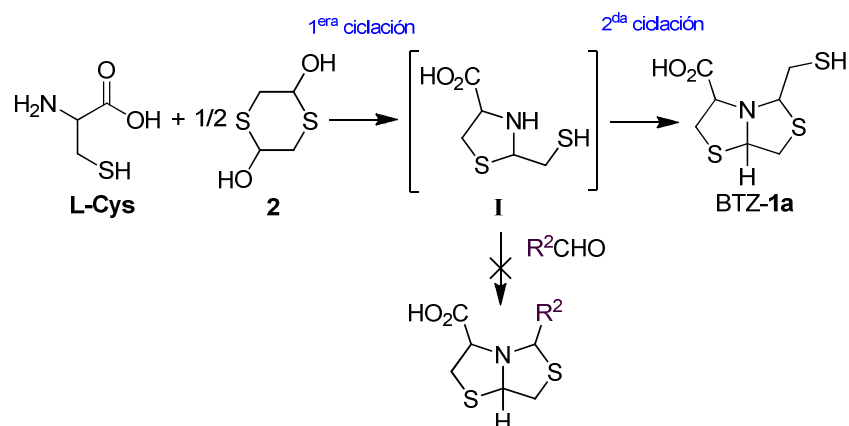


Figura 3. Intento sintético para preparar las bistiazolidinas sustituidas en posición 2.

Por esta razón se intentó preparar derivados mercaptoacetaldeídos protegidos a nivel del tiol y de esta manera evitar la segunda ciclación para obtener las tiazolidinas intermedias de reacción.

Grupo protector bencilo

Se sintetizó el mercaptoacetal bencilado **4** a partir de la condensación del bromo dietilacetal **3** con bencilmercaptano (BnSH) en NaOEt/EtOH, obteniéndose **4** en forma cuantitativa, ver Figura 4 ⁹.

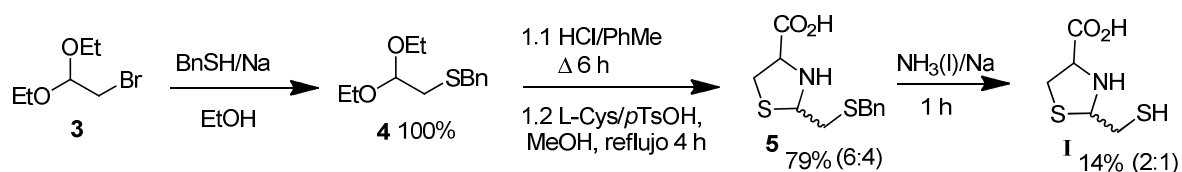


Figura 4. Síntesis del mercaptoacetaldeído bencilado **4** y la tiazolidina **I**

El acetal **4** se hidrolizó con HCl cc en PhMe a 70 °C, para obtener el bencilaldeído correspondiente. Este aldeído se condensó con L-Cys en MeOH a reflujo y ácido *p*-TsOH como catalizador para obtener la tiazolidina bencilada **5** (79%, r.d. 6:4) ver Figura 4. Luego se realizó la desprotección del bencilo de la tiazolidina **5** con Na en NH₃ (l), obteniéndose por una única vez la tiazolidina **I** con un rendimiento del 14%. Se realizaron varios intentos para preparar más tiazolidina **I** pero no fue posible reproducir esta reacción. Esta falta de reproducibilidad se puede atribuir en parte a las drásticas condiciones de desprotección y a la labilidad del enlace “acetálico”.

Grupo protector acetilo

Debido a que el grupo bencilo no resultó como grupo protector para preparar las tiazolidinas, se intentó trabajar con el tiol acetilado. Para ello se preparó el mercaptoacetaldehído acetilado **7** mediante la condensación del bromo dietilacetal **3** y el tioacetato de potasio **6**, en acetona como solvente. Se obtuvo el tioéster **7** con un rendimiento del 94%. El tioacetato **6** se preparó a partir del ácido tioacético e hidróxido de potasio en EtOH, fue una reacción cuantitativa¹⁰, ver Figura 5.

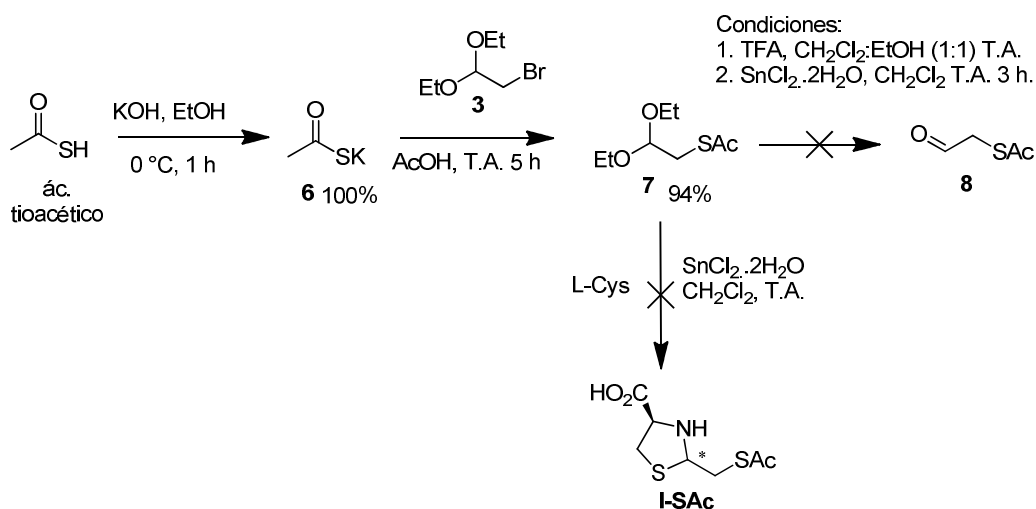


Figura 5. Síntesis del mercaptoacetaldehído acetilado **7** e intentos de preparación de la tiazolidina **I-SAc**.

Se ensayaron varias condiciones de hidrólisis del acetal acetilado **7**, en medio ácido con TFA o utilizando el hidrato de SnCl₂¹¹ pero no se logró identificar al aldehído de interés **8**, ver Figura 5. Por último se intentó realizar la hidrólisis *in situ* del acetal **7** utilizando SnCl₂·2H₂O, en presencia de L-Cys pero no se logró identificar la tiazolidina tioacetilada **I-SAc**, ver Figura 5.

Grupo protector tritilo

El otro grupo protector que se utilizó fue el tritilo, para ello se preparó el aldehído protegido **10** a partir del mercaptoetanol **9**. Se realizó como primer paso de síntesis la tritilación del azufre con TrtCl/TFA en CH₂Cl₂¹². Luego se oxidó el grupo alcohol a aldehído utilizando la reacción de Parikh–Doering para dar el compuesto **10** con un rendimiento global del 11%, ver Figura 6. Por último se intentó la condensación del aldehído tritilado **10** con L-Cys para sintetizar la tiazolidina **I-STrt** pero se obtuvieron mezclas complejas. Esto se puede atribuir en parte a la inestabilidad del aldehído **10** y del grupo tritilo como protector del azufre.

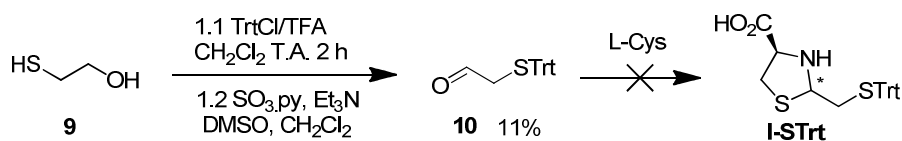


Figura 6. Síntesis del mercaptoacetaldehído **10** e intentos para preparar a **I-STrt**.

Los tres grupos protectores utilizados (bencilo, acetilo y tritilo) no fueron efectivos para poder aislar la tiazolidina intermedia **I**. Por esta razón se decidió cambiar el diseño de síntesis y utilizar otro tipo de estrategia para poder introducir diferentes grupos funcionales en la posición 2 de la bistiazolidina.

Se planteó la preparación de tiazolidinas sustituidas en posición 2, con el objetivo de enlentecer el segundo paso de ciclación y de esta manera poder aislar la tiazolidina intermedia para poder condensarla con diferentes aldehídos. Se eligió como sustituyente éster etílico porque había antecedentes en la preparación de este tipo de tiazolidinas¹³. Un posterior paso de ciclación permitiría preparar derivados bistiazolidina con distintos grupos funcionales en posición 2 y con un éster etílico en posición 5. A estos derivados los llamaremos bistiazolidinas-**11** (BTZ-**11**).

3.3.1. Análisis retrosintético de las bistiazolidinas-**11**

Las BTZ-**11** planteadas pueden ser sintetizadas a partir de la condensación de las tiazolidinas **13** con los aldehídos **12**, ver Figura 7. Los aldehídos van a proveer el grupo R^2 capaz de coordinar con los iones Zn^{2+} del sitio activo de M β L, ejemplos de R^2 serían: $-CH_2SH$, $-CHF_2$ y $-CH_2SO_3H$.

Las tiazolidinas **13** se pueden preparar a partir de la condensación de aminotioles y la mercaptocetonas, ver Figura 7. Los aminotioles de partida van a aportar dos variables estructurales al biciclo, como es la estereoquímica del C8 del biciclo dependiendo si son L o D aminotioles y las cadenas R^1 del biciclo siendo $R^1 = H$ si se parte de Cys o $R^1 = Me$ al partir de PNA.

La mercaptocetona necesaria se encuentra en la forma dimérica como ditiano **14**, puede prepararse a partir del α -bromopiruvato de etilo **15** utilizando hidrosulfuro de sodio (NaSH) para sustituir al bromo, ver Figura 7.

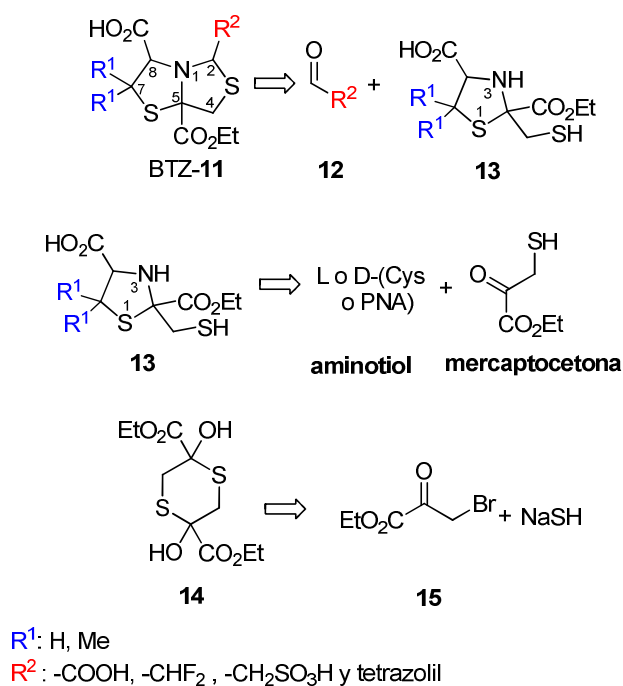


Figura 7. Análisis retrosintético de las bistiazolidinas-11.

3.3.2. Síntesis del ditiano 14

Para la preparación del ditiano **14** se utilizaron dos rutas sintéticas descritas en literatura, ver Figura 8^{13, 14}.

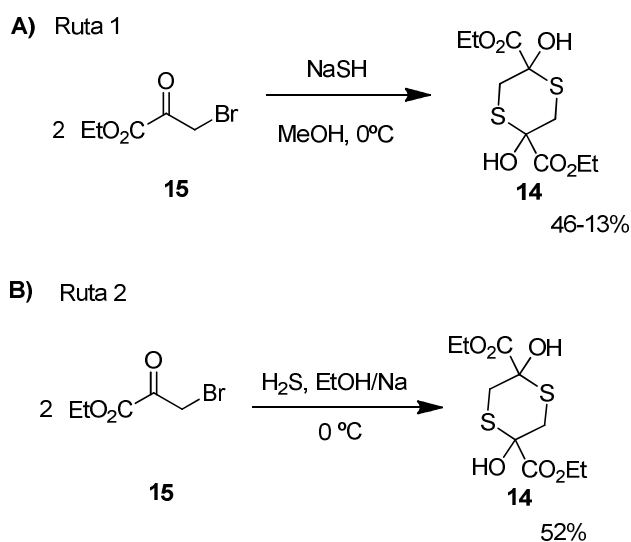


Figura 8. Rutas sintéticas del ditiano **14**. **A)** Ruta 1 de Patterson y col.¹³ **B)** Ruta 2 de Taylor y col.¹⁴.

Estas emplean un método directo utilizando un halogenuro de alquilo y un sulfuro metálico, en donde se sustituye el halogenuro por azufre. Si bien es una metodología rápida, tiene como inconveniente la formación de tioéteres debido a la elevada reactividad del tiol^{15, 16}. En la metodología de Patterson (ruta 1) se utiliza la sal NaSH como fuente de S^{2-} ¹³, la cual se purifica previamente a su uso, realizando lavados con EtOH y Et₂O, ver Figura 9¹⁷. Se prepara una suspensión de NaSH (1.1 eq) en MeOH que se enfría con baño de hielo y se agrega a una solución de etil bromopiruvato (1 eq) en MeOH, también en baño de hielo. El mejor rendimiento obtenido fue de 46%, pero intentos posteriores de síntesis dieron rendimientos menores de 13%. La principal dificultad de la metodología de Patterson es su baja reproducibilidad.

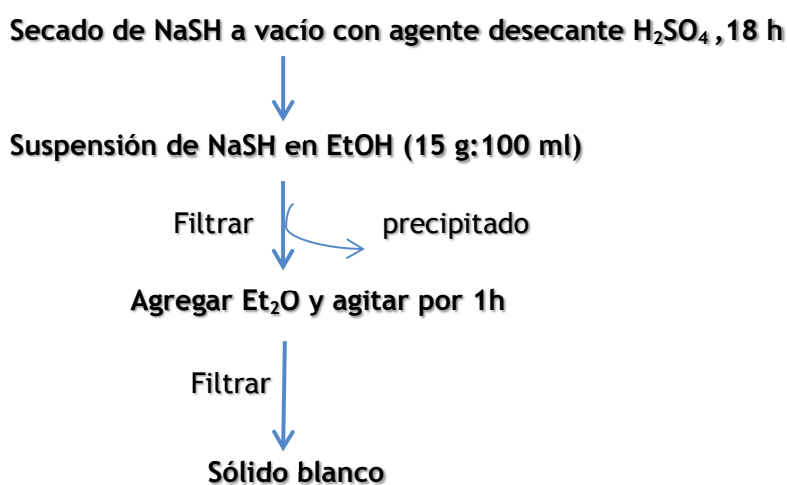


Figura 9. Esquema de purificación de NaSH.

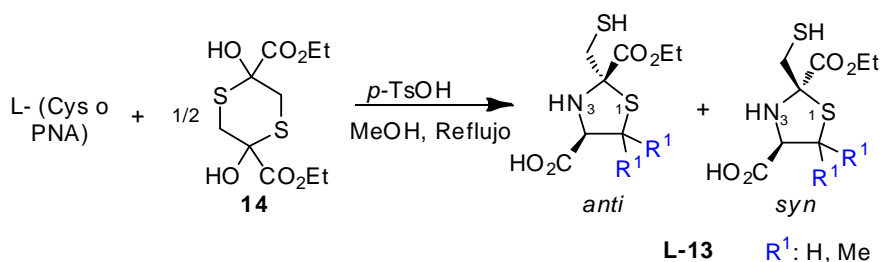
La baja reproducibilidad de la ruta 1 se atribuye en parte a la inestabilidad de la sal NaSH ya que se descompone a pesar de los cuidados de almacenamiento, siendo crucial el tiempo en que se realiza la purificación de la misma. Por este motivo se eliminó el secado previo a la purificación de NaSH, lo que permitió una reacción más reproducible pero igualmente con rendimiento bajo, en el entorno del 25-28%. Se probaron otras condiciones de reacción, como agregar 2 equivalentes de la sal, cambios en el volumen del solvente e inversión en el orden de agregado de los reactivos,¹⁷ pero no se logró obtener mejores resultados. Los parámetros más críticos para esta reacción son el orden y la velocidad de agregado, además de la baja temperatura.

En la metodología de Taylor (ruta 2) la sal NaSH se forma *in situ*, haciendo barbotar H₂S (g) sobre una solución de NaOEt (1.3 eq). Esta misma solución se enfría y se agrega a una solución de etil bromopiruvato (1 eq) en EtOH a 0 °C¹⁴. En este caso se obtuvo al ditiano **14** con un rendimiento del 52%. Si bien se obtuvo el compuesto deseado con un buen rendimiento, la ruta 2 tiene como desventaja la necesidad de producir H₂S gas, lo que la vuelve una ruta más laboriosa respecto a la ruta 1. Por esta razón se eligió la ruta 1 para la síntesis del ditiano **14**. Se debe destacar que el

compuesto **14** siempre se obtiene bajo forma dimérica cíclica o ditiano y no como mercaptocetona¹⁸.

3.3.3. Síntesis de tiazolidinas **13**

Luego de la puesta a punto de la síntesis del ditiano **14**, se prepararon dos derivados tiazolidinas **13a-b** y sus enantiómeros correspondientes. La síntesis se realizó de acuerdo a los antecedentes del grupo^{19, 20}, ver Tabla 1. La reacción de condensación del aminotiol de partida (Cys o PNA) con el ditiano **14** se llevó a cabo en MeOH a reflujo y ácido *p*-TsOH como catalizador, ver Tabla 1.



Compuesto	Aminotiol	R ¹	Reflujo (h)	*Rendimiento (%)	**r.d. (anti:syn)
Serie L					
L-13a	L-Cys	H	8	38	65:35
L-13b	L-PNA	Me	3	49	60:40
Serie D					
D-13a	D-Cys	H	2	48	57:43
D-13b	D-PNA	Me	2	42	55:45

*Rendimiento de la tiazolidina **13** mayoritaria, **r.d.: relación diastereomérica según la integración de señales independientes en el ¹H RMN del crudo de reacción.

Tabla 1 Secuencia sintética y condiciones de reacción de las tiazolidinas **13a-b**.

En la Tabla 1 las tiazolidinas **13a** y **13b** se agrupan en serie L o D, de acuerdo a la configuración absoluta del aminotiol de partida. La secuencia sintética de la Tabla 1 muestra únicamente la serie L de las tiazolidinas **13a-b** y se señalan las posibles configuraciones relativas de los derivados preparados.

Las cuatro tiazolidinas se obtuvieron con rendimientos de moderados a buenos (38%-42%) y con una r.d. *anti:syn* promedio de 60:40, ver Tabla 1. Se realizaron otros intentos de síntesis cambiando

el disolvente de reacción a EtOH, MeCN y CH₂Cl₂, pero se obtuvieron rendimientos menores. En particular, con los dos últimos solventes se recuperó mayoritariamente el material de partida.

La configuración absoluta del diastereómero mayoritario L-**13a** se pudo determinar por difracción de rayos X de monocristal, ver Figura 10. La misma fue asignada como como *anti*-L-**13a** (2*S*, 4*R*) ya que la cadena que contiene el tiol se encuentra en posición *anti* con respecto al ácido carboxílico en posición 4.

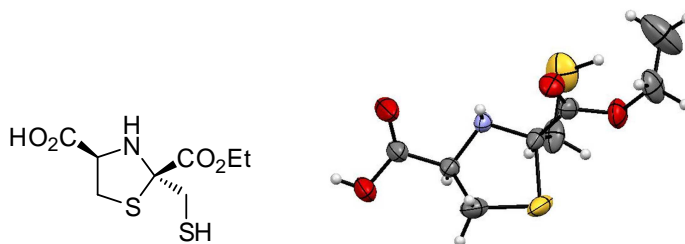


Figura 10. ORTEP. Estructura molecular del compuesto *anti*-L-**13a** obtenida a partir de difracción de rayos X de monocristal.

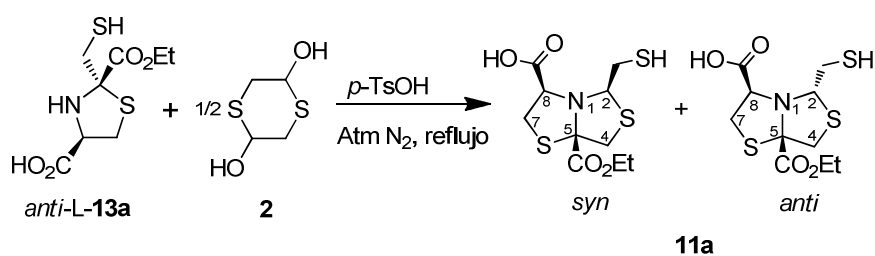
Los diastereómeros de la tiazolidina L-**13b** son aceites, por lo que no se pudo determinar la configuración por difracción de rayos X. Se realizaron estudios de NOESY unidimensional para el diastereómero mayoritario de L-**13b**, pero no se logró determinar su configuración relativa. Por esta razón al considerar su analogía estructural con la tiazolidina **13a**, se propuso la configuración absoluta del diastereómero mayoritario como *anti*-L-**13b** (2*S*, 4*R*).

3.3.4. Síntesis de bistiazolidinas **11** (BTZ-**11**)

Las tiazolidinas **13** preparadas contienen la cadena mercaptometil en posición 2, necesaria para formar el segundo anillo de tiazolidina al condensarse con otro aldehído. Esta reacción de condensación para obtener este tipo de bistiazolidinas no se encuentra descrita en literatura, por lo que se ensayaron distintas condiciones de reacción. En todas ellas se utilizó catálisis en medio ácido, ya que la catálisis básica favorecería la formación del puente disulfuro de los derivados BTZ-**11** que contienen un grupo tiol.

1) Síntesis de la serie L del mercaptometil derivado: bistiazolidina **11a**

La bistiazolidina **11a** es análogo de la L-BTZ-**1a**, ya que contiene el sustituyente mercaptometil en posición 2. La misma se preparó con el fin de evaluar si el éster etílico en la posición 5 favorece o no la actividad frente a las MβL. El compuesto BTZ-**11a** se sintetizó mediante la condensación de la tiazolidina *anti*-L-**13a** y el ditiano **2**, este último se obtiene comercialmente, ver Tabla 2.



Entrada	Condiciones		Rendimiento 11a (%)	* r.d. (syn:anti)
	Solvente	T (°C)		
1	PhMe	3 h a 70	Mc	
2	MeCN	4 h a reflujo	Mc	
3	CH ₂ Cl ₂	10 h a reflujo	53	67:33

* r.d.: relación diastereomérica según la integración de señales independientes en el ¹H RMN del crudo de reacción, mc: mezcla compleja.

Tabla 2. Secuencia sintética y condiciones de reacción de la bistiazolidina **11a**.

De acuerdo a nuestra experiencia en este tipo de sistemas, el calentamiento es necesario para favorecer la despolimerización del dímero **2** a β-mercaptoaldehído y también la ciclación del producto ¹⁹. Se evaluaron distintas condiciones de reacción, ver Tabla 2.

Primero se utilizó PhMe como disolvente, calentando a 70 °C por 3 h, pero en estas condiciones se observó la descomposición del material de partida, ver entrada 1, Tabla 2. Por esta razón se ensayaron otros disolventes más polares y de menor punto de ebullición. Al utilizarse MeCN a reflujo por 4 h no se logró la formación de **11a** y se recuperó parte del material de partida **13a** y otros productos de descomposición, ver entrada 2, Tabla 2. Al emplearse CH₂Cl₂ durante 10 h de reflujo se obtuvo el producto deseado de **11a** con un rendimiento del 53% y una r.d. *syn:anti* 67:33, ver entrada 3, Tabla 2.

Al realizar la purificación del crudo de reacción sólo se aisló el diastereómero mayoritario *syn*-L-**11a** puro, el minoritario por el contrario siempre se obtuvo impuro a pesar de realizarse varios intentos de purificación. Al ser ambos diastereómeros aceites no se pudo determinar la configuración absoluta por rayos X.

Se intentó determinar las estereoquímicas relativas del *syn* y *anti*-**11a** mediante estudios de NOESY unidimensionales pero no se obtuvieron resultados concluyentes, ya que únicamente se observaron acoples escalares entre protones vecinos. Por esta razón no se pudo asignar la configuración relativa de estos biciclos por esta metodología.

Teniendo en cuenta la experiencia previa en la preparación de bistiazolidinas, así como también la configuración absoluta de la tiazolidina de partida (*anti*-L-**13a**), se propone para el diastereómero

mayoritario la configuración *syn*-L-**11a** (2*R*, 5*S*, 8*R*) y para el diastereómero minoritario la *anti*-L-**11a** (2*S*, 5*S*, 8*R*). Estas configuraciones deberían ser confirmadas por estudios posteriores, como por ejemplo derivatizar a **11a** para obtener cristales y poder resolver su estructura por difracción de rayos X.

2) Síntesis de la serie D del mercaptometil derivado: bistiazolidina **11b**

El compuesto **11b** es enantiómero de **11a**, siendo análogo de D-BTZ-**1a** con las mismas sustituciones en posición 2 y 8, pero presentando un sustituyente -COOEt en posición 5. Para la síntesis de la **11b** se procedió de manera análoga a la síntesis de **11a**, ver Figura 11.

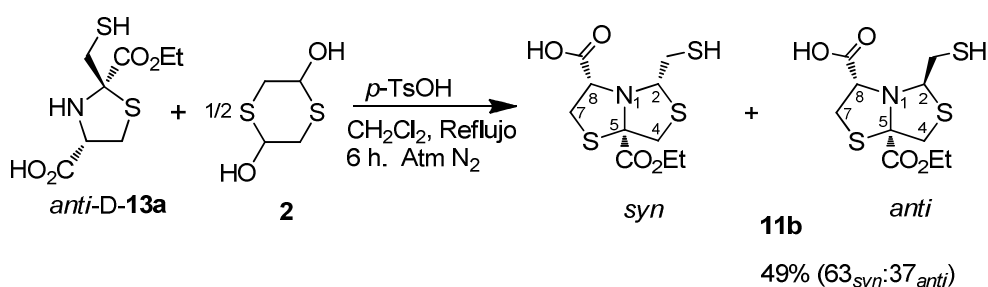


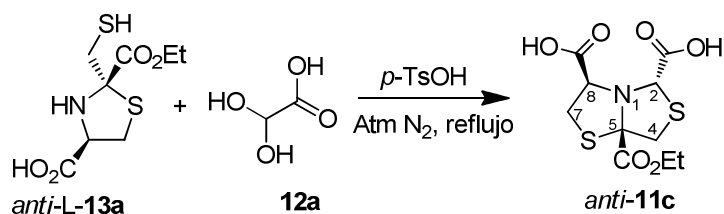
Figura 11. Secuencia sintética y condiciones de reacción de la bistiazolidina **11b**.

Se obtuvo a **11b** con un rendimiento del 49% y una r.d. *syn:anti* de 63:37, similar a la obtenida para su enantiómero BTZ-**11a**. La propuesta de la configuración relativa de ambos diastereómeros se indica en la Figura 11, se propusieron en base a las mismas consideraciones que para su enantiómero BTZ-**11a**.

3) Síntesis del derivado diácido: bistiazolidina **11c**

El derivado **11c** presenta un ácido carboxílico en posición 2 como grupo de remplazo del mercaptometil. El diácido **11c** se diseñó debido a que el grupo -COOH adicional podría coordinar con Zn^{2+} al tener en cuenta que el grupo carboxilato de BTZ-**1a** (primera serie sintetizada) es el responsable de la interacción con el Zn^{2+} de la enzima Sfh-1².

La BTZ-**11c** se sintetizó a partir de la condensación de la tiazolidina *anti*-L-**13a** y el ácido glioxílico **12a**, catalizada en medio ácido con *p*-TsOH. Se utilizaron distintas condiciones de reacción, las cuales se muestran en la Tabla 3.



Entrada	Condiciones			Rendimiento <i>anti-11c</i> (%)
	Solvente	Reflujo	Aditivo	
1	MeOH	5 h	Tamices A4	-
2	CH ₃ CN	45 min	Tamices A4	-
3	PhH	2 h	Dean-Stark	5%
4	PhH	5 h	Dean-Stark	3%

Tabla 3. Secuencia sintética y condiciones de reacción de la bistiazolidina **11c**.

Teniendo en cuenta que el aldehído de partida **12a** es hidrato y que además durante la reacción de condensación se generan moléculas de agua, se ensayaron condiciones de reacción que permitieran quitar el agua del medio y así desplazar el equilibrio hacia el producto deseado. En los primeros intentos de síntesis se utilizó MeOH y MeCN como disolventes de reacción y tamices moleculares para eliminar el agua del medio, pero no se obtuvo el producto deseado, ver entradas 1 y 2, Tabla 3. Finalmente la BTZ-**11c** se obtuvo utilizando PhH a reflujo por 2 h, provisto con trampa de Dean-Stark para la remoción del agua del medio de reacción, ver entrada 3, Tabla 3. En dichas condiciones se obtuvo a *anti-11c* con un rendimiento del 5%, es importante destacar que no se logró identificar la presencia de mezcla diastereomérica en el crudo de reacción y únicamente se aisló a *anti-11c*.

El Dean-Stark también se puede utilizar con PhMe en lugar de PhH, pero en éste caso se desestimó su uso debido a su alto punto de ebullición ya que puede favorecer la dimerización de la tiazolidina de partida **13a**. Al aumentar el tiempo de reflujo a 5 h no se logró mejorar el rendimiento, ver entrada 4, Tabla 3.

La configuración absoluta de *anti-11c* se pudo determinar por difracción de rayos X de monocristal, asignándose como (2*S*, 5*S*, 8*R*), ver Figura 12.

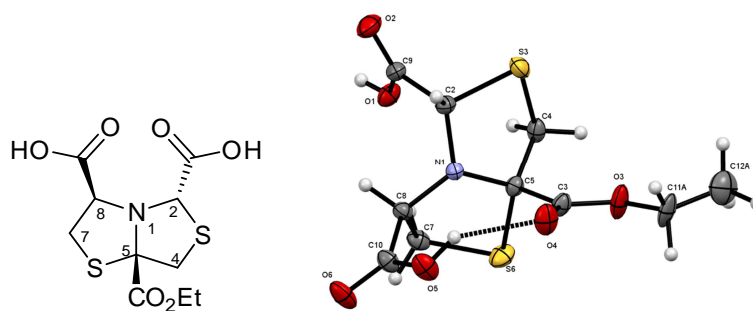


Figura 12. ORTEP. Estructura molecular de la bistiazolidina *anti*-**11c** obtenida a partir de difracción de rayos X de monocristal. El enlace de hidrógeno se representa con línea punteada negra.

En la estructura cristalina de **11c** se observa una interacción por puente de hidrógeno entre el hidroxilo del ácido carboxílico y el carbonilo del éster del bicyclo. La cadena del éster presenta libre rotación en el bicyclo, por lo que se observan dos posiciones en el cristal pero en la estructura cristalina sólo se muestra una de ellas.

4) Síntesis del difluorometil derivado: bistiazolidina **11d**

La bistiazolidina **11d** presenta un grupo $-\text{CHF}_2$ en posición 2 como remplazo del grupo tiol. Para sintetizar **11d**, primero se preparó el difluoro acetaldehído **12b** por reducción del ácido difluoroacético utilizando LiAlH_4 (1 eq), ver Figura 13²¹.

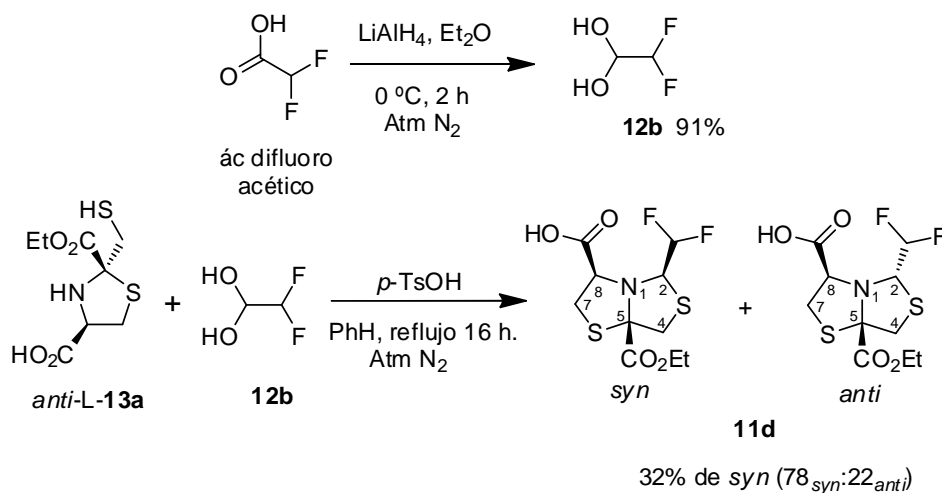


Figura 13. Secuencia sintética y condiciones de reacción de la bistiazolidina **11d**.

El acetal **12b** se extrae de una mezcla agua:éter y es utilizado sin purificar, el rendimiento del crudo de reacción fue del 91%.

Luego se realiza la condensación del acetal **12b** con la tiazolidina *anti*-L-**13a**, utilizando PhH a reflujo 16 h y trampa Dean-Stark. Estas condiciones de reacción se eligieron en base a la síntesis de la BTZ-**11c** debido a que también en este caso el aldehído de partida está bajo forma de hidrato. Se obtuvo **11d** con una r.d. *syn:anti* 78:22, según la integración de señales independientes en el ^1H RMN del crudo de reacción. Al purificar el crudo de reacción se obtuvo al diastereómero mayoritario *syn*-**11d** con rendimiento del 32%.

En este caso se obtuvieron cristales del diastereómero minoritario de **11d**, por lo que se pudo determinar su configuración absoluta por difracción de rayos X de monocristal. La misma se asignó como *anti*-**11d** (*2S, 5S, 8R*), ver Figura 14.

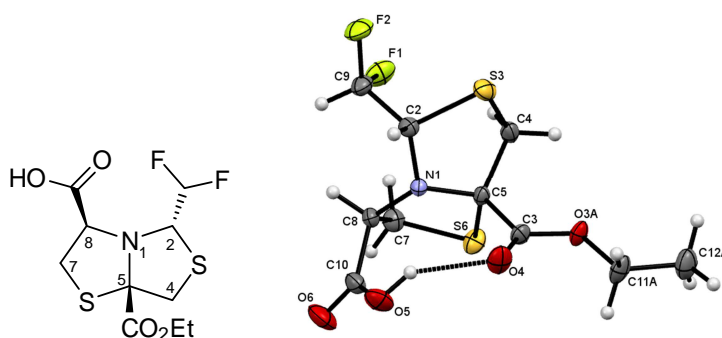


Figura 14. ORTEP. Estructura molecular de *anti*-**11d** obtenida a partir de difracción de rayos X de monocristal. Se representa el enlace de hidrógeno con línea punteada negra.

En la estructura cristalina se visualiza nuevamente el puente de hidrógeno entre el grupo -COOH y el -CO₂Et del biciclo. También se muestra una de las dos posibles posiciones del grupo éster etílico, ver Figura 14. En base a la estereoquímica del diastereómero minoritario (*anti*-**11d**) se propuso la estereoquímica del isómero mayoritario como *syn*-**11d** (*2R, 5S, 8R*).

Datos espectroscópicos de ^1H y ^{13}C RMN de anti-11d

Los compuestos organofluorados tienen datos espectroscópicos de ^1H y ^{13}C RMN que son particularmente interesantes ya que presentan constantes de acoplamiento H-F y C-F ^{22, 23}. En particular, el derivado *anti*-**11d** presenta dos átomos de F geminales que son diastereotópicos. Esto se puede apreciar en el ^1H RMN de *anti*-**11d**, en donde H9 tiene una multiplicidad ddd con una constante de acoplamiento (*J*) diferente para cada átomo de F ($^2J_{\text{H-F}} = 55.6$ y 54.1 Hz) y una constante con su protón vecino H2 ($^3J_{\text{H-F}} = 1.6$ Hz), ver Figura 15. La señal de H9 se muestra amplificada en el espectro ^1H RMN, ver Figura 15. En el compuesto *anti*-**11d** los valores de las $^2J_{\text{H-F}}$ están de acuerdo a lo descrito en bibliografía, en el entorno de 50 Hz.

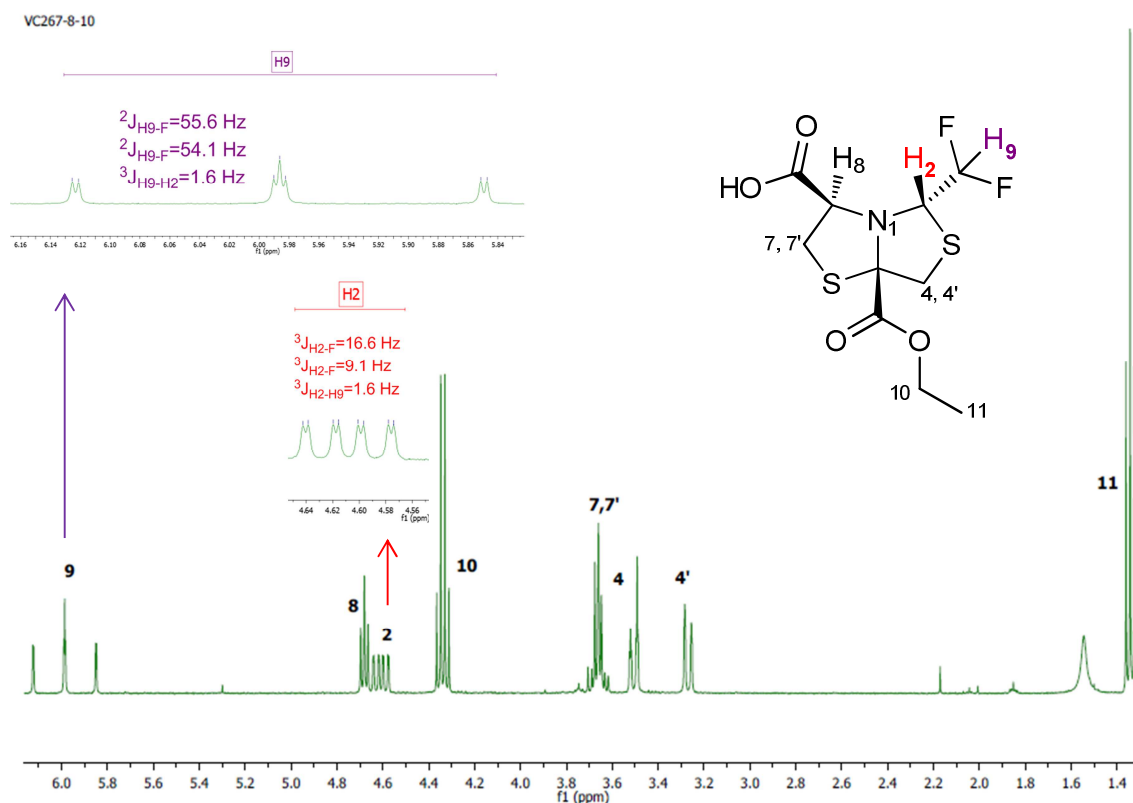


Figura 15. Espectro de ^1H RMN de *anti*-11d

Por otra parte el protón H2 de *anti*-11d tiene una multiplicidad ddd, presentando acoplamiento con los dos F geminales de C9 ($^3J_{\text{H-F}} = 16.6$ y 9.1 Hz) y con el protón vecino H9 ($^3J_{\text{H-F}} = 1.6$ Hz). Los valores de $^3J_{\text{H-F}}$ se encuentran dentro del rango descrito en bibliografía, de 0 a 50 Hz²³. Las señales de H2 se muestran amplificadas en el ^1H RMN de la Figura 15. Si bien los acoplamientos H-F se pueden observar hasta cuatro enlaces de distancia, para el compuesto *anti*-11d solo se ven para H2.

En los espectros de ^{13}C RMN también se observan los acoplamientos C-F, la multiplicidad de la señal depende del número de átomos de F presentes²². En el ^{13}C RMN de *anti*-11d se puede apreciar la multiplicidad para los carbonos C9 y C2 debido al acoplamiento con los dos átomos de flúor, ver Figura 16.

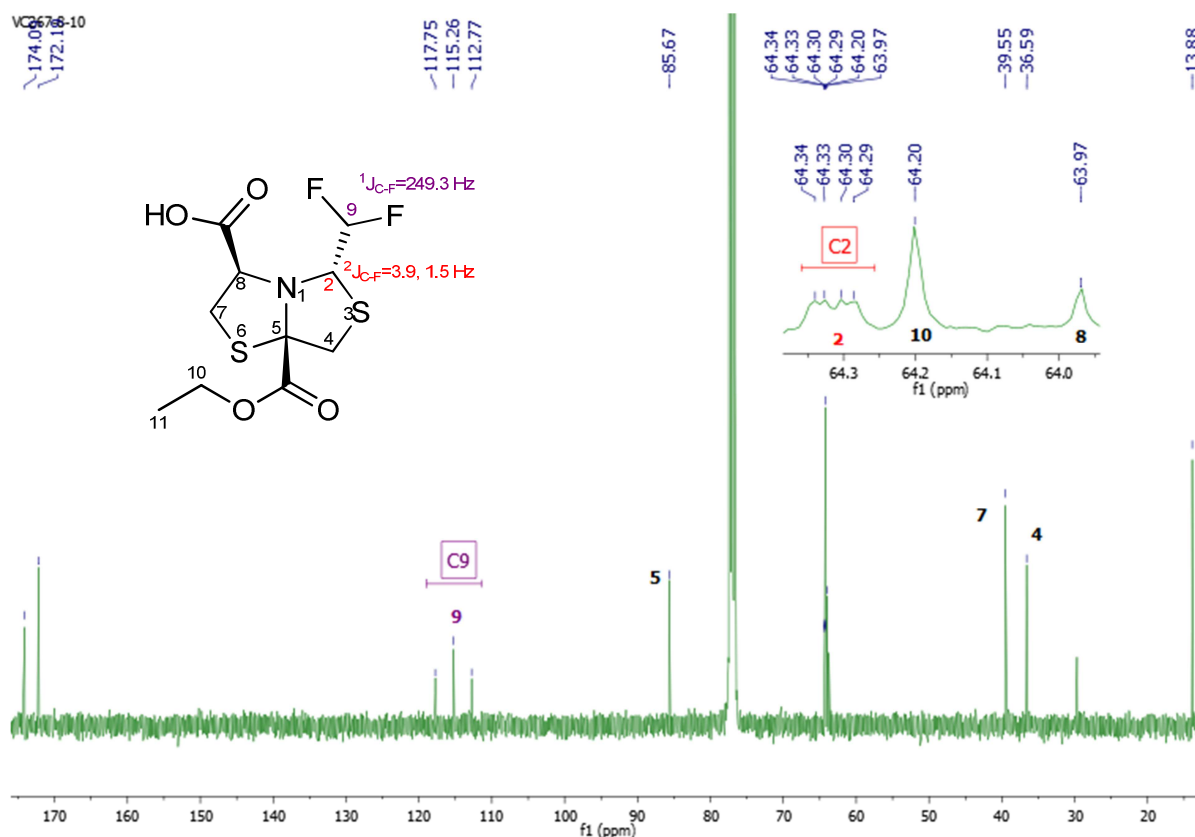


Figura 16. Espectro de ^{13}C RMN de *anti*-**11d**

La señal del C9 se observa como un triplete, con una $^1J_{\text{C-F}}$ de 249.3 Hz. El valor de $^1J_{\text{C-F}}$ está dentro del rango descrito en literatura de 250 a 300 Hz ²². El C2 tiene una multiplicidad de dd ($^2J_{\text{C-F}} = 3.9$ y 1.5 Hz), debido a que los átomos de flúor son diastereotópicos, ver Figura 16. La señal del C2 se muestra amplificada en el espectro de ^{13}C RMN, en donde también se aprecia el C10 y C8, ver Figura 16. Según bibliografía las $^2J_{\text{C-F}}$ están en el rango de 30-45 Hz, pero los valores para *anti*-**11d** son bastante menores $^2J_{\text{C-F}} = 3.9$ y 1.5 Hz. Esto se podría explicar por el entorno químico del C2, ya que se encuentra unido a dos heteroátomos electronegativos (N y S).

5) Síntesis del derivado metilsulfónico: bistiazolidina **11e**

La bistiazolidina **11e** presenta un grupo ácido metilsulfónico ($-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$) en posición 2 como remplazo del mercaptometil. Para la síntesis de BTZ-**11e** hubo que preparar el aldehído correspondiente mediante la hidrólisis del acetal **12c** para luego realizar la condensación con la tiazolidina *anti*-L-**13a**, ver Figura 17. Se llevó a cabo la hidrólisis en medio ácido del ácido-2-dietoxietansulfónico (**12c**) utilizando HCl 4 M o TFA en exceso, en ninguno de los dos casos se pudo aislar el producto deseado. Por esta razón se intentó realizar la hidrólisis utilizando TFA en

tándem a la reacción de condensación de la tiazolidina *anti*-L-**13a** para obtener a BTZ-**11e**, ver Figura 17.

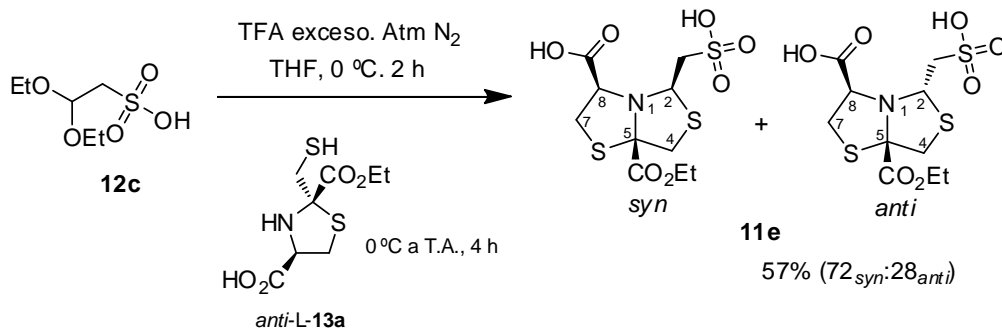


Figura 17. Secuencia sintética y condiciones de reacción de la bistiazolidina **11e**.

La dificultad que presenta el producto **11e** es su alta polaridad, según los valores teóricos de pKa que fueron estimados para **11e** utilizando la base datos de la página chemicalyze.org²⁴, el grupo sulfónico estaría bajo forma aniónica en un rango de pH 0 a 14, ver Figura 18 .

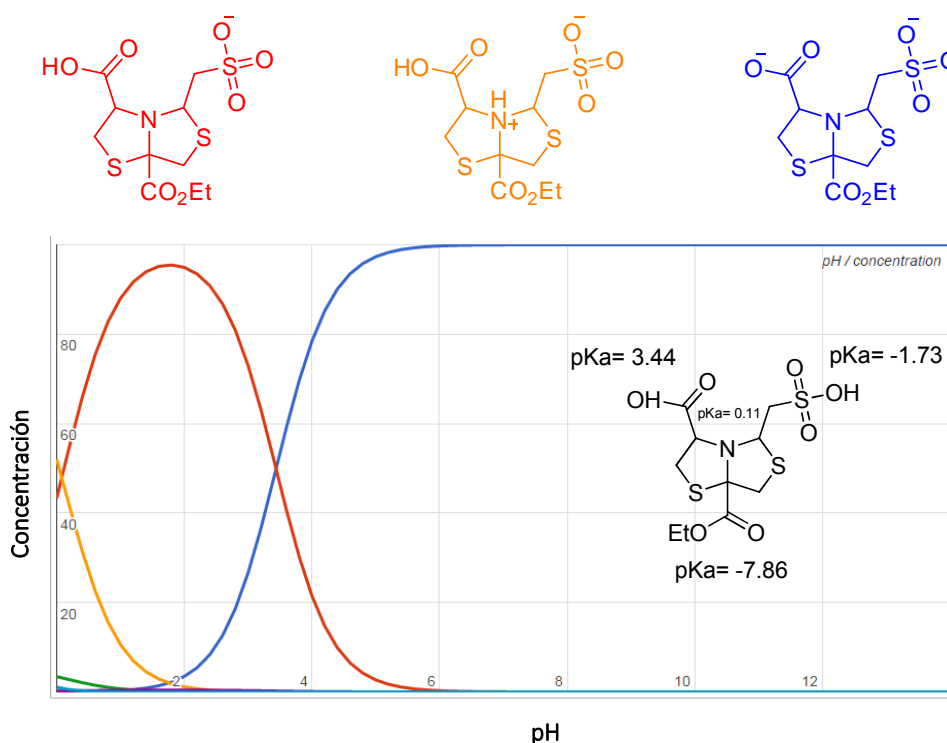


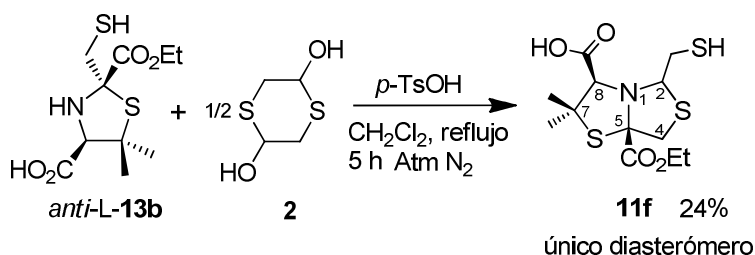
Figura 18. Predicción del equilibrio ácido-base de la bistiazolidina **11e**²⁴.

Teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas de **11e**, se ensayaron metodologías de purificación en fase reversa. Se intentó purificar por HPLC preparativa reversa pero no se logró

encontrar una fase móvil adecuada para la separación de las impurezas de **11e**. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando TLC preparativa reversa, con una fase móvil (MeOH:AcOH 10 mM) (5:95), a pH = 3.5. En estas condiciones se logró aislar a **11e** pero contaminado con acetato, en una relación AcOH:**11e** (3:1). Para evitar esta impureza se cambió el ácido de la fase móvil a HCl 3 mM, obteniéndose a **11e** con una r.d. *syn:anti* 72:28, según la integración de señales independiente en el ^1H NMR del crudo de reacción. Al purificar el crudo de reacción se aisló a **11e** en una mezcla diasteromérica 60:40 y con un rendimiento del 57%. La mezcla resultó ser un sólido blanco, pero no pudo ser recristalizado para su determinación estructural por rayos X. La configuración absoluta del diasterómero mayoritario fue propuesta como *syn-11e* (2*R*, 5*S*, 8*R*) y la del diasterómero minoritario como *anti-11e* (2*S*, 5*S*, 8*R*), por analogía con el derivado BTZ-**11d**.

6) Síntesis del mercaptometil derivado con gem-dimetilo: bistiazolidina **11f**

Se preparó el derivado **11f** análogo de la BTZ-**1b**, ya que presenta el grupo mercaptometil en posición 2 y el *gem*-dimetilo en posición 7. Estos compuestos se diferencian en el sustituyente del C5, que pasa de H a CO₂Et en **11f**. Para la síntesis de la BTZ-**11f** se llevó a cabo una reacción de condensación entre la tiazolidina *anti*-L-**13b** y el ditiano **2**, en distintos solventes ver Tabla 4.



Entrada	Condiciones		Rendimiento (%)
	Solvente	Reflujo (h)	
1	CH ₂ Cl ₂	5	24
2	MeCN	4	Mc
3	MeOH	4	Mc

mc: mezcla compleja

Tabla 4. Secuencia sintética y condiciones de reacción de la bistiazolidina **11f**.

La primera condición utilizada para preparar a **11f** fue usando CH₂Cl₂ a reflujo por 5 h, aislándose un solo diasterómero de **11f** con un rendimiento del 24%, ver entrada 1, Tabla 4. Al considerar el espectro de ^1H RMN del crudo de reacción no se logró identificar la presencia de mezcla diasteromérica debido a la complejidad de las señales. El producto **11f** resultó ser un compuesto inestable, de difícil purificación. A pesar de sucesivos intentos no se logró mejorar la pureza del

producto aislado. Por esta razón se probaron otras condiciones de reacción para obtenerlo, pero no se logró identificar la formación del biciclo de interés, ver entrada 2 y 3, Tabla 4.

Para el derivado **11f** se propuso la estereoquímica del C5 como (*S*) ya que es la configuración que fue propuesta para la tiazolidina de partida (*anti*-L-**13b**), ver Tabla 4. Por otro lado los derivados BTZ-**11c** (-CO₂H) y **11d** (-CHF₂) presentan esta configuración en C5, las cuales fueron asignadas por rayos X. Para el centro asimétrico C2 del biciclo **11f** no fue posible proponer una estereoquímica debido al corrimiento químico del C2, este criterio se describirá más adelante.

7) Síntesis del difluorometil derivado con gem-dimetilo: bistiazolidina **11g**

El compuesto **11g** presenta el grupo -CHF₂ en posición 2 como remplazo del grupo mercaptometil y además presenta el grupo gem-dimetilo en el C7. Para sintetizar la BTZ-**11g** se llevó a cabo una reacción de condensación entre la tiazolidina *anti*-L-**13b** y el acetal **12b**, ver Figura 19.

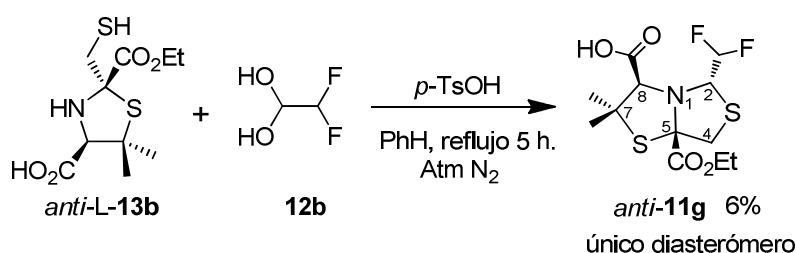


Figura 19. Secuencia sintética y condiciones de reacción de la bistiazolidina **11g**.

Las condiciones ensayadas para **11g** son análogas a las utilizadas para la síntesis de la BTZ-**11d**, pero la diferencia es que se utilizó un tiempo de reflujo de 5 h en vez de 16 h. Se aisló un solo diastereómero *anti*-**11g** con un rendimiento del 6%, la reacción no fue optimizada. Al observar el espectro de ¹H RMN del crudo de reacción no fue posible identificar la presencia de mezcla diastereomérica debido a la complejidad de las señales. La configuración relativa propuesta para el derivado *anti*-**11g** se muestra en la Figura 19. La estereoquímica del C5 se propuso como (*S*) de acuerdo a la configuración absoluta asignada por difracción de rayos X de su análogo **11d** (sin gem-dimetilo) y la estereoquímica de C2 como (*S*) de acuerdo a criterios que se describirán más adelante.

Discusión de las estereoquímicas relativas de las bistiazolidinas-11

Se pudo determinar la configuración absoluta a partir de rayos X de monocristal de dos derivados de bistiazolidinas-**11** preparadas, estas son el diácido *anti*-**11c** (-CO₂H) y el difluorometil **11d** (-CHF₂). Para el resto de las BTZ-**11** preparadas se propusieron las configuraciones relativas según lo

descripto para este tipo de heterociclos y los datos recabados por rayos X para este tipo de bistiazolidinas. Para la mayoría de las BTZ-**11** preparadas, los protones H2 y H8, que son los de interés para los estudios de NOESY unidimensional, se encuentran superpuestos o muy cercanos entre sí para poder ser irradiados independientemente, por lo que no fue posible determinar las configuraciones relativas con esta metodología. Por otra parte se intentó relacionar el desplazamiento químico del C2 (ppm) con la configuración absoluta del biciclo y así poder predecir la configuración del mismo. Se consideraron como valores de predicción los desplazamientos químicos del C2 de la primer serie de bistiazolidinas, en particular BTZ-**1b** y el derivado difluorometil BTZ-**11d** (-CHF₂), ya que son bistiazolidinas que presentan los datos espectroscópicos para ambos diasterómeros y cuyas configuraciones absolutas fueron determinadas por rayos X. Estos datos se recopilaron en la Tabla 5.

¹³ C RMN del C2 δ(ppm)			
Mercaptometil derivados -CH ₂ SH		Difluorometil derivados -CHF ₂	
<i>syn-1b</i>	<i>anti-1b</i>	<i>syn-11d</i>	<i>anti-11d</i>
75.7	70.3	73.2	64.3

Tabla 5. Las configuraciones absolutas asignadas por rayos X y su relación con los desplazamientos químicos del carbono 2 de las bistiazolidinas **1b** y **11d**.

Si se observa los desplazamientos químicos del C2 para un mismo compuesto, **1b** o **11d**, el isómero *syn* presenta mayor desplazamiento químico respecto al isómero *anti*, ver Tabla 5. Esta observación se podría extrapolar a las configuraciones absolutas propuestas para las BTZ-**11** y ver si está de acuerdo a esta propuesta. A continuación se muestra en la Tabla 6 los desplazamientos químicos del C2 para tres derivados de BTZ-**11**, cuyas configuraciones absolutas fueron propuestas.

¹³ C RMN del C2 δ(ppm)				
Mercaptometil derivados -CH ₂ SH		Metilsulfónico derivados -CH ₂ SO ₃ H		Difluorometil derivado -CHF ₂
<i>syn-11a</i>	<i>anti-11a</i>	<i>syn-11e</i>	<i>anti-11e</i>	<i>anti-11g</i>
70.9	69.3	67.4	63.2	62.6

Tabla 6. Las configuraciones absolutas propuestas y los desplazamientos químicos del carbono 2 de bistiazolidinas **11**.

Si se observan los desplazamientos químicos del compuesto mercaptometil **11a** (-CH₂SH), estos estarían de acuerdo con las configuraciones absolutas propuestas para ambos diasterómeros, ya que el isómero *syn* presenta el mayor δ para C2, ver Tabla 6. A pesar de ello no se puede considerar

a estas configuraciones como correctas debido a que los desplazamientos de los C2 de ambos diasterómeros son muy próximos entre sí.

En el derivado metilsulfónico **11e**, los desplazamientos del C2 para ambos diasterómeros concuerdan con las configuraciones absolutas propuestas, ver Tabla 6.

Si se compara el desplazamiento del C2 del derivado gem-dimetilo **11g** (-CHF₂), del que se aisló un sólo isómero, y su análogo sin gem-dimetilo **11d** (-CHF₂), del que se aisló ambos diasterómeros, se podría proponer que el derivado **11g** presenta una estereoquímica *anti*, ver Tabla 6 y 5. Para el derivado gem-dimetilo **11f** (-CH₂SH) no fue posible proponer la estereoquímica del C2 de acuerdo su desplazamiento químico (70.3 ppm) debido a que su análogo sin-gemdimetilo **11a** (-CH₂SH) tiene corrimientos químicos muy próximos entre ambos diasterómeros, ver Tabla 6.

En resumen, se prepararon siete nuevos derivados de bistiazolidinas-**11** con rendimientos variables del 5 al 57%. Los nuevos derivados bistiazolidinas-**11** fueron preparados a partir de una tiazolidina enantioméricamente pura. La reacción de formación de la bistiazolidina ocurre con la formación de un nuevo centro quiral en el C2 del bicyclo. Esto explica por qué la mayoría de las BTZ-**11** preparadas presentaron dos diasterómeros, con un promedio de r.d. *syn:anti* 70:30. En particular, en los derivados diácido **11c** (-COOH), gem-dimetilo **11f** (-CH₂SH) y gem-dimetilo **11g** (CHF₂) se aisló un único diasterómero y no se pudo identificar la presencia de mezcla diasterómerica debido a que las señales en el ¹H RMN del crudo de reacción fueron muy complejas.

3.3.5. Evaluación biológica

Los ensayos biológicos se realizaron en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario-Argentina (IBR-CONICET), en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, a cargo del Prof. Alejandro Vila. Los ensayos de inhibición *in vitro* se realizaron frente a dos subclases de MβL: NDM-1 (enzima di-zinc, subclase B1) y Shf-1 (enzima mono-zinc, subclase B2). Se evaluaron las tiazolidinas **13** (intermediarios de reacción) y las BTZ-**11** preparadas, la determinación del modo de inhibición de los compuestos de interés y sus constantes de inhibición (K_i) se realizó por seguimiento espectrofotométrico de la hidrólisis de imipenem (0-1700 μM) a una concentración fija de enzima de 0.1 nM, en ausencia y a distintas concentraciones de los compuestos a evaluar. Los estudios de la concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) se realizaron únicamente frente a NDM-1. Se calcularon las IC₅₀ a nivel enzimático (IC₅₀ NDM-1), según el seguimiento espectrofotométrico de la hidrólisis mencionado anteriormente. También se calcularon las IC₅₀ a nivel intracelular (IC₅₀ RMN), utilizando la metodología de monitoreo en tiempo real de la hidrólisis de imipenem en células de *Escherichia coli* por ¹H RMN²⁵.

Evaluación biológica de los derivados tiazolidinas 13 y la tiazolidina LC70 frente a NDM-1

Las tiazolidinas **13** preparados fueron evaluados frente a NDM-1 ya que poseen un grupo tiol libre y un ácido carboxílico. Además se evaluó la tiazolidina **LC70**, compuesto preparado por Lucía Castellano como parte de su trabajo de Licenciatura. Las tiazolidinas **13** y **LC70** ensayadas presentaron un modo de inhibición competitiva frente a NDM-1. Las constantes de inhibición K_i y los valores de IC_{50} se representan en la Tabla 7. En dicha tabla se agrupan las tiazolidinas **13** de acuerdo a la serie L o D que pertenecen.

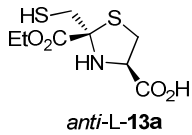
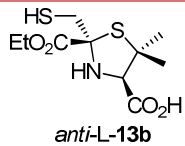
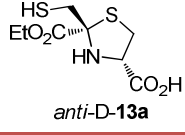
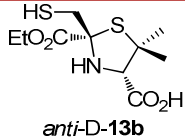
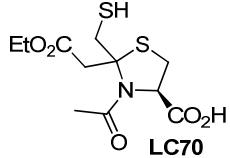
Entrada	Estructura	NDM-1	
		K_i (μ M)	IC_{50} (μ M)
Serie L tiazolidinas 13			
1	 <i>anti-L-13a</i>	5.20 ± 0.70	3.80 ± 0.79
2	 <i>anti-L-13b</i>	0.40 ± 0.06	0.88 ± 0.05
Serie D tiazolidinas 13			
3	 <i>anti-D-13a</i>	2.50 ± 0.40	9.00 ± 1.00
4	 <i>anti-D-13b</i>	1.52 ± 0.76	6.93 ± 2.53
Tiazolidina LC70			
5	 LC70	2.60 ± 0.60	10.00 ± 1.00

Tabla 7. Constantes de inhibición y concentración inhibitoria del 50% de las tiazolidinas serie L y D **13a-b** y la tiazolidina **LC70** frente a NDM-1.

Al observar los valores de K_i de las tiazolidinas ensayadas, se puede apreciar que todas ellas fueron activas en NDM-1. El compuesto **L-13b** presenta una $K_i = 0.4 \mu$ M, siendo el compuesto de mayor

afinidad frente a la enzima NDM-1 (menor K_i). Si se la compara con la BTZ-**1a** que presenta una $K_i = 7 \mu\text{M}$ en NDM-1, L-**13b** es 17 veces más activa.

Si comparamos los valores de K_i de las tiazolidinas **13** de la serie L (L-**13a** y L-**13b**), se observa que presentan una diferencia en un orden de actividad, siendo el derivado gem-dimetilo L-**13b** el que presenta mejor afinidad por la enzima, ver entrada 1 y 2, Tabla 7. Esto evidenciaría que el grupo gem-dimetilo es importante en el reconocimiento enzima-inhibidor, lo que en parte se podría justificar por la similitud estructural de L-**13b** con el producto de hidrólisis de la bencilpenicilina (BPN), ver Figura 20.

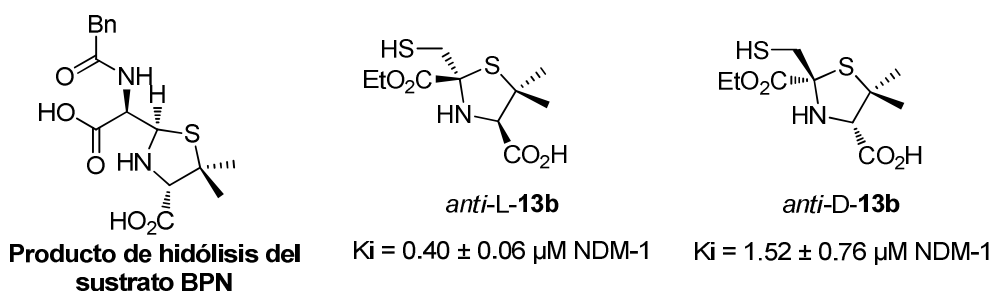


Figura 20. Comparación de la estructura del producto de hidrólisis de bencilpenicilina y la tiazolidina **13b** de la serie L y D.

Por otro lado las tiazolidinas de la serie D (D-**13a** y D-**13b**) tienen afinidades de unión similares entre sí con valores de K_i del mismo orden de actividad, ver entrada 3 y 4, Tabla 7.

La tiazolidina **LC70** presentó un comportamiento muy similar a D-**13a** con una $K_i = 2.6 \mu\text{M}$, ver entrada 3 y 5, Tabla 7. A diferencia de las tiazolidinas **13**, el compuesto **LC70** presenta el N acetilado y un metilencarboxilato de etilo ($-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$) en posición 2 de la tiazolidina. Sin embargo, estas variaciones estructurales no influyeron en la actividad inhibitoria, ya que **LC70** presentó una K_i del mismo orden de actividad que los derivados **13**.

Monitoreo en tiempo real de la serie L de las tiazolidinas 13

También se monitoreó en tiempo real la hidrólisis de imipenem en células *E. coli* que expresan el gen $bla_{\text{NDM-1}}$ en presencia de los compuestos L-**13a** y L-**13b**. Se determinó su IC_{50} por ^1H -RMN, los resultados de IC_{50} RMN fueron de $120 \mu\text{M}$ para L-**13a** y $1000 \mu\text{M}$ para L-**13b**, ver Figura 21.

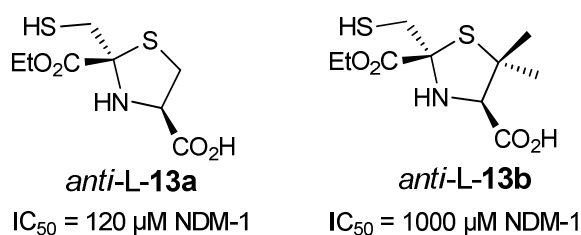


Figura 21. Concentración inhibitoria del 50% por RMN de la serie L de la tiazolidina **13a** y **13b** frente a NDM-1.

A pesar de que L-**13b** es el compuesto que presenta mejor interacción de unión con la enzima NDM-1 (menor K_i), a nivel intracelular no tiene muy buena actividad ya que presentó un IC_{50} RMN de $1000 \mu\text{M}$. Por otro lado, la tiazolidina L-**13a**, con una K_i 17 veces mayor respecto a L-**13b**, es mejor inhibidor intracelular ya que tiene una IC_{50} RMN de $120 \mu\text{M}$. Si se compara el valor de inhibición de la bistiazolidina BTZ-**1a** (IC_{50} RMN = $23 \mu\text{M}$) con L-**13a** (IC_{50} RMN = $120 \mu\text{M}$) se observa que **1a** tiene un valor cinco veces menor respecto a la tiazolidina. Estos resultados demuestran que ambos compuestos son capaces de inhibir a NDM-1 en el periplasma bacteriano.

*Evaluación de la serie L de las tiazolidinas **13a-b** frente a Sfh-1*

Las tiazolidinas **13** de la serie L presentaron buenos valores de K_i frente a Sfh-1, donde el compuesto L-**13a** presentó mejor afinidad por la enzima (K_i menor) que la tiazolidina L-**13b**, ver Figura 22.

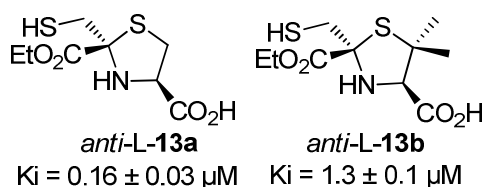


Figura 22. Valores de constantes de inhibición de la serie L de las tiazolidinas **13a-b** de frente a Sfh-1.

Es interesante ver que el valor de K_i de la tiazolidina L-**13a** es del mismo orden de actividad que para la BTZ-**1a** ($K_i = 0.26 \mu\text{M}$ en Sfh-1) de la primera serie de bistiazolidinas sintetizadas. Recientemente se han obtenido los rayos X del complejo Shf-1:L-**13a** en donde se observa que el grupo $-\text{SH}$ de la tiazolidina interacciona con el ion Zn^{2+} del sitio activo, ver Figura 23. Este modo de inhibición es diferente al observado para BTZ-**1a** ya que en este último es el grupo $-\text{COOH}$ del biciclo el que coordina con el Zn^{2+} de la enzima.

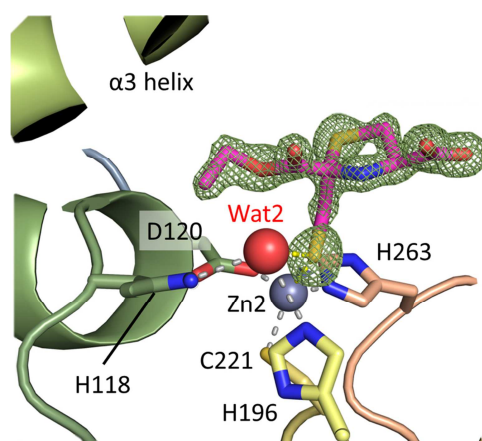


Figura 23. Estructura cristalina del complejo Shf-1:L-13a. La molécula de agua se representan como esferas de color rojo (Wat2) y el ion zinc se representan como esfera de color gris (Zn2). Los enlaces de hidrógeno y las interacciones de coordinación de los iones zinc se representan con línea punteada blanca. Los colores de los residuos aminoacídicos del sitio activo están dados por el tipo de átomo que representan. Esta figura se obtuvo a través de pymol (www.pymol.org).

Esto evidencia una nueva modo de unión frente a la enzima Sfh-1, mediante la interacción del grupo –SH con el ion Zn del sitio activo de la enzima.

Evaluación biológica de las bistiazolidinas-11 y la bistiazolidina LC59 frente a NDM-1.

Los derivados bistiazolidinas-11 preparados se evaluaron frente a NDM-1, al igual que la bistiazolidina LC59 preparado por la QF Lucía Castellano en su Licenciatura. Los valores correspondientes de K_i y IC_{50} se muestran en la Figura 24. En todos los casos el modo de inhibición de las bistiazolidinas ensayadas fue competitivo.

Si se observa en la figura 24 el compuesto 11a (análogo de BTZ-1a) tiene un valor de K_i de 8 μ M. El derivado 11a se preparó con el fin de evaluar si el grupo –CO₂Et en posición 5 influye en la actividad inhibitoria respecto a la observada en la primera serie de BTZ-1 sintetizadas. El análogo 1a presenta una K_i = 7 μ M por lo que se puede concluir que el éster en C5 no influye la actividad inhibitoria en NDM-1.

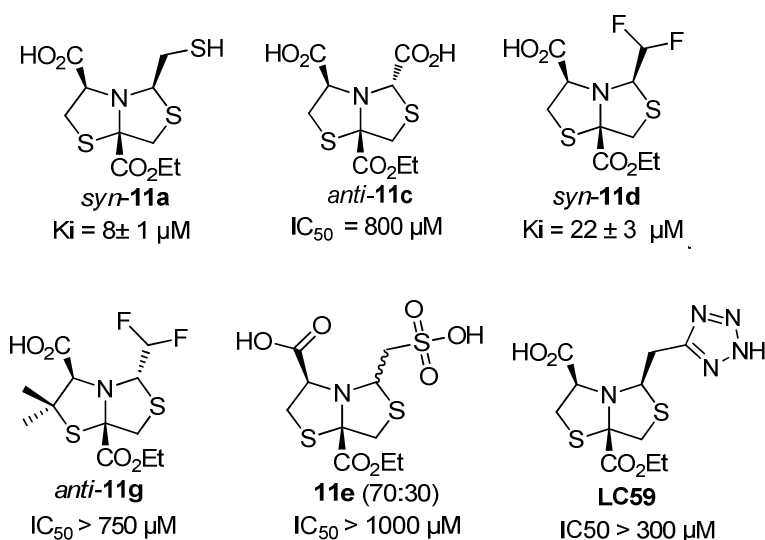


Figura 24. Resultados de los ensayos biológicos de las bistiazolidinas-**11** frente a NDM-1.

Por otro parte el resto de las bistiazolidinas preparadas que poseen grupos isómeros del tiol, no presentaron actividades inhibitorias importantes a excepción del derivado difluorometil **11d** ($K_i = 23 \mu\text{M}$), ver Figura 24. Se puede concluir que los cuatro isómeros preparados, $-\text{COOH}$, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ y tetrazolil, para remplazar al grupo tiol no fueron satisfactorios.

También se preparó un derivado diácido del tipo bisoxazolidina **16**, que presenta en posición 5 un grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ (ver síntesis en parte experimental), ver Figura 25. El compuesto **16** se evaluó frente a las M β L NDM-1 y Sfh-1 pero no presentó actividad inhibitoria.

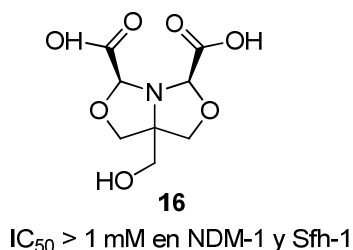


Figura 25. Estructura y resultado biológico de la bisoxazolidina **16**.

Al tener en cuenta el tipo de interacción de unión de la primera serie de bistiazolidinas-**1** con Sfh-1 (el grupo $-\text{COOH}$ coordina con el Zn^{2+} del sitio activo), se esperaba que los derivados diácidos fueran activos frente a esta enzima. Pero no fue lo observado para el compuesto **16**, como tampoco fue el caso del derivado diácido **11c**.

3.4. Conclusiones

Se logró desarrollar una metodología sintética para la obtención de heterociclos del tipo bistiazolidinas sustituidas en posición 2 con varios grupos funcionales diferentes al grupo tiol (-COOH, -CHF₂, -tetrazolil, CH₂SO₃H). Esto se consiguió al enlentecer el segundo paso de ciclación, al introducir un grupo carboxietil en posición 5 del heterociclo. De esta manera se prepararon siete derivados de bistiazolidinas-**11** con rendimientos de bajos a moderados (5-57%). En general se observó la presencia de dos diasterómeros principales con una r.d. promedio *syn:anti* 70:30. A su vez, esta metodología permitió aislar los intermedios de reacción, lográndose preparar dos tiazolidinas **13** y sus correspondientes enantiómeros. Estos cuatro derivados se obtuvieron con rendimientos moderados (38-42%) y una r.d. promedio *anti:syn* 60:40.

La BTZ-**11a** permitió demostrar que el grupo -COOEt en posición 5 no afecta la afinidad de unión por la enzima, pero no se pudo encontrar un grupo de remplazo que fuera más eficiente que el grupo tiol. Si bien con el grupo difluorometil (-CHF₂) se logró una cierta actividad inhibitoria, ésta no fue reproducible y no fue un buen inhibidor a nivel intracelular (IC₅₀ RMN > 1000 µM).

El mercaptometil derivado **11a** presenta una afinidad de unión frente a NDM-1 (K_i = 8 µM) del mismo orden que la BTZ **1a**, pero el derivado **11a** es más difícil de preparar y purificar que el anterior por lo que no ofrece ninguna ventaja adicional.

Las tiazolidinas intermedias **13** resultaron ser muy buenos inhibidores ya que todas presentaron actividades inhibitorias con K_i en el rango de 0.16-9.0 µM en NDM-1 y Sfh-1. En particular, la tiazolidina L-**13b** tiene una K_i = 0.4 µM en NDM-1, siendo 17 veces más activa que BTZ-**1a** (K_i = 7 µM en NDM-1). Estos resultados son prometedores por lo que se seguirá trabajando en la optimización de nuevos derivados con el fin de caracterizar completamente su comportamiento bioquímico e *in vivo*.

Bibliografía

- (1) González, 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 1. *Am. Chem. Soc. Infect. Dis.* **2015**, *1* (11), 544–554 DOI: 10.1021/acsinfecdis.5b00046.
- (2) Hinchliffe, P.; González, M. M.; Mojica, M. F.; González, 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- β -lactamase inhibition by bisthiazolidines reveals multiple binding modes Philip. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016** DOI: 10.1073/pnas.1601368113.
- (3) Faridoo; Islam, N. U. An Update on the Status of Potent Inhibitors of Metallo- β -Lactamases. *Sci. Pharm.* **2013**, *81*, 309–327 DOI: 10.3797/scipharm.1302-08.
- (4) Fast, W.; Sutton, L. D. Metallo-beta-lactamase: Inhibitors and reporter substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834* (8), 1648–1659 DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.04.024.
- (5) Toney, J. H.; Hammond, G. G.; Fitzgerald, P. M. D.; Sharma, N.; Balkovec, J. M.; Rouen, G. P.; Olson, S. H.; Hammond, M. L.; Greenlee, M. L.; Gao, Y. D. Succinic Acids as Potent Inhibitors of Plasmid-borne IMP-1 Metallo-beta-lactamase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (34), 31913–31918 DOI: 10.1074/jbc.M104742200.
- (6) Liénard, B. M. R.; Horsfall, L. E.; Galleni, M.; Frère, J. M.; Schofield, C. J. Inhibitors of the FEZ-1 metallo- β -lactamase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (4), 964–968 DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.11.053.
- (7) Toney, J. H.; Fitzgerald, P. M.; Grover-Sharma, N.; Olson, S. H.; May, W. J.; Sundelof, J. G.; Vanderwall, D. E.; Cleary, K. a; Grant, S. K.; Wu, J. K.; et al. Antibiotic sensitization using biphenyl tetrazoles as potent inhibitors of *Bacteroides fragilis* metallo-beta-lactamase. *Chem. Biol.* **1998**, *5* (4), 185–196 DOI: 10.1016/S1074-5521(98)90632-9.
- (8) Meanwell, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (8), 2529–2591 DOI: 10.1021/jm1013693.
- (9) Keiko, N. A.; Stepanova, L. G.; Verochkina, E. A.; Chuvashhev, Y. A. Synthesis and properties of alkylthioethanals. *Arkivoc* **2011**, No. 10, 127–138.
- (10) Carcel, C. M.; Laha, J. K.; Loewe, R. S.; Thamyongkit, P.; Karl-Heinz Schweikart, V. M.; David F. Bocian, J. S. L. Porphyrin Architectures Tailored for Studies of Molecular Information Storage. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (20), 6739–6750 DOI: 10.1021/jo0498260.
- (11) Cayley, A. N.; Gallagher, K. A.; Ménard-Moyon, C.; Schmidt, J. P.; Diorazio, L. J.; Taylor, R. J. K. Preparation of Novel Polycyclic Heterocycles Using a Tin(II) Chloride Dihydrate-Mediated

- Deacetalisation-Bicyclisation Sequence. *Synthesis (Stuttg)*. **2008**, No. 23, 3846–3856 DOI: 10.1055/s-0028-1083214.
- (12) Sharma, R. K.; Tam, J. P. Tandem Thiol Switch Synthesis of Peptide Thioesters via N–S Acyl Shift on Thiazolidine. *Org. Lett.* **2011**, 13 (19), 5176–5179 DOI: 10.1021/ol202047q.
- (13) Nagasawa, H. T.; Goon, D. J. W.; Crankshaw, D. L.; Vince, R.; Patterson, S. E. Novel , Orally Effective Cyanide Antidotes. *J. Med. Chem.* **2007**, 50 (26), 6462–6464 DOI: 10.1021/jm7011497.
- (14) Taylor, E. C.; Reiter, L. A. Studies on the Molybdenum Cofactor. An Unequivocal Total Synthesis of (+/-)-Urothione. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111 (1), 285–291 DOI: 10.1021/ja00183a043.
- (15) Wardell, J. L. Preparation of thiols. In *The Thiol Group*; Patati, S., Ed.; 1974; pp 163–269.
- (16) Choi, J.; Yoon, N. M. Synthesis of Thiols via Palladium Catalyzed Methanolysis of Thioacetates with Borohydride Exchange Resin. *Synth. Commun.* **1995**, 25 (17), 2655–2663 DOI: 10.1080/00397919508011812.
- (17) Tanabe, S.; Ogasawara, Y.; Nawata, M.; Kawanabe, K. Preparation of a Sulfurtransferase Substrate, Sodium 3-Mercaptopyruvate, from 3-Bromopyruvic Acid and Sodium Hydrosulfide. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37 (10), 2843–2845 DOI: 10.1248/cpb.37.2843.
- (18) Cooper, A. J.; Haber, M. T.; Meister, A. The Chemistry and Biochemistry of 3-Mercaptopyruvic Acid, the alpha-Keto Acid Analog of Cysteine. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257 (2), 816–826.
- (19) Saiz, C.; Castillo, V.; Fontán, P.; Bonilla, M.; Salinas, G.; Rodríguez-Haralambides, A.; Mahler, S. G. Discovering Echinococcus granulosus thioredoxin glutathione reductase inhibitors through site-specific dynamic combinatorial chemistry. *Mol. Divers.* **2013**, 18 (1), 1–12 DOI: 10.1007/s11030-013-9485-3.
- (20) Saiz, C.; Castillo, V.; Mahler, S. G. Imine Domino Reactions Generate Novel Scaffolds: Fused Bisthiazolidines or Bisthiiranes. *Synlett* **2012**, No. 7, 1090–1094 DOI: 10.1055/s-0031-1290621.
- (21) E.T. McBee, O. R. P. and C. G. H. Lithium Aluminum Hydride Reduction of Difluoroacetic Acid. *Proc. Indiana Acad. Sci.* **1954**, 64, 108–111.
- (22) Tamejiro Hiyama. General Introduction. In *Organofluorine Compounds: Chemistry and Applications*; Springer-Verlag, 1946; pp 14–18.
- (23) Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C. ¹³C NMR Spectroscopy. Halogen compounds. In *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*; Springer-Verlag, 2000; pp 112–116.

(24)

<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=O%3DC%28O%29%5BC%40H%5D1N2C%28CS%28%3DO%29%28O%29%3DO%29%28C%28OCC%29%3DO%29SC1&source=fp>.

(25) Ma, J.; Mcleod, S.; Maccormack, K.; Sriram, S.; Gao, N.; Breeze, A. L.; Hu, J. Real-Time Monitoring of New Delhi Metallo- beta -Lactamase activity in living bacterial cells by ¹H NMR Spectroscopy. *Angewandte* **2014**, 53 (8), 2130–2133 DOI: 10.1002/anie.201308636.

Capítulo 4

Conclusiones Generales y Perspectivas

4. Conclusiones generales y perspectivas

Conclusiones generales:

En este trabajo se realizó un diseño racional de inhibidores de MBL basado en la similitud estructural de bistiazolidinas con los antibióticos β -lactámicos, en particular con las penicilinas. Los heterociclos de bistiazolidinas presentan un grupo tiol y un ácido carboxílico capaces de coordinar con iones Zn^{2+} del sitio activo de la enzima.

Con este objetivo se desarrolló una nueva metodología para preparar bistiazolidinas BTZ-1 sustituidas con un ácido carboxílico en posición 8 y un mercaptometil en posición 2, ver Figura 1. Estos productos se prepararon en una secuencia en tándem con rendimientos de moderados a muy buenos (46-89%) y con altos excesos enantioméricos (95-100%).

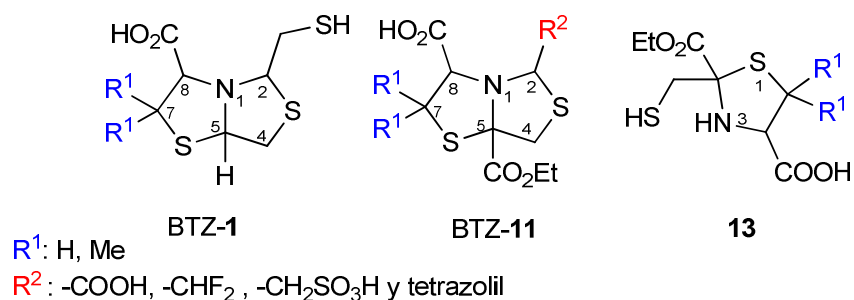


Figura 1. Estructura de las bistiazolidinas-1, bistiazolidinas-11 y tiazolidinas 13.

Se diseñaron nuevos derivados con el fin de evaluar la importancia del grupo tiol, bistiazolidinas BTZ-11. En base a este diseño se desarrolló una nueva metodología sintética. Las BTZ-11 son sustituidas en posición 2 con un grupo diferente al mercaptometil y que poseen un grupo éster en posición 5, ver Figura 1. Se prepararon siete derivados BTZ-11 sustituidos con diferentes grupos funcionales en posición 2: -COOH, -CHF₂, -CH₂SO₃H y tetrazolil.

Se caracterizó el modo de inhibición de la primer serie de bistiazolidinas (BTZ-1) frente a siete M β L pertenecientes a las tres subclases (B1, B2 y B3), obteniéndose K_i del orden μ M (0.26-84 μ M). Dentro de este grupo se encuentran las enzimas de relevancia en clínica NDM-1, IMP-1 y VIM-2 (B1).

Además, se demostró su capacidad inhibitoria *in vitro* frente a patógenos resistentes aislados de casos clínicos hospitalarios que expresan NDM-1 (B1) o L1 (B3).

Se pudo estudiar en profundidad las interacciones de unión enzima-inhibidor mediante la obtención de las estructuras cristalinas de estos complejos por difracción de rayos X (nueve complejos M β L:BTZ-1). El estudio de estos complejos dejó en evidencia cuatro modos de unión para este tipo de biciclos, destacándose la participación del tiol y el ácido carboxílico en

interacciones claves con la enzima ya sea coordinando iones Zn^{2+} o con residuos aminoacídicos del sitio activo.

Para la segunda serie de bistiazolidinas (BTZ-**11**) se logró demostrar que el grupo tiol es fundamental para la actividad inhibitoria. Si bien se observó que la sustitución en 5 con el grupo $-CO_2Et$ no influye en la interacción con las enzimas, no se logró identificar grupos capaces de remplazar al tiol en este tipo de sistemas.

Por otra parte las tiazolidinas **13**, intermediarios de síntesis de BTZ-**11**, fueron buenos inhibidores de M β L del orden μM (0.16-9.0 μM , en NDM-1 y Sfh-1), en donde el compuesto L-**13b** fue el más activo en ambas enzimas, ver Figura 1. El hecho de que los derivados tiazolidinas **13** son buenos inhibidores de estas enzimas es alentador ya que son compuestos mucho más sencillos de sintetizar y purificar, que las BTZ-**11**.

Si bien se demostró que el tiol es fundamental para la actividad, luego de realizar estudios de estabilidad de estas bistiazolidinas, se observó que estos compuestos son inestables ya que el $-SH$ se oxida fácilmente. Para evitar esto se preparó el derivado **1c**, acetilado a nivel del tiol, que resultó buen candidato a prodroga.

Perspectivas:

En resumen, se desarrollaron, sintetizaron y evaluaron nuevas bistiazolidinas con buena actividad inhibitoria en un amplio espectro de M β L pertenecientes a las tres subclases (B1, B2 y B3). Además de ser inhibidores enzimáticos, son inhibidores del crecimiento de patógenos aislados en casos clínicos hospitalarios al ser utilizados en combinación con A β L.

Los resultados obtenidos justificarían los esfuerzos para continuar la búsqueda de compuestos con mayor potencia en los ensayos *in vivo*. En este sentido la prodroga **1c** es un buen punto de partida para estudiar su comportamiento *in vivo*, evaluando si este derivado es capaz de desacetilarse y actuar en el periplasma bacteriano. Por otro lado restan por preparar y evaluar otro grupo de compuestos análogos a las bistiazolidinas pero remplazando el tiol por otros grupos funcionales, como ácido hidroxámico, hidroxamato reverso, $-CH_2COOH$, etc.

Por último, debido a que la actividad inhibitoria de las tiazolidinas **13** es muy prometedora, sería interesante evaluarlas frente a otras M β L y como inhibidores del crecimiento bacteriano. También sería interesante diseñar y desarrollar nuevos derivados tiazolidinas con otras sustituciones en el C2.

Capítulo 5

Parte Experimental

5. Parte experimental

5.1 Consideraciones generales

Disolventes y Reactivos

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de diferentes fuentes comerciales y utilizados sin previa purificación. Los disolventes fueron destilados previamente a su uso y los disolventes anhidros fueron secados de acuerdo a la bibliografía¹.

Cromatografía

El seguimiento de las reacciones y columnas cromatográficas se realizó por cromatografía en capa fina utilizando placas de sílica gel F254 de 0.25 mm (Macherey-Nagel, Polygram® SIL G/UV 254). La detección se realizó por luz UV ($\lambda = 254$ nm), vapores de I₂ o reveladores irreversibles por inmersión con posterior calentamiento. Los reveladores irreversibles utilizados fueron *p*-hidroxibenzaldehído (EtOH:H₂SO₄:PHB, 95:4:1), ácido fosfomolibdico (solución 10% en EtOH) y ninhidrina (solución al 5% en BuOH). La purificación de los crudos de reacción se realizó por columna cromatográfica con fase estacionaria sílica gel flash con partículas de 40 μ m diámetro (Merck grado 60, 230-400 mesh) y cromatografía en capa fina preparativa con fase estacionaria de sílica gel F-254 de 500 μ m (SAI, 20x20 cm) o sílica gel fase reversa C18, F-254 de 1000 μ m (SAI, 20x20 cm).

Puntos de fusión

Los puntos de fusión fueron determinados con los equipos Laboratory Devices Gallenkamp y Stuart Digital.

Espectrometría de masas

Las medidas de masa de baja resolución (MS) fueron realizadas en un espectrómetro de masas GCMS Shimadzu QP 1100-EX. Las medidas de masa de alta resolución (HRMS) fueron realizadas en un espectrómetro de masas MicroOTOF-Q (Bruker Daltonics) con ionización por Electro Spray (ESI).

Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en espectrómetros Bruker Avance (400 o 500 MHz ¹H RMN y 100 o 125 MHz ¹³C RMN) a 21 °C. Los desplazamientos químicos (δ) se informan en ppm y de la siguiente manera: multiplicidad (s=singulete, d=doblete, t=tripleto, q=cuarteto, m=multiplete), constantes de acoplamiento (*J*) que se expresan

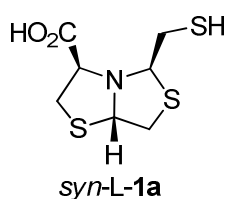
en Hz, e integración. La configuración relativa de los compuestos se estudió realizando experimentos de NOESY unidimensionales, utilizando un secuencia de pulso selnogg, D8 a 300 y 800 ms.

Difractómetro de Rayos X

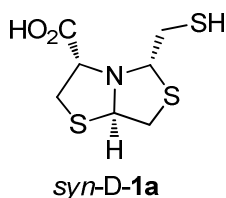
La estructura cristalina de los compuestos sintetizados se resolvió por difracción de rayos X de un monocristal a través de un difractómetro automático Bruker D8 Venture.

5.2 Síntesis

La preparación de **L-1a** es representativa de la síntesis de bistiazolidinas **1a-b**.

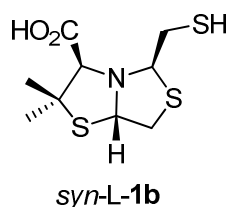


(2R,5S,8R)-8-Carboxil-2-mercaptopetil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (syn-L-1a). En un balón de dos bocas se disuelve con agitación L-cisteína (L-Cys: 0.5 g, 4.13 mmol) en MeCN de calidad HPLC (20ml), se agregan 1,4-ditiano-2,5-diol **2** (0.75 g, 4.96 mmol) y ác. *p*-TsOH (0.030 g, 0.17 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. Se lleva a reflujo por 2 h, luego de transcurrida la reacción se vuelca en solución saturada de NaCl y se extrae con CH₂Cl₂ (5x30ml). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna en SiO₂ con fase móvil Hex:AcOEt:AcOH (3:2:1%) para dar **syn-L-1a** (0.84 g, 86 %, *syn:anti* 95:5), como sólido blanco; PF 103–104 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.05 (dd, *J* = 5.8, 4.2, 1H), 4.32 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 7.1, 3.3, 1H), 3.55 (dd, *J* = 12.0, 5.8, 1H), 3.43 (dd, *J* = 11.4, 3.3, 1H), 3.33 (dd, *J* = 11.4, 7.1, 1H), 3.11 (dd, *J* = 12.0, 4.2, 1H), 2.81 (dd, *J* = 8.5, 6.9, 2H), 1.86 (t, *J* = 8.5, 1H_{SH}); ¹³C RMN (100 MHz, (CD₃)₂CO) δ 172.1, 75.6, 74.5, 71.5, 39.2, 34.3, 34.0; HRMS calculado para C₇H₁₁NO₂S₃, [M+H]⁺ 238.0025, valor encontrado: 238.0033; [α]_D = -57.7° (20 °C, MeCN, *c* = 0.6).

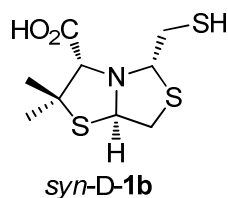


(2S,5R,8S)-8-Carboxil-2-mercaptopetil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (syn-D-1a). Se prepara y purifica de manera análoga a **syn-L-1a**, utilizando como aminotiol de partida la D-cisteína (D-Cys:

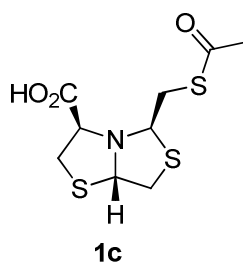
0.2 g, 1.65 mmol) para dar *syn*-D-**1a** (0.31 g, 80 %, *syn:anti* 95:5), como sólido blanco con las mismas propiedades espectroscópicas que L-**1a** y un $[\alpha]_D = +63.1^\circ$ (20 °C, +MeCN, $c = 0.6$).



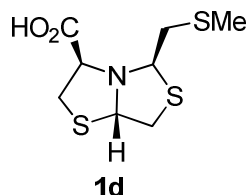
8-Carboxil-7-dimetil-2-mercaptopetil-1-aza-3,6-ditiobencilo[3.3.0]oc-tano (L-1b). Se prepara de manera análoga a *syn*-L-**1a**, utilizando como aminotiol de partida la L-penicilamina (L-PNA: 0.5 g, 3.35 mmol). Se obtiene a L-**1b** con una relación diastereomérica (r.d.) *syn:anti* 95:5. Se purifica por cromatografía en columna en SiO₂ con una fase móvil Hex:AcOEt (3:1) para dar **(2R,5S,8R)-syn-L-BTZ-1b** (0.79 g, 89 %), como sólido blanco; PF 89-97 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4.98 (dd, $J = 6.6, 5.4, 1H$), 4.31 (t, $J = 7.3, 1H$), 3.80 (s, 1H), 3.43 (dd, $J = 11.7, 6.6, 1H$), 3.06 (dd, $J = 11.7, 5.4, 1H$), 2.81 (m, 2H), 1.89 (t, $J = 8.7, 1H_{SH}$), 1.62 (s, 3H), 1.52 (s, 3H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 170.4, 78.5, 75.7, 68.7, 55.1, 40.5, 32.0, 28.1, 28.0; HRMS calculado para C₉H₁₆NO₂S₃, [M+H]⁺ 266.0343, valor encontrado 266.0330; $[\alpha]_D = -45.2^\circ$ (20 °C, MeOH, $c = 1.0$). **(2R,5R,8R)-anti-L-1b**, como aceite; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.07 (dd, $J = 8.1, 5.2, 1H$), 4.55 (dd, $J = 7.3, 5.7, 1H$), 3.97 (s, 1H), 3.38 (dd, $J = 10.1, 8.1, 1H$), 3.21 (dd, $J = 10.1, 5.2, 1H$), 2.66 (m, 1H), 2.87 (m, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.66 (dd, $J = 9.0, 8.3, 1H_{SH}$), 1.49 (s, 3H); ¹³C RMN (10 MHz, CDCl₃) δ 174.6, 77.0, 70.5, 70.1, 58.6, 40.5, 33.9, 32.9, 25.6.



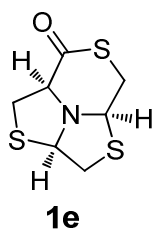
(2R,5S,8S)-8-Carboxil-7-dimetil-2-mercaptopetil-1-aza-3,6-ditiobencilo[3.3.0]oc-tano (*syn*-D-1b). Se prepara de manera análoga a *syn*-L-**1a**, utilizando como aminotiol de partida la D-penicilamina (0.2 g, 1.34 mmol) y disolvente de reacción EtOH. El compuesto *syn*-D-**1b** se obtiene como sólido blanco (0.27 g, 76 %, *syn:anti* 99:1). Presenta igual propiedades espectroscópicas que *syn*-L-**1b** y un $[\alpha]_D = +40.0^\circ$ (20 °C, MeOH, $c = 1.0$).



(2R,5S,8R)-8-Carboxil-2-(acetiltio)metil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (1c). En un balón de dos bocas se disuelve con agitación *syn*-L-**1a** (0.10 g, 0.42 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml) y se agrega Ac₂O (0.05 ml, 0.50 mmol), bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente y se mantiene la agitación durante 2 h. Luego de transcurrida la reacción ésta se vuelca en agua y se ajusta a pH = 3 con HCl 5%. Se extrae con CH₂Cl₂ (20 mlx5). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en SiO₂ con fase móvil Hex:AcOEt (2:1) para dar a **1c** (0.047 g, 40 %), como sólido blanco; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.07 (dd, *J* = 6.1, 4.2, 1H), 4.39 (dd, *J* = 5.9, 7.7, 1H), 4.17 (dd, *J* = 7.1, 2.9, 1H), 3.61 (dd, *J* = 12.0, 6.1, 1H), 3.42 (dd, *J* = 11.4, 2.9, 1H), 3.32 (dd, *J* = 11.4, 7.1, 1H), 3.21 (d, *J* = 5.9, 1H), 3.20 (d, *J* = 7.7, 1H), 3.11 (dd, *J* = 12.0, 4.2, 1H), 2.40 (s, 1H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 195.6, 172.6, 73.4, 71.8, 71.4, 39.1, 37.4, 33.6, 30.7; HRMS calculado para C₉H₁₃NO₃S₃, [M+Na]⁺ 301.9950, valor encontrado 301.9957; [α]_D = - 43.0° (21°C, AcOEt, *c* = 1.1).

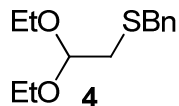


(2R,5S,8R)-8-Carboxil-2-(metiltio)metil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (1d). En un balón de dos bocas se disuelve con agitación *syn*-L-**1a** (0.15 g, 0.63 mmol) en EtOH (3ml), bajo atmósfera de nitrógeno. Se agrega NaOH (0.09 g, 2.21 mmol) y MeI (0.12 g, 0.82 mmol) y se deja con agitación por 30 min. Luego de transcurrida la reacción ésta se vuelca en HCl 5 % y se extrae con AcOEt (20 mlx5). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en SiO₂ con fase móvil Hex:AcOEt:AcOH (3:1:1%) para dar **1d** (0.10 g, 65 %) como aceite; ¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 5.16 (dd, *J* = 5.5, 3.8, 1H), 4.58 (dd, *J* = 6.6, 7.3, 1H), 4.43 (dd, *J* = 6.6, 3.8, 1H), 3.59 (dd, *J* = 11.8, 5.5, 1H), 3.34 (dd, *J* = 10.9, 6.6, 1H), 3.29 (dd, *J* = 10.9, 3.8, 1H), 3.08 (dd, *J* = 11.8, 3.8, 1H), 2.95 (dd, *J* = 13.8, 7.3, 1H), 2.72 (dd, *J* = 13.8, 6.6, 1H), 2.17 (s, 3H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 172.2, 74.4, 72.6, 71.3, 43.7, 39.1, 34.1, 15.8.

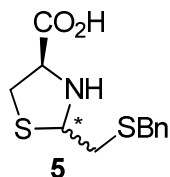


(2R,5S,8R)-9-Ona-1-aza-3,6,10-tritiotriciclo[3.3.5.0]onceavo (1e). En un balón de dos bocas se disuelve con agitación *syn*-L-**1a** (0.10 g, 0.42 mmol) en AcOEt (6ml), bajo atmósfera de nitrógeno. Se agrega pentafuorofenol (0.080 g, 0.44 mmol), HOBT (0.064g, 0.42 mmol) y DCC (0.087g, 0.42 mmol). Se deja en agitación a temperatura ambiente por 16 h. Luego de transcurrida la reacción se concentra a presión reducida y el crudo de reacción se purifica por cromatografía en SiO₂ con fase móvil Hex:AcOEt (8:1) para dar **1e** (0.020 g, 22 %), como sólido blanco; ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.19 (dd, *J* = 5.1, 2.4, 1H), 4.89 (dd, *J* = 7.4, 4.9, 1H), 4.06 (dd, *J* = 6.5, 3.7, 1H), 3.69 (dd, *J* = 10.8, 3.7, 1H), 3.64 (dd, *J* = 14.4, 2.4, 1H), 3.40 (dd, *J* = 10.8, 6.5, 1H), 3.35 (dd, *J* = 14.4, 5.1, 1H), 3.21 (dd, *J* = 11.2, 4.9, 1H), 2.83 (dd, *J* = 11.2, 7.4, 1H); ¹³CNMR (100 MHz, CDCl₃) δ 198.5, 73.9, 69.0, 63.1, 39.0, 35.1, 34.6. Se obtuvo la estructura molecular de **1e** por difracción de rayos X, ver anexo.

Preparación del mercaptoacetaldehído protegido **4**

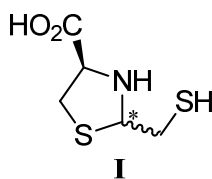


Mercaptobencilacetaldehído dietil acetal (4). En un balón de dos bocas se agrega Na (1.2 g, 52.1 mmol) en EtOH (10 ml) en pequeñas porciones, bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez formado el EtONa se agrega mercaptobencilo (6.3 g, 50.8 mmol) y bromuro de acetaldehído dietil acetal **3** (10 g, 50.8 mmol) con ecualizador. Se deja por 3 h con calentamiento a 70 °C. Luego de transcurrida la reacción, se vuelca en agua y se extrae con CH₂Cl₂ (100 ml x 5). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida para dar **4**, que es utilizado sin purificar. ¹H RMN (CDCl₃) δ 7.20 (m, 5H), 4.53 (t, *J* = 5.5, 1H), 3.78 (s, 2H), 3.65 (m, 2H), 3.52 (m, 2H), 2.57 (d, *J* = 5.5, 2H), 1.20 (t, *J* = 7.0, 6H), de acuerdo a los datos espectroscópicos descriptos en literatura ².

Preparación de las tiazolidinas **5** y **I**

2-(Benciltio)metil-4-carboxil-tiazolidina (5). En un balón de dos bocas se disuelve con agitación benciltioacetaldehído (0.67, 4.0 mmol) en MeOH (8 ml), bajo atmósfera de nitrógeno. Se agregan L-cisteína (0.49 g, 4.0 mmol) y ácido *p*-TsOH (0.030 g, 0.17 mmol), se deja a reflujo por 4 h. La mezcla de reacción se filtra por Büchner para dar **5** (0.86, 79%), como sólido color crema; PF 137.7 °C (descomposición); mezcla diastereomérica (6:4): **5** mayoritario ^1H RMN (400 MHz, D_2O) δ 7.37 (m, 4H), 7.30 (m, 1H), 4.55 (t, $J = 5.7$, 1H), 3.83 (d, $J = 8.8$, 2H), 3.59 (m, 1H), 3.27 (dd, $J = 10.4$, 6.8, 1H), 3.02 (dd, $J = 5.7$, 13.9, 1H), 2.81 (m, 2H); ^{13}C RMN (100 MHz, D_2O) δ 177.3, 138.3, 129.0, 128.8, 127.3, 68.4, 68.1, 37.7, 36.0, 34.6; **5** minoritario ^1H RMN (D_2O) δ 7.37 (m, 4H), 7.30 (m, 1H), 4.56 (m, 1H), 3.83 (d, $J = 8.8$, 2H), 3.75 (dd, $J = 8.0$, 6.6, 1H), 3.23 (dd, $J = 10.5$, 6.6, 1H), 2.81 (m, 2H), 2.59 (dd, $J = 13.7$, 3.4, 1H); ^{13}C RMN (100 MHz, D_2O) δ 177.7, 138.5, 128.9, 128.8, 127.31, 67.9, 66.0, 38.2, 37.6, 35.5.

Síntesis del benciltioacetaldehído: En un balón de dos bocas se disuelve con agitación mercaptobencilacetaldehído dietil acetal **4** (1 g, 4.2 mmol) en PhMe:H₂O (16 ml:50 ml), bajo atmósfera de nitrógeno. Se agrega HCl concentrado (1.4 ml), la solución se lleva a calentamiento de 70 °C durante 6 h. Luego de transcurrida la reacción, se separa la fase orgánica (tolueno) y se realiza extracción sobre la fase acuosa con AcOEt (60 mlx5). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida para dar el benciltioacetaldehído. Se utiliza el crudo de reacción sin purificar. ^1H RMN (CDCl_3) δ 9.35 (t, $J = 3.4$, 1H) 7.22 (m, 5H), 3.53 (s, 2H), 2.98 (d, $J = 3.4$, 2H), de acuerdo a los datos espectroscópicos descriptos en literatura ².

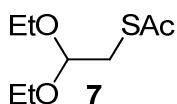


4-Carboxil-2-mercaptometil-tiazolidina (I). En un balón de dos bocas de 100 ml se disuelve con agitación la tiazolidina **10** (0.74 g, 2.8 mmol) en NH₃(l)/Na (XXg, mmol) (solución azul, NH₃(l) 50ml), bajo atmósfera de nitrógeno. Se deja a -70 °C por 20 minutos. Se neutraliza con NH₄Cl a -70 °C para destruir el exceso de Na, luego se deja el balón abierto a temperatura ambiente para eliminar el NH₃ (g). Se vuelca en agua y se lleva a pH = 3 con HCl 5%, se extrae con AcOEt (50 ml x 6). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida para dar **I** (0.070 g, 14%), como sólido. Mezcla diastereomérica (2:1): **I** mayoritario ^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ

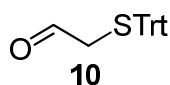
5.24 (dd, $J = 6.6, 5.3, 1\text{H}$), 4.33 (dd, $J = 6.4, 4.9, 1\text{H}$), 3.50 (dd, $J = 11.7, 6.7, 1\text{H}$), 3.29 (m, 2H), 3.12 (m, 2H); ^{13}C RMN (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 187.2, 73.7, 64.3, 38.1, 34.7; **I** minoritario ^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 4.97 (dd, $J = 9.1, 5.0, 1\text{H}$), 3.83 (dd, $J = 7.3, 5.1, 1\text{H}$), 3.66 (dd, $J = 10.8, 7.3, 1\text{H}$), 3.43 (dd, $J = 10.8, 5.1$), 3.12 (m, 2H), 3.04 (dd, $J = 9.1, 5.0, 1\text{H}$); HRMS calculado para $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}_2$ [MH^+] 180,0153, valor encontrado 180.0147.

Preparación de NH_3 (I): En un balón de dos bocas de 1000 ml conteniendo NaOH (200 g) se agrega por goteo lento NH_4OH (300ml) mediante un ecualizador. El NH_3 generado pasa por una trampa con KOH y luego condensa en un balón de 100 ml a $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

Preparación de los mercaptoacetaldehídos protegidos 7 y 10



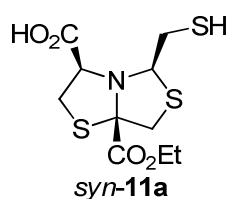
2-(Tioacetil)acetaldehído dietil acetal (7). En un balón de dos bocas se disuelve con agitación bromuro de acetaldehído dietil acetal **3** (2.5 g, 12.6 mmol) en AcO (40 ml), bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación se agrega tioacetato de potasio **6** (2.2 g, 18.8 mmol) con agitación a temperatura ambiente durante 5 hs. Luego de transcurrida la reacción, el crudo de reacción se concentra a presión reducida. Se purifica por cromatografía en SiO_2 con fase móvil Hex:AcOEt (9:1) para dar **7** (2.3 g, 94%), como aceite: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4.50 (t, $J = 5.4, 1\text{H}$), 3.67 (m, 2H), 3.55 (m, 2H), 3.12 (d, $J = 5.4, 2\text{H}$), 2.35 (s, 3H), 1.21 (t, $J = 7.0, 6\text{H}$), de acuerdo a los datos espectroscópicos en literatura³. **Tioacetato de potasio (6)**: En un balón de dos bocas se seca KOH (1.2 g, 26.3 mmol) con agitación y bajo atmósfera de nitrógeno, se agregan EtOH (18 ml) y ácido tioacético (2 g, 26.3 mmol) a temperatura ambiente. Se deja agitando por 20 min y el crudo de reacción se concentra a presión reducida. Se realizan lavados con THF seco, el precipitado se seca a vacío en desecador³.



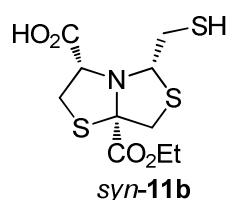
2-(Tritilio)acetaldehído (10). En un balón de dos bocas se disuelve con agitación 2-tritiltioetanol (1.0 g, 3.1 mmol) en CH_2Cl_2 (15 ml), bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se enfría en baño de hielo y se agregan DMSO (1.95 ml), Et_3N (1.3 ml) y SO_3Py (0.5 g, 3.12 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente por 12 h, se concentra el crudo de reacción a presión reducida. Se purifica por cromatografía en SiO_2 con fase móvil Hex:AcOEt (5:0.5) para dar **10** (0.23 g, 23 %), como aceite; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.84 (t, $J = 2.8, 1\text{H}$), 7.43 (m, 6H), 7.30 (m, 6H), 7.23 (m, 3H), 3.09 (d, $J = 2.8, 2\text{H}$), según lo descrito en literatura⁴. **Síntesis de 2-tritiltio-etanol**: En un balón de dos bocas se disuelve con agitación 2-mercaptoetanol **9** (3.0 g, 38.4 mmol) en CH_2Cl_2 (100 ml), bajo atmósfera de nitrógeno. Se agregan cloruro de tritilo (7.5 g, 26.9 mmol) y TFA (3.0 ml, 39.9 mmol). Se deja a temperatura ambiente por 5 h y luego se vuelca en NaHCO_3 en baño

de hielo y se extrae con CH_2Cl_2 (80 mlx5). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida. Se purifica por cromatografía en columna en SiO_2 con fase móvil Hex:AcOEt (5:1) para dar 2-(tritiol)etanol (5.6 g, 46 %), como sólido; ^1H RMN (CDCl_3) δ 7.42 (m, 6H), 7.29 (m, 6H), 7.22 (m, 3H), 3.38 (t, $J = 6.1$, 2H), 2.48 (t, $J = 6.2$, 2H), de acuerdo a los datos espectroscópicos descritos en literatura⁵.

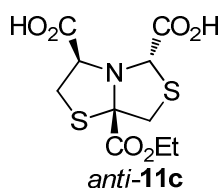
Preparación de las bistiazolidinas-**11a-g**



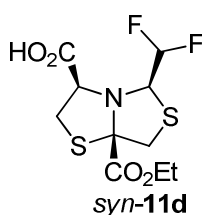
8-Carboxil-5-etoxicarbonil-2-mercaptometil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (11a). En un balón de dos bocas se disuelve con agitación la tiazolidina *anti-L-13a* (0.46 g, 1.80 mmol) en CH_2Cl_2 (15 ml), bajo atmósfera de nitrógeno. Se agregan 1,4-ditiano-2,5-diol (**2**) (0.16 g, 1.08 mmol) y ác. *p*-TsOH (0.030 g, 0.17 mmol). Se calienta a reflujo por 10 h y luego se evapora el CH_2Cl_2 a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en columna en SiO_2 con fase móvil CHCl_3 : Hex: AcOH (3:0.5:1%) para dar **11a** (0.29 g, 53 %, *syn:anti* 67:33). Se aísla **(2R,5S,8R)-syn-11a** como aceite; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4.59 (dd, $J = 7.3, 5.6$, 1H), 4.51 (dd, $J = 7.4, 5.4$, 1H), 4.25 (m, 2H), 3.80 (d, $J = 11.8$, 1H), 3.58 (dd, $J = 10.1, 5.6$, 1H), 3.44 (d, $J = 11.8$, 1H), 3.34 (dd, $J = 10.1, 7.3$ Hz, 1H), 2.96 (m, 1H), 2.72 (m, 1H), 1.74 (dd, $J = 9.5, 8.2$, 1H), 1.32 (t, $J = 7.1$, 3H); ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 174.1, 171.2, 85.3, 70.9, 70.0, 62.5, 41.3, 37.1, 34.0, 14.1; $[\alpha]_D = -69.42^\circ$ (20 °C, AcOEt, $c = 1.1$). **(2S,5S,8R)-anti-11a** como aceite; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4.69 (dd, $J = 6.7, 4.0$, 1H), 4.37 (dd, $J = 7.0, 1.3$, 1H), 4.32 (m, 2H), 3.65 (dd, $J = 11.8, 7.0$, 1H), 3.55 (m, 2H), 3.33 (d, $J = 11.9$, 1H), 2.93 (m, 3H), 1.82 (t, $J = 8.2$, 1H), 1.35 (t, $J = 7.1$, 3H); ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 173.8, 172.9, 85.7, 69.4, 64.8, 38.9, 36.7, 33.7, 29.8, 14.0.



8-Carboxil-5-etoxicarbonil-2-mercaptometil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (11b). Se prepara de manera análoga a *syn-L-11a*, utilizando como material de partida la tiazolidina *anti-D-13a* (0.10 g, 0.40 mmol). Se obtiene a **11b** con una r.d. *syn:anti* 63:37. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en SiO_2 con una fase móvil Hex:AcOEt:AcOH (4:1:1%) para dar **(2S,5R,8S)-syn-11b** (0.037 g, 49 %), como aceite con las mismas propiedades espectroscópicas que *syn-11a*.

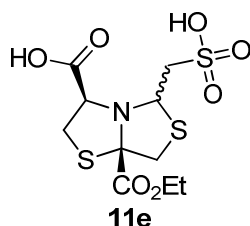


2,8-Carboxil-5-etoxicarbonil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (11c). En un balón de dos bocas provisto con trampa Dean-Stark, se disuelve con agitación la tiazolidina *anti*-L-**13a** (0.20 g, 0.80 mmol) en PhH (10 ml), bajo atmósfera de nitrógeno. Se agregan ácido glioxílico **12a** (0.88 g, 0.95 mmol) y ác. *p*-TsOH (0.030 g, 0.17 mmol) y se lleva a reflujo por 2 h. Luego de transcurrida la reacción, el crudo de reacción se concentra a presión reducida y se purifica por cromatografía en SiO₂ con fase móvil Hex:AcOEt:AcOH (2:1:1%) para dar **(2S,5S,8R)-anti-11c** (0.013 g, 5 %), como sólido blanco; PF 115.7 °C (descomposición); ¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 5.10 (s, 1H), 4.40 (dd, *J* = 5.6, 2.6, 1H), 4.25 (m, 2H), 3.83 (dd, *J* = 8.8, 5.6, 1H), 3.70 (d, *J* = 9.2, 1H), 3.59 (dd, *J* = 8.8, 2.6, 1H), 3.45 (d, *J* = 9.2, 1H), 1.28 (t, *J* = 5.6, 3H); ¹³C RMN (100 MHz, (CD₃)₂CO) δ 174.0, 172.9, 172.0, 86.8, 68.1, 65.7, 63.8, 39.3, 39.0, 14.2. HRMS calculado para C₁₀H₁₃NO₆S₂, [MNa⁺] 330.0082, valor encontrado 330.0022. Se obtuvo la estructura molecular de *anti-11c* por difracción de rayos X, ver anexo.



8-Carboxil-5-etoxicarbonil-8-difluorometil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (syn-11d). En un balón de dos bocas provisto con trampa Dean-Stark, se disuelve con agitación la tiazolidina *anti*-L-**13a** (0.40 g, 1.59 mmol) en PhH (10 ml), bajo atmósfera de nitrógeno. Se agregan difluoroacetaldehído **12b** (0.22 g, 2.69 mmol) y ác. *p*-TsOH (0.030 g, 0.17 mmol), se lleva a reflujo por 16 h. Luego de transcurrida la reacción, el crudo de reacción se concentra a presión reducida. Se obtiene a **11d** con una r.d. *syn:anti* 78:22. Se purifica por cromatografía en SiO₂ con fase móvil Hex:AcOEt:AcOH (2:1:1%) para dar **(2R,5S,8R)-syn-11d** (0.079 g, 32 %), como aceite; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.73 (td, ²*J*_{H-F} = 59.7, ³*J*_{H-H} = 3.8, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.33 (q, *J* = 7.0, 2H), 4.28 (tapp, *J* = 6.5, 1H), 3.80 (d, *J* = 12.8, 1H), 3.51 (dd, *J* = 12.1, 6.5, 1H), 3.42 (dd, *J* = 12.1, 6.5, 1H), 3.28 (d, *J* = 12.8, 1H), 1.34 (t, *J* = 7.0, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.3, 171.6, 115.2 (t, ¹*J*_{CF} = 246.0), 87.1, 75.2, 73.2 (dd, ²*J*_{CF} = 26.0, 23.2), 64.0, 39.7, 36.4, 13.8. **(2S,5S,8R)-anti-11d**, como sólido blanco; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.99 (ddd, ²*J*_{H-F} = 55.6, 54.1, ³*J*_{H-H} = 1.6, 1H), 4.68 (t, *J* = 6.5, 1H), 4.61 (ddd, ³*J*_{H-F} = 16.6, 9.1, ³*J*_{H-H} = 1.6, 1H), 4.34 (q, *J* = 7.1, 2H), 3.68 (dd, *J* = 12.0, 6.5, 1H), 3.65 (dd, *J* = 12.0, 6.5, 1H), 3.51 (td, *J* = 11.5, 1.6, 1H), 3.27 (d, *J* = 11.5, 1H), 1.34 (t, *J* = 7.1, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.1, 172.2, 115.2 (t, ¹*J*_{CF} = 249.3),

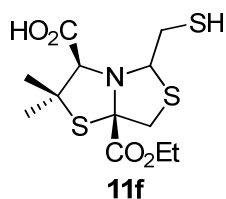
85.7, 64.3 (dd, $^2J_{CF} = 3.9, 1.5$), 64.2, 64.0, 63.7, 39.5, 36.6, 29.7, 13.9. Se obtuvo la estructura molecular de *anti*-**11d** por difracción de rayos X, ver anexo. *Síntesis del difluoroacetaldehído 12b*: En un balón de dos bocas se agrega con agitación LiAlH_4 (8.2 mmol) en Et_2O (21 ml) a baño de hielo, bajo atmósfera de nitrógeno. Luego se agrega el ácido difluoroacético (1.0 g, 10.4 mmol) y se deja a 0 °C por 2 h. A continuación se agrega H_2O (0.5 ml aprox.) hasta observar que la solución no desprenda oxígeno y se agregan una solución de H_2SO_4 (3 ml, 39 % v/v), a 0 °C. La reacción se vuelca en H_2O (20 ml) y se extrae con Et_2O (20 ml x 2) para dar a **12b** (0.9 g, 91%). Se utiliza el crudo de reacción sin purificar. ^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{Cl}_2$) δ 5.73 (m, 2 H_{OH}), 5.56 (td, $^2J_{\text{H-F}} = 55.7$, $^3J_{\text{H-H}} = 4.0$, 1H), 4.95 (m, 1H).



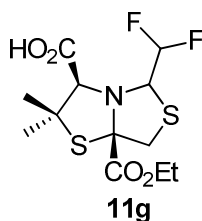
(2R/S,5S,8R)-8-Carboxil-5-etoxicarbonil-2-metilsulfónico-1-aza-3,6-ditiobicyclo [3.3.0]octano (11e).

En un balón de dos bocas se disuelve con agitación ácido 2,2-dietoxietanosulfónico **12c** (0.050 g, 0.23 mmol) en THF (5 ml), bajo atmósfera de nitrógeno. Se agrega TFA (0.15 ml) a 0 °C y se deja en agitación por 2 h. Luego se agrega la tiazolidina L-**13a** (0.058 g, 0.23 mmol) a 0 °C y se deja en agitación por 4 h a temperatura ambiente. Luego de transcurrida la reacción, se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene a **11e** con una r.d. *syn:anti* 72:28. El crudo de reacción se purifica por TLC preparativa reversa con fase móvil MeOH:HCl 3mM (5:95) para dar **11e** (0.13 g, 57 %), como sólido blanco. Mezcla diastereomérica (6:4): **(2R,5S,8R)-syn-11e**: ^1H RMN (500 MHz, D_2O) δ 4.90 (dd, $J = 11.0, 3.0$, 1H), 4.40 (t, $J = 6.8$, 1H), 4.29 (m, 2H), 3.74 (d, $J = 12.9$, 1H), 3.69 (dd, $J = 13.7, 3.0$, 1H), 3.48 (m, 1H), 3.42 (d, $J = 12.9$, 1H), 3.40 (m, 2H), 3.31 (dd, $J = 13.7, 11.0$, 1H), 1.32 (m, 3H); ^{13}C RMN (400 MHz, D_2O) δ 173.2, 173.0, 85.1, 67.3, 67.4, 63.8, 51.3, 42.0, 36.0, 13.1.

(2S,5S,8R)-anti-11e: ^1H RMN (500 MHz, D_2O) δ 4.51 (dd, $J = 6.9, 5.8$, 1H), 4.29 (m, 2H), 3.83 (d, $J = 12.1$, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.61 (m, 1H), 3.52 (d, $J = 12.1$, 1H), 3.40 (m, 2H), 3.18 (dd, $J = 14.1, 9.2$, 1H), 1.32 (m, 3H); ^{13}C RMN (100 MHz, D_2O) δ 175.9, 175.9, 85.1, 70.4, 63.6, 63.2, 58.5, 40.2, 36.8, 13.0.

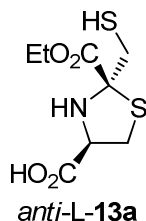


(2S,5S,8R)-8-Carboxil-5-etoxicarbonil-7-dimetil-2-mercaptometil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (11f). Se prepara de manera análoga a L-**11a**, utilizando como material de partida la tiazolidina *anti*-L-**13b** (0.14 g, 0.50 mmol), calentando a reflujo por 5 h. Se evapora el disolvente y el crudo se purifica por cromatografía en columna en SiO₂ con fase móvil Hex:AcOEt:AcOH (3:1:1%) para dar **11f** (0.043 g, 24 %), como aceite; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4.63 (dd, *J* = 7.8, 3.4, 1H), 4.32 (m, 2H), 4.11 (s, 1H), 3.46 (d, *J* = 11.7, 1H), 3.27 (d, *J* = 11.7, 1H), 2.98 (m, 1H), 2.96 (m, 1H), 2.82 (m, 1H), 1.81 (t, *J* = 8.1, 1H), 1.67 (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 1.34 (t, *J* = 7.1, 3H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 174.7, 171.4, 83.9, 74.3, 70.3, 63.7, 59.2, 40.3, 31.7, 27.9, 26.5, 13.9; HRMS calculado para C₁₀H₁₃NO₆S₂, [MNa⁺] 360.0374, valor encontrado 360.0393.

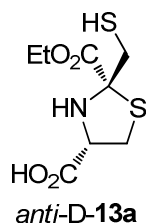


(2S,5S,8R)-8-Carboxil-5-etoxicarbonil-7-dimetil-2-difluorometil-1-aza-3,6-ditiobicyclo[3.3.0]octano (11g). Se prepara de manera análoga a L-**11d**, utilizando como material de partida la tiazolidina *anti*-L-**13b** (0.26 g, 0.96 mmol) y calentando a reflujo por 5 h. Se purifica por cromatografía en columna en SiO₂ con fase móvil Hex:AcOEt:AcOH (3:1:1%) para dar **11g** (0.19 g, 6 %), como aceite: ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.90 (tdd, ²*J*_{H-F} = 56.4, 54.8, ³*J*_{H-H} = 6.6, 1H), 4.57 (dd, ³*J*_{H-F} = 14.9, 6.7, 1H), 4.27 (q, *J* = 7.1, 2H), 4.24 (s, 1H), 3.35 (dd, *J* = 9.2, 2.2, 1H), 3.24 (d, *J* = 9.2, 1H), 1.71 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.33 (t, *J* = 7.1, 3H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 176.1, 170.8, 115.3 (dd, ¹*J*_{CF} = 241.9, 238.5 Hz), 82.1, 69.6, 62.6 (dd, ²*J*_{CF} = 29.5, 26.0 Hz), 62.5, 62.1, 36.6, 32.8, 28.2, 14.0.

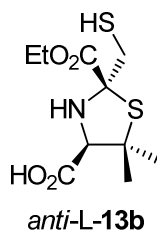
La preparación de L-**13a** es representativa de la síntesis de las tiazolidinas **13a-b** en general



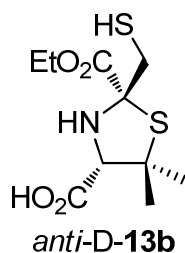
4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)tiazolidina (L-13a). En un balón de dos bocas se disuelve con agitación L-cisteína (L-Cys: 1.00 g, 8.25 mmol) en MeOH ppa (20 ml), bajo atmósfera de nitrógeno y se agregan con agitación el ditiano **14** (1.4 g, 4.92 mmol) y ácido *p*-TsOH (0.030 g, 0.17 mmol). La reacción se lleva a reflujo por 2 h y luego se vuelca en agua y se extrae con AcOEt (60 mlx5). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida. Se obtiene a L-**13a** con una r.d. *anti:syn* 65:35. El crudo se purifica por cromatografía en SiO₂ con fase móvil Hex:AcOEt:AcOH (3:1:1%) para dar (**2S, 4R**)-*anti*-L-**13a** (0.32 g, 38 %), como sólido blanco; PF 99.1-101.5 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4.32 (m, 2H), 4.17 (dd, *J* = 9.0, 6.2, 1H), 3.43 (dd, *J* = 10.7, 6.2, 1H), 3.10 (dd, *J* = 10.7, 9.0, 1H), 3.05 (d, *J* = 8.4, 1H), 1.95 (t, *J* = 8.4, 1H), 1.20 (t, *J* = 7.1, 3H); ¹³CNMR (400 MHz, CDCl₃) δ 174.6, 171.0, 79.3, 64.9, 62.9, 39.4, 33.7, 14.1. HRMS calculado C₈H₁₃NO₄S₂ [MNa⁺] 274,0184, valor encontrado 274.0178; [α]_D = - 94.12° (21 °C, AcOEt, *c* = 2.6). Se obtuvo la estructura molecular de *anti*-L-**13a** por difracción de rayos X, ver anexo.



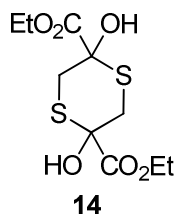
4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)tiazolidina (D-13a). Se prepara de manera análoga a *anti*-L-**13a**, utilizando como aminotiol de partida la D-cisteína (D-Cys: 0.10 g, 0.83 mmol). Se obtiene a D-**13a** con una r.d. *anti:syn* 57:43. Se purifica por cromatografía en SiO₂ con una fase móvil Hex:AcOEt:AcOH (3:1:1%) para dar (**2R, 4R**)-*anti*-D-**13a** (0.10 g, 48%) como aceite. Presenta idénticas propiedades espectroscópicas que *anti*-L-**13a**; [α]_D = + 90.35° (21 °C, AcOEt, *c* = 1.2).



4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)-5-dimetiltiazolidina (L-13b). Se prepara de manera análoga a *anti*-L-13a, utilizando como aminotiol de partida la L-penicilamina (L-PNA: 1.5 g, 10.1 mmol). Se obtiene a L-13b con una r.d. *anti:syn* 60:40. Se purifica por cromatografía en SiO₂ con una fase móvil Hex:AcOEt:AcOH (3:1:1%) para dar (**2S, 4R**)-*anti*-L-13b (1.3 g, 49 %), como aceite; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4.31 (m, 2H), 3.84 (s, 1H), 3.02 (dd, *J* = 13.6, 4.7, 1H), 2.93 (dd, *J* = 13.6, 10.9, 1H), 2.00 (dd, *J* = 10.9, 4.7, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.33 (t, *J* = 7.1, 3H), 1.29 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.3, 171.3, 76.0, 72.5, 62.6, 60.7, 34.1, 26.5, 26.1, 14.0; HRMS calculado para C₁₀H₁₇NO₄S₂, [M+Na]⁺ 302.0491, valor encontrado 302.0490; [α]_D = -49.1° (21 °C, AcOEt, *c* = 1.9).



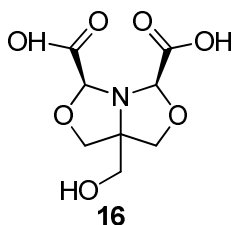
4-Carboxil-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)-5-dimetiltiazolidina (D-13b). Se prepara de manera análoga a *anti*-L-13a, utilizando como aminotiol de partida la D-penicilamina (D-PNA: 0.50 g, 3.35 mmol). Se obtiene a D-13b con una r.d. *anti:syn* 55:45. Se purifica por cromatografía en SiO₂ con una fase móvil Hex:AcOEt:AcOH (3:1:1%) para dar (**2R, 4R**)-*anti*-D-13b (0.40 g, 42 %), como aceite. Presenta idénticas propiedades espectroscópicas que *anti*-L-13b; HRMS calculado para C₁₀H₁₇NO₄S₂, [M+Na]⁺ 302.0491, valor encontrado 302.0521; [α]_D = +42.5° (21 °C, AcOEt, *c* = 1.6).

*Preparación del ditiano 14**Metodología de Patterson*

Diethyl 2,5-dihidroxi-1,4-ditiano-2,5-dicarboxilato (14). En un balón de dos bocas se disuelve con agitación NaSH (7 g, 125 mmol) en MeOH (80 ml) a baño de hielo. En otro balón de dos bocas se disuelve con agitación etil bromopiruvato **15** (14 ml, 114 mmol) en MeOH (80 ml) a baño de hielo. Luego se agrega en pequeñas porciones la solución de NaSH sobre la solución de **15**, a baño de hielo. Se deja con agitación por 45 min. El precipitado se filtra por Büchner se realizan lavados con Et₂O para dar **14** (4 g, 25%); ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 6.98 (s, 2H_{OH}), 4.18 (q, J = 7.1, 4H), 3.65 (d, J = 14.1, 2H), 2.87 (d, J = 14.1, 2H), 1.23 (t, J = 7.1, 6H), según lo descrito en literatura ⁶. *Purificación de NaSH:* En un matraz se disuelve la sal NaSH (17.0 g, 303 mmol) en EtOH (120 ml), aproximadamente durante 1 h. Luego se agrega Et₂O (180 ml) y se agita por 30 min. Se filtra por Büchner y se realiza lavado con Et₂O. El precipitado se seca a vacío.

Metodología de Taylor

Diethyl 2,5-dihidroxi-1,4-ditiano-2,5-dicarboxilato (14). En un balón de dos bocas se agrega Na (0.3 g, 11 mmol) en EtOH (80 ml) en pequeñas porciones, bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez formado el EtONa se hace barbotar H₂S (g) por 30 minutos. La solución se enfría en baño de hielo y se agrega en pequeñas cantidades una solución de etil bromopiruvato **15** (2.0 g, 10 mmol) en EtOH (10 ml) a 0 °C. Se deja en agitación por 30 minutos. El precipitado se filtra por Büchner, se realizan lavados con Et₂O para dar **14** (0.7 g, 52%)

Preparación de la bisoxazolidina 16

(2R,5SoR,8S)-2,8-Carboxil-5-hidroximetil-1-aza-3,7-dioxobicyclo[3.3.0]octano (16). En un balón de dos bocas se disuelve con agitación trihidroximetilaminometano (TRIS, 0.66 g, 5.43 mmol) en CH₂Cl₂ (12 ml), bajo atmósfera de nitrógeno. Se agregan ácido glioxílico (1.0 g, 10.86 mmol) y MgSO₄ (0.98 g, 8.14 mmol). Se lleva a reflujo por 5 h. Luego de transcurrida la reacción, se

concentra el crudo reacción a presión reducida. Se agrega MeOH y se filtra por Büchner para dar **16** (0.75 g, 61 %), como sólido blanco; PF 138.2 °C (descomposición); ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 4.90 (s, 2H), 3.98 (d, $J = 8.9$, 2H), 3.89 (d, $J = 3.9$, 2H), 3.57 (s, 2H); ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD) δ 173.9, 94.1, 88.3, 70.5, 61.5; HRMS calculado para $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_7$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 256.0433, valor encontrado 256.0283.

5.3 Difracción de Rayos X de los compuestos preparados

Técnica de cristalización

La obtención de cristales se realiza mediante la evaporación del disolvente. Se disuelve el compuesto de interés utilizando mezcla de disolventes miscibles entre sí. En la mezcla utilizada se debe incorporar un solvente en que el compuesto sea insoluble pero en cantidades tales que permita la disolución del mismo. Para 10 mg de compuesto utilizar un volumen final de 8-10 ml de solvente. La solución final se filtra con papel de filtro a un vial y se deja durante 4-7 días en una cámara saturada con solvente.

En el caso de BTZ-**1e**, *anti*-L-**13a**, *anti*-**11c**, *anti*-**11d** se utilizó una mezcla de CH_2Cl_2 :MeOH:Hex en una proporción aproximada (1:0.2:0.4).

Datos recabados de la estructura molecular de BTZ-**1e**

A colorless parallelepiped-like specimen of $\text{C}_7\text{H}_9\text{NOS}_3$, 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%, $R_{\text{int}} = 3.98\%$, $R_{\text{sig}} = 1.98\%$) and 1779 (95.29%) were greater than $2\sigma(F^2)$. 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 $5.757^\circ < 2\theta < 53.18^\circ$. 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 F^2 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 and the largest hole was -0.286 e⁻/Å³ with an RMS deviation of 0.078 e⁻/Å³. On the basis of the final model, the calculated density was 1.626 g/cm³ and $F(000)$, 456 e⁻.

Table 1. Sample and crystal data for BTZ-1e.

Identification code	ValerieC_VC269_1829	
Chemical formula	C ₇ H ₉ NOS ₃	
Formula weight	219.33 g/mol	
Temperature	298(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal size	0.080 x 0.090 x 0.380 mm	
Crystal habit	colorless parallelepiped	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P 21 21 21	
Unit cell dimensions	a = 5.2493(7) Å	α = 90°
	b = 12.0624(18) Å	β = 90°
	c = 14.1479(16) Å	γ = 90°
Volume	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 BTZ-1e.

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	Σ 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; l > 2σ(l) R1 = 0.0398, wR2 = 0.0939 all data R1 = 0.0421, wR2 = 0.0949
Weighting scheme	w = 1/[σ 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

Datos recabados de la estructura molecular de *anti*-L-13a

A specimen of $C_8H_{13}NO_4S_2$, approximate dimensions 0.256 mm x 0.357 mm x 0.455 mm, was used for the X-ray crystallographic analysis. The X-ray intensity data were measured. A total of 392 frames were collected. The total exposure time was 2.41 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 43769 reflections to a maximum θ angle of 29.11° (0.73 Å resolution), of which 3161 were independent (average redundancy 13.847, completeness = 99.7%, $R_{int} = 3.29\%$, $R_{sig} = 1.82\%$) and 2874 (90.92%) were greater than $2\sigma(F^2)$. The final cell constants of $a = 6.0194(4)$ Å, $b = 7.1500(6)$ Å, $c = 27.3932(18)$ Å, volume = $1178.97(15)$ Å³, are based upon the refinement of the XYZ-centroids of 123 reflections above $20\sigma(I)$ with $6.101^\circ < 2\theta < 42.14^\circ$. Data were corrected for absorption effects using the multi-scan method (SADABS). The ratio of minimum to maximum apparent transmission was 0.914. The calculated minimum and maximum transmission coefficients (based on crystal size) are 0.8230 and 0.8940. The final anisotropic full-matrix least-squares refinement on F^2 with 145 variables converged at $R1 = 6.19\%$, for the observed data and $wR2 = 16.24\%$ for all data. The goodness-of-fit was 1.074. The largest peak in the final difference electron density synthesis was $0.489 e^-/\text{Å}^3$ and the largest hole was $-0.403 e^-/\text{Å}^3$ with an RMS deviation of $0.070 e^-/\text{Å}^3$. On the basis of the final model, the calculated density was 1.416 g/cm^3 and $F(000)$, 528 e^- .

Table 1. Sample and crystal data for *anti*-L-13a.

Identification code	ValerieC_1	
Chemical formula	$C_8H_{13}NO_4S_2$	
Formula weight	251.31 g/mol	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal size	0.256 x 0.357 x 0.455 mm	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P 21 21 21	
Unit cell dimensions	$a = 6.0194(4)$ Å	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 7.1500(6)$ Å	$\beta = 90^\circ$
	$c = 27.3932(18)$ Å	$\gamma = 90^\circ$
Volume	$1178.97(15)$ Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.416 g/cm^3	
Absorption coefficient	0.446 mm^{-1}	
$F(000)$	528	

Table 2. Data collection and structure refinement for *anti*-L-13a.

Theta range for data collection	2.94 to 29.11°
Index ranges	$-8 \leq h \leq 8$, $-9 \leq k \leq 9$, $-37 \leq l \leq 37$
Reflections collected	43769
Independent reflections	3161 [$R(int) = 0.0329$]
Coverage of independent reflections	99.7%
Absorption correction	multi-scan

Table 2. Data collection and structure refinement for *anti*-L-13a.

Max. and min. Transmission	0.8940 and 0.8230	
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	3161 / 8 / 145	
Goodness-of-fit on F^2	1.074	
Final R indices	2874 data; $I > 2\sigma(I)$	R1 = 0.0619, wR2 = 0.1544
	all data	R1 = 0.0705, wR2 = 0.1624
Weighting scheme	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0516P)^2 + 1.8175P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$	
Absolute structure parameter	0.1(0)	
Largest diff. peak and hole	0.489 and -0.403 $e\text{\AA}^{-3}$	
R.M.S. deviation from mean	0.070 $e\text{\AA}^{-3}$	

Table 3. Hydrogen bond distances (\AA) and angles ($^\circ$) for *anti*-L-13a.

	Donor-H	Acceptor-H	Donor-Acceptor	Angle
N1-H1 \cdots O4	0.81(7)	2.24(7)	2.700(5)	117.(6)
C1-H1A \cdots O1	0.99	2.38	3.353(6)	165.6
C1-H1B \cdots S2	0.99	3.01	3.922(6)	153.7
S2-H2 \cdots O3	1.21(3)	2.55(6)	3.282(4)	117.(3)
O2-H2A \cdots N1	0.84	2.05	2.885(5)	173.6
C2-H2B \cdots O1	1.0	2.47	3.137(6)	123.8
C7-H7A \cdots O4	0.99	2.58	3.311(7)	130.3

Datos recabados de la estructura molecular *anti*-11c

A colorless flat needle-like specimen of $C_{10}H_{12}NO_6S_2$, approximate dimensions 0.026 mm x 0.116 mm x 0.397 mm, was used for the X-ray crystallographic analysis. The X-ray intensity data were measured. A total of 2092 frames were collected. The total exposure time was 21.29 hours. The frames were integrated with the Bruker SAINT software package using a narrow-frame algorithm. The integration of the data using a monoclinic unit cell yielded a total of 17956 reflections to a maximum θ angle of 72.32° (0.81 \AA resolution), of which 2541 were independent (average redundancy 7.067, completeness = 100.0%, $R_{\text{int}} = 7.22\%$, $R_{\text{sig}} = 4.30\%$) and 2335 (91.89%) were greater than $2\sigma(F^2)$. The final cell constants of $a = 6.9399(2)$ \AA , $b = 8.0169(2)$ \AA , $c = 11.9201(4)$ \AA , $\beta = 98.996(2)^\circ$, volume = $655.03(3)$ \AA^3 , are based upon the refinement of the XYZ-centroids of 9885 reflections above $20\sigma(I)$ with $12.91^\circ < 2\theta < 144.2^\circ$. Data were corrected for absorption effects using the multi-scan method (SADABS). The ratio of minimum to maximum apparent transmission was 0.725. The calculated minimum and maximum transmission coefficients (based on crystal size) are 0.3050 and 0.9050. The final anisotropic full-matrix least-squares refinement on F^2 with 179 variables converged at $R1 = 3.69\%$, for the observed data and $wR2 = 11.59\%$ for all data. The goodness-of-fit was 0.920. The largest peak in the final difference electron density synthesis was $0.332 e^-/\text{\AA}^3$ and the largest

hole was $-0.253 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ with an RMS deviation of $0.058 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$. On the basis of the final model, the calculated density was 1.553 g/cm^3 and $F(000)$, 318 e^- .

Table 1. Sample and crystal data for *anti*-**11c**.

Identification code	ValerieC_2
Chemical formula	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}_6\text{S}_2$
Formula weight	306.33 g/mol
Wavelength	1.54178 Å
Crystal size	0.026 x 0.116 x 0.397 mm
Crystal habit	colorless flat needle
Crystal system	Monoclinic
Space group	P 1 21 1
Unit cell dimensions	a = 6.9399(2) Å $\alpha = 90^\circ$ b = 8.0169(2) Å $\beta = 98.996(2)^\circ$ c = 11.9201(4) Å $\gamma = 90^\circ$
Volume	655.03(3) Å ³
Z	2
Density (calculated)	1.553 g/cm ³
Absorption coefficient	3.922 mm ⁻¹
F(000)	318

Table 2. Data collection and structure refinement for *anti*-**11c**.

Theta range for data collection	3.75 to 72.32°
Index ranges	-8<=h<=8, -8<=k<=9, -14<=l<=14
Reflections collected	17956
Independent reflections	2541 [R(int) = 0.0722]
Coverage of independent reflections	100.0%
Absorption correction	multi-scan
Max. and min. Transmission	0.9050 and 0.3050
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	2541 / 1 / 179
Goodness-of-fit on F^2	0.920
$\Delta/\sigma_{\text{max}}$	0.779
Final R indices	2335 data; $l > 2\sigma(l)$ R1 = 0.0369, wR2 = 0.1096 all data R1 = 0.0421, wR2 = 0.1159
Weighting scheme	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.1000P)^2]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
Absolute structure parameter	0.1(0)
Largest diff. peak and hole	0.332 and $-0.253 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$
R.M.S. deviation from mean	$0.058 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$

Table 3. Hydrogen bond distances (Å) and angles (°) for *anti*-11c.

	Donor-H	Acceptor-H	Donor-Acceptor	Angle
O1-H1 ^{...} O6	0.74	2.00	2.734(3)	168.6
O5-H5 ^{...} O4	0.82	2.06	2.784(4)	147.0
O5-H5 ^{...} N1	0.82	2.22	2.736(4)	120.7

Datos recabados de la estructura molecular *anti*-11d

A specimen of $C_{10}H_{13}F_2NO_4S_2$, approximate dimensions 0.168 mm x 0.289 mm x 0.450 mm, was used for the X-ray crystallographic analysis. The X-ray intensity data were measured. A total of 679 frames were collected. The total exposure time was 16.68 hours. The frames were integrated with the Bruker SAINT software package using a narrow-frame algorithm. The integration of the data using a monoclinic unit cell yielded a total of 22754 reflections to a maximum θ angle of 28.34° (0.75 Å resolution), of which 3271 were independent (average redundancy 6.956, completeness = 99.4%, $R_{int} = 2.62\%$, $R_{sig} = 1.82\%$) and 3071 (93.89%) were greater than $2\sigma(F^2)$. The final cell constants of $a = 6.9704(3)$ Å, $b = 8.0097(3)$ Å, $c = 11.9695(5)$ Å, $\beta = 100.105(2)^\circ$, volume = 657.90(5) Å³, are based upon the refinement of the XYZ-centroids of 131 reflections above $20 \sigma(I)$ with $10.33^\circ < 2\theta < 50.33^\circ$. Data were corrected for absorption effects using the multi-scan method (SADABS). The ratio of minimum to maximum apparent transmission was 0.907. The calculated minimum and maximum transmission coefficients (based on crystal size) are 0.8270 and 0.9300. The final anisotropic full-matrix least-squares refinement on F^2 with 207 variables converged at $R1 = 3.24\%$, for the observed data and $wR2 = 8.92\%$ for all data. The goodness-of-fit was 1.114. The largest peak in the final difference electron density synthesis was $0.237 e^-/\text{Å}^3$ and the largest hole was $-0.236 e^-/\text{Å}^3$ with an RMS deviation of $0.052 e^-/\text{Å}^3$. On the basis of the final model, the calculated density was 1.582 g/cm³ and $F(000)$, 324 e⁻.

Table 1. Sample and crystal data for *anti*-11d.

Identification code	ValerieC_BTZ	
Chemical formula	$C_{10}H_{13}F_2NO_4S_2$	
Formula weight	313.33 g/mol	
Temperature	298(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal size	0.168 x 0.289 x 0.450 mm	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P 1 21 1	
Unit cell dimensions	$a = 6.9704(3)$ Å	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 8.0097(3)$ Å	$\beta = 100.105(2)^\circ$
	$c = 11.9695(5)$ Å	$\gamma = 90^\circ$
Volume	657.90(5) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.582 g/cm ³	
Absorption coefficient	0.438 mm ⁻¹	

F(000) 324

Table 2. Data collection and structure refinement for *anti*-**11d**.

Theta range for data collection	2.97 to 28.34°
Index ranges	-9<=h<=9, -10<=k<=10, -15<=l<=15
Reflections collected	22754
Independent reflections	3271 [R(int) = 0.0262]
Coverage of independent reflections	99.4%
Absorption correction	multi-scan
Max. and min. Transmission	0.9300 and 0.8270
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Refinement program	SHELXL-2014/6 (Sheldrick, 2014)
Function minimized	$\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)^2$
Data / restraints / parameters	3271 / 43 / 207
Goodness-of-fit on F ²	1.114
Δ/σ_{\max}	0.001
Final R indices	3071 data; $l > 2\sigma(l)$ R1 = 0.0324, wR2 = 0.0846 all data R1 = 0.0362, wR2 = 0.0892
Weighting scheme	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0426P)^2 + 0.2284P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
Absolute structure parameter	-0.0(0)
Largest diff. peak and hole	0.237 and -0.236 eÅ ⁻³
R.M.S. deviation from mean	0.052 eÅ ⁻³

Table 3. Hydrogen bond distances (Å) and angles (°) for *anti*-**11d**.

	Donor-H	Acceptor-H	Donor-Acceptor	Angle
O5-H5 ^{...} O4	0.82	2.05	2.791(4)	149.5
O5-H5 ^{...} N1	0.82	2.21	2.722(3)	120.4

5.4 Ensayo de estabilidad de L-1a

Se disuelve L-**1a** (10 mg) en DMSO (0.1 ml) y se diluye en buffer fosfato (10mM NaH₂PO₄:Na₂HPO₄, pH 7.56, 200 mM NaCl, 20 μM ZnSO₄ y 50 μg/mL BSA) para alcanzar una concentración final de 20 mM y se deja con agitación a 27 °C. La reacción se detiene con el agregado de HCl 5% hasta pH 1 y luego se extrae con AcOEt (4x10ml). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida. Esta operación se realiza por triplicado, para tener distintos tiempos de reacción (6 h, 24 h y 48 h). Los crudos se analizan por ¹H-NMR

5.5 Preparación y purificación de las metalo-β-lactamasas a evaluar

La caracterización de la inhibición de las BTZ-1 frente a tres metalo-β-lactamasas (NDM-1, IMP-1 y BclI) se realizó 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). Se caracterizó la inhibición de las BTZ-1 frente a la MβL Verona Imipenemasa (VIM)ba cargo del Dr. Prof. Roberto Bonomo en Research Service, Louis Stokes Cleveland Department of Véterans Affairs Medical Center, and Departments of Pharmacology, Biochemistry, Microbiology, and Molecular Biology, Case Wéstern Reserve University, Cleveland-USA. También se caracterizó la inhibición de las BTZ-1 frente a las MβL Sfh-1 y L1 a cargo del Dr. Prof. James Spencer en School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol-UK.

NDM-1

Preparación de la enzima NDM-1 para los estudios de cinética:

El gen *bla*_{NDM-1} que codifica a NDM-1 carece de los primeros 38 residuos aminoacídicos, e incluye la secuencia líder. Se clona entre las restricciones *NdeI* y *XhoI* del plásmido modificado pET-28 (+) (sitio de corte TEV). La proteína se expresa en *E. coli* BL21(DE3). Las bacterias se cultivan en medio mínimo M9 a 37 °C, OD₆₀₀=0.6. La expresión de NDM-1 se inicia con el agregado de 0.05 mM isopropil β-D-l-tiogalactopiranosido y a continuación se adiciona al medio 0.5 mM ZnSO₄. Las células bacterianas se incuban toda la noche a 18 °C. Todos lo pasos posteriores de purificación se realizaron a 4 °C. Las células se cultivan nuevamente y se resuspenden en 50 mM de Tris-Cl, pH 8.0, 200 mM NaCl, aditivo 10 µg/ml DNase, 4mM MgCl₂, 2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 10 mM β-mercaptoetanol. Las células *E. coli* se lisan con sonicación (5 ciclos de 30 s y entre cada ciclo un reposo de 1 min), el material en suspensión se separa por centrifugación de 60 min a 15000 g. El crudo se purifica con una resina de afinidad Ni-Sepharose, la columna se lava con 100 ml de buffer A (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 200 mM NaCl y 10 mM β-mercaptoetanol), la proteína His6x-NDM-1 se eluye con buffer B (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoetanol y 500 mM imidazol) con un gradiente lineal de 0 a 100% utilizando 100 ml. Luego 100 µM de His6x-NDM-1 se mezcla con la proteasa TEV en una relación 50:1, respectivamente. La mezcla se deja por 16 h a 4 °C y a su vez se realiza la diálisis contra 100 volúmenes de 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 200 mM NaCl y 10 mM β-mercaptoetanol. Luego nuevamente se coloca a NDM-1 en la resina de afinidad Ni-Sheparose para separarla de His6x-tag, His6x-NDM-1 y proteasa TEV. NDM-1 se obtiene con una pureza >95%, según SDS-PAGE. El β-mercaptoetanol se elimina por diálisis de 12 h, 100 µM NDM-1 contra 100 volúmenes de 10 mM HEPES, pH 7.5, 200 mM NaCl, 200 µM ZnSO₄; seguida de 4 h de diálisis contra 100 volúmenes de 10 mM HEPES, pH 7.5, 200 mM NaCl. NDM-1 se concentra por ultrafiltración (Millipore, Bedford, MA, USA) a una concentración final de 200 µM. La concentración final se determina por la absorbancia 280 nm utilizando un coeficiente molar de absorción de 28500 M⁻¹cm⁻¹ (ε₂₈₀). El rendimiento de proteína promedio es de 50mg/l de cultivo.

Preparación de la enzima NDM-1 para los estudios cristalográficos:

La enzima NDM-1 carece de los primeros 26 aminoácidos, e incluye la secuencia líder; se clonan con vector pPOINF T7. Se expresa y purifica según Rydzik y *col.*⁷. Se lleva a una concentración de 35 mg/ml por ultrafiltración.

VIM-2

Preparación de la enzima VIM-2 para los estudios cinéticos:

Se utiliza *P. Aeruginosa* PA3 para amplificar el gen *bla*_{VIM-2}, incluyendo la secuencia líder. Luego se clona con el vector pET-24a (+), empleando los sitios de restricción *Nde*I y *Bam*HI y se expresa en células de *E. coli* BL21(DE3). Estas bacterias portando el gen *bla*_{VIM-2} se cultivan en medio LB con 50 mg/l kanamicina por 18 h. A continuación se inoculan en medio súper óptimo (SOB) y se dejan con constante agitación a 200 rpm, hasta obtener OD₆₀₀=0.6. Posteriormente se induce la expresión de VIM-2 con la adición de 0.1 mM de isopropil β-D-l-tiogalactopiranosido y a continuación se adiciona al medio 2 mM ZnSO₄. Se incuban por 20 h a 20 °C con constante agitación a 200 rpm. Las células se cultivan y congelan a -20 °C por 18 h. Se resuspenden en 50 mM de Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl y 2 mM ZnSO₄. Se genera la lisis con 40mg/l de lisosomas y 1.0 unidad/ml de nucleasa (benzonasa, Novagen). Se realiza una lisis exhaustiva con sonicación (3 ciclos de 30 s a un 50% amplitud, Fisher Scientific, Waltham, MA), el material en suspensión se separa por centrifugación de 10 min a 12000 rpm. Se realiza diálisis durante la noche contra 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 y 2 mM ZnSO₄. VIM-2 se purifica con una resina de intercambio aniónico (Q Hitrap Sephrose Fast Flow or Source 15Q, GE Helthcare), seguida de gel filtración (Superdex 75 10/300 GL, GE Helthcare). La enzima se almacena a 4 °C en 50 mM Tris-HCl, 2 mM ZnSO₄, a pH 7.4. Se obtiene a VIM-2 con una pureza 95% según SDS-PAGE.

Preparación de la enzima VIM-2 para los estudios cristalográficos:

Preparación y purificación según lo descrito para los estudios cinéticos. Pero se lleva a una concentración final de 15 mg/ml por ultrafiltración.

BclI

Preparación de la enzima BclI para los estudios cinéticos:

Se codifica en el gen *bla*_{BclI} carente de los primeros 21 aminoácidos y se clonan con el vector pET28a (sitio de corte Trombina; Novagen) utilizando los sitios de restricción *Nde*I y *Sal*I. Se obtiene la proteína His6x-BclI. Las células se resuspenden en buffer A (50 mM Tris, pH 8.0, 200 mM NaCl) con 10 µg/ml DNase, 4 mM MgCl₂ y 2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Se lisan las células por sonicación y los materiales insolubles se remueven por centrifugación (60 min, 15000 g). El sobrenadante se incubaba en la resina de afinidad Ni-sepharose equilibrada con buffer A. La columna se lava con 10 ml de buffer A y la proteína se eluye con buffer A conteniendo además 500 mM de imidazol con gradiente lineal de 0 a 100% (100 ml). Se realiza el corta de His6x con trombina y se vuelve a colocar en la resina de Ni-sepharose. Se diluye a BclI con buffer C (100 mM, HEPES, pH 7.0, 1 mM) en relación (1:5), respectivamente. Luego se coloca en una resina de intercambio iónico CM-sepharose con buffer C. La columna se lava con 100 ml de buffer C y la proteína BclI se eluye con Buffer C con 400 mM NaCl. Se obtiene con una pureza > 95% según SDS-PGE. Se lleva a una concentración final de 15 mg/ml con ultrafiltración

(Millipore, Bedford, MA, USA) y es intercambiada a Tris-HCl, pH 7.0, 50 mM NaCl, 1mM DTT y 1 mM ZnSO₄.

IMP-1

El gen *bla*_{IMP-1} que codifica a IMP-1 carece de los primeros 21 aminoácidos, se clona a través del vector pOINF y se obtiene la His6x-IMP-1. La proteína se expresa en células *E. coli*. SoluBL21(DE3), cultivadas en medio LB a 37 °C hasta A₆₀₀=0.6. Posteriormente se induce la expresión de IMP-1 con la adición 0.5 mM de isopropil β-D-I-tiogalactopiranosido y a continuación se adiciona al medio 0.5 mM ZnSO₄, se incuban por 16 h a 18 °C. Las células *E. coli* se centrifugan por 10 min a 6500 xg. Luego se resuspenden en 50 mM HEPES, pH 8.0, 400mM NaCl. Se provoca la lisis de las bacterias agregando una proteasa (complete EDTA-free protease inhibitor mixture, Roche) y 10 μM ZnCl₂, seguida de dos ciclos de sonicación (30.00 psi). Se centrifugan a 100000 xg por 1 h. Al sobrenadante se le agrega 8 mM imidazol y se incuba en una resina afinidad Ni-NTA (Qiagen) por 2 h. La resina se lava con buffer A (50 mM Tris, pH 7.5, 400 mM NaCl, 10 μM ZnCl₂ y 1mM) con 10 mM de imidazol, seguida de buffer A con 0.1% Triton X-100 y por ultimo se lava exhaustivamente con buffer A con 20 mM de imidazol. Luego se eluye la proteína con buffer B 50 mM Tris, pH 7.5, 200 mM NaCl, 10 μM ZnCl₂, 400 mM imidazol. Se reduce la concentración de imidazol a 10 mM con Amicon 10 kDa. Para realizar el corte de His6x se incuba toda la noche con la proteasa 3C, a 4 °C. Luego la mezcla de digestión se incuba por 30 min en la resina Ni-NTA, se eluye con buffer B. Luego se purifica con una columna de exclusión Superdex S75 en 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 100 μM ZnCl₂, 1 mM TCEP. Se concentra con Amicon 10 kDa a 25 mg/ml.

L1

Se produce de manera análoga a IMP-1, pero para su purificación se utiliza el buffer A sustituyendo a TCEP por β-mercaptoetanol (1 mM). La proteína sin His6x se purifica con la columna de exclusión Superdex S200, utilizando 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 100 mM NaCl, 100 μM ZnSO₄. Se lleva a una concentración final de 23 mg/ml con Amicon 10 kDa. Además, previo a la cristalización se adiciona 5 mM ZnSO₄.

Sfh-1

Se produce de manera análoga a IMP-1, pero para su purificación se utiliza el buffer A sustituyendo a TCEP por β-mercaptoetanol (1 mM). La proteína sin His6x se purifica con una columna de exclusión Superdex S75 utilizando 50 mM HEPES, pH 7.0. Se lleva a una concentración final de 15 mg/ml con Amicon 10 kDa.

5.6 Preparación de células *E. coli* que expresan NDM-1 utilizada en los estudios de ^1H RMN

Se preparó un plásmido para la expresión periplásmica de NDM-1 (pMBLeNDM-1), donde el gen $bla_{\text{NDM-1}}$ está bajo el control del promotor pLac. Células de *E. coli* portando el vector pMBLe (sin el gen $bla_{\text{NDM-1}}$) o pMBLeNDM-1 se inoculan en 10 ml del medio LB en presencia de 25 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, se dejan incubando a 37 °C con agitación continua a 200 rpm hasta alcanzar un $\text{OD}_{600}=0.6$. Luego se agrega 100 μM de isopropil β -D-l-tiogalactopiranosido (IPTG) para inducir la expresión de la proteína. Se incuban por 2 h a 37 °C con agitación de 200 rpm. El cultivo celular se centrifuga a 1000 g por 4 min a 4 °C. El sobrenadante se descarta y las células se lavan exhaustivamente y se resuspenden en 1 ml de 50 mM de fosfato de sodio, pH 7.0. Se centrifugan nuevamente a 1000 g por 4 min a 4 °C, se repite tres veces. Las células se resuspenden en buffer fosfato hasta $\text{OD}_{600}=0.1$ para estudios de RMN.

5.7 Ensayos biológicos

Caracterización del mecanismo de inhibición y determinación de la constante de Inhibición (K_i) en las diferentes subclases de metalo- β -lactamasas

Se monitoreo la hidrólisis de imipenem frente a seis metalo- β -lactamasas (B1: NDM-1, IMP-1, BclI; B2: Sfh-1; B3: L1, GOB-18) con un espectrofotómetro Jasco V-670 a una longitud de onda de 300 nm, con un $\Delta\epsilon_{300} = -9000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Para la metalo- β -lactamasa B1 VIM-2 se monitoreo nitrocefina a 482 nm, con $\Delta\epsilon_{482} = -17400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El medio de reacción empleado fue buffer A (10 mM HEPES, pH 7.5, 200 mM NaCl, 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA) para la subclase B2 Shf-1 y buffer A con 20 μM ZnSO_4 para las subclases B1 y B3, a 30 °C. La reacción se lleva a cabo en una cubeta de cuarzo con una concentración final de enzima de 1nM (o 3nM para VIM-2). Los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración final de 100 mM y se diluye con 10 mM HEPES, pH 7.5, 200 mM NaCl hasta 10 mM. Se utilizan volúmenes apropiados de esta solución para obtener la concentración final del compuesto deseada. Obteniendo un porcentaje de DMSO en la muestra final entre 0.01-0.07% (no altera la actividad enzimática). El ensayo se inicia con el agregado de la M β L a la mezcla del sustrato con el inhibidor. Las constantes de inhibición se determinaron por el ajuste al modo de inhibición competitiva según GraphPad 5.0; con la ecuación $v_o = (v_{max} \times [S]) / (K_M \times (1 + [I]/K_i) + [S])$. Siendo v_o la velocidad inicial, [S] concentración del sustrato (imipenem) y [I] concentración del inhibidor, ver gráficos a continuación.

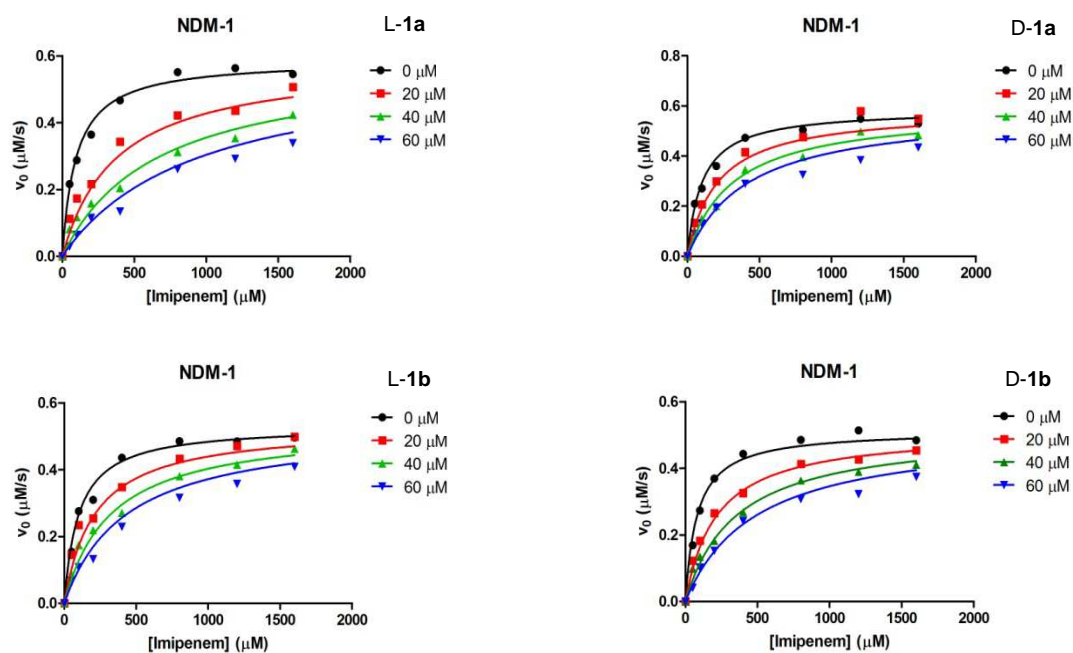


Figura 1. Inhibición *In vitro* de las bistiazolidinas-1 frente a NDM-1. La velocidad inicial de hidrólisis de imipenem (0-1700 μM) por NDM-1 (1 nM) fue evaluada en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de las bistiazolidinas-1 (20-60 μM). El gráfico v_0 vs $[\text{imipenem}]$ muestra el ajuste al modo de inhibición competitivo.

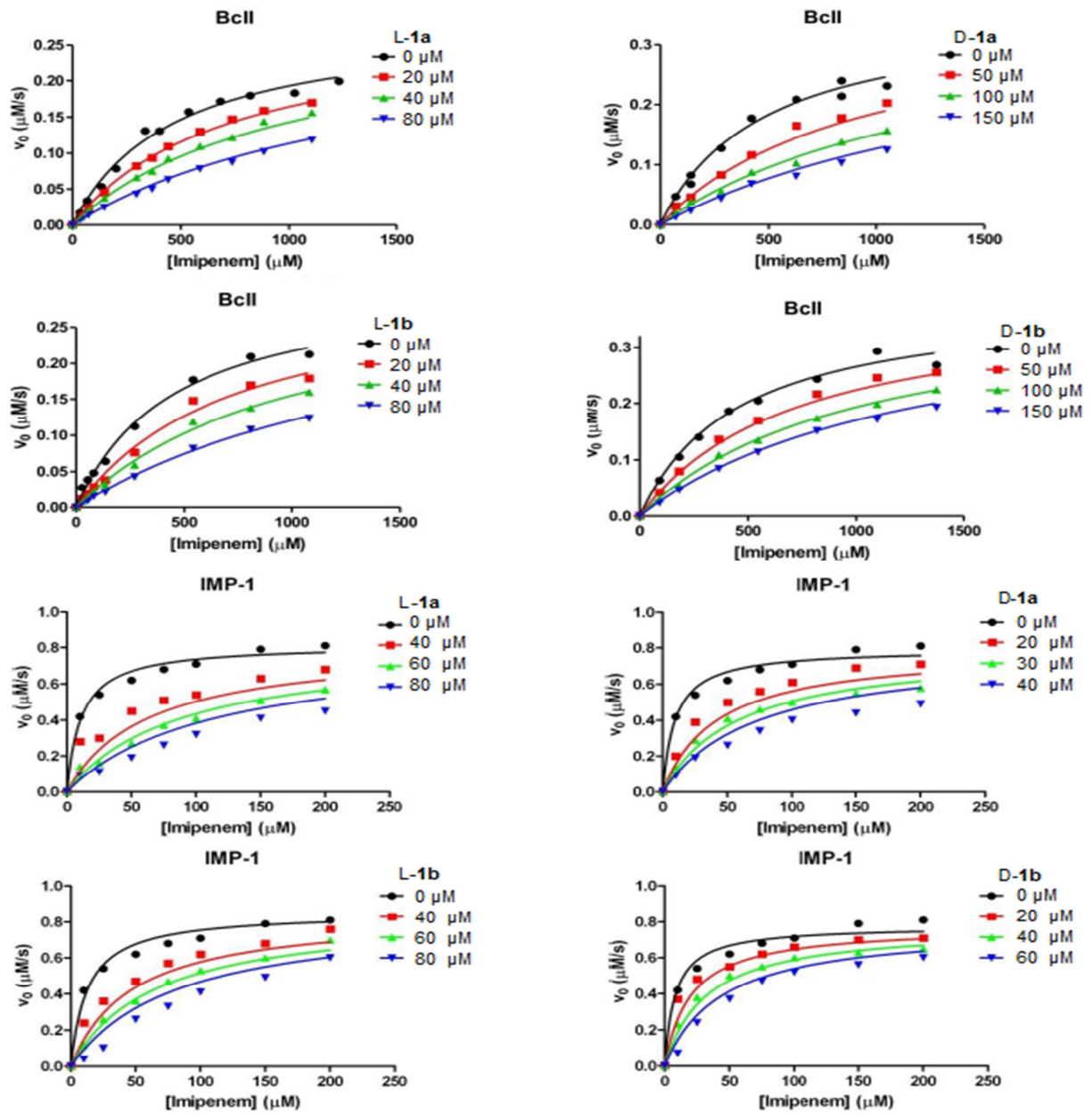


Figura 2. Inhibición *In vitro* de las bistiazolidinas-1 frente a BclI y IMP-1. La velocidad inicial de hidrólisis de imipenem (0-1500 μM) por NDM-1 (1 nM) fue evaluada en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de las bistiazolidinas-1. El gráfico v_0 vs [imipenem] muestra el ajuste al modo de inhibición competitivo.

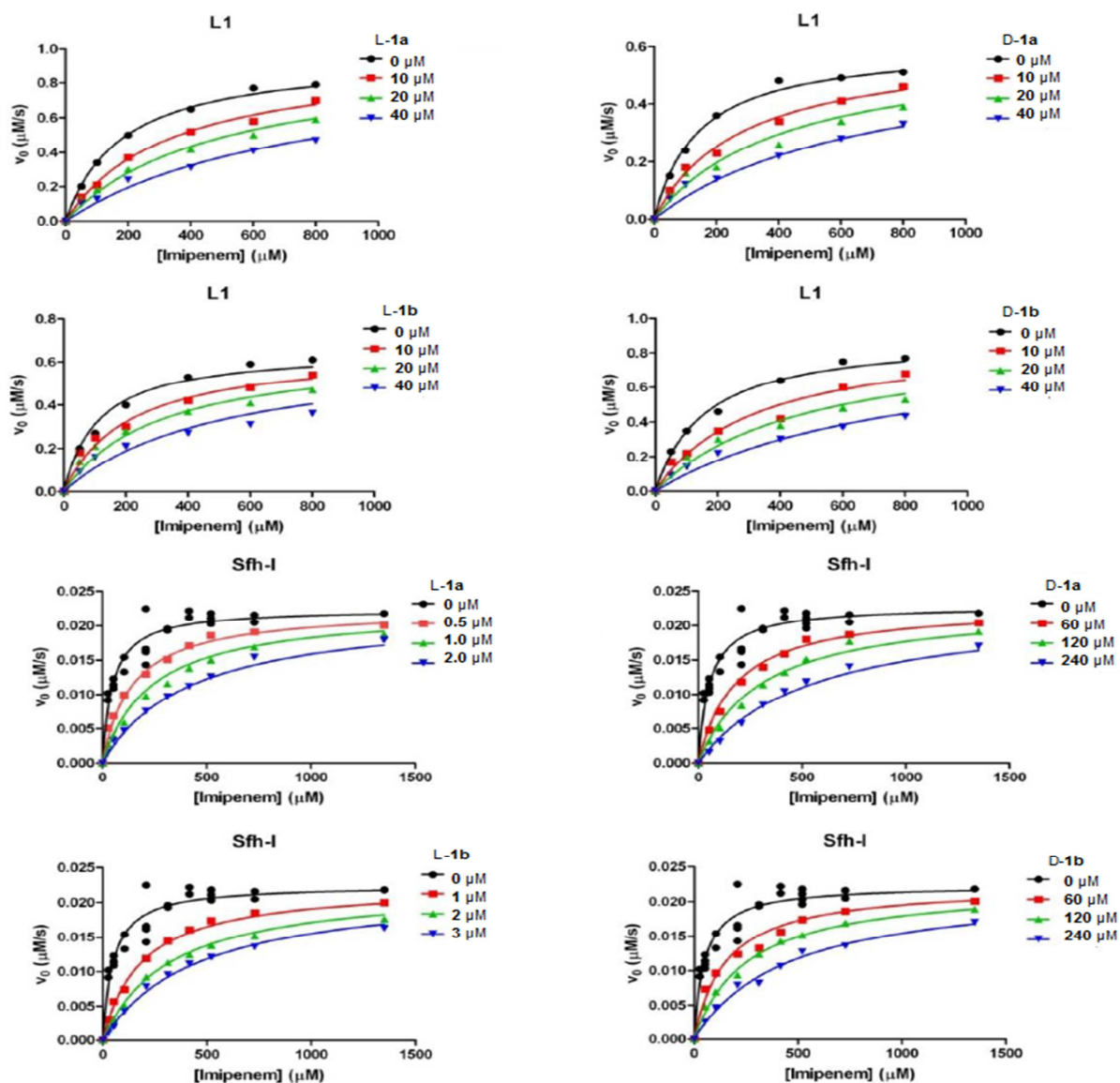


Figura 3. Inhibición *In vitro* de las bistiazolidinas-1 frente a L1 y Sfh-1. La velocidad inicial de hidrólisis de imipenem (0-1500 μM) por NDM-1 (1 nM) fue evaluada en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de las bistiazolidinas-1. El gráfico v_0 vs [imipenem] muestra el ajuste al modo de inhibición competitiva.

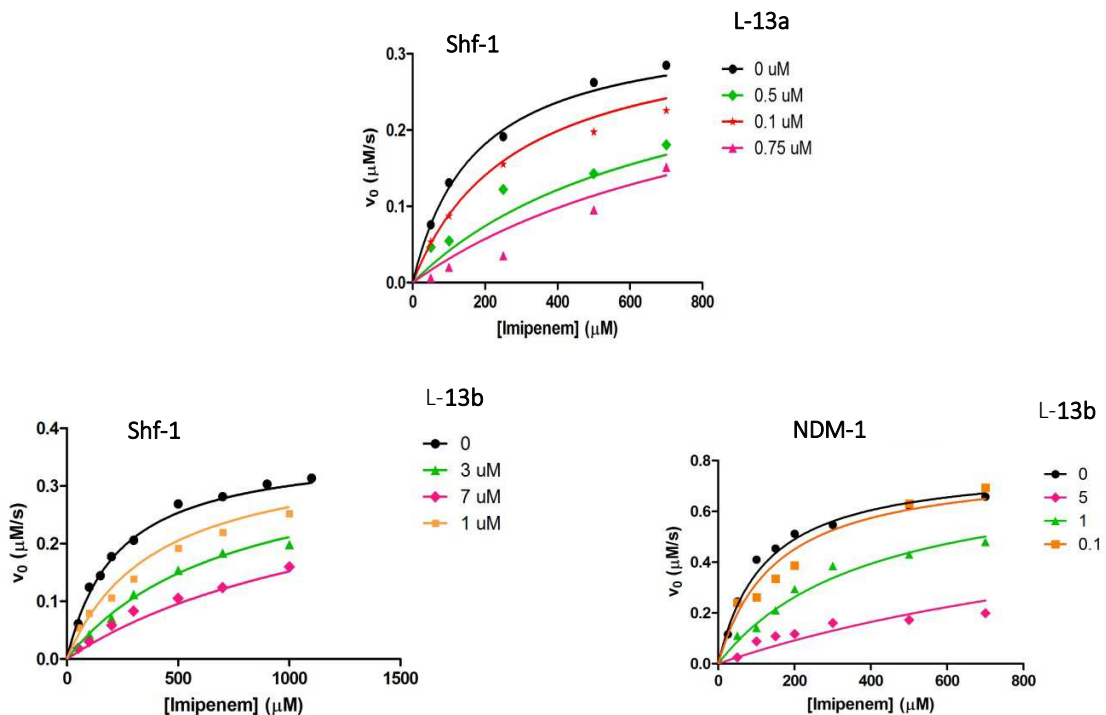


Figura 4. Inhibición *In vitro* de las tiazolidinas **13** frente a NDM-1 y Sfh-1. La velocidad inicial de hidrólisis de imipenem (0-1700 μM) por NDM-1 (1 nM) fue evaluada en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de las bistiazolidinas-1 (20-60 μM). El gráfico v_0 vs [imipenem] muestra el ajuste al modo de inhibición competitivo.

Actividad de L-1a frente a la glioxilasa II humana

El estudio de inhibición de L-1a frente a la hidroxiacilglutathion hidrolasa: glioxilasa II (hHAGH). Se realizó según el sistema hHAGH R&D. Se utilizó un lector UV de micropocillos (BMG Labtech Pheraster FS) y una placa de 96 pocillos (Greiner Bio-one). Se hizo por triplicado con una concentración de L-1a de 100 μM . El inhibidor se incubó 10 min con la glioxilasa II para luego agregar 0.5 mM S-lactoilglutathion con 200 μM DTNB. El seguimiento del sustrato se realizó a 450 nm en presencia de 0.2 ng/ μl de hHAGH. No se observó inhibición de L-1a frente a la glioxilasa II.

Ensayo citotoxicidad de L-1a en células de mamífero

Las células de HeLa y HEK 293 se cultivan en medio DMEM normal en una placa de 96 pocillos, de 5000 o 2000 células por pocillo, respectivamente. Luego de 24 h, se agrega L-1a con una concentración final de DMSO del 1%. La placa se tapa y se incuba por 24 h. Se agregan 20 μl de tetrazolium (MTS, CellTiter96Aqueous One Solution, Promega). Luego la placa se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ con 5% CO_2 por 4h en la oscuridad. Luego para determinar la proliferación celular se mide la absorbancia a 495 nm. No se observó citotoxicidad de L-1a en las células mamífero.

Ensayo de actividad inhibitoria de bistiazolidinas-1 en patógenos resistentes asilados de casos clínicos hospitalarios "Time Kill Cell"

Este estudio se realizó a cargo del Dr. Prof. Roberto Bonomo en 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.

Tres patógenos que expresan únicamente la metalo- β -lactamasa NDM-1, asilados de casos clínicos hospitalarios fueron utilizados para este ensayo, estos son: *Klebsiella pneumoniae* (imipenem MIC=8mg/l), *Providencia rettgeri* (imipenem MIC=64 mg/l) y *Acinetobacter baumannii* (imipenem MIC=128 mg/l). Cada uno de ellos se cultivaron en medio MHB con 50 mg/l ampicilina a 37 °C. Se dejan incubar por 24 hs. Se inoculan 1.5 μ l del cultivo en 1 ml de MHB hasta obtener una suspensión de 10^6 CFU/ml. Esta suspensión se deja a 37 °C en diferentes condiciones: 1) MHB sólo, 2) MHB con 0.4% DMSO, 3) con concentraciones subletales de imipenem (4 μ g/ml para *K. pneumoniae* y 16 μ g/ml para *A. baumannii* y *P. rettgeri*), 4) con 100 μ g/ml de inhibidor, con 3) y 4). Luego se toma una muestra de 10 μ l cada 100, 300, 500 min y se realizan diluciones seriadas con MHB. El número de células viables se determina con 20 μ l de cada dilución sembrada en MHA. Las placas se incuban a 37 °C y se cuenta el número de colonias; estas se realizan por triplicado. Los gráficos de Células viables (CFY/ml) vs t (min) se muestran en la Figura 5.

Las bistiazolidinas-1 no son agentes antimicrobianos ya que no se detecta una disminución en el crecimiento del cultivo celular al agregar los inhibidores respecto al control de crecimiento.

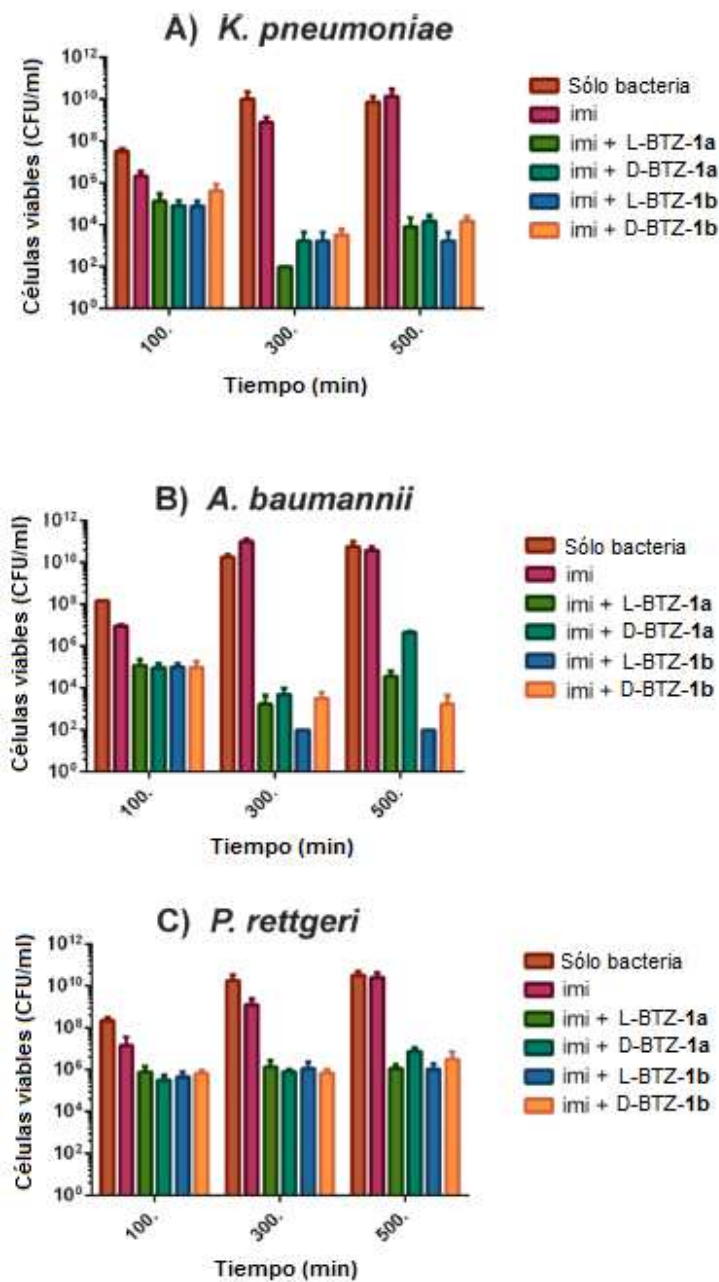


Figura 5. Actividad in vitro de las bistiazolidinas-1 frente a tres patógenos que expresan únicamente NDM-1, aislados de casos clínicos hospitalarios. **A)** *Klebsiella pneumoniae*, **B)** *Acinetobacter baumannii* y **C)** *Providencia rettgeri*. En ausencia y presencia de concentraciones subletales de imipenem (imi), como también en presencia de concentraciones subletales de imipenem y 100 µg/ml de bistiazolidinas-1. La viabilidad celular se evaluó por conteo de células a los 100, 300 y 500 min. Concentraciones subletales de imipenem 4 µg/ml para *K. pneumoniae* y 16 µg/ml para *A. baumannii* y *P. rettgeri*.

Determinación de la constante de inhibición al 50% (IC₅₀) de los compuestos frente a NDM-1 por ¹H RMN.

Los espectros de ¹H RMN se obtuvieron con Bruker Avance de 600 MHz equipado con probe TXI. El tubo de RMN se prepara con 500 µl de la suspensión células *E. coli* en buffer fosfato con 90% agua y 10% de agua deuterada. La preparación de la suspensión celular se describe en el punto 5.6. Luego se adicionan los inhibidores a distintas concentraciones en presencia de 500 µM de imipenem para la estimación de los valores de IC₅₀. La medida de las muestras preparadas se realizan con 64 scans a 25 °C.

Previo al calculo de IC₅₀ se confirmó por ¹H RMN que el sustrato imipenem es estable en el buffer de medida en presencia de células *E. coli* sin el gen *bla*_{NDM-1} (pMBLe), ver Figura 6. Pero al exponer 500 µM de imipenem frente a células *E. coli* con gen *bla*_{NDM-1} (pMBLeNDM-1) este se degrada entre 9 a 15 min.

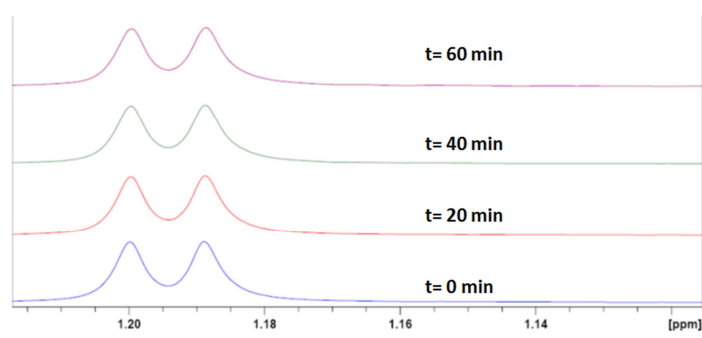


Figura 6. Estabilidad de imipenem durante el ensayo de ¹H RMN. No se observó hidrólisis de imipenem en 60 min de medida en buffer con células *E. coli* con pMBLe (OD₆₀₀=10) a 25 °C.

Además se confirma por ¹H RMN que no haya enzima libre en el medio de medida, asegurando que la actividad inhibitoria medida se deba a la acción del compuesto en el periplasma de la célula bacteriana, ver Figura 7.

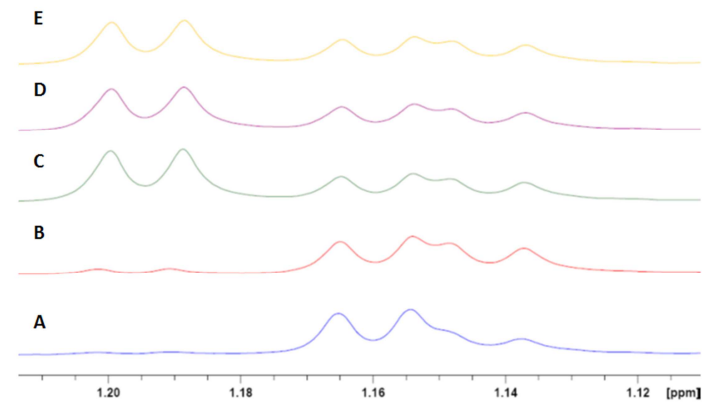


Figura 7. Hidrólisis de imipenem por NDM-1 en el periplasma de células *E. coli*. **A)** Espectro ^1H RMN de imipenem ($500\ \mu\text{M}$) expuesto a células de *E. coli* con pMBLeNDM-1 ($\text{OD}_{600} = 0.1$) por 30 min en el imán del RMN, **B)** Espectro ^1H RMN del sobrenadante de la muestra **A)** luego de 1 h en el imán de RMN. **C, D y E)** Espectro ^1H RMN del sobrenadante de la muestra **B)** al agregar $500\ \mu\text{M}$ de imipenem a 0, 120 y 240min en el imán de RMN, respectivamente. Todas las muestras se prepararon en buffer 50 mM de fosfato de sodio a pH 7.0 con un 10% de agua deuterada. El sobrenadante de la suspensión celular se obtiene mediante centrifugación a 1000 g por 10 min a $4\ ^\circ\text{C}$ y filtración con filtro de $0.22\ \mu\text{M}$.

También se confirma la viabilidad celular durante 1 h de medida en el RMN, ver figura 8. Para ello se realizan diluciones seriadas de 10^2 a 10^8 de las suspensiones celulares de *E. coli* empleadas para este ensayo (placas A, B y C), ver Figura 8. Luego $10\ \mu\text{l}$ de cada dilución se siembran en placas de agar LB con $25\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina. Las placas se dejan secar y se incuban a $37\ ^\circ\text{C}$ toda la noche.

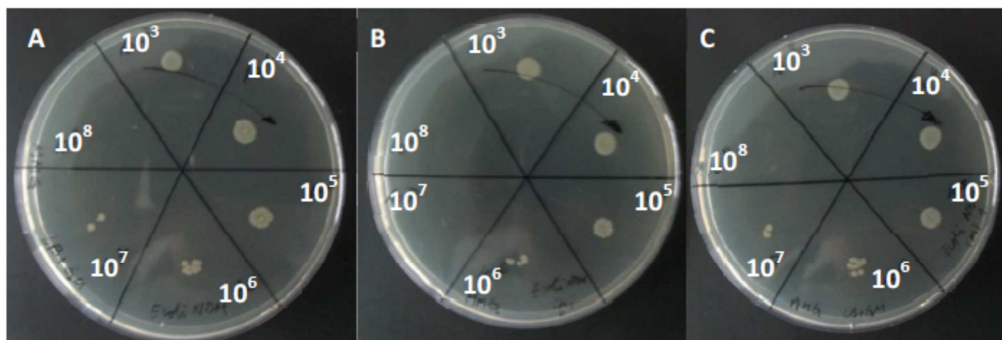


Figura 8 Ensayo de viabilidad de células *E. coli* con pMBLeNDM-1 posterior a los experimentos de RMN. Las células utilizadas son del mismo lote de producción. Las colonias de placa A no se expusieron a imipenem. Las colonias de la placa B son células expuestas a $500\ \mu\text{M}$ imipenem antes del ensayo de RMN y la placa C son las colonias expuestas a $500\ \mu\text{M}$ imipenem después de 1 h en el imán de RMN. Se visualizó la dilución de 10^6 para evaluar la viabilidad celular, demostrándose que no hay cambios en el crecimiento bacteriano al someterse a las condiciones de RMN ya que en las tres placas (A, B y C) se obtuvieron de 6 a 8 colonias aisladas.

Los valores de IC_{50} se realizan según Dalvit y col⁸; para ello se calcula el porcentaje de inhibición a los 15 min del 1H RMN según la **ecuación 1**:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times \frac{[1 - ([S_{TOT}] - [S_W])]}{([S_{TOT}] - [S_{W/O}])}$$

Donde $[S_W]$ y $[S_{W/O}]$ están dados por la integración de las señales de imipenem en el 1H RMN (1.21-1.18 ppm) en presencia y ausencia del inhibidor, respectivamente. Siendo $[S_{TOT}]$ la suma de $[S_{W/O}] + [P_{W/O}]$ o $[S_W] + [P_W]$, donde $[P_{W/O}]$ o $[P_W]$ son las integrales del producto de hidrólisis de imipenem (1.17-1.12 ppm) en presencia o ausencia del inhibidor, respectivamente. Los valores de IC_{50} se pueden determinar con la siguiente **ecuación 2**:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times \left(1 - \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}} \right)^n} \right) \right)$$

Siendo $[I]$ la concentración del inhibidor y n es el factor cooperatividad.

Se obtuvieron los siguientes gráficos para la cuatro bistiazolidinas-1 frente a la metalo- β -lactamasa NDM-1, Figura 9:

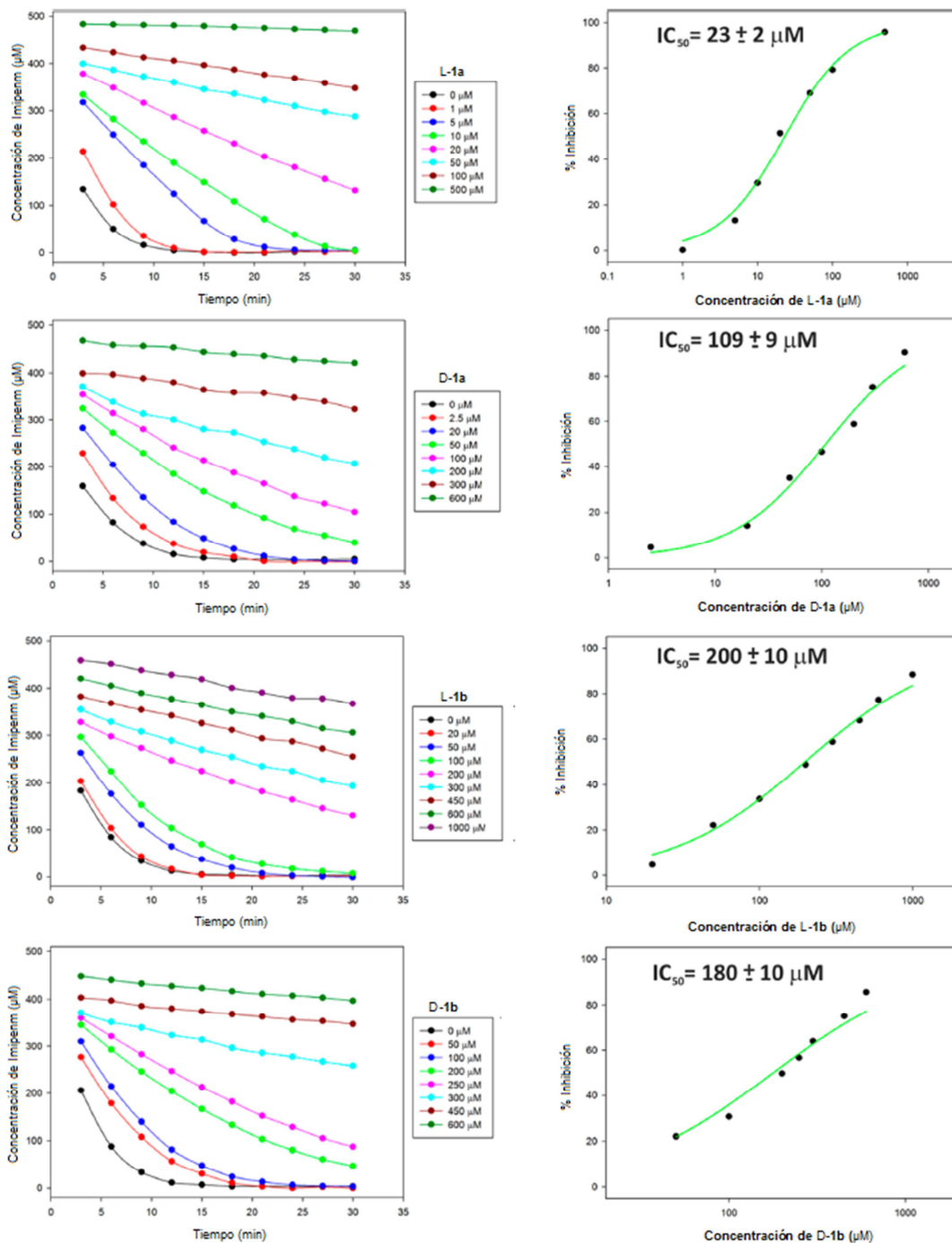


Figura 9. Inhibición de bistiazolidinas-1 frente células *E. coli* que expresan a NDM-1. Concentración de imipenem a lo largo del tiempo según la integración de sus señales en el 1H RMN, a diferentes concentraciones del inhibidor (ecuación 1). Cálculo de IC_{50} según la ecuación 2.

5.8 Estructura cristalina de los complejos metalo- β -lactamasa: L-1^a

La determinación estructural de los complejos M β L:BTZ-1 por difracción de rayos X estuvieron a cargo del Dr. Prof. James Spencer en School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol-UK.

NDM-1:L-1a

Para la obtención de los cristales se utiliza una solución de 35 mg/ml NDM-1, preparada según lo descrito en el punto 5.5. Para la cristalización se utilizan 100 mM MES, pH 6.5, 25% (p/v) monometil éter PEG 200. Se dejan en contacto con una solución 5 mM de L-1^a al 5% de DMSO por 10 min. Se agrega 25% de glicerol y se congela con nitrógeno líquido. Para la difracción de rayos x se utiliza un detector Pilatus M2 asociado a un sincrotrón con fuente de luz de diamante (línea de luz I041; Didcot, UK). Los datos fueron integrados con el programa XDS y la asignación de grupos en el espacio fue realizada por POINTLESS, implementada de acuerdo a XIA2 crystallography y escalada con SCALA en conjunto con CCP4 crystallography suite. La estructura fue resuelta a través del remplazo molecular con PHASER utilizando como modelo inicial la enzima sin ligando (PDB 3SPU). El modelo se reconstruye con COOT y se realiza el refinamiento con PHENIX. La calidad de la estructura final se obtuvo con MolProbity.

VIM-2:L-1a

Condiciones de cocrystalización, se mezcla 15 mg/ml de VIM-2 (preparada según lo descrito en el punto 5.5) con 10 mM de L-1^a disuelto en DMSO. La concentración final de DMSO es \leq 10% (p/p). La calidad de difracción de los cristales se obtiene de 0.1 M N,N-Bis(2-hidroxiethyl)glicina (Bicine), pH 9.0 y 65% de 2-metil-2,4-pentanodiol. Los cristales se colocan en el loop y se congelan con nitrógeno líquido. La difracción de rayos x y el procesamiento de datos se realizan de manera análoga a lo descrito para NDM-1. El modelo inicial de la proteína es PDB1KO3. En este caso se utiliza para refinar el modelo Refmac5 en vez de PHENIX.

Sfh-1:L-1a

Se cristaliza por difusión de vapor por gota colgante utilizando 0.1 M nitrato de amonio, 3% (v/v) isopropanol y 25 % (p/v) PEG 3350. Los cristales se obtienen después de 2-3 días a 20 °C⁹. Para obtener cristales del complejo proteína-inhibidor se dejan en contacto por 15-30 min con una solución 2-5 mM de la bistiazolidina-1 con crioprotector (0.02 M HEPES, pH 7.5, 0.12 M acetato de sodio, 14% PEG 3350, 20% glicerol y 2 mM TCEP). Para la difracción de rayos x y procesamiento de datos se procede de manera análoga a NDM-1. El modelo inicial de proteína es PDB 3SD9. En este caso el refinamiento de la estructura final se realiza con Refmac5.

L1:L-1a

Se cristaliza por difusión de vapor por gota colgante a 4 °C, se utiliza para la formación de la gota los siguientes agente de precipitación (100 mM HEPES, pH 7.5, 2.0 M (NH₄)₂SO₄, 1.5% (p/p) PEG

400) y se equilibra contra 500 μ l. Para obtener cristales del complejo proteína-inhibidor se dejan en contacto por 15-30 min con una solución 2-5 mM de la bistiazolidina-1 con crioprotector (0.05 M HEPES, pH 7.5, 1.75 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.25% PEG 400, 25% glicerol y 2 mM TCEP). Para la difracción de rayos x y procesamiento de datos se procede de manera análoga a NDM-1. Para el modelo inicial de proteína se utiliza PDB 1SML.

Datos recabados de la estructura cristalina de los complejos de L-1a con Sfh-1 y L1; D-1a con Bcll y L1; L-1b con IMP-1 y L1; D-1b con L1.

	IMP-1:L-1b	IMP-1:D-1a	IMP-1	Bcll:D-1a	Sfh-1:L-1a	L1:D-1b	L1:L-1a	L1:D-1a
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$C2_1$	$P2_1$	$P6_422$	$P6_422$	$P6_422$
Molecules/ASU	4	4	4	1	2	1	1	1
Cell dimensions								
<i>a, b, c</i> (Å)	49.05, 78.45, 260.61	48.56, 77.70, 261.89	49.19, 78.00, 260.13	53.08, 61.28, 69.51	32.77, 86.70, 72.23	105.13, 105.13, 98.17	104.98, 104.98, 98.47	104.96, 104.96, 98.83
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 93.04, 90.0	90.0, 90.09, 90.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
Wavelength	0.92	0.9686	0.96862	1.5418	0.97949	0.97949	0.97623	0.9686
Resolution (Å)	29.82 – 2.30 (2.38 – 2.30)	37.24 – 2.30 (2.38 – 2.30)	35.57 – 1.98 (2.03 – 1.98)	40.09 – 1.80 (1.86- 1.80)	19.42 – 1.30 (1.32 – 1.30)	30.35 – 1.8 1.80	30.87 – 1.63 (1.66 – 1.627)	28.97 – 1.84 (1.88 – 1.84)
R_{merge}	0.109 (0.521)	0.190 (1.530)	0.200 (0.779)	0.272 (0.760)	0.118 (0.413)	0.180 (0.858)	0.084 (0.65)	0.213 (0.778)
$I / \sigma I$	18.3 (4.2)	11.60 (3.10)	5.8 (2.2)	4.0 (1.30)	7.6 (3.6)	21.69 (4.29)	41.04 (6.0)	16.9 (5.6)
Completeness (%)	99.9 (99.9)	100 (99.8)	99.0 (98.0)	97.8 (81.7)	97.6 (95.5)	100 (100)	99.7 (94.1)	99.4 (90.3)
Redundancy	10.3 (9.9)	17.7 (18.1)	9.5 (8.3)	4.2 (2.7)	5.8 (5.9)	33.8 (34.9)	65.3 (27.3)	37.9 (32.2)
Refinement								
Resolution (Å)	29.82 – 2.30	37.24 – 2.30	35.57 – 1.98	40.09 – 1.80	19.42 – 1.30	30.35 – 1.80	30.87 – 1.63	28.97 – 1.84
No. reflections	45814	45125	69452	19247	91618	30208	40522	28142
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	22.20 / 18.20	17.77 / 22.03	17.21 / 20.45	19.3 / 24.4	16.02 / 18.86	16.55 / 19.57	15.74 / 18.18	14.79 / 19.49
No. atoms								
Protein	6870	6888	6892	1718	3717	2015	2012	2006
Solvent/Zn	337	338	510	140	605	283	340	337
Inhibitor	45 (3)	52 (4)	-	13 (1)	26 (2)	15 (1)	13 (1)	13 (1)
R.m.s. deviations								
Bond lengths (Å)	0.008	0.009	0.008	0.017	0.0110	0.008	0.016	0.007
Bond angles (°)	1.18	1.18	1.12	1.871	1.5689	1.05	1.573	1.04
Ramchandran (%)								
Outliers	0.0	0.0	0.5	0.32	0.4	0.0	0.0	0.0
Favoured	97.2	97.7	97.4	96.43	97.0	95.6	96.4	96.4

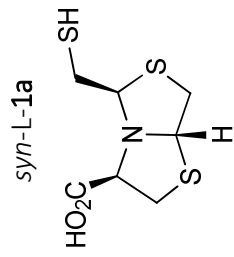
Bibliografía

- (1) Perrin D, A. W. *Purification of Laboratory Chemicals*; Pergamon Press: Oxford, 1988.
- (2) Keiko, N. A.; Stepanova, L. G.; Verochkina, E. A.; Chuvashhev, Y. A. Synthesis and properties of alkylthioethanals. *Arkivoc* **2011**, No. 10, 127–138.
- (3) Carcel, C. M.; Laha, J. K.; Loewe, R. S.; Thamyongkit, P.; Karl-Heinz Schweikart, V. M.; David F. Bocian, J. S. L. Porphyrin Architectures Tailored for Studies of Molecular Information Storage. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (20), 6739–6750 DOI: 10.1021/jo0498260.
- (4) Qvit, N.; Reuveni, H.; Gazal, S.; Zundevich, A.; Blum, G.; Niv, M. Y.; Alexandra Feldstein, S. M.; Shalev, D. E.; Friedler, A.; Chaim Gilon. Synthesis of a Novel Macrocyclic Library: Discovery of an IGF-1R Inhibitor. *J. Comb. Chem.* **2008**, *10* (2), 256–266 DOI: 10.1021/cc700113c.
- (5) Sharma, R. K.; Tam, J. P. Tandem Thiol Switch Synthesis of Peptide Thioesters via N–S Acyl Shift on Thiazolidine. *Org. Lett.* **2011**, *13* (19), 5176–5179 DOI: 10.1021/ol202047q.
- (6) Nagasawa, H. T.; Goon, D. J. W.; Crankshaw, D. L.; Vince, R.; Patterson, S. E. Novel , Orally Effective Cyanide Antidotes. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (26), 6462–6464 DOI: 10.1021/jm7011497.
- (7) Rydzik, A. M.; Brem, J.; van Berkel, S. S.; Pfeffer, I.; Makena, A.; Claridge, T. D. W.; Schofield, C. J. Monitoring 851 conformational changes in the NDM-1 metallo- β -lactamase by ¹⁹F ⁸⁵² NMR spectroscopy. *Angewandte* **2014**, *53* (12), 3129–3133 DOI: 10.1002/anie.201310866.
- (8) Dalvit, C.; Ardini, E.; Fogliatto, G. P.; Mongelli, N.; Veronesi, M. Reliable high-throughput functional screening with 3-FABS. *Drug Discov. Today* **2004**, *9* (14), 595–602 DOI: 10.1016/S1359-6446(04)03161-7.
- (9) Fonseca, F.; Bromley, E. H. C.; Saavedra, M. J.; Correia, A.; Spencer, J. Crystal structure of serratia fonticola Sfh-1: Activation of the nucleophile in mono-zinc metallo-beta-lactamases. *J. Mol. Biol.* **2011**, *411* (5), 951–959 DOI: 10.1016/j.jmb.2011.06.043.

Anexo

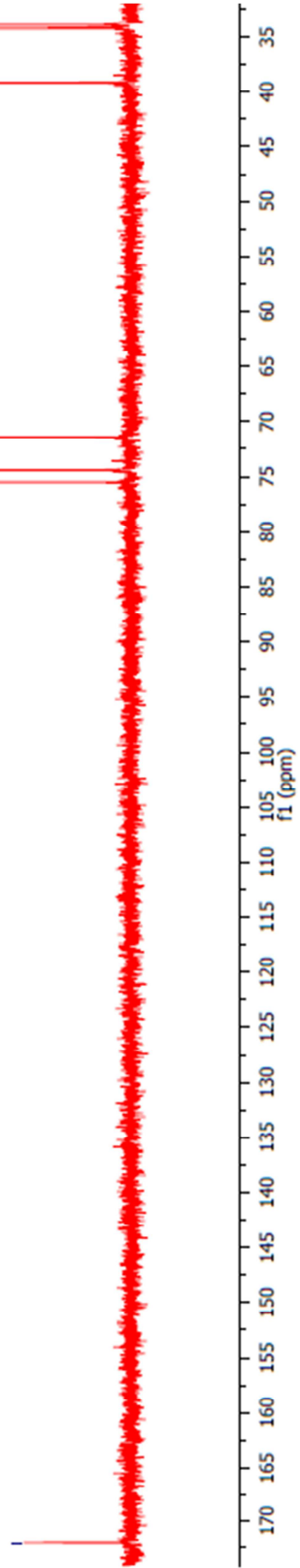
ca. 8662
Cajalía CS319 puro

172.80

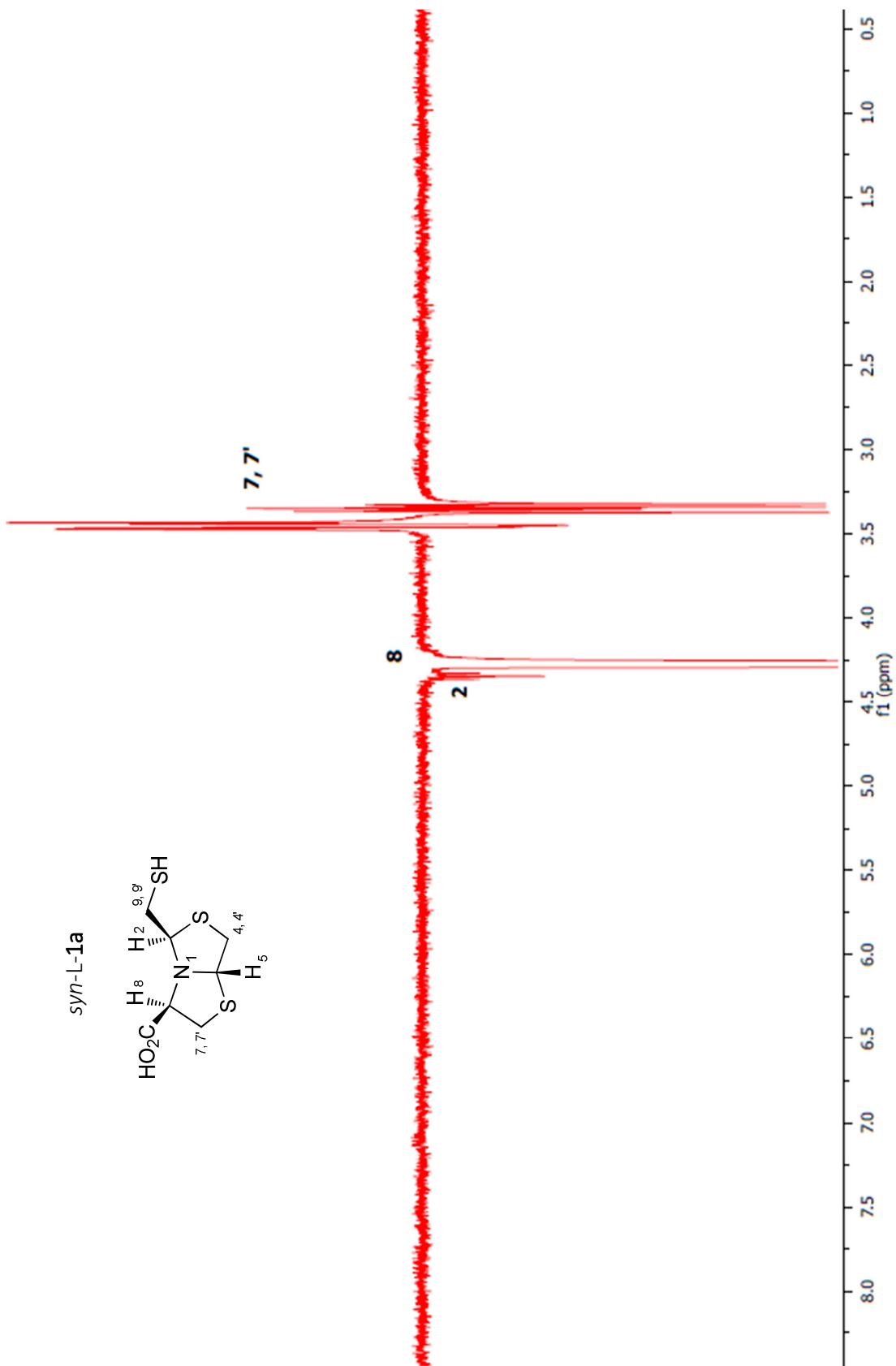
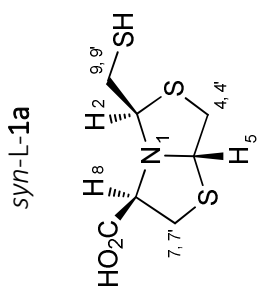


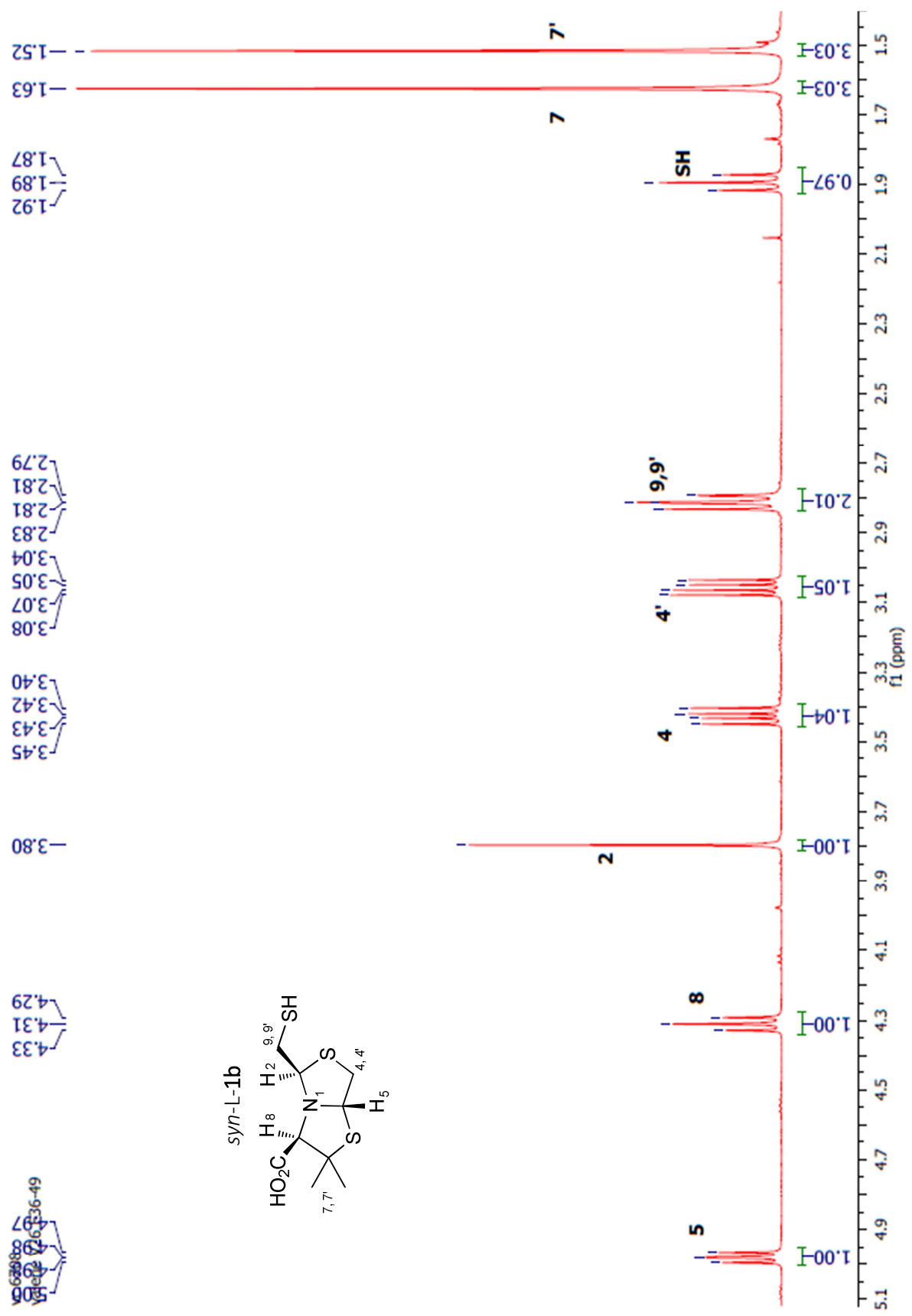
39.14
34.21
33.90

75.51
74.43
71.41

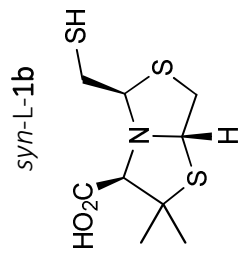
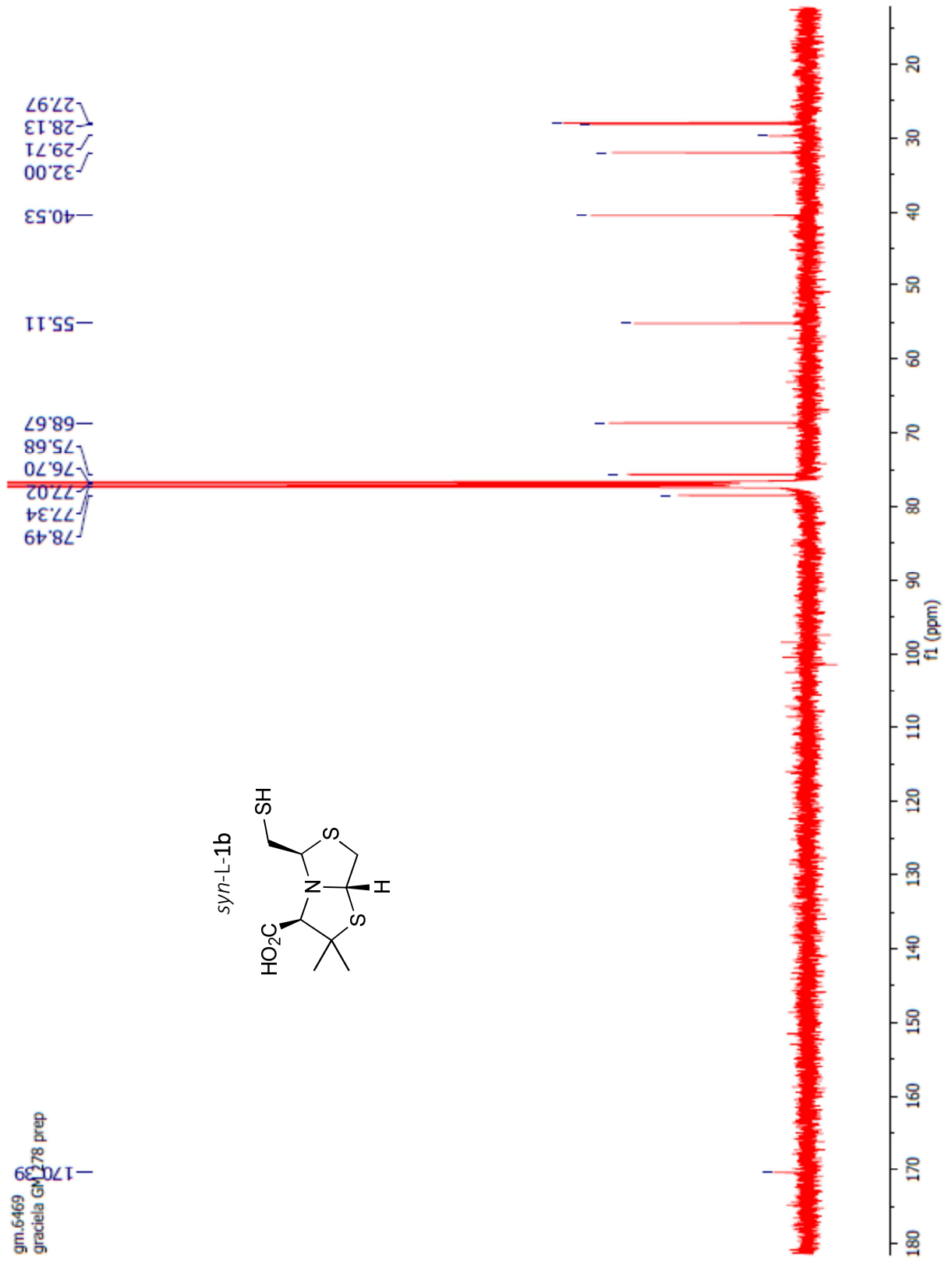


gm14821-NOESY 319 Julio2014
graciela LC26 NOE 4.27 ppm

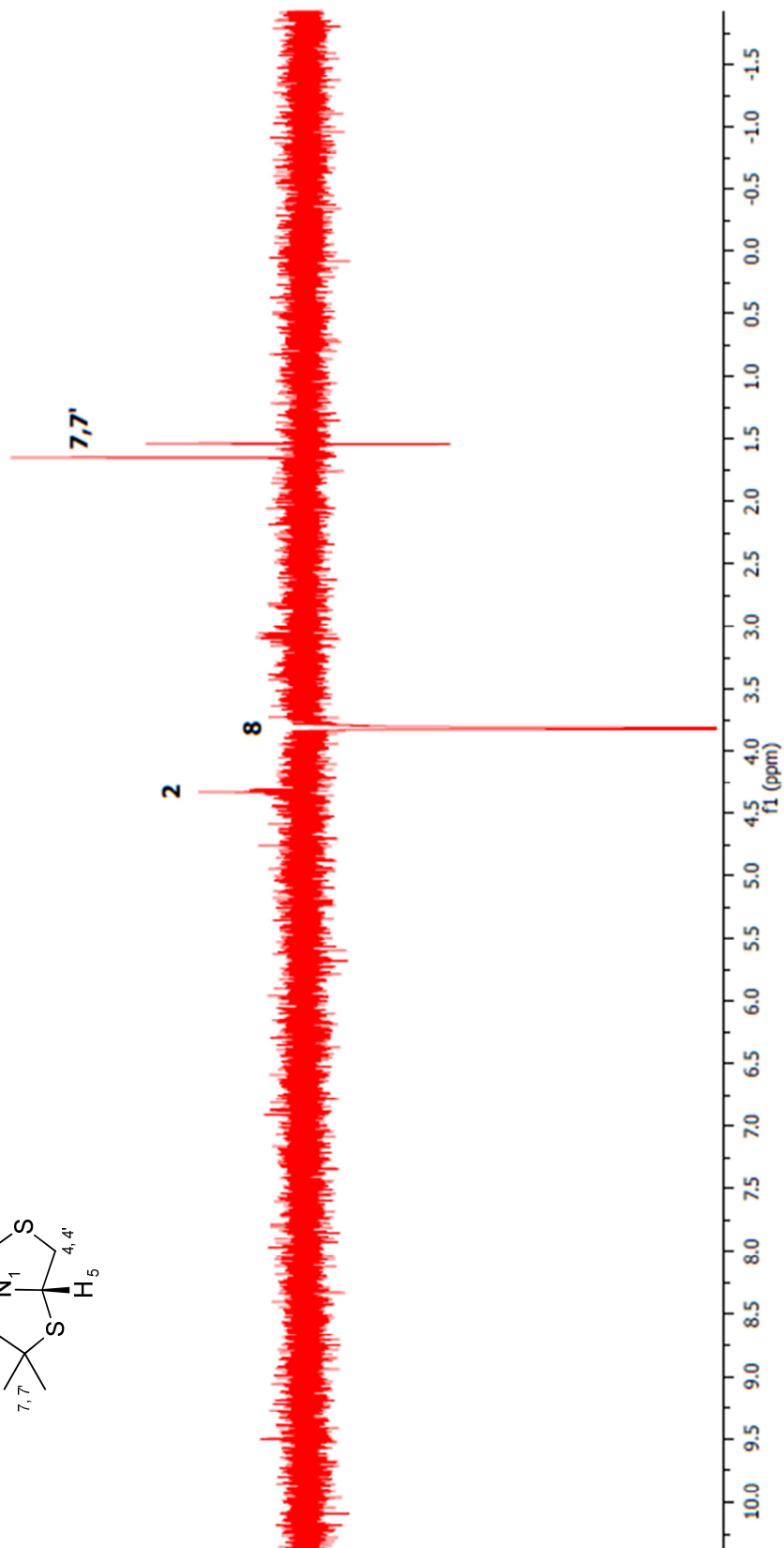
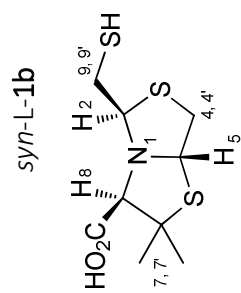


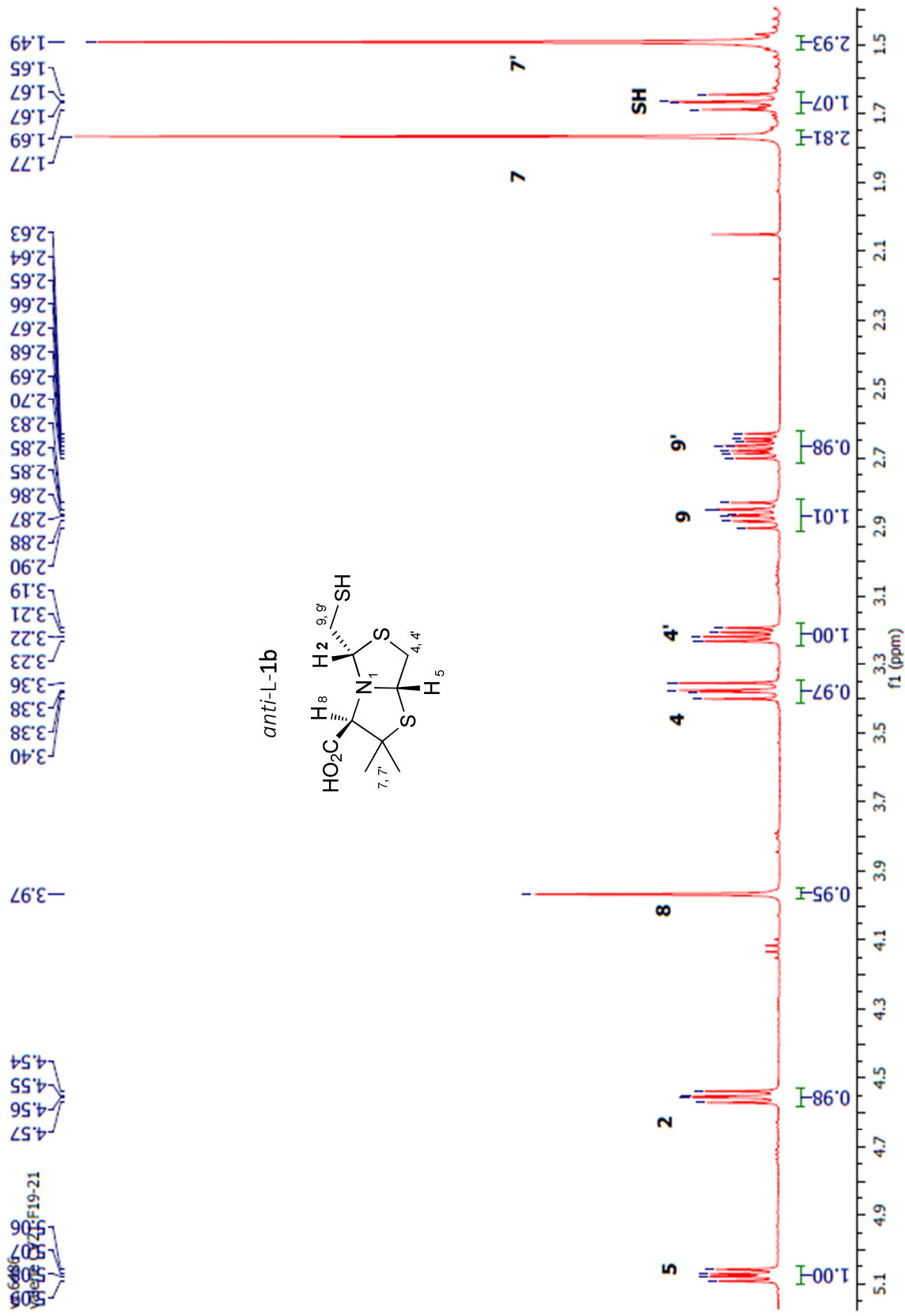


gm.6469
graciela GM 278 prep



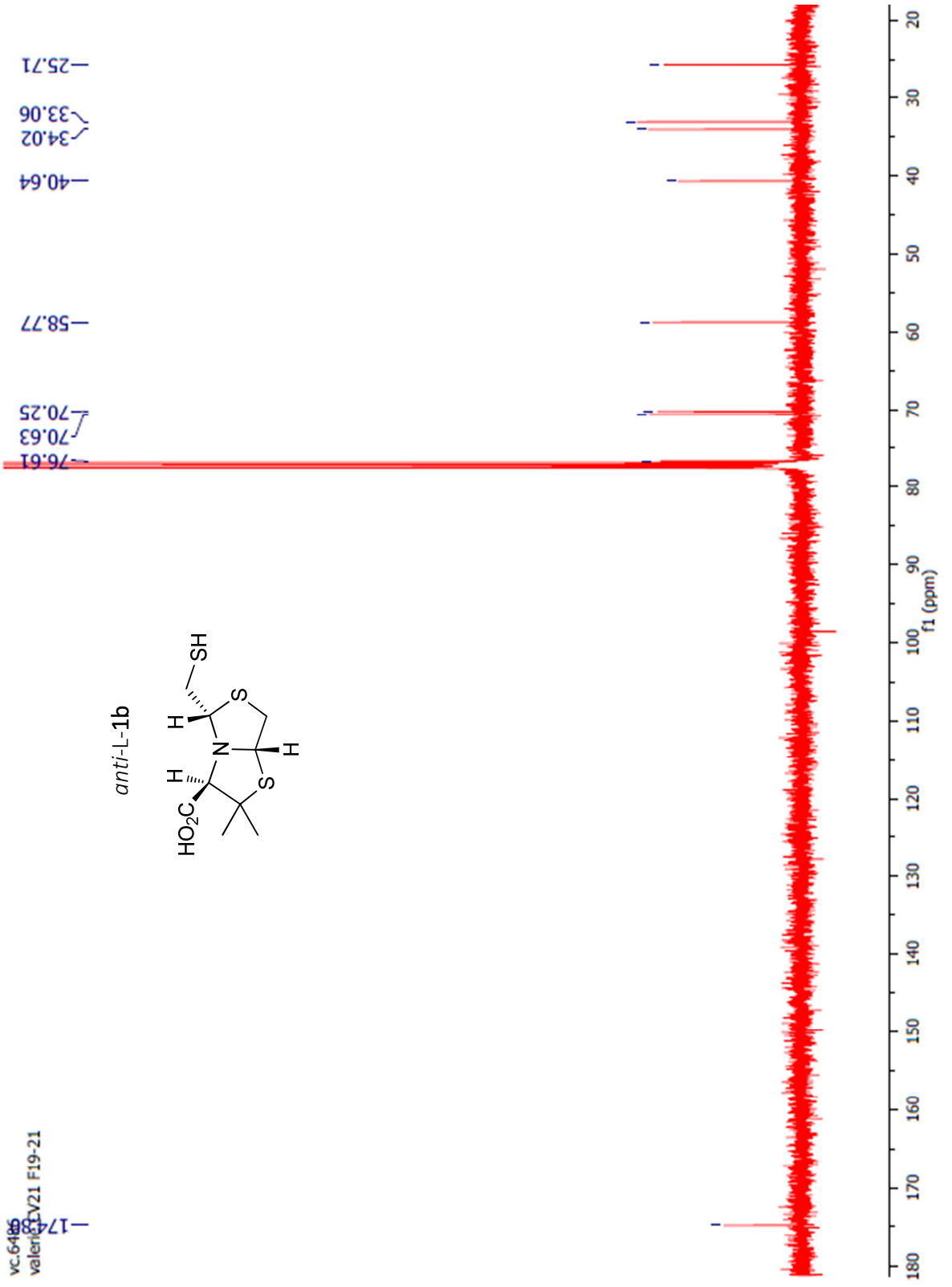
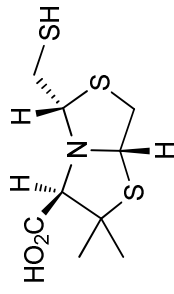
vc.6708
valerie V26 F36-49 NOE d=3.8 ppm

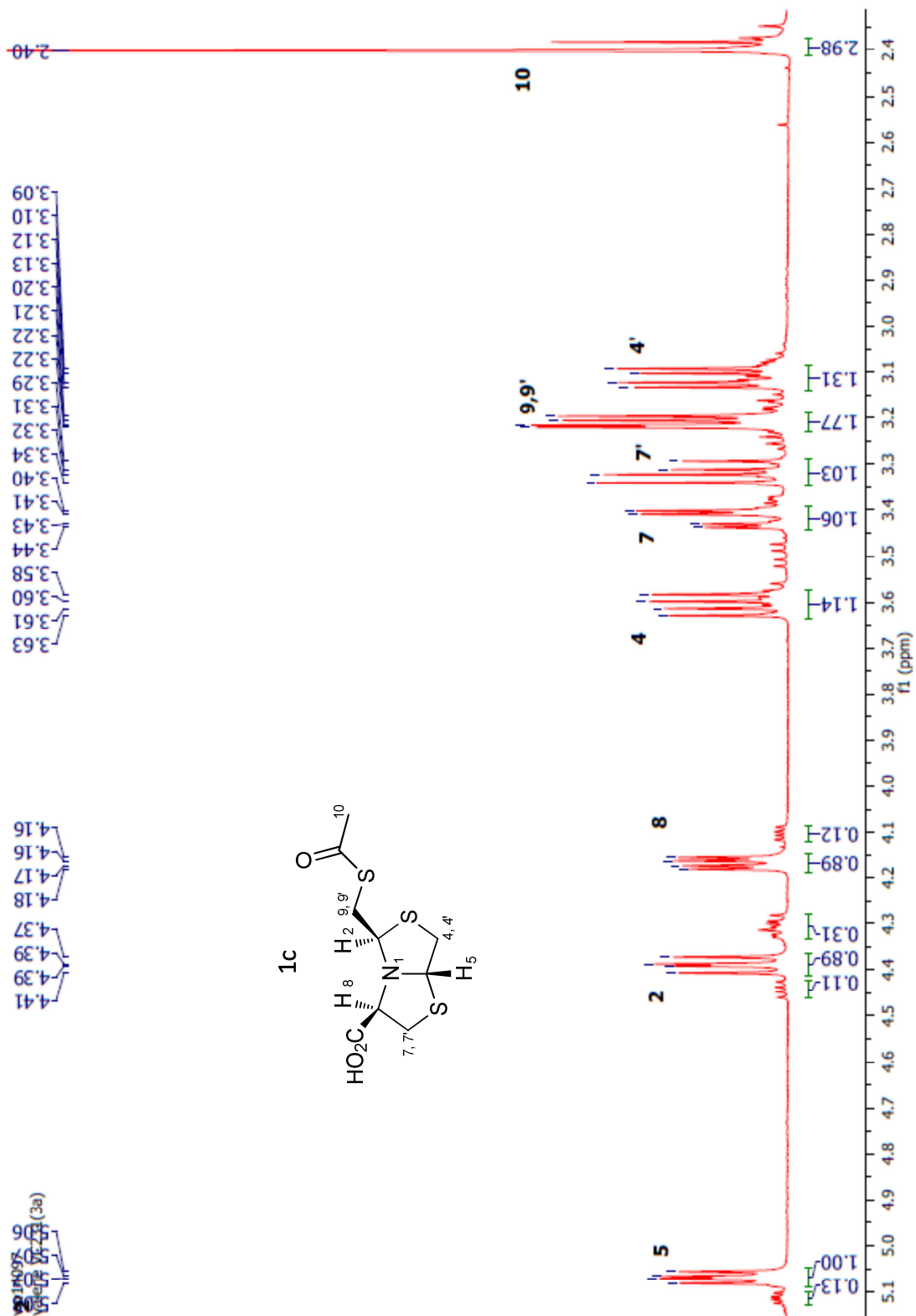


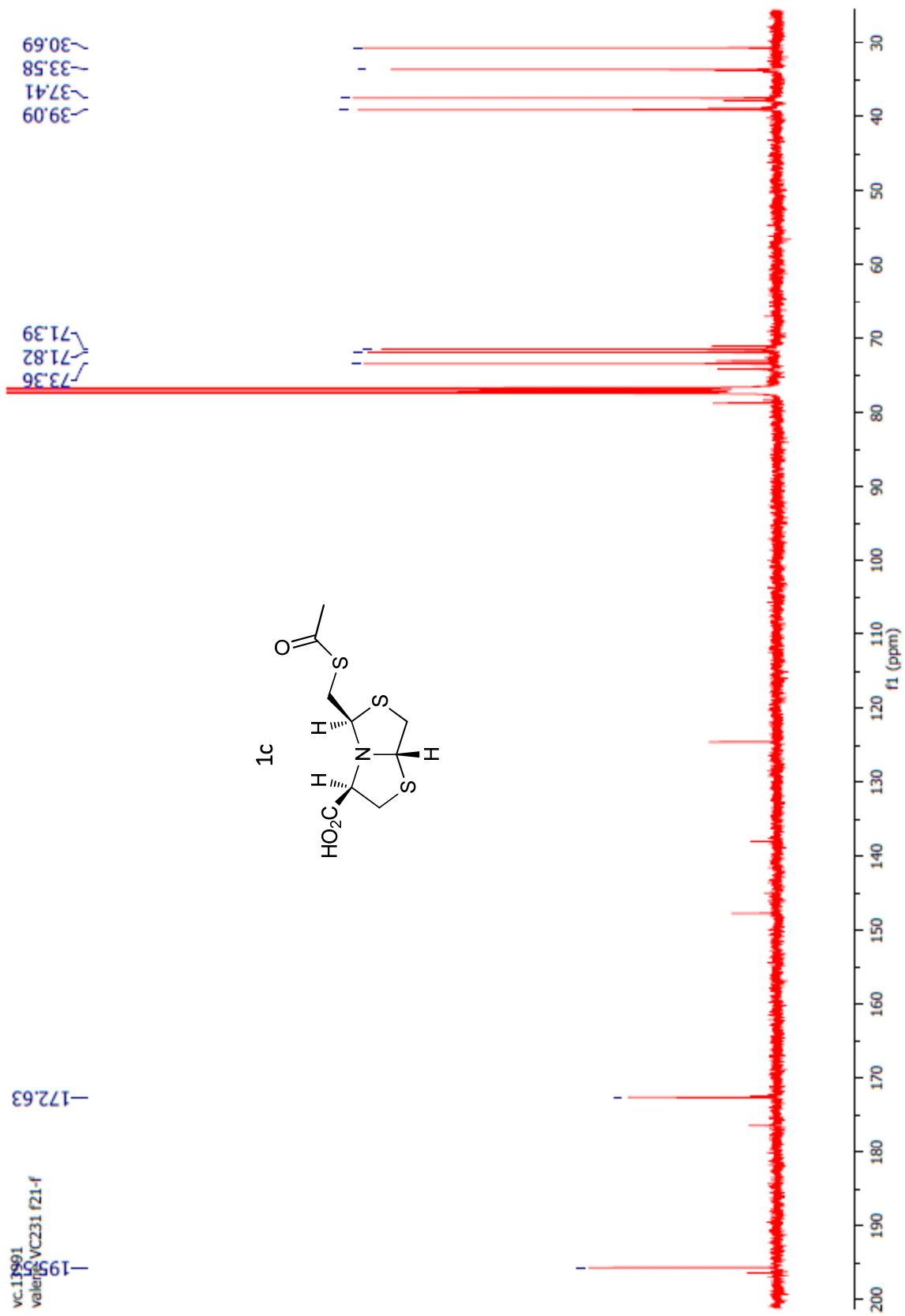


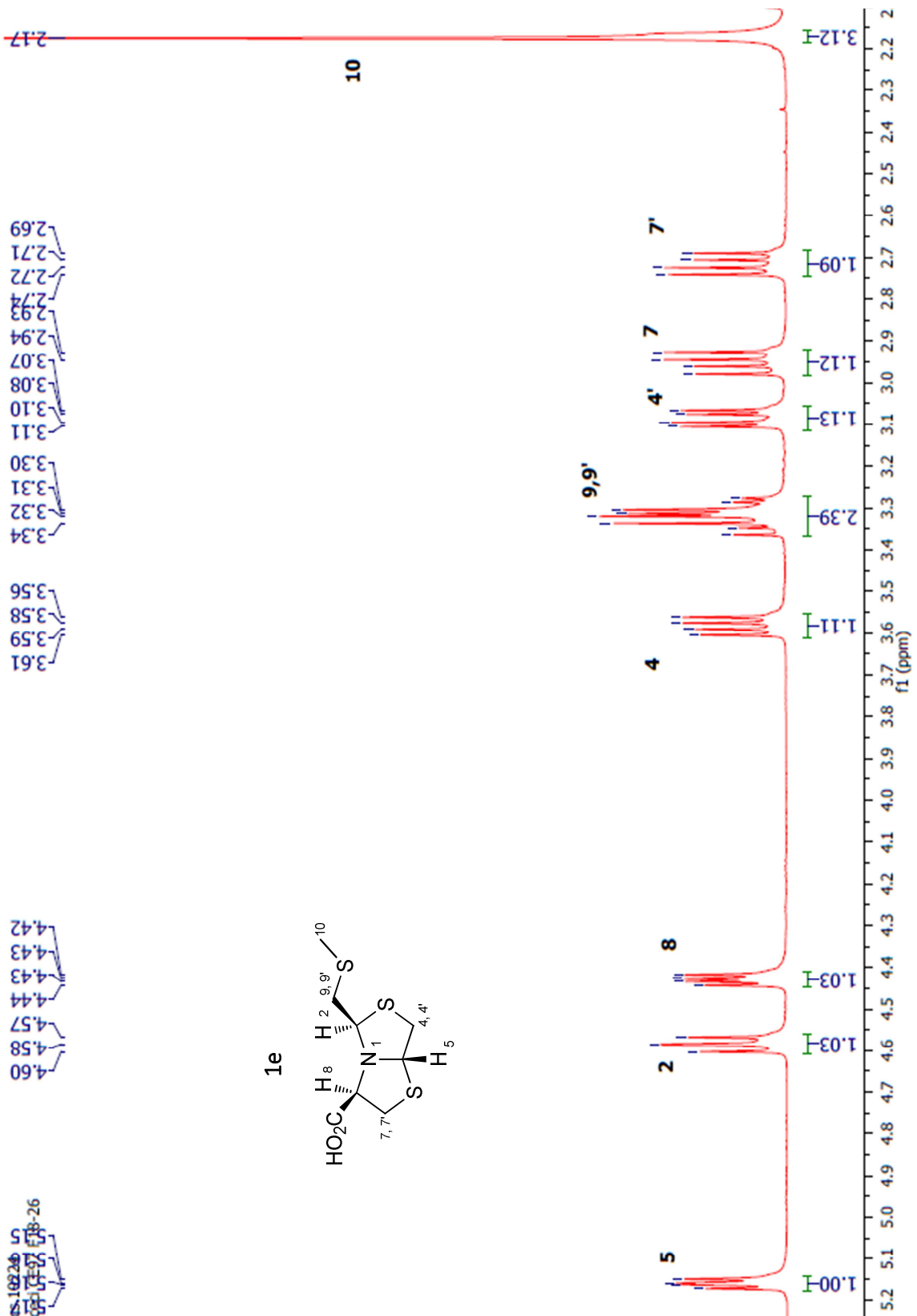
vc.6486
valeri
17438
21 F19-21

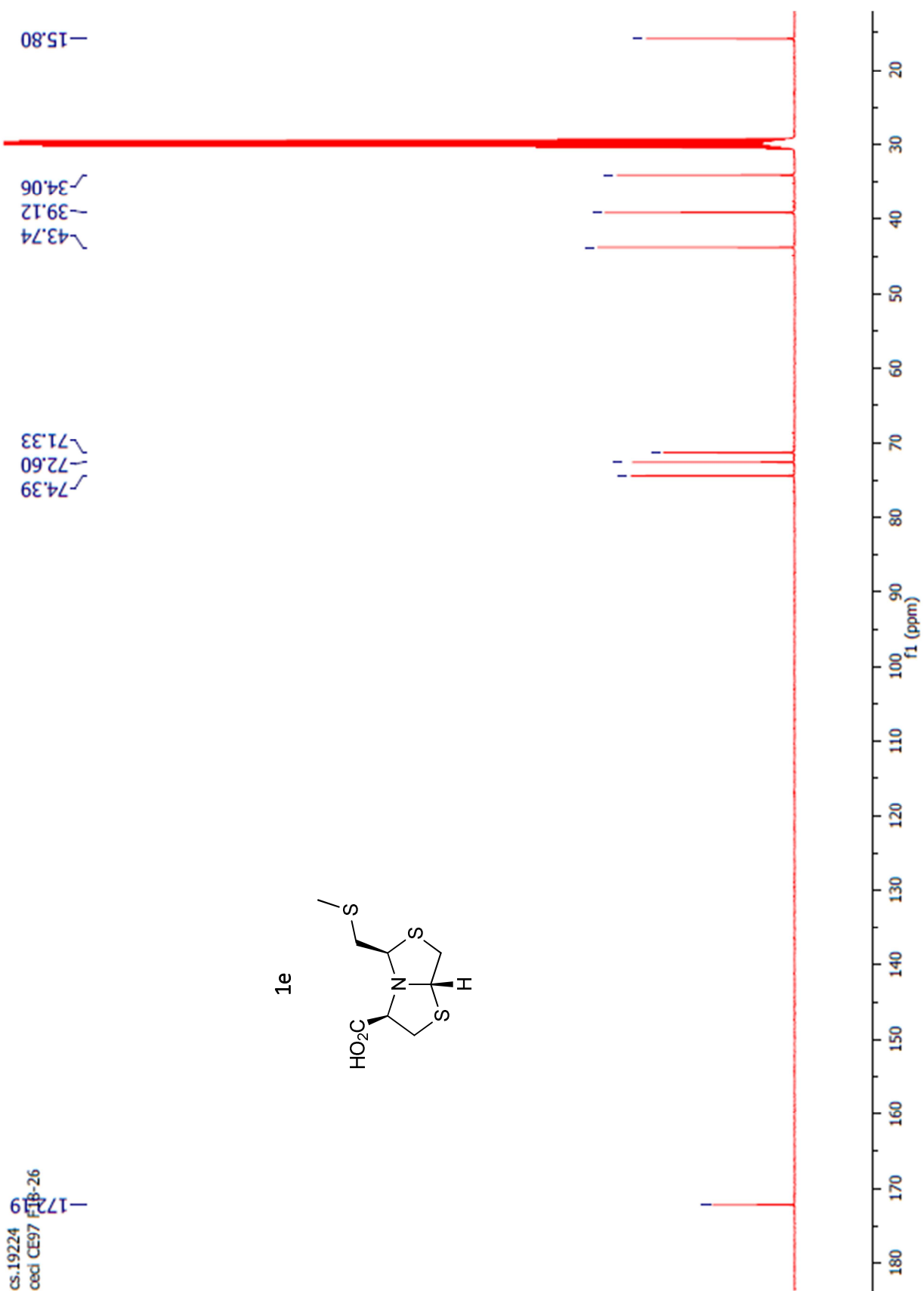
anti-L-1b











cs.19224
ced CE97 F18-26

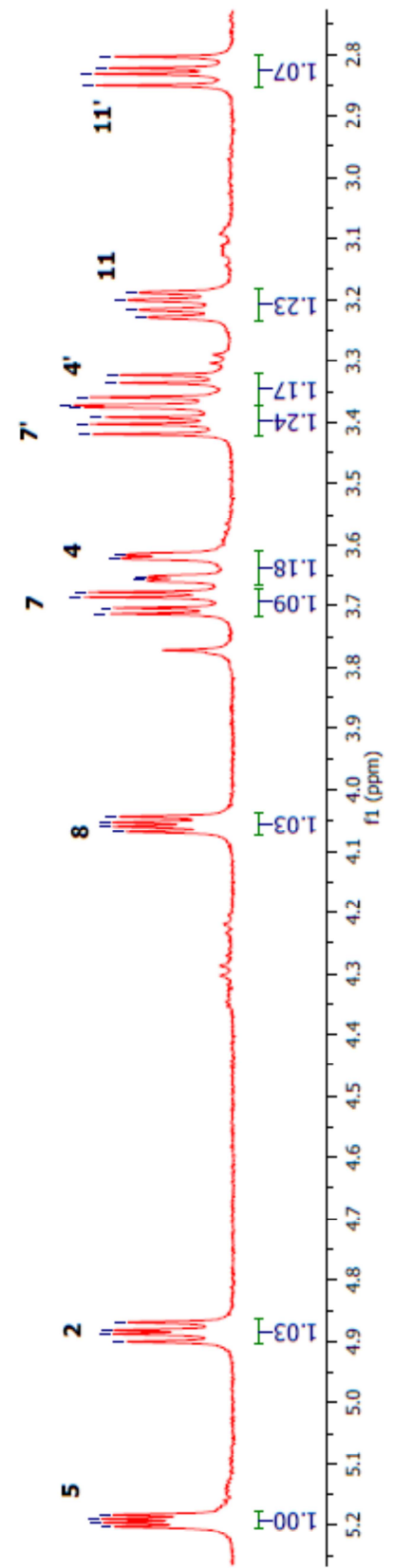
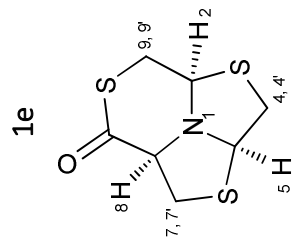
2.85
2.83
2.82
2.80

3.19
3.20
3.22
3.23
3.36
3.37
3.38
3.40
3.42

3.62
3.62
3.65
3.66
3.68
3.69
3.70
3.71

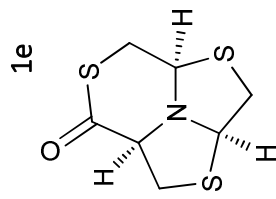
4.04
4.05
4.06
4.07

4.87
4.88
4.89
4.90
13-36
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36



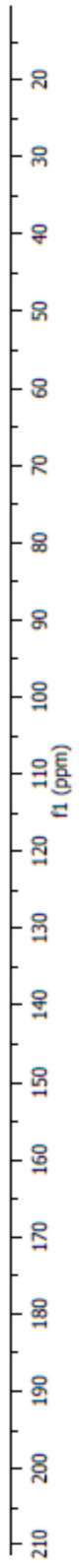
vc.15240
valerie VC15240 f18-29

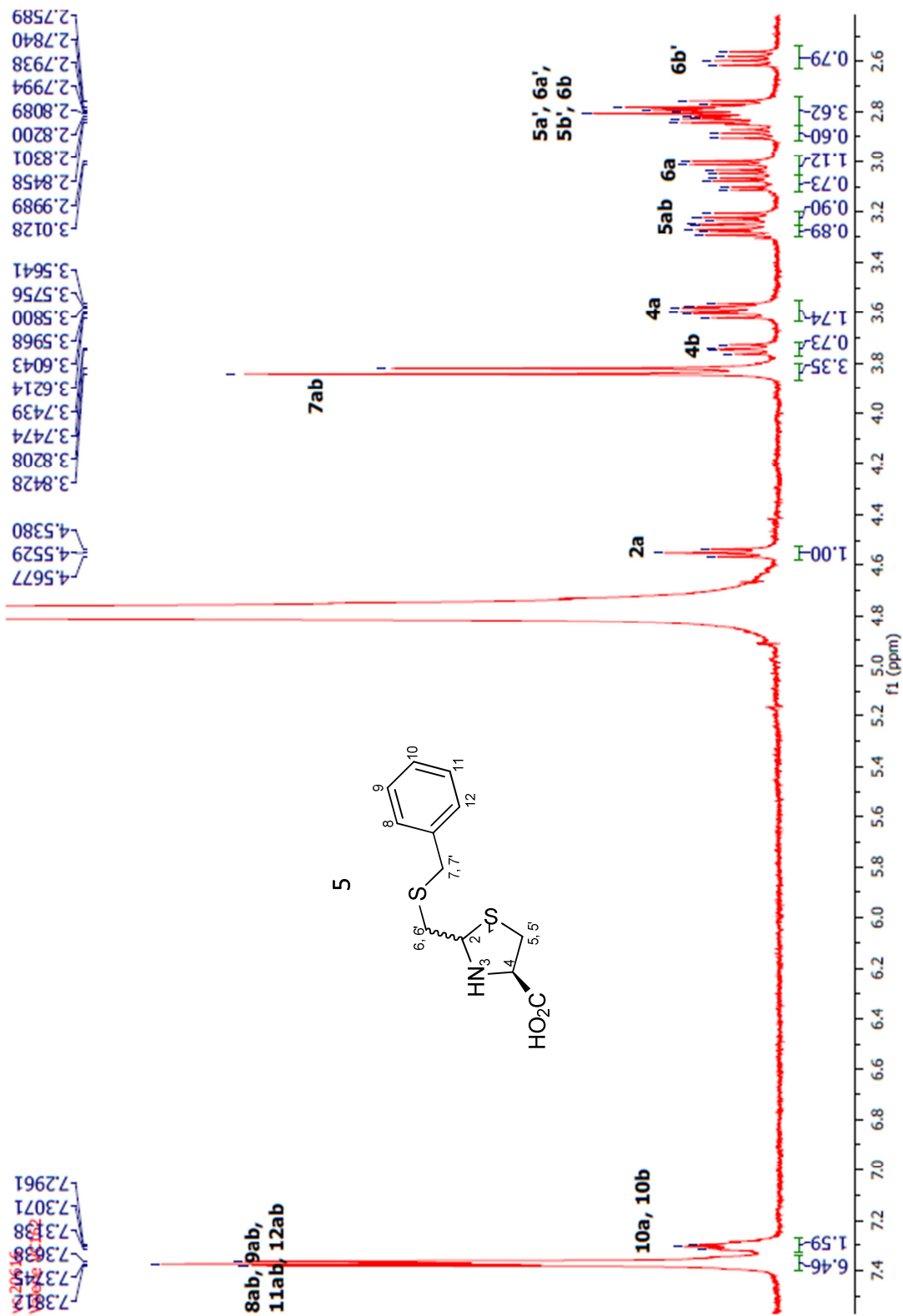
198.00

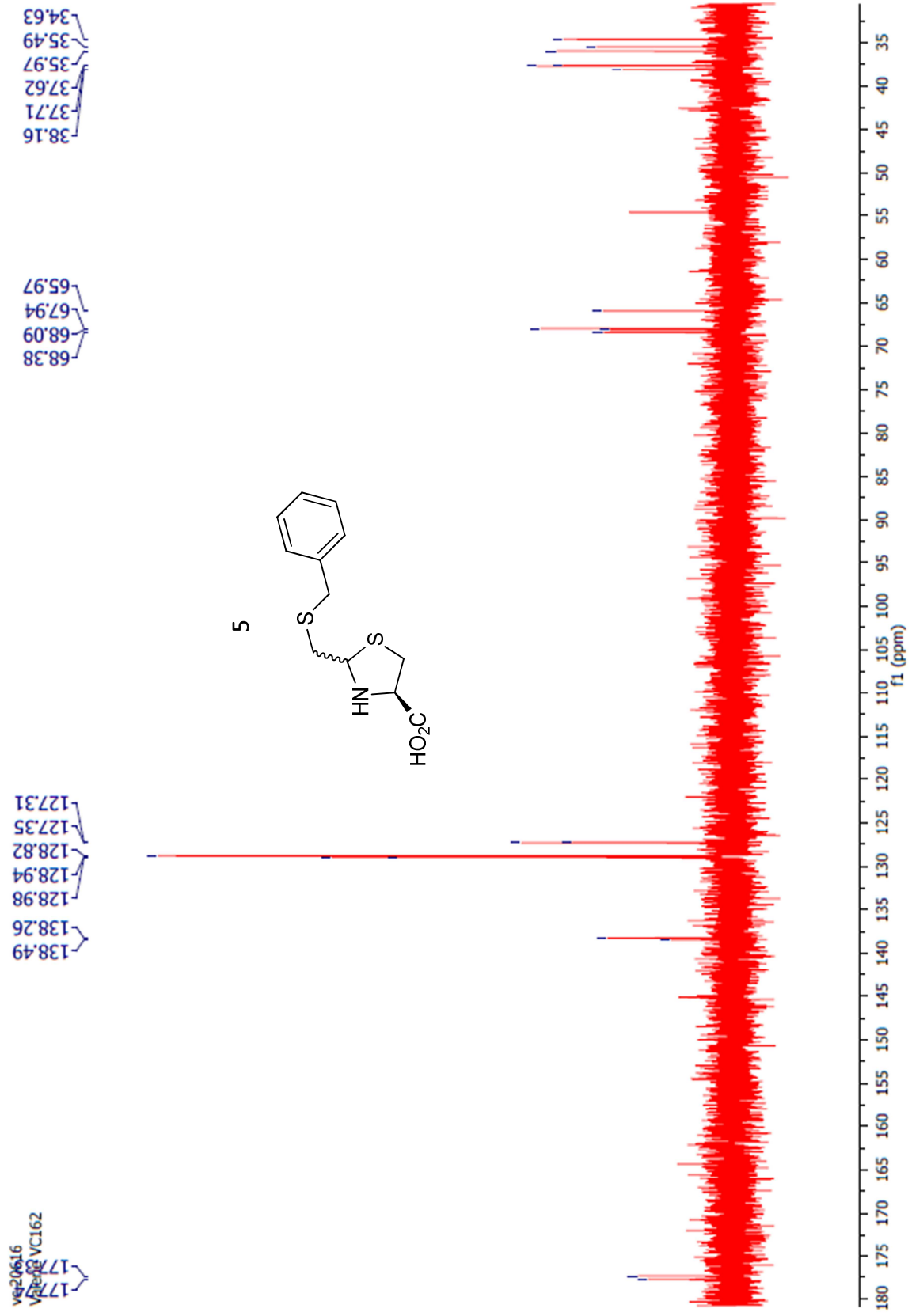


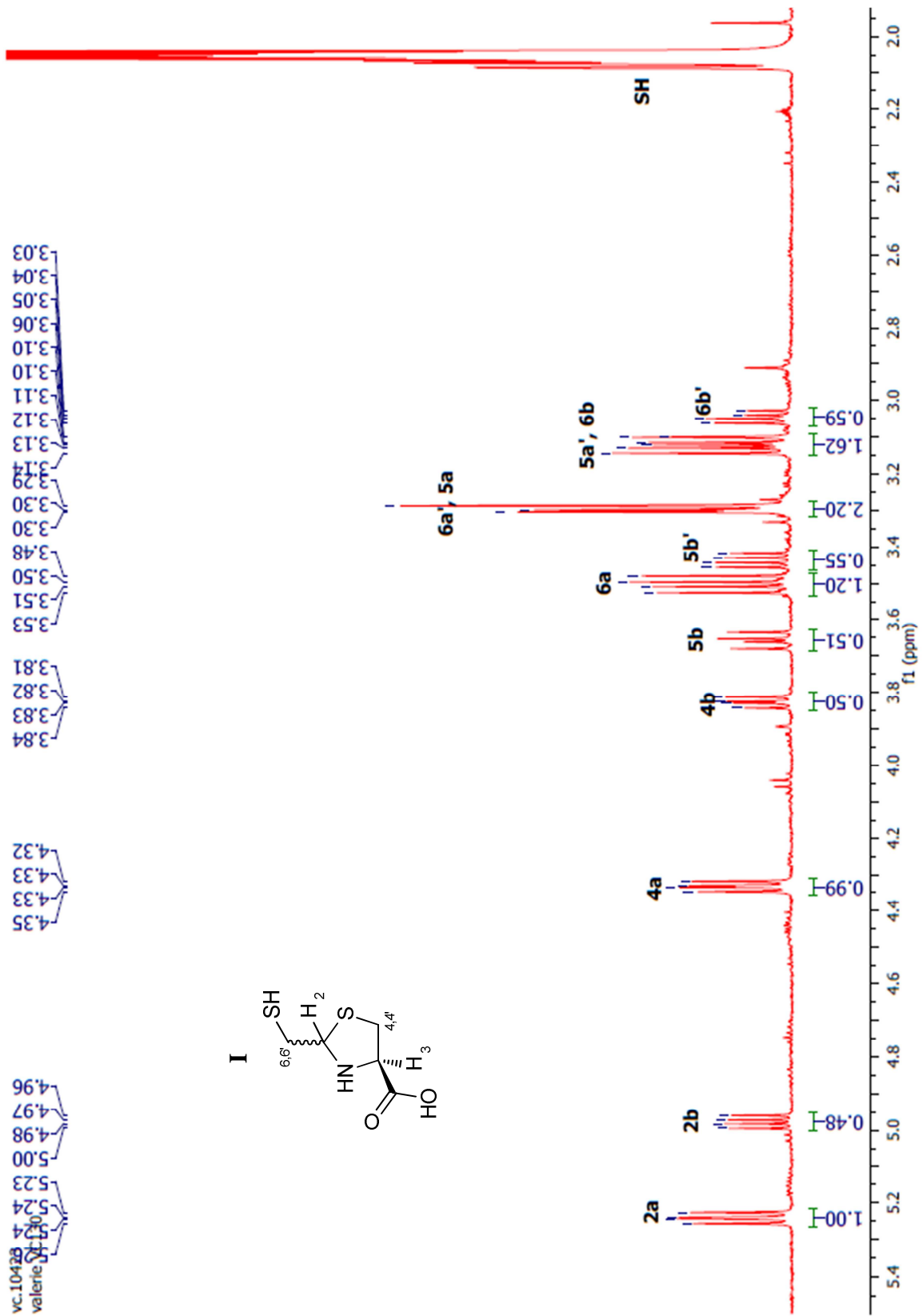
38.97
35.08
34.59

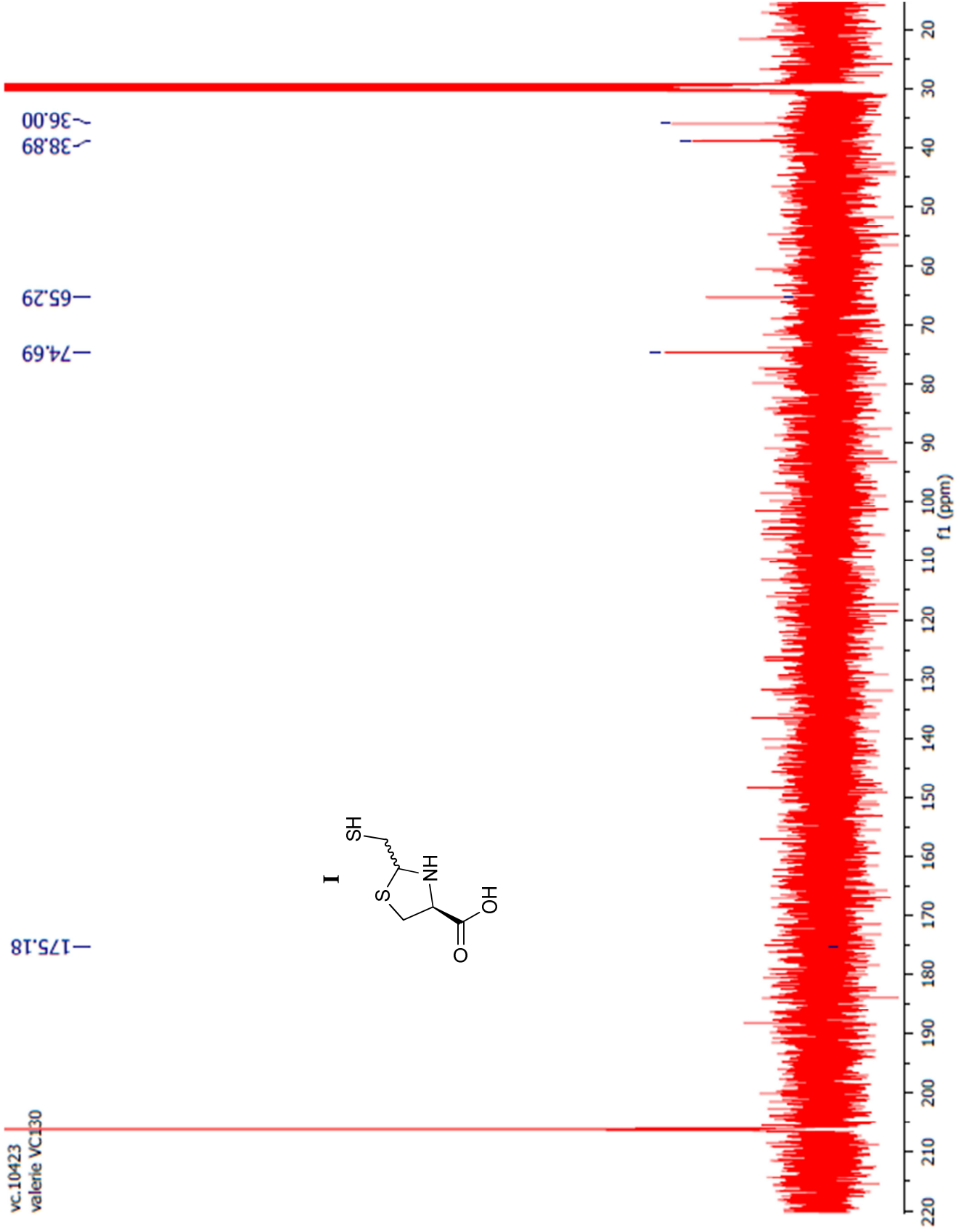
73.85
69.03
63.06

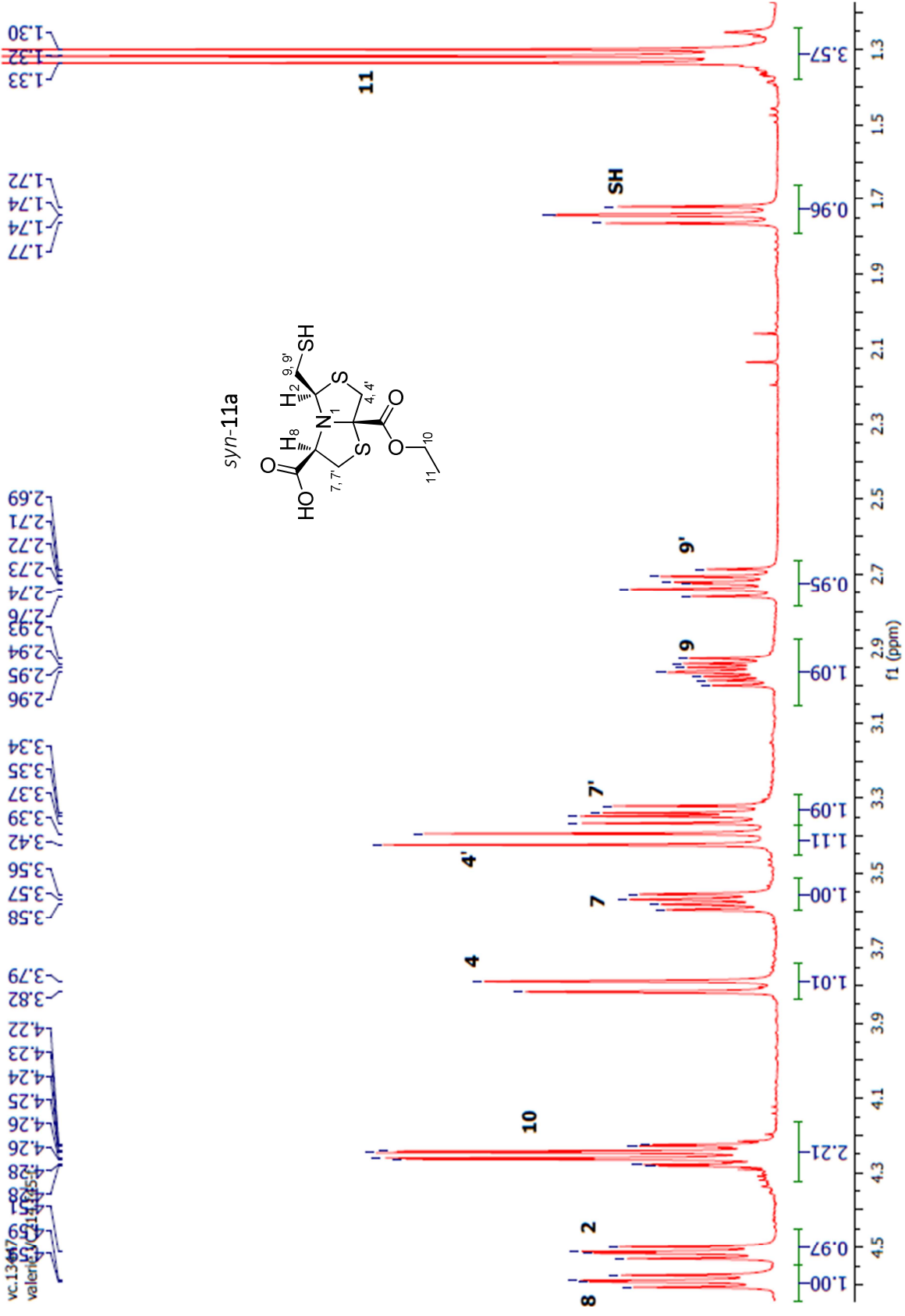


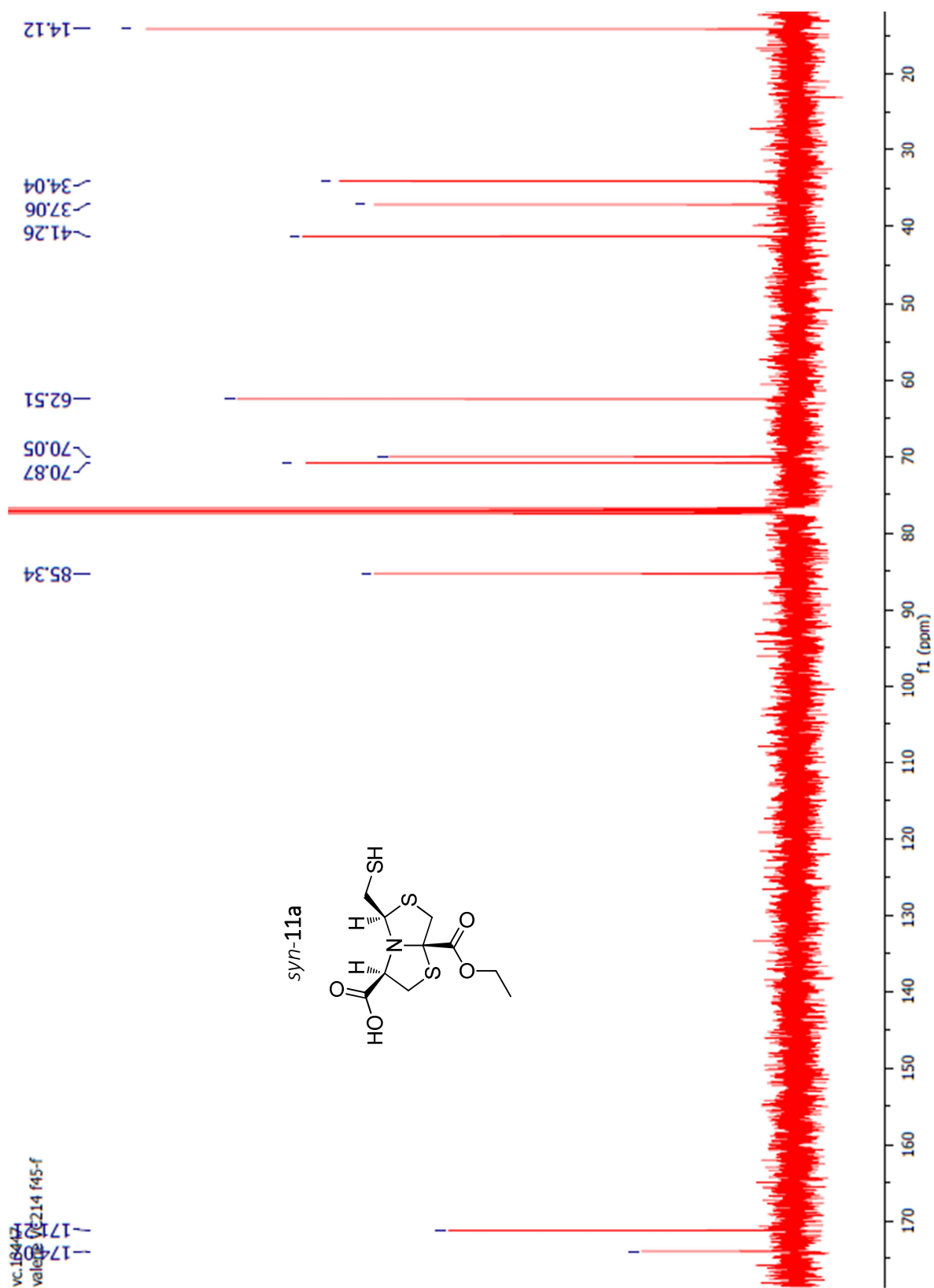


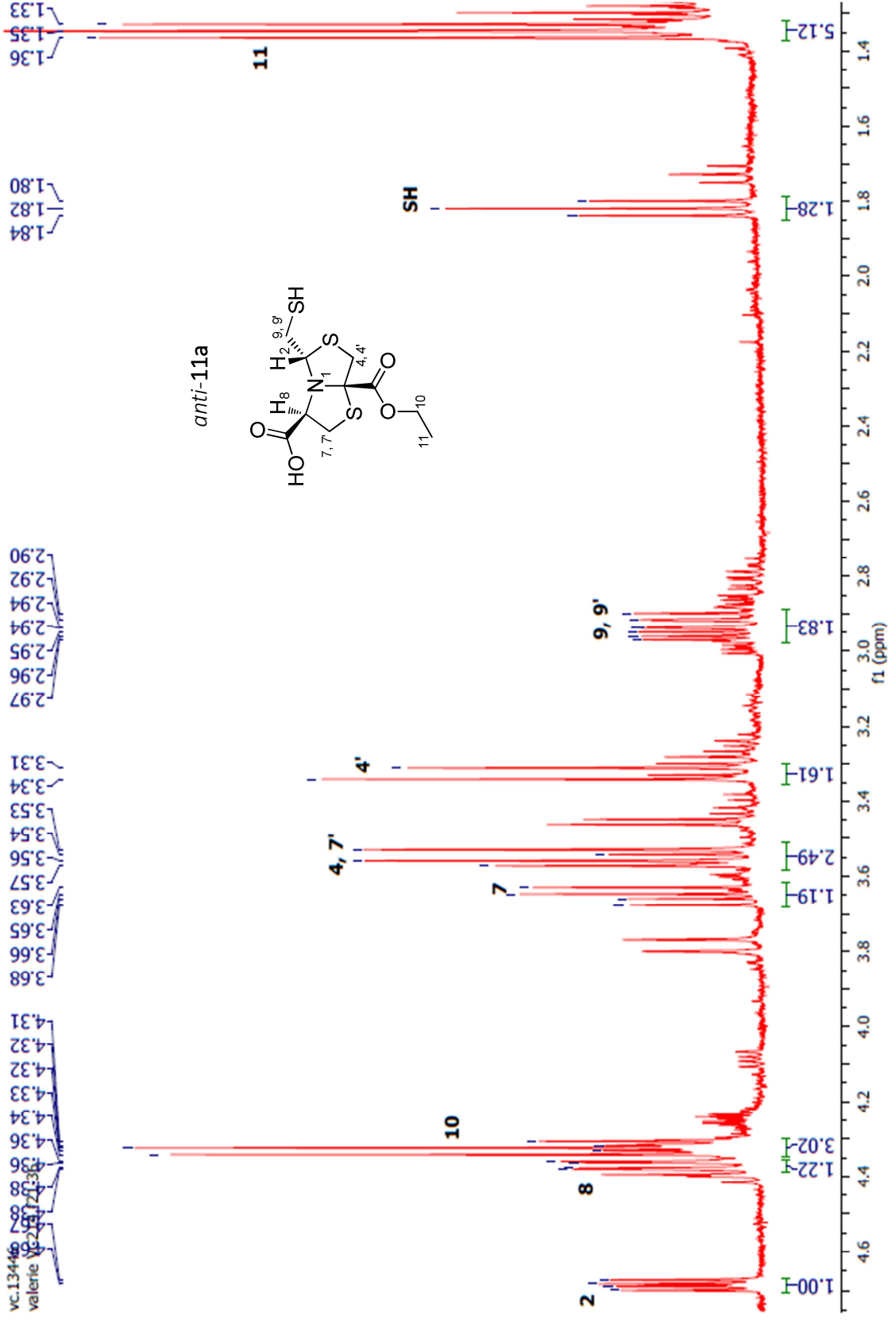






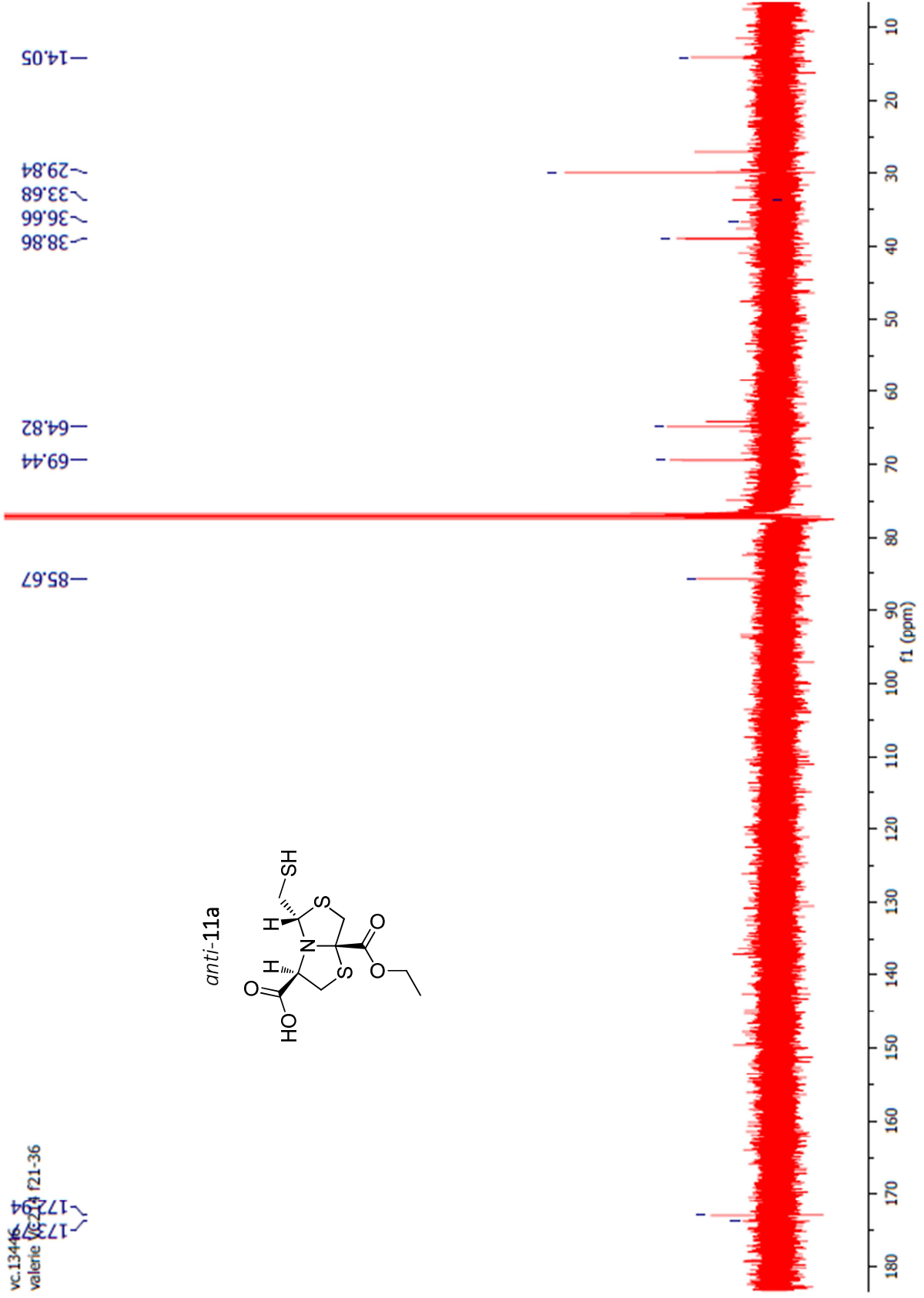
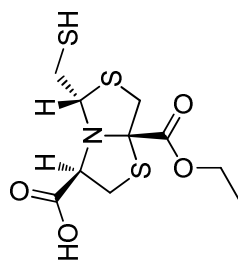


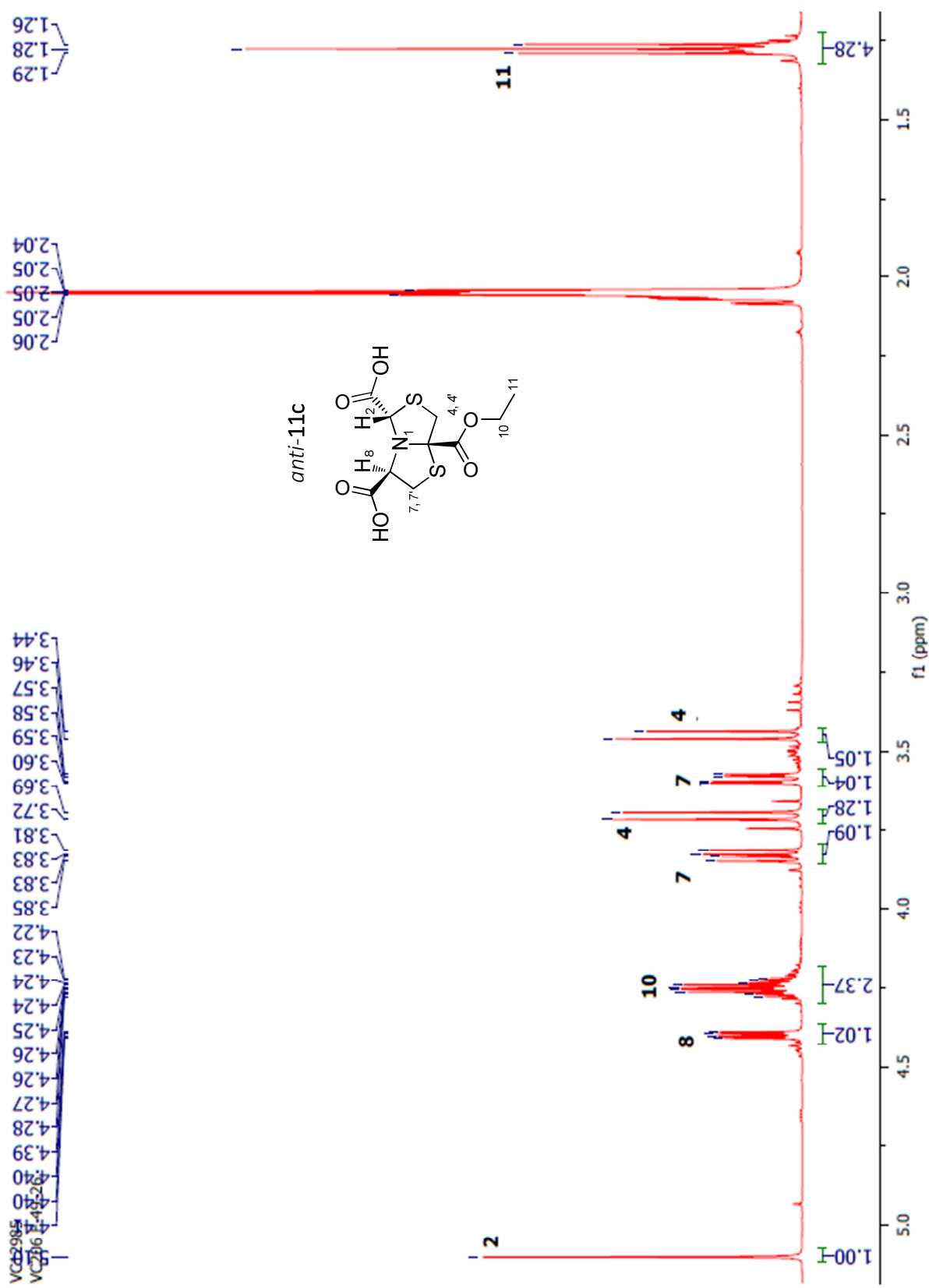


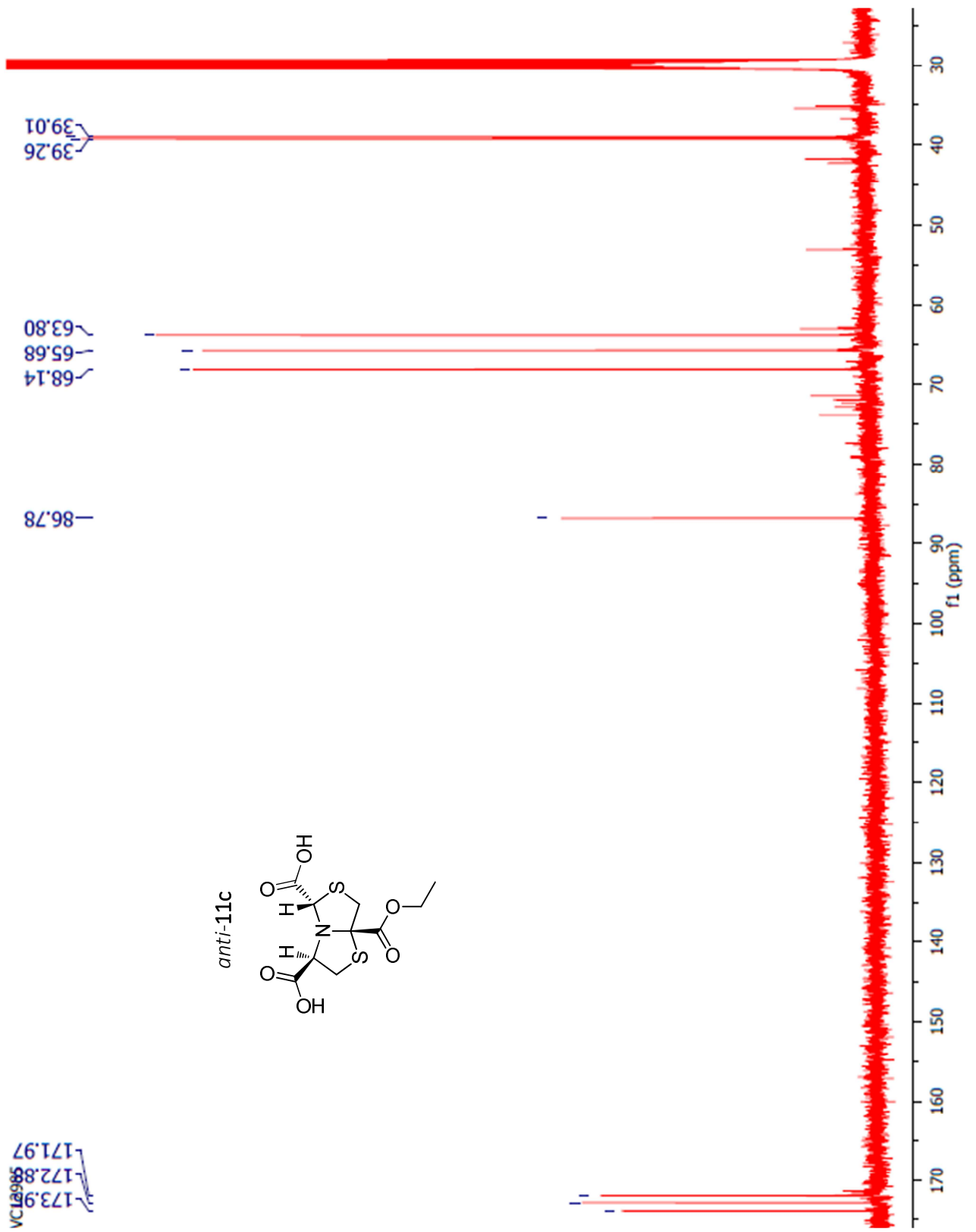


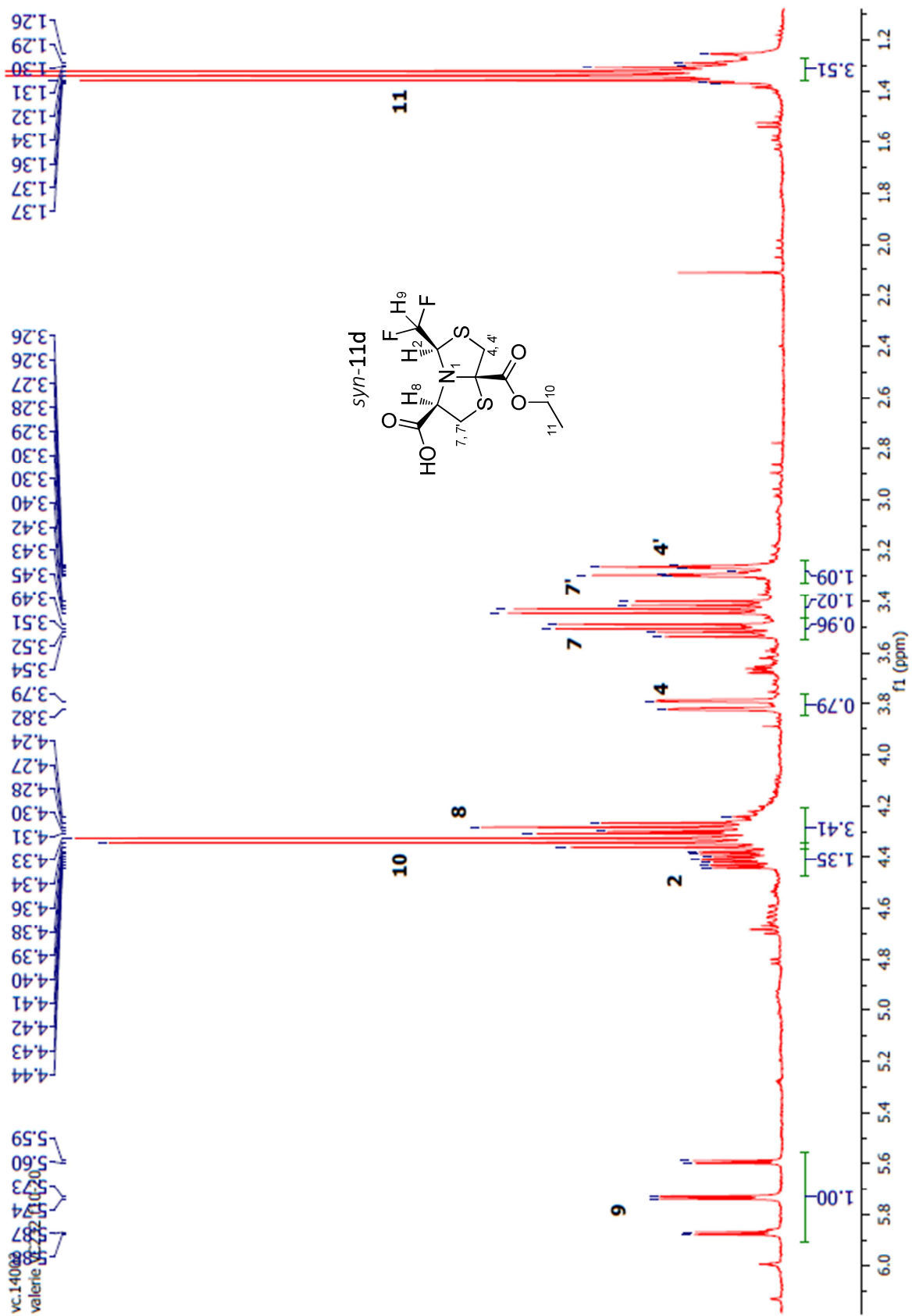
vc.13446
valerie vc.214 721-36

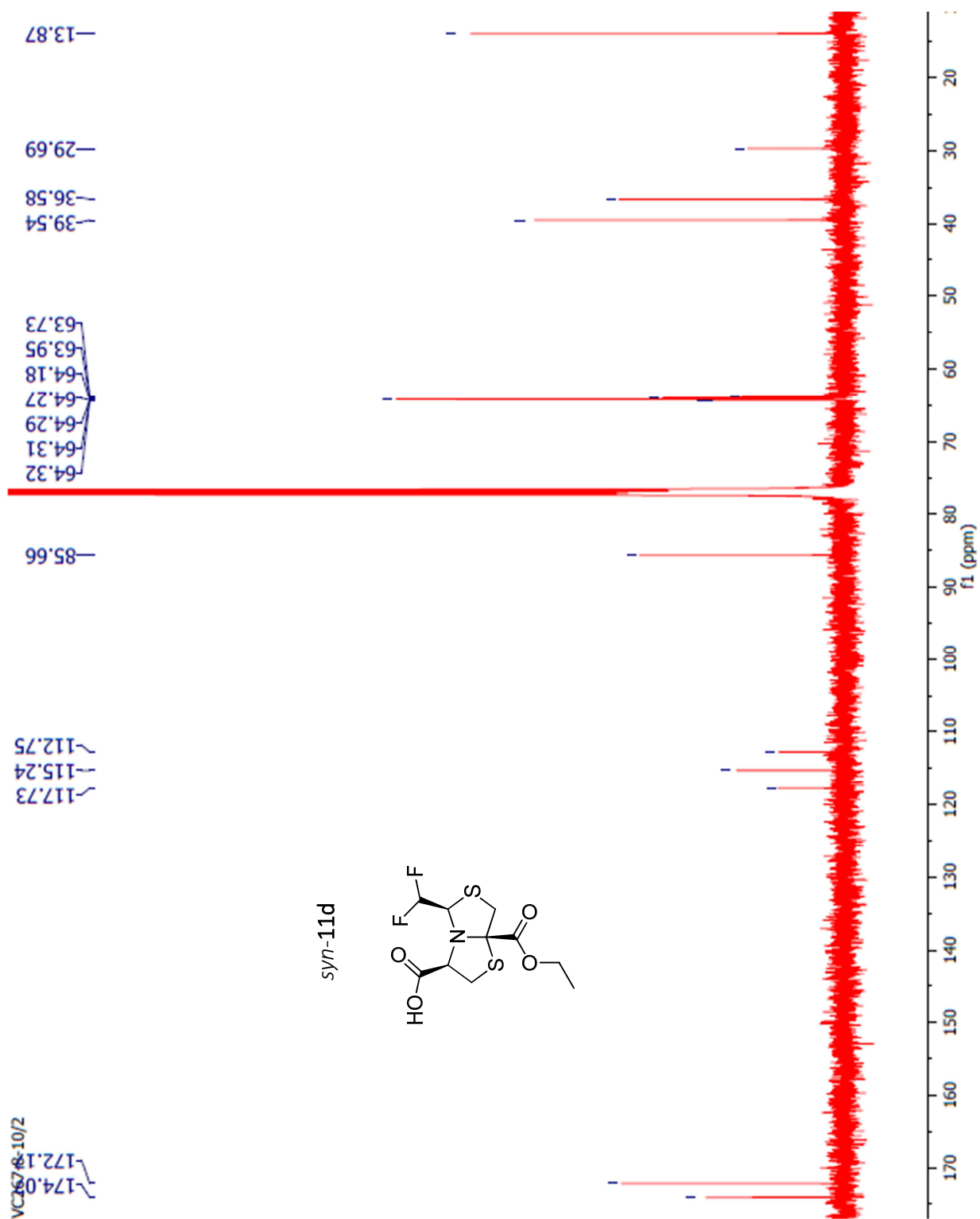
anti-11a

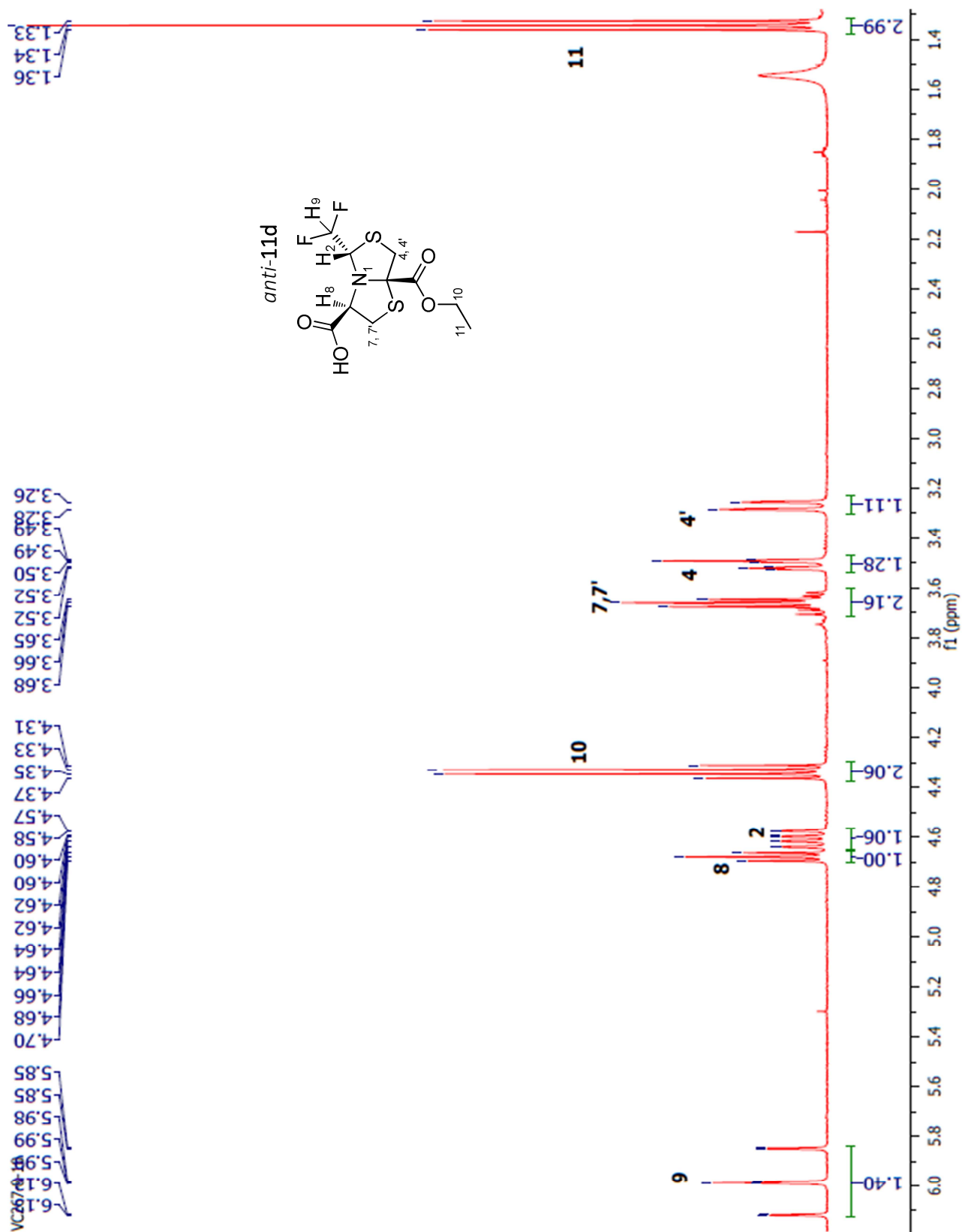


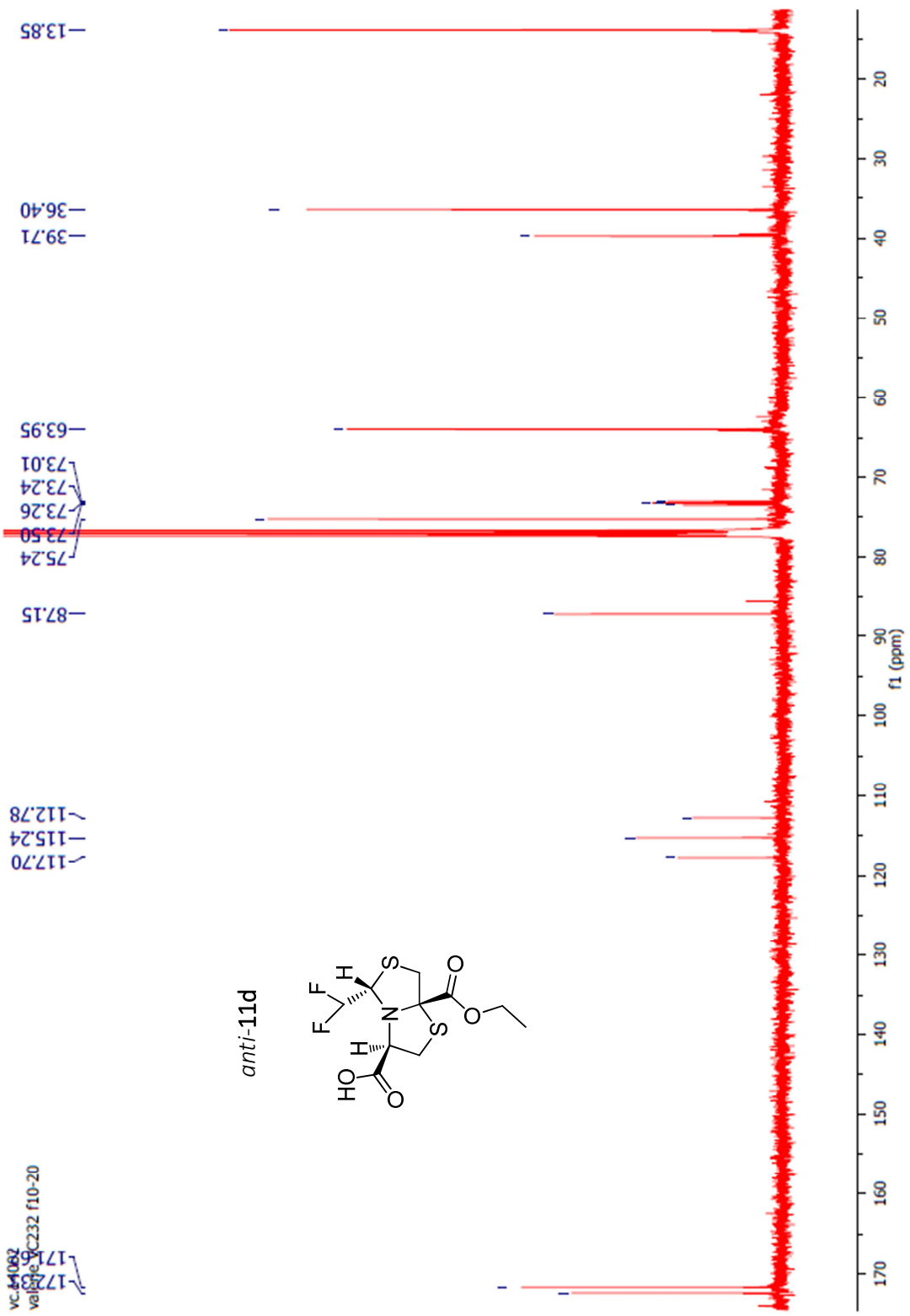


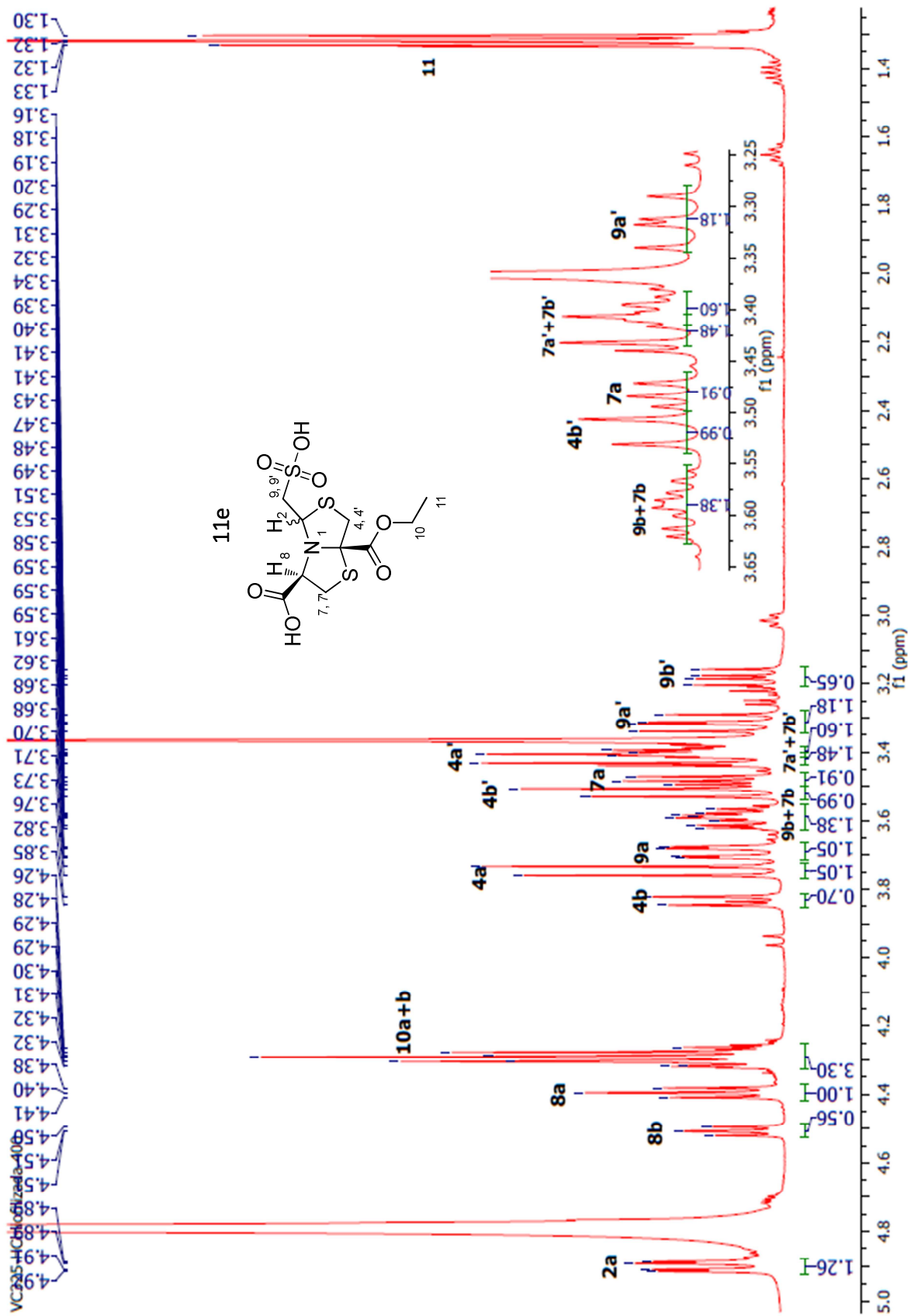


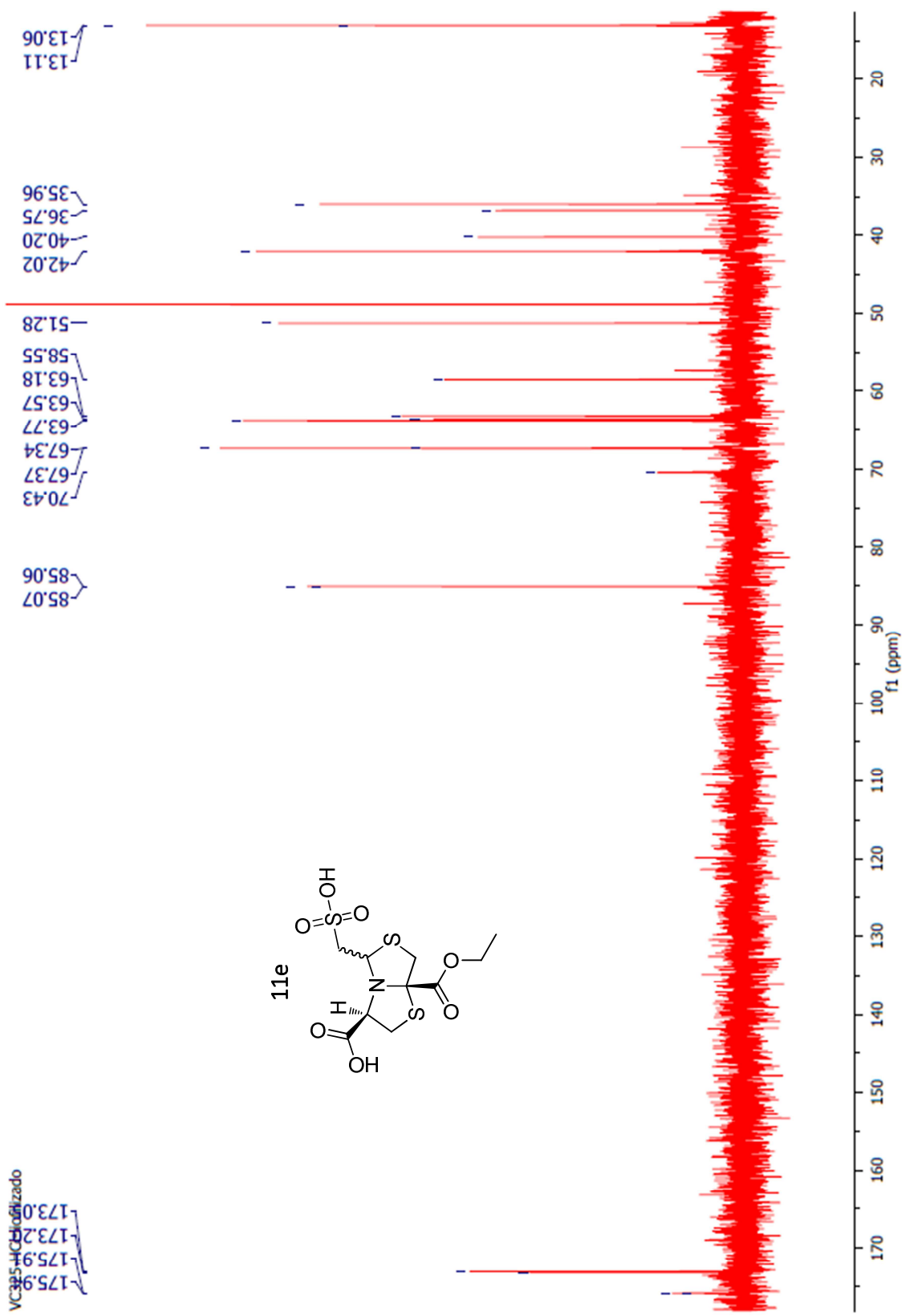


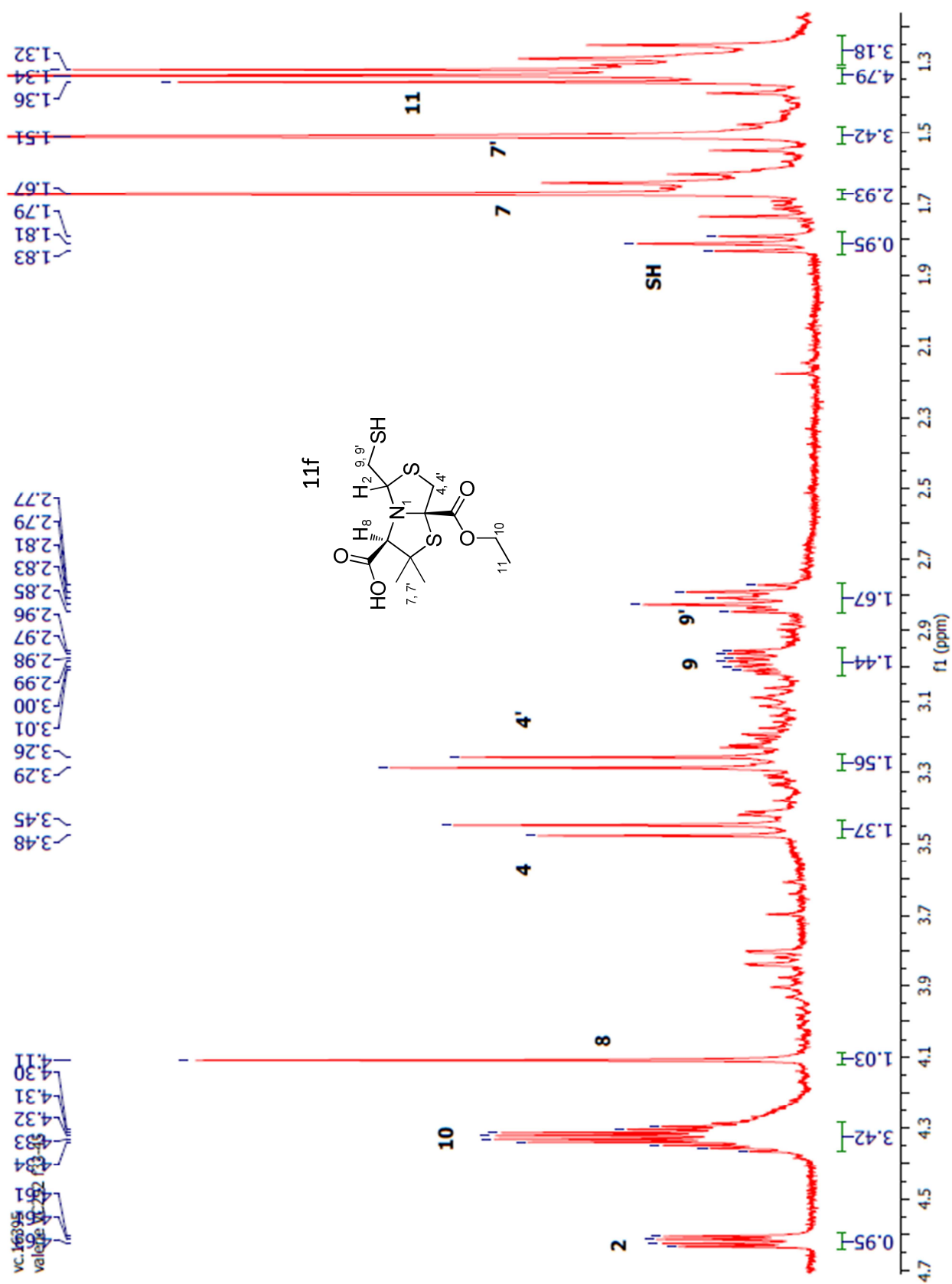




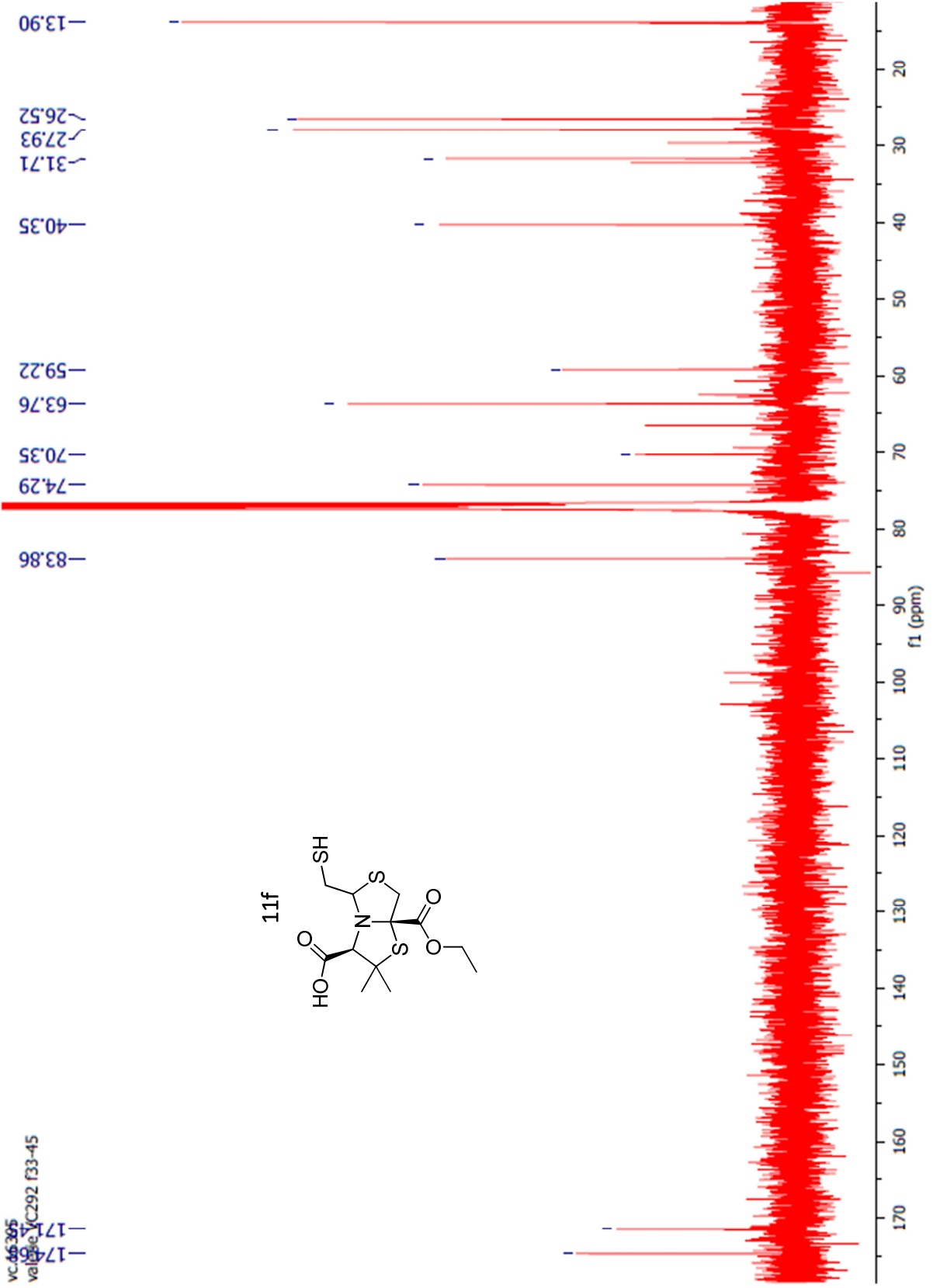
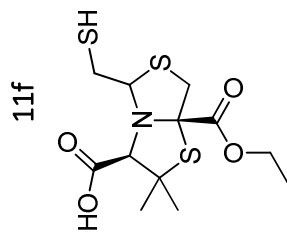


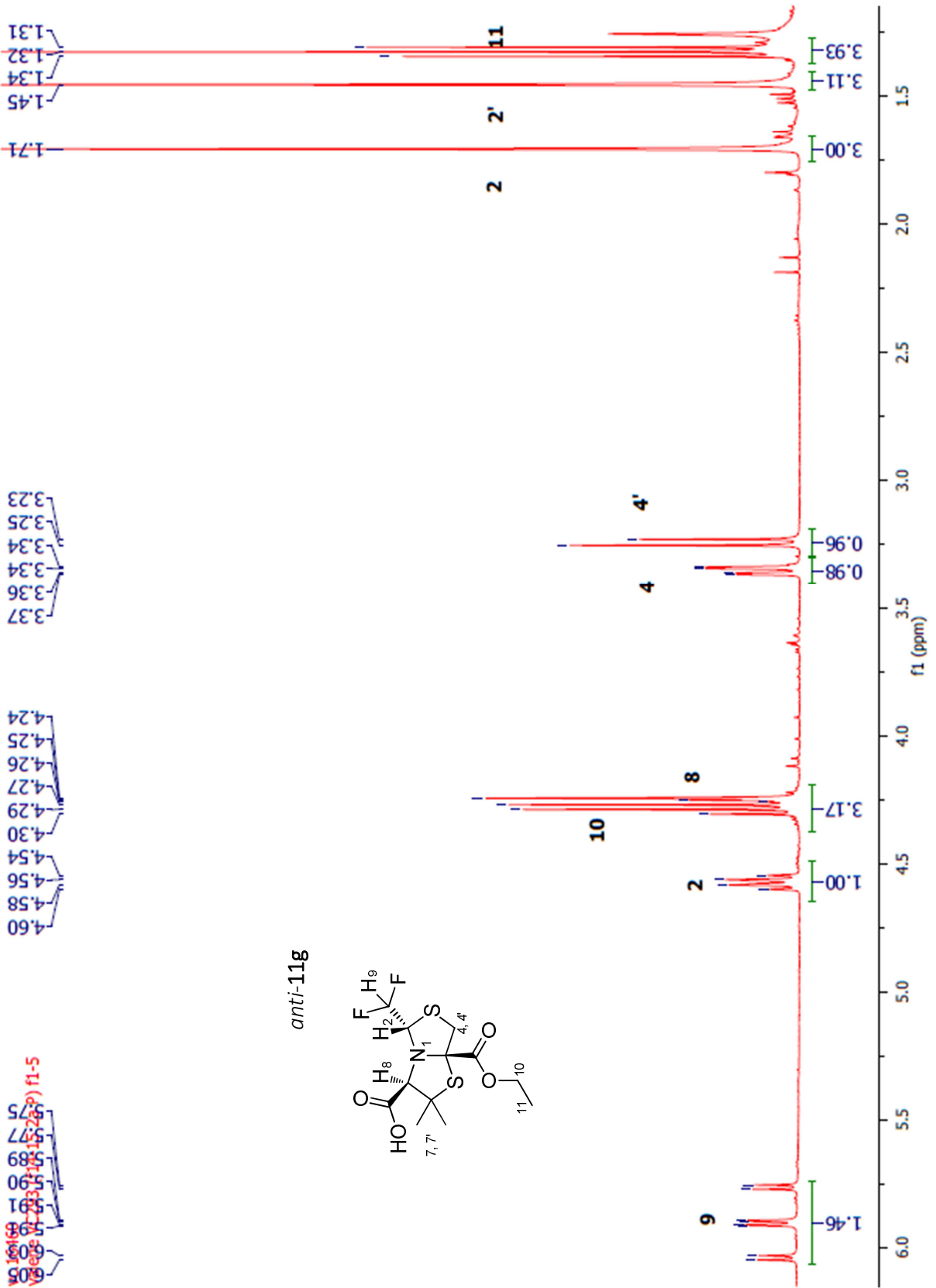




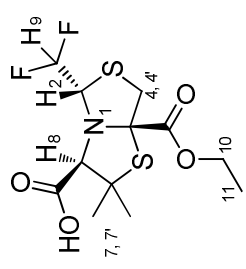


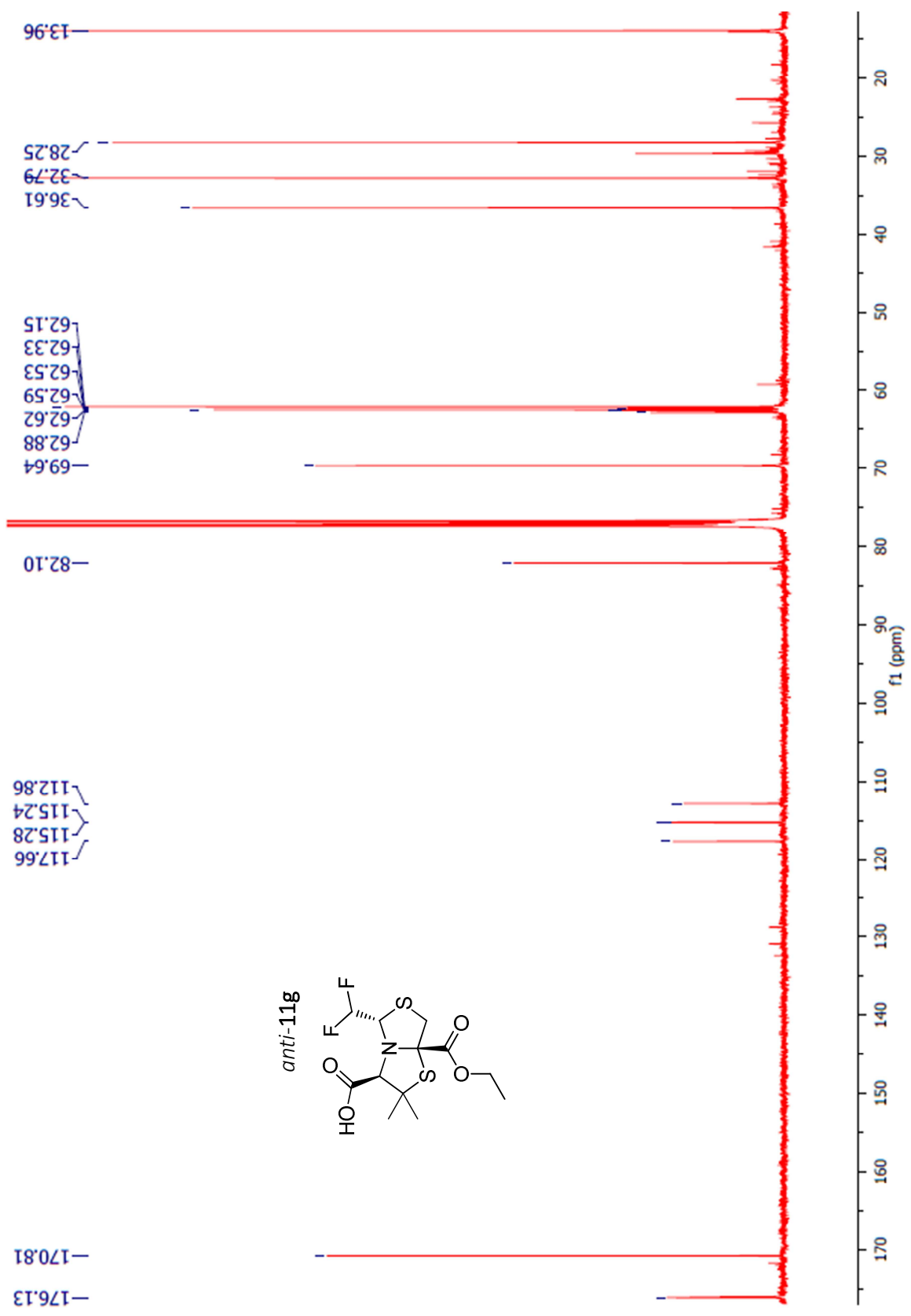
vc:66395
val:801
C292 f33-45

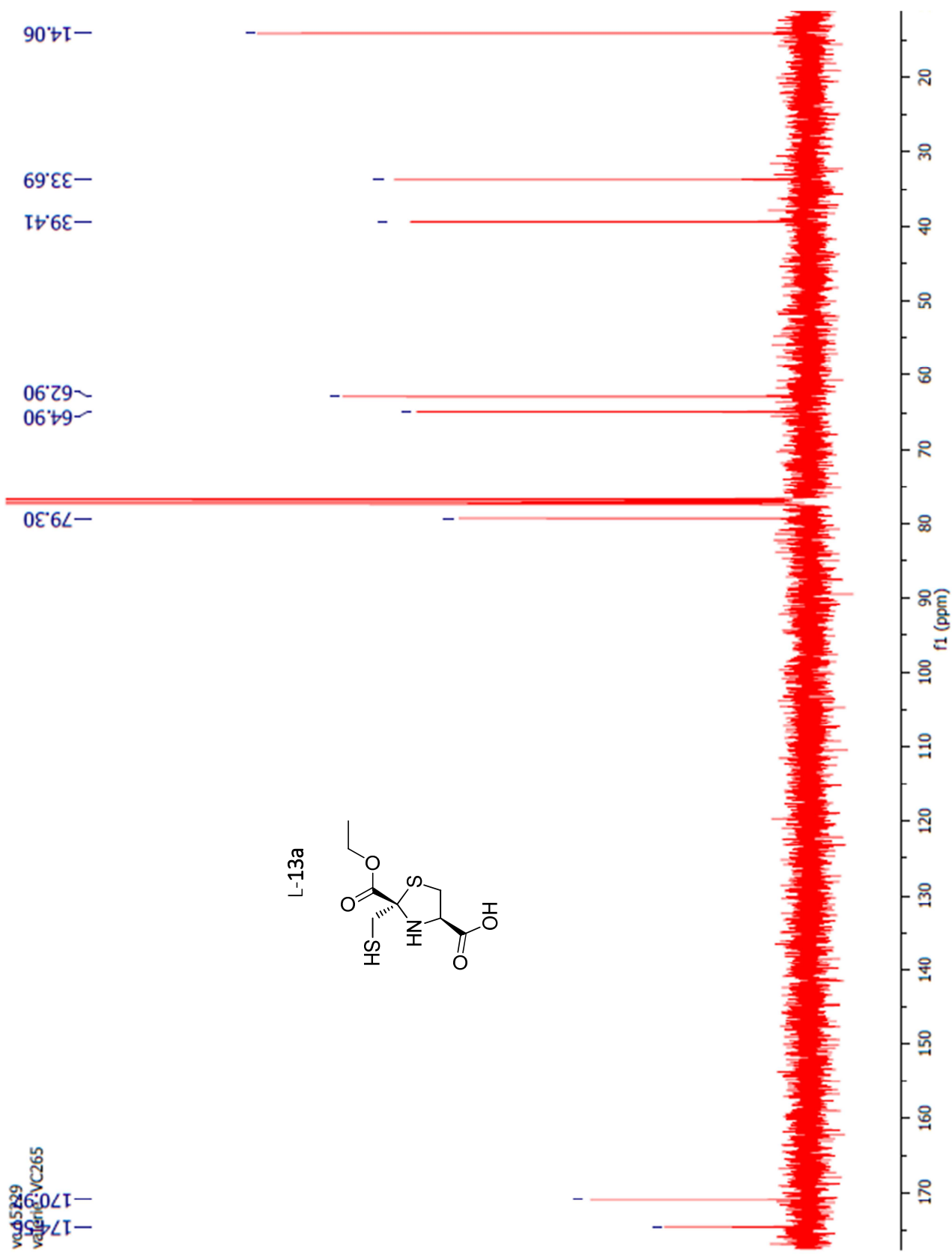


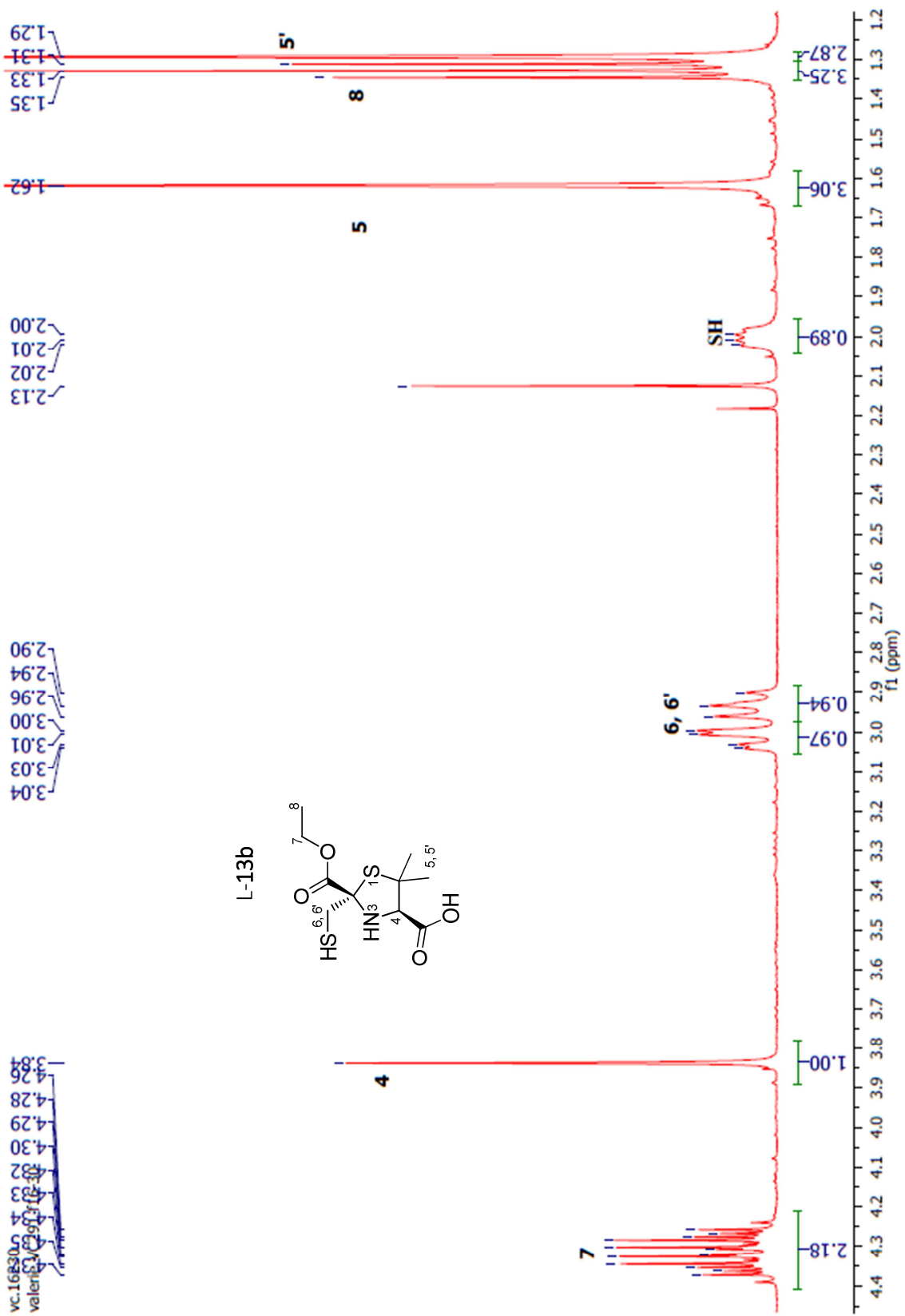


anti-11g



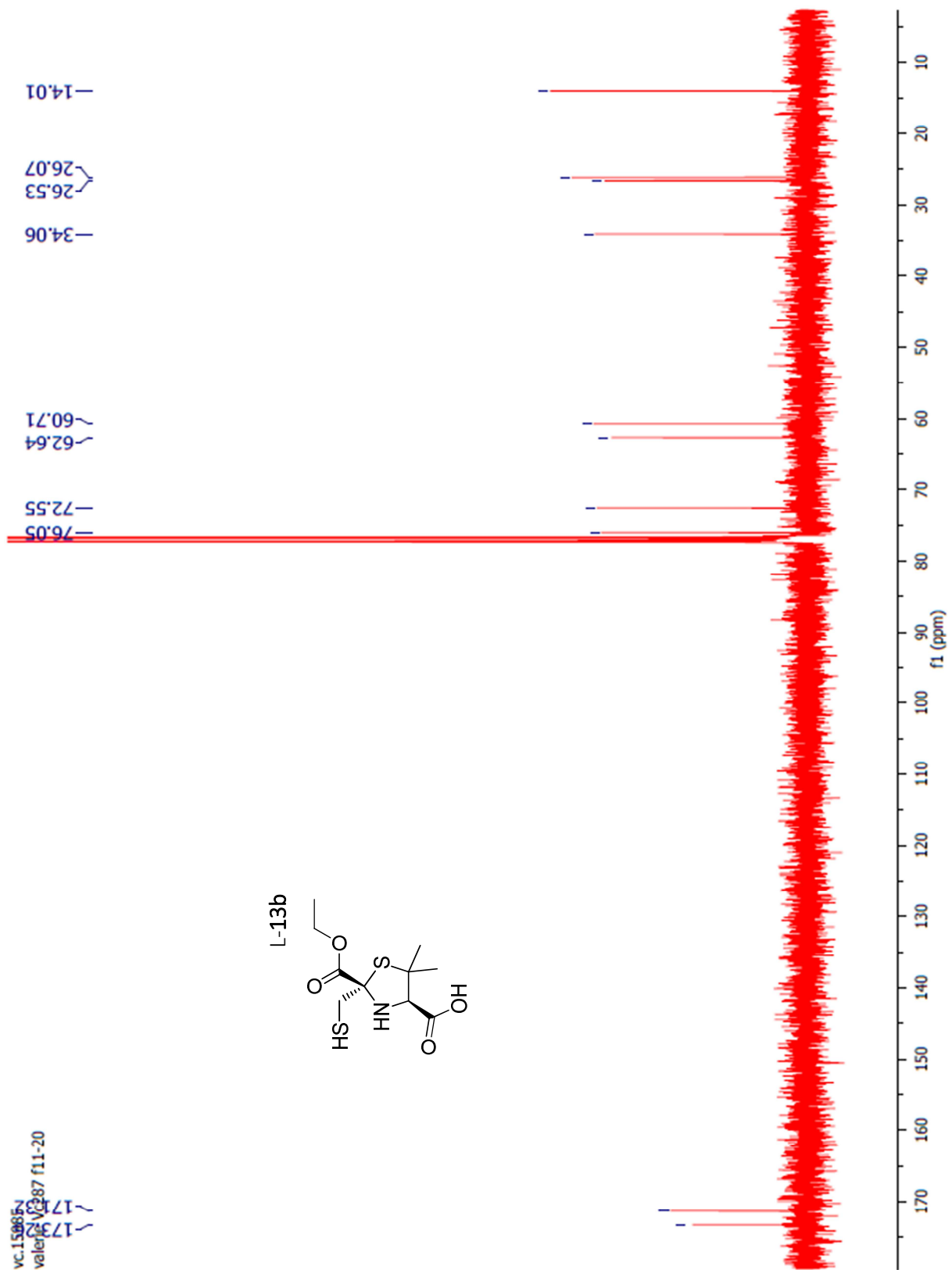
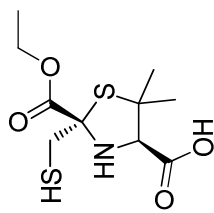


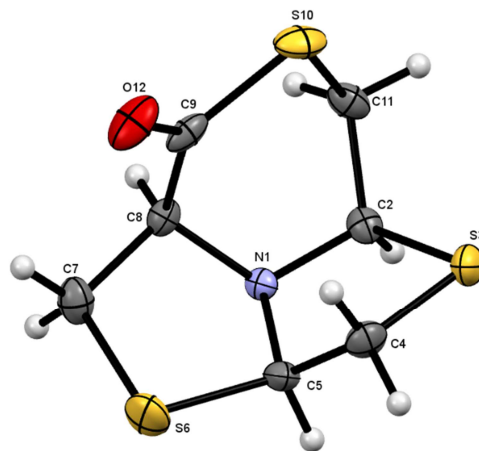




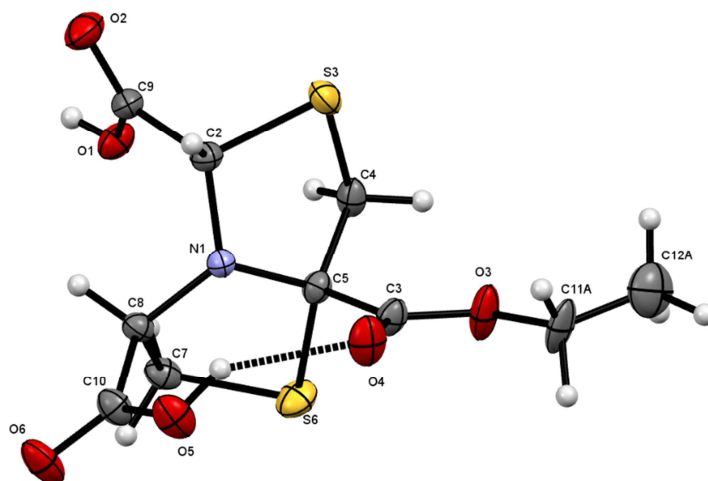
vc.150854
valeris_V387 f11-20
~173.2
~171.3

L-13b

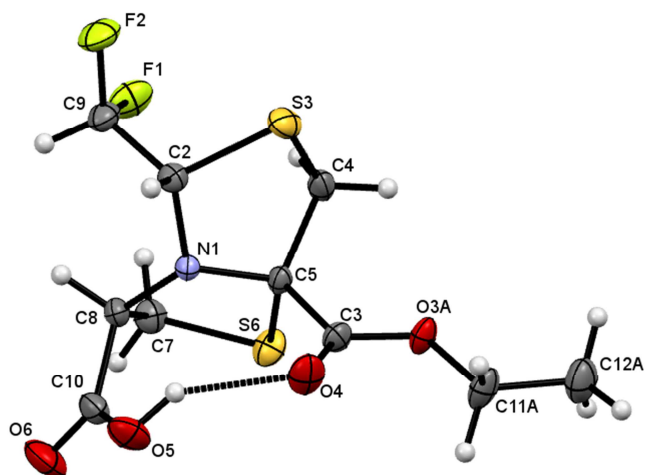




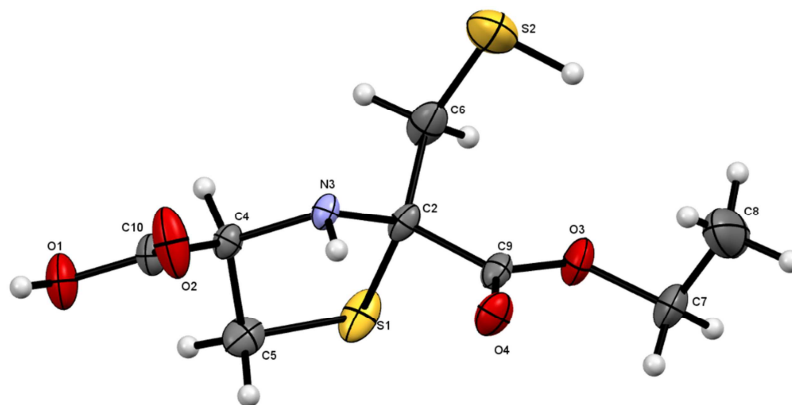
ORTEP. Estructura molecular de **1e** obtenida a partir de difracción de rayos X de monocristal.



ORTEP. Estructura molecular de *anti*-**11c** obtenida a partir de difracción de rayos X de monocristal.



ORTEP. Estructura molecular de *anti-11d* obtenida a partir de difracción de rayos X de monocristal.



ORTEP. Estructura molecular de *anti-13a* obtenida a partir de difracción de rayos X de monocristal.

Bisthiazolidines: A Substrate-Mimicking Scaffold as an Inhibitor of the NDM-1 Carbapenemase

Mariano M. González,[†] Magda Kosmopoulou,[‡] Maria F. Mojica,[§] Valerie Castillo,[⊥] Philip Hinchliffe,[‡] Ilaria Pettinati,^Δ Jürgen Brem,^Δ Christopher J. Schofield,^Δ Graciela Mahler,[⊥] Robert A. Bonomo,[§] Leticia I. Llarrull,[†] James Spencer,^{*‡} and Alejandro J. Vila^{*†}

[†]Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Ocampo y Esmeralda, 2000 Rosario, Argentina

[‡]School of Cellular and Molecular Medicine, Medical Sciences Building, University of Bristol, University Walk, Bristol BS8 1TD, United Kingdom

[§]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, Ohio 44106, United States

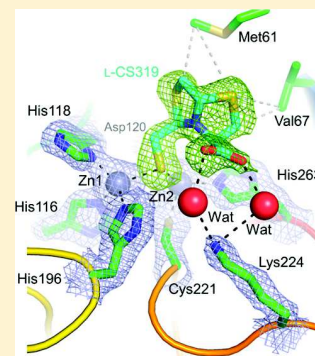
[⊥]Laboratorio de Química Farmacéutica, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo 11200, Uruguay

^ΔDepartment of Chemistry, University of Oxford, Chemistry Research Laboratory, 12 Mansfield Road, Oxford OX1 3TA, United Kingdom

Supporting Information

ABSTRACT: Pathogenic Gram-negative bacteria resistant to almost all β -lactam antibiotics are a major public health threat. Zn(II)-dependent or metallo- β -lactamases (MBLs) produced by these bacteria inactivate most β -lactam antibiotics, including the carbapenems, which are “last line therapies” for life-threatening Gram-negative infections. NDM-1 is a carbapenemase belonging to the MBL family that is rapidly spreading worldwide. Regrettably, inhibitors of MBLs are not yet developed. Here we present the bisthiazolidine (BTZ) scaffold as a structure with some features of β -lactam substrates, which can be modified with metal-binding groups to target the MBL active site. Inspired by known interactions of MBLs with β -lactams, we designed four BTZs that behave as *in vitro* NDM-1 inhibitors with K_i values in the low micromolar range (from 7 ± 1 to $19 \pm 3 \mu\text{M}$). NMR spectroscopy demonstrated that they inhibit hydrolysis of imipenem in NDM-1-producing *Escherichia coli*. *In vitro* time kill cell-based assays against a variety of bacterial strains harboring *bla*_{NDM-1} including *Acinetobacter baumannii* show that the compounds restore the antibacterial activity of imipenem. A crystal structure of the most potent heterocycle (L-CS319) in complex with NDM-1 at 1.9 Å resolution identified both structural determinants for inhibitor binding and opportunities for further improvements in potency.

KEYWORDS: antibiotic resistance, inhibitors, bisthiazolidines, metallo- β -lactamase, NDM-1



Seven decades after the clinical introduction of penicillin, β -lactam resistance is a major public health problem, a situation aggravated by overuse of this class of antibiotics in hospitals and agriculture. A succession of increasingly potent penicillins, cephalosporins, and carbapenems was developed, with carbapenems now often being used as “last-resort therapies” for the treatment of β -lactam-resistant bacterial infections.^{1–3} The therapeutic efficacy of carbapenem antibiotics (imipenem, meropenem, ertapenem, and doripenem) is severely challenged by the appearance and spread of carbapenemases in Gram-negative bacteria. Carbapenemases include two types of enzymes: (i) those with an essential Ser residue in their active site, known as serine- β -lactamases (SBLs), and (ii) the Zn(II)-dependent metallo- β -lactamases (MBLs). Whereas only a few SBLs (e.g., KPC-2^{4,5}) are capable of hydrolyzing carbapenems, most MBLs display an unusually broad substrate profile, being able to inactivate all bicyclic β -lactam antibiotics. The association of MBL genes with mobile

genetic elements (and other resistance cassettes) facilitated the dissemination of these enzymes among prevalent pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* and members of the Enterobacteriaceae, making them serious clinical threats.^{6,7}

New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1), originally found encoded by a multiresistance plasmid in *Klebsiella pneumoniae*,⁸ is one of the most widespread carbapenemases and has been identified in multiple pathogenic and environmental species⁷ on every inhabited continent. NDM-1 is a member of the B1 subclass of MBLs that represents the largest and most clinically relevant group of MBLs.

Crystal structures of NDM-1^{9–11} reveal a dinuclear metal center in the active site, composed of two Zn(II) ions (Figure 62 fl

Special Issue: Gram-Negative Resistance

Received: April 16, 2015

63 1): one containing a tetrahedral coordination sphere (Zn1 site)
 64 and one in a trigonal bipyramidal coordination sphere (Zn2

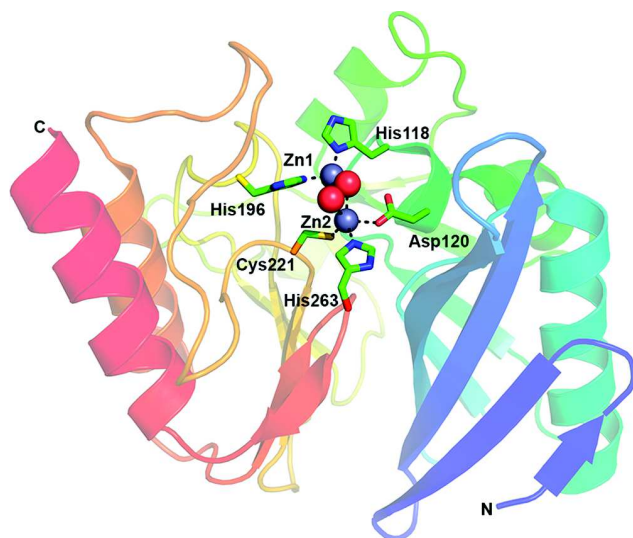


Figure 1. Structure of NDM-1 (PDB code 3SPU). The enzyme contains a dinuclear metal center in the active site, comprising two Zn(II) ions: one with a tetrahedral coordination sphere (Zn1, coordinated to residues His116, His118, and His196 and a water/hydroxide molecule) and one in a trigonal bipyramidal coordination sphere (Zn2, coordinated to residues Asp120, Cys221, and His263, a water molecule, and the water/hydroxide molecule). Zinc ions and water molecules are represented as gray and red spheres, respectively. The amino acid side chains are colored according to atom type. The protein main chain is color-ramped from the N-terminus (blue) to the C-terminus (red). This figure was generated using PyMol (www.pymol.org).

65 site). The Zn1 site consists of a Zn(II) ion coordinated to
 66 residues H116, H118, and H196 and a water/hydroxide
 67 molecule (we have used the standard BBL numbering scheme¹²
 68 throughout this paper). The metal ion at the Zn2 site is
 69 coordinated to residues D120, C221, and H263, a water
 70 molecule, and the formerly mentioned water/hydroxide. As
 71 with all MBLs, NDM-1 is not inhibited by commercially
 72 available (mechanism-based) serine- β -lactamase inhibitors, and
 73 clinically useful MBL inhibitors are not yet identified.^{13–16}

74 Several papers reveal thiol-bearing carboxylate compounds,
 75 such as D- and L-captopril,^{8,17–19} as well as carboxylate-bearing
 76 compounds such as a maleic acid derivative, ME1017,²⁰ and
 77 rhodanine-derived ene-thiolates²¹ as active NDM-1 inhibitors.
 78 Natural products have also been reported to inhibit NDM-1 by
 79 “sequestration” of the essential Zn(II) cofactors.²² Inspired by
 80 these attempts, here we report the use of bisthiazolidines
 81 (BTZs) as a novel scaffold, replicating some features of β -
 82 lactam substrates, which can be readily synthesized with high
 83 yields, are capable of inhibiting NDM-1 in vitro, and can restore
 84 the efficacy of imipenem against pathogenic bacteria expressing
 85 NDM-1 in time kill assays. The crystal structure of NDM-1 in
 86 complex with the most potent inhibitor reveals details of the
 87 inhibitor binding interaction and provides a basis for further
 88 improvement of this scaffold.

89 ■ RESULTS AND DISCUSSION

90 Inhibition of MBLs present in Gram-negative bacteria is
 91 challenging for two main reasons: (1) covalent enzyme–

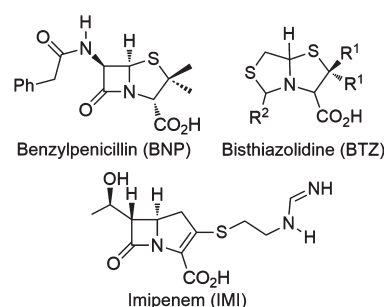
intermediate (EI) adducts do not form during catalysis,^{1,23} and 92
 (2) their broad substrate spectrum, which for most MBLs 93
 results from a wide, open active site groove containing few (if 94
 any) specific sites for substrate recognition. The most critical 95
 consideration in the catalytic mechanism is the activation of a 96
 Zn(II)-bound water/hydroxide nucleophile and the stabilization, 97
 by the Zn(II) ion at the Zn2 site, of an anionic 98
 intermediate that forms during hydrolysis of some cepha- 99
 losporins and carbapenems.^{24–26} 100

Substrate recognition in MBLs is largely driven by interaction 101
 with the metal ions,²⁷ particularly Zn2.²⁸ The β -lactam 102
 carboxylate present at position C3' in penicillins and 103
 carbapenems and in position C4' in cephalosporins is able 104
 to bind Zn2, as well as to interact with a conserved charged 105
 residue at position 224, as seen in some of the structurally 106
 characterized enzyme–product (EP) or EI complexes.^{11,29,30} 107
 Hence, we sought to design an NDM-1 inhibitor scaffold 108
 replicating these interactions while at the same time 109
 considering other available data related to MBL–substrate 110
 interactions. 111

The rationale for our design of BTZ inhibitors is as follows. 112
 We reasoned that bicyclic substrates are well recognized by 113
 MBLs. In contrast, monocyclic β -lactam compounds (such as 114
 the monobactam antibiotic aztreonam) do not bind productively, 115
 because binding through the sulfonate moiety to Zn2 116
 orients the carbonyl group far away from the nucleophile.^{31,32} 117
 Second, the tetrahedral bridgehead nitrogen of bicyclic β -lactam 118
 antibiotics is important for affinity, because γ -lactam analogues 119
 of the penicillins, which have a planar bridgehead nitrogen, are 120
 not substrates of the *Bacillus cereus* BcII MBL.³³ 121

On the basis of the substrate structural features outlined 122
 above, we envisioned that BTZs could mimic substrate 123
 recognition by MBLs (Scheme 1). The motivation is based 124 s1

Scheme 1. Benzylpenicillin and Imipenem Substrates of NDM-1 and the Bisthiazolidine (BTZ) Scaffold



on the ability of BTZs to (1) mimic a bicyclic β -lactam 125
 compound while being devoid of β -lactam functionality, (2) 126
 retain the bridging N and the carboxylate able to interact with 127
 Zn2, and (3) accommodate additional metal-binding groups 128
 targeting the essential Zn center. 129

The BTZ compounds include a free thiol, which is a high- 130
 affinity Zn(II) binding group, as well as a carboxylate, and 131
 present these with different relative orientations. The BTZs 132
 were synthesized by double condensation of aminothiols and 133
 the mercaptoacetaldehyde dimer, as shown in Table 1.³⁴ We 134 t1
 prepared four BTZs: L-CS319 and L-VC26 and their 135
 enantiomers. The use of penicillamine as a precursor endows 136
 these compounds with the C7 *gem*-dimethyl group present in 137
 penicillins (Scheme 1). This synthetic strategy allowed us to 138
 obtain the targeted compounds with high yields and 139

Table 1. Synthesis of Bisthiazolidines L-CS319, D-CS319, L-VC26, and D-VC26

aminothiols	R ¹	product	yield ^a (%)	dr syn:anti ^b
L-Cys	H	L-CS319	86	95:05
D-Cys	H	D-CS319	80	95:05
L-PNA	Me	L-VC26	89	95:05
D-PNA	Me	D-VC26	76	99:01

^aYields were determined on the basis of isolated pure compounds. ^bdr, diastereomeric ratio, was calculated on the basis of ¹H NMR well-defined signals.

140 diastereomeric ratios, starting from the readily available
141 precursors, L- or D-cysteine (Cys) and L- or D-penicillamine
142 (PNA). Unfortunately, attempts to isolate the minor
143 diastereomer (the *anti* compound), failed in both cases for
144 Cys or PNA.

145 We studied the effect of these BTZs on the initial rates of
146 imipenem hydrolysis by NDM-1. This analysis revealed a
147 competitive inhibition model with inhibition constants (K_i ;
148 Table 2 and Figure S1) ranging between 7 and 19 μ M. In all

Table 2. Inhibition of NDM-1 by Bisthiazolidines

	L-CS319	D-CS319	L-VC26	D-VC26
K_i (μ M) ^[a]	7 \pm 1	19 \pm 3	18 \pm 3	12 \pm 1
IC ₅₀ (μ M) ^[b]	23 \pm 2	109 \pm 9	200 \pm 10	180 \pm 10

^[a]Competitive inhibition of NDM-1-catalyzed imipenem hydrolysis by bisthiazolidines. ^[b]IC₅₀ of bisthiazolidines for imipenem hydrolysis by *E. coli* cells expressing NDM-1.

149 four cases, the progress curves reflected a single velocity for the
150 onset of inhibition, and we did not observe a curvature of the
151 reaction progress curves over a time scale where the
152 uninhibited reaction progress curve is linear (Figure S2).
153 These observations allowed us to discard time-dependent
154 inhibition and the possibility of a two-state binding process, in
155 contrast to what we have recently reported for inhibition of
156 VIM MBLs by these BTZ compounds.³⁵ The most active
157 compound was L-CS319. The observation that L-CS319 binds
158 with greater affinity than D-CS319 (which features more
159 penicillin-like carboxylate stereochemistry) suggests that thiol
160 binding is the main determinant of inhibition, overriding
161 stereochemical preferences involved in substrate binding. The
162 penicillamine derivatives L- and D-VC26, bearing a *gem*-
163 dimethyl group, were nearly 2 times less active than L-CS319.

164 To investigate uptake into bacterial cells and to observe in
165 real time whether BTZs inhibited NDM-1 directly, we then
166 tested the ability of these compounds to protect imipenem
167 from the hydrolytic activity of NDM-1 in *E. coli* cells by
168 following imipenem hydrolysis using ¹H NMR.³⁶ Addition of
169 the four BTZs inhibited imipenem hydrolysis by bacterial cells
170 (Table 2 and Figure 2). L-CS319 was the most potent inhibitor
171 in bacteria with an IC₅₀ value of 23 μ M, whereas its enantiomer
172 was 4.7 times less active, a difference within the same order of
173 magnitude as that observed in the in vitro experiments. The

174 main differences between inhibitory potencies measured in
175 vitro and in bacterial cells were observed for the *gem*-dimethyl
176 compounds, which displayed IC₅₀ values between 180 and 200
177 μ M, 1 order of magnitude less potent than L-CS319. The
178 relatively high IC₅₀ values for these compounds might arise
179 from differences in cell permeability.

180 These results encouraged us to broaden our cell-based assays
181 using three NDM-1-producing clinical isolates, *Klebsiella*
182 *pneumoniae* Ca01.37, *Acinetobacter baumannii* 1.58, and
183 *Providencia rettgeri* Ch01.27. Strikingly, our results showed
184 between 7 and 3 log₁₀-fold reduction of viable cell counts on
185 exposure to sublethal concentrations of imipenem in the
186 presence of the four BTZ inhibitors (Figures 3 and S7). Hence,
187 these findings demonstrate the ability of these inhibitors to
188 restore the activity of imipenem against NDM-1-producing
189 clinical isolates. More noteworthy, because the outer membrane
190 of *Acinetobacter* spp. acts as a substantial barrier against the
191 penetration of antibiotics,^{37,38} our data show that penetration
192 against difficult to treat pathogens is an extremely favorable
193 property of these compounds. Finally, these compounds do not
194 act as direct antimicrobials, as the BTZs independently do not
195 decrease the viable cell number when compared to broth-only
196 controls in in vitro time kill experiments (Figure S7).

197 MBLs are members of an extensive metalloenzyme super-
198 family that includes multiple human homologues.³⁹ Candidate
199 MBL inhibitors should therefore show selectivity for MBLs
200 when compared to related human enzymes, as well as lack
201 toxicity against human cells. Thus, we investigated the ability of
202 the most potent inhibitor in vitro (L-CS319) to inhibit human
203 glyoxalase II (hGlx2), an MBL superfamily member involved in
204 oxoaldehyde degradation.⁴⁰ Inhibition of hGlx2 was not
205 observed at concentrations up to 100 μ M L-CS319 (data not
206 shown). To extend this finding, we next tested the cytotoxicity
207 of L-CS319 against cultured mammalian cells. L-CS319 did not
208 show toxic effects against HeLa and Hek 293 cell lines up to a
209 concentration of 500 μ M (Figure S8), indicating a lack of
210 significant inhibitory activity of this compound against other
211 essential human enzymes.

212 To characterize the mode of inhibition of NDM-1 by L-
213 CS319, we determined a crystal structure of the complex.
214 NDM-1 crystals were obtained in the P1 crystal form (four
215 molecules in the asymmetric unit) described by Feng et al. (pdb
216 4RMS³⁰) and soaked with 5 mM of inhibitor dissolved in
217 DMSO, yielding a structure for the complex to a resolution of
218 1.90 Å (above which value completeness in the high-resolution
219 bin rapidly drops). Inspection of difference maps yielded clear
220 evidence for the presence of bound ligand in all four molecules
221 of NDM-1 (Figure S9), although crystallographic *B*-factors
222 varied between individual chains (Table 3). Inhibitor binding
223 has little effect upon the overall structure of NDM-1 (rmsd
224 0.647 Å between C α atoms using SSMSuperpose⁴¹ compared
225 to PDB accession 3SPU¹⁰). The main differences are in the
226 conformation of the L3 (residues 61–65) and, to a lesser
227 extent, L10 (residues 224–238) loops. Loop L3 is poorly
228 defined in the complex (as evidenced by weaker electron
229 density and elevated crystallographic *B*-factors) and could be
230 modeled in its entirety for only one of the four molecules
231 (Figure S10).

232 The inhibitor is bound to the NDM-1 active site, which
233 contains two zinc ions bound to the canonical metal ligands of
234 B1MBLs. The sulfur atom of the mercaptomethyl group is
235 positioned nearly equidistant between the two zinc ions,
236 displacing the bridging water/hydroxide molecule that is

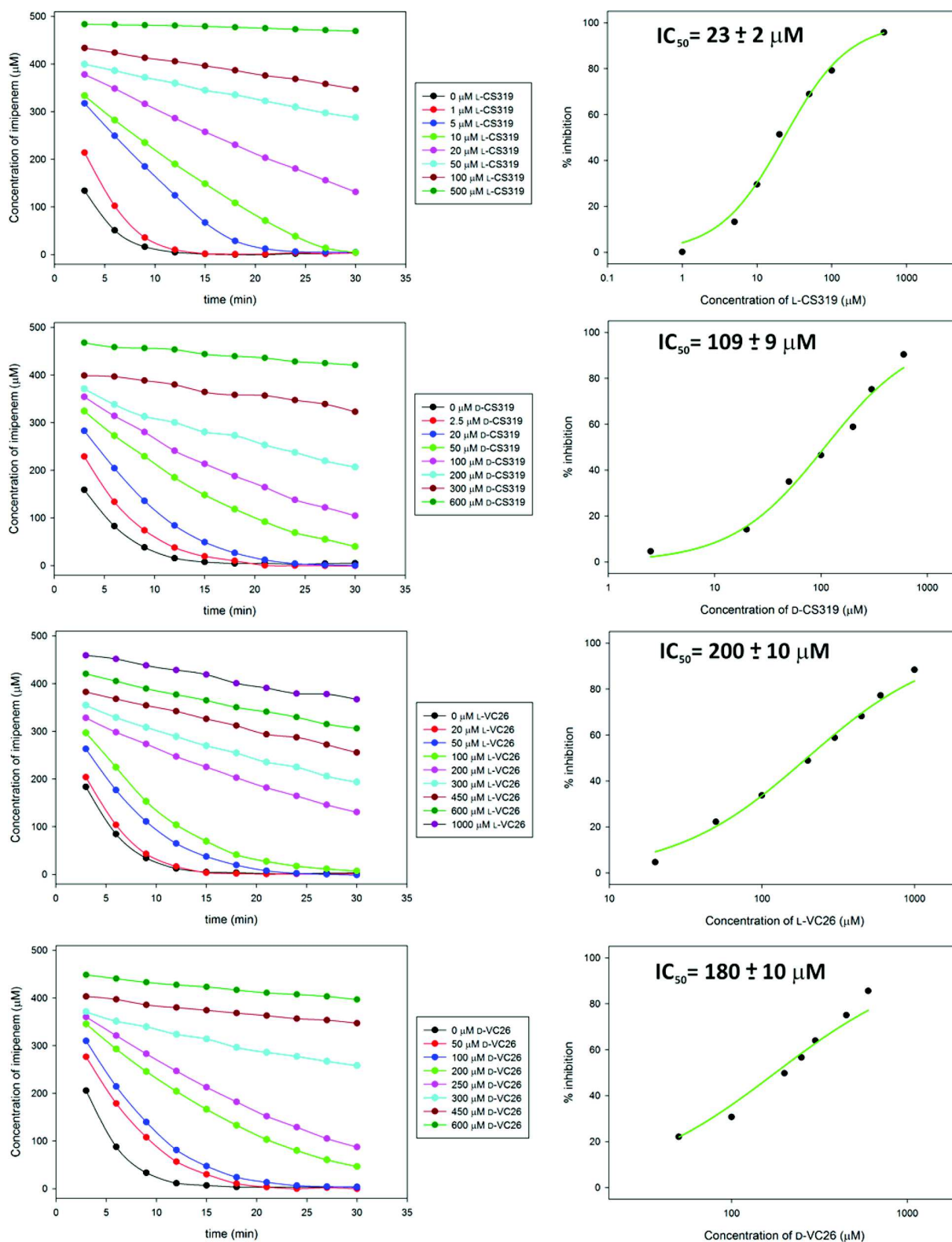


Figure 2. Carbenem hydrolysis inhibition in *E. coli* cells by BTZs. (Left) Remaining imipenem concentration, as determined from the ^1H NMR spectrum, after a given incubation time with NDM-1-bearing *E. coli* cells, in the absence or in the presence of different concentrations of each bithiazolidine. (Right) Determination of the IC_{50} from the plots of the percentage of inhibition as a function of compound concentration using eq 2.

237 proposed to be the attacking nucleophile (Figure 4), but with
 238 little impact on the $\text{Zn1}-\text{Zn2}$ distance (3.7 vs 3.8 Å in the
 239 unbound form). The coordination geometry of the two zinc
 240 ions is tetrahedral, in contrast to the structure of unliganded

NDM-1, which features a five-coordinated Zn2 ion, indicating
 241 that inhibitor binding is able to displace the second “apical”
 242 Zn2 -bound water molecule that is a feature of many unliganded
 243 MBL structures. The carboxylate moiety does not bind Zn2 , 244

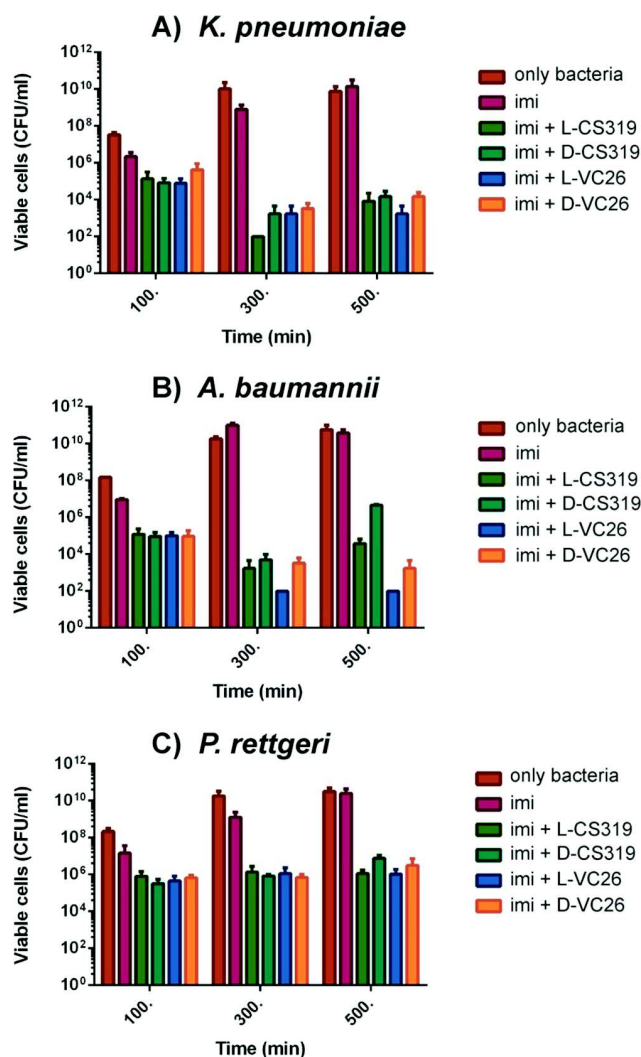


Figure 3. BTZs restore the in vitro activity of imipenem against NDM-1-producing *K. pneumoniae* (A), *A. baumannii* (B), and *P. rettgeri* (C). Bacteria were grown at sublethal concentrations of imipenem alone (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *K. pneumoniae* and 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *A. baumannii* and *P. rettgeri*) or in combination with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each compound. Viable cells were recovered at 100, 300, and 500 min. Results shown are the mean of three biological replicates \pm SD.

Table 3. Data Collection and Refinement Statistics

data collection	
processing	XDS/SCALA
beamline	DLS I04-1
space group	P1
cell dimensions (\AA)	$a = 46.57, b = 69.02, c = 69.65$
	$\alpha = 87.39^\circ, \beta = 88.21^\circ, \gamma = 76.75^\circ$
wavelength (\AA)	0.9200
resolution ^a (\AA)	28.47–1.90 (2.00–1.90)
total reflections ^a	183229 (24469)
unique reflections ^a	62122 (8848)
completeness ^a (%)	93.5 (91.0)
redundancy ^a	2.9 (2.8)
$I/(\text{sig } I)$ ^a	17.4 (5.4)
R_{merge} ^a (%)	0.045 (0.195)
refinement	PHENIX
total reflections ^a	62116 (2595)
resolution ^a (\AA)	27.88–1.90 (1.93–1.90)
R_{cryst} ^a (%)	15.4 (18.7)
R_{free} ^{a,b} (%)	18.2 (24.3)
RMS bond length (\AA)	1.179
RMS bond angle (\AA)	0.008
protein atoms	6763
water molecules	624
% residues in Ramachandran regions ^c (favored/allowed/disallowed)	98.3/1.7/0
B -factor (protein) ^d	19.6
B -factor (ligand) ^e	33.6
B -factor (water molecules)	29.9
PDB accession code	4U4L

^aData for the highest resolution shell are in parentheses. ^b R_{free} was calculated with 5% of the reflections omitted. ^cCalculated using MolProbity. ^d19.2, 19.2, 18.3, 21.6 for chains A–D, respectively. ^e46.3, 37.0, 34.5, 45.3 for chains A–D, respectively, refined at full occupancy.

meropenem (pdb 4EYL; 4.05 \AA). Third, the tetrahedral co-ordination geometry for both Zn1 and Zn2 differs from the 5- and 6-co-ordination typically observed in EP complexes, but resembles that for the captopril structure. Lastly, the BTZ carboxylate group occupies a unique position, making water-mediated interactions with K224, whereas in all β -lactam EP complexes so far described the equivalent (C2 or C3) carboxylate is positioned to form a bridge between Zn2 and K224. The complex with L-captopril does not feature a Zn2–carboxylate interaction. Hence, as in the case of β -lactam EP adducts of NDM-1, K224 orients the inhibitor for binding to the dinuclear metal site. Mimicking the interaction of β -lactams with the Zn(II) ions and/or K224 may be productive for the development of MBL-specific inhibitors. Finally, the bridging N atom in the BTZ scaffold is far from the zinc ions (at a distance of 5.5 \AA from Zn1 and 4.4 \AA from Zn2), in contrast to what has been reported in different EP complexes and proposed for EI species. We attribute this difference to the presence of the thiol moiety, which we propose dominates binding to the metal site and, in so, doing limits the extent to which interactions of BTZs with NDM-1 fully mimic those made by β -lactams.

We recently obtained the crystal structure of L-CS319 bound to a related B1MBL, VIM-2, for which BTZ inhibition was described by a slow-binding model (see above). In this work we observed binding of L-CS319 to VIM-2 in two conformations.

but instead makes hydrogen bonds with water molecules (Wat; Figure 4) that are themselves connected to Ne of K224.

Crystal structures have been deposited for complexes of NDM-1 with hydrolysis products (EP complexes) generated from a variety of β -lactams^{9,11,30} and with the thiol-containing captopril.¹¹ Comparison of the BTZ complex with these structures (Figure 5) identifies both similarities in the interactions of these different ligands with NDM-1 and some features that are unique to BTZ binding. First, the position of the BTZ thiol, displacing the “bridging” water molecule, is very similar to that occupied by the free thiol of captopril or the carboxylate group of hydrolyzed meropenem, but differs from that of the bridging water present in EP complexes of penicillins or cephalosporins. Second, the Zn1–Zn2 distance resembles that observed in complexes with L-captopril (3.59 \AA ; pdb 4EXS) and hydrolyzed cefuroxime (3.83 \AA ; pdb 4RL0) but is considerably shorter than in EP complexes of penicillins and the cephalosporin cephalixin (ca. 4.6 \AA) or, to a lesser extent,

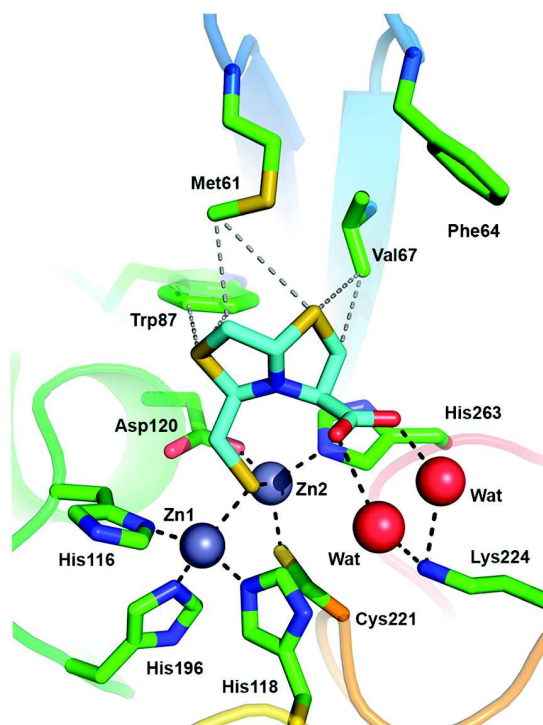


Figure 4. Crystal structure of the NDM-1:L-CS319 complex. Inhibitor L-CS319 interacts with both zinc ions via its sulfhydryl group. The carboxylate group interacts with K224 through two water molecules (Wats). Zinc ions and water molecules are represented as gray and red spheres, respectively. Hydrogen bonds and zinc coordination bonds are shown as black dashes and hydrophobic interactions as gray dashes. Protein main chain is color-ramped from the N-terminus (blue) to the C-terminus (red). The figure was generated using PyMol (www.pymol.org).

288 Binding of L-CS319 to NDM-1 resembles the more populated
 289 of these, in which the mercaptomethyl sulfur atom is also
 290 positioned between the two zinc ions, and the inhibitor
 291 carboxylate is also involved in interactions with the protein
 292 main chain. However, in the case of VIM-2, which lacks the
 293 conserved K224 found in NDM-1 (and most other subclass
 294 B1MBLs), the BTZ carboxylate instead contacts the main-chain
 295 carbonyl groups of N233 and (via a water molecule) C221.
 296 These interactions are present in both of the observed modes
 297 of BTZ binding to VIM-2. We consider it possible that these
 298 more plastic interactions involving the BTZ carboxylate permit
 299 multiple modes of binding to VIM-2, resulting in the different
 300 mode of inhibition that is observed in solution experiments.
 301 Notably, VIM-2 R228, a residue previously proposed to
 302 substitute for K224 in many VIM enzymes, is not optimally
 303 oriented for H-bonding to the BTZ carboxylate and is present
 304 in two conformations, of which the second (conformer B;
 305 [Figure S11](#)) cannot participate in BTZ binding. This, together
 306 with our observation that a leucine substitution at position 228
 307 has little impact upon BTZ affinity, further supports our
 308 contention that the BTZ carboxylate occupies a less well-
 309 defined binding pocket in VIM-2, compared to NDM-1. We
 310 also note that differences in the conformation of the L3 loop
 311 (see below) may also serve to shift the position of the BTZ
 312 bicyclic ring system in the major conformer of the VIM-2
 313 complex, compared to its location in the present NDM-1
 314 structure ([Figure S11](#)).

In addition to hydrogen-bonding and metal coordination 315
 interactions, the inhibitor makes hydrophobic contacts with 316
 residues M61 and V67 at the base of loop L3 and with W87 of 317
 loop L5. Mutagenesis studies on NDM-1 suggest that loop L3 318
 is important in substrate recognition.⁴² Indeed, improvement in 319
 IMP-1 inhibition by a series of succinic acid derivatives was 320
 achieved by optimizing hydrophobic interactions in the active 321
 site.¹⁵ It is notable that the conformation of loop L3 varies in 322
 the different NDM-1 structures, with the meropenem EP and 323
 captopril complexes in particular differing from the native 324
 structure. Although caution must be exercised in making 325
 comparisons as loop L3 is generally less well-defined in NDM-1 326
 structures, has relatively high *B*-factors, and is frequently 327
 involved in crystal contacts, we observe that in the BTZ 328
 complex loop L3 adopts a more “closed” conformation, 329
 overlaying the active site, than is the case for other structures 330
 so far reported ([Figure 5](#)). Indeed, the distance from the Zn1 331
 (trihistidine) site to the *C* α of G63 at the apex of the L3 loop 332
 varies between 17.9 Å (this structure), 20.1 Å (unliganded 333
 enzyme), and the complexes with hydrolyzed ampicillin (21.4 334
 Å), hydrolyzed meropenem (18.4 Å), and *L*-captopril (19.6 Å). 335
 We anticipate that the BTZ scaffold, particularly L-CS319, can 336
 be further decorated to improve recognition by hydrophobic 337
 moieties located in the L3 and L5 loops. We further note that 338
 the conformation of the L10 loop also differs between the 339
 native structure, the BTZ and captopril complexes, and the 340
 various β -lactam EP complexes, most likely as a result of 341
 contacts between the side chain of N233 and the EP 342
 carboxylate groups. Modifying the BTZ scaffold to enable 343
 exploitation of similar interactions may offer a further route to 344
 improving inhibitor potency. 345

In summary, we report the successful use of the 346
 bisthiazolidine scaffold as the basis for new inhibitors of the 347
 MBL NDM-1. All compounds efficiently inhibited NDM-1, 348
 with one showing low micromolar inhibition both in vitro and 349
 in bacterial cells, as well as the ability to restore carbapenem 350
 efficacy against NDM-1-producing clinical isolates. Two key 351
 elements of this compound are a thiol group that binds by 352
 bridging the two Zn(II) ions in the NDM-1 active site and a 353
 carboxylate that interacts with K224. The approach outlined 354
 herein provides a novel, efficient strategy for MBL inhibition, 355
 inspired by key elements of β -lactam binding and hydrolysis, 356
 and provides a flexible scaffold for further optimization. 357

METHODS 358

Protein Preparation. For kinetic studies, the *bla*_{NDM-1} gene 359
 encoding the protein lacking the first 38 residues (including the 360
 leader sequence) was cloned between the *Nde*I and *Xho*I 361
 restriction sites of a modified version of the pET-28 (+) 362
 plasmid in which the thrombin cleavage site was replaced by a 363
 TEV cleavage site.^{43,44} The mature NDM-1 (residues 32–294, 364
 BBL numbering) was produced in *Escherichia coli* BL21(DE3). 365
 The bacterial culture was grown at 37 °C in M9 minimal media 366
 until it reached OD₆₀₀ = 0.6. Then, NDM-1 production was 367
 induced by addition of 0.5 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyr- 368
 ranoside (IPTG). At the time of induction of protein expression, 369
 the growth medium was supplemented with 0.5 mM ZnSO₄. 370
 Cells were incubated overnight at 18 °C. All subsequent 371
 purification steps were performed at 4 °C. The cells were 372
 harvested and resuspended in 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 200 mM 373
 NaCl and supplemented with 10 μ g/mL DNase, 4 mM MgCl₂, 374
 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), and 10 mM β - 375
 mercaptoethanol. *E. coli* cells were disrupted by sonication (five 376

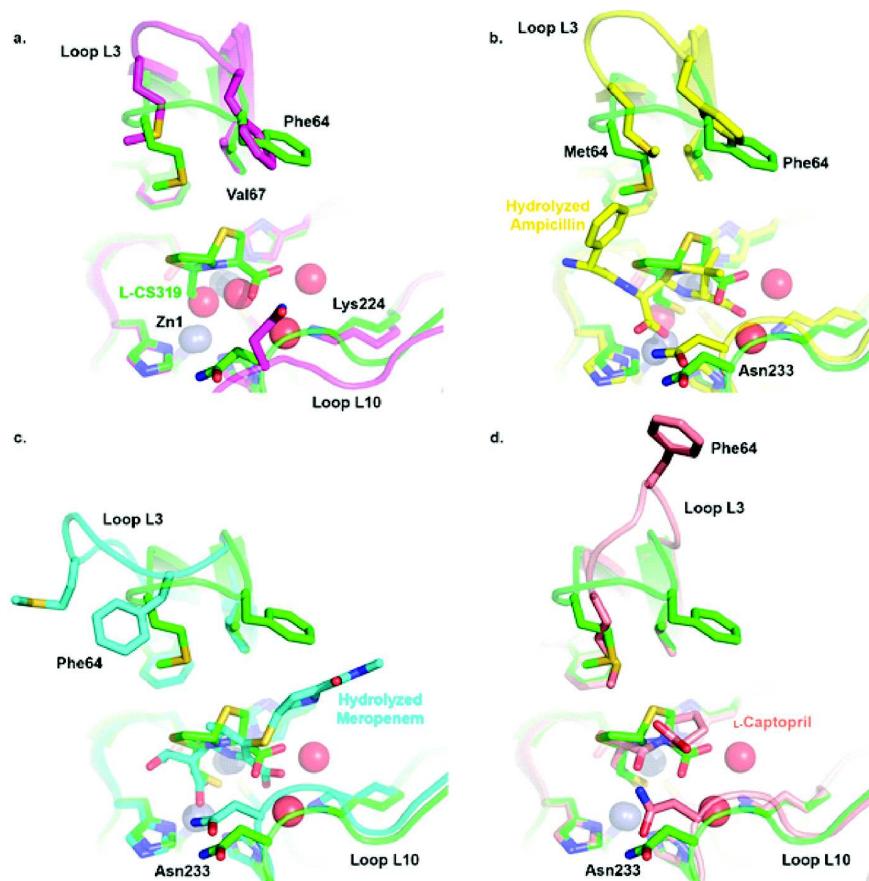


Figure 5. Comparison of NDM-1:L-CS319 complex with other NDM-1 structures. Overlay of structure of NDM-1:L-CS319 complex (green) with structures of NDM-1: (a) unliganded NDM-1 (magenta, pdb 3SPU); (b) complex with hydrolyzed ampicillin (yellow, pdb 3Q6X); (c) complex with hydrolyzed meropenem (cyan, pdb 4EYL); (d) complex with L-captopril (salmon, pdb 4EXS). Carbon atoms are colored as above, other atoms are standard. Zinc ions (gray spheres) and active site residues from the NDM-1:L-CS319 complex structure are shown. This figure was generated using Pymol (www.pymol.org).

377 cycles of 30 s with 1 min between), and the insoluble material
 378 was removed by centrifugation for 60 min at 15000g. The crude
 379 extract was loaded onto a Ni-Sepharose column equilibrated
 380 with buffer A (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM
 381 β -mercaptoethanol), the column was washed with 100 mL of
 382 buffer A, and His6x-NDM-1 was eluted with buffer B (50 mM
 383 Tris-Cl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoethanol,
 384 500 mM imidazole) using a linear gradient (0–100% buffer B,
 385 in 100 mL). Then, 100 μ M His6x-NDM-1 was mixed with the
 386 TEV protease (1:50 TEV:His6x-NDM-1 ratio), and the
 387 mixture was incubated for 16 h at 4 °C during dialysis against
 388 100 volumes of 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM
 389 β -mercaptoethanol. NDM-1 was then loaded onto a Ni-
 390 Sepharose column to separate it from the His6x tag, the
 391 uncleaved fusion protein, and the His6x-tagged TEV protease.
 392 NDM-1 was collected in the flow-through of the column with a
 393 purity >95%, as determined by SDS-PAGE. β -Mercaptoethanol
 394 was removed from the protein sample by one 12-h dialysis step
 395 of 100 μ M NDM-1 against 100 volumes of 10 mM HEPES, pH
 396 7.5, 200 mM NaCl, 200 μ M ZnSO₄, followed by three 4-h
 397 dialysis steps against 100 volumes of 10 mM HEPES, pH 7.5,
 398 200 mM NaCl. NDM-1 was concentrated using Centricon
 399 ultrafiltration devices (Millipore, Bedford, MA, USA) to a final
 400 concentration of 200 μ M. Protein concentrations were
 401 determined from the absorbance at 280 nm using a molar
 402 absorption coefficient⁴⁵ (ϵ_{280}) of 28500 M⁻¹ cm⁻¹. The average

protein yield was 50 mg/L culture. For X-ray crystallography, 403
 NDM-1 lacking the first 26 amino acids (including the leader 404
 sequence) was expressed from the pOPINF T7 vector.⁴⁶ 405
 Recombinant NDM-1 was expressed and purified according to 406
 the method of Rydzik et al.⁴⁷ and concentrated to 35 mg/mL 407
 by ultrafiltration. 408

Representative Synthesis of Bisthiazolidines.⁴⁸ *Syn-* 409
thesis of (2R,5S,8R)-8-Carboxylate-2-mercaptomethyl-1-aza- 410
3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (L-CS319). 1,4-Dithiane-2,5-di- 411
 thiol (0.8 g, 5.0 mmol) and *p*-TsOH ac. (0.030 g, 0.17 mmol) 412
 were added to a stirred suspension of L-cysteine (0.5 g, 4.1 413
 mmol) in ethanol (16 mL). The mixture was heated at reflux 414
 for 2 h. It was then cooled and poured into brine, extracted 415
 with CH₂Cl₂ (5 × 30 mL), dried (Na₂SO₄), and filtered, and 416
 the solvent was removed under reduced pressure. The residue 417
 was purified by chromatography on SiO₂ (1:3:0.1 EtOAc/ 418
 hexane/AcOH) to give compound L-CS319 (0.830 g, 86%, 419
syn/anti 95:05) as a white solid: mp 103–104 °C; ¹H NMR 420
 (CDCl₃) δ 1.86 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H_{SH}), 2.81 (dd, *J* = 8.5, 6.9 Hz, 421
 2H), 3.11 (dd, *J* = 12.0, 4.2 Hz, 1H), 3.33 (dd, *J* = 11.4, 7.1 Hz, 422
 1H), 3.43 (dd, *J* = 11.4, 3.3 Hz, 1H), 3.55 (dd, *J* = 12.0, 5.8 Hz, 423
 1H), 4.25 (dd, *J* = 7.1, 3.3 Hz, 1H), 4.32 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 424
 5.05 (dd, *J* = 5.8, 4.2 Hz, 1H); ¹³C NMR ((CD₃)₂CO) δ 34.0, 425
 34.3, 39.2, 71.5, 74.5, 75.6, 172.1; HRMS calculated for 426
 C₇H₁₁NO₂S₃, [M + H]⁺ 238.0025, found 238.0033; [α]_D = 427
 -57.7° (20 °C, AcCN, *c* 0.6). 428

429 **Synthesis of (2S,5R,8S)-8-Carboxylate-2-mercaptomethyl-**
430 **1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (D-CS319).** An analo-
431 gous route to the one described for L-CS319, starting from
432 D-cysteine, was used. The spectroscopic properties were
433 identical to those obtained for L-CS319, $[\alpha]_{\text{D}} = +63.1^{\circ}$ (20
434 $^{\circ}\text{C}$, AcCN, c 0.6).

435 **Synthesis of (2R,5S,8R)-2-Mercaptomethyl-7-dimethyl-8-**
436 **carboxylate-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (L-VC26).**
437 An analogous route to the one described for L-CS319, starting
438 from L-penicillamine, was used. Purification by chromatography
439 on SiO_2 (1:3, EtOAc/hexane) gave compound L-VC26 (89%,
440 *syn/anti* 95:0.5): ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.52 (s, 3H), 1.62 (s,
441 3H), 1.89 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H_{SH}), 2.81 (m, 2H), 3.06 (dd, $J =$
442 11.7, 5.4 Hz, 1H), 3.43 (dd, $J = 11.7, 6.6$ Hz, 1H), 3.80 (s, 1H),
443 4.31 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.98 (dd, $J = 6.6, 5.4$ Hz, 1H); ^{13}C
444 NMR (CDCl_3) δ 28.0, 28.1, 32.0, 40.5, 55.1, 68.7, 75.7, 78.5,
445 170.4; HRMS calculated for $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_2\text{S}_3$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 266.0343,
446 found 266.0330; $[\alpha]_{\text{D}} = -45.2^{\circ}$ (20 $^{\circ}\text{C}$, MeOH, c 1.0).

447 **Synthesis of (2S,5R,8S)-2-Mercaptomethyl-7-dimethyl-8-**
448 **carboxylate-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (D-VC26).**
449 It was prepared following an analogous route to the one
450 described for L-CS319, starting from D-penicillamine. The
451 spectroscopic properties were identical to those obtained for L-
452 VC26; $[\alpha]_{\text{D}} = +40.0^{\circ}$ (20 $^{\circ}\text{C}$, MeOH, c 1.0).

453 **Inhibition Assays on NDM-1.** Hydrolysis of imipenem by
454 NDM-1 was monitored using a Jasco V-670 spectrophotometer
455 by following the changes in absorbance at 300 nm using a $\Delta\epsilon_{300}$
456 = $-9000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The reaction medium employed was 10
457 mM HEPES, pH 7.5, 200 mM NaCl, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA, and 20
458 μM ZnSO_4 at 30 $^{\circ}\text{C}$. Reactions were carried out in 0.1 cm path
459 length quartz cuvettes in a final volume of 300 μL , with a final
460 enzyme concentration of 1 nM. Bisthiazolidines were dissolved
461 in DMSO to a final concentration of 100 mM and then diluted
462 10-fold (to 10 mM) in 10 mM HEPES, pH 7.5, 200 mM NaCl.
463 Appropriate volumes of the 10 mM stock solutions were used
464 to achieve the desired final concentrations. The final DMSO
465 concentration in the reaction mixture was then maintained
466 between 0.01 and 0.07%, which did not alter the enzyme
467 activity (data not shown). The assay was initiated by the
468 addition of NDM-1 to the mixture of substrate and inhibitor. In
469 the presence of inhibitor, the initial phase of the time courses
470 was linear but showed a decreased rate of hydrolysis with
471 respect to the reaction in the absence of inhibitor. The initial
472 rate of reaction for each substrate or substrate–inhibitor
473 concentration, under steady state conditions (<5% of substrate
474 consumed), was calculated from the slope of the initial linear
475 phase of the respective time course. Inhibition constants (K_i)
476 were evaluated by nonlinear fitting of the initial velocities at
477 various concentrations of the substrates and inhibitors, with the
478 equations for different inhibition models as implemented in
479 GraphPad 5.0. Best fits were obtained with the competitive
480 inhibition model using the equation $v_0 = ((v_{\text{max}} \times [\text{S}]) / (K_{\text{M}} \times$
481 $(1 + ([\text{I}] / K_i) + [\text{S}]))$ (Figure S1). The inhibition constants (K_i)
482 are shown with their corresponding standard errors obtained
483 from the fit (Table 2). We obtained the Lineweaver–Burk plots
484 for each bisthiazolidine from the fits to the competitive
485 inhibition model using the equation $(1/v_0) = (1/v_{\text{MAX}}) \times ((1/$
486 $[\text{S}]) \times K_{\text{M}} \times (1 + ([\text{I}] / K_i) + 1)$ (Figure S3). The
487 bisthiazolidine inhibitors did not show a significant absorption
488 spectrum, allowing us to discard possible interferences with the
489 measurements (Figure S18).

490 **Glyoxalase Activity Measurements.** The inhibition
491 analyses for hydroxyacylglutathione hydrolase, human glyox-

ylase II (hHAGH), were performed following the hHAGH 492
assay from R&D Systems. The hHAGH assay was carried out 493
using a BMG Labtech Pherastar FS microplate reader using 494
UV-Star 96 well plates (Greiner Bio-One). L-CS319 was 495
screened at a single concentration (100 μM) in triplicate. The 496
inhibitor was incubated for 10 min with the enzyme prior to 497
addition of the substrate. The rate of hydrolysis of S- 498
lactoylglutathione (0.5 mM, supplemented with DTNB (200 499
 μM) to form a substrate mixture) by recombinant hHAGH (0.2 500
 $\text{ng}/\mu\text{L}$) was monitored at 405 nm in the presence of L-CS319. 501
EDTA was used as control. No inhibition was detected at these 502
assay conditions. 503

504 **E. coli Cell Preparations for Inhibition Studies.** We 504
constructed a plasmid for the periplasmic expression of NDM-1 505
(pMBLeNDM-1), in which the $bla_{\text{NDM-1}}$ gene is under the 506
control of the pLac promoter (Scheme S1). *E. coli* cells carrying 507
the pMBLe vector (without the $bla_{\text{NDM-1}}$ gene) or the 508
pMBLeNDM-1 vector were inoculated into 10 mL of lysogeny 509
broth (LB) medium in the presence of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin 510
and were grown with shaking (220 rpm) at 37 $^{\circ}\text{C}$ until cells 511
reached $\text{OD}_{600} = 0.6$. At that time, 100 μM IPTG was added for 512
NDM-1 β -lactamase induction, and cells were grown for 2 h at 513
37 $^{\circ}\text{C}$ with shaking (220 rpm). Cell cultures were centrifuged 514
at 1000g for 4 min at 4 $^{\circ}\text{C}$, the supernatant was discarded, and 515
the cell pellets were washed thoroughly by resuspending them 516
in 1 mL of buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.0) and were 517
then pelleted again by centrifugation (1000g, for 4 min at 4 518
 $^{\circ}\text{C}$). This process was repeated three times, and finally cells 519
were resuspended in buffer to $\text{OD}_{600} = 0.1$ for NMR studies. 520
Lastly, 500 μL of final cell suspensions (in 50 mM sodium 521
phosphate, pH 7.0, at 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O) was placed in the 522
NMR tube for data acquisition. Different concentrations of 523
each compound and/or 500 μM of imipenem were added for 524
estimation of the IC_{50} values. Supernatants from the cell 525
suspensions were collected by centrifugation (1000g for 10 min 526
at 4 $^{\circ}\text{C}$) and then filtered through 0.22 μm filters. 527

528 **Plating Colony Tests for NDM-1-Bearing E. coli Cells.** 528
We obtained serial 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , and 10^8 -fold dilutions 529
from stock suspensions of NDM-1-bearing *E. coli* cells. Then, 530
we inoculated an LB-agar plate containing 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 531
gentamicin with 10 μL drops of each dilution. The drops 532
were allowed to dry on the plate, and the plate was incubated at 533
37 $^{\circ}\text{C}$ overnight. 534

535 **^1H NMR Measurements and Analyses.** All spectra were 535
acquired on a Bruker Avance 600 MHz spectrometer equipped 536
with a TXI probe. We used a sweep width of 10204 Hz for 1D 537
 ^1H NMR experiments. All spectra were acquired with 64 scans, 538
and the temperature was kept constant at 25 $^{\circ}\text{C}$. Water 539
suppression was achieved by means of the excitation sculpting 540
scheme; the water-selective 180 $^{\circ}\text{C}$ sine-shaped pulse was 2 ms 541
long. The FID was collected in 32K data points. A 1 Hz 542
exponential line broadening function was applied prior to 543
Fourier transformation. NMR spectra were processed and 544
analyzed with TopSpin 3.0. All spectra in a given series were 545
plotted at the same scaling ratio. 546

547 **Whole-Cell IC_{50} Measurements and Analyses.** We 547
confirmed that imipenem is sufficiently stable in buffer or in 548
the presence of *E. coli* cells lacking carbapenemases (Figure S4). 549
However, when a 500 μM imipenem solution was exposed to 550
a suspension of *E. coli* cells expressing NDM-1, the carbapenem 551
was degraded within 9–15 min (Figure 2). Cell lysis leading to 552
NDM-1 leakage into the medium was not observed, confirming 553
that the reaction occurred within the bacterial periplasm 554

555 (Figure S5). Cell viability after 1 h of incubation during the
556 NMR measurements was verified (Figure S6).

557 We then performed the IC₅₀ measurements according to the
558 procedure of Dalvit and co-workers.⁴⁹ To evaluate the potency
559 of the inhibitors we calculated the percentage of the inhibition
560 seen 15 min after the initiation of the reaction using eq 1

$$\% \text{inhibition} = 100 \times [1 - ([S_{\text{TOT}}] - [S_{\text{w}}]) / ([S_{\text{TOTAL}}] - [S_{\text{w/o}}])] \quad (1)$$

561 where [S_w] and [S_{w/o}] are given by the integrals of the substrate
562 signals (between 1.21 and 1.18 ppm of imipenem in this case)
563 in the presence and absence of inhibitor, respectively. [S_{TOTAL}]
564 is the sum of [S_{w/o}] and [P_{w/o}] or [S_w] and [P_w], where [P_w]
565 and [P_{w/o}] are the integrals of the product signals (between
566 1.17 and 1.12 ppm of hydrolyzed imipenem in this case) in the
567 presence and absence of the inhibitor, respectively. IC₅₀ values
568 can be obtained by fitting the data of percent inhibition versus
569 inhibitor concentration to eq 2

$$\% \text{inhibition} = 100 \times [1 - 1 / (1 + ([I] / \text{IC}_{50})^n)] \quad (2)$$

571 where [I] is the concentration of the inhibitor and *n* is the
572 cooperativity factor. The IC₅₀ values are presented with the
573 corresponding standard errors obtained from the fit (Table 2).

574 **Crystallization and Structure Determination.** We used
575 a version of NDM-1 lacking the first 26 amino acids at a
576 concentration of 35 mg/mL. Crystals were obtained from 100
577 mM MES, pH 6.5, 25% (w/v) PEG 2000 monomethyl ether
578 and soaked for 10 min in a solution of mother liquor containing
579 5 mM of the bithiazolidine L-CS319 and 5% dimethyl
580 sulfoxide (DMSO), before transient transfer to mother liquor
581 supplemented with 25% glycerol and snap-freezing in liquid
582 nitrogen. X-ray diffraction data were collected on a Pilatus M2
583 detector mounted on beamline I04-1 of the Diamond Light
584 Source synchrotron radiation facility (Didcot, UK). Data were
585 integrated using the program XDS⁵⁰ with space group
586 assignment by POINTLESS⁵¹ as implemented in the XIA2
587 crystallography pipeline,⁵² and scaled and merged using
588 SCALA⁵³ as part of the CCP4 crystallography suite.⁵⁴ The
589 structure was solved by molecular replacement using
590 PHASER⁵⁵ with unliganded NDM-1 (pdb 3SPU)¹⁰ as a search
591 model. The model was rebuilt using Coot⁵⁶ and refined using
592 PHENIX.⁵⁷ The quality of the final structure was assessed with
593 MolProbity.⁵⁸

594 **Cytotoxicity Assays.** HeLa/HEK 293 cells were seeded
595 (5000 or 2000 per well, respectively) in normal DMEM using
596 96-well plates. After 24 h, the wells were closed and
597 supplemented with the inhibitor (final DMSO concentration
598 - 1%). Following a further 24 h incubation period, 20 μL of
599 tetrazolium (MTS, CellTiter96Aqueous One Solution (Prom-
600 ega)) was added to the medium in each well. The plate was
601 incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 4 h in the dark before the
602 absorbance was read at 495 nm to determine cell proliferation
603 values.

604 **In Vitro Time Kill Study.** Three clinical strains expressing
605 NDM-1 as the only MBL were employed for these experiments
606 (Table S1).⁵⁹ NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* (imipe-
607 nem MIC = 8 mg/L), *Providencia rettgeri* (imipenem MIC = 64
608 mg/L),⁵⁹ and *Acinetobacter baumannii* (imipenem MIC = 128
609 mg/L) were cultured overnight at 37 °C in Muller Hinton
610 broth (MHB) supplemented with 50 mg/L ampicillin. The
611 following day, 1.5 μL of the overnight cultures was inoculated
612 in 1 mL of MHB to obtain a bacterial suspension of

approximately 10⁶ CFU/mL. To examine the effects of the
614 novel bithiazolidine compounds on bacterial growth, the
615 bacterial suspensions were grown at 37 °C under different
616 conditions: MHB alone (growth control) or supplemented with
617 0.4% DMSO (growth control), sublethal concentrations of
618 imipenem (4 mg/L for *K. pneumoniae* and 16 mg/L for *A.*
619 *baumannii* and *P. rettgeri*), 100 mg/L of each inhibitor, or a
620 combination of imipenem and inhibitor. Samples (10 μL) were
621 removed at time intervals of 100, 300, and 500 min of exposure,
622 and serial dilutions were performed on MHB. The number of
623 viable cells was determined by spotting 20 μL of each dilution
624 on Muller Hinton agar (MHA). The plates were incubated at
625 37 °C overnight, and the numbers of colonies were counted.
626 Results shown are the mean of three biological replicates.

627 The inhibitors do not have any antimicrobial effect on their
628 own, as differences could not be detected in viable cell number
629 between inhibitor-exposed cells and broth-only controls
630 (Figure S7).
631

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the
634 ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsinfec-
635 dis.5b00046.
636

Supporting figures, scheme, and table (PDF)

Accession Codes

The Protein Data Bank entry for the NDM-1/CS319 complex
639 is 4U4L.
640

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*(A.J.V.) E-mail: vila@ibr-conicet.gov.ar.

*(J.S.) E-mail: jim.spencer@bristol.ac.uk.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funds and/or facilities provided by
648 the Cleveland Department of Veterans Affairs, the Department
649 of Veterans Affairs Merit Review Program, the Veterans
650 Integrated Service Network 10 Geriatric Research, Education,
651 and Clinical Center (VISN 10 GRECC), ANPCyT grants to
652 A.J.V., and the National Institute of Allergy and Infectious
653 Diseases of the National Institutes of Health under Awards
654 SR01AI100560-03, R01 AI100560, and R01 AI063517. A.J.V.
655 and L.L.L. are CONICET staff members. M.M.G. thanks
656 CONICET for fellowships. V.C. is grateful for a fellowship
657 from ANII (POS_X_2014). J.S., J.B., and C.J.S. acknowledge
658 funding from the U.K. Medical Research Council (UK-Canada
659 Team Grant G1100135). We thank Diamond Light Source for
660 access to beamline I04-1 (Proposal MX313) that contributed to
661 the results presented here.
662

■ REFERENCES

- (1) Fisher, J. F., Meroueh, S. O., and Mobashery, S. (2005) Bacterial
664 resistance to β-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling
665 opportunity. *Chem. Rev.* 105, 395–424.
666
- (2) van Duin, D., Kaye, K. S., Neuner, E. A., and Bonomo, R. A.
667 (2013) Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treat-
668 ment and outcomes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 75, 115–120.
669

- 670 (3) Bush, K. (2010) Alarming β -lactamase-mediated resistance in
671 multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 558–
672 564.
- 673 (4) Patel, G., and Bonomo, R. A. (2011) Status report on
674 carbapenemases: challenges and prospects. *Expert Rev. Anti-Infect.*
675 *Ther.* 9, 555–570.
- 676 (5) Munoz-Price, L. S., Poirel, L., Bonomo, R. A., Schwaber, M. J.,
677 Daikos, G. L., Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M.,
678 Hayden, M. K., Kumarasamy, K., Livermore, D. M., Maya, J. J.,
679 Nordmann, P., Patel, J. B., Paterson, D. L., Pitout, J., Villegas, M. V.,
680 Wang, H., Woodford, N., and Quinn, J. P. (2013) Clinical
681 epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae*
682 carbapenemases. *Lancet Infect. Dis.* 13, 785–796.
- 683 (6) Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J.,
684 Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C. G.,
685 Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A. V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie,
686 T., Paterson, D. L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Rao, B., Ray, U.,
687 Sarma, J. B., Sharma, M., Sheridan, E., Thirunarayan, M. A., Turton, J.,
688 Upadhyay, S., Warner, M., Welfare, W., Livermore, D. M., and
689 Woodford, N. (2010) Emergence of a new antibiotic resistance
690 mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and
691 epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* 10, 597–602.
- 692 (7) Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M., and Toleman, M. A.
693 (2011) Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi
694 environment and its implications for human health: an environmental
695 point prevalence study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 355–362.
- 696 (8) Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K.,
697 Lee, K., and Walsh, T. R. (2009) Characterization of a new metallo-
698 beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase
699 gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae*
700 sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 5046–
701 5054.
- 702 (9) Zhang, H., and Hao, Q. (2011) Crystal structure of NDM-1
703 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism. *FASEB J.* 25,
704 2574–2582.
- 705 (10) King, D., and Strynadka, N. (2011) Crystal structure of New
706 Delhi metallo- β -lactamase reveals molecular basis for antibiotic
707 resistance. *Protein Sci.* 20, 1484–1491.
- 708 (11) King, D. T., Worrall, L. J., Gruninger, R. J., and Strynadka, N. C.
709 J. (2012) New Delhi metallo- β -lactamase: structural insights into β -
710 lactam recognition and inhibition. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 11362–
711 11365.
- 712 (12) Galleni, M., Lamotte-Brasseur, J., Rossolini, G. M., Spencer, J.,
713 Dideberg, O., and Frère, J. M. (2001) Standard numbering scheme for
714 class B β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 660–663.
- 715 (13) Liénard, B. M. R., Hüting, R., Lassaux, P., Galleni, M., Frère, J.-
716 M., and Schofield, C. J. (2008) Dynamic combinatorial mass
717 spectrometry leads to metallo- β -lactamase inhibitors. *J. Med. Chem.*
718 51, 684–688.
- 719 (14) Mollard, C., Moali, C., Papamicael, C., Damblon, C., Vessilier,
720 S., Amicosante, G., Schofield, C. J., Galleni, M., Frère, J. M., and
721 Roberts, G. C. (2001) Thiomandelic acid, a broad spectrum inhibitor
722 of zinc beta-lactamases: kinetic and spectroscopic studies. *J. Biol. Chem.*
723 276, 45015–45023.
- 724 (15) Toney, J. H., Hammond, G. G., Fitzgerald, P. M., Sharma, N.,
725 Balkovec, J. M., Rouen, G. P., Olson, S. H., Hammond, M. L.,
726 Greenlee, M. L., and Gao, Y. D. (2001) Succinic acids as potent
727 inhibitors of plasmid-borne IMP-1 metallo- β -lactamase. *J. Biol. Chem.*
728 276, 31913–31918.
- 729 (16) García-Saez, I., Hopkins, J., Papamicael, C., Franceschini, N.,
730 Amicosante, G., Rossolini, G. M., Galleni, M., Frère, J.-M., and
731 Dideberg, O. (2003) The 1.5-Å structure of *Chryseobacterium*
732 *meningosepticum* zinc β -lactamase in complex with the inhibitor, D-
733 captopril. *J. Biol. Chem.* 278, 23868–23873.
- 734 (17) Guo, Y., Wang, J., Niu, G., Shui, W., Sun, Y., Zhou, H., Zhang,
735 Y., Yang, C., Lou, Z., and Rao, Z. (2011) A structural view of the
736 antibiotic degradation enzyme NDM-1 from a superbug. *Protein Cell* 2,
737 384–394.
- (18) Zhang, Y. L., Yang, K. W., Zhou, Y. J., LaCuran, A. E., 738
Oelschlaeger, P., and Crowder, M. W. (2014) Diaryl-substituted 739
azolythioacetamides: Inhibitor discovery of New Delhi metallo- β - 740
lactamase-1 (NDM-1). *ChemMedChem* 9, 2445–2448. 741
- (19) Klingler, F. M., Wichelhaus, T. A., Frank, D., Bernal, J. C., El- 742
Delik, J., Müller, H. F., Sjuts, H., Gottig, S., Koenigs, A., Pos, K. M., 743
Pogoryelov, D., and Proschak, E. (2015) Approved drugs containing 744
thiols as inhibitors of metallo- β -lactamases: a strategy to combat 745
multidrug-resistant bacteria. *J. Med. Chem.* 58, 3626–3630. 746
- (20) Livermore, D. M., Mushtaq, S., Morinaka, A., Ida, T., Maebashi, 747
K., and Hope, R. (2013) Activity of carbapenems with ME1071 748
(disodium 2,3-diethylmaleate) against Enterobacteriaceae and *Acine-* 749
tobacter spp. with carbapenemases, including NDM enzymes. *J.* 750
Antimicrob. Chemother. 68, 153–158. 751
- (21) Brem, J., van Berkel, S. S., Aik, W., Rydzik, A. M., Avison, M. B., 752
Pettinati, I., Umland, K. D., Kawamura, A., Spencer, J., Claridge, T. D., 753
McDonough, M. A., and Schofield, C. J. (2014) Rhodanine hydrolysis 754
leads to potent thioenolate mediated metallo- β -lactamase inhibition. 755
Nat. Chem. 6, 1084–1090. 756
- (22) King, A. M., Reid-Yu, S. A., Wang, W., King, D. T., De Pascale, 757
G., Strynadka, N. C., Walsh, T. R., Coombes, B. K., and Wright, G. D. 758
(2014) Aspergillomarasmine A overcomes metallo- β -lactamase anti- 759
biotic resistance. *Nature* 510, 503–506. 760
- (23) Crowder, M. W., Spencer, J., and Vila, A. J. (2006) Metallo- β - 761
lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Acc.* 762
Chem. Res. 39, 721–728. 763
- (24) Yang, H., Aitha, M., Hetrick, A. M., Richmond, T. K., Tierney, 764
D. L., and Crowder, M. W. (2012) Mechanistic and spectroscopic 765
studies of metallo- β -lactamase NDM-1. *Biochemistry* 51, 3839–3847. 766
- (25) Tioni, M. F., Llarrull, L. I., Poeylout-Palena, A. A., Martí, M. A., 767
Saggu, M., Periyannan, G. R., Mata, E. G., Bennett, B., Murgida, D. H., 768
and Vila, A. J. (2008) Trapping and characterization of a reaction 769
intermediate in carbapenem hydrolysis by *B. cereus* metallo-beta- 770
lactamase. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 15852–15863. 771
- (26) Wang, Z., Fast, W., and Benkovic, S. J. (1999) On the 772
mechanism of the metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. 773
Biochemistry 38, 10013–10023. 774
- (27) Rasia, R. M., and Vila, A. J. (2004) Structural determinants of 775
substrate binding to *Bacillus cereus* metallo- β -lactamase. *J. Biol. Chem.* 776
279, 26046–26051. 777
- (28) Meini, M.-R., González, L. J., and Vila, A. J. (2013) Antibiotic 778
resistance in Zn(II)-deficient environments: metallo- β -lactamase 779
activation in the periplasm. *Future Microbiol.* 8, 947–979. 780
- (29) Garau, G., Bebrone, C., Anne, C., Galleni, M., Frère, J.-M., and 781
Dideberg, O. (2005) A metallo- β -lactamase enzyme in action: crystal 782
structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with 783
biapenem. *J. Mol. Biol.* 345, 785–795. 784
- (30) Feng, H., Ding, J., Zhu, D., Liu, X., Xu, X., Zhang, Y., Zang, S., 785
Wang, D. C., and Liu, W. (2014) Structural and mechanistic insights 786
into NDM-1 catalyzed hydrolysis of cephalosporins. *J. Am. Chem. Soc.* 787
136, 14694–14697. 788
- (31) Poeylout-Palena, A. A., Tomatis, P. E., Karsisiotis, A. I., 789
Damblon, C., Mata, E. G., and Vila, A. J. (2007) A minimalistic 790
approach to identify substrate binding features in B1Metallo- β - 791
lactamases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 5171–5174. 792
- (32) Tripathi, R., and Nair, N. N. (2015) Mechanism of meropenem 793
hydrolysis by New Delhi metallo β -lactamase. *ACS Catal.* 5, 2577– 794
2586. 795
- (33) Baldwin, J. E., Lynch, G. P., and Pitlik, J. (1991) γ -Lactam 796
analogues of β -lactam antibiotics. *J. Antibiot.* 44, 1–24. 797
- (34) Saiz, C., Pizzo, C., Manta, E., Wipf, P., and Mahler, S. G. (2009) 798
Microwave assisted tandem reactions for the synthesis of 2-hydrazolyl- 799
4-thiazolidinones. *Tetrahedron Lett.* 50, 901–904. 800
- (35) Mojica, M. F., Mahler, S. G., Bethel, C. R., Taracila, M. A., 801
Kosmopoulou, M., Papp-Wallace, K. M., Llarrull, L. I., Wilson, B. M., 802
Marshall, S. H., Wallace, C. J., Villegas, M. V., Harris, M. E., Vila, A. J., 803
Spencer, J., and Bonomo, R. A. (2015) Exploring the role of residue 804
228 in substrate and inhibitor recognition by VIM metallo- β - 805
lactamases. *Biochemistry* 54, 3183–3196. 806

- 807 (36) Ma, J., McLeod, S., MacCormack, K., Sriram, S., Gao, N.,
808 Breeze, A. L., and Hu, J. (2014) Real-time monitoring of New Delhi
809 metallo- β -lactamase activity in living bacterial cells by 1H NMR
810 spectroscopy. *Angew. Chem., Int. Ed.* 53, 2130–2133.
- 811 (37) Sato, K., and Nakae, T. (1991) Outer membrane permeability of
812 *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. *J.*
813 *Antimicrob. Chemother.* 28, 35–45.
- 814 (38) Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P.
815 N., and Bonomo, R. A. (2007) Global challenge of multidrug-resistant
816 *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3471–
817 3484.
- 818 (39) Bebrone, C. (2007) Metallo-beta-lactamases (classification,
819 activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their
820 superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 74, 1686–1701.
- 821 (40) Sousa Silva, M., Gomes, R. A., Ferreira, A. E., Ponces Freire, A.,
822 and Cordeiro, C. (2013) The glyoxalase pathway: the first hundred
823 years... and beyond. *Biochem. J.* 453, 1–15.
- 824 (41) Krissinel, E., and Henrick, K. (2004) Secondary-structure
825 matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in
826 three dimensions. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 60, 2256–
827 2268.
- 828 (42) Chiou, J., Leung, T. Y., and Chen, S. (2014) Molecular
829 mechanisms of substrate recognition and specificity of New Delhi
830 metallo- β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5372–5378.
- 831 (43) Houben, K., Marion, D., Tarbouriech, N., Ruigrok, R. W. H.,
832 and Blanchard, L. (2007) Interaction of the C-terminal domains of
833 sendai virus N and P proteins: comparison of polymerase-nucleocapsid
834 interactions within the paramyxovirus family. *J. Virol.* 81, 6807–6816.
- 835 (44) Kapust, R. B., Tözsér, J., Fox, J. D., Anderson, D. E., Cherry, S.,
836 Copeland, T. D., and Waugh, D. S. (2001) Tobacco etch virus
837 protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants
838 with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng., Des. Sel.* 14, 993–
839 1000.
- 840 (45) Kim, Y., Tesar, C., Mire, J., Jedrzejczak, R., Binkowski, A.,
841 Babnigg, G., Sacchetti, J., and Joachimiak, A. (2011) Structure of
842 apo- and monometalated forms of NDM-1 – a highly potent
843 carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase. *PLoS One* 6, e24621.
- 844 (46) Berrow, N. S., Alderton, D., Sainsbury, S., Nettleship, J.,
845 Assenberg, R., Rahman, N., Stuart, D. I., and Owens, R. J. (2007) A
846 versatile ligation-independent cloning method suitable for high-
847 throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res.* 35,
848 e45.
- 849 (47) Rydzik, A. M., Brem, J., van Berkel, S. S., Pfeffer, I., Makena, A.,
850 Claridge, T. D. W., and Schofield, C. J. (2014) Monitoring
851 conformational changes in the NDM-1 metallo- β -lactamase by 19F
852 NMR spectroscopy. *Angew. Chem., Int. Ed.* 53, 3129–3133.
- 853 (48) Saiz, C., Castillo, V., Fontán, P., Bonilla, M., Salinas, G.,
854 Rodríguez-Haralambides, A., and Mahler, S. G. (2014) Discovering
855 *Echinococcus granulosus* thioredoxin glutathione reductase inhibitors
856 through site-specific dynamic combinatorial chemistry. *Mol. Diversity*
857 18, 1–12.
- 858 (49) Dalvit, C., Ardini, E., Fogliatto, G. P., Mongelli, N., and
859 Veronesi, M. (2004) Reliable high-throughput functional screening
860 with 3-FABS. *Drug Discovery Today* 9, 595–602.
- 861 (50) Kabsch, W. (2010) Integration, scaling, space-group assignment
862 and post-refinement. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 66,
863 133–144.
- 864 (51) Evans, P. R. (2011) An introduction to data reduction: space-
865 group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr.,*
866 *Sect. D: Biol. Crystallogr.* 67, 282–292.
- 867 (52) Winter, G., Dökel, S., Jones, A. K., Scheerer, P., Krauss, N.,
868 Höhne, W., and Friedrich, B. (2010) Crystallization and preliminary
869 X-ray crystallographic analysis of the [NiFe]-hydrogenase maturation
870 factor HypF1 from *Ralstonia eutropha* H16. *Acta Crystallogr., Sect. F:*
871 *Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66, 452–455.
- 872 (53) Evans, P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta*
873 *Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 62, 72–82.
- 874 (54) Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J.,
875 Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G.
W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., 876
Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., and Wilson, K. S. 877
(2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta* 878
Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr. 67, 235–242. 879
(55) McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. 880
D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic 881
software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658–674. 882
(56) Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) 883
Features and development of Coot. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol.* 884
Crystallogr. 66, 486–501. 885
(57) Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., 886
Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A., 887
Zwart, P. H., and Adams, P. D. (2012) Towards automated 888
crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta* 889
Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr. 68, 352–367. 890
(58) Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., 891
Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and 892
Richardson, D. C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for 893
macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol.* 894
Crystallogr. 66, 12–21. 895
(59) Lascos, C., Hackel, M., Marshall, S. H., Hujer, A. M., 896
Bouchillon, S., Badal, R., Hoban, D., and Bonomo, R. A. (2011) 897
Increasing prevalence and dissemination of NDM-1 metallo- β - 898
lactamase in India: data from the SMART study (2009). *J. Antimicrob.* 899
Chemother. 66, 1992–1997. 900

Cross-class metallo- β -lactamase inhibition by bisthiazolidines reveals multiple binding modes

Philip Hinchliffe^a, Mariano M. González^b, Maria F. Mojica^{c,d}, Javier M. González^e, Valerie Castillo^f, Cecilia Saiz^f, Magda Kosmopoulou^a, Catherine L. Tooke^a, Leticia I. Larrull^b, Graciela Mahler^f, Robert A. Bonomo^{c,d,g,h,i}, Alejandro J. Vila^{b,1}, and James Spencer^{a,1}

^aSchool of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, United Kingdom; ^bFacultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina, Universidad Nacional de Rosario, 2000 Rosario, Argentina; ^cResearch Service, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, OH 44106; ^dDepartment of Biochemistry, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106; ^eInstituto de Bionanotecnología, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina, Universidad Nacional de Santiago del Estero, G4206XCP Santiago del Estero, Argentina; ^fLaboratorio de Química Farmacéutica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay; ^gDepartment of Pharmacology, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106; ^hDepartment of Microbiology, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106; and ⁱDepartment of Molecular Biology, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106

Edited by Gregory A. Petsko, Weill Cornell Medical College, New York, NY, and approved May 16, 2016 (received for review January 25, 2016)

Metallo- β -lactamases (MBLs) hydrolyze almost all β -lactam antibiotics and are unaffected by clinically available β -lactamase inhibitors (β LIs). Active-site architecture divides MBLs into three classes (B1, B2, and B3), complicating development of β LIs effective against all enzymes. Bisthiazolidines (BTZs) are carboxylate-containing, bicyclic compounds, considered as penicillin analogs with an additional free thiol. Here, we show both L- and D-BTZ enantiomers are micromolar competitive β LIs of all MBL classes in vitro, with K_i s of 6–15 μ M or 36–84 μ M for subclass B1 MBLs (IMP-1 and BclI, respectively), and 10–12 μ M for the B3 enzyme L1. Against the B2 MBL Sfh-I, the L-BTZ enantiomers exhibit 100-fold lower K_i s (0.26–0.36 μ M) than D-BTZs (26–29 μ M). Importantly, cell-based time-kill assays show BTZs restore β -lactam susceptibility of *Escherichia coli*-producing MBLs (IMP-1, Sfh-1, BclI, and GOB-18) and, significantly, an extensively drug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolate expressing L1. BTZs therefore inhibit the full range of MBLs and potentiate β -lactam activity against producer pathogens. X-ray crystal structures reveal insights into diverse BTZ binding modes, varying with orientation of the carboxylate and thiol moieties. BTZs bind the di-zinc centers of B1 (IMP-1; BclI) and B3 (L1) MBLs via the free thiol, but orient differently depending upon stereochemistry. In contrast, the L-BTZ carboxylate dominates interactions with the monozinc B2 MBL Sfh-I, with the thiol uninvolved. D-BTZ complexes most closely resemble β -lactam binding to B1 MBLs, but feature an unprecedented disruption of the D120–zinc interaction. Cross-class MBL inhibition therefore arises from the unexpected versatility of BTZ binding.

carbapenemase | antibiotic resistance | inhibitors | bisthiazolidines | metallo- β -lactamase

The production of metallo- β -lactamases (MBLs) by Gram-negative pathogens, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Stenotrophomonas maltophilia*, is a major contributor to bacterial antibiotic resistance (1, 2). MBLs are able to hydrolyze most β -lactam antibiotics, including clinically important serine β -lactamase inhibitors (β LIs, clavulanic acid and penicillanic acid sulfones) and the carbapenems, which are often used as a “last-resort” therapy for serious infections (3–6). MBLs can be divided into three subclasses—B1, B2, and B3—based on sequence, structure, and zinc ion utilization (2, 7–9). All three classes contain a similar overall $\alpha\beta\alpha$ -fold, with the active site lying in a groove between the two β -sheets (Fig. 1). In most di-zinc B1 enzymes, such as IMP-1 (10), BclI (11), and NDM-1 (12), the Zn1 site is tetrahedrally coordinated by a water molecule (Wat1), H116, H118, and H196 [standard MBL numbering scheme (7) used throughout], whereas Zn2 is bound by Wat1, a second water molecule (Wat2), D120, C221, and H263 in a trigonal bipyramidal coordination. A water

molecule (Wat1) bridges/coordinates Zn1 and Zn2 in an arrangement that is suited to activate it as a nucleophile.

In monozinc B2 enzymes, such as CphA (13) and Sfh-I (14), binding of the zinc ion is representative of the Zn2 site in B1 enzymes, with coordination by a water molecule (Wat1), D120, C221, and H263, in a tetrahedral rather than trigonal bipyramidal geometry. Two water molecules (Wat1 and Wat2) are present in the active site, with Wat2 hydrogen-bonded to H118 and H196, and Wat1 coordinating Zn2, lying approximately equidistant between Zn2 (2.3 Å) and Wat2 (2.6 Å). Wat2 is believed to be activated by H118, rather than a zinc ion, to act as the nucleophile during antibiotic hydrolysis (14).

Di-zinc B3 enzymes [e.g., L1 (15) and AIM-1 (16)] have similar active-site architectures to B1 MBLs, with Zn1 in tetrahedral coordination with a water molecule (Wat1), H116, H118, and H196; and the nucleophilic water (Wat1) bridging Zn1 (1.9 Å) and Zn2 (2.1 Å). Zn2, however, is coordinated by D120, H121, H263, and an additional water molecule (Wat2) in a distorted

Significance

Bacterial diseases remain a huge burden on healthcare worldwide, with the emergence and re-emergence of strains resistant to currently used antibiotics posing an increasing clinical threat. Metallo- β -lactamases (MBLs) are key determinants of antibiotic resistance because they hydrolyze almost all β -lactam antibiotics and are unaffected by currently available β -lactamase inhibitors (β LIs). The structural diversity between MBLs has proved problematic when designing β LIs effective against all MBL targets. Here we show a series of small compounds, bisthiazolidines, which act as inhibitors of all MBL types, restoring the efficacy of currently used antibiotics against resistant bacterial strains producing different MBLs. High-resolution crystal structures reveal how diverse MBLs are inhibited by the unexpected versatility of bisthiazolidine binding, raising implications for future β LI design.

Author contributions: P.H., L.I.L., G.M., R.A.B., A.J.V., and J.S. designed research; P.H., M.M.G., M.F.M., J.M.G., V.C., C.S., M.K., and C.L.T. performed research; P.H., M.M.G., M.F.M., J.M.G., L.I.L., G.M., R.A.B., A.J.V., and J.S. analyzed data; and P.H., L.I.L., G.M., R.A.B., A.J.V., and J.S. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Data deposition: The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb/home/home.do [PDB ID codes 5EWA (IMP-1:2a), 5EW0 (Sfh-I:1a), 5EV6 (IMP-1, native), 5EV8 (IMP-1:1b), 5EVB (L1:1b), 5EVD (L1:2b), 5EVK (L1:1a), and 4NQ6 (BclI:1b)].

¹To whom correspondence may be addressed. Email: vila@ibr-conicet.gov.ar or jim.spencer@bristol.ac.uk.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1601368113/-DCSupplemental.

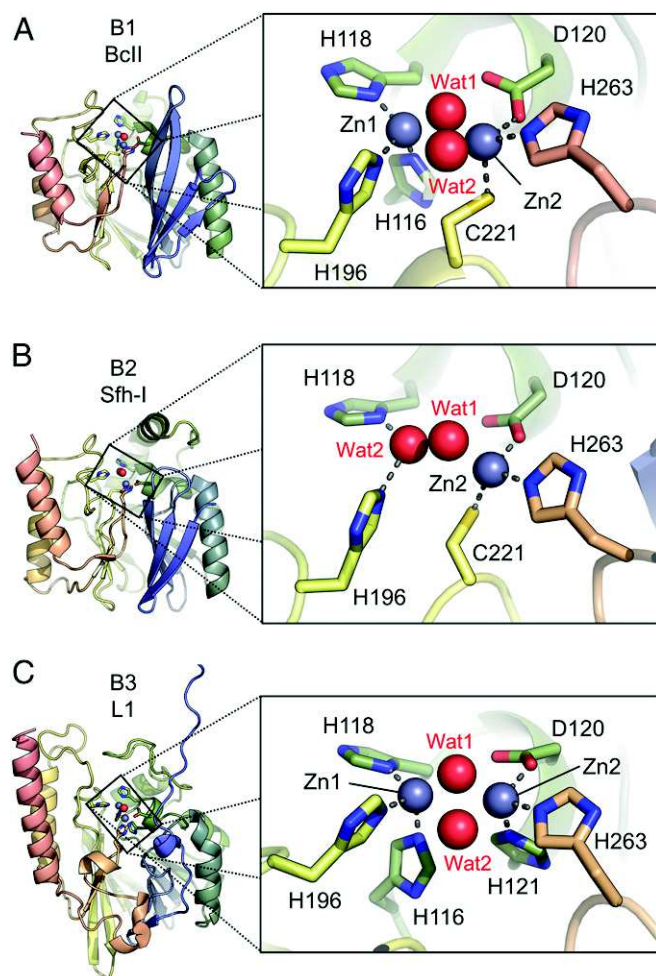


Fig. 1. Architecture of B1, B2, and B3 metallo- β -lactamases. The common $\alpha\beta\alpha$ -fold of representative MBLs is colored from the N (light blue) to C terminus (light red), and is shown alongside a close up view of the active-site (boxed). Zinc ions (gray) and water molecules (red) are represented as spheres. Zinc coordination bonds are shown as gray dashes, with the corresponding residues (labeled) shown as sticks. (A) B1 BcII (PDB ID code 4C09), (B) B2 Sfh-I (PDB ID code 3SD9), and (C) B3 L1 (PDB ID code 15ML).

trigonal bipyramidal geometry. To date, clinically useful β LIs of any of the three MBL classes have not been identified, and the aforementioned structural differences have complicated development of β LIs with cross-class (B1, B2, and B3) activity.

In response to this urgent medical need, we have developed and synthesized four bithiazolidine (BTZ) compounds, L-CS319 (**1a**), D-CS319 (**1b**), L-VC26 (**2a**), and D-VC26 (**2b**) (blue, gray, orange, and cyan, respectively, in Fig. 2) (17, 18). These β LIs contain both a free thiol, which is a high-affinity zinc-binding group, and two defining properties of β -lactam substrates, a feature hitherto overlooked in MBL inhibitor design. These are, first, a carboxylate moiety that in penicillins and carbapenems is able to bind Zn2 and interact with conserved residues on the protein main chain (19, 20); and, second, a tetrahedral bridge-head nitrogen that interacts with Zn2 as hydrolysis of bicyclic β -lactam antibiotics proceeds (21, 22). The absence of structural information on how a single compound can bind and inhibit all three classes of MBLs hinders further development of any potent cross-class inhibitors. We therefore characterized cross-class MBL inhibition in vitro, and in MBL-producing bacteria, by the four previously synthesized BTZs, and obtained crystal structures for B1 (IMP-1 and BcII), B2 (Sfh-I), and B3 (L1) MBLs com-

plexed with the novel scaffold, including one compound (**1a**) now structurally characterized in all three classes. These data demonstrate how a single compound class can use multiple modes of binding to inhibit, in vitro and in producer organisms, MBLs of different classes and active-site architectures, and identify routes to further improve potency against the range of target enzymes.

Results

BTZs Are Cross-Class MBL Inhibitors in Vitro. Previous kinetic characterization of BTZ inhibition of selected MBL targets demonstrated them to be micromolar competitive inhibitors of carbapenem (imipenem) or cephalosporin (nitrocefim) hydrolysis by the B1 MBLs, VIM-2 and NDM-1, with K_i s varying between 3.7 ± 0.3 and 19 ± 3 μ M (17, 18) (Table 1). Here, we evaluate their cross-class inhibition potential by measuring the in vitro effect of BTZs on imipenem hydrolysis by VIM-2 and other MBLs of subclasses B1 [*Bacillus cereus* BcII (11, 23, 24) and *Serratia marcescens* IMP-1 (10)], B2 [*Serratia fonticola* Sfh-I (14, 25)], and B3 [*S. maltophilia* L1 (15, 26)]. To ensure coverage of diverse MBLs, we also assayed activity against the structurally uncharacterized, atypical *Elizabethkingia meningoseptica* GOB-18, reconstituted in its fully active monozinc form (27).

These data reveal the compounds to be competitive, micromolar inhibitors of all MBL classes (Figs. S1 and S2), with K_i s between 0.26 ± 0.03 μ M and 84 ± 6 μ M (Table 1). The inhibition of B1 MBLs is little affected by the stereochemistry on the BTZs [D- (**1b**, **2b**) or L- (**1a**, **2a**) BTZs], or by the presence of a *gem*-dimethyl group (**2a**, **2b**), with K_i values varying by 2- and 2.5-fold (IMP-1 and BcII, respectively). In particular, BTZ potency against IMP-1 or VIM-2 is the same for both enantiomers, whereas the addition of a *gem*-dimethyl group (**2a/2b**) resulted in a two- to threefold increase in K_i . In contrast, against BcII, D-BTZs were 1.5- to 2.5-fold less potent than the L-BTZs, whereas the *gem*-dimethyl group had little effect on potency (**2a/2b** K_i is up to 1.5-fold greater than **1a/1b**). Against the B3 MBL L1, all compounds exhibit near identical K_i values, between 10 and 12 μ M ± 1 –2, whereas only **2b** exhibits similar potency against the B3 MBL GOB-18 (10 μ M), with the three other BTZs three- to fourfold less potent (30–41 μ M ± 1 –4). The unusual GOB-18 active site, in which the Zn1 ligand H116 is replaced by Q and only the Zn2 site is occupied in vitro (27), likely accounts for these small differences we observe in potency against B3 enzymes. Although it is possible periplasmic GOB-18 is di-zinc, as GOB-1 (28), importantly these data show the BTZ scaffold inhibits MBLs with even highly atypical active-site architectures. Only against B2 Sfh-I is there strong stereochemical preference, with L-BTZs (**1a**, **2a**) greater than 100-fold more potent than their corresponding D-enantiomers (**1b**, **2b**). As is the case for the B1 and B3 enzymes, there is little change in BTZ potency on addition of a *gem*-dimethyl group, with **1a** and **2a** exhibiting similar, submicromolar K_i values (0.26 ± 0.03 μ M and 0.36 ± 0.04 μ M, respectively).

BTZs Restore β -Lactam Efficacy Toward MBL-Producing Isolates. To assess the clinical potential of BTZs, time-kill assays were performed using *E. coli* cells expressing the B1 MBLs IMP-1 and BcII, B2 Sfh-I,

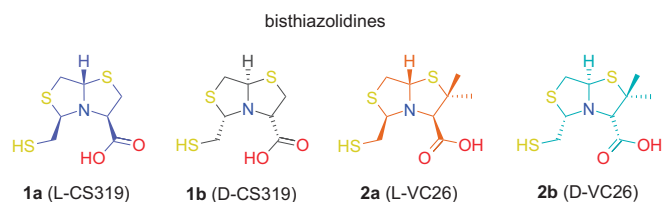


Fig. 2. Chemical structures of bithiazolidine inhibitors. Bithiazolidines **1a** (L-CS319, blue), **1b** (D-CS319, gray), **2a** (L-VC26, orange), and **2b** (D-VC26, cyan).

Table 1. In vitro competitive inhibition of MBLs by bisthiazolidines

MBL subclass	Enzyme	Substrate	Inhibition constants ($K_i/\mu\text{M}$)				Source
			1a	1b	2a	2b	
B1	NDM-1	Imipenem	7 ± 1	19 ± 3	18 ± 3	12 ± 1	(17)
	VIM-2	Imipenem	2.9 ± 0.4	3.2 ± 0.4	6 ± 1	10 ± 2	—
	IMP-1	Imipenem	8 ± 2	6 ± 1	15 ± 3	14 ± 3	—
	BcII	Imipenem	36 ± 2	53 ± 5	32 ± 3	84 ± 6	—
B2	Sfh-I	Imipenem	0.26 ± 0.03	26 ± 3	0.36 ± 0.04	29 ± 3	—
B3	L1	Imipenem	12 ± 1	10 ± 1	11 ± 2	10 ± 1	—
	GOB-18	Imipenem	41 ± 4	30 ± 2	31 ± 2	10 ± 1	—

and the B3 enzyme GOB-18 (Fig. S3). Additionally, a multidrug-resistant *S. maltophilia* clinical isolate producing both the B3 MBL L1 and the serine β -lactamase L2 was also studied (Fig. 3 and Fig. S4). The β LLs do not have any antimicrobial effect on their own, as differences could not be detected in viable cell number between cells exposed to BTZs and broth-only controls. Viable cell counts following exposure to sublethal concentrations of β -lactams (imipenem and ticarcillin-clavulanate for the *E. coli* and *S. maltophilia* isolates, respectively) in the presence of BTZs demonstrated that BTZs are able to inactivate the MBLs in clinically relevant strains, as evidenced by the significant reductions in bacterial count ($>10^3$). Potentiation of antibiotic activity against *S. maltophilia* is particularly significant because strains of this Gram-negative pathogen tend to be extensively multidrug-resistant, particularly because of the expression of two distinct β -lactamases and several membrane-spanning multidrug efflux pumps (29).

Structure Determination of BTZ Complexes with B1, B2, and B3 MBLs.

An understanding of how BTZs inhibit all three classes of MBL requires structural information for representative BTZ:MBL complexes to complement our previously obtained structures of **1a** bound to the B1 MBLs VIM-2 and NDM-1 (17, 18). We therefore crystallized the MBLs IMP-1 and BcII (subclass B1), Sfh-I (B2), and L1 (B3) and soaked the crystals in the four BTZs. Cocomplex structures were solved for IMP-1 with **1b** (2.30 Å resolution) and **2a** (2.30 Å); BcII with **1b** (1.80 Å); Sfh-I with **1a** (1.30 Å); and L1 with **1a** (1.63 Å), **1b** (1.84 Å), and **2b** (1.80 Å) (Table S1). For B2 Sfh-I we were unable to obtain a cocomplex with both BTZ stereoisomers, consistent with the in vitro observation that D-BTZs were at least 100-fold less-potent Sfh-I inhibitors than L-BTZs. In all seven cases there was clear $F_o - F_c$ density in the MBL active site into which the corresponding ligand could be modeled (Fig. S5). Further ligand validation statistics (real-space R value, local ligand density fit, and real-space correlation coefficient) are presented in Table S2.

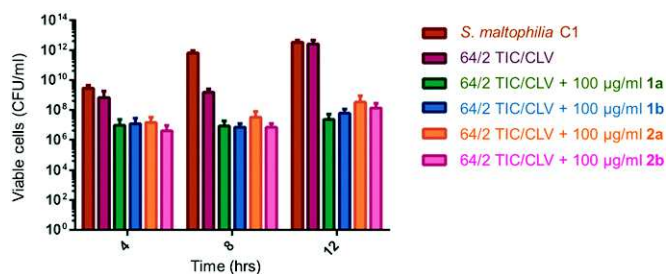


Fig. 3. Bisthiazolidines restore the in vitro activity of ticarcillin-clavulanate against a *S. maltophilia* clinical isolate. Bacteria were grown at sublethal concentrations of a mixture of ticarcillin (TIC, 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and clavulanate (CLV, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or in combination with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each compound. Viable cells were recovered at 4, 8, and 12 h. Results shown are the mean of three biological replicates \pm SD.

IMP-1 crystallized in the space group $P2_12_12_1$, with four molecules in the asymmetric unit (ASU), not previously described. Electron density consistent with bound **2a** was observed in three of the four subunits (average B-factor 1.8 times greater than the protein main chain), whereas **1b** could be confidently modeled in all four molecules of the ASU (B-factors 1.1 times greater than the main chain). For comparison, we have also solved, to 1.98 Å resolution, the structure of uncomplexed dizinc IMP-1, also in the space group $P2_12_12_1$ (SI Results). BcII crystallized in the previously described space group C2 (30), with one molecule in the ASU and one molecule of **1b** identified in the active site (B-factor 1.6 times greater than the main chain). Sfh-I crystallized in space group $P2_1$ (14), with **1a** clearly defined in both monomers of the ASU (B-factors 1.2 times greater than the protein main chain). L1 crystallized in space group $P6_422$ (15), with one molecule in the ASU, into which **1a**, **1b**, and **2b** were modeled into clearly defined density (B-factors 2.1, 1.8, and 1.7 above the main chain). Ligands were refined at full occupancy for all but L1:**1b** (ligand occupancy 0.76) and L1:**2b** (0.81).

A Dual-Mode of Binding for L-BTZs to MBLs. The IMP-1:**2a** (Fig. 4A) and L1:**1a** (Fig. 4B) structures reveal similar binding modes for L-BTZs to IMP-1 (B1) and L1 (B3) (Fig. 4C). These modes also resemble the previously observed binding mode of **1a** to both VIM-2 (18) and NDM-1 (17) (Fig. S6). In all these structures, the thiol of the BTZ mercaptomethyl group is positioned nearly equidistant between the two zinc ions (between 2.22 and $2.43 \text{ \AA} \pm 0.14$ and 0.23 \AA) (see Table S1 for coordinate errors and Table S3 for detailed distances). BTZ binding displaces the zinc-bridging nucleophilic water/hydroxide (Wat1) that is observed in the native MBL active site (Fig. S7), with a concomitant small increase in the Zn1–Zn2 distance of approximately $0.3/0.4 \text{ \AA} (\pm 0.14/0.23 \text{ \AA})$, compared with uncomplexed enzymes (Table S3). L-BTZ binding is further stabilized by direct interaction of its carboxylate with structurally equivalent side chains that are implicated in substrate binding (19, 20, 31), K224 in IMP-1 and S223 in L1. **1a** also makes hydrophobic interactions with two residues on L1 (W38 and P226), and **2a** contacts two (W64 and V67) on the flexible L3 loop (32) positioned above the IMP-1 active site (gray side chains in Fig. 4A and B). Despite these similarities, BTZ binding results in a larger ligand:protein buried surface area in the IMP-1:**2a** (330 \AA^2) complex compared with L1:**1a** (264 \AA^2), largely because of the L3 loop which is present in IMP-1 but not L1 (Fig. 4).

In contrast, L-BTZ binding to the monozinc B2 MBL Sfh-I differs substantially from that to B1 or B3 enzymes. In the complex with **1a**, the **1a**-carboxylate group interacts with the active-site zinc ($1.84 \pm 0.03 \text{ \AA}$), and is within hydrogen-bonding distance of two protein side chains, N233 ($2.97 \pm 0.03 \text{ \AA}$) and H196 ($2.96 \pm 0.03 \text{ \AA}$) (Fig. 5A). Binding to Sfh-I results in approximately 265 \AA^2 of buried surface area, and is stabilized by interactions with four hydrophobic residues (W87, F156, I153, F236) (Fig. 5A, gray). In addition, although BTZ binding has little effect on the overall Sfh-I structure [rmsd 0.33 \AA over 228 C α atoms, compared with native Sfh-I (14)], there are significant

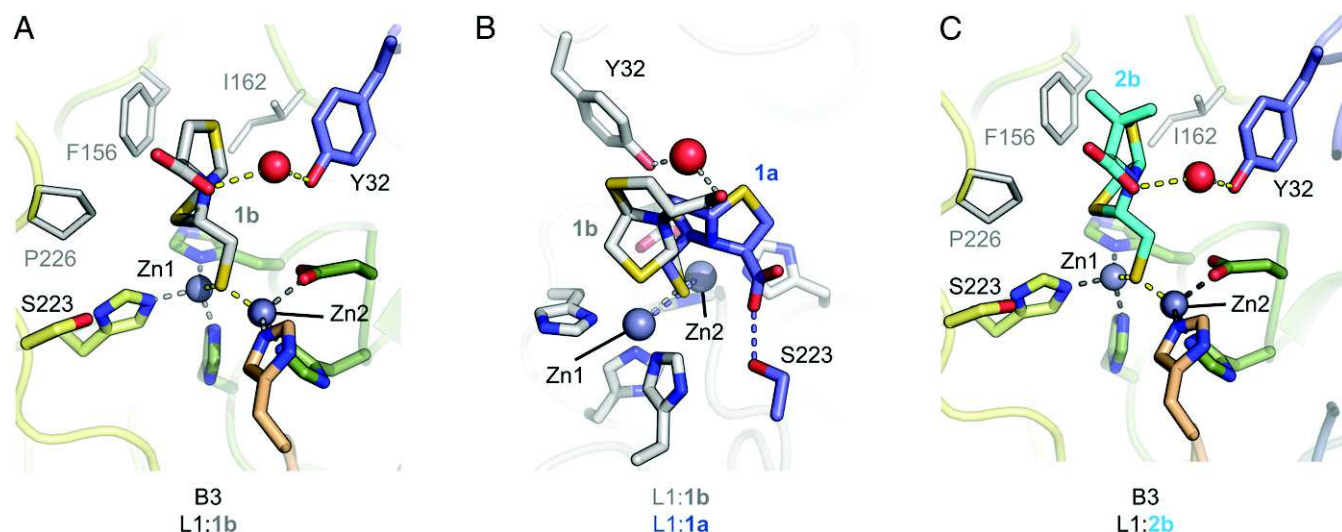


Fig. 6. **1b** binding to B3 MBL L1. A water molecule (red sphere) mediates the interaction of Y32 (sticks, labeled) with the β -BTZ carboxylate, but S223 (sticks, labeled), which binds **1a**, is not involved. Hydrophobic and zinc-binding residues represented as Fig. 4. (A) **1b** (gray) bound in the active site of B3 L1 (colored as in Fig. 4). Interactions shown as in Fig. 4. (B) Superposition of L1:**1b** (gray) with L1:**1a** (blue). Interactions between the BTZ and protein are shown as gray or blue dashes, according to their respective structures. (C) **2b** (cyan) bound to B3 L1, represented as in B.

uncomplexed IMP-1, rmsd = 0.28 Å over 222 C α atoms) or BcII (BcII:**1b** compared with uncomplexed BcII, rmsd = 0.41 Å over 223 C α atoms). **1b** binding to IMP-1 (buried surface area 292 Å²) features four ligand–zinc interactions (Fig. 7A), the carboxylate (2.1 ± 0.26 Å) and bridging nitrogen (2.8 ± 0.26 Å) with Zn2, and the thiol bridging Zn1 (2.0 ± 0.26 Å) and Zn2 (2.2 ± 0.26 Å), with the Zn1–Zn2 distance increasing by 0.2–0.3 Å (± 0.26 Å). Binding is further favored by interaction of the carboxylate with Lys224, as is the case with **2a** binding to IMP-1.

As in the IMP-1:**2a** complex, residues W64 and V67 in the L3 loop are involved in hydrophobic interactions with the inhibitor, with W64 in particular forming π -stacking interactions with the BTZ bicyclic ring. Despite previous observations that the NDM-1 L3 loop may “close” on **1a** binding (17), the position of the IMP-1 L3 loop is more stable, with no substantial conformational shifts evident on BTZ binding compared with the native structure. **1b** makes very similar interactions (Fig. 7B) on binding BcII (buried surface area 287 Å²): that is, the carboxylate (2.0 ± 0.13 Å) and bridging nitrogen (2.7 ± 0.13 Å) with Zn2, the carboxylate with K224 (2.9 ± 0.13 Å), and the thiol equidistant between active-site zincs (2.2 ± 0.13 Å), with the Zn1–Zn2 distance increasing by 0.3 ± 0.13 Å compared with uncomplexed BcII (PDB ID code 4C09). Three hydrophobic interactions are formed, one with W87 and two with residues F61 and V67 in the L3 loop, which form after the L3 loop closes by ~ 3.0 – 4.6 ± 0.13 Å compared with its position in the native structure (Fig. S8). As observed in the **1a**:Sfh-I complex, there are also important rearrangements within the IMP-1 and BcII active sites on **1b** binding (Fig. 7 C and D). Remarkably, the electron density clearly defines a displacement of the Zn2 ligand D120 and consequent loss of the D120–Zn2 coordination interaction (Fig. S9). Instead, D120 reorients to form hydrogen bonds with either E59 (IMP-1) or S69 (BcII), which results in an irregular five-coordinate geometry for Zn2 and a 1.0 ± 0.26 Å (IMP-1) or 0.7 ± 0.13 Å (BcII) movement of Zn2 away from D120.

Discussion

Here we show the structural basis for micromolar competitive inhibition of all three MBL classes by BTZs, including of clinically relevant enzymes from opportunist bacterial pathogens, such as *E. coli*, *P. aeruginosa*, or *S. maltophilia*, which can cause severe or even life-threatening infections. BTZs are able to cross the outer membrane of Gram-negative bacteria and enter the

periplasm, inhibiting MBL activity in vivo and potentiating the activity of carbapenems and other β -lactams against MBL-producing clinical isolates. Our data demonstrate this simple scaffold, which in several aspects resembles the architecture of the bicyclic β -lactam substrate, is able to overcome the variations in MBL active-site architecture across subclasses to achieve roughly equipotent inhibition of all MBLs tested. Such variations, which encompass differences in zinc ligands, interaction partners for the carboxylate group at C2/C3 of β -lactams and the positions and locations of hydrophobic surfaces and conformationally flexible surface loops adjacent to the active site, have manifested as substantial differences in potency against different MBL targets for some other inhibitor classes. Unexpectedly our structural data reveal that BTZ inhibition of different MBLs is unique and characterized by multiple binding modes that vary both with target enzyme and with the BTZ enantiomer used.

The crystal structures of MBL:BTZ complexes presented here and in previous publications (17, 18) identify that BTZs use four distinct modes of binding to the range of MBL targets. L-BTZs adopt similar binding modes to the B1 and B3 binuclear enzymes, with overall BTZ orientation retained across enzymes that use different side chains [K224 (BcII, IMP-1, NDM-1); R228 (VIM-2) and S223 (L1)] in interactions with the BTZ carboxylate group that may or may not involve the intermediacy of bound water molecules. This binding mode is also robust to differences in the composition (particularly with respect to the positions of aromatic residues) and orientation of the mobile L3 loop that is a feature of most B1 MBLs, but absent in B3 enzymes such as L1.

In contrast, β -BTZ binding differs profoundly between complex structures for B1 (BcII, IMP-1) and B3 (L1) enzymes, with interactions involving the carboxylate group (with Zn2 and the K224 side chain) a feature of the BcII and IMP-1 complexes but absent from those with L1. The differing L1 active-site architecture, which compared with B1 MBLs lacks an extended L3 loop and instead features elongated linkers between other secondary structural elements adjacent to the active site and hydrophobic residues at different positions, likely imposes a different orientation upon the bound β -BTZ ligand. The fourth binding mode is observed in B2 MBL Sfh-I complexed with **1a**. In B2 enzymes conserved hydrophobic residues on the long $\alpha 3$ helix adjacent to the active site form a “hydrophobic wall” proposed

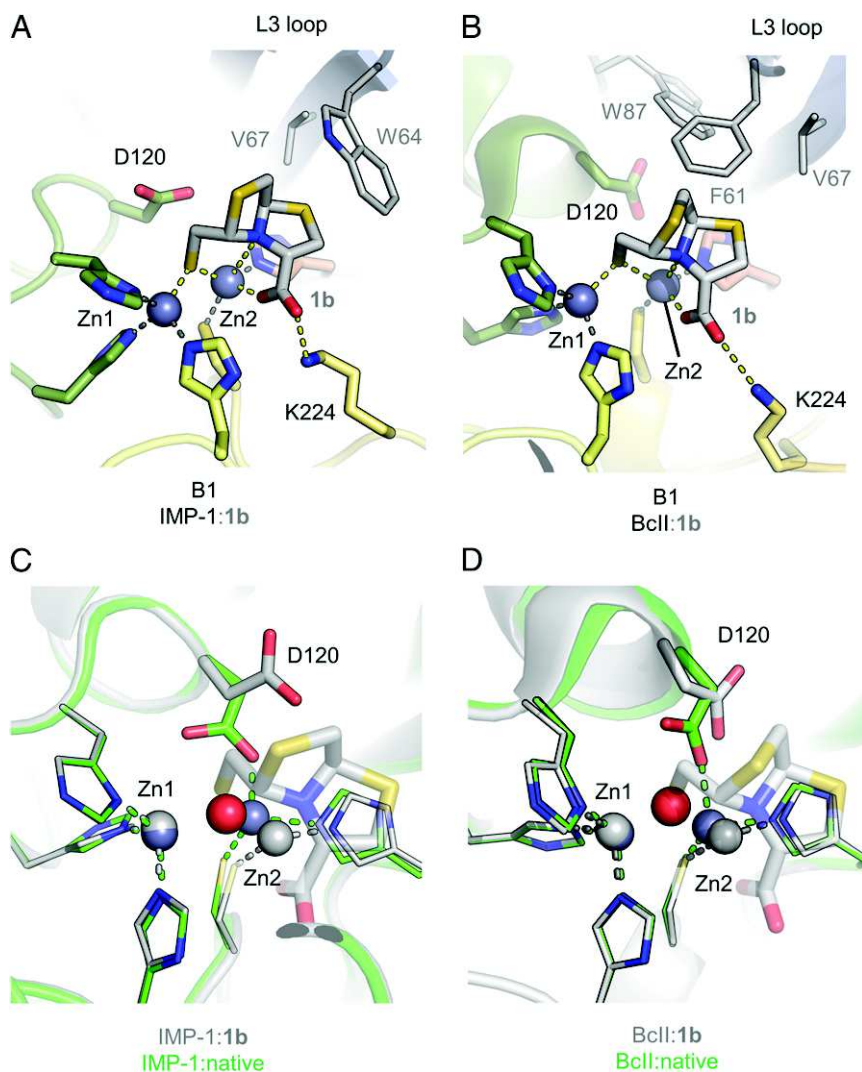


Fig. 7. **1b** binding to B1 MBLs BclI and IMP-1. **1b** bound in the active of B1 MBLs (A) IMP-1 and (B) BclI (colors and interactions as in Fig. 4). In both A and B, K224 binds the **1b** carboxylate and the D120–Zn2 coordination is disrupted. (C) Superposition of IMP-1:**1b** (gray; zinc ions, light gray) with unliganded, native IMP-1 (green; zinc ions, dark gray). Binding causes movement of Zn2, and loss of the D120–Zn2 interaction. (D) Superposition of BclI:**1b** (gray; zinc ions, light gray) with unliganded, native BclI (PDB ID code 4C09 green; zinc ions, dark gray). Binding is similar to C, causing the same rearrangements within the active site.

to contribute to selective carbapenem binding (33, 34). In the Sfh-I:**1a** structure, the BTZ thiol was observed buried deep into the hydrophobic cavity formed by residues W87, I153, F236, and F156, rather than, as anticipated, involved in interactions with the zinc center. We consider it likely that positioning of the thiol moiety in this cavity by the unique hydrophobic wall of B2 MBLs also explains the high selectivity of Sfh-I for L- over D-BTZs, which is not observed in the B1 and B3 family members studied in this work. In addition, the carboxylate of bound D-BTZ would be positioned differently at the Zn site, requiring different ancillary interactions with the protein main chain. In Sfh-I, unlike our observations of BTZ binding to L1 and IMP-1, the more constrained active site provides little room for a second BTZ binding mode. It is likely that significant conformational changes within the active site would be required to bind D-BTZs, resulting in higher K_S in vitro, whereas in the crystalline state these are prevented by packing interactions. Taken together, these data clearly indicate that the variation in active-site architecture between different MBLs is such that the ability to support more than one mode of binding may be necessary to achieve activity toward the full range of targets for even simple inhibitor scaffolds.

Investigation of the activity of BTZs as potential MBL inhibitors was in part prompted by their structural similarities to β -lactam substrates. Comparison of L-BTZ:MBL and hydrolyzed substrate:MBL structures highlights both differences and simi-

larities in the modes of ligand binding (Fig. 8). B1 and B3 MBLs bind antibiotic similarly, exemplified by the NDM-1:ampicillin (19) (Fig. 8A, green) and L1:moxalactam (20) (Fig. 8B, green) structures, respectively. In particular, in binuclear MBLs K224 (B1) or S223 (B3) interact with the carboxylate at C2/C3 of the hydrolyzed β -lactam. However, in both cases β -lactam binding is also characterized by interactions of Zn2 with the β -lactam nitrogen and carboxylate, whereas equivalent interactions are not observed in the **1a**:MBL complexes. The absence of an interaction between the BTZ nitrogen (a component of the bicyclic ring structure) and Zn2 is, however, consistent with several models of MBL-catalyzed antibiotic hydrolysis that feature Zn2-coordination by the β -lactam nitrogen only after the amide bond has been cleaved and the β -lactam ring opened (21, 22). On the other hand, BTZ binding involves the thiol group bridging Zn1 and Zn2, and displacement of the nucleophilic water (Wat1), whereas in complexes with hydrolyzed antibiotics Wat1 is present (19, 20), albeit with differences in zinc geometry. These differences are particularly evident in the NDM-1:ampicillin structure [PDB ID code 3Q6X (19)] where Wat1 is more tightly bound to a trigonal bipyramidal Zn1 (2.1 Å) than Zn2 (2.7 Å). In comparison, in the native NDM-1 structure [PDB ID code 3SPU (12)], Wat1 is more consistently (between the five chains in the ASU) equidistant between Zn1 (tetrahedral geometry) and Zn2. **1b** binding to L1 also involves fewer interactions with Zn2 than

hydrolyzed antibiotic (Fig. 8C), although it is notable that Y32, which helps to stabilize inhibitor binding by interaction with the BTZ carboxylate, also stabilizes antibiotic binding through interaction with the moxalactam carbonyl oxygen (20).

In comparison with MBL:L-BTZ complexes, (or binding of D-BTZs to L1), **1b** binding to the B1 MBLs IMP-1 and BcII more closely represents that of hydrolyzed β -lactams. This is most evident with respect to interactions involving Zn2 and Lys224, as highlighted by comparison of IMP-1:**1b** and BcII:**1b** complexes with that of hydrolyzed ampicillin bound to NDM-1 (19) (Fig. 9 A and B, respectively). In particular, both the BTZ and ampicillin carboxylate groups interact with Zn2 (2.0–2.2 Å) and hydrogen bond to Lys224 N ϵ (2.5–2.9 Å). Furthermore, the bridgehead nitrogen of D-BTZs lies within coordination distance of Zn2 (2.7–2.8 \pm 0.13/0.26 Å), although this interaction is not as strong as the equivalent in the NDM-1:ampicillin complex involving the β -lactam nitrogen (2.2 Å) (Fig. 9 C–E). However, despite the closer resemblance of their binding to that of antibiotic substrates, comparison of K_i values shows D-BTZs to be no more effective B1 MBL inhibitors than the L-BTZs that exhibit different binding modes (Table 1). This difference may arise from D-BTZ binding causing the energetically unfavorable disruption of the D120–Zn2 interaction. This D120 rearrangement may be necessary to relieve conformational strain about the Zn2 site arising from interaction with bound D-BTZ, or may be a means of relieving steric clashes because of the orientation of D-BTZ in the active site imposed by interactions involving the carboxylate group and, in particular, positioning of the sulfur atom as a bridging ligand to both zinc ions.

Similar to B1 and B3 enzymes, structural characterization of hydrolyzed biapenem binding to the B2 MBL CphA (34) (Fig. 8D, green) reveals the antibiotic to interact with Zn2 via its β -lactam nitrogen atom and carboxylate group, and by hydrogen

bonds to Lys224, Thr157, and T119. In comparison, in Sfh-I:**1a**, the BTZ carboxylate group, and not the nitrogen atom, interacts with the Sfh-I zinc ion, as well as two residues that are not involved in antibiotic binding to CphA, H196, and N233 (Fig. 8D, blue). Binding of hydrolyzed biapenem also involves residues W87, I153, F236, and F156 of the hydrophobic wall, a unique structural feature of B2 MBLs. These residues also stabilize binding of **1a**, specifically the thiol moiety, indicating that the hydrophobic wall is also important in BTZ binding by B2 MBLs (34). However, although thiol compounds have been shown as high-affinity MBL ligands (35), giving rise to the identification of a variety of thiol-based inhibitors, the absence of thiol:Zn2 interactions in our Sfh-I:BTZ crystal structure supports consideration of other metal binding groups, such as carboxylates or phosphonates, in searches for broad-spectrum MBL inhibitors.

Numerous chemical scaffolds have been explored as candidate MBL inhibitors, in a search that is given added impetus by the increasing dissemination of MBLs on mobile genetic elements and in clinically significant pathogens. However, studies to date have focused upon relatively restricted numbers of target enzymes, and characterization, particularly at structural level, has not in most cases extended to all three enzyme subclasses. Captopril (an angiotensin-converting enzyme and MBL inhibitor) is the most studied MBL inhibitor, with complexes of one or both of its enantiomers described for B1 (BcII [PDB ID codes 4C1H (36) and 4C1C (36)], BlaB (37), IMP-1 [PDB ID codes 4C1G and 4C1F (36)], NDM-1 (38) and VIM-2 [PDB ID codes 4C1D and 4C1E (36)]), B2 [CphA (35)] and B3 [L1 (39)] MBLs. Hence we compared the BTZ binding modes described here to those of L- and D-captopril, which, like BTZs, feature a carboxylate group attached to a ring system and a free thiol group, but lack the bicyclic organization and bridgehead nitrogen of the BTZ scaffold. Similar to BTZ complexes, the free thiol of D- or L-captopril bridges the

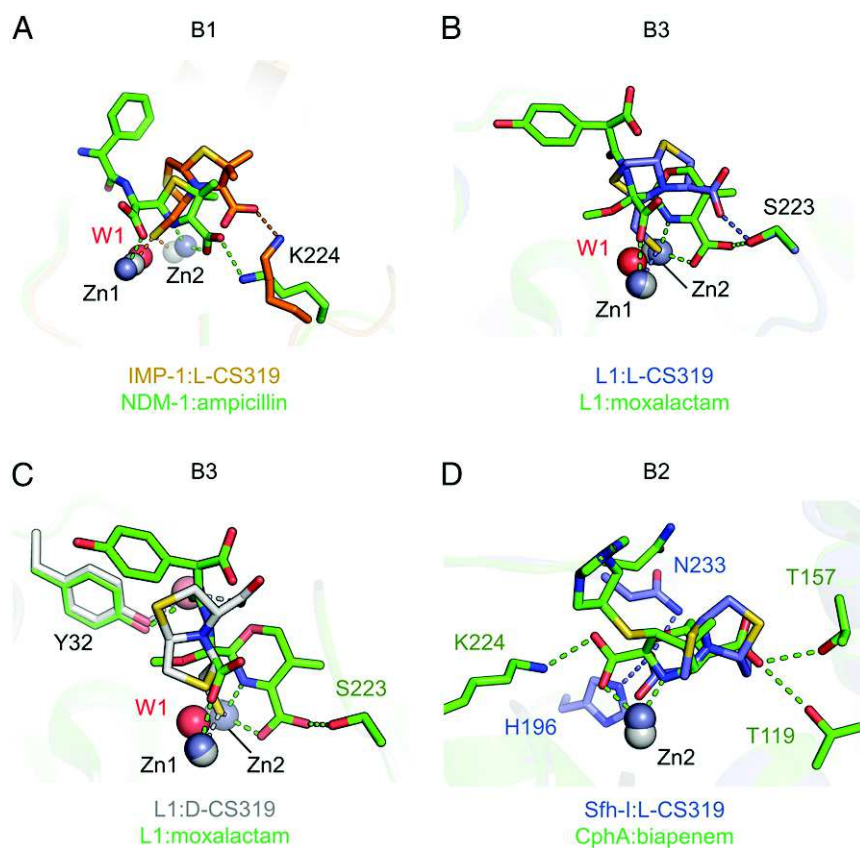


Fig. 8. Comparisons of the mode of binding between bishizolidines and hydrolyzed antibiotics. Superpositions of (A) IMP-1:**1a** (orange; zinc ions, light gray) with NDM-1:hydrolyzed ampicillin (PDB ID code 3Q6X, green; zinc ions, dark gray); (B) L1:**1a** (blue; zinc ions, light gray) with L1:moxalactam (PDB 2AIO, green; zinc ions, dark gray); (C) L1:**1b** (gray; zinc ions, light gray) with L1:moxalactam (as in B); (D) Sfh-I:**1a** (gray; zinc ions, light gray) with CphA:biapenem (PDB ID code 1X8I, green; zinc ions, dark gray).

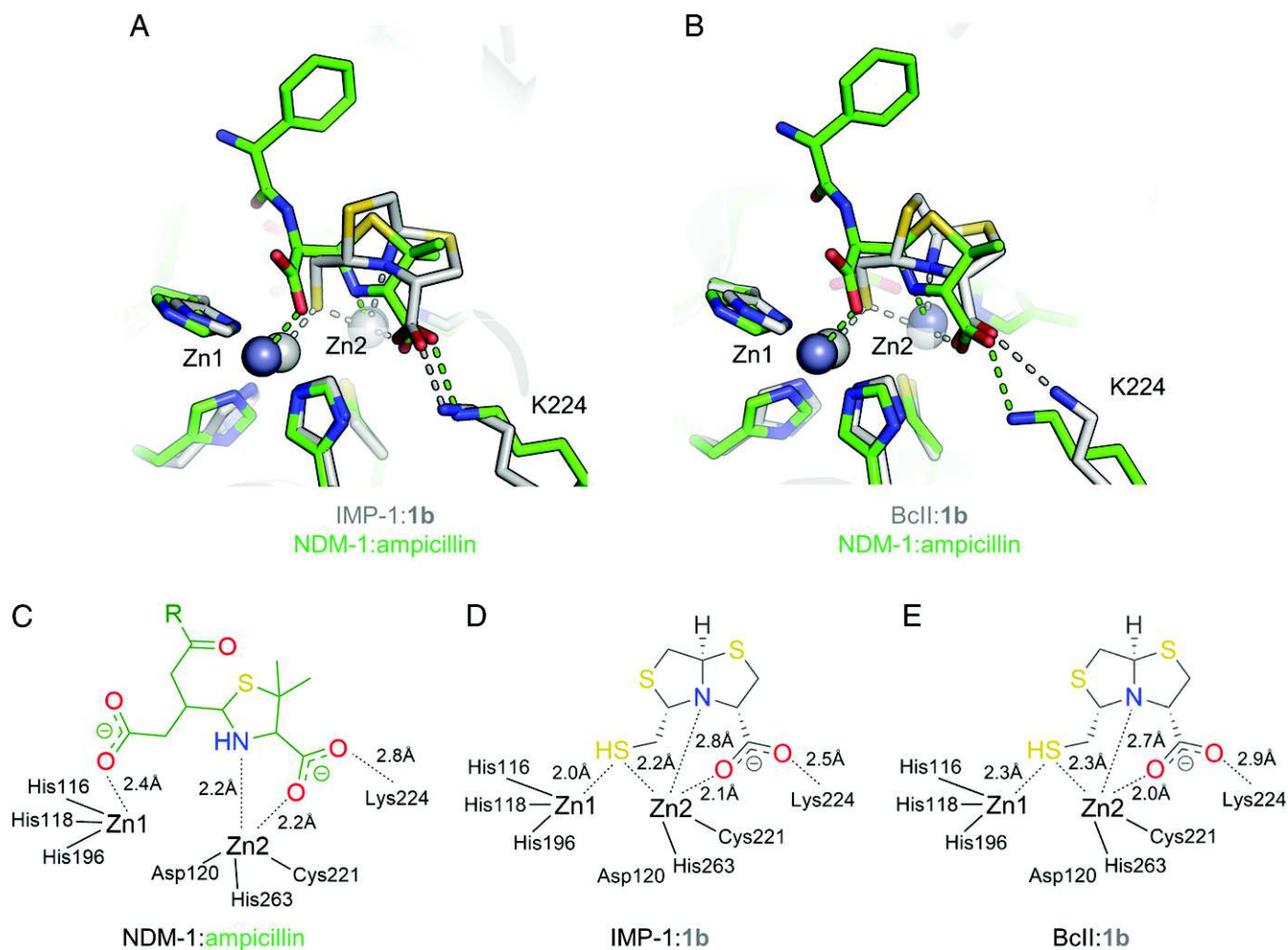


Fig. 9. **1b** binding to B1 MBLs IMP-1 and BclI closely resembles binding of hydrolyzed antibiotic. Superpositions of NDM-1:ampicillin (green) with (A) IMP-1**1b** and (B) BclI:1**b** (gray; zinc ions, light gray). The modes of binding and ligand-protein/zinc interaction distances are shown in schematic representation for (C) NDM-1:ampicillin, (D) IMP-1:1**b**, and (E) BclI:1**b**.

active-site zinc ions of both B1 (IMP-1 and BclI) and B3 (L1) MBLs (Fig. S10A–E), whereas the carboxylate interacts with K224 (B1), S223 (B3), or R228 (B1 VIM-2). However, D-captropil binding to L1 does not involve Y32, as in the L1:1**b** structure (Fig. S10D), and unlike **1b** binding to BclI and IMP-1 (Fig. S10B and C), D-captropil binding to these targets does not feature Zn2–nitrogen or Zn2–carboxylate interactions.

Some other thiol-based inhibitors, such as the thioenolate ML302F (30), or mercaptoacetic acids (40), have been noted to make additional interactions with Zn2 through their carboxylate groups. Resemblance of D-captropil and BTZ binding is most apparent for the B2 enzymes, where D-captropil binds to the active site of CphA through interaction of its carboxylate group with the zinc ion (35), as observed in the Sfh-I:1**a** structure (Fig. S10F). However, thiol-binding to the Zn2 site of B2 enzymes is possible, as observed previously in a CphA:inhibitor cocrystal structure (PDB ID code 3IOF) (41). These data may indicate that, when both a thiol and carboxylate are present, the carboxylate–Zn2 interaction may be preferable, possibly as a result of the ability of the carboxylate group to make ancillary interactions with the protein main chain.

A major hurdle in the development of small molecules as effective countermeasures for infections by opportunistic Gram-negative bacteria is the requirement to penetrate the outer envelope of the bacterial cell. Many Enterobacteriaceae, and in addition

nonfermenting species such as *A. baumannii* or *P. aeruginosa*, have limited permeability toward many small molecule solutes. In a previous investigation we established that BTZs can penetrate Gram-negative bacteria that express the NDM-1 MBL (17). The present work extends these results significantly by demonstrating BTZ inhibition (as evidenced by potentiation of carbapenem antimicrobial activity) of MBL activity for enzymes of all three subclasses expressed in *E. coli*. However, to investigate the ability of BTZs to penetrate more challenging organisms, we also assessed MBL inhibition in clinical *S. maltophilia* isolates. *S. maltophilia* is a versatile opportunist pathogen of compromised patients (42), and is attracting increasing attention as a pathogen of note in the biology of cystic fibrosis lung disease, with chronic infection identified as a risk factor for pulmonary exacerbations (43). *S. maltophilia* is a notoriously resistant organism with increased efflux pump activity, porin reduction, and two inducible β -lactamases (L1 and L2), that collectively confer resistance to most β -lactams (29). Ticarcillin–clavulanate is a combination shown to be effective against some *S. maltophilia* infections (44), but may be compromised by β -lactamase production (45). Therefore, the ability of BTZs to restore β -lactam efficacy against a nosocomial *S. maltophilia* isolate indicates potential effectiveness in clinically relevant situations, where cross-class inhibition must extend to extensively drug-resistant physiological strains.

In closing, we report BTZs achieve cross-class MBL inhibition despite the structural diversity and zinc requirements of the different enzyme targets. The ability of the unique BTZ scaffold to bind in multiple orientations is likely a result of the substrate-like design that is decorated with two strong metal-binding groups (-SH and -COOH). Indeed, the multiple binding modes possible for B1 and B3 enzymes accord with the broad substrate spectrum of these enzymes, whereas the B2 MBL, which shows preference for carbapenem substrates, shows some stereochemical preference. BTZs therefore provide a novel, efficient strategy for cross-class MBL inhibition, show activity against target bacterial pathogens as well as *in vitro*, and thus justify efforts at further improvement to enhance potency and clinical applicability.

Materials and Methods

Synthesis of Bisthiazolidines. **1a** (L-CS319; (2R,5S,8R)-8-carboxylate-2-mercaptomethyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0] octane); **1b** (D-CS319; (2S,5R,8S)-8-carboxylate-2-mercaptomethyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0] octane); **2a** (L-VC26; (2R,5S,8R)-2-mercaptomethyl-7-dimethyl-8-carboxylate-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0] octane); and **2b** (D-VC26; (2S,5R,8S)-2-mercaptomethyl-7-dimethyl-8-carboxylate-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0] octane) were synthesized as previously described (18). The L- and D- notation thus refers to the 2R,5S,8R and 2S,5R,8S chiralities of the BTZs, respectively.

Purification of Soluble MBLs. IMP-1, L1, and Sfh-I lacking the first 21 amino acids were cloned into pOPINF vectors (46) resulting in a N-terminally His₆-tagged protein cleavable with 3C protease. BclI was cloned into the pET28a vector (Novagen) using NdeI and SalI restriction sites, resulting in a N-terminally His₆-tagged protein cleavable with thrombin. For IMP-1, L1, and Sfh-I production, *E. coli* SoluBL21 (DE3) cells (Genlantis) bearing pOPINF were grown at 37 °C in auto-induction terrific broth media (Formedium) for 8 h, then left overnight at 20 °C. BclI was overexpressed in *E. coli* BL21(DE3), grown at 37 °C in LB medium to A₆₀₀ 0.6, when 0.5 mM IPTG and 0.5 mM ZnSO₄ were added (16 h, 18 °C). Cells were harvested by centrifugation (6,500 × g, 10 min).

For L1, cells were resuspended in 50 mM Hepes pH 8.0, 400 mM NaCl, Complete EDTA-free protease inhibitor mixture (Roche), 10 μM ZnCl₂, and broken by two passages through a cell disruptor (30,000 psi). After centrifugation (100,000 × g, 1 h), supernatant (plus 8 mM imidazole) was incubated 2 h with Ni-NTA resin (Qiagen); 1 mM β-mercaptoethanol was included in all subsequent buffers. Protein-bound resin was washed in Buffer A (50 mM Tris pH 7.5, 400 mM NaCl, 10 μM ZnCl₂) plus 10 mM imidazole, then with the same buffer plus 0.1% Triton X-100. Resin was further washed in Buffer A plus 20 mM imidazole and protein eluted in 50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 10 μM ZnCl₂, 400 mM imidazole. Imidazole was reduced to 10 mM in an Amicon 10-kDa centrifugal filter. The tag was removed by 3C protease cleavage (4 °C, overnight) and capture on Ni-NTA resin. L1 was subsequently loaded onto a Superdex S200 column equilibrated in 10 mM Tris pH 7.0, 100 mM NaCl, 100 μM ZnSO₄. Peak fractions were concentrated to 23 mg/mL. For crystallization, L1 protein was supplemented with 5 mM ZnSO₄. IMP-1 was purified similar to L1, except 1 mM TCEP (rather than β-mercaptoethanol) was included in all buffers, and protein loaded onto a Superdex S75 column equilibrated in 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 100 μM ZnCl₂, 1 mM TCEP, and concentrated to 25 mg/mL. Sfh-I was purified as L1, except protein was loaded on to a Superdex S75 column equilibrated in 50 mM Hepes pH 7.0 and concentrated to 15 mg/mL. For BclI, cells were resuspended in Buffer B (50 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl) supplemented with 10 μg/mL DNase, 4 mM MgCl₂, and 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and disrupted by sonication. After centrifugation (60 min, 15,000 × g) and supernatant loaded on to Ni-Sepharose resin equilibrated with Buffer A. The column was washed with 100 mL of Buffer B and BclI was eluted with Buffer B plus 500 mM imidazole using a linear gradient (0–100% Buffer B, over 100 mL). The his-tag was removed with thrombin and capture on Ni-Sepharose resin. Flow-through (cleaved BclI) was diluted (1:5) in Buffer C (100 mM Hepes pH 7.0, 1 mM ZnSO₄) and loaded on to CM-Sepharose resin equilibrated with Buffer C. The column was washed with 100 mL of Buffer C and BclI was eluted with Buffer C plus 400 mM NaCl, with a purity >95%, as determined by SDS/PAGE. Protein was concentrated to 15 mg/mL using Centricon ultrafiltration devices (Millipore) and exchanged into 10 mM Tris-HCl pH 7, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, and 1 mM ZnSO₄.

GOB-18 was purified cytoplasmically, and reconstituted in its fully active monozinc form, as previously described (27).

Enzyme Assays. Inhibition constants (K_i) were determined by following imipenem hydrolysis at 300-nm absorbance (JascoV-670 spectrophotometer) in Buffer C (10 mM Hepes pH 7.5, 0.2 M NaCl, 50 μg/mL BSA; B1 and B3 enzymes) or Buffer C plus 20 μM ZnSO₄ (B2 Sfh-I). BTZs were dissolved in DMSO (30 mM) and diluted in reaction buffer to the desired concentration. The presence of 1% DMSO did not alter the enzyme activity. Assays were initiated by enzyme addition to the substrate and inhibitor mixture. K_i s were determined by data fitting to the Competitive Inhibition Model implemented in GraphPad Prism 5.0.

In Vitro Time-Kill Study. *E. coli* DH5α carrying the pMBLe plasmid (17) expressing MBLs BclI, IMP-1, Sfh-I, and GOB-18 were cultured overnight at 37 °C in Mueller Hinton Broth (MHB) supplemented with 25 mg/L gentamycin. Next, 1.5 μL of the overnight cultures were inoculated in 1 mL MHB supplemented with 100 μM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to obtain a bacterial suspension of ~10⁶ CFU/mL. To examine the effects of the novel BTZs compounds on bacterial growth, bacterial suspensions were grown at 37 °C under different conditions: MHB alone (growth control) or supplemented with 0.4% DMSO (growth control), sublethal imipenem concentrations, 100 mg/L of each inhibitor, or a combination of imipenem and inhibitor. Samples (10 μL) were removed at intervals of 100, 300, and 500 min of exposure, and serial dilutions performed on MHB. Viable cell numbers were determined by spotting 20 μL of each dilution on Muller Hinton Agar (MHA). Plates were incubated (37 °C overnight), and colonies counted. Results are the mean of three biological replicates. Assays using a clinical isolate of *S. maltophilia* (strain C1: L1 and L2 producer) were performed similarly except samples were taken after 4, 8, and 12 h of treatment.

Crystallization and Structure Determination. L1 and Sfh-I were crystallized as previously described (14, 15). IMP-1 was crystallized using sitting-drop vapor diffusion in CrysChem24 well plates (Hampton Research) at 18 °C. Drops were formed by mixing 1-μL protein solution with 1-μL crystallization reagent [0.1 M sodium cacodylate pH 6.0, 0.2 M sodium acetate, 25% (wt/vol) PEG8000] and equilibrated against 500 μL. Crystals grew to maximum size in 7 d. BclI was crystallized using hanging-drop vapor diffusion in 24-well plates (Hampton Research) at 20 °C. Drops were formed by mixing 1-μL protein solution with 1-μL crystallization reagent [180 mM K₂SO₄, 20% (wt/vol) PEG 3350, 1 mM DTT, and 1 mM ZnSO₄] and equilibrated against 1 mL. Crystals grew to maximum size within 3–5 d.

Inhibitor bound complexes were obtained by soaking crystals for 15–60 min in 2- to 5-mM inhibitor dissolved in cryoprotectant [L1: 0.05 M Hepes pH 7.5, 1.75 M (NH₄)₂SO₄, 1.25% (vol/vol) PEG400, 25% (vol/vol) glycerol, 2 mM TCEP; IMP-1: 0.1 M sodium cacodylate, 0.15 M sodium acetate, 25% (vol/vol) ethylene glycol, 15% (wt/vol) PEG8000, 2 mM TCEP, 50 μM ZnCl₂; Sfh-I: 0.02 M Hepes pH 7.5, 0.12 M sodium acetate, 14% (wt/vol) PEG3350, 20% (vol/vol) glycerol, 2 mM TCEP; BclI: reservoir plus 20% (vol/vol) glycerol]. IMP-1 native crystals were cryoprotected by soaking (1 min) in IMP-1 cryoprotectant. Crystals were looped and flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at 100K on beamlines I02, I03, I04, I04-1, or I24 (Diamond Light Source, United Kingdom) or on a high-flux Rigaku RAXIS IV++ in-house X-ray generator (BclI, Los Alamos National Laboratory). Datasets were indexed and integrated using XDS (47), iMosflm (48), or HKL2000 (49) and scaled using Aimless in CCP4 (50) or HKL2000 (49). Crystals were not prone to radiation damage in all cases and relatively high R_{merge} values, compared with high $I/\sigma I$ values, are a result of the high redundancy of the data, or in the case of BclI:1b because of the collection of data on a home source. Structures were phased by molecular replacement with Phaser (51) using as starting models PDB ID codes 3I13 (52) (BclI), 1SML (15) (L1), 1DD6 (10) (IMP-1), or 3SD9 (14) (Sfh-I). Structures were completed by iterative rounds of manual model building in Coot (53) and refinement in Phenix (54) or Refmac5 (55). Sfh-I crystals were pseudomerohedrally twinned [twin law h, -k, -l, determined by Xtriage (54)], so the Sfh-I model was completed with twin refinement in Refmac5. Omit maps were calculated from the final model after removal of the ligand and refinement in Phenix (L1, IMP-1, BclI) or Refmac (Sfh-I). Ligand structures and geometric restraints were calculated with PRODRG (56) or Phenix eLBOW (57). Structure validation was assisted by Molprobit (58), SFCHECK (59), and Phenix. Figures were prepared using PyMol (60). The r.m.sds were calculated over Cα atoms aligned using PDBeFold (61). Ligand buried surface areas were calculated using PDBePisa (62).

See *SI Results* and *Fig. S11* for a discussion of the movement of the uncomplexed di-zinc IMP-1 L3 loop between chains in the asymmetric unit.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank the Diamond Light Source for beam time (proposal MX313) and the staff of beamlines I02, I03, I04 and I04-1, and I24 for their help. The work was supported by National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health Grant R01AI100560 (to L.I.L., G.M.,

R.A.B., A.J.V., and J.S.) and in part by Grants R01AI063517 and R01AI072219 (to R.A.B.); funds and facilities provided by the Cleveland Department of Veterans Affairs, Award 1101BX001974 (to R.A.B.); Biomedical Laboratory Research & Development Service of the VA Office of Research and Development and the

Geriatric Research Education and Clinical Center VISN 10 (to R.A.B.); and UK Medical Research Council UK-Canada Team Grant G1100135 (to J.S.). The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

- Walsh TR (2010) Emerging carbapenemases: A global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 36(Suppl 3):S8–S14.
- Bush K, Jacoby GA (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54(3):969–976.
- Karsisiotis AI, Dambon CF, Roberts GC (2014) A variety of roles for versatile zinc in metallo- β -lactamases. *Metalomics* 6(7):1181–1197.
- Bush K (2010) Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr Opin Microbiol* 13(5):558–564.
- Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S (2005) Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev* 105(2):395–424.
- van Duin D, Kaye KS, Neuner EA, Bonomo RA (2013) Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A review of treatment and outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75(2): 115–120.
- Galleni M, et al.; Metallo-beta-lactamases Working Group (2001) Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 45(3):660–663.
- Bebrone C (2007) Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol* 74(12):1686–1701.
- Palzkill T (2013) Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci* 1277: 91–104.
- Concha NO, et al. (2000) 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. *Biochemistry* 39(15): 4288–4298.
- Carfi A, Duée E, Galleni M, Frère JM, Dideberg O (1998) 1.85 Å resolution structure of the zinc (II) beta-lactamase from *Bacillus cereus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54(Pt 3):313–323.
- King D, Strynadka N (2011) Crystal structure of New Delhi metallo- β -lactamase reveals molecular basis for antibiotic resistance. *Protein Sci* 20(9):1484–1491.
- Bebrone C, et al. (2009) The structure of the dizinc subclass B2 metallo-beta-lactamase CphA reveals that the second inhibitory zinc ion binds in the histidine site. *Antimicrob Agents Chemother* 53(10):4464–4471.
- Fonseca F, Bromley EH, Saavedra MJ, Correia A, Spencer J (2011) Crystal structure of *Serratia fonticola* Sfh-I: Activation of the nucleophile in mono-zinc metallo- β -lactamases. *J Mol Biol* 411(5):951–959.
- Ullah JH, et al. (1998) The crystal structure of the L1 metallo-beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* 284(1):125–136.
- Leiros HK, et al. (2012) Crystal structure of the mobile metallo- β -lactamase AIM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*: Insights into antibiotic binding and the role of Gln157. *Antimicrob Agents Chemother* 56(8):4341–4353.
- González MM, et al. (2015) Bisthiiazolidines: A substrate-mimicking scaffold as an inhibitor of the NDM-1 carbapenemase. *ACS Infect Dis* 1(11):544–554.
- Mojica MF, et al. (2015) Exploring the role of residue 228 in substrate and inhibitor recognition by VIM metallo- β -lactamases. *Biochemistry* 54(20):3183–3196.
- Zhang H, Hao Q (2011) Crystal structure of NDM-1 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism. *FASEB J* 25(8):2574–2582.
- Spencer J, et al. (2005) Antibiotic recognition by binuclear metallo-beta-lactamases revealed by X-ray crystallography. *J Am Chem Soc* 127(41):14439–14444.
- Tioni MF, et al. (2008) Trapping and characterization of a reaction intermediate in carbapenem hydrolysis by *B. cereus* metallo-beta-lactamase. *J Am Chem Soc* 130(47):15852–15863.
- Wang Z, Fast W, Benkovic SJ (1999) On the mechanism of the metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry* 38(31):10013–10023.
- Rasia RM, Vila AJ (2002) Exploring the role and the binding affinity of a second zinc equivalent in *B. cereus* metallo-beta-lactamase. *Biochemistry* 41(6):1853–1860.
- Felici A, et al. (1993) An overview of the kinetic parameters of class B beta-lactamases. *Biochem J* 291(Pt 1):151–155.
- Fonseca F, et al. (2011) Biochemical characterization of Sfh-I, a subclass B2 metallo-beta-lactamase from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrob Agents Chemother* 55(11):5392–5395.
- Crowder MW, Walsh TR, Banovic L, Pettit M, Spencer J (1998) Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 42(4):921–926.
- Morán-Barrio J, et al. (2007) The metallo-beta-lactamase GOB is a mono-Zn(II) enzyme with a novel active site. *J Biol Chem* 282(25):18286–18293.
- Horsfall LE, et al. (2011) Broad antibiotic resistance profile of the subclass B3 metallo- β -lactamase GOB-1, a di-zinc enzyme. *FEBS J* 278(8):1252–1263.
- Crossman LC, et al. (2008) The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* 9(4):R74.
- Brem J, et al. (2014) Rhodanine hydrolysis leads to potent thioenolate mediated metallo- β -lactamase inhibition. *Nat Chem* 6(12):1084–1090.
- Feng H, et al. (2014) Structural and mechanistic insights into NDM-1 catalyzed hydrolysis of cephalosporins. *J Am Chem Soc* 136(42):14694–14697.
- Moali C, et al. (2003) Analysis of the importance of the metallo-beta-lactamase active site loop in substrate binding and catalysis. *Chem Biol* 10(4):319–329.
- Brem J, et al. (2015) Studying the active-site loop movement of the São Paulo metallo- β -lactamase-1. *Chem Sci (Camb)* 6(2):956–963.
- Garau G, et al. (2005) A metallo-beta-lactamase enzyme in action: Crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J Mol Biol* 345(4):785–795.
- Liénard BM, et al. (2008) Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo-beta-lactamases by thiols. *Org Biomol Chem* 6(13):2282–2294.
- Brem J, et al. (2015) Structural basis of metallo-beta-lactamase inhibition by captopril stereoisomers. *Antimicrob Agents Chemother* 60(1):142–150.
- García-Saez I, et al. (2003) The 1.5-Å structure of *Chryseobacterium meningosepticum* zinc beta-lactamase in complex with the inhibitor, D-captopril. *J Biol Chem* 278(26): 23868–23873.
- King DT, Worrall LJ, Gruninger R, Strynadka NC (2012) New Delhi metallo- β -lactamase: Structural insights into β -lactam recognition and inhibition. *J Am Chem Soc* 134(28): 11362–11365.
- Nauton L, Kahn R, Garau G, Hernandez JF, Dideberg O (2008) Structural insights into the design of inhibitors for the L1 metallo-beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Mol Biol* 375(1):257–269.
- Wachino J, et al. (2013) 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* 57(1):101–109.
- Lassaux P, et al. (2010) Mercaptophosphonate compounds as broad-spectrum inhibitors of the metallo-beta-lactamases. *J Med Chem* 53(13):4862–4876.
- Looney WJ, Narita M, Mühlemann K (2009) *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis* 9(5):312–323.
- Waters V, et al. (2011) *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: Serologic response and effect on lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 183(5):635–640.
- Falagas ME, Valkimadi PE, Huang YT, Matthaiou DK, Hsueh PR (2008) Therapeutic options for *Stenotrophomonas maltophilia* infections beyond co-trimoxazole: A systematic review. *J Antimicrob Chemother* 62(5):889–894.
- Chang YT, Lin CY, Chen YH, Hsueh PR (2015) Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Front Microbiol* 6:893.
- Berrow NS, et al. (2007) A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res* 35(6):e45.
- Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 2):125–132.
- Battye TG, Kontogiannis L, Johnson O, Powell HR, Leslie AG (2011) iMOSFLM: A new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67(Pt 4):271–281.
- Otwinowski Z, Minor W (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Method Enzymol* 276:307–326.
- Winn MD, et al. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67(Pt 4):235–242.
- McCoy AJ, et al. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Cryst* 40(Pt 4):658–674.
- González JM, Buschiazzo A, Vila AJ (2010) Evidence of adaptability in metal coordination geometry and active-site loop conformation among B1 metallo-beta-lactamases. *Biochemistry* 49(36):7930–7938.
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 12 Pt 1):2126–2132.
- Adams PD, et al. (2010) PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 2):213–221.
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53(Pt 3): 240–255.
- Schüttelkopf AW, van Aalten DM (2004) PRODRG: A tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 8): 1355–1363.
- Moriarty NW, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD (2009) electronic Ligand Builder and Optimization Workbench (eLBOW): A tool for ligand coordinate and restraint generation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65(Pt 10):1074–1080.
- Chen VB, et al. (2010) MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 1):12–21.
- Vaguine AA, Richelle J, Wodak SJ (1999) SFHECK: A unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55(Pt 1):191–205.
- DeLano WL (2002) *The PyMOL User's Manual* (DeLano Scientific, San Carlos, CA), pp 452.
- Krissinel E, Henrick K (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 12 Pt 1):2256–2268.
- Krissinel E, Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372(3):774–797.