



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Síntesis de Heterociclos Como Potenciales Inhibidores de β -Lactamasas

Q.F. Valentina Villamil Pociña

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctor en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Diciembre 2022

Síntesis de Heterociclos Como Potenciales Inhibidores de β -Lactamasas

Tribunal:

Dra. Laura Scarone

Dr. Sebastián Testero

Dra. Paula Rodríguez

Dra. Graciela Mahler, Director

Dra. Cecilia Saiz, Co-Director

Agradecimientos

A mis tutoras:

Graciela y Cecilia, por todo lo que me han enseñado, por todas las oportunidades que me han dado y por apoyarme siempre en mis decisiones.

A las instituciones financiadoras:

CAP, ANII, PEDECIBA y NIH.

A mis compañeros de Química Farmacéutica:

Nati, porque sos adorable, y porque no importa que tan tomados estemos, siempre transmitís mucha paz.

Camí, porque sos todo lo que está bien y tu alegría contagia. Gracias por todos tus abrazos reponedores.

Franco, por ser un gran amigo, por fundar la CoHLuCo y por alegrar siempre las jornadas.

Vero, por ser tan buena compañera y por todo tu apoyo siempre.

Chelo, por todos los tecitos que me preparaste mientras escribía y por darme para adelante con Carletto.

Lau, por todos los momentos compartidos!

Guille, por todo el bullying que me has hecho estos años, por siempre hacerme reír.

Magda, por ser la cocinera del grupo, la amante de las plantas y muy buena compañera.

Vane, por ser nuestra guía espiritual y enseñarnos que todo poder conlleva una gran responsabilidad.

Martin, por todas las cervezas compartidas y por ser tan buen compañero.

Ramiro, por hacer las tardes más divertidas.

A **Laurita, Danilo, Gloria y Eduardo**, por todo este tiempo compartido, y por todo lo que me han transmitido. A **Horacio y Gonzalo**, por los experimentos de RMN y por los momentos compartidos.

Gracias por todo el apoyo. Los quiero mucho a todos!

A los compañeros de Orgánica y Farmacognosia:

Por todos los congresos compartidos, los reactivos prestados y la buena onda de siempre.

A los compañeros del LBB:

A todo el grupo, por siempre darme una mano y por toda la alegría. Especialmente a **Cesar**, gracias por todo lo que me has enseñado y el lindo trabajo que sacamos adelante.

A los compañeros de farmacología:

Eli, Manu, Bea y Laura. Gracias por dejarme usar el HPLC y por recibirme con tanto cariño.

A nuestros colaboradores:

Prof. **Alejandro Vila** y Dra. **Agustina Rossi** (IBR-CONICET). Gracias a todo el grupo por recibirme con tanta alegría en su Laboratorio y por todo lo que me han enseñado.

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

Prof. **Robert Bonomo** y su grupo de trabajo, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Case Western Reserve University, Cleveland, USA.

Grazie mille!

A **Fabio y Emilia**, por aceptarme en su Laboratorio y darme la oportunidad de seguir formándome con ustedes. A **Maria Luisa**, por todo lo que me enseñaste, por todos los cafecitos compartidos. A **Andrea, Francesco Alleto, Francesco Fini, Nicolò y Dana**, gracias por recibirme con tanta alegría y por todas las piadipizzas. A **Carlo**, gracias por tu apoyo y cariño a la distancia.

A **Martín Fló**, por los experimentos de ECD.

A mi familia y amigos:

Gracias por el apoyo. Especialmente a mi **mamá**, gracias por estar siempre.

Síntesis de Heterociclos Como Potenciales Inhibidores de β -Lactamasas

Valentina Villamil Pociña

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2022

DIRECTORES: Dra. Graciela Mahler y Dra. Cecilia Saiz

**(Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica,
Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay)**

En la actualidad, uno de los principales desafíos de la química medicinal es el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos capaces de superar la creciente aparición de resistencias frente a los fármacos existentes.

Los antibióticos β -lactámicos han sido la clase más importante de antibióticos durante varias décadas y representan la mitad del mercado mundial de antibacterianos. A pesar de ello, su utilidad como agentes terapéuticos está siendo amenazada por β -lactamasas, enzimas que los inactivan por hidrólisis. La resistencia bacteriana a los antibióticos es una epidemia emergente en todo el mundo y existe una necesidad urgente de nuevas estrategias para mantener la efectividad de los agentes antimicrobianos actuales.

Este trabajo de tesis se enfocó en el diseño y síntesis de nuevos heterociclos análogos a bistiazolidinas y tiazolidinas previamente preparadas por el grupo de investigación. Los nuevos compuestos fueron evaluados frente a enzimas β -lactamasas y se logró identificar una serie de derivados más activos que los heterociclos originales. Además, se aplicó un enfoque biotecnológico para la obtención de benzobisheterociclos enantioméricamente puros, logrando resultados altamente prometedores.

Synthesis of Heterocycles as Potential β -Lactamases Inhibitors

Valentina Villamil Pociña

Graduate Program in Chemistry of the Faculty of Chemistry

University of the Republic

2022

DIRECTOR: Dra. Graciela Mahler y Dra. Cecilia Saiz

**(Pharmaceutical Chemistry Laboratory, Department of Organic Chemistry,
Faculty of Chemistry, University of the Republic, Montevideo, Uruguay)**

Currently, one of the main challenges in medicinal chemistry is the development of new antibacterial agents capable of overcoming the growing emergence of resistance to existing drugs.

β -lactam antibiotics have been the most important class of antibiotics for several decades, accounting for half of the global antibacterial market. Despite this, their usefulness as therapeutic agents is being threatened by β -lactamases, enzymes that inactivate them by hydrolysis. Bacterial resistance to antibiotics is an emerging epidemic worldwide and there is an urgent need for new strategies to maintain the effectiveness of current antimicrobial agents.

This work focused on the design and synthesis of new heterocycles analogous to bithiazolidines and thiazolidines previously prepared by the research group. The new compounds were evaluated against β -lactamases enzymes, and it was possible to identify a series of analogs more active than the original heterocycles. In addition, a biotechnological approach was applied to obtain enantiomerically pure benzobisheterocycles, achieving highly promising results.

Índice

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antibióticos β -lactámicos y resistencia bacteriana.....	3
1.1.1 Antibióticos β -lactámicos.....	3
1.1.2 Resistencia bacteriana a antibióticos	4
1.2 β -Lactamasas	5
1.2.1 Serina- β -Lactamasas	6
1.2.2 Metallo- β -Lactamasas.....	8
1.3 Estrategias para combatir la resistencia mediada por β -lactamasas	12
1.3.1 Desarrollo de ABL resistentes a la inactivación por β -lactamasas.....	12
1.3.2 Combinaciones de ABL e inhibidores de SBL	13
1.4 Inhibidores de Metallo- β -lactamasas descritos en literatura.....	14
1.5 Antecedentes de grupo	16
1.5.1 Bistiazolidinas y Oxazolidinil-tiazolidinas	17
1.5.2 Tiazolidinas	20
1.6 Bibliografía.....	23

Capítulo 2. Objetivos

2.1 Objetivo General.....	37
2.2 Objetivos Específicos.....	37

Capítulo 3. Síntesis de prodrogas de bistiazolidinas y tiazolidinas

3.1 Introducción	43
3.1.1 Desarrollo de nuevos antimicrobianos utilizando estrategias basadas en pro- drogas	43
3.1.2 Nuevas prodrogas de BTZ y TZ	45
3.2 Objetivo Específico	46
3.3 Resultados y discusión	46
3.3.1 Diseño y síntesis de prodrogas de bistiazolidinas y tiazolidinas.....	46
3.3.2 Ensayos preliminares para evaluar la utilidad de los compuestos sintetizados como posibles prodrogas	52
3.4 Conclusiones y perspectivas.....	68
3.5 Bibliografía.....	69

Capítulo 4. Diseño y síntesis de nuevas bistiazolidinas conteniendo grupos ésteres y amidas

4.1 Introducción	77
4.1.1 Estrategias de diseño de inhibidores basadas en la estructura del sitio activo de las MBL	77
4.1.2 Mejora de la permeabilidad a través de la pared celular por introducción de grupos cargados positivamente.....	79
4.1.3 Diseño de nuevos análogos de bistiazolidinas para aumentar la actividad in vitro.....	79
4.1.4 Antecedentes en la síntesis de ésteres y amidas	80
4.2 Objetivo Específico	81
4.3 Resultados y discusión	82
4.3.1 Diseño de nuevos análogos y estudios computacionales	82
4.3.2 Síntesis de los nuevos derivados	87
4.3.3 Optimización de la reacción de desprotección de tioacetilos	90
4.3.4 Ensayos de actividad biológica	111
4.4 Conclusiones y perspectivas.....	118
4.5 Bibliografía.....	121

Capítulo 5. Diseño y síntesis de benzobisheterociclos y su evaluación como inhibidores de MBL

5.1 Introducción	133
5.1.1 Diseño de nuevos análogos de BTZ conteniendo estructuras aromáticas fusionadas: benzobisheterociclos	133
5.2 Objetivo Específico	134
5.3 Resultados y discusión	134
5.3.1 Diseño de los nuevos análogos y estudios computacionales.....	134
5.3.2 Síntesis racémica de BBH.....	138
5.3.3 Ensayos de actividad biológica	150
5.3.4 Determinación estructural de los complejos MBL:inhibidores	155
5.3.5 Estudios de estabilidad en plasma humano de las BNTZ 17a y 17f	158
5.3.6 Estudios de citotoxicidad.....	160
5.4 Conclusiones y perspectivas.....	161
5.5 Bibliografía.....	163

Capítulo 6. Enfoques biocatalíticos para la obtención de benzobisheterociclos enantioméricamente puros

6.1 Introducción	169
------------------------	-----

6.1.1 Estrategias para la obtención de benzobisheterociclos BBH enantioméricamente puros.....	169
6.1.2 Aplicaciones biocatalíticas para la obtención de compuestos ópticamente puros.....	170
6.2 Objetivo Específico	174
6.3 Resultados y discusión	174
6.3.1 Resolución de mezclas racémicas por formación de diastereómeros	174
6.3.2 Enfoques biocatalíticos para la obtención de BBH enantioméricamente puros.....	175
6.3.3 Determinación de la IC ₅₀ de (+)-23a y (-)-30 frente a la enzima NDM-1.....	203
6.4 Conclusiones y perspectivas.....	204
6.5 Bibliografía.....	206

Capítulo 7. Diseño y síntesis de análogos de bistiazolidinas y tiazolidinas conteniendo bioisósteros del grupo tiol

7.1 Introducción	215
7.1.1 Diseño de nuevos análogos biosisotéricos del grupo mercaptometilo	215
7.1.2 Antecedentes de grupos capaces de coordinar con Zn ²⁺	216
7.2 Objetivo Específico	217
7.3 Resultados y discusión	217
7.3.1 Diseño de nuevos bioisósteros de BTZ y TZ	217
7.3.2 Desarrollo de la metodología sintética para la síntesis de bioisósteros de BTZ.....	218
7.3.3 Síntesis de bioisósteros de BTZ y TZ.....	224
7.3.4 Evaluación biológica de los bioisósteros preparados	230
7.4 Conclusiones y perspectivas.....	231
7.5 Bibliografía.....	233

Capítulo 8. Diseño y síntesis de nuevos análogos de bistiazolidinas conteniendo ácidos borónicos como potenciales inhibidores de SBL y MBL

8.1 Introducción	239
8.1.1 Aplicaciones del Boro en el campo de la Química Farmacéutica	239
8.1.2 Inhibición de SBL y MBL mediada por ácidos o ésteres borónicos.....	242
8.1.3 Estrategias sintéticas para la preparación de ácidos y ésteres borónicos ..	244
8.2 Objetivo Específico	247
8.3 Resultados y discusión	248
8.3.1 Diseño de nuevos análogos de BTZ y TZ conteniendo boro.....	248
8.3.2 Síntesis de los nuevos análogos	249
8.3.3 Evaluación biológica de los bioisósteros preparados	267

8.4 Conclusiones y perspectivas	269
8.5 Bibliografía	270

Capítulo 9. Conclusiones y perspectivas

9.1 Conclusiones	281
9.2 Perspectivas	283

Capítulo 10. Parte experimental

10.1 Generalidades.....	289
10.2 Procedimientos sintéticos.....	283
10.3 Screening a pequeña escala: Miniaturización de reacción	336
10.4 Difracción de Rayos X.....	337
10.5 Test Colorimétricos	341
10.6 Ensayos de estabilidad en buffer o plasma humano	343
10.7 Métodos HPLC.....	343
10.8 Dicroísmo Circular Electrónico	348
10.9 Estudios computacionales.....	349
10.10 Ensayos de Actividad Biológica.....	351
10.11 Estructura cristalina de los complejos MBL:Inhibidor.....	353
10.12 Ensayos de citotoxicidad en células	354
10.13 Ensayos Biocatalíticos	354
10.14 Bibliografía	356

Anexo I: Espectros de ^1H-RMN y ^{13}C-RMN	361
---	------------

Anexo II: Papers publicados.....	447
---	------------

Lista de Abreviaciones

¹H-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de Protón

¹³C-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13

4-DMAP: 4-Dimetilamino piridina

ABL: Antibióticos β-lactámicos

Ac.: Acuoso

Ac₂O: Anhídrido acético

AcOEt: Acetato de etilo

ADME: Absorción Distribución Metabolismo y Excreción

AIM: Medio de autoinducción

ATG: Ácido tioglicólico

Boc₂O: Di-terc-butil dicarboxilato

br s: Singulete ancho

BBH: Benzobisheterociclo

BIMI: Benzoimidazolidinil-tiazolidina

BMH: Benzomonoheterociclo

BNTZ: Benzobistiazolidina

BTZ: Bistiazolidina

BuLi: Butil litio

cc.: Concentrado

Cym: Cisteamina

Cys: L-cisteína

d: Doblete

DCM: Diclorometano

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTA: Ditionazabicyclo

DTNB: Ácido ditionitrobenzoico

DTT: Ditionitroreitol

EDA: Etilendiamina

EP: Éter de petróleo

FDA: Administración de Drogas y Alimentos de los EE.UU.

HBTU: O-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión (o Cromatografía líquida de alta eficacia)

HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

IR: Infrarrojo

J: Constante de acoplamiento

K_i: Constante de inhibición

LB: Luria-Bertani

L-CysOEt: L-cisteína etil éster

MAO: Monoamina Oxidasa

MBL: Metallo β -Lactamasas

MIDA: N-metiliminodiacetilo

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

NAEH = número de aceptores de enlaces de hidrógeno

NCL: Native Chemical Ligation

NDEH = número de dadores de enlaces de hidrógeno

NER = número de enlaces rotatables

OTZ: Oxazolidinil-tiazolidina

PD: Farmacodinamia

PDB: Protein Data Bank

PEG: Polietilenglicol

PF: Punto de fusión

Pin: pinacol

PK: Farmacocinética

ppm: Partes por millón

p-TsOH: *p*-toluensulfónico

py: Piridina

q: Cuarteto

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

s: Singulete

sat.: Solución saturada

SBL: Serina β -Lactamasas

S_EAr: Sustitución electrofílica aromática

t: Triplete

T.A.: Temperatura ambiente

TG: TentaGel

TGI: Tracto Gastrointestinal

TFA: Ácido trifluoroacético

TLC: Cromatografía en capa fina

TPSA: Topological polar surface area

TZ: Tiazolidina

μ W: Microondas

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1 Antibióticos β -lactámicos y resistencia bacteriana

1.1.1 Antibióticos β -lactámicos

El descubrimiento y desarrollo de antibióticos es quizás el avance médico más importante del siglo XX. Desde su introducción en el uso clínico antes de la Segunda Guerra Mundial, los antibióticos han salvado innumerables vidas y continúan siendo una terapia de cabecera contra infecciones bacterianas.¹

A partir del descubrimiento de la penicilina G, los antibióticos β -lactámicos (ABL) se han convertido en los fármacos de elección para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas. Actualmente, estos agentes representan el 65% del mercado mundial de antibióticos que incluyen más de 50 medicamentos comercializados.²

Se caracterizan por un anillo β -lactámico de cuatro miembros en su estructura y se clasifican en cuatro categorías principales: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos y monobactamas.³ La estructura de las diferentes clases de ABL se muestra en la Figura 1.1.

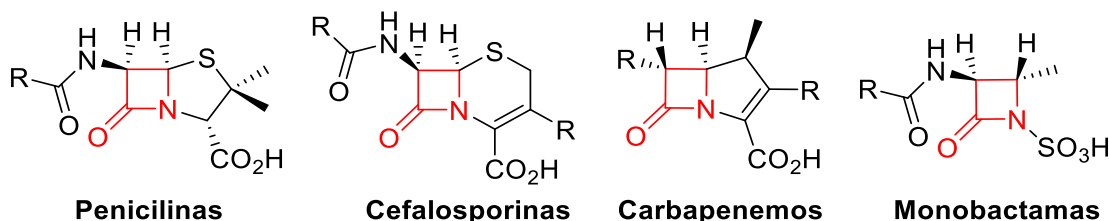


Figura 1.1: Estructura de los ABL: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos y monobactamas.

Las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemos representan los ejemplos más exitosos y utilizados en la clínica. En particular, los carbapenemos son los ABL reservados para infecciones intra-hospitalarias graves, como por ejemplo las infecciones intra-abdominales (apendicitis complicadas y peritonitis), meningitis bacterianas e infecciones de la piel. Entre ellos, los más comúnmente utilizados son el imipenem⁴ y el meropenem.⁵

Por otro lado, las monobactamas han sido utilizadas en menor extensión, pero han sido objeto de varias patentes en los últimos años.⁶

Los ABL son activos contra bacterias Gram-(+) y Gram(-). El mecanismo de acción a nivel molecular de los ABL es la acilación irreversible de un residuo de serina de las transpeptidasas, enzimas bacterianas responsables de la biosíntesis de la pared celular (también llamadas proteínas de unión a penicilina, PBP).^{7,8} Este es un proceso únicamente bacteriano y que ocurre en la pared celular, un lugar de la célula más fácilmente accesible que los objetivos intracelulares de otros antibióticos.^{9,10}

1.1.2 Resistencia bacteriana a antibióticos

Pese a todos sus beneficios para la salud humana, la utilización masiva de antibióticos, tanto en ambientes nosocomiales como en suplementos alimentarios para animales destinados al consumo humano, ha demostrado ser una fuerza impulsora para la evolución de las bacterias y el desarrollo de resistencia hacia estos agentes.¹¹

En el año 1992 la resistencia a antibióticos fue reconocida como una crisis sanitaria con la aparición de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) y *Enterococcus* spp resistente a vancomicina (VRE).¹² En los últimos años, la lista de patógenos más peligrosos ha crecido hasta incluir *E. faecium*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, que han sido denominados colectivamente como patógenos ESKAPE.¹³ La prevalencia de cepas resistentes a múltiples fármacos va en aumento y es extremadamente preocupante, generando muchas especulaciones. En 2019, la resistencia a antibióticos se atribuyó directamente a 1.27 millones de muertes en todo el mundo, notoriamente mayor al año 2014 donde se detectaron 700 000.¹⁴

Sin excepción, la resistencia se ha desarrollado para toda clase de antibióticos, tanto naturales como sintéticos, luego de unos pocos años de su introducción en la clínica, y ahora se reconoce ampliamente que la resistencia bacteriana a los antibióticos es una consecuencia inevitable de su uso.¹⁵

La resistencia bacteriana a los ABL se ha logrado mediante tres estrategias principales: i) modificación de las PBP para que no reconozcan a los ABL; ii) producción de enzimas β -lactamasas que hidrolizan el anillo β -lactámico y iii) sobreexpresión de bombas de eflujo para su expulsión activa.

El principal mecanismo de resistencia hacia estos agentes, tanto en Gram-(+) como Gram(-), es la expresión de β -lactamasas, que hidrolizan el anillo β -lactámico y los vuelve ineficaces.¹⁶

1.2 β -Lactamasas

Actualmente se han identificado más de 7500 β -lactamasas de diverso espectro de acción y especificidad por el sustrato.¹⁷

Estas enzimas se dividen en dos grandes grupos, distinguidas por diferencias fundamentales en su mecanismo hidrolítico: las serina- β -lactamasas (SBL) utilizan un residuo de serina para la hidrólisis mientras que las metalo- β -lactamasas (MBL) utilizan un hidroxilo activado por zinc como nucleófilo.¹⁸

Además, existe un sistema adicional para clasificarlas basado en la secuencia aminoacídica (clasificación de Ambler).¹⁹ Este sistema divide a las β -lactamasas en cuatro clases: las clase A, C y D son SBL y las clase B son MBL.

Las cuatro clases están ampliamente distribuidas en múltiples especies de bacterias ambientales y clínicamente significativas. La diseminación de β -lactamasas se ha visto exacerbada en gran medida por la transferencia de material genético entre microorganismos, a través de la integración de genes que codifican para estas enzimas en elementos genéticos móviles, como plásmidos o transposones.²⁰

Dentro de cada clase, algunas familias de enzimas se han diseminado ampliamente entre los patógenos bacterianos más importantes. En general, se trata de bacterias Gram(-) responsables de infecciones oportunistas en pacientes inmuno-comprometidos. Las familias de enzimas clave incluyen: TEM, SHV, CTX-M y KPC (clase A); NDM, IMP y VIM (clase B); CMY y ADC (clase C) y OXA-23, OXA24/40 y OXA-48, (Clase D).

1.2.1 Serina- β -Lactamasas

Existen evidencias de que las SBL pudieron haber evolucionado a partir de las PBP, con las que comparten un motivo invariable Ser-Xaa-Xaa-Lys. Tanto la catálisis por parte de las SBL como la inhibición de las PBP involucran este

residuo de serina como nucleófilo a través de la formación de un complejo acil-enzima covalente.²¹

Aunque las tres clases de SBL difieren sustancialmente en la secuencia, todas emplean un mecanismo hidrolítico basado en un proceso de acilación-desacilación, Figura 1.2.¹⁷

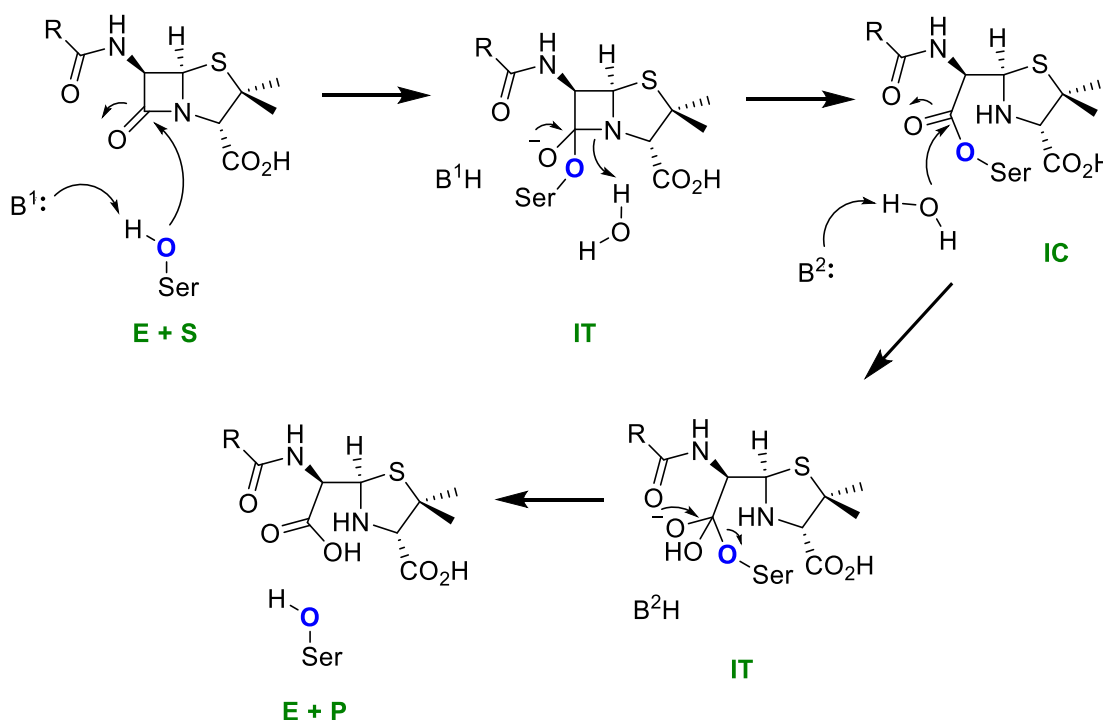


Figura 1.2: Mecanismo general de hidrólisis de penicilinas de las serina-β-lactamasas. Se representa: Enzima (E), Sustrato (S), Intermediario Tetrahédrico (IT), Intermediario Covalente (IC), Producto (P).¹⁷

La primera etapa del mecanismo hidrolítico de las SBL consiste en el ataque nucleofílico del residuo de serina del sitio activo, activado por una base general, al carbonilo del anillo de β-lactama (E + S), que da como resultado un intermediario tetrahédrico de alta energía (IT). La protonación del nitrógeno de la β-lactama conduce a la escisión del enlace C-N, regeneración del carbonilo y a la formación del intermediario acil-enzima covalente (IC). A continuación, una molécula de H₂O activada por una base general del sitio activo ataca el complejo covalente formando nuevamente un intermediario tetrahédrico de alta energía (IT). La regeneración del carbonilo y la liberación del residuo de serina regenera la enzima activa y libera el ABL hidrolizado e inactivo (E + P).^{17,22}

Las tres clases de SBL divergen mecanísticamente, en particular con respecto a las identidades y las interacciones con las bases generales involucradas en el mecanismo. Las enzimas Clase A, utilizan un residuo de Glu166 para activar el residuo de serina nucleofílico y también sería la base general que desprotona la molécula de H₂O para la desacilación. En las enzimas Clase C, el residuo clave para la acilación y desacilación de la enzima sería una Tyr150, mientras que para las enzimas clase D, sería un residuo de Lys.¹⁷

Serina-β-Lactamasas Clase A

Las enzimas de clase A son las β-lactamasas más ampliamente distribuidas y más extensamente estudiadas. Dentro de ellas, las enzimas KPC son las más significativas clínicamente, principalmente debido a su habilidad de hidrolizar carbapenemos, ABL de último recurso para infecciones bacterianas graves. Actualmente, estas enzimas están distribuidas en varias especies, principalmente en *K. pneumoniae*, responsable de la mayoría de las infecciones oportunistas de pacientes comprometidos en el ámbito sanitario.²³

Las familias PC1,²⁴ TEM,²⁵ SHV²⁶ y CTX-M²⁷ también han tenido una gran relevancia clínica debido a su rápida diseminación en plásmidos y otros elementos genéticos móviles a través de una gama de patógenos Gram(-), particularmente las *Enterobacteriaceae*. Estas enzimas hidrolizan la mayoría de las penicilinas, y muchas de ellas son capaces de hidrolizar incluso cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima y ceftazidima. Este conjunto de enzimas ha generado el fenotipo de "espectro extendido" (β-lactamasas de espectro extendido o ESBL). Las ESBL amenazan significativamente la efectividad de cefalosporinas en varios contextos clínicos.²⁸

Serina-β-Lactamasas Clase C

Las SBL de clase C están ampliamente distribuidas en los cromosomas de muchos patógenos Gram(-). La relevancia clínica de esta clase de enzimas está dada por la diseminación de ciertos miembros de la familia, como las enzimas AmpC, CMY, FOX y DHA, en elementos genéticos móviles tanto en *Enterobacteriaceae* como en especies no fermentadoras como *P. aeruginosa*.

En estos microorganismos, estas enzimas son las principales causantes de la resistencia a las cefalosporinas como cefalotina, cefazolina y cefoxitina, y también a la mayoría de las penicilinas.²⁹

Serina-β-Lactamasas Clase D

Las enzimas SBL de clase D son las más diversas y, en muchos aspectos, las menos conocidas de todas las β-lactamasas. Todas las enzimas pertenecientes a esta clase se llaman OXA, y tienen actividad contra penicilinas, cefalosporinas y carbapenemos. Aunque muchos miembros son cromosómicos, ha aumentado su diseminación a través de plásmidos en *P. aeruginosa*³⁰ y, más recientemente, la diseminación de enzimas carbapenemasas en *A. baumannii*³¹ y *Enterobacteriaceae* (particularmente *K. pneumoniae*).³²

1.2.2 Metallo-β-Lactamasas

Las MBL son enzimas dependientes de zinc, y siguen un mecanismo hidrolítico diferente a las SBL: utilizan un hidroxilo de una molécula de H₂O coordinada con Zn²⁺ para hidrolizar el anillo β-lactámico, sin la formación de un intermediario covalente con la enzima. Se cree que estas enzimas tuvieron un origen evolutivo diferente a las SBL y que no están relacionadas con las PBP.³³

Las MBL son estructuralmente muy diversas y, en función de esta diversidad, se han dividido en tres subclases según el alineamiento de la secuencia, la estructura del sitio activo y la estequiometría del metal: B1, B2 y B3.³⁴

Las tres subclases comparten el mismo pliegue proteico general: su estructura terciaria está compuesta por motivos α-hélices y hojas β plegadas según αββα. Sin embargo, presentan arquitecturas de sitios activos distintas. En las enzimas B1 y B3, el sitio activo contiene dos iones Zn²⁺ ubicados en una cavidad amplia flanqueada por dos bucles, mientras que las enzimas B2 contienen un solo Zn²⁺.³⁵

Dentro de la subclase B1, las enzimas clínicamente relevantes son: NDM-1,³⁶ VIM-2,³⁷ IMP-1,³⁸ y CcrA.³⁹ El sitio activo de estas enzimas está altamente conservado y contiene dos iones Zn²⁺ denominados Zn1 y Zn2, que están

coordinados por tres aminoácidos cada uno. El Zn1 está coordinado por tres residuos de histidina (His116, His118 e His196) y un hidróxido proveniente de una molécula de H₂O (W1). El Zn2 adopta una coordinación bipiramidal trigonal con W1, Asp120, Cys221 e His263 como ligandos y una segunda molécula de H₂O (W2) que completa el conjunto de ligandos, Figura 1.3A.⁴⁰ Los iones Zn²⁺ están unidos por W1 que actúa como puente entre ellos y se cree que actúa como nucleófilo en la hidrólisis de los ABL.

Las enzimas B1, están incorporadas en plásmidos y se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias Gram(-) como *K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Tienen una amplia especificidad de sustrato y pueden hidrolizar casi todos los ABL, incluidos los carbapenemos.

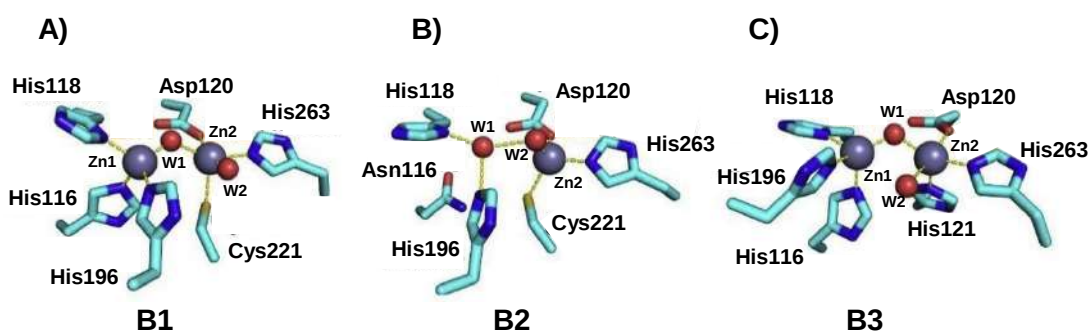


Figura 1.3: Esfera de coordinación de Zn²⁺ en el sitio activo de las tres subclases de MBL: A) B1, B) B2 y C) B3.²² Los iones Zn²⁺ se muestran en gris claro (Zn1 y Zn2) y los residuos involucrados en la coordinación con Zn²⁺ en celeste. Las moléculas de H₂O (W1 y W2) se muestran en color rojo.⁴¹

Dentro de la subclase B2, las enzimas representantes son: Sfh-I, CphA y PFM. Estas enzimas contienen un único ion de zinc que ocupa una posición homóloga a Zn2 en las subclases B1, coordinado por una molécula de H₂O (W1), Asp120, Cys221 e His263. Una segunda molécula de H₂O (W2), activada por His118 e His196, es probablemente el nucleófilo en las enzimas B2, Figura 1.3B. El sitio activo de las MBL B2 es más estrecho respecto a las subclases B1 y B3 y, por lo tanto, tienen un perfil de sustrato más restringido. Como resultado, las enzimas B2 son incapaces de hidrolizar la mayoría de las penicilinas y cefalosporinas y son casi exclusivamente carbapenemasas.^{42,43} Hasta la fecha, se han identificado en los cromosomas de *S. fonticola* (Sfh-I),⁴⁴ *Aeromonas sp.*

(CphA)⁴⁵ y *Pseudomonas sp.* (PFM),⁴⁶ organismos capaces de causar una variedad de infecciones oportunistas en la clínica.

En la subclase B3, la enzima clínicamente relevante es L1. En estas enzimas el Zn1 ocupa una posición homóloga al Zn2 de la subclase B1, mientras que el Zn2 coordina con Asp120, His121 e His263, lo que da como resultado una arquitectura de sitio activo diferente respecto a las MBL pertenecientes a la subclase B1 y B2, Figura 1.3C.

Estas enzimas se encuentran en los cromosomas de numerosas bacterias Gram-(-) ambientales y patógenas, incluidas *S. maltophilia* (L1)⁴⁷, *E. meningoseptica* (GOB)⁴⁸ y *P. otitidis* (POM-1).⁴⁹ Recientemente se ha descrito que algunas enzimas de esta subclase son capaces de incorporarse a los cromosomas de bacterias patógenas a través de un plásmido, lo que indica el potencial para su diseminación.⁵⁰ En conjunto con su amplio espectro de sustratos que incluye la hidrólisis eficiente de carbapenem, las enzimas B3 podrían plantear una preocupación clínica cada vez mayor.

A pesar de las diferencias estructurales, existen varias características comunes del mecanismo de reacción de las MBL de las tres subclases. Actualmente, se acepta que hay dos pasos principales durante la reacción: el ataque nucleofílico al carbonilo y la protonación del átomo de N de la β -lactama luego de la hidrólisis, Figura 1.4. Sin embargo, hay varias controversias respecto a la acumulación de intermediarios de reacción, la identidad del nucleófilo y el donante de protones, y la función específica de cada ion metálico durante el proceso.²²

En la Figura 1.4 se muestra la propuesta aceptada de mecanismo de hidrólisis de carbapenemos para la subclase B1. En una primera etapa, se une el sustrato (E + S); el Zn1 polariza el carbonilo de la β -lactama activándolo para el posterior ataque nucleofílico, y el carboxilato del ABL coordina con el Zn2. Esto desplaza al hidroxilo puente entre ambos Zn y permite el ataque sobre el carbonilo de los ABL.

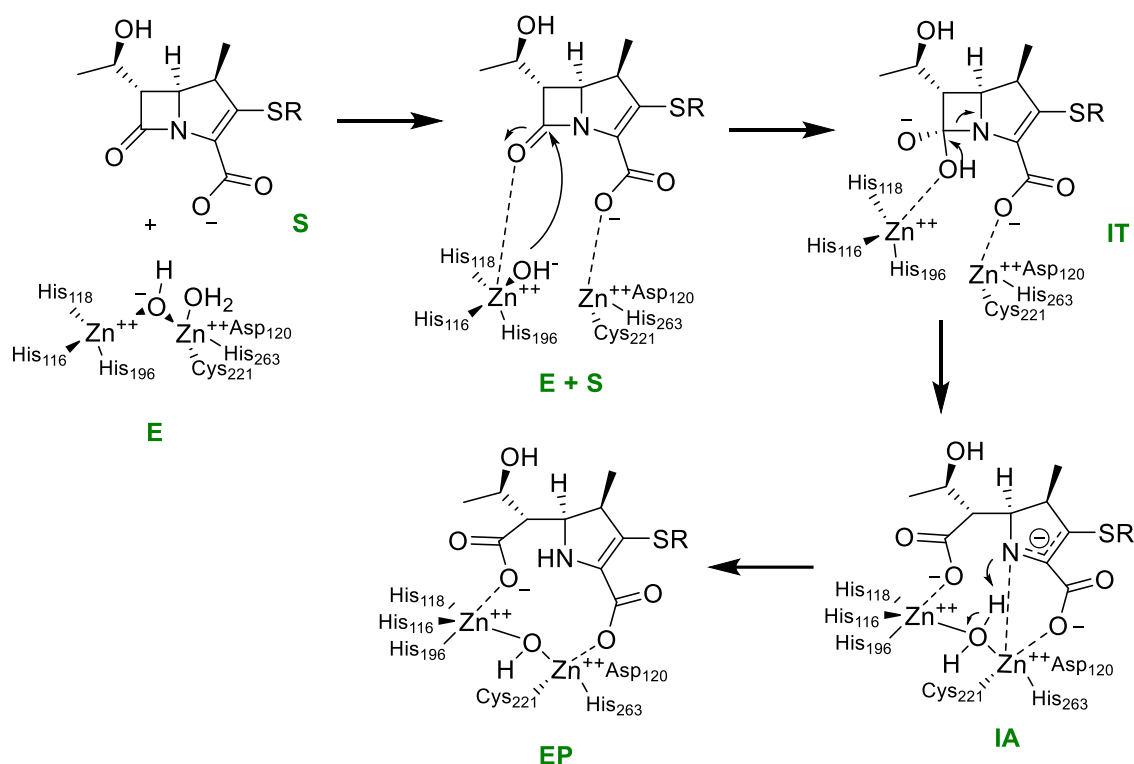


Figura 1.4: Mecanismo propuesto para la hidrólisis de carbapenemos por enzimas pertenecientes a la subclase B1. Se representa: Enzima (E), Sustrato (S), Intermediario Tetrahédrico (IT), Intermediario Aniónico (IA), Producto (P).²²

El ataque nucleofílico del grupo -OH lleva a la formación del intermediario tetrahédrico (IT) de alta energía. A diferencia de las SBL, este intermedio tetrahédrico está energéticamente cerca de los estados de transición relacionados y no ha sido “atrapado”. Este intermediario colapsa rápidamente y evoluciona hacia un intermedio aniónico (IA) con carga negativa en el nitrógeno de la β-lactama, que se deslocaliza en el anillo de pirrolina y se estabiliza mediante una fuerte interacción con el Zn²⁺. Luego, se da la neutralización de esta especie con un protón proveniente del puente H₂O/OH⁻ entre los dos Zn²⁺ (EP), liberando el producto hidrolizado (P).²²

A pesar de las diferencias estructurales de las tres subclases de MBL, la flexibilidad del sitio activo les permite a estas enzimas hidrolizar a la gran diversidad de ABL utilizados en clínica. En particular, es altamente preocupante su actividad carbapenemasa y su rápida diseminación en muchas bacterias patógenas, siendo responsables de la mortalidad y morbilidad ante el fracaso del tratamiento con antibióticos.

1.3 Estrategias para combatir la resistencia mediada por β -lactamasas

Pese a que el desarrollo de resistencia hacia los ABL sigue en aumento, estos agentes siguen siendo la terapia de cabecera contra infecciones bacterianas gracias a su amplio espectro de acción y excelente perfil de seguridad. Por ese motivo, existe una necesidad urgente de encontrar nuevas estrategias para mantener su efectividad en el ámbito clínico.

Actualmente existen dos enfoques para combatir la resistencia bacteriana y preservar el uso de ABL en el tratamiento de infecciones: (i) diseñar y desarrollar nuevos antibióticos que sean capaces de escapar a la acción de las β -lactamasas, o (ii) asociar los ABL ya existentes con compuestos inhibidores de β -lactamasas para que los primeros puedan alcanzar las PBP.

1.3.1 Desarrollo de ABL resistentes a la inactivación por β -lactamasas

La estrategia inicial para superar la resistencia a las β -lactamasas fue modificar las cadenas laterales de penicilinas y cefalosporinas para mejorar la estabilidad frente a estas enzimas. De esta manera, a principios de la década de los 80 salieron al mercado nuevas cefalosporinas de espectro extendido, como ceftazidime y cefepime. Además, surgieron nuevas clases de ABL: carbapenemos y monobactamas.

Sin embargo, el uso indebido y excesivo de antibióticos ha ejercido una gran presión evolutiva sobre los microorganismos que condujo a la diversificación de la especificidad de sustrato de estas enzimas. De esta manera, casi tan pronto como se introduce un nuevo ABL en el uso clínico, rápidamente se identifica alguna β -lactamasa con la capacidad de hidrolizarlo y, por lo tanto, inactivarlo, comprometiendo su efectividad clínica. Por este motivo, en los últimos años, ha habido una disminución significativa en el desarrollo de nuevos ABL, y el énfasis principal para combatir la resistencia bacteriana ha estado centrado en el uso de ABL ya existentes en combinación con inhibidores de β -lactamasas que restauren su actividad antimicrobiana.⁵¹

1.3.2 Combinaciones de ABL e inhibidores de SBL

El ácido clavulánico fue el primer inhibidor de β -lactamasas introducido en la clínica en la década de 1970.⁵² Este compuesto es un producto natural activo únicamente frente a SBL clase A, y se ha utilizado en combinación con amoxicilina para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes que expresan estas enzimas. Una década más tarde, salieron al mercado el sulbactam⁵³ y el tazobactam como inhibidores de SBL de clase A y C, Figura 1.5.⁵⁴

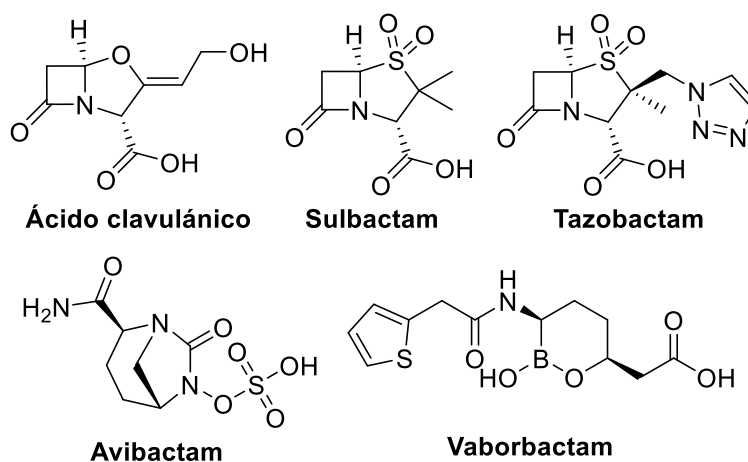


Figura 1.5: Estructura del ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam y vaborbactam, inhibidores de SBL utilizados en clínica.

Todos estos inhibidores contienen un anillo β -lactámico, y la inhibición se basa en la formación de complejos acil-enzima con las SBL con una velocidad de desacilación baja. Más recientemente, se introdujo en la clínica el avibactam,¹⁷ un inhibidor no β -lactámico de SBL clase A, C y D.

A fines del año 2019 fue aprobado para su uso clínico el vaborbactam, un compuesto conteniendo un boronato cíclico, que se utiliza en combinación con meropenem (ABL del tipo carbapenemo). El vaborbactam es un inhibidor de SBL clase A y C.⁵⁵

Las combinaciones ABL/inhibidor de β -lactamasas en uso clínico tienen aplicación limitada ya que ninguno de los inhibidores aprobados es activo contra SBL de espectro extendido (BLEE) y de clase D, y no inhiben MBL.⁵⁶ Hasta el momento no existen inhibidores de MBL aprobados para su uso en clínica.

1.4 Inhibidores de Metallo- β -lactamasas descritos en literatura

Los inhibidores de MBL ideales deberían dirigirse a las enzimas de todas las subclases. Sin embargo, dado que se trata de grupo muy heterogéneo de enzimas, ha resultado difícil de lograr. Muchos inhibidores de MBL descritos en literatura son activos contra una enzima específica o una subclase de MBL, mientras que son poco potentes frente a otras MBL. Por este motivo, el desarrollo de un inhibidor común a todas las subclases es altamente desafiante.

Se han descrito varias estrategias de inhibición para este tipo de enzimas, que incluyen principalmente: i) análogos a sustratos o producto (conteniendo tioles,^{57,58} ácidos carboxílicos⁵⁹ o hidroxamatos⁶⁰ como grupos coordinantes de zinc), ii) análogos a estados de transición (fosfonatos,⁶¹ ácidos o ésteres borónicos⁶² y ciclobutanonas⁶³), iii) inhibidores irreversibles (seleno-derivados⁶⁴) y iv) quelantes de zinc (EDTA).⁶⁵ Algunos ejemplos se muestran en la Figura 1.6.

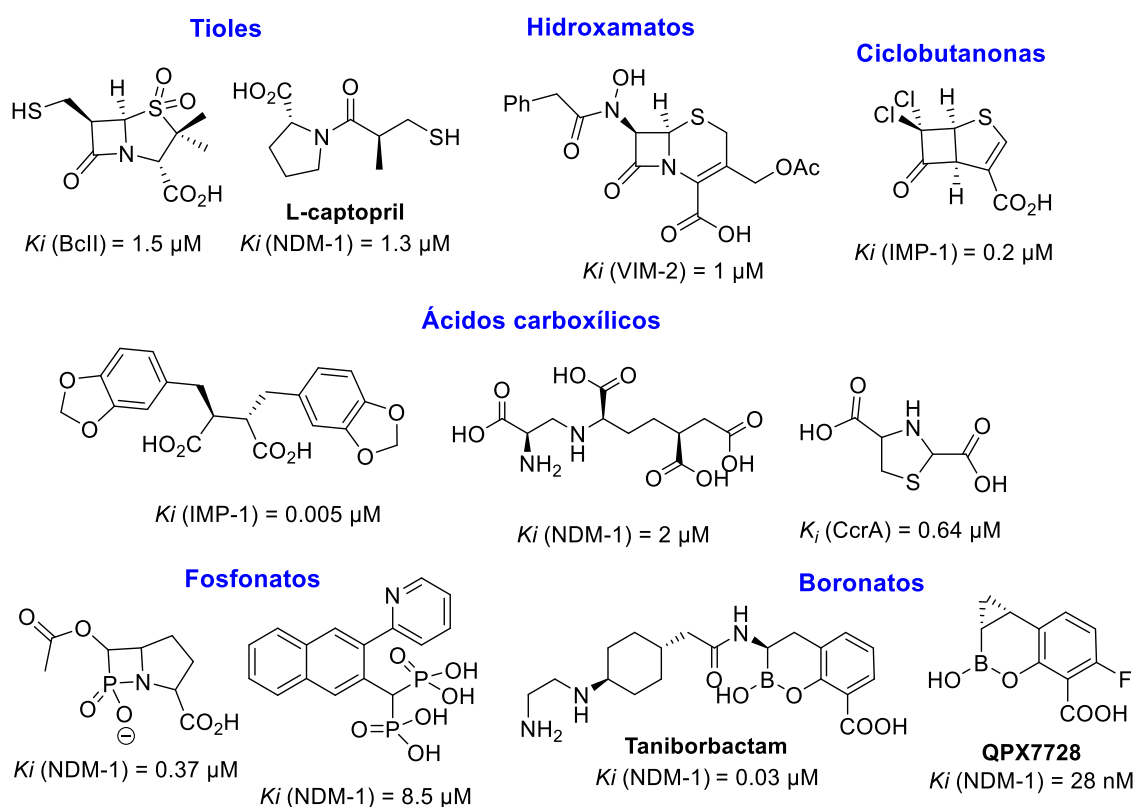


Figura 1.6: Inhibidores de MBL reportados en bibliografía: Análogos a sustrato o producto (tioles, ácidos carboxílicos e hidroxamatos) y análogos a estados de transición (fosfonatos, ácidos o ésteres borónicos y ciclobutanonas).

El grupo carboxilato presente en todos los ABL proporciona la principal fuerza impulsora para la unión con las MBL, coordinándose directamente con Zn^{2+} e interactuando con un residuo cargado positivamente en la posición 224, generalmente una Lys.³⁶ De esta manera, muchos inhibidores reportados en bibliografía contienen un grupo químico con una alta afinidad por el Zn, como grupos tioles, ácidos carboxílicos e hidroxamatos, Figura 1.6. Algunos de estos compuestos mostraron valores de K_i en el orden micromolar frente a enzimas de relevancia clínica como NDM-1, VIM-2 e IMP-1, ver Figura 1.6.

Los análogos del estado de transición son generalmente inhibidores enzimáticos potentes, ya que se unen más estrechamente a la enzima que los propios sustratos.⁶⁶ En el caso de las β -lactamasas, un primer estado de transición implica la preformación de un carbono tetraédrico que da lugar a un intermedio tetraédrico estable (en el caso de SBL) o de alta energía (MBL). Por lo tanto, los inhibidores de los análogos del estado de transición en las β -lactamasas intentan mimetizar el intermediario tetraédrico formado durante el mecanismo hidrolítico de estas enzimas.

De esta manera, se han descrito algunos compuestos conteniendo ciclobutanonas, fosfonatos o bisfosfonatos, y ácidos o ésteres borónicos como análogos a estados de transición a estas enzimas. Este enfoque tiene como ventaja su potencial inhibición conjunta de SBL y MBL.

Los grupos fosfonato se han considerado “imitadores” de estados de transición basados en la geometría tetraédrica del átomo de fósforo. Este enfoque se ha utilizado para inhibir las SBL⁶⁷ y, recientemente, algunos de ellos han mostrado potencia inhibitoria frente a las MBL.⁶⁸

Los compuestos conteniendo ácidos o ésteres borónicos como análogos a estado de transición han resultado especialmente útiles.

Un ejemplo es el Taniborbactam, Figura 1.6, un boronato bicíclico activo contra la mayoría de las subclases de MBL y SBL. Como excepción, el Taniborbactam no es activo frente a enzimas de la subclase B3. Actualmente, este compuesto se encuentra en ensayos clínicos de fase 3 para el tratamiento de infecciones del tracto urinario.⁶²

Otro ejemplo es el boronato bicíclico QPX7728, Figura 1.6, un inhibidor potente de SBL y MBL de las subclases B1. Sin embargo, no es activo frente a enzimas pertenecientes a la subclase B2 ni B3. Este compuesto se encuentra en ensayos clínicos de fase I para el tratamiento de varios tipos de infecciones bacterianas.⁶⁹

A pesar de los avances recientes en el desarrollo de boronatos cíclicos, por el momento no existen inhibidores clínicamente útiles contra las MBL. El número de casos de resistencia mediados por MBL continúa en aumento y se ha convertido en un importante problema de salud pública. Esta situación se ve agravada por un número creciente de pacientes susceptibles y comprometidos, incluidos pacientes con COVID-19 para los que se notifican frecuentemente coinfecciones con bacterias resistentes a antibióticos.⁷⁰ Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos inhibidores de MBL de amplio espectro para preservar el uso de los ABL en clínica y dar batalla a las infecciones bacterianas producidas por microorganismos resistentes.

1.5 Antecedentes de grupo

Desde hace varios años nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en el diseño y síntesis de nuevos inhibidores cross-class de MBL. En este sentido, se reportó la síntesis de bistiazolidinas (BTZ) **1**^{71,72,73,74} y oxazolidinil-tiazolidinas (OTZ) **2**⁷⁵ como análogos a sustrato y tiazolidinas (TZ) **3**^{76,77} como análogos a producto. Estos compuestos resultaron activos frente a todas las subclases de MBL.

En la Figura 1.7 se muestra la similitud estructural entre las BTZ y OTZ y el sustrato penicilina, y la similitud entre las TZ y el producto de hidrólisis de la penicilina. La potencia inhibitoria de estos compuestos se basa en la interacción del grupo tiol con los iones de Zn^{2+} en el sitio activo.

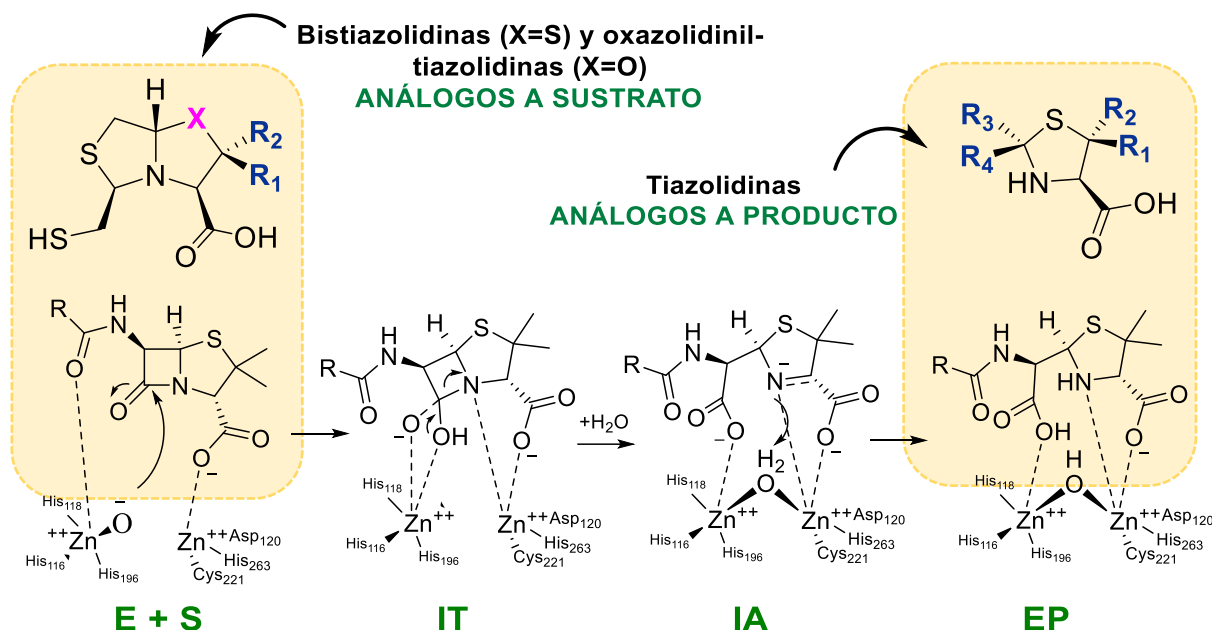
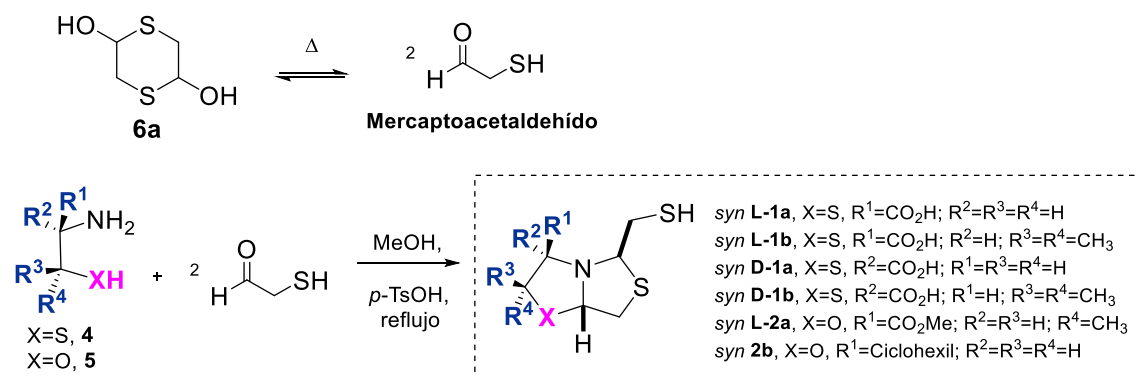


Figura 1.7: Similitud estructural entre las BTZ y TZ y el sustrato penicilina, y la similitud entre las TZ y el producto de hidrólisis de la penicilina. Se representa: Enzima (E), Sustrato (S), Intermediario Tetrahédrico (IT), Intermediario Aniónico (AI), Producto (P).

1.5.1 Bistiazolidinas y Oxazolidinil-tiazolidinas

El diseño de **1** y **2** se basó en las propiedades definitorias de los sustratos de β -lactamasas (un biciclo, un nitrógeno cabeza de puente tetraédrico y un grupo carboxilato) combinados con un tiol libre (que es un grupo de unión a zinc de alta afinidad). Estos compuestos fueron sintetizados utilizando como materiales de partida diferentes β -aminotioles **4** y β -aminoalcoholes **5**, respectivamente, y ditiano **6a**, la forma polimérica del mercaptoacetaldehído, Esquema 1.1.



Esquema 1.1: Síntesis de BTZ **1** y OTZ **2**.

La síntesis de las BTZ y de las OTZ se basa en una doble ciclocondensación vía iones iminio. En la Figura 1.8 se muestra como ejemplo el mecanismo de formación de la bistiazolidina BTZ L-**1a**.

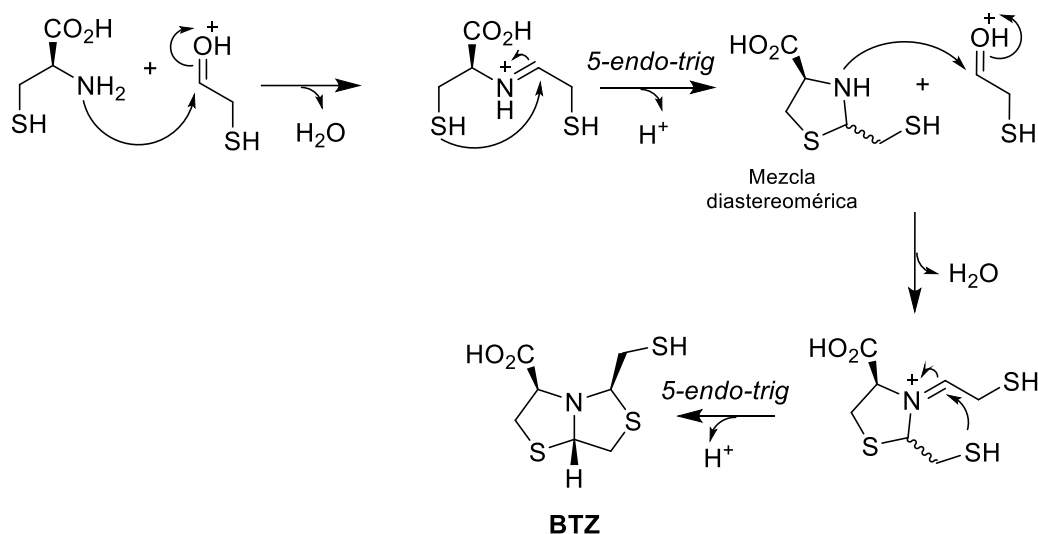


Figura 1.8: Mecanismo de formación de BTZ L-**1a** por doble ciclación de L-cisteína y 2 moléculas de mercaptoacetaldehído, catalizada en medio ácido.

Primero tiene lugar la formación de la primera tiazolidina a partir de L-cisteína y el primer equivalente de mercaptoacetaldehído vía ion iminio. El producto probablemente sea una mezcla diastereomérica, Figura 1.8. Según las reglas de Baldwin, estas ciclaciones *5-endo-trig* se ven desfavorecidas. Sin embargo, el azufre generalmente desobedece las reglas de Baldwin y permite las ciclaciones de este tipo.⁷⁸ Luego, en forma análoga tiene lugar la segunda ciclación obteniendo la bistiazolidina deseada. Hay evidencias de que, si bien en la primera ciclación se obtendría una mezcla diastereomérica de la tiazolidina intermedia, dado que se trata de sistemas dinámicos y reversibles,⁷⁹ para dar la segunda ciclación el biciclo se equilibra para dar lugar al isómero *syn*, energéticamente más estable. Cuando se utilizan β -aminotioles y β -aminoalcoholes quirales, se obtiene un solo diastereómero con excelentes % de exceso diastereomérico (% ed). De esta manera, esta reacción es altamente regio y estereoespecífica.

Como antecedente de este trabajo, se prepararon 4 bistiazolidinas: 2 de la serie L, obtenidas a partir de la L-cisteína o de la L-penicilamina (L-**1a** y L-**1b**, respectivamente) y sus respectivos enantiómeros de la serie D a partir de la D-

cisteína o de la D-penicilamina (D-**1a** y D-**1b**, respectivamente). También se prepararon 2 oxazolidinil-tiazolidinas **2a-b**, Figura 1.9.

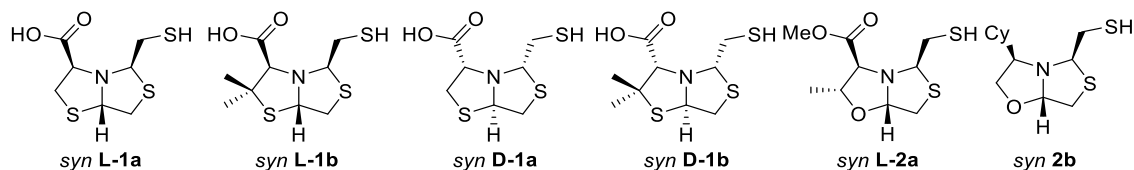


Figura 1.9: Estructura de las BTZ **1** y OTZ **2** preparadas por nuestro grupo.

Las BTZ preparadas fueron evaluadas y caracterizadas como inhibidores competitivos de todas las subclases de MBL, mostrando valores de K_i en el orden μM , Tabla 1.1. Además, lograron restaurar la actividad de ABL frente a microorganismos resistentes Gram(-) que expresan NDM-1: *K. pneumoniae*, *A. baumannii* y *P. rettgeri*, aislados de casos clínicos hospitalarios.⁷¹

Tabla 1.1: Valores de K_i de las BTZ **1** y OTZ **2** frente a todas las subclases de MBL.

Compuesto	K_i (μM)				
	NDM-1	VIM-2	IMP-1	Sfh-1	L1
L- 1a	7 $\pm$ 1	3.7 $\pm$ 0.3	8 $\pm$ 2	0.26 $\pm$ 0.03	12 $\pm$ 1
L- 1b	18 $\pm$ 3	3.8 $\pm$ 0.2	15 $\pm$ 3	0.36 $\pm$ 0.04	11 $\pm$ 2
D- 1a	19 $\pm$ 3	5.4 $\pm$ 0.4	6 $\pm$ 1	26 $\pm$ 3	10 $\pm$ 1
D- 1b	12 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	14 $\pm$ 3	29 $\pm$ 3	10 $\pm$ 1
2a	1.6 $\pm$ 0.6	ND	ND	ND	ND
2b	150 $\pm$ 30	ND	ND	ND	ND

ND = No determinado.

La OTZ **2a** mostró una buena actividad inhibitoria frente a NDM-1, enzima de relevancia clínica ($K_i = 1.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$). Por otro lado, la OTZ **2b** resultó inactiva frente a NDM-1 ($K_i = 150 \pm 30 \mu\text{M}$), Tabla 1.1.⁷⁵

Se lograron obtener las estructuras cristalinas de los complejos MBL:L-**1a** y L-**1b** para las tres principales subclases de MBL. Esto permitió observar los modos de unión al sitio activo de las diferentes enzimas; a modo de ejemplo se muestran los complejos MBL:L-**1a** para las enzimas NDM-1, Sfh-1 y L1, Figura 1.9A-C.

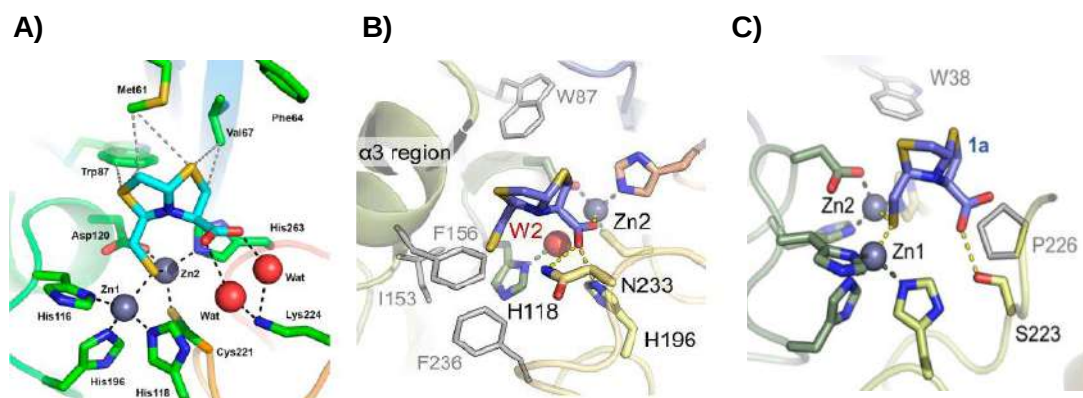


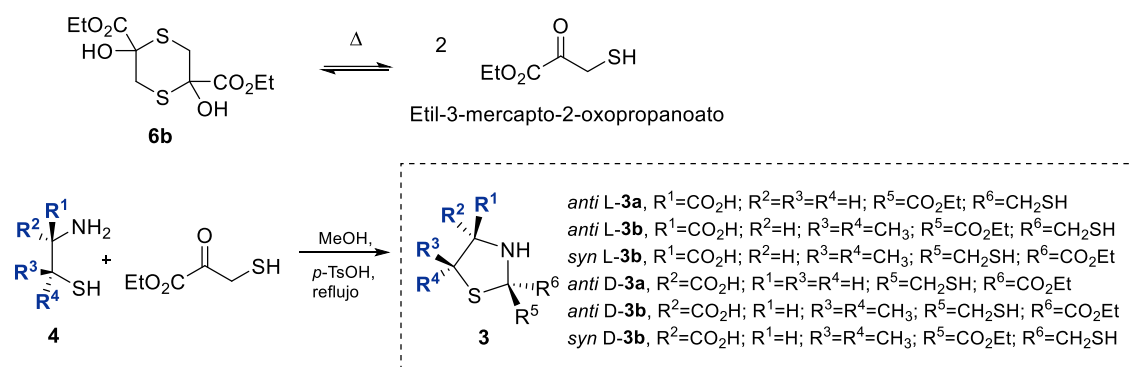
Figura 1.9: Estructuras cristalinas de los complejos MBL:L-**1a** para las enzimas: A) NDM-1; B) Sfh-1 y C) L1.⁸⁰ Los iones Zn^{2+} se muestran en gris, y las moléculas de H_2O en rojo.

Los resultados mostraron que las BTZ de la serie L se unen a las MBL binucleares B1 y B3 a través del tiol, el cual actúa como puente entre los iones Zn^{2+} . El carboxilato no interacciona con el centro metálico; en enzimas B1 interacciona con dos moléculas de H_2O y en enzimas B3 con un residuo de serina. Por último, L-**1a** se une a la MBL Sfh-I, perteneciente a la subclase B2, a través de las interacciones de su carboxilato con Zn^{2+} , y el tiol se encuentra en la profundidad de la cavidad hidrofóbica.

1.5.2 Tiazolidinas

El diseño de las mercaptometil tiazolidinas TZ **3** se basó en su similitud estructural con el producto de hidrólisis de las penicilinas catalizado por MBL.

Las tiazolidinas se obtienen a partir de la ciclación vía ion iminio de β -aminotioles **4** y etil-3-mercapto-2-oxopropanoato, producto de la despolimerización del ditiano sustituido **6b**, ver Esquema 1.2.



Esquema 1.2: Síntesis de TZ **3**.

A diferencia de las BTZ, al utilizar mercaptocetonas la reacción se detiene en la primera ciclación. Esto se debe probablemente a la menor electrofilia de la cetona, y probablemente la presencia del sustituyente éster etílico en lugar del protón, lo que hace que el NH de la primera tiazolidina encuentre más impedimento para atacar como nucleófilo.

En cambio, en la síntesis de BTZ no se puede detener la reacción en la primera ciclación, sino que, al ser el aldehído más electrofílico, rápidamente ocurre la segunda ciclación, dando lugar a la bistiazolidina.

Cuando se utilizó L- o D-penicilamina como material de partida, se aislaron los dos diastereómeros *syn* y *anti* correspondientes, Esquema 1.2. Por el contrario, cuando se utilizó L- o D-cisteína, los isómeros *syn* L-**3a** y *syn* D-**3a**, respectivamente, no se pudieron aislar, probablemente por su inestabilidad. De esta manera, se prepararon seis TZ, ver Figura 1.10.

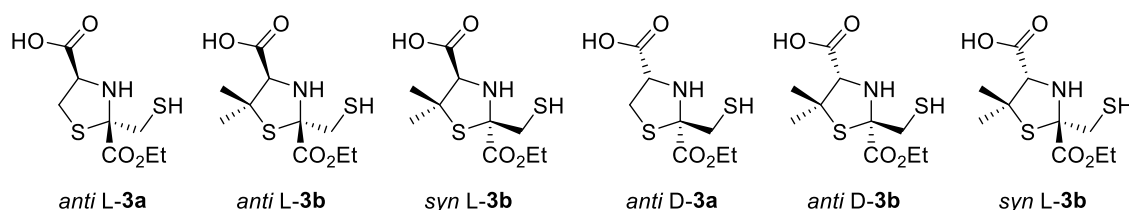


Figura 1.10: Estructura de las TZ **3** previamente preparadas por nuestro grupo.

Estos compuestos fueron caracterizados como inhibidores competitivos de todas las subclases de MBL, mostrando valores de K_i en el orden μM , ver Tabla 1.2.⁷⁷

Tabla 1.2: Valores de K_i de las TZ **3** frente a todas las subclases de MBL.

Compuesto	K_i (μM)				
	NDM-1	VIM-2	IMP-1	Sfh-1	L1
<i>anti</i> L- 3a	5.2 ± 0.7	0.38 ± 0.05	1.0 ± 0.2	0.16 ± 0.03	10.0 ± 0.8
<i>anti</i> L- 3b	0.44 ± 0.06	0.75 ± 0.09	0.46 ± 0.05	1.3 ± 0.1	20 ± 2
<i>syn</i> L- 3b	8 ± 1	3.6 ± 0.4	6.0 ± 0.6	100 ± 10	28 ± 3
<i>anti</i> D- 3a	2.5 ± 0.5	0.39 ± 0.05	1.3 ± 0.1	20 ± 2	4.0 ± 0.5
<i>anti</i> D- 3b	3.1 ± 0.3	0.9 ± 0.1	0.93 ± 0.08	130 ± 10	1.4 ± 0.2
<i>syn</i> D- 3b	0.60 ± 0.05	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	4.0 ± 0.6

Los resultados muestran que la actividad frente a estas enzimas depende de la estereoquímica y de la configuración relativa de las TZ evaluadas. En

general, el mejor compuesto resultó la TZ *anti* L-**3b**, mientras que el menos activo frente a las enzimas ensayadas resultó el compuesto *syn* L-**3b**.

Además, las TZ lograron restablecer la susceptibilidad al imipenem de *Enterobacteriaceae* provenientes de aislados clínicos, logrando una reducción de hasta 16 veces los valores de MIC.

En conclusión, las BTZ y TZ resultaron buenos inhibidores de todas las subclases de MBL. Esto no es fácil de lograr, debido principalmente a que las tres subclases presentan un sitio activo muy variable. En base a estos antecedentes, en el presente trabajo se plantea la modificación estructural de BTZ y TZ para mejorar aún más la potencia inhibitoria de los compuestos originales frente a todas las subclases de MBL.

1.6 Bibliografía

- (1) Hutchings, M.; Truman, A.; Wilkinson, B. Antibiotics: Past, Present and Future. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.
- (2) Shlaes, D. M.; Bradford, P. A. Antibiotics - From There to Where?: How the antibiotic miracle is threatened by resistance and a broken market and what we can do about it. *Pathogens & Immunity.* **2018**, *3* (1), 19. <https://doi.org/10.20411/pai.v3i1.231>.
- (3) Lima, L. M.; Silva, B. N. M. da; Barbosa, G.; Barreiro, E. J. β -Lactam Antibiotics: An Overview from a Medicinal Chemistry Perspective. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *208*, 112829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>.
- (4) Rodloff, A. C.; Goldstein, E. J. C.; Torres, A. Two Decades of Imipenem Therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58* (5), 916–929. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl354>.
- (5) Edwards, J. R. Meropenem: A Microbiological Overview. *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, *36*, 1–17. https://doi.org/10.1093/jac/36.suppl_A.1.
- (6) Thu, Z. M.; Sun, J.; Ji, J.; He, L.; Ji, J.; Iqbal, Z.; Yang, Z. Synthesis and antibacterial evaluation of new monobactams. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **2021**, *39*, 127878. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127878>.
- (7) Waxman, D. J.; Strominger, J. L. Penicillin-Binding Proteins and the Mechanism of Action of β -Lactam Antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *Vol. 52*, 825–869. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.004141>.
- (8) Bayles, K. W. The Bactericidal Action of Penicillin: New Clues to an Unsolved Mystery. *Trends Microbiol.* **2000**, *8* (6), 274–278. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01762-5](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01762-5).
- (9) Koch, A. L. Bacterial Wall as Target for Attack: Past, Present, and Future Research. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16* (4), 673–687. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.673-687.2003>.

- (10) Buynak, J. D. Cutting and Stitching: The Cross-Linking of Peptidoglycan in the Assembly of the Bacterial Cell Wall. *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2 (9), 602–605. <https://doi.org/10.1021/cb700182u>.
- (11) Palumbi, S. R. Humans as the World's Greatest Evolutionary Force. *Science*. **2001**, 293 (5536), 1786–1790. <https://doi.org/10.1126/science.293.5536.1786>.
- (12) Levin, S. The Crisis in Antibiotic Resistance. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **1993**, 2 (1), 53. <https://doi.org/10.1097/00019048-199301000-00013>.
- (13) Rice, L. B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.* **2008**, 197 (8), 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>.
- (14) González-Gutiérrez, M.; García-Fernández, C.; Alonso-Calleja, C.; Capita, R. Microbial Load and Antibiotic Resistance in Raw Beef Preparations from Northwest Spain. *Food Sci. Nutr.* **2020**, 8 (2), 777–785. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1319>.
- (15) Aslam, B.; Wang, W.; Arshad, M. I.; Khurshid, M.; Muzammil, S.; Rasool, M. H.; Nisar, M. A.; Alvi, R. F.; Aslam, M. A.; Qamar, M. U.; Salamat, M. K. F.; Baloch, Z. Antibiotic Resistance: A Rundown of a Global Crisis. *Infect. Drug Resist.* **2018**, 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>.
- (16) Bush, K. Proliferation and Significance of Clinically Relevant β -Lactamases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, 1277 (1), 84–90. <https://doi.org/10.1111/nyas.12023>.
- (17) Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E. C.; Colenso, C. K.; Hirvonen, V. H. A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* **2019**, 431 (18), 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>.
- (18) Bush, K. Characterization of Beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, 32, 259–263. <https://doi.org/10.1128/aac.33.3.259>.
- (19) Hall, B. G.; Barlow, M. Revised Ambler Classification of β -Lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, 55 (6), 1050–1051. <https://doi.org/10.1093/>

jac/dki130.

- (20) Philippon, A.; Arlet, G.; Lagrange, P. H. Origin and Impact of Plasmid-Mediated Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1994**, *13* (1), S17–S29. <https://doi.org/10.1007/BF02390681>.
- (21) Massova, I.; Mobashery, S. Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1128/aac.42.1.1>.
- (22) Palacios, A. R.; Rossi, M. A.; Mahler, G. S.; Vila, A. J. Metallo- β -lactamase Inhibitors Inspired on Snapshots from the Catalytic Mechanism. *Biomolecules.* **2020**, *10* (6). <https://doi.org/10.3390/biom10060854>.
- (23) Rapp, R. P.; Urban, C. Klebsiella Pneumoniae Carbapenemases in Enterobacteriaceae: History, Evolution, and Microbiology Concerns. *Pharmacotherapy.* **2012**, *32* (5), 399–407. <https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.2012.01035.x>.
- (24) Herzberg, O.; Moul, J. Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Crystal Structure of β -Lactamase from *S. aureus* PC1 at 2.5 Å Resolution. *Science.* **1987**, *236* (4802), 694–701. <https://doi.org/10.1126/science.3107125>.
- (25) Bois, S. K. D.; Marriott, M. S.; Amyes, S. G. B. TEM- and SHV-Derived Extended-Spectrum β -Lactamases: Relationship between Selection, Structure and Function. *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, *35* (1), 7–22. <https://doi.org/10.1093/jac/35.1.7>.
- (26) Chaves, J.; Ladona, M. G.; Segura, C.; Coira, A.; Reig, R.; Ampurdanés, C. SHV-1 β -Lactamase Is Mainly a Chromosomally Encoded Species-Specific Enzyme in *K. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45* (10), 2856–2861. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2856-2861.2001>.
- (27) Bauernfeind, A.; Schweighart, S.; Grimm, H. A New Plasmidic Cefotaximase in a Clinical Isolate of *E. coli*. *Infection.* **1990**, *18* (5), 294–298. <https://doi.org/10.1007/BF01647010>.
- (28) Palzkill, T. Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-

- Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -Lactamases. *Front. Mol. Biosci.* **2018**, 5 (FEB), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00016>.
- (29) Jacoby, G. A. AmpC β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, 22 (1), 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>.
- (30) Phillippon, A. M.; Paul, G. C.; Jacoby, G. A. Properties of PSE-2 β -Lactamase and Genetic Basis for Its Production in *P. aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, 24 (3), 362–369. <https://doi.org/10.1128/aac.24.3.362>.
- (31) Poirel, L.; Nordmann, P. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter Baumannii*: Mechanisms and Epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**, 12 (9), 826–836. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x>.
- (32) Poirel, L.; Potron, A.; Nordmann, P. OXA-48-like Carbapenemases: The Phantom Menace. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, 67 (7), 1597–1606. <https://doi.org/10.1093/jac/dks121>.
- (33) Galleni, M.; Lamotte-brasseur, J.; Rossolini, G. M. Standard Numbering Scheme for Class B β -Lactamases. **2001**, 45 (3), 660–663. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.660>.
- (34) Bebrone, C. Metallo- β -Lactamases (Classification, Activity, Genetic Organization, Structure, Zinc Coordination) and Their Superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, 74 (12), 1686–1701. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.05.021>.
- (35) Pal, A.; Tripathi, A. An in Silico Approach for Understanding the Molecular Evolution of Clinically Important Metallo-Beta-Lactamases. *Infect. Genet. Evol.* **2013**, 20 (August), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.028>.
- (36) 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 (28), 11362–11365. <https://doi.org/10.1021/ja303579d>.

- (37) Yamaguchi, Y.; Jin, W.; Matsunaga, K.; Ikemizu, S.; Yamagata, Y.; Wachino, J. I.; Shibata, N.; Arakawa, Y.; Kurosaki, H. Crystallographic Investigation of the Inhibition Mode of a VIM-2 Metallo- β -Lactamase from *P. aeruginosa* by a Mercaptocarboxylate Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (26), 6647–6653. <https://doi.org/10.1021/jm701031n>.
- (38) Concha, N. O.; Janson, C. A.; Rowling, P.; Pearson, S.; Cheever, C. A.; Clarke, B. P.; Lewis, C.; Galleni, M.; Frère, J. M.; Payne, D. J.; Bateson, J. H.; Abdel-Meguid, S. S. Crystal Structure of the IMP-1 Metallo- β -Lactamase from *P. aeruginosa* and Its Complex with a Mercaptocarboxylate Inhibitor: Binding Determinants of a Potent, Broad-Spectrum Inhibitor. *Biochemistry* **2000**, *39* (15), 4288–4298. <https://doi.org/10.1021/bi992569m>.
- (39) Yang, Y.; Rasmussen, B. A.; Bush, K. Biochemical Characterization of the Metallo- β -Lactamase CcrA from *B. fragilis* TAL3636. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36* (5), 1155–1157. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.5.1155>.
- (40) Wang, Z.; Fast, W.; Valentine, A. M.; Benkovic, S. J. Metallo- β -Lactamase: Structure and Mechanism. **1999**, *3* (5), 614–622. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00017-4)
- (41) Bahr, G.; González, L. J.; Vila, A. J. Metallo- β -Lactamases and a Tug-of-War for the Available Zinc at the Host–Pathogen Interface. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2022**, *66*, 102103. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.102103>.
- (42) Garau, G.; Bebrone, C.; Anne, C.; Galleni, M.; Frère, J. M.; Dideberg, O. A Metallo- β -Lactamase Enzyme in Action: Crystal Structures of the Monozinc Carbapenemase CphA and Its Complex with Biapenem. *J. Mol. Biol.* **2005**, *345* (4), 785–795. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.070>.
- (43) Xu, D.; Xie, D.; Guo, H. Catalytic Mechanism of Class B2 Metallo- β -Lactamase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (13), 8740–8747. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512517200>.
- (44) Saavedra, M. J.; Peixe, L.; Sousa, J. C.; Henriques, I.; Alves, A.; Correia, A. Sfh-I, a Subclass B2 Metallo- β -Lactamase from a *Serratia Fonticola*

- Environmental Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47 (7), 2330–2333. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2330-2333.2003>.
- (45) Massidda, O.; Rossolini, G. M.; Satta, G. The *Aeromonas Hydrophila* CphA Gene: Molecular Heterogeneity among Class B Metallo- β -Lactamases. *J. Bacteriol.* **1991**, 173 (15), 4611–4617. <https://doi.org/10.1128/jb.173.15.4611-4617.1991>.
- (46) Silverio, M. P.; Kraychete, G. B.; Rosado, A. S.; Bonelli, R. R. *Pseudomonas fluorescens* Complex and Its Intrinsic, Adaptive, and Acquired Antimicrobial Resistance Mechanisms in Pristine and Human-Impacted Sites. *Antibiotics*. **2022**, 11 (8), 985. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11080985>
- (47) Avison, M. B.; Higgins, C. S.; Von Heldreich, C. J.; Bennett, P. M.; Walsh, T. R. Plasmid Location and Molecular Heterogeneity of the L1 and L2 β -Lactamase Genes of *Stenotrophomonas Maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45 (2), 413–419. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.2.413-419.2001>.
- (48) Morán-Barrio, J.; González, J. M.; Lisa, M. N.; Costello, A. L.; Dal Peraro, M.; Carloni, P.; Bennett, B.; Tierney, D. L.; Limansky, A. S.; Viale, A. M.; Vila, A. J. The Metallo- β -Lactamase GOB Is a Mono-Zn(II) Enzyme with a Novel Active Site. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (25), 18286–18293. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700467200>.
- (49) Thaller, M. C.; Borgianni, L.; Di Lallo, G.; Chong, Y.; Lee, K.; Dajcs, J.; Stroman, D.; Rossolini, G. M. Metallo- β -Lactamase Production by *Pseudomonas Otitidis*: A Species-Related Trait. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55 (1), 118–123. <https://doi.org/10.1128/AAC.01062-10>.
- (50) Wachino, J. I.; Yoshida, H.; Yamane, K.; Suzuki, S.; Matsui, M.; Yamagishi, T.; Tsutsui, A.; Konda, T.; Shibayama, K.; Arakawa, Y. SMB-1, a Novel Subclass B3 Metallo- β -Lactamase, Associated with ISCR1 and a Class 1 Integron, from a Carbapenem-Resistant *Serratia Marcescens* Clinical Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55 (11), 5143–5149. <https://doi.org/10.1128/AAC.05045-11>.

- (51) Rodríguez-Baño, J.; Navarro, M. D.; Retamar, P.; Picón, E.; Pascual, Á. β -Lactam/ β -Lactam Inhibitor Combinations for the Treatment of Bacteremia Due to Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *E. coli*: A Post Hoc Analysis of Prospective Cohorts. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54* (2), 167–174. <https://doi.org/10.1093/cid/cir790>.
- (52) Reading, C.; Cole, M. Clavulanic Acid: A Beta Lactamase Inhibiting Beta Lactam from *S. clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11* (5), 852–857. <https://doi.org/10.1128/AAC.11.5.852>.
- (53) Betrosian, A. P.; Douzinas, E. E. Ampicillin-Sulbactam: An Update on the Use of Parenteral and Oral Forms in Bacterial Infections. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2009**, *5* (9), 1099–1112. <https://doi.org/10.1517/17425250903145251>.
- (54) English, A. R.; Retsema, J. A.; Girard, A. E.; Lynch, J. E.; Barth, W. E. CP-45,899, a Beta-Lactamase Inhibitor That Extends the Antibacterial Spectrum of Beta-Lactams: Initial Bacteriological Characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1978**, *14* (3), 414–419. <https://doi.org/10.1128/AAC.14.3.414>.
- (55) Tsivkovski, R.; Lomovskayaa, O. Biochemical Activity of Vaborbactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64* (2), 1–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.01935-19>.
- (56) Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. New β -Lactamase Inhibitors in the Clinic. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2016**, *30* (2), 441–464. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.007>.
- (57) 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- β -Lactamases. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (23), 20659–20666. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212581200>.
- (58) Buynak, J. D.; Chen, H.; Vogeti, L.; Gadhachanda, V. R.; Buchanan, C. A.; Palzkill, T.; Shaw, R. W.; Spencer, J.; Walsh, T. R. Penicillin-Derived Inhibitors That Simultaneously Target Both Metallo- and Serine- β -Lactamases. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (5), 1299–1304.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.12.037>.

- (59) 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- β -Lactamase Antibiotic Resistance. *Nature*. **2014**, 510 (7506), 503–506. <https://doi.org/10.1038/nature13445>.
- (60) Ganta, S. R.; Perumal, S.; Pagadala, S. R. R.; Samuelsen, Ø.; Spencer, J.; Pratt, R. F.; Buynak, J. D. Approaches to the Simultaneous Inactivation of Metallo- and Serine- β -Lactamases. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, 19 (6), 1618–1622. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.018>.
- (61) Skagseth, S.; Akhter, S.; Paulsen, M. H.; Muhammad, Z.; Lauksund, S.; Samuelsen, Ø.; Leiros, H. K. S.; Bayer, A. Metallo- β -Lactamase Inhibitors by Bioisosteric Replacement: Preparation, Activity and Binding. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 135, 159–173. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.035>.
- (62) Liu, B.; Trout, R. E. L.; Chu, G. H.; McGarry, D.; Jackson, R. W.; Hamrick, J. C.; Daigle, D. M.; Cusick, S. M.; Pozzi, C.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Mangani, S.; Docquier, J. D.; Weiss, W. J.; Pevear, D. C.; Xerri, L.; Burns, C. J. Discovery of Taniborbactam (VNRX-5133): A Broad-Spectrum Serine- And Metallo- β -Lactamase Inhibitor for Carbapenem-Resistant Bacterial Infections. *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (6), 2789–2801. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01518>.
- (63) Johnson, J. W.; Gretes, M.; Goodfellow, V. J.; Marrone, L.; Heynen, M. L.; Strynadka, N. C. J.; Dmitrienko, G. I. Cyclobutanone Analogues of β -Lactams Revisited: Insights into Conformational Requirements for Inhibition of Serine- and Metallo- β -Lactamases. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (8), 2558–2560. <https://doi.org/10.1021/ja9086374>.
- (64) Chiou, J.; Wan, S.; Chan, K. F.; So, P. K.; He, D.; Chan, E. W. C.; Chan, T. H.; Wong, K. Y.; Tao, J.; Chen, S. Ebselen as a Potent Covalent Inhibitor of New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM-1). *Chem. Commun.* **2015**, 51 (46), 9543–9546. <https://doi.org/10.1039/c5cc02594j>.

- (65) Osano, E.; Arakawa, Y.; Wacharotayankun, R.; Ohta, M.; Horii, T.; Ito, H.; Yoshimura, F.; Kato, N. Molecular Characterization of an Enterobacterial Metallo β -Lactamase Found in a Clinical Isolate of *Serratia Marcescens* That Shows Imipenem Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38 (1), 71–78. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.1.71>.
- (66) Schramm, V. L. Enzymatic Transition States and Drug Design. *Chem. Rev.* **2018**, 118 (22), 11194–11258. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00369>.
- (67) Chen, C. C. H.; Rahil, J.; Pratt, R. F.; Herzberg, O. Structure of a Phosphonate-Inhibited β -Lactamase: An Analog of the Tetrahedral Transition State/Intermediate of β -Lactam Hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **1993**, 1 (5), 165–178. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1571>.
- (68) Lassaux, P.; Hamel, M.; Gulea, M.; Delbrück, H.; Mercuri, P. S.; Horsfall, L.; Dehareng, D.; Kupper, M.; Frère, J. M.; Hoffmann, K.; Galleni, M.; Bebrone, C. Mercaptophosphonate Compounds as Broad-Spectrum Inhibitors of the Metallo- β -Lactamases. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (13), 4862–4876. <https://doi.org/10.1021/jm100213c>.
- (69) Veeraraghavan, B.; Bakthavatchalam, Y. D.; Sahni, R. D. Oral Antibiotics in Clinical Development for Community-Acquired Urinary Tract Infections. *Infect. Dis. Ther.* **2021**, 10 (4), 1815–1835. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00509-4>.
- (70) Nieuwlaat, R.; Mbuagbaw, L.; Mertz, D.; Burrows, L. L.; Bowdish, D. M. E.; Moja, L.; Wright, G. D.; Schünemann, H. J. Coronavirus Disease 2019 and Antimicrobial Resistance: Parallel and Interacting Health Emergencies. *Clin. Infect. Dis.* **2021**, 72 (9), 1657–1659. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa773>.
- (71) 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. *ACS Infect. Dis.* **2016**, 1 (11), 544–554. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00046>.

- (72) 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.* **2014**, *18* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11030-013-9485-3>.
- (73) Mojica, M. F.; Mahler, S. G.; Bethel, C. R.; Taracila, M. A.; Kosmopoulou, M.; Papp-Wallace, K. M.; Llarull, L. I.; Wilson, B. M.; Marshall, S. H.; Wallace, C. J.; Villegas, M. V.; Harris, M. E.; Vila, A. J.; Spencer, J.; Bonomo, R. A. Exploring the Role of Residue 228 in Substrate and Inhibitor Recognition by VIM Metallo- β -Lactamases. *Biochemistry.* **2015**, *54* (20), 3183–3196. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00106>.
- (74) Hinchliffe, P.; González, M. M.; Mojica, M. F.; González, J. M.; Castillo, V.; Saiz, C.; Kosmopoulou, M.; Tooke, C. L.; Llarull, L. I.; Mahler, G.; Bonomo, R. A.; Vila, A. J.; Spencer, J. Cross-Class Metallo- β -Lactamase Inhibition by Bisthiazolidines Reveals Multiple Binding Modes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (26), E3745–E3754. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601368113>.
- (75) Saiz, C.; Villamil, V.; González, M. M.; Rossi, M. A.; Martínez, L.; Suescun, L.; Vila, A. J.; Mahler, G. Enantioselective Synthesis of New Oxazolidinylthiazolidines as Enzyme Inhibitors. *Tetrahedron Asymmetry.* **2017**, *28* (1), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.11.002>.
- (76) Rossi, M. A.; Martinez, V.; Hinchliffe, P.; Mojica, M. F.; Castillo, V.; Moreno, D. M.; Smith, R.; Spellberg, B.; Drusano, G. L.; Banchio, C.; Bonomo, R. A.; Spencer, J.; Vila, A. J.; Mahler, G. 2-Mercaptomethyl-Thiazolidines Use Conserved Aromatic-S Interactions to Achieve Broad-Range Inhibition of Metallo- β -Lactamases. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (8), 2898–2908. <https://doi.org/10.1039/d0sc05172a>.
- (77) Hinchliffe, P.; Moreno, D. M.; Rossi, M. A.; Mojica, M. F.; Martinez, V.; Villamil, V.; Spellberg, B.; Drusano, G. L.; Banchio, C.; Mahler, G.; Bonomo, R. A.; Vila, A. J.; Spencer, J. 2-Mercaptomethyl Thiazolidines (MMTZs) Inhibit All Metallo- β -Lactamase Classes by Maintaining a Conserved Binding Mode. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7* (9), 2697–2706. <https://doi.org/10.1021/acinf.1c00000>.

1021/acsinfecdis.1c00194.

- (78) Baldwin, J. E.; Lusch, M. J. Rules for ring closure: application to intramolecular aldol condensations in polyketonic substrates. *Tetrahedron*. **1982**, 38 (19), 2939-2947. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(82\)85023-0](https://doi.org/10.1016/0040-4020(82)85023-0).
- (79) 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. <https://doi.org/10.1021/ol901104a>.
- (80) 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. *ACS Infect. Dis.* **2016**, 1 (11), 544–554. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00046>.

CAPÍTULO 2

Objetivos

2.1 Objetivo General

El objetivo general de esta tesis es diseñar y sintetizar nuevos heterociclos con mejorada actividad frente a β -lactamasas y mayor estabilidad, basados en inhibidores del tipo mercaptometil bistiazolidinas BTZ **1** y tiazolidinas TZ **3** previamente caracterizados por el grupo como inhibidores de todas las subclases de MBL.

2.2 Objetivos Específicos

Para lograr el objetivo general, se plantean los objetivos específicos descritos a continuación, los cuales serán desarrollados a lo largo de los diferentes capítulos de esta tesis:

2.2.1 Diseñar y sintetizar una serie de prodrogas derivadas de BTZ 1 y TZ 3

Para alcanzar este objetivo específico se pretenden diseñar y preparar nuevas prodrogas de BTZ **1** y TZ **3**, con los grupos carboxilato y tiol protegidos adecuadamente. Luego, se propone realizar diferentes experimentos para predecir si las prodrogas preparadas podrían exhibir mejores propiedades ADME y una mayor estabilidad en medios biológicos respecto a las drogas originales.

Por un lado, se plantea realizar cálculos teóricos de las propiedades ADME utilizando un software adecuado. Además, se propone llevar a cabo estudios de estabilidad en buffer acuosos simulando el perfil de pH del TGI y en plasma, y por último evaluar actividad frente a organismos resistente que expresan MBL.

2.2.2 Diseñar y sintetizar una serie de nuevos derivados ésteres y amidas a partir del ácido carboxílico de la BTZ 1a

Para alcanzar este objetivo específico se pretende diseñar los nuevos análogos en base a estudios *in silico*, con la hipótesis de que la incorporación de grupos hidrofóbicos pueda aumentar las interacciones con las MBL y que la presencia de aminas primarias pueda favorecer la penetración a través de la pared bacteriana. Luego, se propone explorar metodologías sintéticas que nos

permitan preparar dichos derivados, y realizar su caracterización estructural espectroscópica.

Por último, se pretende realizar la evaluación biológica de los análogos preparados frente a MBL pertenecientes a las tres subclases de MBL y su evaluación contra bacterias resistentes expresando MBL.

2.2.3 Diseñar y sintetizar una serie de benzobisheterociclos (BBH) análogos a BTZ 1

Para alcanzar este objetivo específico se pretende diseñar los nuevos BBH conteniendo un anillo aromático fusionado a la bistiazolidina. Para ello, se utilizarán herramientas de química computacional. Luego, se plantea explorar diferentes metodologías sintéticas para la preparación de los BBH propuestos, y su caracterización estructural espectroscópica.

Una vez preparados los compuestos, se propone realizar su evaluación biológica frente a MBL pertenecientes a las tres subclases de MBL y su evaluación contra bacterias resistentes expresando MBL.

Por último, se pretende seleccionar los compuestos más prometedores y continuar su caracterización mediante estudios de estabilidad en plasma y de citotoxicidad en células mamíferas.

2.2.4 Explorar diferentes enfoques químicos y biocatalíticos para obtener BBH enantioméricamente puros

Para alcanzar este objetivo específico se propone realizar una resolución de las mezclas racémicas de BBH, ya sea mediante la derivatización para formar diastereómeros o utilizando herramientas biocatalíticas, tales como enzimas Monoamino Oxidasas (MAO).

Por último, se plantea realizar la evaluación biológica de los enantiómeros puros aislados frente a MBL.

2.2.5 Diseñar y sintetizar una serie de análogos a BTZ 1 y TZ 3 en donde el tiol es reemplazado por otros grupos capaces de coordinar con zinc

Para alcanzar este objetivo específico se pretende diseñar los nuevos análogos en base a la hipótesis de que el tiol puede ser reemplazado por otros grupos químicamente más estables que mantengan la actividad frente a MBL. Para tales fines, se propone desarrollar una metodología sintética que nos permita preparar dichos derivados.

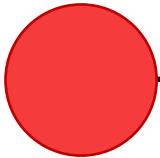
Por último, se plantea realizar la evaluación biológica de los análogos preparados frente a MBL pertenecientes a las tres subclases y su evaluación contra bacterias resistentes expresando MBL.

2.2.6 Diseñar y sintetizar una serie de derivados de BTZ y TZ conteniendo ácidos o ésteres borónicos como potenciales inhibidores tanto de MBL como de SBL

Para alcanzar este objetivo específico se pretende diseñar los nuevos análogos, en donde se explora el reemplazo del tiol y del ácido carboxílico de las BTZ y TZ por un ácido o éster borónico.

Luego, se propone desarrollar una metodología sintética que nos permita preparar los nuevos derivados y realizar su caracterización estructural espectroscópica.

Por último, se plantea realizar la evaluación biológica de los análogos preparados frente a SBL y MBL pertenecientes a las tres subclases y su evaluación contra bacterias resistentes.



CAPÍTULO 3

Síntesis de prodrogas de
bistiazolidinas y tiazolidinas

3.1 Introducción

3.1.1 Desarrollo de nuevos antimicrobianos utilizando estrategias basadas en prodrogas

El diseño de fármacos antibacterianos es muy desafiante. Parte de la dificultad asociada con el desarrollo de nuevos agentes radica en que, para ejercer su acción, deben presentar una estabilidad adecuada y alta permeabilidad a través de la pared celular bacteriana que les permita acumularse en el sitio de infección.¹

Una estrategia que ha ganado importancia en los últimos años para superar estos desafíos es la síntesis de prodrogas, derivados bioreversibles de fármacos que experimentan una transformación enzimática y/o química *in vivo* para liberar el fármaco original activo.² Este enfoque resulta muchas veces más sencillo que la optimización del compuesto líder para llegar a un perfil PK/PD adecuado. En la última década, la FDA ha aprobado 30 profármacos, siendo el 10% de ellos para aplicaciones antibacterianas.^{3,4}

Dependiendo de qué variable PK/PD se desee abordar, puede ser deseable aumentar la hidrofilia o la lipofilia para mejorar la solubilidad o la permeabilidad pasiva a través de membranas, respectivamente.

Para mejorar la solubilidad en agua del fármaco se puede unir covalentemente un componente polar o un grupo ionizable. Entre los grupos polares más utilizados, se encuentran los glicoles, polietilenglicol o azúcares.⁵ Como ejemplo, se describen una serie de prodrogas de ciprofloxacina más solubles en agua que el fármaco original, en donde el ácido carboxílico se encuentra esterificado con mono, di y trietilenglicol, hidrolizables en medios biológicos, Figura 3.1.⁶ También se desarrollaron prodrogas de la moxifloxacina, conteniendo éteres de celulosa que llevaron a una mejora de la biodisponibilidad y eficacia del antibiótico.⁷

Por otro lado, los grupos funcionales ionizables más empleados para mejorar la solubilidad en agua de antimicrobianos son los grupos fosfato. La ceftarolina fosamil, conteniendo un grupo N-fosfato, es un ejemplo de profármaco más soluble que la droga original utilizado en clínica para el

tratamiento de infecciones por *S. aureus* resistente a la metilicina (MRSA), Figura 3.1.⁸ Las aminas primarias también se han empleado con estos fines, que además han mostrado una mejora en la permeabilidad de los antimicrobianos a través de la pared celular, especialmente en bacterias Gram(-).⁹

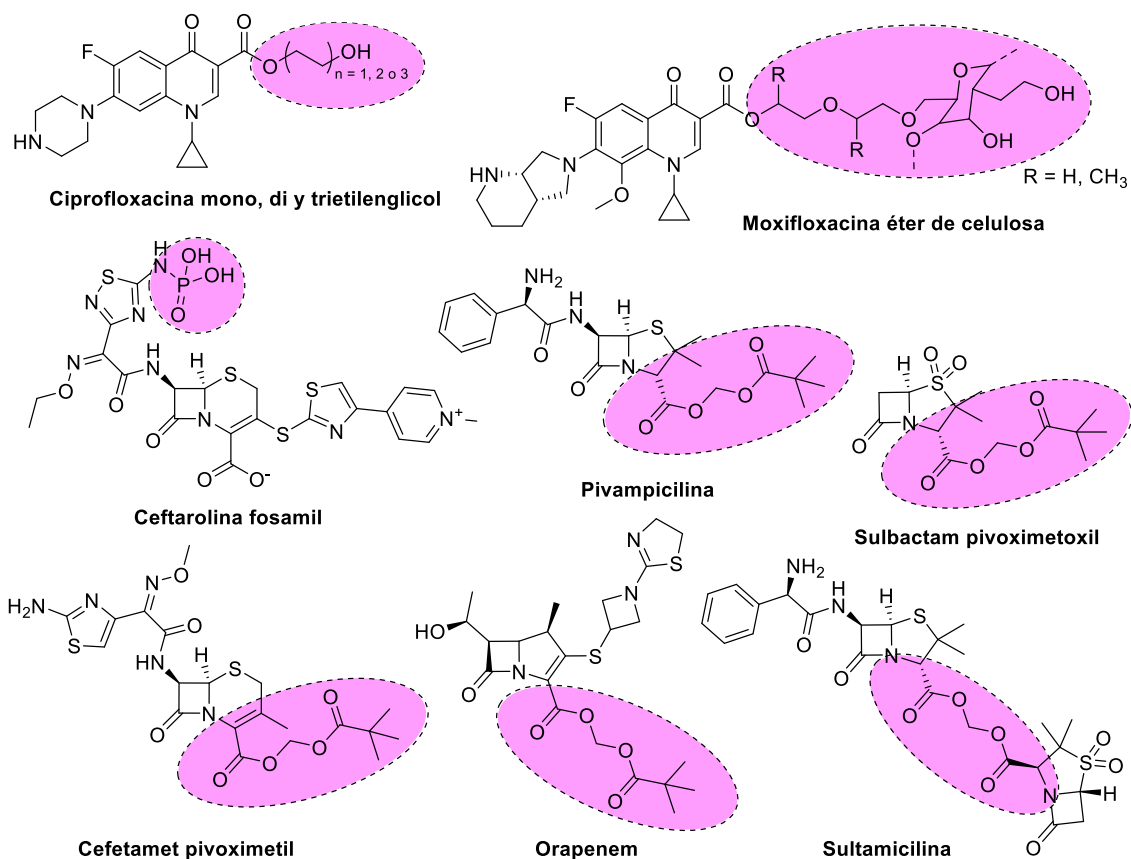


Figura 3.1: Ejemplos de estructura de prodrogas con aplicaciones antibacterianas descritas en literatura. Las prodrogas ceftarolina fosamil, pivampicilina, sulbactam pivoximetoxil, cefetamet pivoximetil, orapenem y sultamicilina se utilizan en clínica.

Por el contrario, cuando se desea aumentar la lipofilia de un fármaco que contiene grupos funcionales polares y/o ionizados, como los grupos carboxilato o aminas, se pueden agregar grupos hidrofóbicos para enmascarar la carga. Un enfoque ampliamente utilizado ha sido la síntesis de ésteres o amidas que pueden ser hidrolizados por esterasas¹⁰ o peptidasas,¹¹ respectivamente, tanto plasmáticas como bacterianas. En particular, el uso de ésteres como prodrogas ha sido fundamental para superar la biodisponibilidad oral limitada de algunos ABL, debida a una baja absorción gastrointestinal.¹²

Por ejemplo, se han reportado varios pivoximetoxil ésteres, entre los cuales destaca la pivampicilina¹³ y cefetamet pivoxil,¹⁴ pivoximetoxil ésteres de la ampicilina y cefetamet, respectivamente, usadas en clínica desde hace más de 30 años, Figura 3.1. Con este enfoque se logró mejorar notoriamente la lipofilia y la biodisponibilidad oral respecto al fármaco original. Una vez hidrolizado el profármaco, el pivaloiloxi ester se elimina como pivalato conjugado con carnitina.¹⁵ Un ejemplo más reciente es el Orapenem®, pivoximetoxil éster del tebipenem, primer carbapenemo desarrollado para uso oral. Este profármaco fue aprobado en Japón en 2009 para su uso pediátrico en el tratamiento de otitis, sinusitis y neumonía.¹⁶

El desarrollo de ésteres como prodrogas se ha extendido a inhibidores de SBL como el sulbactam. Para estos fines se desarrolló el sulbactam pivoximetoxil éster, que logró incrementar notoriamente la absorción gastrointestinal cuando se administra por vía oral, Figura 3.1.¹⁷

Otra estrategia que se ha utilizado es el uso de “co-drogas”, por ejemplo la sultamicilina, conteniendo ampicilina y sulbactam unidos covalentemente por un pivaloiloxi éster, Figura 3.1.¹⁸ Esto permite la administración conjunta del ABL y un inhibidor de SBL, protegiendo simultáneamente los grupos carboxilato causantes de la baja absorción gastrointestinal observada cuando se administran por separado. Esta estrategia también disminuyó los efectos secundarios comunes de los medicamentos dosificados por separado, como la diarrea y la disentería.

3.1.2 Nuevas prodrogas de bistiazolidinas BTZ y tiazolidinas TZ

Se pretende llevar a cabo ensayos *in vivo* con las BTZ y TZ previamente preparadas, en un régimen de administración oral en un modelo de ratón.

Tanto las BTZ como las TZ tienen como característica en común la presencia de un ácido carboxílico y un grupo tiol. El tiol es propenso a la oxidación en medios biológicos, dando lugar a derivados del tipo disulfuros que carecen de actividad inhibitoria contra MBL. Además, en algunos medicamentos la presencia del grupo tiol se ha asociado con “rush” cutánea, un ejemplo es el Captopril.¹⁹ Por otro lado, el grupo carboxilato podría llevar a una absorción

gastrointestinal errática.¹⁰ Para evitar estos problemas, se propone explorar la preparación de prodrogas para mejorar las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y farmacocinéticas de estos compuestos.

3.2 Objetivo Específico

3.2.1 Diseñar y sintetizar prodrogas derivadas de BTZ **1** y TZ **3**

Para alcanzar este objetivo específico se pretenden diseñar y preparar nuevas prodrogas de BTZ **1** y TZ **3**, con los grupos carboxilato y tiol protegidos adecuadamente. Luego, se propone realizar diferentes experimentos para predecir si las prodrogas preparadas podrían exhibir mejores propiedades ADME y una mayor estabilidad en medios biológicos respecto a las drogas originales.

Por un lado, se plantea realizar cálculos teóricos de las propiedades ADME utilizando un software adecuado. Además, se propone llevar a cabo estudios de estabilidad en buffer acuosos simulando el perfil de pH del TGI y en plasma, y por último evaluar la actividad frente a organismos resistentes que expresan MBL.

3.3 Resultados y discusión

En el presente Capítulo se muestran los resultados más relevantes obtenidos en la síntesis de nuevas prodrogas de BTZ y TZ.

Las principales actividades realizadas en este marco se relacionan con los objetivos específicos y se desarrollan a continuación.

3.3.1 Diseño y síntesis de prodrogas de bistiazolidinas y tiazolidinas

Se diseñaron los compuestos **7** y **8** como posibles prodrogas de BTZ L-**1a-b** y de TZ L-**3a-b**, respectivamente, en las que el grupo ácido carboxílico se encuentra protegido como éster de pivoximetoxilo y el tiol como tioacetilo o tiopivaloilo, Figura 3.2.

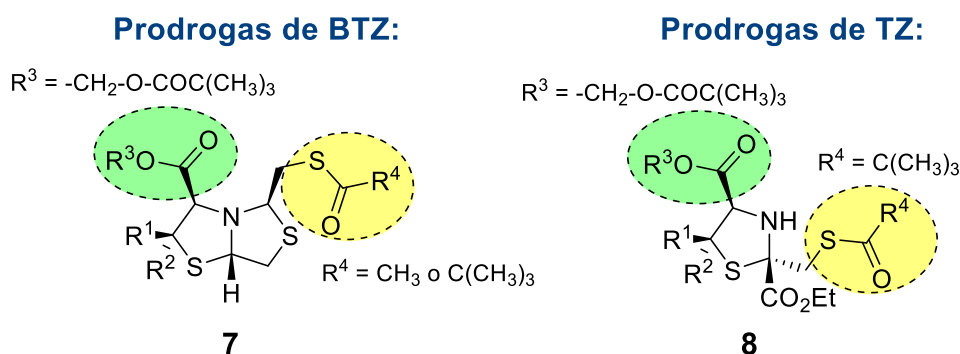
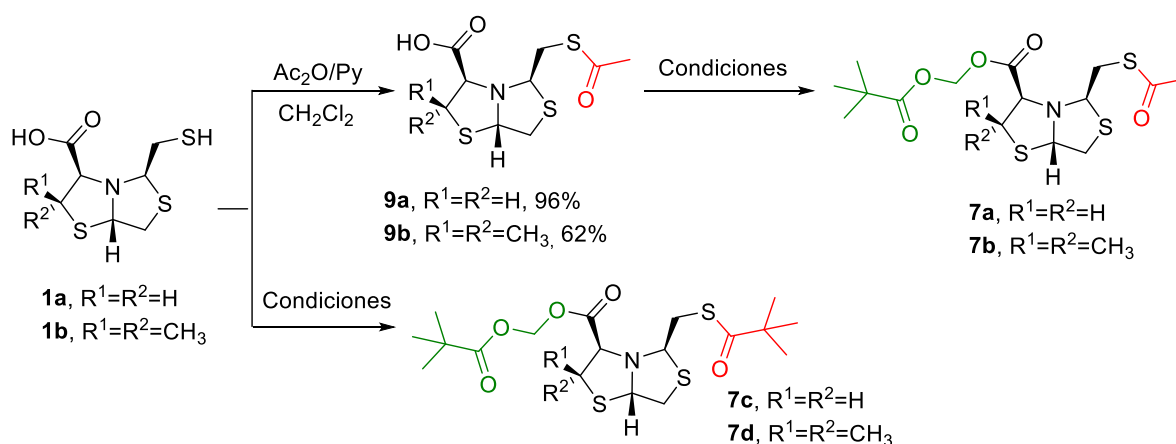


Figura 3.2: Diseño de prodrogas de BTZ (**7**) y TZ (**8**) propuestas.

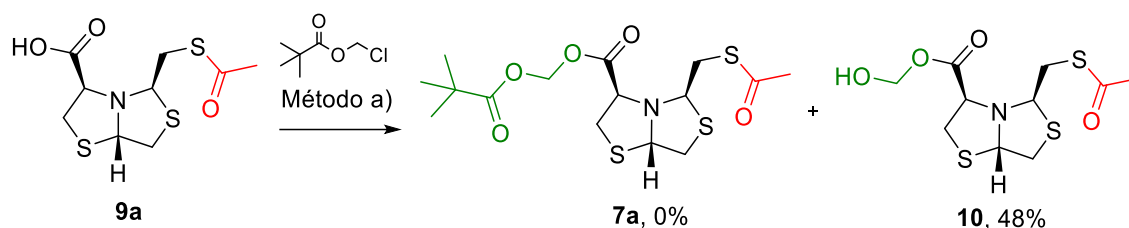
Síntesis de prodrogas de bistiazolidinas BTZ

Se diseñaron las prodrogas de BTZ **7a-d**, Esquema 3.1. En los derivados **7a-b** el tiol está protegido como acetil-tioéster y en los compuestos **7c-d** el tiol está esterificado con ácido pivalico. Las estrategias sintéticas generales para su preparación se muestran en el Esquema 3.1.



Esquema 3.1: Síntesis de las prodrogas **7a-d**.

Para la síntesis de las prodrogas **7a-b**, en primer lugar se prepararon las BTZ S-Acetiladas **9a-b** a partir de **L-1a** y **L-1b**, respectivamente, utilizando una mezcla Ac_2O/Py (1:1).²⁰ Los compuestos se obtuvieron en buenos rendimientos, 96 y 62% respectivamente. Luego, se ensayaron las condiciones para la síntesis del éster de pivaloxilo descritas en bibliografía, partiendo de **9a**, clorometil pivalato y TEA, sin solvente (método a).²¹ En dichas condiciones, no se obtuvo el producto deseado, sino que se aisló el hemiacetal **10** en un 48% de rendimiento, Esquema 3.2.



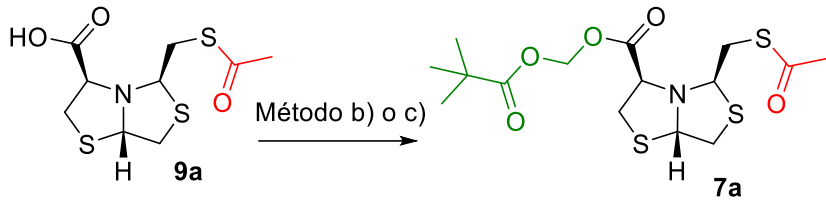
Esquema 3.2: Propuesta para la síntesis de **7a** utilizando condiciones reportadas en bibliografía; método a): clorometil pivalato, TEA, T. A., 24 h.

Con el fin de encontrar las condiciones para obtener el producto deseado, se realizó un screening de solventes a pequeña escala (5 mg) utilizando como modelo de estudio **9a**, y se exploraron dos rutas sintéticas adicionales: i) **9a** ácido libre, clorometil pivalato y TEA como base (método b), y ii) formando previamente la sal sódica del ácido carboxílico de **9a** utilizando NaOAc/AcOEt y luego agregando clorometil pivalato en ausencia de base (método c), ver Tabla 3.1.

La metodología de trabajo se basó en la miniaturización de reacciones, un enfoque desarrollado por High Throughput Experimentation (HTE) para encontrar el tiempo óptimo de reacción.^{22,23} La ventaja de la miniaturización de reacciones es que requiere pocos miligramos de reactivos (microescala) y los tiempos de manipulación son más cortos.

De esta manera, se llevó a cabo el screening utilizando diferentes solventes apróticos polares. Luego de 24 horas, se tomó una alícuota de cada reacción individual y se diluyó para su análisis por HPLC.²⁰ Los resultados se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Screening a pequeña escala de solventes para la síntesis de **7a** a partir de **9a**. Condiciones: Método b): clorometil pivalato, solvente, TEA, T. A., 24 h; Método c): i) NaOAc/AcOEt, ii) clorometil pivalato, solvente, T. A., 24 h.

		
Solvente	7a, R _{HPLC} (%)	
	Método b)	Método c)
DMSO	61	72
DMF	76	86
Acetona	2	4
Acetonitrilo	3	5
THF	4	5
NMP	58	64
1,4-Dioxano	3	3

Los mejores resultados para la obtención de **7a** a partir de **9a** se lograron utilizando el método c) en DMF como solvente (86% de rendimiento). El método b) también llevó a buenos resultados, aunque levemente menores (76%). También se obtuvieron buenos rendimientos en DMSO y en 1-metil-2-pirrolidona. Los solventes menos polares (acetona, acetonitrilo, THF y 1,4-dioxano) llevaron a los rendimientos más bajos (menores a 5%).

Una vez establecidas las mejores condiciones de reacción, se llevó a cabo el escalado utilizando el método b) y el método c) en DMF, Tabla 3.2.

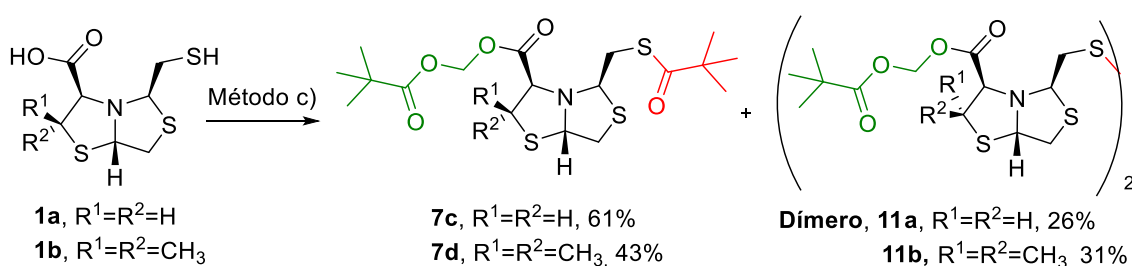
Tabla 3.2: Síntesis de las prodrogas **7a-d** utilizando: Método b): clorometil pivalato, DMF, TEA, T. A., 24 h; Método c): i) NaOAc/AcOEt, ii) clorometil pivalato, DMF, T. A., 24 h.

9a , R ¹ =R ² =H 9b , R ¹ =R ² =CH ₃	Método b) o c)	7a , R ¹ =R ² =H 7b , R ¹ =R ² =CH ₃
Rendimiento (%) ^a		
Producto	Método b	Método c
7a	53	65
7b	ND	59

^aRendimientos de los productos puros luego de purificación por columna cromatográfica.

El compuesto deseado **7a** se obtuvo en 53 y 65% de rendimiento utilizando el método b) y c), respectivamente, Tabla 3.2, validando el screening a pequeña escala. Según el análisis del crudo de reacción por ¹H RMN, no se obtuvo en estas condiciones el hemiacetal **10**. La prodroga **7b** se preparó de manera análoga partiendo de **9b**, utilizando el método c) en DMF, con un 59% de rendimiento, Tabla 3.2.

Por otro lado, las prodrogas **7c** y **7d**, se prepararon partiendo de L-**1a** y L-**1b**, respectivamente, utilizando el método c) en DMF, Esquema 3.3.



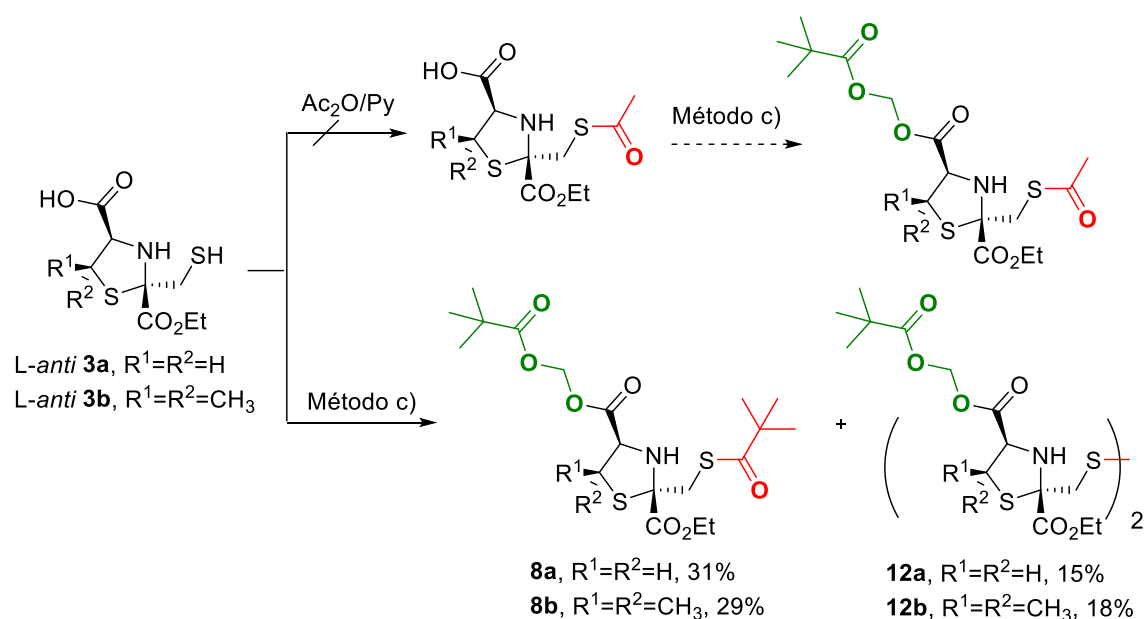
Esquema 3.3: Síntesis de las prodrogas **7c-d** utilizando método c): i) NaOAc/AcOEt, ii) clorometil pivalato, DMF, T. A., 24 h.

Los compuestos **7c-d** se obtuvieron con un 61 y 43% de rendimiento, respectivamente. Los bajos rendimientos obtenidos se deben a que parte del material de partida sufre reacciones de oxidación en estas condiciones,

formando las especies diméricas **11a** y **11b** en 26 y 31% de rendimiento, respectivamente, Esquema 3.3.

Síntesis de prodrogas de tiazolidinas

Se diseñaron las prodrogas de TZ **8a-b** con el grupo carboxilato protegido como pivaloxilo y el tiol protegido como pivaloilo. Las estrategias sintéticas para su preparación se muestran en el Esquema 3.4.



Esquema 3.4: Síntesis de las prodrogas de TZ **8a-b**. Método c: i) NaOAc/AcOEt, ii) clorometil pivalato, DMF, T. A., 24 h.

En primer lugar, se intentó S-acetilar las tiazolidinas, en forma análoga a la ruta utilizada para sintetizar **7a-b**. Sin embargo, la reacción llevó a una mezcla compleja de especies, Esquema 3.4. Esto podría deberse a la mayor reactividad de la amina secundaria de las TZ respecto a las terciarias de las BTZ. Por esa razón, se prepararon únicamente las prodrogas **8a** y **8b** partiendo de L-*anti* **3a** y L-*anti* **3b**, respectivamente, y clorometil pivalato, Esquema 3.4, en 31 y 29% de rendimiento, respectivamente. Se aislaron como subproductos de las reacciones las especies diméricas **12a** y **12b** en 15 y 18% de rendimiento, respectivamente, Esquema 3.4.

De esta manera se obtuvieron 4 prodrogas de BTZ (**7a-d**) y 2 prodrogas de TZ (**8a-b**), Figura 3.3.

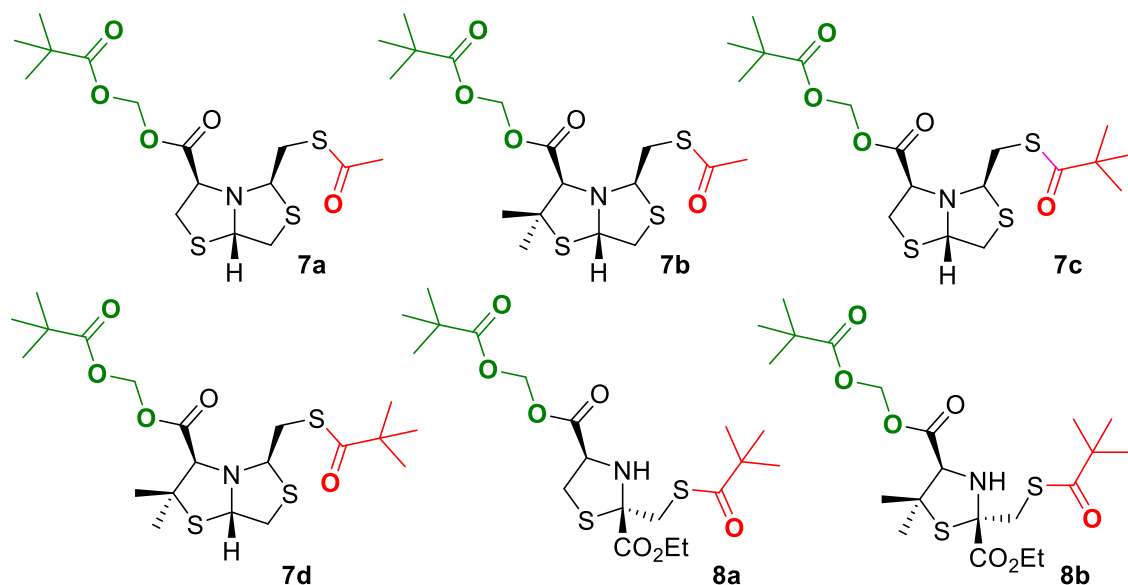


Figura 3.3: Estructura de las prodrogas preparadas 7a-d y 8a-b.

3.3.2 Ensayos preliminares para evaluar la utilidad de los compuestos sintetizados como posibles prodrogas

Con el objetivo de estudiar su utilidad como posibles prodrogas, nos planteamos las siguientes hipótesis iniciales:

i) Las prodrogas se mantienen intactas a lo largo del TGI, donde finalmente se absorben y pasan al torrente sanguíneo, Figura 3.4.

ii) Una vez en sangre, el éster pivaloxilo se hidroliza por acción de las carboxiesterasas sanguíneas para liberar el ácido carboxílico. En cuanto al tiol, se mantiene protegido en plasma para así evitar reacciones de oxidación, Figura 3.4.

iii) El inhibidor ingresa a la bacteria a través de porinas como tioéster, donde se hidroliza por esterasas bacterianas e inhibe las MBL, Figura 3.4.

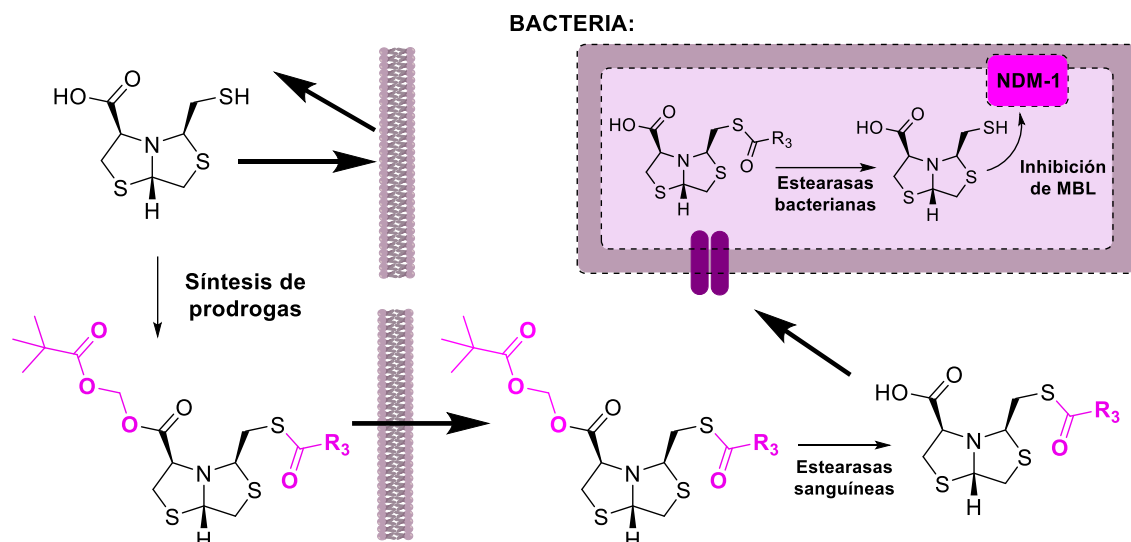


Figura 3.4: Estrategia basada en prodrogas aplicada a BTZ **1a**, propuesta de hidrólisis por esterasas sanguíneas o bacterianas.

Para corroborar las hipótesis y determinar si las prodrogas preparadas podrían exhibir un mejor comportamiento respecto a las drogas originales, se plantea realizar tres tipos de experimentos:

- i) predecir las propiedades ADME teóricas de las prodrogas y de las drogas originales mediante cálculos teóricos utilizando el software Molinspiration.²⁴
- ii) llevar a cabo estudios de estabilidad en buffer acuosos y en plasma humano.
- iii) realizar ensayos de concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) para evaluar si las prodrogas podrían ejercer su acción atravesando la pared celular bacteriana.

i) Cálculos teóricos de las propiedades ADME

Las reglas de Lipinski, o regla de los cinco, sirven como guía primaria para determinar si un compuesto tiene propiedades fisicoquímicas adecuadas para ser activo por vía oral.²⁵ En ellas se establecen los rangos óptimos de ciertas propiedades fisicoquímicas tales como: peso molecular ($PM < 500$ Da), lipofilia ($\log P < 5$), número de enlaces rotables ($NER < 10$), y número de aceptores ($NAEH < 10$) y dadores ($NDEH < 5$) de enlaces de hidrógeno.²⁶ En un intento por mejorar estas predicciones, se reportaron algunas variantes de las reglas de Lipinski, por ejemplo, el enfoque de Ghose²⁷ ($\log P > -0.4$ y < 5.6 lleva a mejores

predicciones) y el enfoque de Veber²⁸ (área de superficie polar topológica (TPSA < 140 Å²).

Para cada compuesto en estudio se puede calcular el valor teórico de estas propiedades utilizando un programa de cálculo adecuado.²⁹ En este trabajo se utilizó el software Molinspiration;²⁴ para calcular las propiedades fisicoquímicas que permitan predecir la adsorción, distribución, metabolización y excreción (ADME) teóricas tanto de las prodrogas **7a-d** y **8a-b** preparadas como de las drogas originales **1a-b** y **3a-b** y así predecir si el enfoque de prodrogas llevaría a compuestos con mejorada biodisponibilidad oral. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3: Cálculos teóricos de las propiedades ADME utilizando el software Molinspiration.³⁰

Compuesto	PM < 500 Da (Lipinski)	NDEH < 5 (Lipinski)	NAEH < 10 (Lipinski)	NER < 10 (Veber)	TPSA < 140 Å (Veber)	logP 0.4 - 5.6 (Lipinski / Ghose)
L-1a	237.4	1	3	2	41	-0.84
L-1b	265.4	1	3	2	41	-0.03
L-anti 3a	251.3	2	5	5	76	-1.14
L-anti 3b	279.4	2	5	5	76	-0.33
7a	393.5	0	6	9	73	3.25
7b	421.6	0	6	9	73	4.05
7c	435.6	0	6	10	73	4.57
7d	415.9	0	6	10	73	5.38
8a	449.6	1	8	13	108	4.28
8b	477.6	1	8	13	108	5.08

PM = peso molecular (< 500 Da), lipofilia (logP < 5), NER = número de enlaces rotables (< 10), NAEH = número de aceptores de enlaces de hidrógeno (< 10), NDEH = número de dadores de enlaces de hidrógeno (< 5) y TPSA = área de superficie polar topológica (< 140 Å²). Código de color: Verde, cumple; Rojo, no cumple.

Respecto al peso molecular, tanto las prodrogas como las drogas originales cumplen las reglas de Lipinski.

Tanto el TPSA como el logP son descriptores que están relacionados con la capacidad de un fármaco para atravesar las membranas celulares del tracto gastrointestinal. Estos parámetros son los más importantes y decisivos a la hora de predecir la biodisponibilidad oral de compuestos basado en las reglas de Lipinski.³¹ Los resultados muestran que las prodrogas **7a-d** y **8a-b** exhiben

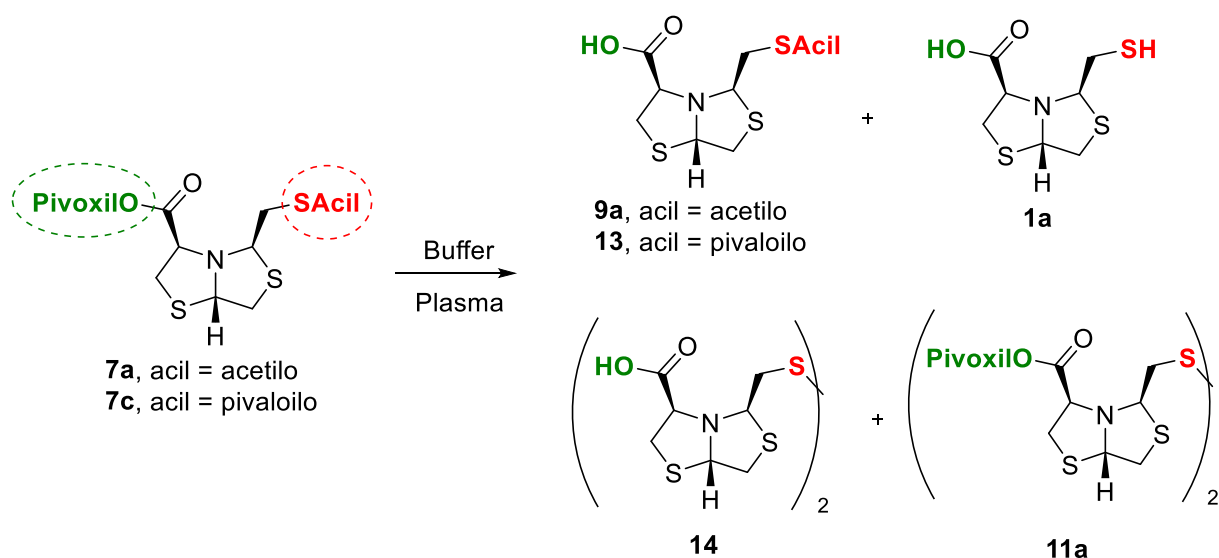
valores teóricos para TPSA y logP dentro de los rangos óptimos, ver Tabla 3.3. Las drogas originales **1a** y **3a** mostraron un valor de logP calculado fuera del rango óptimo (-0.84 y -1.14, respectivamente). Por lo tanto, según esta aproximación las prodrogas propuestas (**7a** y **7c**, y **8a**, respectivamente) podrían mejorar las propiedades de ADME respecto a la droga original.

Por último, algunas de las prodrogas excedieron el límite de número de enlaces rotables permitidos estipulado por Lipinski (**8a-b**). Sin embargo, existen prodrogas disponibles en el mercado que no cumplen con esta regla, por ejemplo, el Fosinopril (prodroga de Fosinoprilat) y Simvastatina (prodroga de Simvastatina ácido libre).³¹

En su conjunto, estos resultados de estudios teóricos indicarían que las prodrogas sintetizadas podrían tener buena biodisponibilidad cuando se administren por vía oral.

ii) Estudios de estabilidad en buffer acuosos y plasma

Para obtener información acerca de la estabilidad de estos compuestos, se estudió la degradación química y enzimática en buffer acuosos a pH 1.2, 4.5, 6.8 y 7.4, simulando el gradiente de pH a través del TGI, y en plasma. Para estos fines se seleccionaron como modelos de estudio las prodrogas S-Acetoilo **7a** y S-Pivaloilo **7c**. También se realizaron ensayos de degradación en plasma del compuesto líder BTZ **1a** para comparar la estabilidad respecto a las prodrogas sintetizadas. Los potenciales productos de degradación se muestran en el Esquema 3.5.



Esquema 3.5: Posibles productos de degradación de las prodrogas **7a** y **7c**.

Estudios de estabilidad en buffer acuosos de **7a** y **7c**

Se incubaron las prodrogas **7a** y **7c** en buffers acuosos pH 1.2, 4.5, 6.8 y 7.4 a 37 °C, y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (15, 30, 45, 60 y 120 min) para su análisis utilizando una técnica validada por HPLC.^{20,33} Cada condición se ensayó por triplicado. En la Tabla 3.4 y en las gráficas de la Figura 3.5 se representa el % remanente de la prodroga vs tiempo para el derivado S-Acetil **7a** y S-Pivaloil **7c** a los diferentes pH ensayados.

Tabla 3.4: Estudios de estabilidad de las prodrogas **7a** y **7c**: % remanente de prodroga a diferentes tiempos de incubación en buffer acuosos a pH: 1.2, 4.5, 6.8 y 7.4.

Tiempo (min)	% remanente de prodroga ^a							
	7a	7c	7a	7c	7a	7c	7a	7c
	pH 1.2		pH 4.5		pH 6.8		pH 7.4	
15	98	100	98	99	99	100	97	100
30	98	99	99	99	99	99	94	99
45	96	99	96	100	98	99	93	99
60	95	99	95	99	98	99	91	98
120	90	100	96	99	99	99	87	99

^aLos % remanentes de prodroga fueron calculados por HPLC.

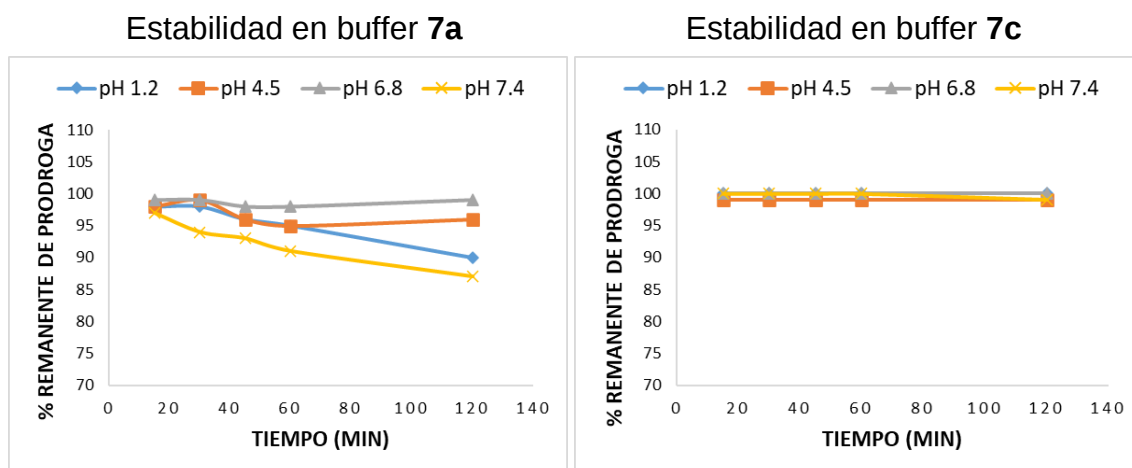
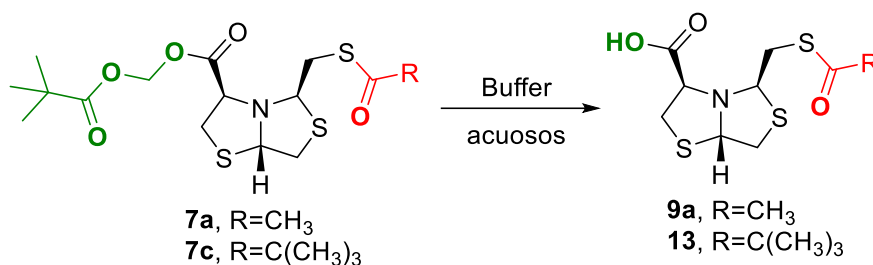


Figura 3.5: Estudios de estabilidad en buffer acuosos de las prodrogas **7a** y **7c**. Gráficos % remanente de prodroga vs tiempo en buffer acuosos pH: 1.2, 4.5, 6.8 y 7.4.

El análisis por HPLC de las mezclas de reacción reveló que, en buffer acuosos, la prodroga **7a** sufre una lenta hidrólisis a nivel del éster pivaloxilo para formar **9a**, en diferente extensión según el pH, Esquema 3.6 y cromatograma en la Figura 3.6A. Por el contrario, respecto a la prodroga **7c** no se identificó el producto de hidrólisis **13** ni tampoco otros productos de degradación, ver Esquema 3.6 y cromatograma en Figura 3.6B.



Esquema 3.6: Degradación química de **7a** y **7c** para dar **9a** y **13**, respectivamente, en buffer acuosos.

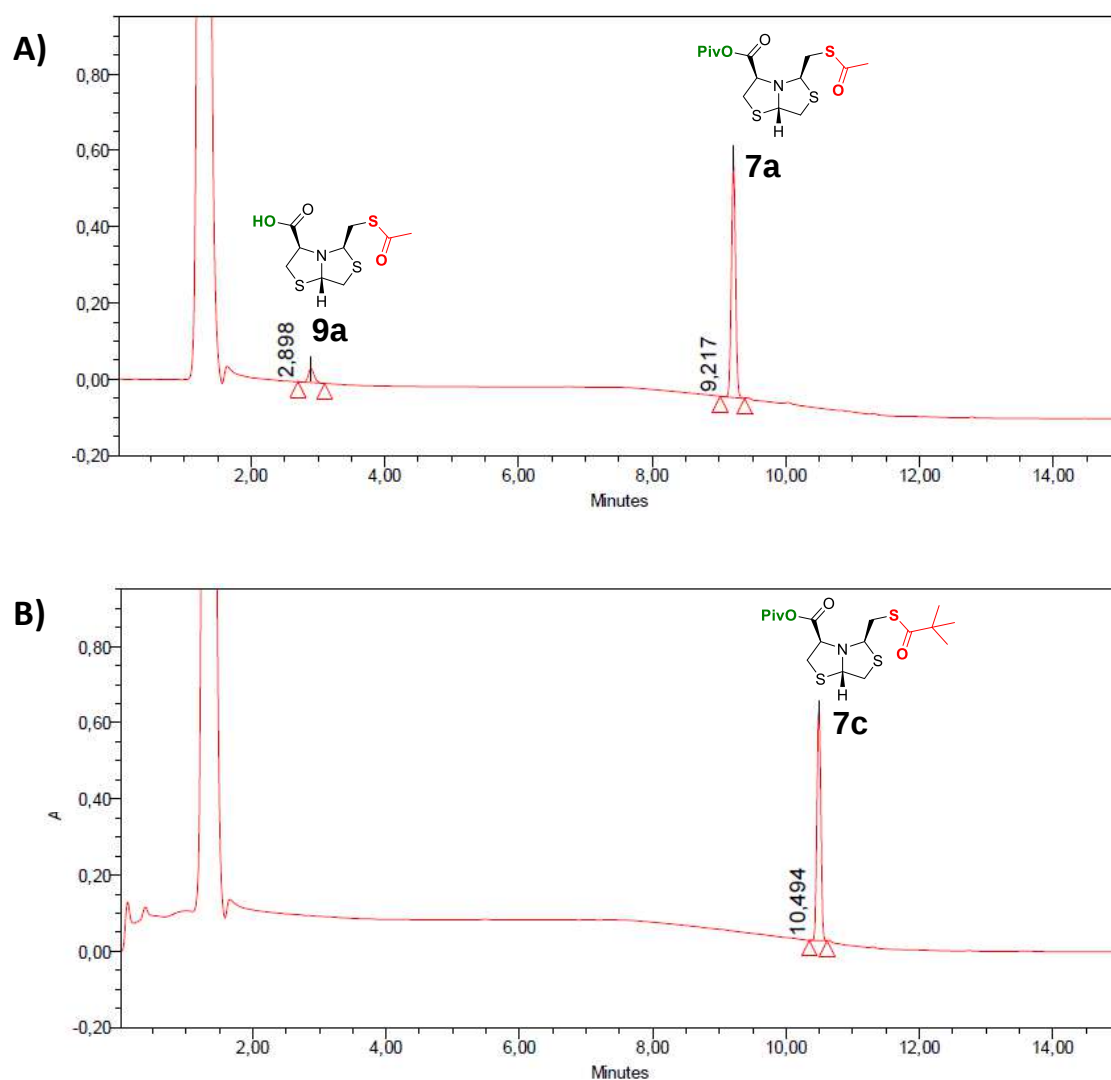


Figura 3.6: Cromatogramas luego de la incubación de A) **7a** y B) **7c** a pH 7.4, 120 min. Condiciones cromatográficas: columna fase reversa C18 (Kinetex NUCLEOSIL® C18, 150 mm × 4 mm, 5 µm); fase móvil A = TFA 0.003 M; fase móvil B = ACN; condiciones iniciales 70/30 (fase móvil A/fase móvil B) cambian en 2 min a 55/45, se mantienen durante 3.5 min y cambian en 0.1 min a 5/95, manteniéndose durante 2.4 min; flujo = 1.2 mL/min.

A pH 4.5 y 6.8 la hidrólisis fue despreciable para ambas prodrogas en un período de dos horas. A pH 1.2 y 7.4, en un período de dos horas la prodroga **7a** se hidrolizó un 10 y un 13%, respectivamente, mientras que para la prodroga **7c** la degradación fue despreciable (<2% en todos los tiempos). En ningún caso se detectó la droga original **1a** ni las especies diméricas **11a** o **14** (ver estructuras en Esquema 3.5), ni tampoco otros productos de degradación, lo que indicaría que el grupo tioéster es estable en las condiciones ensayadas.

Estudio de estabilidad en plasma de **7a** y **7c**

Se incubaron las prodrogas **7a** y **7c** en plasma a 37 °C y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (10, 20, 30, 45, 60 y 120 min). Luego, se analizaron los resultados obtenidos por HPLC. En la Tabla 3.5 y en las gráficas de la Figura 3.7 se representa el % remanente de la prodroga vs tiempo para el derivado S-Acetil **7a** y S-Pivaloil **7c** y el % de los productos de hidrólisis **9a** y **13**, respectivamente.

Tabla 3.5: Estudios de estabilidad en plasma de las prodrogas **7a** y **7c**: % remanente de prodrogas y sus productos de hidrólisis: **9a** y **13**, respectivamente a diferentes tiempos.

Tiempo	% remanente de prodroga ^a			
	Prodroga 7a		Prodroga 7c	
	% 7a	% 9a	% 7c	% 13
10	0	100	33	60
20	0	100	26	73
30	0	96	11	87
45	0	93	0	92
60	0	88	0	91
120	0	76	0	91

^aLos % remanentes de prodroga fueron calculados por HPLC.

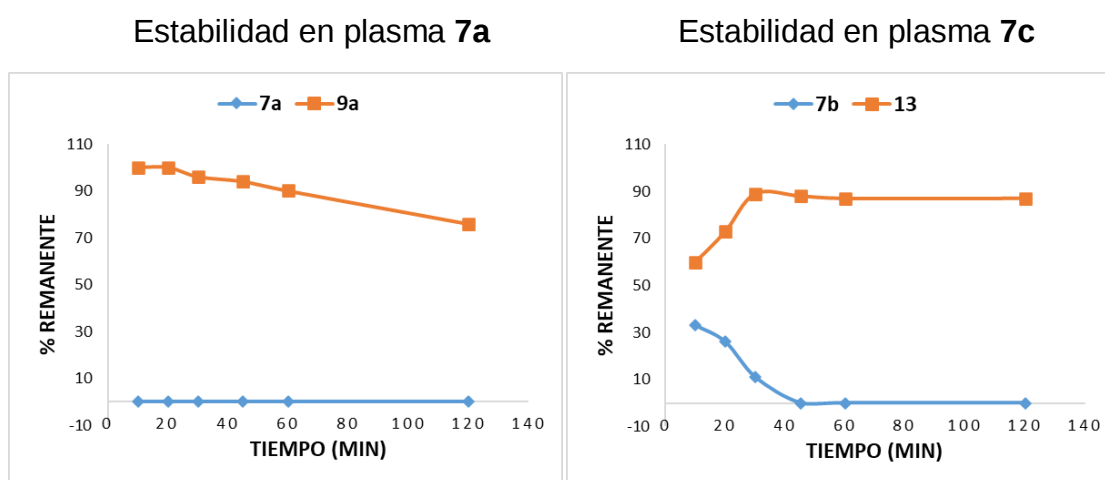


Figura 3.7: Estudios de estabilidad en plasma de las prodrogas **7a** y **7c**. Gráficos % remanente de prodroga o sus productos de hidrólisis (**9a** y **13**, respectivamente) vs tiempo.

Los resultados muestran que la prodroga **7a** se hidroliza completamente a los 10 min de incubación. Para la prodroga **7c** la velocidad de hidrólisis es más lenta, llegando a una hidrólisis completa a los 45 min de incubación, Tabla 3.5 y gráficas en Figura 3.7.

En la Figura 3.8 se muestran los cromatogramas a $t = 0$ min y 120 min de incubación para la prodroga **7a**.

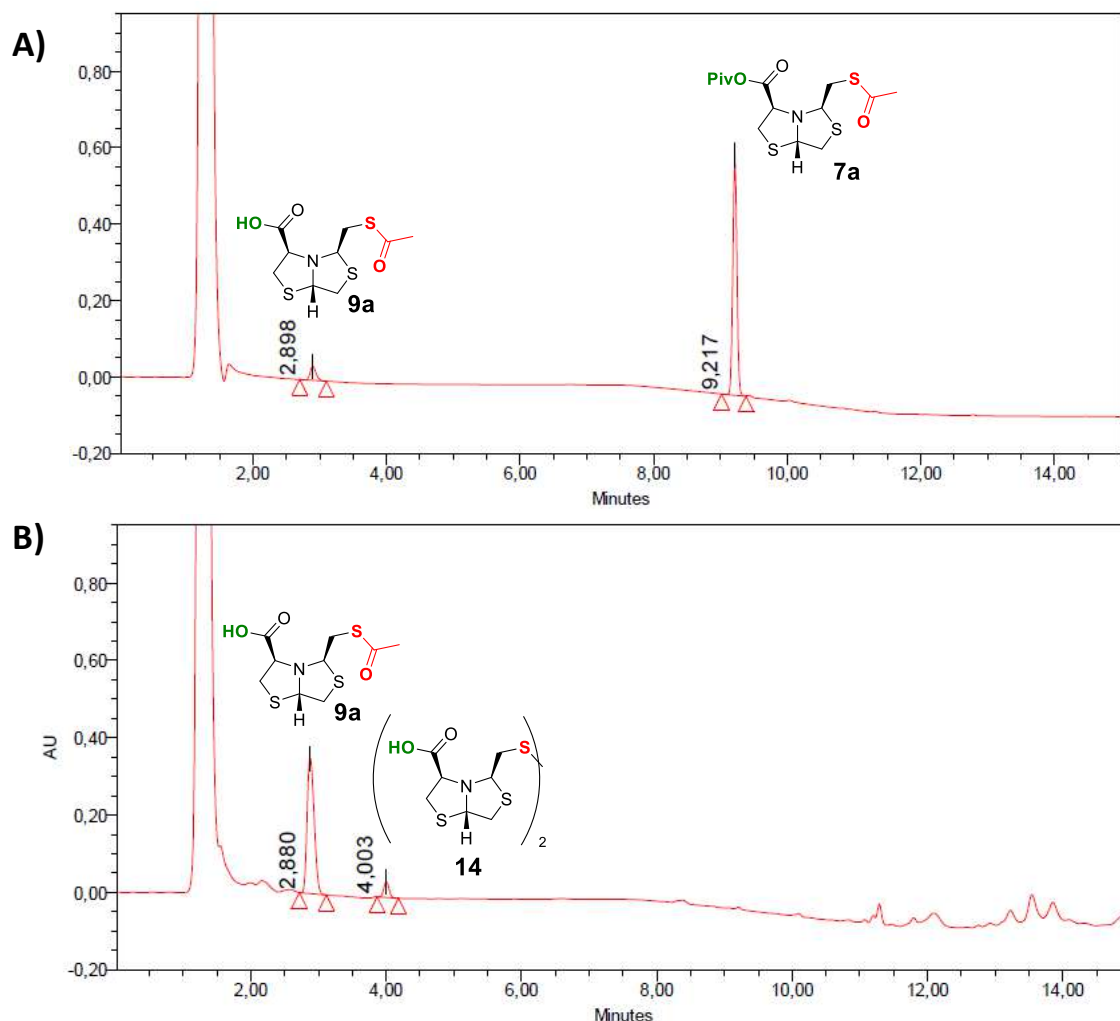
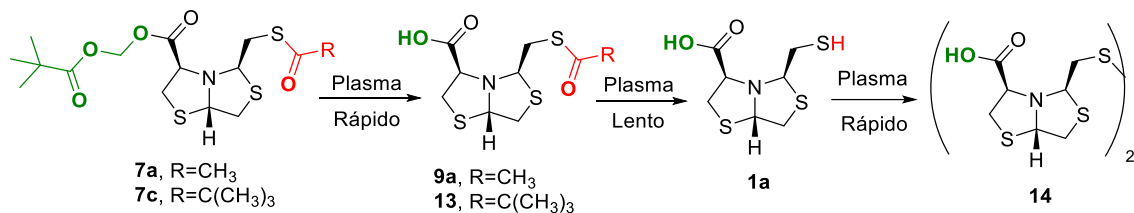


Figura 3.8: Cromatogramas luego de la incubación de **7a** en plasma a tiempos: A) 0 min y B) 120 min. Condiciones cromatográficas: columna fase reversa C18 (Kinetex NUCLEOSIL® C18, 150 mm × 4 mm, 5 μ m); fase móvil A = TFA 0.003 M; fase móvil B = ACN; condiciones iniciales 70/30 (fase móvil A/fase móvil B) cambian en 2 min a 55/45, se mantienen durante 3.5 min y cambian en 0.1 min a 5/95, manteniéndose durante 2.4 min; flujo = 1.2 mL/min.

El análisis por HPLC muestra que en plasma la prodroga **7a** se hidroliza principalmente a nivel del éster pivaloxilo para dar **9a**. Se propone que una vez hidrolizado el éster pivaloxilo, se da una lenta hidrólisis a nivel del tioéster,

liberando el grupo tiol, que se oxida rápidamente para formar la especie dimérica **14**, ver Esquema 3.7. No se detectó en los cromatogramas la presencia de la droga original **1a**, ver Esquema 3.7 y cromatogramas en Figura 3.8.



Esquema 3.7: Degradación de las prodrogas **7a** y **7c** en plasma.

En la Figura 3.9 se muestran los cromatogramas a $t = 0$ min y 120 min de incubación para la prodroga **7c**.

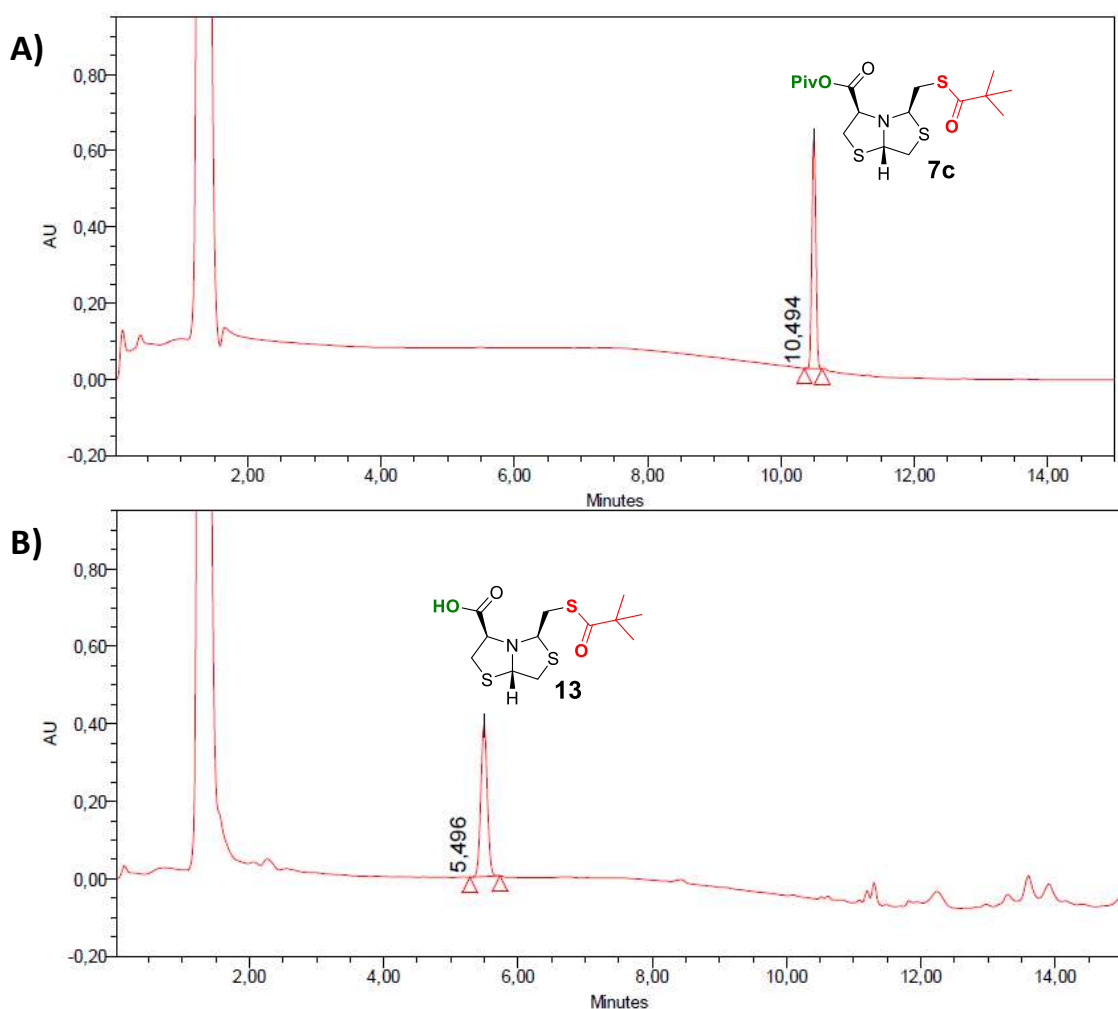


Figura 3.9: Cromatogramas luego de la incubación de **7c** en plasma a tiempos: A) 0 min y B) 120 min.

Para la prodroga **7c** en cambio, una vez hidrolizado el éster de pivaloxilo para dar el compuesto **13**, no se observa prácticamente hidrólisis a nivel del tioéster luego de 120 min de incubación, ver cromatogramas en Figura 3.9. Por lo tanto, esto indicaría que el grupo pivaloilo es más estable que el grupo acetilo en estas condiciones.

*Estudio de estabilidad en plasma de BTZ **1a** y los intermediarios **9a** y **13***

Se incubó la droga original **1a** y los intermediarios **9a** y **13** en plasma a 37 °C y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (15, 30, 45, 60 y 120 min) para su análisis por HPLC. En la Tabla 3.6 y en las gráficas de la Figura 3.10 se representa el % remanente de **1a**, **9a** y **13** vs tiempo, ver Tabla 3.6. Dado que el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) es un parámetro muy utilizado para comparar la estabilidad de compuestos en plasma, se calculó para los tres compuestos, Figura 3.10 y Tabla 3.6.

Tabla 3.6: Estudios de estabilidad en plasma de los compuestos **1a**, **9a** y **13**: % remanente a diferentes tiempos y cálculos de tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para una cinética de primer orden.

% remanente de prodroga ^a						
$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$						
Tiempo	% 1a	$t_{1/2}$ 1a	% 9a	$t_{1/2}$ 9a	% 13	$t_{1/2}$ 13
15	75		98		100	
30	48		95		100	
45	19	23	91	210	98	770
60	16		83		95	
120	3		70		92	

^aLos % remanentes de prodroga fueron calculados por HPLC.

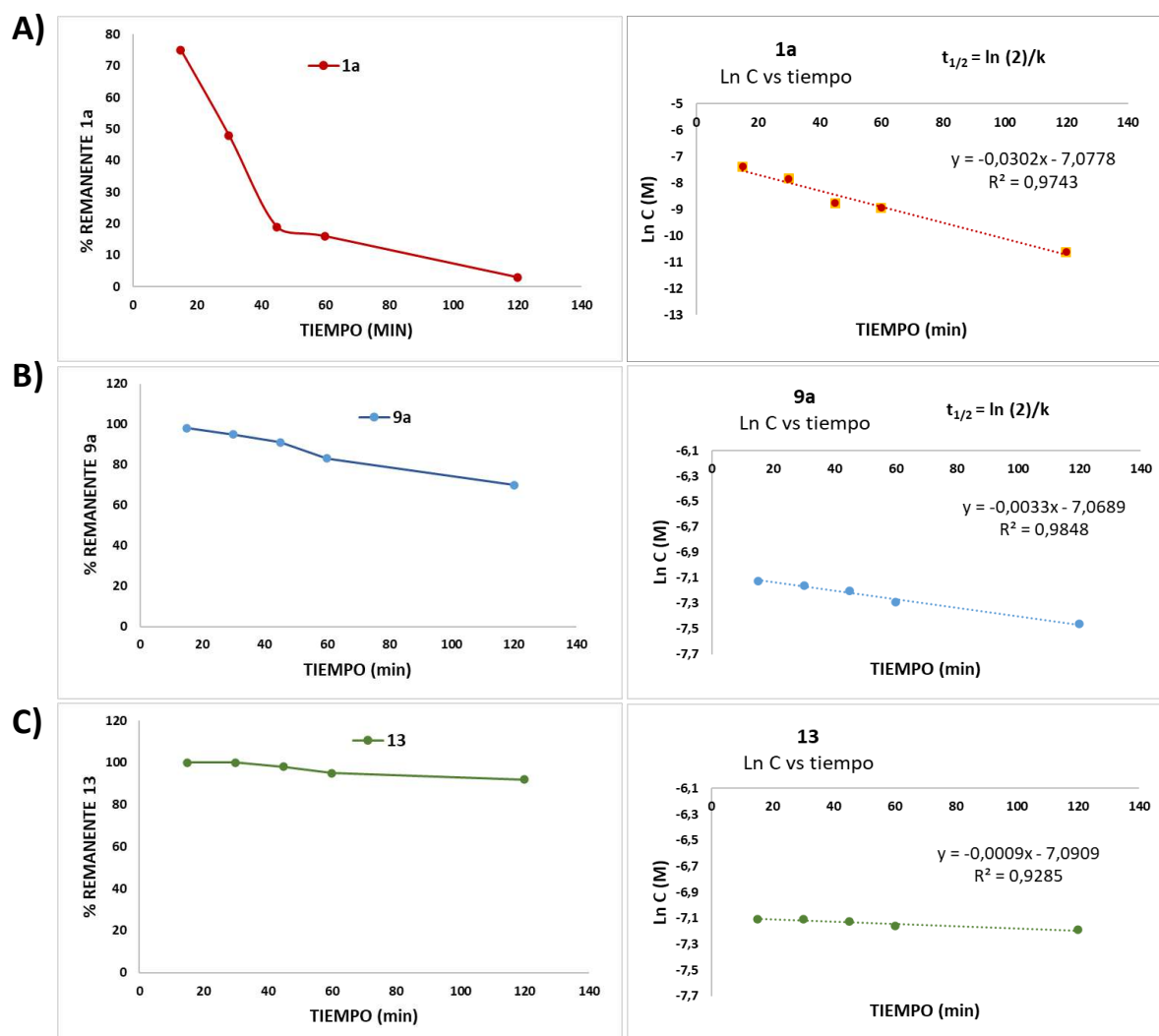


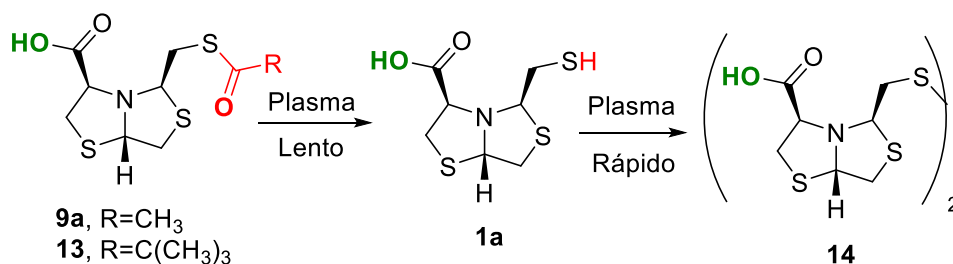
Figura 3.10: Estudios de estabilidad en plasma: Gráficas % remanente vs tiempo y Ln C vs tiempo para los compuestos: A) **1a**; B) **9a**; y C) **13**.

El ajuste a un modelo lineal de las gráficas logaritmo de la concentración (Ln C) vs tiempo implica que la degradación de los compuestos sigue una cinética de primer orden, ver gráficas en Figura 3.10. A partir de la pendiente de estas gráficas (k) se calcularon los $t_{1/2}$ para **1a**, **9a** y **13** según ecuación [1]:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad [1]$$

El compuesto **1a** se degrada en plasma con un $t_{1/2} = 23$ min, gráficas en Figura 3.10A, significativamente menor que los compuestos **9a** y **13** (210 y 770 min, respectivamente), Tabla 3.6 y Figura 3.10B-C.

El análisis por HPLC mostró que la principal especie formada en todos los casos es el dímero **14**, Esquema 3.8 y cromatogramas en Figura 3.11.



Esquema 3.8: Degradación en plasma de los compuestos **1a**, **9a** y **13**.

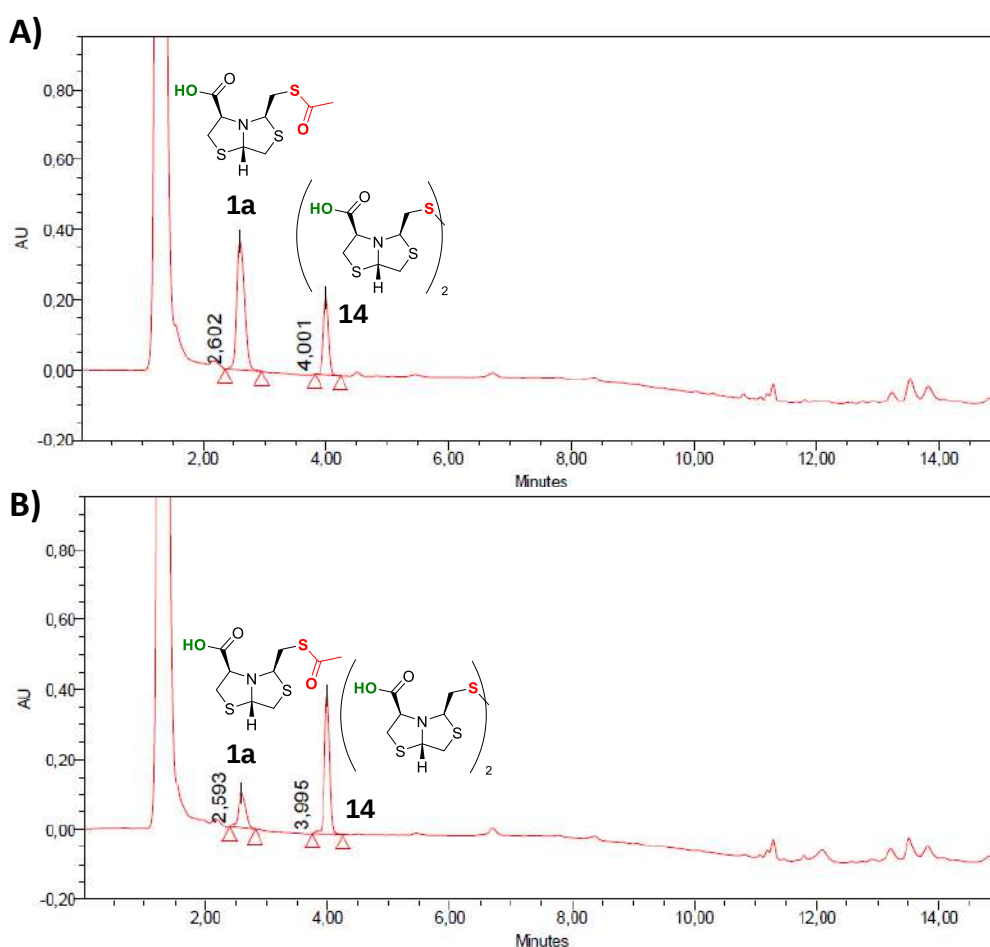


Figura 3.11: Cromatogramas de la degradación de **1a** en plasma, A) 15 min y B) 45 min.

En su conjunto, los resultados de los ensayos de estabilidad son alentadores, y podrían indicar que los grupos protectores elegidos (pivaloxilo para el ácido carboxílico y acetilo y pivaloilo para el tiol) serían adecuados. Por un lado, el grupo éster pivaloxilo se hidroliza lentamente en buffer acuosos en las condiciones de pH ensayadas, mientras el tioéster se mantiene intacto. Esto

es deseable, ya que el objetivo de estas prodrogas es que se absorban intactas. Por otro lado, si bien se da una rápida hidrólisis del éster pivaloxilo en plasma, no es relevante ya que el objetivo de este grupo sería solo mejorar la absorción a través del TGI.

Un aspecto importante es que la hidrólisis del grupo tioéster en plasma es lenta, en particular el S-pivaloilo, resultado altamente satisfactorio. Esto evita las reacciones de oxidación indeseadas en plasma que sufre la droga original, aumentando su $t_{1/2}$ en plasma.

Si bien ambas prodrogas sintetizadas parecen tener una estabilidad adecuada en los diferentes buffers ensayados y en plasma, la prodroga **7c** resulta ligeramente más estable respecto a **7a**. Este enfoque es simplemente una aproximación, que servirá de guía para seleccionar un candidato adecuado para continuar con ensayos *in vivo* en modelos de ratón.

iii) Evaluación biológica de las prodrogas frente a bacterias resistentes expresando MBL

Según los resultados obtenidos en los ensayos de estabilidad en plasma, el grupo tioéster sufre una lenta hidrólisis en plasma, y una vez hidrolizado se oxida rápidamente. El $t_{1/2}$ de la droga original en plasma es de 23 min, mientras que para el compuesto **9a** con el tiol protegido como S-acetilo es de 210 min. Esta es una característica muy favorable ya que preservaría la integridad del tiol hasta llegar al blanco terapéutico, donde podría hidrolizarse. Esto sucede con algunos profármacos antibacterianos, que logran escapar a la acción de las esterasas humanas y son activados en el sitio de infección por las esterasas bacterianas.³²

Para determinar si el compuesto **9a** podría hidrolizarse en el espacio periplásmico bacteriano para inhibir las MBL, se realizaron ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) utilizando cepas de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* provenientes de aislados clínicos resistentes a ABL que expresan las MBL: NDM-1 y VIM-2, respectivamente. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el Prof. Robert Bonomo en Research Service, Louis Stokes

Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Case Western Reserve University, en Cleveland, USA.

La MIC es definida como la concentración más baja de antibiótico (meropenem) que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por un tiempo prolongado (típicamente 24 h).³³ El ensayo se realiza mediante la técnica de microdilución en medio de cultivo, siguiendo las pautas del CLSI,³⁴ en microplacas llamadas “placas de microtitulación” conteniendo 96 pocillos de fondo en forma de “U”, Figura 3.12. El ensayo se llevó a cabo en presencia de antibiótico en tres condiciones: (i) en ausencia de inhibidor (control de crecimiento) (ii) en presencia del compuesto de referencia L-**1a** (control positivo, disminuye las MIC de meropenem por tener el tiol libre, que se une a los iones de zinc en el sitio activo de las MBL) y (iii) en presencia de S-acetil **9a**, ver Figura 3.12

Las microplacas son sembradas con concentraciones crecientes del antibiótico. Para ello, a partir de la mayor concentración de antibiótico se realizan diluciones dobles seriadas desde 128 hasta 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de concentración final de antibiótico. La concentración de inhibidor (100 $\mu\text{g/mL}$) y la carga bacteriana inicial (5×10^4 UFC/pocillo) se mantienen constantes en toda la microplaca. Cada ensayo se realiza por triplicado.

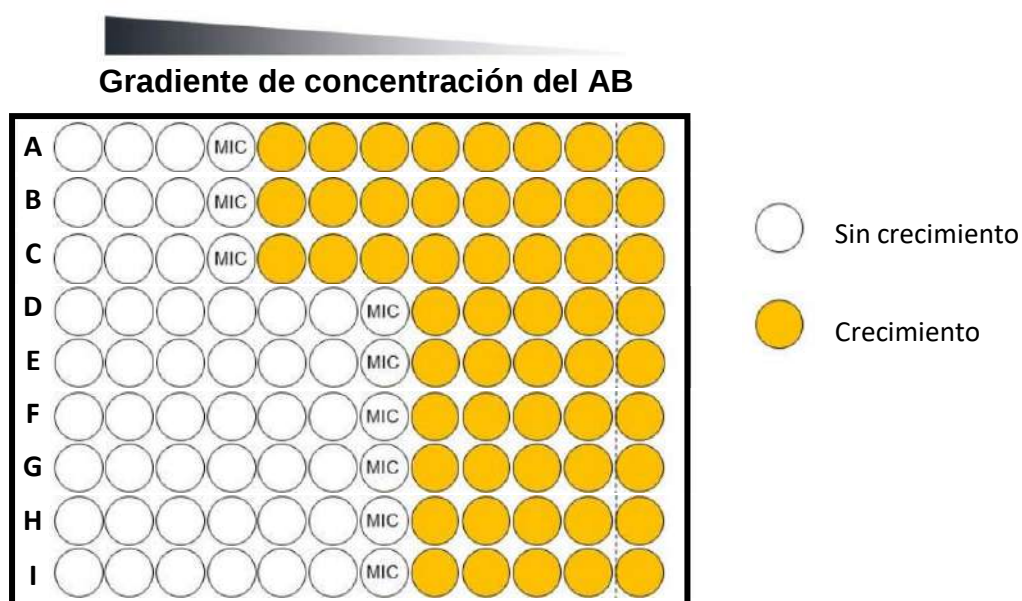


Figura 3.12: Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) para *P. aeruginosa*. El ensayo se llevó a cabo en tres condiciones: A-C: en ausencia de inhibidor, control de crecimiento; D-F:

en presencia de L-**1a**, control positivo, y G-I: en presencia de **9a** (G-I). Concentración de inhibidor: 100 µg/mL. Carga bacteriana inicial: 5×10^4 UFC/pocillo. Gradiente de concentración de ABL (meropenem): 128 a 0.25 µg/mL.

Luego de la incubación a 35°C, se observan los pocillos y se determina la menor concentración de antibiótico que a simple vista inhibe completamente el crecimiento del microorganismo estudiado (donde no se observa turbidez). Dicha concentración será la MIC del antibiótico en presencia o ausencia del inhibidor en cuestión.

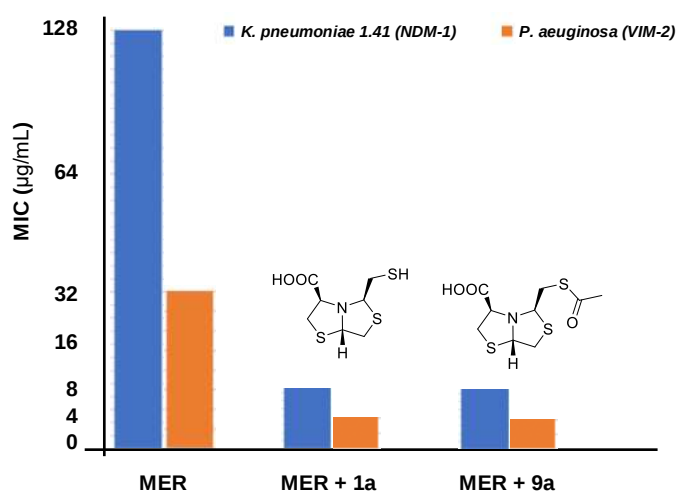


Figura 3.13: Ensayos de MIC (µg/mL) frente a cepas de *K. pneumoniae* (azul) y *P. aeruginosa* (anaranjado) provenientes de aislados clínicos que expresan NDM-1 y VIM-2, en ausencia y presencia de los compuestos: **1a** y **9a**.

Los resultados muestran que las MIC del meropenem en ausencia de inhibidor son 128 y 32 µg/mL para *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, respectivamente, Figura 3.13. Luego, tanto en presencia de L-**1a** (control positivo) como de **9a**, el valor de MIC de meropenem frente a ambos aislados clínicos es el mismo y notablemente menor en comparación con meropenem sin inhibidor (8 para *K. pneumoniae* y 4 para *P. aeruginosa*). Dado que el grupo tiol es esencial para la inhibición de las MBL, el hecho de que L-**1a** y **9a** lleven a los mismos resultados en ensayos en bacteria, confirmaría que el tioéster de **9a** se hidrolizaría en medio intrabacteriano, liberando el tiol y llevando a la inhibición de las MBL, y por ende disminución de las MIC.

3.4 Conclusiones y perspectivas

Se lograron sintetizar 4 prodrogas de BTZ y 2 prodrogas de TZ. Todas ellas mostraron valores de cálculos teóricos de ADME para las propiedades TPSA y logP dentro de los rangos estipulados. Los estudios de estabilidad en plasma de L-**1a** mostraron que se degrada para dar especies diméricas con un $t_{1/2}$ de 23 min. En cambio, los compuestos S-Acetilo **9a** y S-Pivaloilo **13** muestran una alta estabilidad ($t_{1/2}$ = 210 y 770 min, respectivamente).

El valor de MIC de meropenem frente a dos aislados clínicos que expresan diferentes MBL fue el mismo en presencia del compuesto L-**1a** (con el tiol libre, que se une a los iones de zinc en el sitio activo) y en presencia de **9a**, revelando que las esterasas microbianas activan el profármaco en el periplasma bacteriano. En su conjunto estos resultados preliminares son altamente prometedores.

Como perspectivas a futuro se plantea:

- i) Realizar estudios de estabilidad de las demás prodrogas preparadas **7b**, **7d** y **8a-b** tanto en buffer acuosos como en plasma.
- ii) Realizar ensayos adicionales de estabilidad, como por ejemplo la caracterización de su perfil metabólico utilizando microsomas de hígado de rata comercialmente disponibles.
- iii) Realizar ensayos de MIC del compuesto **13** en cepas resistentes para determinar si se hidroliza en bacteria.
- iv) Realizar ensayos *in vivo* en un modelo preclínico utilizando ratones infectados.

3.5 Bibliografía

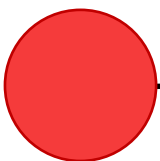
- (1) Cheng, A. V.; Wuest, W. M. Signed, Sealed, Delivered: Conjugate and Prodrug Strategies as Targeted Delivery Vectors for Antibiotics. *ACS Infect. Dis.* **2019**, 5 (6), 816–828. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00019>.
- (2) Stella, V. J. Prodrugs as Therapeutics. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2004**, 14 (3), 277–280. <https://doi.org/10.1517/13543776.14.3.277>.
- (3) Vera-Cabrera, L.; Gonzalez, E.; Rendon, A.; Ocampo-Candiani, J.; Welsh, O.; Velazquez-Moreno, V. M.; Choi, S. H.; Molina-Torres, C. In Vitro Activities of DA-7157 and DA-7218 against Mycobacterium Tuberculosis and Nocardia Brasiliensis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50 (9), 3170–3172. <https://doi.org/10.1128/AAC.00571-06>.
- (4) Ishikawa, T.; Matsunaga, N.; Tawada, H.; Kuroda, N.; Nakayama, Y.; Ishibashi, Y.; Tomimoto, M.; Ikeda, Y.; Tagawa, Y.; Iizawa, Y.; Okonogi, K.; Hashiguchi, S.; Miyake, A. TAK-599, a Novel N-Phosphono Type Prodrug of Anti-MRSA Cephalosporin T-91825: Synthesis, Physicochemical and Pharmacological Properties. *Bioorganic Med. Chem.* **2003**, 11 (11), 2427–2437. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(03\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(03)00126-3).
- (5) Stella, V. J.; Nti-Addae, K. W. Prodrug Strategies to Overcome Poor Water Solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, 59 (7), 677–694. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.013>.
- (6) Assali, M.; Joulani, M.; Awwad, R.; Assad, M.; Almasri, M.; Kittana, N.; Zaid, A. N. Facile Synthesis of Ciprofloxacin Prodrug Analogues to Improve Its Water Solubility and Antibacterial Activity. *Chemistry Select.* **2016**, 1 (6), 1132–1135. <https://doi.org/10.1002/slct.201600091>.
- (7) Abbas, N. S.; Amin, M.; Hussain, M. A.; Edgar, K. J.; Tahir, M. N.; Tremel, W. Extended Release and Enhanced Bioavailability of Moxifloxacin Conjugated with Hydrophilic Cellulose Ethers. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 136, 1297–1306. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.052>.
- (8) Bentley, A.; Butters, M.; Green, S. P.; Learmonth, W. J.; MacRae, J. A.;

- Morland, M. C.; O'Connor, G.; Skuse, J. The Discovery and Process Development of a Commercial Route to the Water Soluble Prodrug, Fosfluconazole. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6* (2), 109–112. <https://doi.org/10.1021/op010064+>.
- (9) Richter, M. F.; Drown, B. S.; Riley, A. P.; Garcia, A.; Shirai, T.; Svec, R. L.; Hergenrother, P. J. Predictive Compound Accumulation Rules Yield a Broad-Spectrum Antibiotic. *Nature* **2017**, *545* (7654), 299–304. <https://doi.org/10.1038/nature22308>.
- (10) Beaumont, K.; Webster, R.; Gardner, I.; Dack, K. Design of Ester Prodrugs to Enhance Oral Absorption of Poorly Permeable Compounds: Challenges to the Discovery Scientist. *Curr. Drug Metab.* **2003**, *4* (6), 461–485. <https://doi.org/10.2174/1389200033489253>.
- (11) Díez-Torrubia, A.; Cabrera, S.; De Castro, S.; García-Aparicio, C.; Mulder, G.; De Meester, I.; Camarasa, M. J.; Balzarini, J.; Velázquez, S. Novel Water-Soluble Prodrugs of Acyclovir Cleavable by the Dipeptidyl-Peptidase IV (DPP IV/CD26) Enzyme. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 456–468. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.10.001>.
- (12) Mizen, L.; Burton, G. The Use of Esters as Prodrugs for Oral Delivery of Beta-Lactam Antibiotics. *Pharm. Biotechnol.* **1998**, *11*, 345–365. https://doi.org/10.1007/0-306-47384-4_15.
- (13) Fan, H. J.; Paternotte, I.; Vermander, M.; Li, K.; Beaujean, M.; Scorneaux, B.; Dumont, P.; Osinski, P.; Claesen, M.; Tulkens, P. M.; Sonveaux, E. Ester Prodrugs of Ampicillin Tailored for Intracellular Accumulation. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1997**, *7* (24), 3107–3112. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(97\)10146-9](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(97)10146-9).
- (14) Koup, J. R.; Dubach, U. C.; Brandt, R.; Wyss, R.; Stoeckel, K. Pharmacokinetics of Cefetamet (Ro 15-8074) and Cefetamet Pivoxil (Ro 15-8075) after Intravenous and Oral Doses in Humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32* (4), 573–579. <https://doi.org/10.1128/AAC.32.4.573>.
- (15) Meleggh, B.; Kerner, J.; Bieber, L. L. Pivampicillin-Promoted Excretion of Pivaloylcarnitine in Humans. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36* (20), 3405–

3409. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90318-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90318-2).
- (16) Jain, A.; Utle, L.; Parr, T. R.; Zabawa, T.; Pucci, M. J. Tebipenem, the First Oral Carbapenem Antibiotic. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2018**, *16* (7), 513–522. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1496821>.
 - (17) English, A. R.; Girard, D.; Jasys, V. J.; Martingano, R. J. Effective Acid Prodrugs Of. **1990**, *33* (1), 344–347. <https://doi.org/10.1021/jm00163a055>.
 - (18) Betrosian, A. P.; Douzinas, E. E. Ampicillin-Sulbactam: An Update on the Use of Parenteral and Oral Forms in Bacterial Infections. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2009**, *5* (9), 1099–1112. <https://doi.org/10.1517/17425250903145251>.
 - (19) Israili, Z. H.; Dallas Hall, W. Cough and Angioneurotic Edema Associated with Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Therapy: A Review of the Literature and Pathophysiology. *Ann. Intern. Med.* **1992**, *117* (3), 234–242. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-117-3-234>.
 - (20) Villamil, V.; Saiz, C.; Mahler, G. A New Procedure for Thioester Deprotection Using Thioglycolic Acid in Both Homogeneous and Heterogeneous Phase. *Tetrahedron.* **2021**, *94*, 132335-132343. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2021.132335>.
 - (21) Teitelbaum, A. M.; Meissner, A.; Harding, R. A.; Wong, C. A.; Aldrich, C. C.; Remmel, R. P. Synthesis, PH-Dependent, and Plasma Stability of Meropenem Prodrugs for Potential Use against Drug-Resistant Tuberculosis. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21* (17), 5605–5617. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.05.024>.
 - (22) Mennen, S. M.; Alhambra, C.; Allen, C. L.; Barberis, M.; Berritt, S.; Brandt, T. A.; Campbell, A. D.; Castañón, J.; Cherney, A. H.; Christensen, M.; Damon, D. B.; Eugenio De Diego, J.; García-Cerrada, S.; García-Losada, P.; Haro, R.; Janey, J.; Leitch, D. C.; Li, L.; Liu, F.; Lobben, P. C.; Macmillan, D. W. C.; Magano, J.; McInturff, E.; Monfette, S.; Post, R. J.; Schultz, D.; Sitter, B. J.; Stevens, J. M.; Strambeanu, I. I.; Twilton, J.; Wang, K.; Zajac, M. A. The Evolution of High-Throughput Experimentation in Pharmaceutical Development and Perspectives on the Future. *Org.*

- Process Res. Dev.* **2019**, 23 (6), 1213–1242. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00140>.
- (23) Shevlin, M. Practical High-Throughput Experimentation for Chemists. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, 8 (6), 601–607. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00165>.
- (24) Jarrahpour, A.; Motamedifar, M.; Zarei, M.; Youssoufi, M. H.; Mimouni, M.; Chohan, Z. H.; Hadda, T. Ben. Petra, Osiris, and Molinspiration Together as a Guide in Drug Design: Predictions and Correlation Structure/Antibacterial Activity Relationships of New N-Sulfonyl Monocyclic β -Lactams. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2010**, 185 (2), 491–497. <https://doi.org/10.1080/10426500902953953>.
- (25) Kubinyi, H. Drug Research: Myths, Hype and Reality. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2003**, 2 (August), 5–8. <https://doi.org/10.1038/nrd1156>.
- (26) Lipinski, C. A. Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, 1 (4), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>.
- (27) Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J. Comb. Chem.* **1999**, 1 (1), 55–68. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>.
- (28) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, 45 (12), 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- (29) Wang, Y.; Xing, J.; Xu, Y.; Zhou, N.; Peng, J.; Xiong, Z.; Liu, X.; Luo, X.; Luo, C.; Chen, K.; Zheng, M.; Jiang, H. In Silico ADME/T Modelling for Rational Drug Design. *Q. Rev. Biophys.* **2015**, 48 (4), 488–515. <https://doi.org/10.1017/S0033583515000190>.
- (30) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry

- Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, 7 (January), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- (31) Protti, Í. F.; Rodrigues, D. R.; Fonseca, S. K.; Alves, R. J.; de Oliveira, R. B.; Maltarollo, V. G. Do Drug-Likeness Rules Apply to Oral Prodrugs? *ChemMedChem* **2021**, 16 (9), 1446–1456. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000805>.
- (32) Wang, J.; Cooper, D. L.; Zhan, W.; Wu, D.; He, H.; Sun, S.; Lovett, S. T.; Xu, B. Diglycine Enables Rapid Intrabacterial Hydrolysis for Activating Antibiotics against Gram-negative Bacteria. *Angew. Chemie* **2019**, 131 (31), 10741–10744. <https://doi.org/10.1002/ange.201905230>.
- (33) Jepson, A. K.; Schwarz-Linek, J.; Ryan, L.; Ryadnov, M. G.; Poon, W. C.; What is the ‘minimum inhibitory concentration’(mic) of pexiganan acting on *E. coli*? A cautionary case study. *Biophysics of infection*. **2016**, 915, 33-48. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32189-9_4
- (34) Limbago, B. M100-S11, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clin. Microbiol. Newsl.* **2001**, 23 (6), 49. [https://doi.org/10.1016/s0196-4399\(01\)88009-0](https://doi.org/10.1016/s0196-4399(01)88009-0).



CAPÍTULO 4

Diseño y síntesis de nuevas
bistiazolidinas conteniendo grupos
ésteres y amidas

4.1 Introducción

En el presente capítulo se describe el diseño y síntesis de análogos de BTZ **1** con el objetivo de mejorar la actividad *in vitro* de los inhibidores originales. Para ello se utilizaron distintas estrategias de diseño basadas en: i) la estructura del sitio activo de las MBL según datos cristalográficos descritos en literatura; ii) estudios *in silico* realizados por nuestro grupo; y iii) la habilidad de ciertos grupos funcionales para favorecer la penetración a través de la envoltura celular bacteriana.

4.1.1 Estrategias de diseño de inhibidores basadas en la estructura del sitio activo de las MBL

La primera estructura de una MBL reportada en el Protein Data Bank (PDB) fue la enzima BcII, de *B. cereus*, perteneciente a la subclase B1.^{1,2} Según los datos cristalográficos y el análisis de los autores, el sitio activo de esta enzima está ubicado en una ranura superficial en la parte inferior de un motivo sándwich $\beta\beta$, rodeado por varios bucles. En particular, el bucle L3 contiene un conjunto de residuos hidrofóbicos que serían los responsables de la unión y especificidad de sustrato para esta clase de enzimas.^{3,4}

A partir de este trabajo, varios grupos intentaron co-cristalizar otras MBL con ABL hidrolizados. Es así que el grupo de C. J. Strynadka y Quan Hao lograron resolver las estructuras cristalinas del complejo NDM-1:ABL hidrolizado para metilicina, bencilpenicilina, oxacilina y ampicilina. De acuerdo con los resultados obtenidos por estos autores, la enzima NDM-1 posee una hendidura que se abre fácilmente y es capaz de acomodar los grupos voluminosos de estos ABL. En la Figura 4.1 se muestran como ejemplos dos representaciones de la estructura del complejo NDM-1:ampicilina hidrolizada, ABL que contiene como cadena lateral un grupo bencilamina.^{5,6} Se observa que el anillo aromático de la cadena lateral forma interacciones hidrofóbicas fuertes con los residuos L65 y M67 del loop 3 y W93 del loop 5, Figura 4.1.⁷

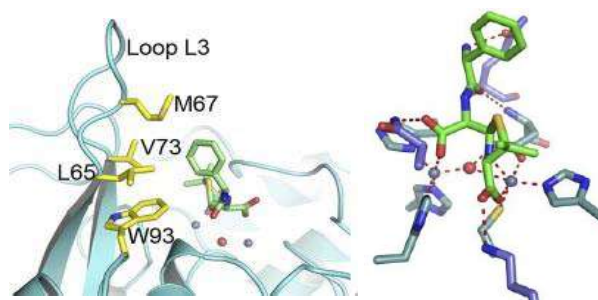


Figura 4.1: Representación del complejo NDM-1:ampicilina hidrolizada. Interacciones hidrofóbicas entre la ampicilina hidrolizada (anillo aromático) y el loop L3 de NDM-1: (residuos L65 y M67).

La presencia del loop L3 conteniendo residuos hidrofóbicos resultaría clave para el anclaje del sustrato en el sitio activo de NDM-1, al igual que para otras MBL. El hecho de que estas enzimas se adapten a grupos voluminosos e hidrofóbicos sugiere que realizar variaciones de esta índole puede ser una estrategia eficaz para el diseño racional de nuevos inhibidores de MBL.

En base a estas características, varios grupos de trabajo han diseñado y sintetizado inhibidores de MBL conteniendo en su estructura anillos aromáticos. Por ejemplo, el grupo de Kurosaki y col. reportaron la síntesis del ácido 2- ω -fenilpropil-3-mercaptopropiónico como un potente inhibidor de la enzima VIM-2 y lograron resolver la estructura cristalina del complejo VIM-2:Inhibidor por rayos X,⁴ Figura 4.2. El grupo tiol coordina con ambos Zn^{2+} y el anillo aromático interacciona con un residuo de Tyr67 en el loop 1 cercano al sitio activo a través de interacciones π - π de apilamiento. Además, el grupo metileno interacciona con un residuo de Phe61 también localizado en el loop 1, a través de interacciones CH- π . Estos dos residuos parecerían jugar un rol importante en la unión y en el reconocimiento de sustratos o inhibidores en la enzima VIM-2.

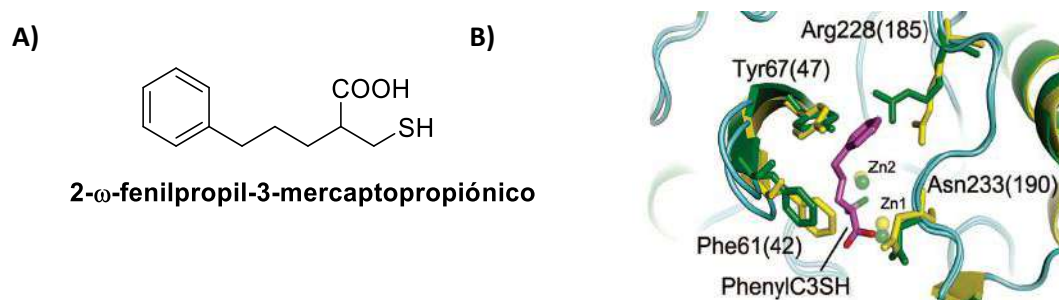


Figura 4.2: A) Estructura del inhibidor: ácido 2- ω -fenilpropil-3-mercaptopropiónico; B) Superposición de la enzima VIM-2 nativa (verde) y el complejo VIM-2:inhibidor (VIM-2 en amarillo e inhibidor en violeta).

A partir de los resultados publicados en literatura, se observa claramente la presencia de regiones hidrofóbicas en el sitio activo de las MBL. Esto resulta un punto fundamental a considerar para el diseño de nuevos inhibidores de estas enzimas.

4.1.2 Mejora de la permeabilidad a través de la envoltura celular bacteriana por introducción de grupos cargados positivamente

Otro factor a tener en cuenta en el diseño de fármacos con aplicaciones antimicrobianas es la adecuada permeabilidad a través de la envoltura celular bacteriana que permita acumular el fármaco en el medio intrabacteriano. Particularmente, las bacterias Gram(-) tienen dos membranas celulares y la membrana externa está recubierta de lipopolisacáridos, que dificultan la permeabilidad de moléculas pequeñas.⁸ Aquellos compuestos que no son capaces de atravesar la membrana externa, típicamente lo hacen a través de porinas, canales que están revestidos con aminoácidos cargados. En este sentido, se ha descrito que la introducción de grupos cargados positivamente, como las aminas primarias, mejoran la solubilidad y la permeabilidad a través de la envoltura celular, que permite su acumulación dentro de la bacteria,⁹ llevando a una mejora en la actividad contra bacterias resistentes.

4.1.3 Diseño de nuevos análogos de bistiazolidinas para aumentar la actividad *in vitro*

El grupo ácido carboxílico presente en los ABL coordina con el o los iones zinc tanto en el complejo enzima-sustrato como en los aductos enzima-producto

e intermedio enzimático, siendo crucial para el reconocimiento y anclaje en las MBL, Figura 4.3a.⁶ En cambio, en las BTZ **1** es el tiol quien coordina con el zinc y ésta es la interacción más importante para la inhibición de MBL. Si bien el grupo carboxilato coordina con diversos residuos en el sitio activo,¹⁰ en principio se podría modificar para mejorar la actividad *in vitro* de las BTZ **1**, Figura 4.3b.

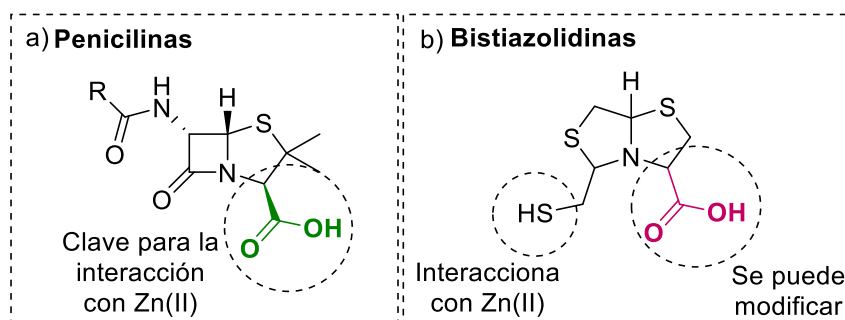


Figura 4.3: a) Estructura general de penicilinas: el ácido carboxílico es fundamental para la unión al sitio activo de las MBL. b) Estructura de **1a** y modificaciones propuestas del ácido carboxílico.

Desde el punto de vista químico, el ácido carboxílico es un grupo funcional ampliamente versátil. Pueden ser utilizados como punto de partida para la síntesis de muchos derivados, por ejemplo: ésteres,¹¹ amidas,¹² ácidos borónicos,¹³ alcoholes,¹⁴ cetonas y aldehídos,¹⁵ entre otros. En este trabajo se propone la síntesis de derivados ésteres o amidas a partir del ácido carboxílico, Figura 4.3b.

4.1.4 Antecedentes en la síntesis de ésteres y amidas y protección del grupo tiol

Actualmente existen descriptas en literatura una gran variedad de metodologías para preparar ésteres y amidas a partir de ácidos carboxílicos y alcoholes o aminas, respectivamente. Normalmente es necesario activar primero el ácido carboxílico, ya sea preparando un derivado de ácido más reactivo o convirtiendo el -OH del ácido en un buen grupo saliente. También se ha explorado la catálisis enzimática para la síntesis de amidas en condiciones moderadas como alternativa a los métodos tradicionales.^{16,17}

Los derivados de ácidos más comúnmente utilizados son los cloruros de ácidos, que pueden prepararse utilizando SOCl_2 o cloruro de oxalilo.¹⁸ Otra

opción para activar los ácidos carboxílicos es utilizar agentes acoplantes, que pueden formar un enlace covalente con el ácido carboxílico y los hacen más electrofílicos y reactivos frente al ataque nucleofílico de alcoholes o aminas. Los primeros agentes acoplantes que se reportaron son las carbodiimidas.¹⁹ Otros grupos de agentes acoplantes muy utilizados se basan en el sistema HOBt/HOAt²⁰ y las sales de uronio/aminio tales como HBTU o TBTU.²¹

Un aspecto a tener en cuenta a la hora de sintetizar amidas o ésteres es que, cuando en los materiales de partida se encuentran grupos nucleofílicos, éstos pueden competir con el alcohol o la amina. En el caso de las BTZ, el tiol es un grupo químicamente muy reactivo. Por lo tanto, una vez activado el ácido carboxílico se dará rápidamente una reacción inter o intramolecular entre el tiol y el ácido activado, para dar el tioéster correspondiente. Por ese motivo es necesario proteger este grupo antes de realizar cualquier tipo de modificación sobre las bistiazolidinas y desprotegerlo al final de la síntesis.

Los métodos más comúnmente utilizados para proteger el grupo tiol consisten en la síntesis de tioéteres,²² tioésteres,²³ o a través de la oxidación para dar sulfuros asimétricos regenerados por reducción.²⁴ Dentro de estos enfoques, la síntesis de acetil-tioésteres es una estrategia ampliamente utilizada, debido a que su preparación se realiza en condiciones suaves y en buen rendimiento.²⁵ Para su desprotección existe una amplia variedad de métodos descritos, como por ejemplo: NaOH en EtOH,²⁶ NH₃ en MeOH,²⁷ NH₂OH.HCl en MeOH,²⁸ MeSNa en CH₂Cl₂,²⁹ NH₂NH₂·H₂O en CH₃CN³⁰ y TiCl₄/Zn en CH₂Cl₂,³¹ entre otros. Estos métodos se usan generalmente para desproteger sustratos alifáticos y no funcionalizados. También se han reportado varios métodos enzimáticos para hidrolizar tioésteres, como por ejemplo utilizando la enzima carboximetilprolina sintasa (CarB).³²

4.2 Objetivo Específico

4.2.1 Diseñar y sintetizar una serie de nuevos derivados ésteres y amidas a partir del ácido carboxílico de la BTZ 1a

Para alcanzar este objetivo específico se pretende diseñar los nuevos análogos en base a estudios *in silico*, con la hipótesis de que la incorporación de

grupos hidrofóbicos pueda aumentar las interacciones con las MBL y que la presencia de aminas primarias pueda favorecer la penetración a través de la envoltura celular. Luego, se propone explorar metodologías sintéticas que nos permitan preparar dichos derivados, y realizar su caracterización estructural espectroscópica.

Por último, se pretende realizar la evaluación biológica de los análogos preparados frente a MBL pertenecientes a las tres subclases de MBL y su evaluación contra bacterias resistentes expresando MBL.

4.3 Resultados y Discusión

En el presente capítulo se muestran los resultados más relevantes obtenidos en la síntesis de nuevos análogos ésteres y amidas de bistiazolidinas.

Las principales actividades realizadas en este marco se relacionan con los objetivos específicos y se desarrollan a continuación.

4.3.1 Diseño de nuevos análogos y estudios computacionales

En base a los antecedentes descriptos en literatura y mostrados en la sección anterior, se propone: i) introducir grupos funcionales hidrofóbicos que puedan incrementar las interacciones en el sitio activo y mejorar la potencia inhibitoria de las bistiazolidinas y ii) introducir aminas primarias dada la habilidad de este grupo funcional de mejorar la acumulación del compuesto dentro de la bacteria. Con estos fines, se diseñaron y sintetizaron los compuestos **1c-d** y **15a-g**, Figura 4.4.

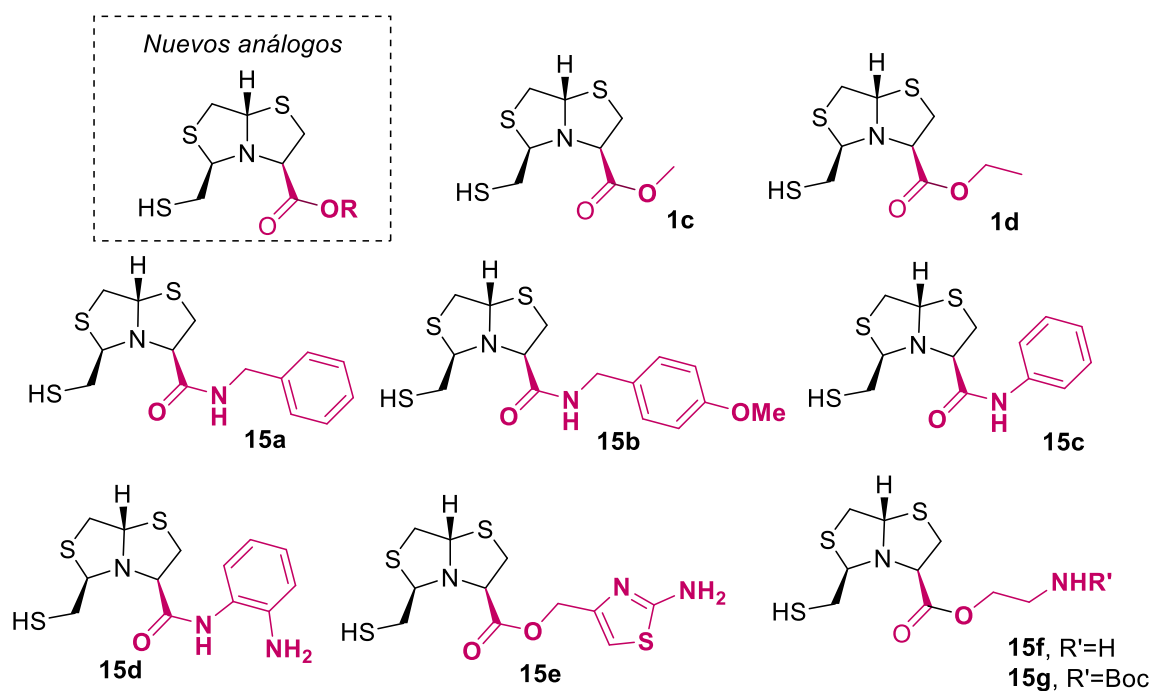


Figura 4.4: Estructura de los derivados ésteres y amidas **1c-d** y **15a-g** propuestos.

Los compuestos conteniendo un éster metílico (**1c**) o etílico (**1d**) en posición R son los derivados más simples, y de esta manera, puede estudiarse rápidamente el efecto de enmascarar la carga del ácido carboxílico en el patrón de inhibición de MBL.

Los derivados **15a-e** contienen en su estructura motivos aromáticos capaces de potenciar las interacciones con la enzima en el sitio activo, Figura 4.4. Los compuestos **15a-b** contienen a nivel de R un grupo bencilamina, mimetizando la cadena lateral de los ABL bencilpenicilina (o penicilina G) y ampicilina. El compuesto fenil-derivado **15c** es homólogo a **15a**, conteniendo un $-\text{CH}_2$ menos. Los análogos **15d-f** contienen una amina primaria en la cadena lateral R. El compuesto **15g** NHBoc es el precursor de **15f**, y también será evaluado frente a MBL.

A su vez, se realizaron estudios de docking de las estructuras propuestas como posibles inhibidores, para estudiar su capacidad de unión a NDM-1, enzima de relevancia clínica. Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Diego Moreno y el Lic. Salvador Drusin de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Nuestra hipótesis se basa en que el grupo tiol coordina con el centro metálico de estas enzimas de manera análoga a como se une la BTZ **1a** según estudios cristalográficos,³³ y que esta interacción es la más importante. Por este motivo, para la obtención de los complejos NDM-1:inhibidor de los compuestos **15a-g** se utilizó el método de docking molecular sesgado por sitios solventes (SSBMD) implementado en el programa Autodock 4.2.6.³⁴ Con este método de docking, se modifica la función de score para que se priorice la ubicación del grupo tiol entre los dos centros metálicos en el sitio activo de la enzima, mejorando así la descripción de la interacción.

La estructura de la enzima fue obtenida del Protein Data Bank (PDBid = 3SPU). Se generó una cuadrícula de 40 puntos de lado, espaciada 0.375 Å y centrada en el sitio catalítico. Para cada compuesto se generaron 100 poses, agrupadas por un RMSD menor a 2 Å. Las poses seleccionadas fueron aquellas con energía de unión negativa y una pose consistente con los datos experimentales obtenidos para BTZ **1a**. Las poses de los compuestos **15a-g** obtenidas se optimizaron en vacío utilizando el nivel de teoría HF/6-31G* en Gaussian 09.³⁵ En la figura 4.5 se representan los complejos NDM-1:inhibidor para los compuestos **1a** y **15a-g**.

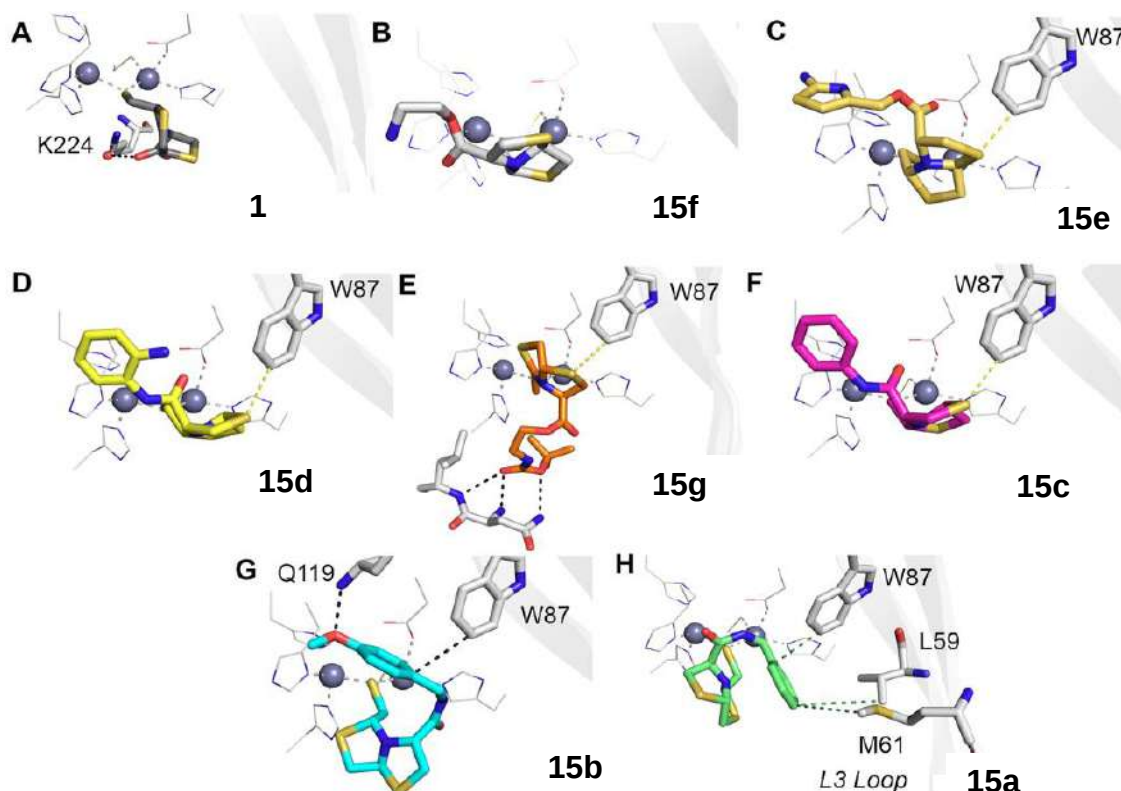


Figura 4.5: Modos de unión de BTZ **1a** y análogos **15a-g** con NDM-1. (A) Complejo cristalino de BTZ **1a** (gris):NDM-1 (PDB 4u4l); Complejos *in silico* con NDM-1: (B) **15f** (blanco), (C) **15e** (amarillo oscuro), (D) **15d** (amarillo), (E) **15g** (naranja), (F) **15c** (rosa), (G) **15b** (celeste) y (H) **15a** (verde). Ligandos del ion Zn^{2+} (gris claro, líneas), iones Zn^{2+} (gris, esferas), interacción S- π (amarilla, líneas discontinuas), interacciones hidrofóbicas (verde, líneas discontinuas), puentes de hidrógeno (líneas discontinuas negras) e interacciones de coordinación metal-ligando (líneas discontinuas grises).

Los resultados muestran que en todos los casos el grupo tiol queda en una posición equidistante de ambos iones Zn^{2+} , preservando el modo de unión observado para BTZ **1a** según estudios cristalográficos realizados por nuestro grupo (Figura 4.5-A).¹⁰ Luego, el biciclo y los sustituyentes del éster o amida se acomodan dentro del sitio activo mostrando, en algunos casos, interacciones adicionales que estabilizarían los modos de unión, ver Figura 4.5-B-H.

En la BTZ **1a** se observa una interacción entre el carboxilato y un residuo de lisina (K224), Figura 4.5-A. Los derivados **15d-f** que presentan un grupo amino capaz de protonarse adoptarían una orientación diferente dentro del sitio. La estructura bicíclica del análogo **15f** conteniendo un grupo etilamina se gira 90° (Figura 4.5-B) con respecto a BTZ **1a** (Figura 4.5-A) y la amina se dispone

en dirección opuesta a la adoptada por el carboxilato en **1a**. Como resultado, la única interacción del compuesto **15f** en el sitio activo de NDM-1 parecería ser entre el tiol y el Zn (II).

Sin embargo, el compuesto **15f** que presenta el grupo amino protegido con Boc (análogo **15g**), se dispone en el sitio activo en una forma análoga a la mostrada por BTZ **1a**, aunque se produce una pequeña reorientación de la estructura bicíclica (Figura 4.5-E) y el átomo de azufre del anillo de tiazolidina entraría en contacto con W87 a través de una interacción S- π . El grupo Boc se dispondría apuntando al residuo K224 (Figura 4.6).

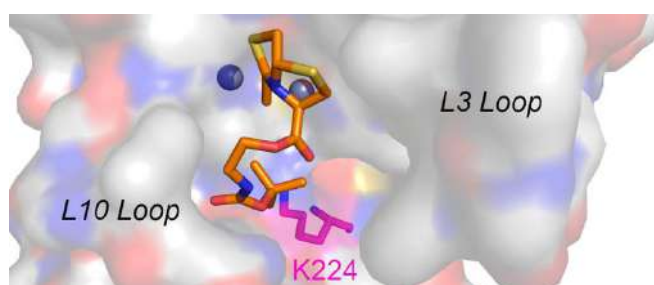


Figura 4.6 Complejo NDM-1:**15g**. Se muestra la superficie de la proteína con el siguiente código de color: N (azul), O (rojo), S (amarillo) y C (blanco). El residuo de K224 se muestra en rosado y el compuesto **15g** en anaranjado.

Los compuestos **15d** y **15e**, ambos con un grupo amina, presentan una unión similar a **15f** (Figura 4.5-D y C, respectivamente). Sin embargo, debido a un pequeño movimiento del biciclo, el S del anillo de tiazolidina ahora interactúa con W87 a través de una interacción S- π . Este tipo de interacción S- π con el residuo de W87 también se observó previamente para complejos de tiazolidinas **3** con MBL, siendo la principal fuerza de estabilización después de la interacción tiolato-Zn²⁺.³⁶ En el caso de los nuevos derivados planteados, también podría contribuir a la unión con NDM-1.

A pesar de la ausencia de una carga positiva, la unión de **15c** (Figura 4.5-F) también es similar a la de **15d** y **15e** con respecto a la posición de la estructura bicíclica y la interacción S- π con W87.

El bicíclico de **15a** (Figura 4.5-H) se gira 180° con respecto a **1a**. El resto de bencilamina contacta con algunos residuos del bucle L3 (M61 y L59) y W87. En la Figura 4.7 se comparan los complejos cristalizados de NDM-1 y

ampicilina³⁷ y bencilpenicilina⁶ hidrolizadas con el complejo *in silico* NDM-1:**15a**. Se observa que la incorporación del grupo bencilamina en el análogo **15a** hace que adopte una posición similar a la cadena lateral de estos antibióticos hidrolizados (Figura 4.7). En este derivado, el anillo aromático se acomodaría en una región hidrofóbica del sitio activo de NDM-1 y establecería interacciones hidrofóbicas fuertes con el bucle L3, que podrían conducir a una mayor potencia inhibitoria.

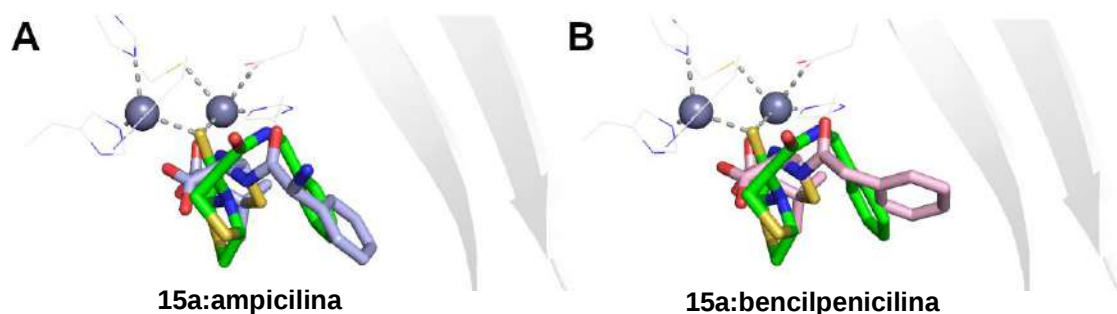


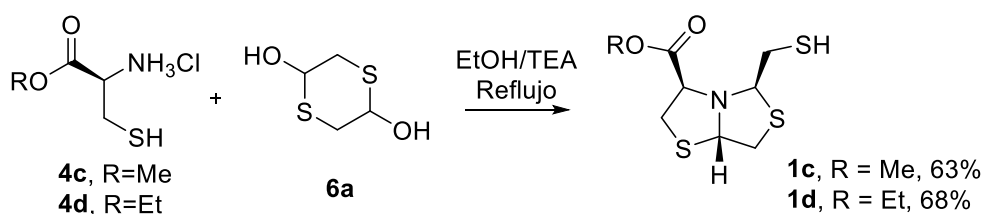
Figura 4.7: Comparación entre el complejo *in silico* NDM-1:**15a** y el complejo cristalino NDM-1:ampicilina hidrolizada (A) y NDM-1:bencilpenicilina (B).

Finalmente, el inhibidor **15b**, con un grupo metoxibencilamina en R, se une de manera diferente (Figura 4.5-G) a todos los análogos antes mencionados. La estructura bicíclica gira 90° en comparación con **1a** y el grupo introducido forma solo un puente de hidrógeno débil con Q119 (3.5 Å).

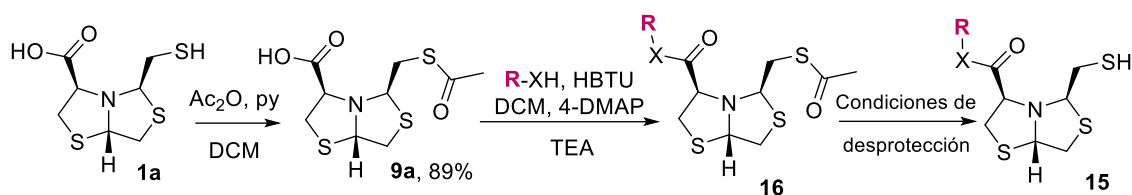
En base a los resultados obtenidos de los estudios de docking, se propone sintetizar los derivados **15a-g** y evaluarlos frente a todas las subclases de MBL para corroborar estos resultados obtenidos *in silico*.

4.3.2 Síntesis de los nuevos derivados

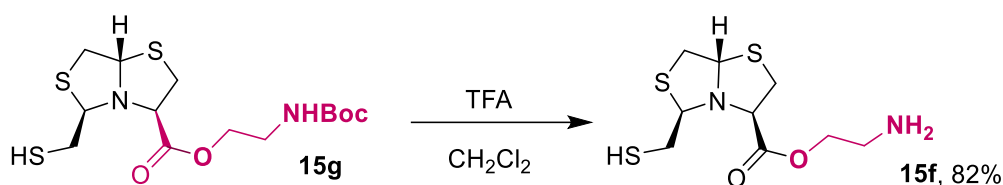
Las estrategias sintéticas para la preparación de los derivados **1c-d** y **15a-f** se muestran en el Esquema 4.1, 4.2 y 4.3.



Esquema 4.1: Síntesis de los derivados **1c** y **1d**.



Esquema 4.2: Secuencia de síntesis de los análogos **15a-g**.

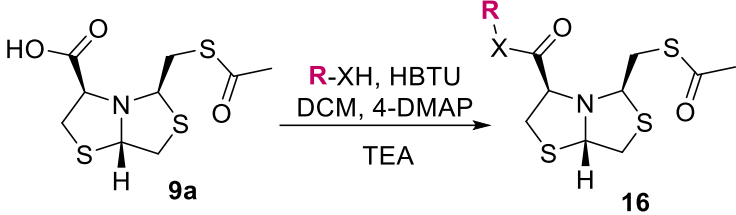
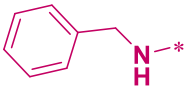
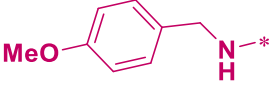
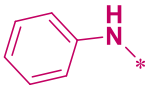
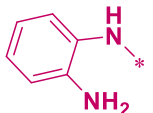
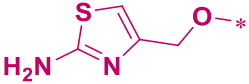


Esquema 4.3: Síntesis de **15f** a partir de **15g**.

Los compuestos **1c-d** se prepararon utilizando una ruta sintética análoga a la utilizada para las BTZ **1a-b**, partiendo de los 2-aminotioles comercialmente disponibles: L-cisteína metil o etil éster, respectivamente, y ditiano **6a**, en un 63 y 68% de rendimiento, respectivamente, Esquema 4.1.

Dado que para la síntesis de los derivados **15a-g** los 2-aminotioles de partida no están disponibles comercialmente, los grupos de interés se introdujeron a partir del biciclo **1a**. Para la síntesis de los análogos **15a-g** se comenzó preparando la bistiazolidina S-acetilada **9a** a partir de **1a** y Ac_2O en piridina, en un 89% de rendimiento, Esquema 4.2. Luego se llevó a cabo la síntesis de ésteres y amidas a partir de **9a** y el alcohol o amina correspondiente utilizando HBTU como agente acoplante, ver resultados en Tabla 4.1

Tabla 4.1: Síntesis de derivados S-acetilados **16** utilizando HBTU como agente acoplante en DCM, rt.

		
Entrada	R-X-*	16, R (%) ^a
1		16a , 38
2		16b , 74
3		16c , 41
4		16d , 56
5		16e , 50
6		16g , 79

^aProductos aislados luego de purificación cromatográfica.

Los derivados **16a-g** S-acetilados se obtuvieron con rendimientos desde 38 a 79%, Tabla 4.1.

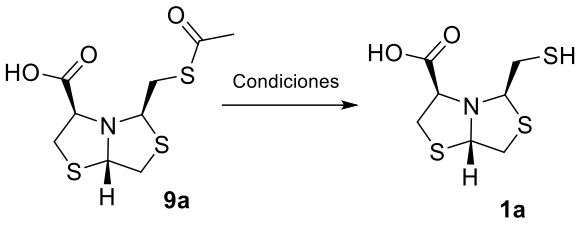
Luego, los compuestos deseados **15a-g** se pueden obtener a partir de sus análogos S-protegidos **16a-g** por desprotección del tioéster. Dado que las bistiazolidinas son sustratos lábiles, la desprotección de los compuestos **16a-g** para regenerar el tiol libre es la etapa clave de esta ruta sintética y debe ser llevada a cabo en condiciones suaves y selectivas. Por ese motivo en este trabajo exploramos varias metodologías de desprotección con el fin de obtener las mejores condiciones para luego aplicarla a los derivados de interés.

4.3.3 Optimización de la reacción de desprotección de tioacetilos

a) Desprotección utilizando métodos clásicos descritos en bibliografía

Para estudiar condiciones de desprotección del grupo tioacetilo en los sistemas bistiazolidina, se utilizó como modelo de estudio la S-acetil BTZ **9a**. En primer lugar, se ensayaron algunos métodos generales descritos en bibliografía, según se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Desprotección de **9a** utilizando métodos clásicos reportados en bibliografía.

		
Entrada	Condiciones	1a, R (%) ^a
1	NaOH 0.2M, EtOH ²⁶	Mezcla compleja
2	NH ₂ OH.HCl, TEA, MeOH ²⁸	33%
3	MeOH, NH ₃ ²⁷	Mezcla compleja
4	NaSMe, CH ₂ Cl ₂ ²⁹	Mezcla compleja

. ^aProductos aislados luego de purificación cromatográfica.

Al utilizar NaOH en EtOH,²⁶ NaSMe en CH₂Cl₂²⁹ o NH₃ en MeOH,²⁷ no se pudo obtener el compuesto **1a** sino que se obtuvo una mezcla compleja de especies, entre ellos productos de oxidación del tiol y probablemente de hidrólisis del anillo de tiazolidina. Utilizando NH₂OH.HCl en MeOH²⁸ se pudo obtener el compuesto **1a** en un 33% de rendimiento.

Con el fin de mejorar estos rendimientos se decidió explorar otras metodologías más suaves de desprotección.

b) Desprotección de tioacetilos por transtioesterificación

Tioles en solución como agentes de desprotección (**Método A**)

En búsqueda de una metodología alternativa para desproteger tioacetilos, nos centramos en el proceso de transtioesterificación o intercambio tiol/tioéster en medio acuoso. En este tipo de reacciones, un grupo tiol ataca al carbonilo de un tioéster, formándose un intermediario tetraédrico que luego puede o bien volver a los materiales de partida o evolucionar al producto transtioesterificado, siendo por lo tanto un proceso reversible, Figura 4.8.

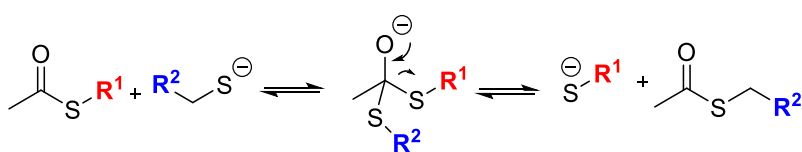
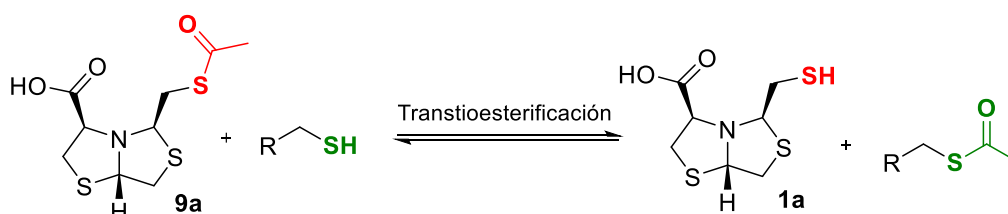


Figura 4.8: Proceso de transtioesterificación.

En primer lugar, se decidió explorar si diferentes tioles disponibles comercialmente eran capaces de desproteger el tioacetilo de **9a** por un mecanismo de transtioesterificación según Esquema 4.4.



Esquema 4.4: Desprotección de tioacetilos mediante transtioesterificación.

Se realizó un screening donde se seleccionaron tioles con diferentes valores de pKa, ver tabla 4.3. Por un lado, se utilizaron alquil-tioles como el ácido tioglicólico (ATG), *n*-propanotiol y β-mercaptoetanol; tioles aromáticos como tiofenol y 2-NH₂-4-Cl-tiofenol, y agentes redox como ditiotretitol reducido (DTT) y glutatión reducido. La reacción se llevó a cabo en buffer a pH 8, ligeramente básico para asegurar un alto porcentaje de tiolato, ya que es un mejor nucleófilo que el tiol, Figura 4.8. No se probaron valores de pH más altos para evitar que ocurran reacciones de oxidación a disulfuros.

Dado que el intercambio tiol-tioéster es un equilibrio, se usaron 2 equivalentes del agente desprotector para desplazar el equilibrio hacia el producto deseado **1a**. Con el fin de encontrar rápidamente el mejor tiol como agente desprotector, el tiempo de reacción se fijó en 30 min, Tabla 4.3. Para verificar que no se produce desprotección en ausencia de tiol, se incubó **9a** en buffer fosfato pH 8, a temperatura ambiente por 30 min. Los resultados del screening se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Screening de tioles para la desprotección de **9a** en buffer fosfato pH 8, rt, 30 min.

Entrada	Tiol (2eq)	pKa (tiol)	1a, R (% , 30 min) ^a	1a, R (% , 24 h) ^a
1	Ácido tioglicólico (ATG)	10.6	56	74
2	<i>n</i> -propanotiol	10.8	8	-
3	β-Mercaptoetanol	9.6	31	-
4	Tiofenol	6.4	7	-
5	2-NH ₂ -4-Cl-tiofenol	5.7	0	-
6	Ditiotreitol (DTT)	9.2	25	-
7	Glutación	8.8	0	-
8	Sin aditivo	-	0	-

^aProductos aislados luego de purificación cromatográfica.

No se observó la formación de **1a** cuando se incubó **9a** en buffer pH 8 en ausencia de tiol (Tabla 4.3, entrada 8). Por otro lado, en presencia de los diferentes tioles tiene lugar la desprotección de **9a** en diferente extensión dependiendo del tiol utilizado para el intercambio.

El bajo rendimiento obtenido cuando se utiliza *n*-propanotiol y β-mercaptoetanol podría explicarse debido a sus valores de pKa particularmente más altos, que conducen a una concentración de tiolato muy baja a pH 8. Sin embargo, de acuerdo con estos resultados, en muchos casos el pKa del tiol parece no estar correlacionado con el potencial de intercambio, sino que existen también otros factores a tener en cuenta, como efectos electrónicos y estructurales. Por ejemplo, el tiofenol o el 2-NH₂-4-Cl-tiofenol también llevaron a

conversiones bajas a pesar de tener un pKa muy bajo, Tabla 4.3, entrada 4 y 5. Este hecho podría explicarse debido a la propensión de los tioles aromáticos a oxidarse a disulfuros rápidamente.³⁸ Además, poseen un tiolato cuya carga negativa puede participar de la resonancia del anillo aromático y, por lo tanto, está menos disponible para un ataque nucleofílico. Otro factor a tener en cuenta es su baja solubilidad en buffer pH 8 que también parece jugar un papel significativo.

El potencial redox también parece ser importante, principalmente debido a la inestabilidad del agente de desprotección en estas condiciones. Por ejemplo, el DTT es un agente reductor muy potente,³⁹ tiene un valor de pKa de 9,2 y 10,1 y un potencial redox de -0,33 V frente a un electrodo de hidrógeno estándar a pH 7,0 y 25 °C.⁴⁰ Lo mismo sucede cuando se usa glutatión reducido. Los bajos rendimientos obtenidos para ambos tioles podrían deberse a sus bajos potenciales redox, que los hacen susceptibles a la oxidación, afectando negativamente tanto la velocidad como el rendimiento del intercambio.

El mejor resultado fue obtenido utilizando el ATG como tiol de intercambio, con un rendimiento de 56% (Tabla 4.3, entrada 1). La mayor velocidad de reacción podría deberse a la presencia del ácido carboxílico cercano al grupo tiol. Danehy y col. explican en su trabajo que el ácido carboxílico promueve efectos entrópicos importantes.⁴¹ A pH 8, el grupo carboxilato está completamente desprotonado, de modo que el ATG posee dos cargas negativas separadas por una distancia corta, especie altamente solvatada. Sin embargo, el producto de la reacción luego del intercambio (ATG S-acetilado) es un anión de una sola carga y debería estar mucho menos solvatado. La reacción consume entonces una especie altamente solvatada para formar una especie menos solvatada con la liberación de un número considerable de moléculas de solvente. Esto resulta entrópicamente favorable, favoreciendo así la reacción de intercambio.

En base a los resultados obtenidos en el screening, se seleccionó el ATG como agente de desprotección y se extendió el tiempo de reacción a 24 h. A este tiempo de reacción la desprotección de **9a** fue completa, con un rendimiento del 74% (Tabla 4.3, entrada 1).

Desarrollo de un reactivo soportado en polímero para desproteger tioacetilos (Método B)

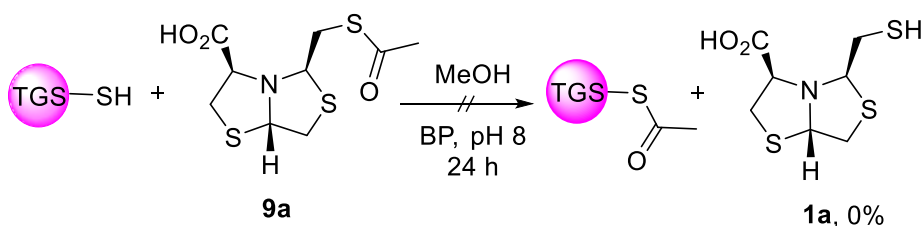
Pese a que utilizando ATG en solución (método A) se lograron mejorar los rendimientos de obtención de **1a** (74%) respecto al método utilizando $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ en MeOH (33%), se debe tener en cuenta que se utiliza un exceso de reactivo que podría llevar a que el paso de purificación sea problemático en algunos casos.

Se decidió entonces explorar como enfoque alternativo, la síntesis de un reactivo soportado en polímero capaz de desproteger tioacetilos. A diferencia de la síntesis en fase sólida convencional, el reactivo/catalizador está anclado a un soporte sólido y produce una transformación química en un sustrato que está presente en solución.⁴² Este enfoque tiene ventajas sobre la síntesis convencional en fase de solución, como la simplificación de la etapa de purificación y el reciclaje del catalizador. El reactivo soportado puede ser usado en exceso para forzar el avance de la reacción y luego separarse del medio de reacción por simple filtración. Además, tiene la ventaja de la síntesis en fase de solución, ya que permite monitorear fácilmente el progreso de la reacción utilizando técnicas convencionales, como TLC o HPLC, evitando el paso de escisión de las reacciones en fase sólida.⁴³

Existen varios ejemplos de bibliografía en donde utilizan reactivos y scavengers soportados en fase sólida para llevar a cabo diferentes transformaciones químicas. Kobayashi y col. describieron un reactivo de ácido sulfónico soportado en poliestireno capaz de hidrolizar tioésteres en agua a reflujo.⁴⁴ Sin embargo, estas condiciones resultarían demasiado drásticas para las bistiazolidinas. Otro ejemplo es el descrito por Liguori y col., en donde prepararon ATG unido a un polímero, útil para desproteger α -aminoácidos protegidos con N-nosilo. La reacción se lleva a cabo en DCM, utilizando una resina de Wang como soporte sólido.⁴⁵

Con el objetivo de desarrollar un reactivo en soporte sólido para la desprotección del grupo S-Aceto en medio buffer acuoso, seleccionamos las resinas Tentagel® (TG) a base de PEG que tienen una amplia compatibilidad con disolventes acuosos y orgánicos.^{46,47}

Existe una amplia variedad de resinas TG disponibles comercialmente. En primer lugar, utilizamos una resina conteniendo una funcionalidad tiol libre (TGS-SH, 0,2-0,3 meq/g, 130 μ m), que podría ser útil para la desprotección de tioésteres a través de un intercambio de tiol/tioéster, tal como sucede con el ATG en solución. Se llevó a cabo la reacción de intercambio usando 2 equivalentes de resina TGS-SH y **9a** como material de partida, disuelto en una mezcla 1:9 MeOH:buffer pH 8, Esquema 4.5.



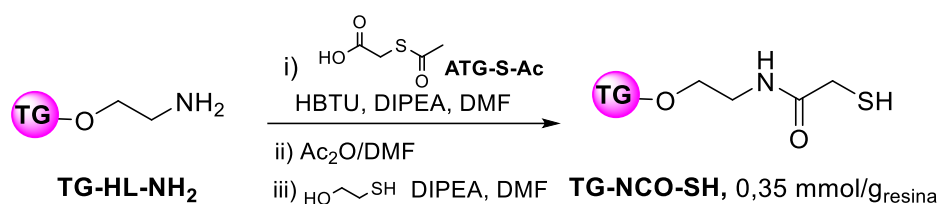
Esquema 4.5: Reacción de desprotección de **9a** utilizando la resina TGS-SH.

En estas condiciones, no se detectó **1a** en el crudo de reacción luego de 24 h, sino que se recuperó el material de partida **9a** sin reaccionar.

Dado que la distancia entre el tiol y el soporte sólido podría ser crítica para la reacción de desprotección, decidimos explorar el uso de un sistema resina-linker. Esto permite separar el grupo funcional activo del polímero insoluble, disminuyendo factores estéricos que podrían estar afectando la reacción de desprotección.

En base a los resultados obtenidos con ATG en solución para la desprotección de **9a**, decidimos explorar su utilidad anclado a un soporte sólido en fase heterogénea. El anclaje del ATG al soporte podría realizarse fácilmente a través de su funcionalidad ácido carboxílico, el cual puede formar, por ejemplo, un enlace amida con una funcionalidad amina presente en un soporte sólido. El ATG actuaría como linker y además contiene la funcionalidad tiol libre.

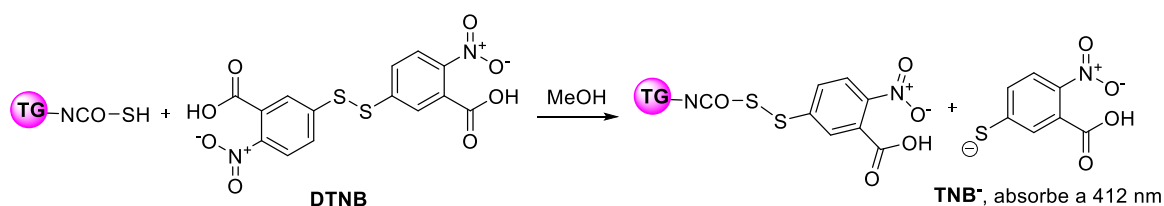
Se seleccionó la resina TG-HL-NH₂ conteniendo una funcionalidad amina libre como soporte sólido para el anclaje del ATG. La resina se convirtió en el derivado 2-mercaptoamida correspondiente (TG-NCO-SH) en tres pasos de reacción según se muestra en el Esquema 4.6.



Esquema 4.6: Anclaje del reactivo TGA en soporte sólido TG-HL-NH₂ para dar TG-NCO-SH.

Primero, se ancló el ATG S-acetil protegido (ATG-S-Ac) al soporte sólido utilizando HBTU como agente acoplante (2 ciclos x 30 min).⁴⁸ Se utilizó el test de ninhidrina para verificar que la reacción de acilación se completó (prueba de ninhidrina negativa), según el método de Kayser reportado en bibliografía.⁴⁹ En segundo lugar, se realizó el capping de los grupos amina libres residuales por tratamiento con anhídrido acético en DMF (2 ciclos, 15 min).⁵⁰ Por último, el reactivo TG-NCO-SH se generó por escisión tiolítica empleando un método descrito para fase sólida (2-mercaptoetanol/DIPEA/DMF 1:1:18).⁵¹

Una vez preparado el reactivo soportado en polímero TG-NCO-SH, se llevó a cabo la cuantificación de tioles totales (carga del soporte sólido) utilizando la metodología reportada por Badyal y col., basada en el reactivo de Ellman.⁵² Este método se basa en la reacción del ácido ditionitrobenzoico (DTNB) con los grupos tiol libre del reactivo sólido produciendo el anión coloreado 5-tio-3-nitrobenzoato (TNB⁻) el cual se cuantifica por espectrofotometría a 412 nm ($\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Esquema 4.7.⁵³



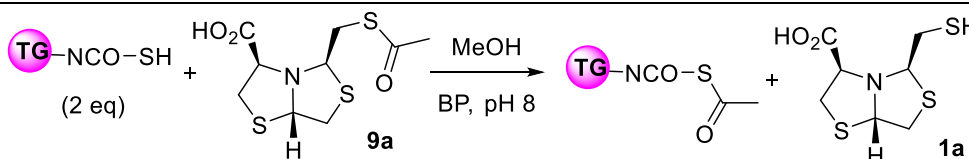
Esquema 4.7: Cuantificación de tioles en fase sólida basada en el reactivo de Ellman (DTNB).

Utilizando esta metodología se determinó una carga de tioles de 0,35 mmol/g_{resina},

Con el fin de encontrar rápidamente las condiciones óptimas para la reacción de desprotección, la metodología de trabajo se basó en la miniaturización de reacciones, tal como se detalló en el Capítulo 3.

De esta manera se llevó a cabo un screening a pequeña escala (5 mg) de la reacción de intercambio usando 2 equivalentes de la resina TG-NCO-SH y **9a** como material de partida, disuelto en una mezcla 1:9 MeOH/buffer pH 8, Tabla 4.4. Se tomaron alícuotas para su análisis por HPLC a diferentes intervalos de tiempo (2, 6 y 24 h).

Tabla 4.4: Optimización del tiempo para la desprotección de **9a** utilizando el reactivo en soporte sólido TG-NCO-SH (2 eq.) en MeOH:Buffer pH 8 (1:9), rt, a escala 5 mg y escala 20 mg.

		
Tiempo (h)	Escala analítica (5 mg) 1a, R_{HPLC} (%)	Escalado (20 mg) 1a, R (%) ^a
2	40	-
6	55	-
24	93	90

^aProductos aislados luego de purificación cromatográfica.

Los resultados mostraron que luego de 24 h, la conversión de **9a** en **1a** fue >99% y el rendimiento del 93%, determinado por HPLC utilizando un estándar externo de **1a**, ver Tabla 4.4. Una vez establecido el tiempo óptimo, la reacción de desprotección de **9a** se escaló (20 mg) para validar el screening a pequeña escala y se obtuvo el producto **1a** por filtración y extracción en un 90% de rendimiento sin purificación adicional, Tabla 4.4.

Luego del escalado de la reacción de desprotección, decidimos explorar si el reactivo TG-NCO-SH podría ser reciclado y reutilizado para siguientes desprotecciones. Para ello, la resina fue lavada con MeOH y regenerada mediante escisión tiolítica empleando 2-mercaptoetanol/DIPEA/DMF 1:1:18, Tabla 4.5.⁵¹

Tabla 4.5: Regeneración-reutilización del reactivo TG-NCO-SH para la desprotección de **9a**.

Ciclo	1a , R _{HPLC} (%)	Carga de la resina (mmol/g _{resina}) ^a
1	90	0.35
2	93	0.33
3	93	0.32
4	89	0.33
5	90	0.32
6	87	0.30

^aCalculado según cuantificación de tioles en fase sólida basada en el reactivo de Ellman

Se realizaron en total cinco ciclos de regeneración-reutilización para la desprotección de **9a**. La cuantificación de tioles utilizando el método de Ellman indicó en cada etapa que la regeneración fue completa y que la carga de tior se mantiene constante luego de cada ciclo, Tabla 4.5. Los resultados mostraron que la resina TG-NCO-SH se puede reutilizar al menos cinco veces sin perder significativamente la actividad, obteniendo **1a** en rendimientos entre 87 y 93% determinados por HPLC, ver Tabla 4.5.

c) Desprotección utilizando 2-aminotioles (**Método C**)

Si bien el uso del ATG, tanto en fase homogénea como en fase heterogénea resultó útil para la desprotección de **9a**, este método tiene como desventaja que los tiempos de reacción son largos. Este aspecto puede ser crucial cuando el compuesto que contiene el tior libre tiene una alta tendencia a oxidarse en buffer a pH ligeramente básico. Es por este motivo que nos enfocamos en la búsqueda de agentes de desprotección alternativos que nos permitan obtener los mismos resultados, pero en menor tiempo de reacción.

El proceso de transtioesterificación se ha visto involucrado en muchos procesos químicos, como por ejemplo en Native Chemical Ligation o NCL, un método muy utilizado para la formación de enlaces amidas en la síntesis péptidos. La primera etapa de esta metodología consiste en una reacción de

transtioesterificación entre un tioéster C-terminal de un péptido A y un grupo tiol de un residuo de cisteína N-terminal de un péptido B en buffer pH 7, formándose un nuevo tioéster intermediario, ver Figura 4.9. Luego se da una transferencia intramolecular del acilo del azufre al nitrógeno, dando lugar a la formación de un enlace amida en forma regio y quimioselectiva. La formación del enlace amida es irreversible y desplaza el equilibrio hacia los productos, volviendo el proceso muy eficiente.^{54,55,56,57}

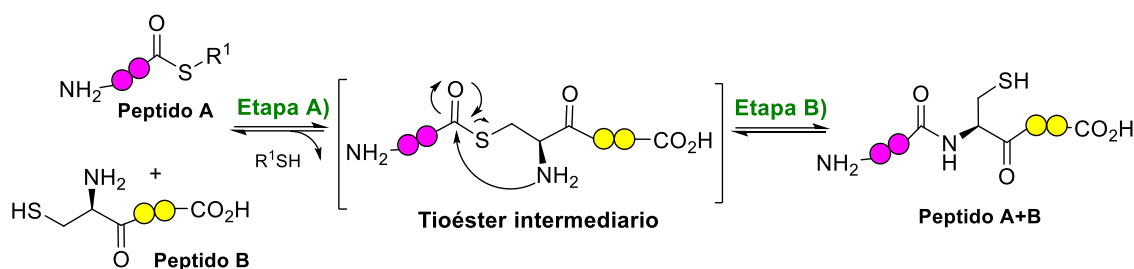
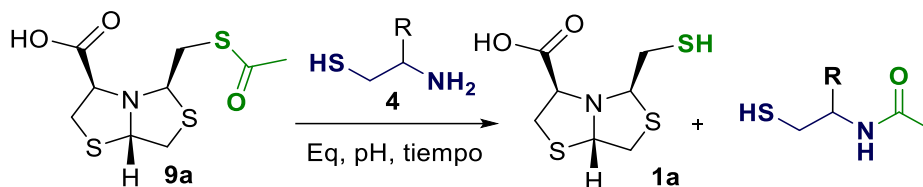


Figura 4.9: Síntesis de péptidos usando el enfoque Native Chemical Ligation (NCL). Etapa A: Transtioesterificación. Etapa B: transferencia 1,5-S,N-acilo.

Con estos antecedentes, decidimos explorar la habilidad de distintos 2-aminotioles **4** para desproteger tioacetilos a través de un mecanismo análogo al que sucede en NCL, según Esquema 4.8.



Esquema 4.8: Screening a escala analítica para la desprotección de **9a** utilizando diferentes 2-aminotioles **4**, eq, pH y tiempo.

Nuevamente se utilizó como metodología de trabajo la miniaturización de reacción para explorar una amplia gama de condiciones en paralelo. Se realizó un screening a pequeña escala de la reacción de desprotección de **9a** variando el pH del medio, el 2-aminotiol **4**, los equivalentes de agente de desprotección y el tiempo de reacción.

Existen descriptos estudios experimentales y computacionales que respaldan el hecho de que el tiolato es la especie nucleofílica en NCL.⁵⁸ Por ese

motivo, en primer lugar seleccionamos la L-cisteína etil éster (L-CysOEt, **4d**) como 2-aminotiol de intercambio, que contiene un tiol con un valor de pKa de 6.5.⁵⁹ De acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbach, la relación de la especie L-CysOEt SH/S⁻ es 1/2.5 en H₂O a pH 7.3.⁶⁰ Por lo tanto, resultaría útil para trabajar a pH neutros o levemente básicos, manteniendo una alta concentración de tiolatos. El screening se realizó en un rango de pH de 5 a 8.

Dado que se requiere un exceso del agente desprotector para llevar el equilibrio hacia el producto deseado, los equivalentes de L-CysOEt utilizados en el screening fueron: 1, 2, 6 y 10. A intervalos adecuados de tiempo (entre 0,5 y 6 h) se tomaron alícuotas de las reacciones y se diluyeron para análisis por HPLC. Los rendimientos fueron calculados a través de una técnica validada utilizando un estándar externo de **1a**, ver Tabla 4.6.

Tabla 4.6: Rendimientos para la reacción de desprotección de **9a** utilizando buffer acuosos y L-Cys-OEt. pH: 5-8; equivalentes: 1-10; tiempo: 0.5-6 h.

Tiempo Eq.	pH 5		pH 6		pH 7		pH 8	
	2h	6h	2h	6h	2h	6h	0.5 h	2h
1	4	14	16	26	53	36	39	71
2	9	26	20	30	76	60	68	90
6	22	53	23	40	76	58	-	-
10	38	71	25	43	77	62	-	-
0	0	0	0	0	0	0	0	0

Código de colores: rojo 0-19 % de rendimiento, naranja 20-39 %, amarillo 40-59 %, verde claro 60-80 %, verde 80-100. Los rendimientos se determinaron por HPLC.

Los resultados muestran que L-CysOEt es un agente desprotector adecuado, sobre todo a valores de pH 7 y 8. Por otro lado, las reacciones realizadas a pH 5 y 6 proporcionaron los rendimientos más bajos, incluso cuando se utilizaron más equivalentes o tiempos de reacción más prolongados, Tabla 4.6. Esto sugiere una dependencia entre la cantidad de tiolato y la velocidad de

reacción. En general, las mejores condiciones para la desprotección de **9a** se lograron usando 2 equivalentes de L-CysOEt a pH 8, para dar **1a** con un rendimiento del 90 % luego de 2h. De esta manera, se obtuvieron resultados similares al método A y B que utiliza ATG (74% y 93% para fase homogénea y heterogénea, respectivamente) pero en un tiempo considerablemente menor (2 h vs 24 h).

En base a estos resultados, decidimos extender el screening a otros 2-aminotioles como la L-cisteína (L-Cys, **4a**) y cisteamina (Cym, **4e**) para la desprotección de **9a**. Para estos 2-aminotioles el tiol tiene un valor de pKa de 8.3 y 8.2,⁶¹ respectivamente. Por lo tanto, para asegurar una cantidad significativa de tiolato, la reacción se realizó a pH 7 y 8 y el tiempo de reacción entre 0.25 y 2 h utilizando 2 equivalentes del 2-aminotiol, ver Tabla 4.7.

Tabla 4.7: Reacción de desprotección de **9a** utilizando L-cisteína etil éster, L-cisteína y cisteamina. pH: 7-8; equivalentes: 2; tiempo: 0.25-2 h.

R = H, COOH

pH	Tiempo (h)	1a, R _{HPLC} (%)		
		L-CysOEt	L-Cys	Cym
7	0.5	-	64	69
	1	-	80	79
	2	76	90	84
8	0.25	-	62	62
	0.5	68	83	89
	1	-	78	73
	2	90	-	-

Código de colores: rojo 0-19 % de rendimiento, naranja 20-39 %, amarillo 40-59 %, verde claro 60-80 %, verde 80-100. Los rendimientos se determinaron por HPLC.

Se obtuvieron resultados similares para ambos 2-aminotioles L-Cys y Cym y mejores que para la L-Cys-OEt. En general, Cym fue el mejor agente de desprotección: a pH 8 después de 30 min se obtuvo **1a** en un 89% de

rendimiento, Tabla 4.7, mismo rendimiento que utilizando L-Cys-OEt, pero en menor tiempo de reacción (2 h frente a 30 min).

Una vez que se establecieron las mejores condiciones (pH 8, 2 eq, 30 min), se escaló la reacción para la desprotección de **9a** usando los 2-aminotioles: L-CysOEt, L-Cys y Cym, Tabla 4.8.

Tabla 4.8: Escalado de la reacción de desprotección de **9a** utilizando los 2-aminotioles: L-cisteína, L-cisteína etil éster y cisteamina (pH 8, 2 eq., 30 min).

2 eq, pH 8, 30 min
R = H, COOH, CO₂Et

2-aminotiol, 4	Escalado	Screening
	1a , R _{aislado} (%) ^a	1a , R _{HPLC} (%)
L-Cys, 4a	75	83
L-Cys-OEt, 4d	65	68
Cym, 4e	78	89

^aProductos aislados luego de purificación cromatográfica.

Los rendimientos aislados de **1a** luego de la purificación por cromatografía en columna fueron 65%, 75% y 78 % respectivamente, Tabla 4.8. Estos resultados se correlacionan bien con los rendimientos determinados por HPLC en el screening a pequeña escala: 68 %, 83 % y 89 % respectivamente.

Estudios mecanísticos

En NCL se describe que la presencia de una amina en posición beta permite una migración intramolecular de acilo desde el azufre al nitrógeno, liberando nuevamente el grupo tiol, Figura 4.9. La formación de la amida en la etapa final desplaza el equilibrio irreversiblemente hacia los productos.⁵⁸ Cuando se usan 2-aminotioles para la desprotección del tioéster, podría estar ocurriendo un proceso análogo.

Para obtener información acerca del mecanismo de la desprotección, se realizaron una serie de experimentos de RMN. En primer lugar, se llevó a cabo

la reacción de desprotección de **9a** en un tubo de RMN en buffer fosfato pH 8 utilizando: a) Cisteamina (Cym, 2 eq); b) Etilendiamina (EDA, 2 eq); y c) Ácido Tioglicólico (ATG, 2 eq). Se adquirió el espectro de ^1H RMN para todas las condiciones a los 40 min de incubación a temperatura ambiente, ver Figura 4.10 y 4.11.

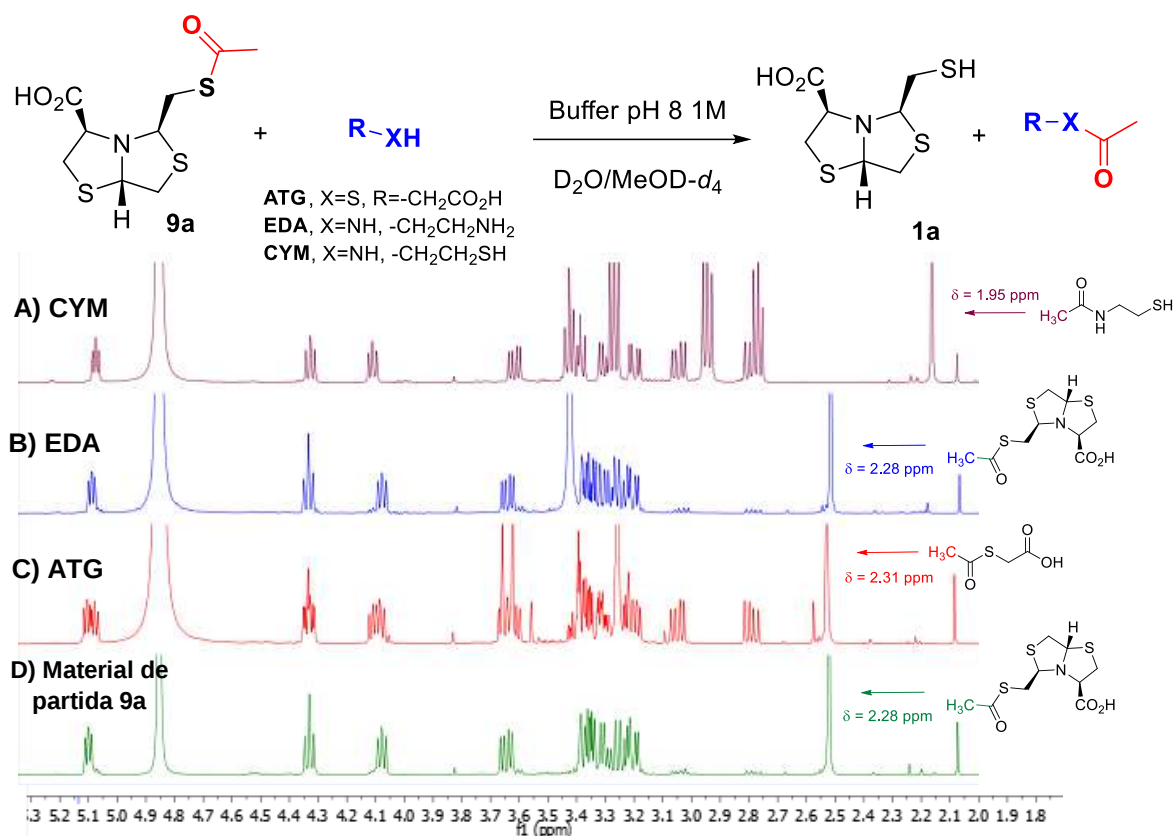


Figura 4.10: Comparación de los espectros de ^1H -NMR para la reacción de desprotección de **9a** usando diferentes agentes de desprotección. En todos los casos la reacción se llevó a cabo partiendo de **9a** (0.04 mmol) en D_2O , buffer fosfato 1 M a pH 8 y $\text{MeOD-}d_4$ (10 %) a 27 °C después de 40 min: A) Cym (0.08 mmol); B) etilendiamina EDA (0.08 mmol); C) ATG (0.08 mmol) y D) Material de partida **9a**.

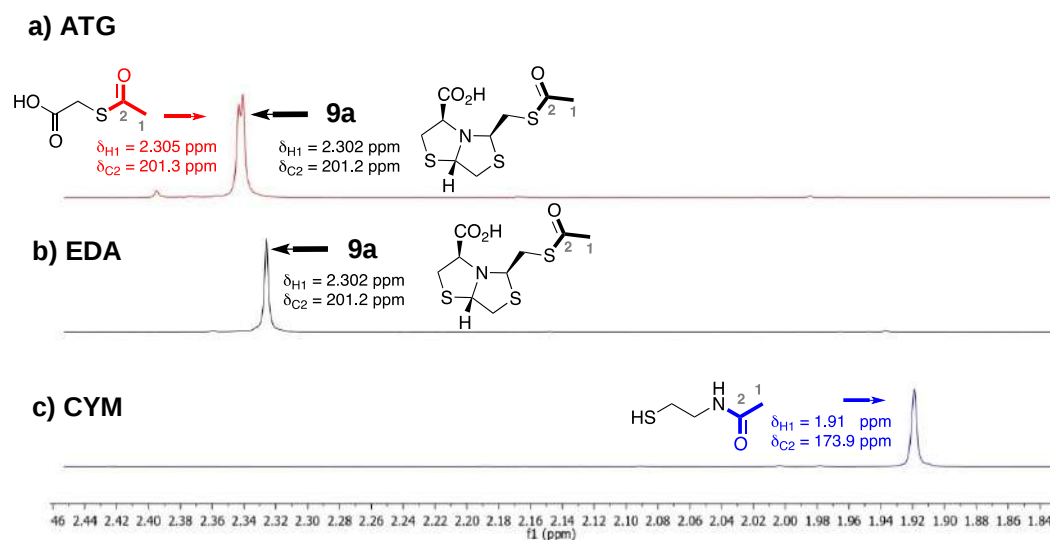


Figura 4.11: Comparación de los espectros de ^1H -NMR para la reacción de desprotección de **9a** usando diferentes agentes de desprotección. En todos los casos la reacción se llevó a cabo partiendo de **9a** (0.04 mmol) en D_2O , buffer fosfato 1 M a pH 8 y MeOD-d_4 (10 %) a 27 °C después de 40 min: a) ATG (0.08 mmol); b) etilendiamina EDA (0.08 mmol); c) Cym (0.08 mmol). El desplazamiento químico de ^{13}C de los átomos de C2 se obtuvo a partir de las correlaciones de $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC con los respectivos protones del grupo acetilo.

Al utilizar ATG, luego de 40 min de incubación se observa en el espectro de ^1H RMN que la conversión de **9a** a **1a** es de aproximadamente el 50%, Figura 4.10 y 4.11a. La presencia de un singulete a 2.305 ppm en el espectro de ^1H RMN se corresponde con el S-acetilo del ácido tioglicólico, que posee una correlación $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC con un carbono a 201.3 ppm, característico de tioésteres, Figura 4.11a. Esto confirma que en estas condiciones el principal mecanismo de desprotección es la transtioesterificación.

Por otro lado, cuando se usó etilendiamina, no se observó transformación de **9a** a **1a** en el crudo de reacción después de 40 min de incubación (Figura 4.10 y 4.11b). Este resultado indicó que solo el grupo amina no es capaz desproteger el tioéster.

Finalmente, cuando se utilizó Cym, se observó una desprotección completa del tioéster **9a** a **1a** luego de 40 min de incubación, Figura 4.10 y 4.11c. En el espectro de ^1H RMN se observa un singulete a 1.91 ppm que posee una correlación $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC con un carbono a 173.9 ppm, característico de amidas

y no de tioésteres, Figura 4.11c. Por lo tanto, se trataría de la cisteamina N-acetilada.

Con el fin de estudiar la cinética de desprotección con ATG se realizó un segundo experimento donde se incubó **9a** en buffer fosfato pH 8 y ATG (2 eq), y se adquirió el espectro de ^1H RMN a diferentes tiempos: 0, 5, 40 min y 9 h, Figura 4.12.

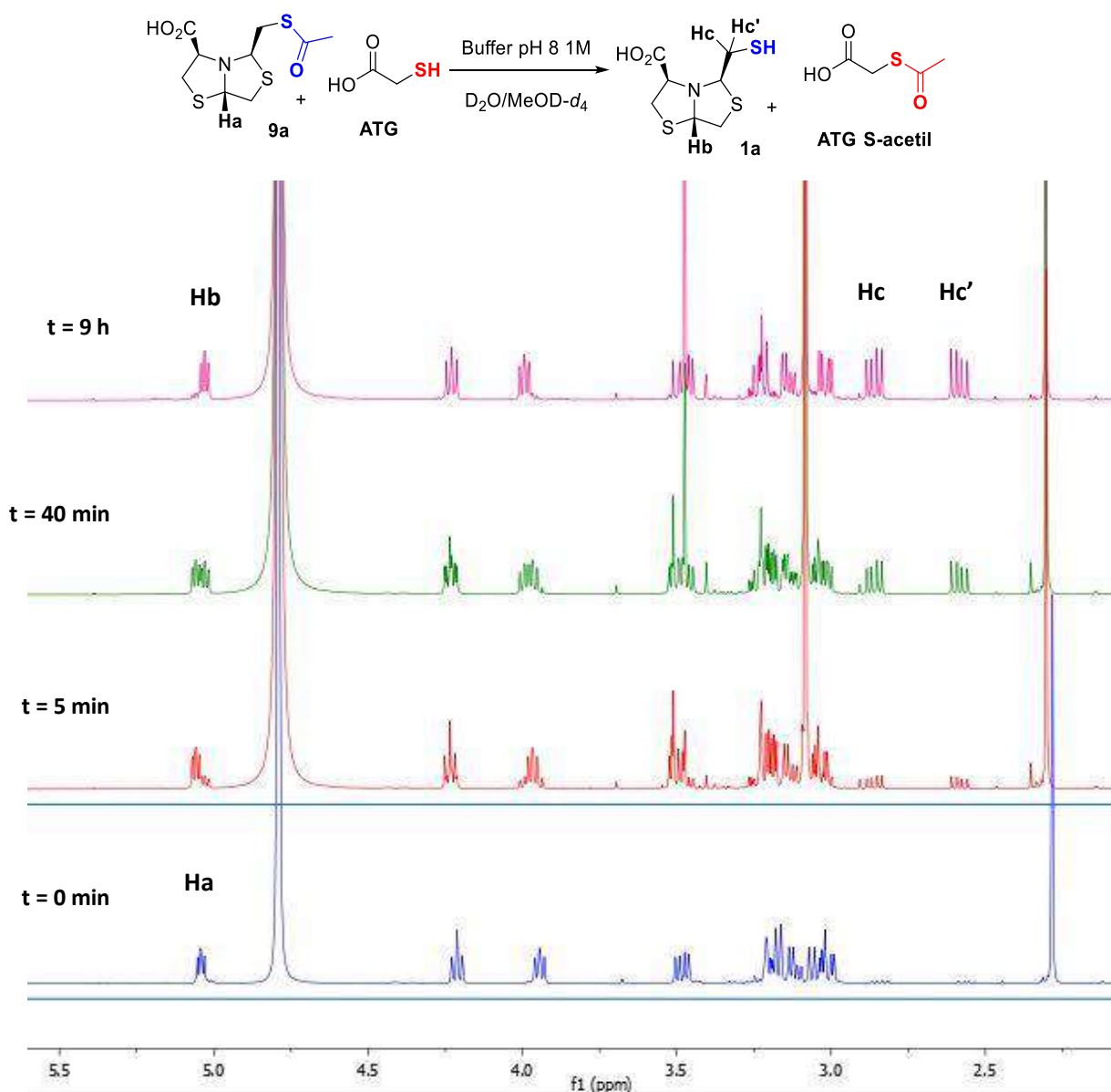


Figura 4.12: Espectros de ^1H RMN de la reacción de desprotección de **9a** (0,04 mmol) en D_2O , buffer fosfato 1 M a pH 8 y MeOD- d_4 (10 %) a 27 °C usando ATG (0,08 mmol) como catalizador, a tiempos: 0, 5, 40 min y 9 h.

Según estos experimentos, se observa que utilizando ATG como agente desprotector, luego de 9 horas se completa la reacción de desprotección de **9a** para dar **1a**, evidenciado por la aparición de los protones Hc y Hb y desaparición de Ha, Figura 4.12. Este tiempo es notoriamente mayor que cuando se utiliza Cym, que requiere 40 min de incubación para una desprotección completa de **9a**.

En base a los resultados obtenidos y los numerosos estudios del mecanismo NCL,^{58,55} proponemos un mecanismo de desprotección con cisteamina que involucra como primer paso, una transtioesterificación que transcurre a través de la formación de un intermediario tetraédrico (Figura 4.13, Etapa I). Este es un intermediario común para la desprotección de tioésteres cuando se utilizan tanto 2-aminotioles como tioles que carecen del grupo amino.

El segundo paso implica una transferencia S,N-acilo, que podría proceder mediante una ciclación 5-endo-trig para formar un intermediario de tiazolidina (Figura 4.13, Etapa II), en forma análoga a lo que ocurre en NCL, dando lugar a la formación de N-acetil cisteamina.

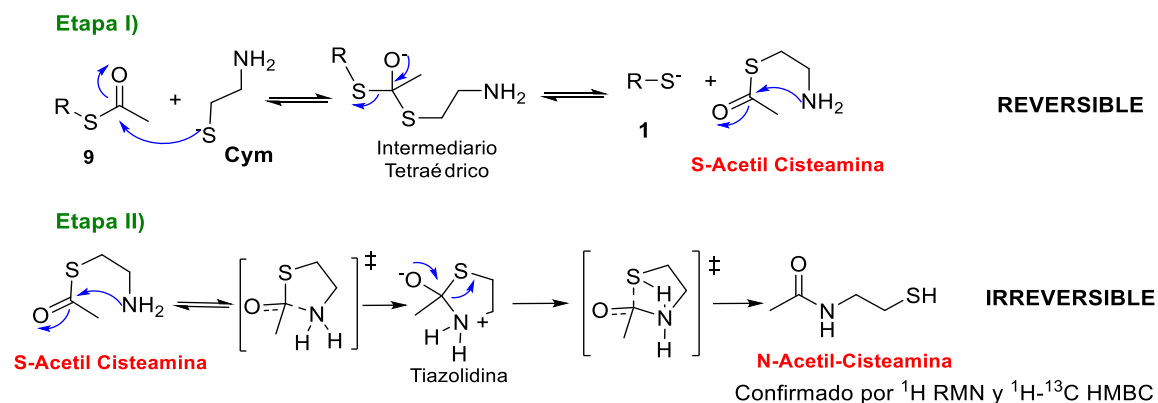


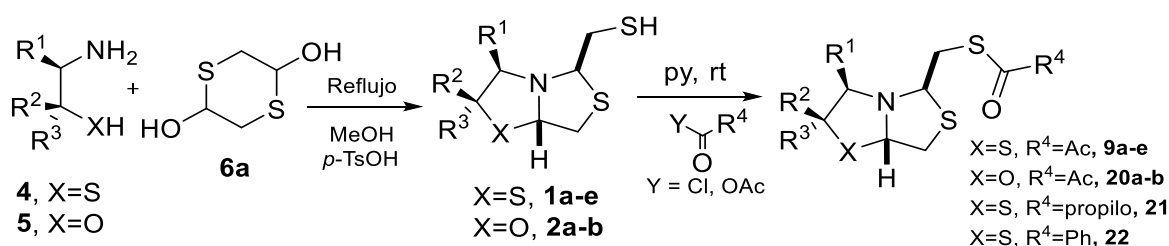
Figura 4.13: Propuesta de mecanismo: Etapa I) intercambio tiol-tioéster reversible a través de un intermediario tetraédrico; Etapa II) Transferencia S,N-acilo irreversible mediante la formación de un intermediario de tiazolidina.

En resumen, el paso de transtioesterificación es reversible, mientras que la transferencia S,N-acilo es irreversible, desplazando el primer equilibrio hacia los productos **1a** y N-acetil cisteamina, y este hecho explicaría el aumento en la velocidad de reacción cuando se utilizan 2-aminotioles.

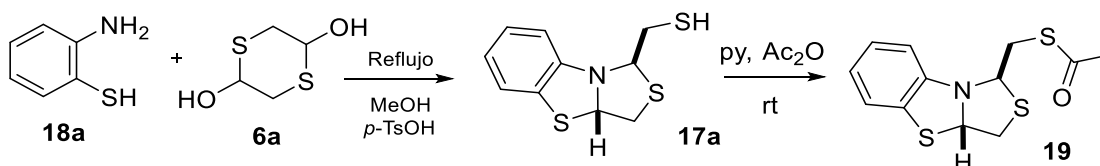
Alcance de la reacción de desprotección

Una vez obtenidas las mejores condiciones de desprotección, se decidió estudiar el alcance de esta metodología a otras S-acil bistiazolidinas, S-acetil oxazolidinil-tiazolidinas y S-acetil benzotiazolidinas.

Para ello, en primer lugar, se sintetizaron las BTZ **1b-e**, la benzobistiazolidina (BNTZ) **17a** y las oxazolidinil-tiazolidinas (OTZ) **2a-b**, partiendo de 2-aminotioles **4**, 2-aminotiofenol **18a** y 2-aminoalcoholes **5**, respectivamente, según se muestra en los Esquemas 4.9 y 4.10. Luego, se prepararon las S-acetil BTZ **9b-e**, la S-acetil BNTZ **19** y las S-acetil OTZ **20a-b** usando Ac_2O y py a temperatura ambiente. También se prepararon los compuestos S-butil BTZ **21** y S-benzoil BTZ **22** usando el correspondiente cloruro de acilo y TEA en CH_2Cl_2 , Esquema 4.9. Los rendimientos se muestran en la Tabla 4.9.



Esquema 4.9: Ruta de síntesis para la obtención de los de S-acetil BTZ **9a-e**, S-acetil OTZ **20a-b**, S-butil BTZ **21** y S-benzoil BTZ **22**.



Esquema 4.10: Ruta de síntesis para la obtención de la S-acetil BNTZ **19**.

Tabla 4.9: Síntesis de S-acetil BTZ **9a-e**, S-acetil BNTZ **19**, S-acetil OTZ **20a-b**, S-butilil BTZ **21** y S-benzoil BTZ **22**.

R^1
 R^2
 R^3
4, X=S
5, X=O

6a

Reflujo
MeOH
p-TsOH

py, rt
Y-C(=O)R⁴

Producto	X	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Y	R (%) ^a
9a	S	-COOH	-H	-H	-Ac	-OAc	89
9b	S	-COOH	-CH ₃	-CH ₃	-Ac	-OAc	62
9d	S	-COOEt	-H	-H	-Ac	-OAc	71
9e	S	-H	-H	-H	-Ac	-OAc	65
19	S	Ar-fusionado	-	-	-Ac	-OAc	79
20a	O	-COOMe	-H	-CH ₃	-Ac	-OAc	79
20b	O	-Ciclohexil	-H	-H	-Ac	-OAc	62
21	S	-H	-H	-H	-Propilo	-Cl	69
22	S	-COOH	-H	-H	-Ph	-Cl	71

^aProductos aislados luego de purificación cromatográfica.

Los compuestos S-protegidos deseados se obtuvieron en rendimientos entre 62 y 89%, Tabla 4.9

Luego, se llevó a cabo la reacción de desprotección de los derivados S-protegidos en fase homogénea (Método A y C) y en fase heterogénea (Método B) en las condiciones optimizadas, para comparar los rendimientos, ver Tabla 4.10.

Tabla 4.10: Rendimientos de desprotección usando: Método A (2 eq. ATG, MeOH:BF pH 8 (1:9), 24 h); Método B (2 eq. TG-NCO-SH, pH 8 (1:9), 24 h y Método C (2 eq. Cym, MeOH:BF pH 8 (1:9), 30 min.

R (%) ^a				
S-acil	Producto	Método A: ATG en solución	Método B: TG-NCO-SH	Método C: Cym en solución
9a	1a	74	90	78
9b	1b	71	92	84
9d	1d	56	66	59
9e	1e	77	79	80
19	17a	51	66	59
20a	2a	69	68	80
20b	2b	53	65	61
21	1e	58	61	51
22	1a	75	76	78

^aProductos aislados luego de purificación cromatográfica.

Los resultados obtenidos muestran que los tres métodos son adecuados para la desprotección de las S-acetil BTZ **9b-e**, S-acetil BenTZ **19**, S-butilil BTZ **21**, S-benzoil BTZ **22** y S-acetil OTZ **20a-b** para dar los tioles libres, Tabla 4.10.

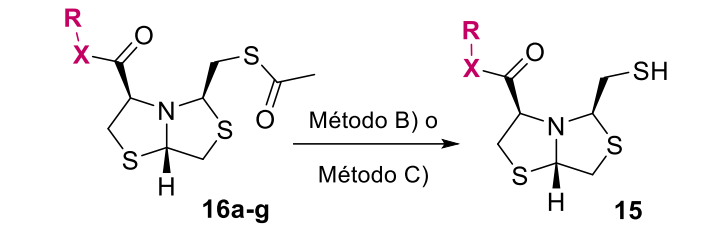
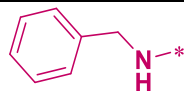
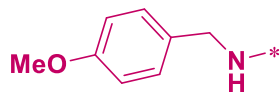
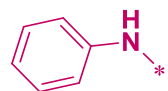
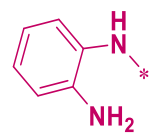
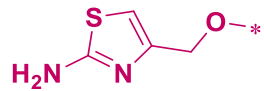
El ATG en solución condujo a rendimientos que varían desde 53 al 77%, mientras que ATG anclado al soporte sólido condujo a los tioles libres en rendimientos que varían desde 61 al 90%. Al usar ATG soportado en polímero, se observó una notoria mejora del rendimiento del 20% para los tioésteres **9a-b**; mientras que se obtuvieron rendimientos similares para todos los demás sustratos.

Cuando se usó el método C (cisteamina como agente desprotector) se obtuvieron rendimientos desde 51 a 84%, resultados similares a los obtenidos con el método A y B, pero en un tiempo significativamente menor (24 h vs 30 min).

Desprotección de los derivados **16**

Una vez optimizadas las condiciones de desprotección, se exploró el uso de los métodos B y C para la desprotección de los derivados S-acetilados **16**, Tabla 4.11.

Tabla 4.11: Desprotección de **16** usando a) Método B: 2 eq. TG-NCO-SH, pH 8 (1:9), 24 h y b) Método C: 2 eq. Cym, MeOH:BF pH 8 (1:9), 30 min.

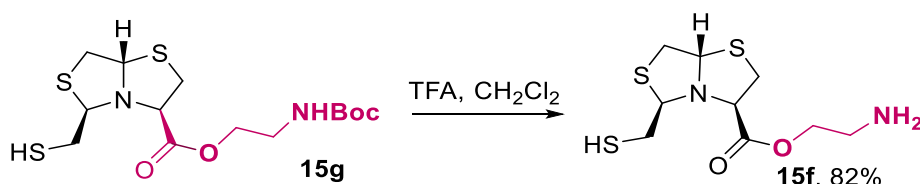
		
R-X-*	15, R (%) ^a	
	Método B	Método C
	15a , 29	15a , 64
	15b , 38	15b , 50
	15c , 24	15c , 58
	15d , 31	15d , 78
	15e , 44	15e , 68
	15g , 39	15g , 70

^aProductos aislados luego de purificación cromatográfica.

Los resultados muestran que ambos métodos son eficaces para la desprotección de **16**: se lograron obtener los tioles libres **15a-g** en rendimientos desde 24 hasta 34% utilizando el método B y desde 50 hasta 78% utilizando el método C. En general, los mejores resultados para la desprotección de los derivados **15** se obtuvieron con el método C. El menor rendimiento obtenido para el método B podría deberse a los tiempos más prolongados de permanencia en

el buffer fosfato pH 8, que acelera el proceso de oxidación de estos derivados que resultaron más susceptibles a la oxidación que otras bistiazolidinas.

Por último, el compuesto **15f** se obtuvo por desprotección de **15g** utilizando una mezcla 1:1 de TFA en CH₂Cl₂, en un 82% de rendimiento, Esquema 4.11.



Esquema 4.11: Desprotección de **15g** para obtener **15f**.

En conclusión, se desarrollaron tres metodologías que resultaron adecuadas para la desprotección de S-Acétilos, S-Benzoilo y S-Butirilo. Los mejores resultados se obtuvieron con el método C) utilizando 2 equivalentes de cisteamina y una mezcla MeOH:BF pH 8 (1:9) como solvente, luego de 30 min de reacción.

4.3.4 Ensayos de actividad biológica

Generalidades

La caracterización de la inhibición de los nuevos derivados **1c-d** y **15a-g** frente MBL pertenecientes a las tres subclases y los ensayos de actividad antimicrobiana en cepas bacterianas expresando MBL 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). A continuación, se detalla la caracterización del modo de inhibición y la determinación de los parámetros K_i e IC_{50} frente a NDM-1 y ensayos en cepas bacterianas resistentes expresando NDM-1 para la BTZ **1d** a modo de ejemplo.

a) Determinación de los parámetros K_i e IC_{50} frente a NDM-1

Para la determinación de los parámetros K_i e IC_{50} , se realizaron ensayos de cinética enzimática determinando las velocidades iniciales de hidrólisis del

sustrato imipenem catalizado por MBL en presencia o en ausencia de inhibidor, Figura 4.14.

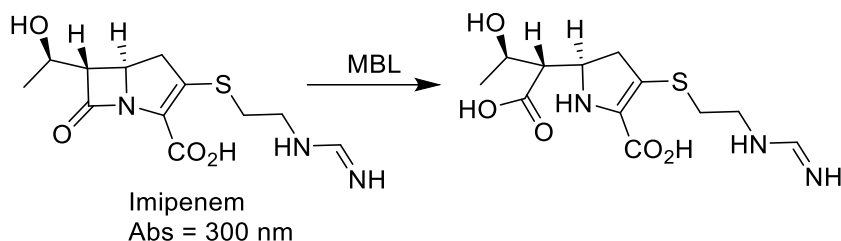


Figura 4.14: Hidrólisis del sustrato imipenem mediada por MBL.

En un primer experimento se trabaja sin inhibidor, con el objetivo de determinar la K_m y la V_{max} del sustrato imipenem con NDM-1, Figura 4.15a-b.

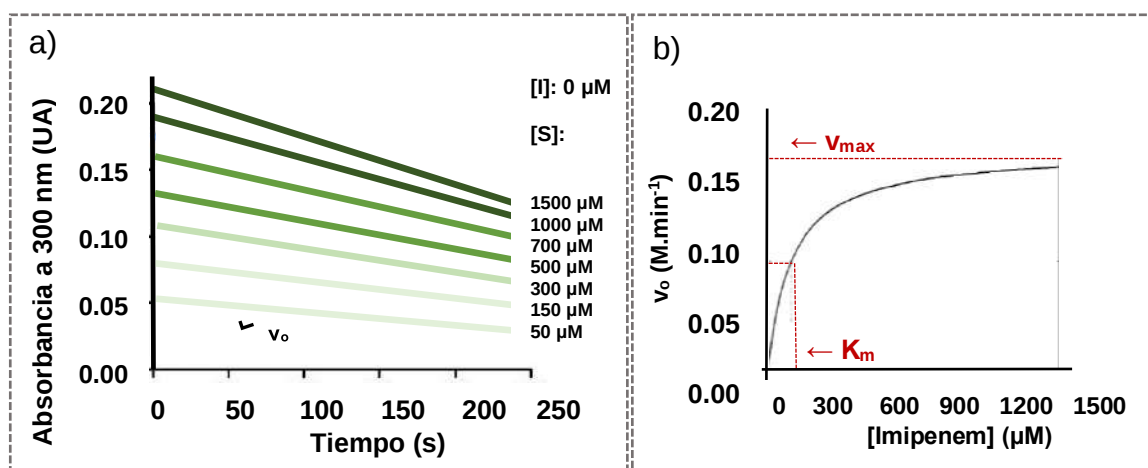


Figura 4.15: a) Gráfico absorbancia a 300 nm de imipenem en función del tiempo (s) en ausencia de inhibidor a diferentes concentraciones de sustrato (0-1500 μM). Concentración de NDM-1 = 1 nM. b) Gráfico de v_o vs [imipenem] para la determinación de parámetros V_{max} y K_m .

El seguimiento de la hidrólisis del antibiótico se monitorea siguiendo los cambios de absorbancia a 300 nm en un lapso de 250 segundos, empleando un $\Delta\epsilon_{300} = -9000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, que representa la diferencia de absorptividad entre el imipenem y el imipenem hidrolizado a esa longitud de onda. Dado que la absorptividad del imipenem hidrolizado es menor a la del imipenem, a lo largo del tiempo veremos una disminución de la absorbancia, tal como se observa en la Figura 4.15a. La pendiente de la gráfica absorbancia vs tiempo se relaciona con la velocidad inicial a través de la Ley de Lambert-Beer, Ecuación 4.1.

$$v_0 = \frac{\text{pendiente}}{\varepsilon * b} \quad \text{Ecuación 4.1,}$$

donde:

$$\text{Pendiente} = \frac{\Delta \text{Absorbancia}}{\Delta \text{Tiempo}}$$

$\varepsilon = \Delta \text{Absortividad}_{300\text{nm}} = -9000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $b = \text{camino óptico (0.1 cm)}$

El experimento se repite para una serie de concentraciones de sustrato (0-1500 μM) y se mide la velocidad inicial (v_0) para cada nivel de concentración de sustrato, manteniendo fija la concentración de enzima, Figura 4.15a.

Una vez calculada la v_0 para una serie de concentraciones de sustrato, se grafican estos valores de velocidad inicial obtenidos versus [imipenem] y se ajustan los datos a la ecuación de Michaelis/Menten con el software Graph Pad., a partir de la cual se extraen los valores de V_{max} y K_m para la dupla enzima-sustrato (imipenem), Figura 4.15b. La V_{max} corresponde a la velocidad máxima alcanzada por la enzima y la K_m a la concentración de sustrato en la cual la velocidad es igual a $V_{\text{max}}/2$.

Una vez obtenida la curva v_0 vs [Imipenem] sin inhibidor, se repiten las determinaciones en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor (0-20 μM) manteniendo fija la concentración de sustrato (cercana a la K_m), Figura 4.16a.

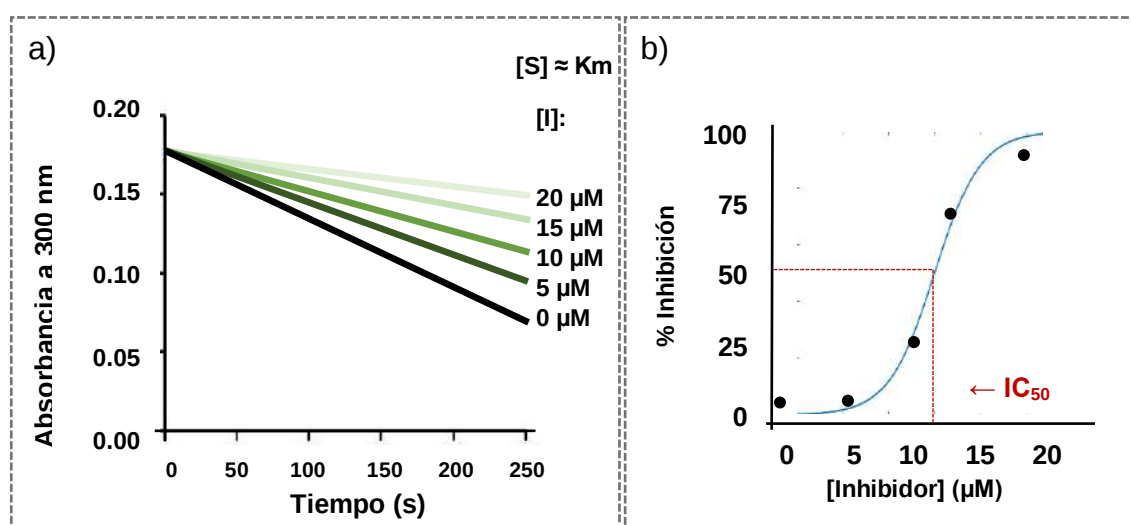


Figura 4.16: a) Gráfica absorbancia de imipenem a 300 nm en función del tiempo (s) en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de inhibidor **1b** (5-20 μM). Concentración inicial de

imipenem = cercana a K_m . Concentración de enzima = 1 nM. b) Gráfico de % inhibición vs [Inhibidor] para la determinación de IC_{50} .

Como es de esperar, en presencia del inhibidor se observa una disminución de la velocidad de hidrólisis del sustrato con respecto al tiempo. Para cada concentración de inhibidor se calcula v_o a partir de la gráfica absorbancia vs tiempo (ecuación 1) y se calcula para cada nivel de concentración de inhibidor el % de inhibición (v_o remanente respecto a v_o sin inhibidor). Por último, se grafica luego % de inhibición vs [inhibidor], Figura 4.16b.

A partir de la curva % de inhibición vs [inhibidor] se interpolan las concentraciones de inhibidor en las cuales el porcentaje de actividad remanente es del 30, 50 y 70 %. La concentración de inhibidor en la cual la actividad remanente de imipenem es 50 % corresponde a la IC_{50} , Figura 4.16b.

Finalmente, para la determinación de la de K_i , se repite el ensayo empleando la concentración de inhibidor en las cuales la enzima retenga el 30, 50 y 70 % (calculadas por interpolación previamente) variando la concentración de imipenem. En cada experimento individual se calcula la v_o (pendiente de la gráfica Abs_{300} vs tiempo corregida por Ley de Lambert-Beer) y se grafica v_o versus concentración de imipenem, Figura 4.17.

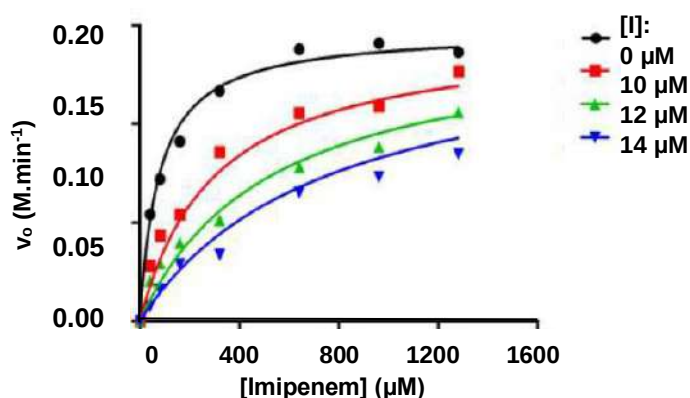


Figura 4.17: Gráfico de v_o vs [imipenem] para diferentes concentraciones de inhibidor (0, 10, 12 y 14 μM).

Los datos experimentales se procesan utilizando nuevamente el software Graph Pad y se ajustan a un modelo de inhibición competitivo según la ecuación 2, a partir de la cual se obtiene el valor de la K_i para dicho inhibidor.

$$v_0 = \frac{v_{max} \times [imipenem]}{K_m} \times \left(1 + \frac{[Inhibidor]}{K_i} + [imipenem]\right), \quad \text{Ecuación 2}$$

b) Actividad inhibitoria de las BTZ frente a cepas bacterianas resistentes

Para los compuestos que muestran mejor actividad *in vitro* se continúa con la caracterización biológica a través de i) ensayos de MIC, tal como fue desarrollado en el Capítulo 3 y ii) experimentos Time-Kill. En estos ensayos se estudia el comportamiento de los inhibidores en medios de cultivo de *E. coli* expresando NDM-1. En su conjunto, ambos ensayos permiten evaluar la capacidad de los compuestos de atravesar la envoltura celular bacteriana y restaurar la actividad de los ABL en bacterias resistentes.

Ensayos de Time-Kill en E. coli expresando NDM-1

Las curvas de mortalidad o experimentos Time-kill (TK) constituyen un enfoque simple y económico para generar datos *in vitro* en condiciones estáticas para el modelado de la PK/PD de antibióticos.⁶² Se llevan a cabo para determinar la actividad del inhibidor en combinación con un ABL frente a un microorganismo durante un período de tiempo corto, generalmente 5 h.

A diferencia de los ensayos de MIC, los ensayos TK miden la cinética de muerte bacteriana mediante el recuento de colonias que permanecen viables tras la exposición al antibiótico en relación con el inóculo original a diferentes tiempos de incubación.

Para realizar el ensayo se incuban células de *E. coli* DH5α que expresan NDM-1 con el inhibidor en estudio (100 µg/mL) a concentraciones subletales del ABL imipenem (6 µg/mL). Luego, se toman alícuotas a los tiempos: 1, 3 y 5 horas, se realizan diluciones adecuadas en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y finalmente se siembran en placas con medio LB-Agar. Las placas se incuban a 37 °C durante toda la noche y se realiza el conteo de células viables. El ensayo se realiza por triplicado.

Determinación de la IC_{50} de los nuevos análogos frente a todas las subclases de MBL

Se caracterizó el modo de inhibición y se determinaron los valores de IC_{50} para las BTZ **1d** y **15a-g** preparadas frente a MBL pertenecientes a las tres subclases: B1, B2 y B3. Los resultados se muestran en la Tabla 4.12

Tabla 4.12: Valores de IC_{50} para los análogos **1c-d** y **15a-g** frente a las tres subclases de MBL.

		IC_{50} (μ M)				
Subclase		B1		B2		B3
Enzima		NDM-1	IMP-1	VIM-2	Sfh-I	L1
Inhibidor	1a	13 $\pm$ 1	16 $\pm$ 4	7.4 $\pm$ 0.6	0.79 $\pm$ 0.05	22 $\pm$ 1
	1c	ND	0.99	0.42	ND	ND
	1d	2.7 $\pm$ 0.2	0.26 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.01	5.5 $\pm$ 0.4	6.9 $\pm$ 0.3
	15a	7.7 $\pm$ 0.8	ND	ND	NI	8.9 $\pm$ 0.6
	15b	52 $\pm$ 6	ND	ND	NI	24 $\pm$ 2
	15c	20 $\pm$ 4	ND	ND	NI	15 $\pm$ 1
	15d	29 $\pm$ 2	ND	ND	NI	30 $\pm$ 2
	15e	27 $\pm$ 1	ND	ND	NI	30 $\pm$ 2
	15f	53 $\pm$ 3	ND	ND	NI	58 $\pm$ 4
	15g	7.9 $\pm$ 0.4	ND	ND	NI	5.4 $\pm$ 0.4

ND = No determinado. NI = No inhiben a una concentración de 1000 μ M.

Código de color: 0.17 5 20 30 58 μ M



Todas las BTZ ensayadas presentaron un modo de inhibición competitiva frente a las MBL evaluadas.

Para el compuesto **1d**, el valor de IC_{50} para las enzimas IMP-1, VIM-2, NDM-1 y L1 es menor respecto a **1a**. Esto evidencia que el bloqueo de la carga negativa del grupo carboxilato mejora la inhibición en estas enzimas. Por otra parte, la inhibición de Sfh-I se vio comprometida, ya que se obtuvieron valores de IC_{50} mayores. En la BTZ **1a** es el grupo carboxilato quien interacciona con el ion Zn^{2+} en Sfh-1, y no el tiol como sucede para el resto de las MBL. La ausencia del carboxilato en el derivado **1d** podría explicar la menor actividad frente a esta enzima. Sin embargo, el valor de IC_{50} se mantiene en el orden micromolar, posiblemente debido a que al ser el etilo un grupo pequeño, permitiría que el compuesto ingrese al sitio activo y sea el tiol que se una al sitio metálico.

De igual forma, el compuesto **1c** resultó más activo frente a las enzimas NDM-1 y L1 respecto a **1a**. No contamos aún con los resultados de IC₅₀ para las enzimas NDM-1, Sfh-1 y L1 para el compuesto **1c**.

El resto de los análogos **15a-g**, mantuvieron los valores de IC₅₀ frente a NDM-1 y L1 en el rango μM . Los mismos fueron capaces de entrar y acomodarse en el sitio activo, a pesar de poseer grupos voluminosos.

Las sustituciones con una bencilamida y amino etil éster NBoc (compuestos **15a** y **15g**, respectivamente) condujeron a los mejores valores de IC₅₀ frente a NDM-1 y L1. En estos casos, la inhibición mejoró con respecto a la BTZ **1a**, pero no superaron al compuesto más simple **1d**. En cambio, un grupo fenilamida (**15c**) o grupos amino cargados positivamente presentes en **15d-f** disminuyeron las potencias de inhibición con respecto a **1a**.

Ninguno de los compuestos **15a-g** fue activo frente a Sfh-I, debido probablemente al gran tamaño de los sustituyentes que impedirían al tiol coordinarse al sitio metálico, dadas las características restrictivas del sitio activo de las enzimas Sfh-1.

Ensayos de MIC en E. coli expresando NDM-1

Se continuó con la caracterización biológica de los compuestos y se realizaron ensayos de MIC frente a cepas bacterianas resistentes, Tabla 4.13.

Tabla 4.13: MIC de imipenem (IMI) y los análogos frente a *E. coli* DH5 α -NDM-1.

Compuesto	IMI	IMI + 1a	IMI + 1d	IMI + 15a	IMI + 15c	IMI + 15e	IMI + 15f	IMI + 15g
MIC ($\mu\text{g/mL}$)	16	4-2	16*	16*	16-8*	16-8*	16-8*	16-8*

* idéntico al control (Imipenem). Determinado por el método de microdilución en caldo siguiendo las directrices del CLSI, utilizando una cepa de *E. coli* DH5 α , imipenem y el compuesto a analizar.

Según los resultados, ninguno de los nuevos análogos ensayados fue capaz de restaurar la susceptibilidad de *E. coli* frente a imipenem en comparación con el compuesto de referencia **1a**. Esto podría deberse a una penetración menos efectiva en el periplasma bacteriano, donde se encuentra

NDM-1, o a problemas de inestabilidad u oxidación durante el tiempo de incubación empleado en las determinaciones de MIC (16 h).

Por estas razones, se decidió realizar ensayos Time-Kill, en donde el tiempo de exposición es menor (5 h). Para ello se incubaron células de *E. coli* DH5 α que expresan NDM-1, expuestas a concentraciones subletales de imipenem durante 1, 3 y 5 h, en presencia y ausencia de los inhibidores. Los resultados se muestran en la Figura 4.18.

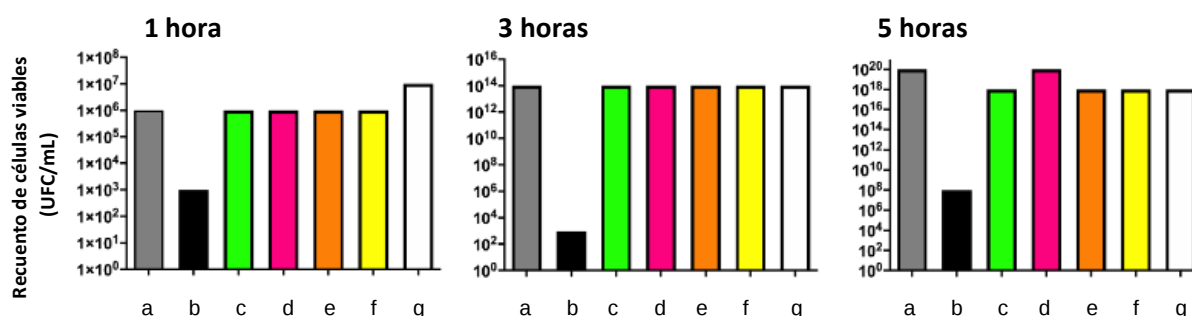


Figura 4.18: Experimentos Time-Kill empleando células de *E. coli* y los inhibidores BTZ **1a**, y los nuevos análogos **15**. a) Control (gris); b) BTZ **1a** (negro); c) **15a** (verde); d) **15c** (rosado); e) **15g** (anaranjado) f) **15d** (amarillo) y g) **15f** (blanco).

Los ensayos de Time-kill mostraron que ninguno de los nuevos análogos restauró la susceptibilidad *E. coli* productora de NDM-1 al antibiótico imipenem. Como los tiempos de incubación fueron mucho más cortos que en las determinaciones de MIC, parecería que la razón principal de la falta de actividad en bacterias sería que los nuevos análogos no son tan permeables como **1a** en el periplasma de *E. coli*, independientemente del tiempo de incubación. La permeabilidad reducida puede deberse a numerosos factores, entre ellos la presencia de una cadena lateral flexible o su mayor tamaño.

En conjunto, tanto los experimentos Time-kill como las MIC mostraron que ninguno de estos compuestos, en presencia de concentraciones subletales de imipenem, son capaces de recuperar la actividad del antibiótico.

4.4 Conclusiones y perspectivas

Como conclusiones, en esta parte del trabajo logramos sintetizar nueve nuevos análogos a BTZ **1a** conteniendo en su estructura ésteres o amidas con

diferentes grupos funcionales. Como etapa clave de la síntesis de estos derivados, se estudiaron y optimizaron tres metodologías de desprotección de tioacetilos en condiciones suaves a través de intercambios tiol/tioésteres, utilizando tioles en fase homogénea o heterogénea y 2-aminotioles. Este trabajo dio lugar a dos publicaciones:

Villamil, V., Saiz, C., and Mahler, G., Thioester Deprotection Using a Biomimetic NCL approach. *Frontiers in Chemistry*, 2022 (10) 1-12.

Villamil, V., Saiz, C., and Mahler, G. A new procedure for thioester deprotection using thioglycolic acid in both homogeneous and heterogeneous phase. *Tetrahedron*, 2021 (94), 132335.

Los compuestos **1c-d** resultaron ligeramente más activos que el compuesto original **1a** en enzimas de relevancia clínica: NDM-1, IMP-1, VIM-2 y L1. El resto de los análogos **15a-g**, mantuvieron los valores de IC₅₀ en el rango micromolar para NDM-1 y L1 y resultaron inactivos frente a Sfh-1. En particular, dos de ellos resultaron levemente más activos (**15a** y **15g**) respecto a **1a**.

Sin embargo, los experimentos Time-kill y MIC mostraron que ninguno de estos compuestos era activo frente a células de *E. coli* que expresan NDM-1.

En base a estos resultados concluimos que:

(1) el grupo carboxilato no es esencial para la inhibición de MBL, salvo para las enzimas Sfh-I en las que éste es el grupo de unión al zinc en el aducto de Sfh-I con BTZ **1a**. El éster etílico **1d** es la excepción, ya que retiene parte de la actividad inhibitoria frente a esta enzima. Por lo tanto, podrían agregarse nuevos grupos en la estructura de BTZ para aumentar su afinidad por estas enzimas.

(2) la sustitución del grupo carboxilato por grupos capaces de establecer interacciones hidrofóbicas con el loop 3 podría ser una estrategia para mejorar la inhibición de MBL dentro del scaffold BTZ, tal como se había predicho en los estudios de docking.

Como perspectivas de este trabajo planteamos:

i) Sintetizar nuevos derivados ésteres o amidas conteniendo otros grupos funcionales que pudieran mejorar las interacciones en el sitio activo y la permeabilidad a través de la envoltura celular bacteriana.

ii) Diseñar otros análogos introduciendo estructuras aromáticas en otras posiciones del biciclo BTZ.

4.5 Bibliografía

- (1) Carfi, A.; Pares, S.; Duée, E.; Galleni, M.; Duez, C.; Frère, J. M.; Dideberg, O. The 3-D Structure of a Zinc Metallo- β -Lactamase from *Bacillus Cereus* Reveals a New Type of Protein Fold. *EMBO J.* **1995**, *14* (20), 4914–4921. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00174.x>.
- (2) Fabiane, S. M.; Sohi, M. K.; Wan, T.; Payne, D. J.; Bateson, J. H.; Mitchell, T.; Sutton, B. J. Crystal Structure of the Zinc-Dependent β -Lactamase from *Bacillus Cereus* at 1.9 Å Resolution: Binuclear Active Site with Features of a Mononuclear Enzyme. *Biochemistry* **1998**, *37* (36), 12404–12411. <https://doi.org/10.1021/bi980506i>.
- (3) Concha, N. O.; Janson, C. A.; Rowling, P.; Pearson, S.; Cheever, C. A.; Clarke, B. P.; Lewis, C.; Galleni, M.; Frère, J. M.; Payne, D. J.; Bateson, J. H.; Abdel-Meguid, S. S. Crystal Structure of the IMP-1 Metallo β -Lactamase from *Pseudomonas Aeruginosa* and Its Complex with a Mercaptocarboxylate Inhibitor: Binding Determinants of a Potent, Broad-Spectrum Inhibitor. *Biochemistry* **2000**, *39* (15), 4288–4298. <https://doi.org/10.1021/bi992569m>.
- (4) Yamaguchi, Y.; Jin, W.; Matsunaga, K.; Ikemizu, S.; Yamagata, Y.; Wachino, J. I.; Shibata, N.; Arakawa, Y.; Kurosaki, H. Crystallographic Investigation of the Inhibition Mode of a VIM-2 Metallo- β -Lactamase from *Pseudomonas Aeruginosa* by a Mercaptocarboxylate Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (26), 6647–6653. <https://doi.org/10.1021/jm701031n>.
- (5) Zhang, H. M.; Hao, Q. Crystal Structure of NDM-1 Reveals a Common β -Lactam Hydrolysis Mechanism. *FASEB J.* **2011**, *25* (8), 2574–2582. <https://doi.org/10.1096/fj.11-184036>.
- (6) 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* (28), 11362–11365. <https://doi.org/10.1021/ja303579d>.
- (7) Yong, D.; Toleman, M. A.; Giske, C. G.; Cho, H. S.; Sundman, K.; Lee, K.;

- Walsh, T. R. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, Bla NDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella Pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53 (12), 5046–5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>.
- (8) Nikaido, H.; Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, 67 (4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593>.
- (9) Jones, S. Permeability Rules for Antibiotic Design. *Nat. Biotechnol.* **2017**, 35 (7), 639. <https://doi.org/10.1038/nbt.3919>.
- (10) 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, 113 (26). <https://doi.org/10.1073/pnas.1601368113>.
- (11) Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1978**, 17 (7), 522–524. <https://doi.org/10.1002/anie.197805221>.
- (12) Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (2), 606–631. <https://doi.org/10.1039/b701677h>.
- (13) Li, C.; Wang, J.; Barton, L. M.; Yu, S.; Tian, M.; Peters, D. S.; Kumar, M.; Yu, A. W.; Johnson, K. A.; Chatterjee, A. K.; Yan, M.; Baran, P. S. Decarboxylative Borylation. *Science*. **2017**, 356, eaam7355-7363 <https://doi.org/10.1126/science.aam7355>.
- (14) Onyestyák, G.; Harnos, S.; Kalló, D. Improving the Catalytic Behavior of Ni/Al₂O₃ by Indium in Reduction of Carboxylic Acid to Alcohol. *Catal. Commun.* **2011**, 16 (1), 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2011.09.032>.
- (15) Kangani, C. O.; Kelley, D. E.; Day, B. W. One-Pot Synthesis of Aldehydes or Ketones from Carboxylic Acids via in Situ Generation of Weinreb Amides

- Using the Deoxo-Fluor Reagent. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (35), 6289–6292. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.06.121>.
- (16) Gotor, V. Non-Conventional Hydrolase Chemistry: Amide and Carbamate Bond Formation Catalyzed by Lipases. *Bioorganic Med. Chem.* **1999**, 7 (10), 2189–2197. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(99\)00150-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(99)00150-9).
- (17) Van Rantwijk, F.; Hacking, M. A. P. J.; Sheldon, R. A. Lipase-Catalyzed Synthesis of Carboxylic Amides: Nitrogen Nucleophiles as Acyl Acceptor. *Monatshefte fur Chemie* **2000**, 131 (6), 549–569. <https://doi.org/10.1007/s007060070086>.
- (18) Leggio, A.; Belsito, E. L.; De Luca, G.; Di Gioia, M. L.; Leotta, V.; Romio, E.; Siciliano, C.; Liguori, A. One-Pot Synthesis of Amides from Carboxylic Acids Activated Using Thionyl Chloride. *RSC Adv.* **2016**, 6 (41), 34468–34475. <https://doi.org/10.1039/c5ra24527c>.
- (19) Rich, D. H.; Singh, J. The Carbodiimide Method; *Academic Press INC.*, **1979**; Vol. 1. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-304201-9.50011-4>.
- (20) Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Minor, C. A.; Albericio, F. Advantageous Applications of Azabenzotriazole (Triazolopyridine)-Based Coupling Reagents to Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2, 201–203. <https://doi.org/10.1039/C39940000201>.
- (21) Twibanire, J. D. A. K.; Grindley, T. B. Efficient and Controllably Selective Preparation of Esters Using Uronium-Based Coupling Agents. *Org. Lett.* **2011**, 13 (12), 2988–2991. <https://doi.org/10.1021/ol201005s>.
- (22) Yoshimura, T.; Tsukurimichi, E.; Sugiyama, Y.; Kita, H.; Shimasaki, C.; Hasegawa, K. Mechanism of Reaction of S,S-Diphenyl-S-Methoxythiazine with Thiols. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1991, pp 3176–3178. <https://doi.org/10.1246/bcsj.64.3176>.
- (23) Zervas, L.; Photaki, I.; Ghelis, N. On Cysteine and Cystine Peptides. II S-Acylcysteines in Peptide Synthesis. *J. fo Am. Chem. Soc.* **1963**, 76, 1337–1341. <https://doi.org/10.1021/ja00892a027>.
- (24) Arisawa, M.; Yamaguchi, M. Rhodium-Catalyzed Disulfide Exchange

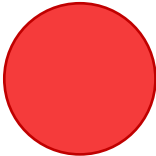
- Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (22), 6624–6625. <https://doi.org/10.1021/ja035221u>.
- (25) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. Protection for the Thiol Group. *Greene's Prot. Groups Org. Synth.* **2006**, 647–695. <https://doi.org/10.1002/9780470053485.ch6>.
- (26) Zhao, Z.; Zhang, X.; Jin, L.; Yang, S.; Lei, P. Synthesis and Antibacterial Activity of Novel Ketolides with 11,12-Quinoylalkyl Side Chains. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*(14), 2358–2363. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.06.039>.
- (27) Saiz, C.; Wipf, P.; Mahler, G. Synthesis and Ring-Chain-Ring Tautomerism of Bisoxazolidines, Thiazolidinyloxazolidines, and Spirothiazolidines. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (14), 5738–5746. <https://doi.org/10.1021/jo2008498>.
- (28) Van Der Heden Van Noort, G. J.; Kooij, R.; Elliott, P. R.; Komander, D.; Ova, H. Synthesis of Poly-Ubiquitin Chains Using a Bifunctional Ubiquitin Monomer. *Org. Lett.* **2017**, *19* (24), 6490–6493. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b03085>.
- (29) Wallace, O. B.; Springer, D. M. Mild , Selective Deprotection of Thioacetates Using Sodium Thiomethoxide. **1998**, *39*, 2693–2694. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)00421-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)00421-3)
- (30) Dion, A.; Dubé, P.; Spino, C. A Triple Diene-Transmissive Diels-Alder Strategy to Build the Quassinoid Framework. *Org. Lett.* **2005**, *7* (25), 5601–5604. <https://doi.org/10.1021/ol0522236>.
- (31) Chung Keun Jin; Hyung Jae Jeong; Min Kyu Kim; Ju Young Kim; Yoon, Y. J.; Lee, S. G. The Selective Deprotection of Thioesters Using Titanium(IV) Chloride/Zinc. *Synlett* **2001**, *12*, 1956–1958. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18769>.
- (32) Batchelar, E. T.; Hamed, R. B.; Ducho, C.; Claridge, T. D. W.; Edelmann, M. J.; Kessler, B.; Schofield, C. J. Thioester Hydrolysis and C–C Bond Formation by Carboxymethylproline Synthase from the Crotonase Superfamily. *Angew. Chemie.* **2008**, *120* (48), 9462–9465. <https://doi.org/10.1002/ange.200803906>.

- (33) 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (26), E3745–E3754. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601368113>.
- (34) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- (35) Arcon, J. P.; Modenutti, C. P.; Avendaño, D.; Lopez, E. D.; Defelipe, L. A.; Ambrosio, F. A.; Turjanski, A. G.; Forli, S.; Marti, M. A. AutoDock Bias: Improving Binding Mode Prediction and Virtual Screening Using Known Protein-Ligand Interactions. *Bioinformatics* **2019**, *35* (19), 3836–3838. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz152>.
- (36) Rossi, M. A.; Martinez, V.; Hinchliffe, P.; Mojica, M. F.; Castillo, V.; Moreno, D. M.; Smith, R.; Spellberg, B.; Drusano, G. L.; Banchio, C.; Bonomo, R. A.; Spencer, J.; Vila, A. J.; Mahler, G. 2-Mercaptomethyl-Thiazolidines Use Conserved Aromatic-S Interactions to Achieve Broad-Range Inhibition of Metallo- β -Lactamases. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (8), 2898–2908. <https://doi.org/10.1039/d0sc05172a>.
- (37) Raczynska, J. E.; Shabalin, I. G.; Minor, W.; Wlodawer, A.; Jaskolski, M. A Close Look onto Structural Models and Primary Ligands of Metallo- β -Lactamases. *Drug Resist. Updat.* **2018**, *40*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.08.001>.
- (38) Tallon, S.; Lawlor, A. C.; Connon, S. J. Urea-Catalyzed Transthioesterification: Towards a New Kinetic Resolution Methodology. **2011**, *2011* (iv), 115–126. <http://doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.410>.
- (39) Lees, W. J.; Whitesides, G. M. Equilibrium Constants for Thiol-Disulfide Interchange Reactions: A Coherent, Corrected Set. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (3), 642–647. <https://doi.org/10.1021/jo00055a016>.

- (40) Günther, W. H. H. Methods in Selenium Chemistry. III. The Reduction of Diselenides with Dithiothreitol. *J. Org. Chem.* **1967**, 32 (12), 3931–3933. <https://doi.org/10.1021/jo01287a044>.
- (41) Danehy, J. P.; Noel, C. J. The Relative Nucleophilic Character of Several Mercaptans toward Ethylene Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82 (10), 2511–2515. <https://doi.org/10.1021/ja01495a028>.
- (42) Ley, S. V.; Baxendale, I. R. New Tools and Concepts for Modern Organic Synthesis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1 (8), 573–586. <https://doi.org/10.1038/nrd871>.
- (43) Kirschning, A.; Monenschein, H.; Wittenberg, R. Functionalized Polymers - Emerging Versatile Tools for Solution-Phase Chemistry and Automated Parallel Synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, 40 (4), 650–679. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010216\)40:4<650::AID-ANIE6500>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010216)40:4<650::AID-ANIE6500>3.0.CO;2-C).
- (44) Iimura, S.; Manabe, K.; Kobayashi, S. Hydrophobic Polymer-Supported Catalyst for Organic Reactions in Water: Acid-Catalyzed Hydrolysis of Thioesters and Transprotection of Thiols. *Org. Lett.* **2003**, 5 (2), 101–103. <https://doi.org/10.1021/ol026906m>.
- (45) De Marco, R.; Gioia, M. L. Di; Leggio, A.; Liguori, A.; Viscomi, M. C. Deprotection of N-Nosyl- α -Amino Acids by Using Solid-Supported Mercaptoacetic Acid. *European J. Org. Chem.* **2009**, 22, 3795–3800. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200900271>.
- (46) Cho, J. K.; Park, B. D.; Park, K. B.; Lee, Y. S. Preparation of Core-Shell-Type Poly(Ethylene Glycol)Grafted Polystyrene Resins and Their Characteristics in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, 203 (15), 2211–2217. [https://doi.org/10.1002/1521-3935\(200211\)203:15<2211::AID-MACP2211>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-3935(200211)203:15<2211::AID-MACP2211>3.0.CO;2-X).
- (47) Quarrell, R.; Claridge, T. D. W.; Weaver, G. W.; Lowe, G. Structure and Properties of TentaGel Resin Beads: Implications for Combinatorial Library Chemistry. *Mol. Divers.* **1996**, 1 (4), 223–232. <https://doi.org/10.1007/BF01715526>.

- (48) Christensen, L.; Fitzpatrick, R.; Gildea, B.; Petersen, K. H.; Hansen, H. F.; Koch, T.; Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E.; Coull, J.; Berg, R. H. Solid-Phase Synthesis of Peptide Nucleic Acids. *J. Pept. Sci.* **1995**, *1* (3), 175–183. <https://doi.org/10.1002/psc.310010304>.
- (49) Gaggini, F.; Porcheddu, A.; Reginato, G.; Rodriguez, M.; Taddei, M. Colorimetric Tools for Solid-Phase Organic Synthesis. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6* (5), 805–810. <https://doi.org/10.1021/cc049963a>.
- (50) Amblard, M.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33* (3), 239–254. <https://doi.org/10.1385/MB:33:3:239>.
- (51) Camarero, J. A.; Cotton, G. J.; Adeva, A.; Muir, T. W. Chemical Ligation of Unprotected Peptides Directly from a Solid Support. *J. Pept. Res.* **1998**, *51* (4), 303–316. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1998.tb00428.x>.
- (52) Badyal, J. P.; Cameron, A. M.; Cameron, N. R.; Coe, D. M.; Cox, R.; Davis, B. G.; Oates, L. J.; Oye, G.; Steel, P. G. A Simple Method for the Quantitative Analysis of Resin Bound Thiol Groups. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (48), 8531–8533. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)01820-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)01820-2).
- (53) Riener, C. K.; Kada, G.; Gruber, H. J. Quick Measurement of Protein Sulfhydryls with Ellman's Reagent and with 4,4'-Dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *373* (4–5), 266–276. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1347-2>.
- (54) Serra, G.; Posada, L.; Hojo, H. On-Resin Synthesis of Cyclic Peptides: Via Tandem N -to- S Acyl Migration and Intramolecular Thiol Additive-Free Native Chemical Ligation. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (6), 956–959. <https://doi.org/10.1039/c9cc07783a>.
- (55) Agouridas, V.; El Mahdi, O.; Diemer, V.; Cargoët, M.; Monbaliu, J. C. M.; Melnyk, O. Native Chemical Ligation and Extended Methods: Mechanisms, Catalysis, Scope, and Limitations. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (12). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00712>.
- (56) Mennen, S. M.; Alhambra, C.; Allen, C. L.; Barberis, M.; Berritt, S.; Brandt,

- T. A.; Campbell, A. D.; Castañón, J.; Cherney, A. H.; Christensen, M.; Damon, D. B.; Eugenio De Diego, J.; García-Cerrada, S.; García-Losada, P.; Haro, R.; Janey, J.; Leitch, D. C.; Li, L.; Liu, F.; Lobben, P. C.; Macmillan, D. W. C.; Magano, J.; McInturff, E.; Monfette, S.; Post, R. J.; Schultz, D.; Sitter, B. J.; Stevens, J. M.; Strambeanu, I. I.; Twilton, J.; Wang, K.; Zajac, M. A. The Evolution of High-Throughput Experimentation in Pharmaceutical Development and Perspectives on the Future. *Org. Process Res. Dev.* **2019**, 23 (6), 1213–1242. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00140>.
- (57) Wong, H.; Cernak, T. Reaction Miniaturization in Eco-Friendly Solvents. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2018**, 11, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.06.001>.
- (58) Wang, C.; Guo, Q. X.; Fu, Y. Theoretical Analysis of the Detailed Mechanism of Native Chemical Ligation Reactions. *Chem. - An Asian J.* **2011**, 6 (5), 1241–1251. <https://doi.org/10.1002/asia.201000760>.
- (59) Friedman, M.; Cavins, J. F.; Wall, J. S. Relative Nucleophilic Reactivities of Amino Groups and Mercaptide Ions in Addition Reactions with α,β -Unsaturated Compounds^{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87 (16), 3672–3682. <https://doi.org/10.1021/ja01094a025>.
- (60) Henderson, J. Concerning the relationship between the strength of acids and their capacity to preserve neutrality. *Am. J. Soc.* **1908**, 250–255. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1908.21.2.173>
- (61) Pitman, I.; Morris, I. Covalent Additions of Glutathione, Cysteine, Homocysteine, Cysteamine and Thioglycolic Acid to Quinazoline Cation. *Aust. J. Chem.* **1979**, 32 (7), 1567. <https://doi.org/10.1071/ch9791567>.
- (62) Petersen, P. J.; Labthavikul, P.; Jones, C. H.; Bradford, P. A. In Vitro Antibacterial Activities of Tigecycline in Combination with Other Antimicrobial Agents Determined by Chequerboard and Time-Kill Kinetic Analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, 57 (3), 573–576. <https://doi.org/10.1093/jac/dki477>.



CAPÍTULO 5

Diseño y síntesis de
benzobisheterociclos y su
evaluación como inhibidores de MBL

5.1 Introducción

5.1.1 Diseño de nuevos análogos de BTZ conteniendo estructuras aromáticas fusionadas: benzoheterociclos

La sustitución del grupo ácido carboxílico de la BTZ **1a** por ésteres y amidas conteniendo diferentes grupos funcionales llevó a inhibidores que mantienen el orden de actividad en el rango μM . Esto supuso el punto de partida para el diseño de nuevos inhibidores, en donde se elimina el ácido carboxílico y se sustituye por otros grupos para mejorar aún más la eficacia de las BTZ **1**, Figura 5.1.

En particular, el derivado **15a** conteniendo un grupo bencilamida llevó a una ligera mejora en la actividad *in vitro* contra la enzima NDM-1. Según los estudios de docking realizados, el grupo aromático de **15a** interacciona con residuos hidrofóbicos, que resultaría clave para inhibición de esta enzima.

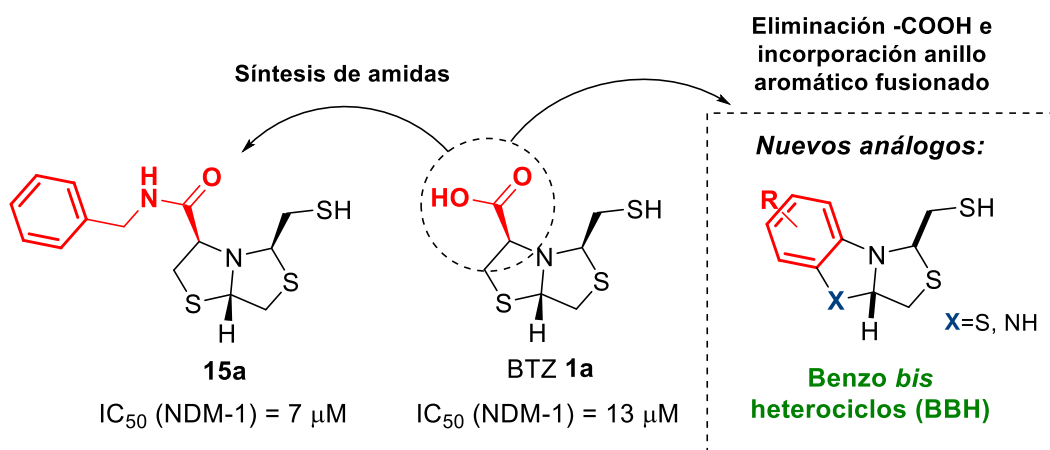


Figura 5.1: Propuesta de nuevos análogos de BTZ **1a**, donde el ácido carboxílico es eliminado y sustituido por un anillo aromático fusionado, dando a lugar a benzo *bis* heterociclos.

Siguiendo con la idea de incorporar estructuras aromáticas en los compuestos originales para mejorar la actividad *in vitro* frente a MBL, decidimos explorar la inclusión de un anillo aromático fusionado al núcleo de BTZ para obtener compuestos del tipo benzobisheterociclos (BBH), Figura 5.1.

5.2 Objetivo Específico

5.2.1 Diseñar y sintetizar una serie de benzobisheterociclos (BBH) análogos a BTZ 1

Para alcanzar este objetivo específico se pretende diseñar los nuevos BBH conteniendo un anillo aromático fusionado a la bistiazolidina. Para ello se utilizarán herramientas de química computacional. Luego, se plantea explorar diferentes metodologías sintéticas para la preparación de los BBH propuestos, y su caracterización estructural espectroscópica.

Una vez preparados los compuestos, se propone realizar su evaluación biológica frente a MBL pertenecientes a las tres subclases de MBL y su evaluación contra bacterias resistentes expresando MBL.

Por último, se pretende seleccionar los compuestos más prometedores y continuar su caracterización mediante estudios de estabilidad en plasma y de citotoxicidad en células mamíferas.

5.3 Resultados y Discusión

En el presente capítulo se muestran los resultados más relevantes en cuanto al diseño y síntesis de nuevos benzobisheterociclos.

Las principales actividades realizadas en este marco se relacionan con los objetivos específicos y se desarrollan a continuación.

5.3.1 Diseño de los nuevos análogos y estudios computacionales

Los primeros análogos que se diseñaron fueron los compuestos benzobistiazolidina (BNTZ) **17a** y benzoimidazolidinil-tiazolidina (BIMI) **23a**, conteniendo un anillo aromático sin sustituir fusionado al bisheterociclo, Figura 5.2A.

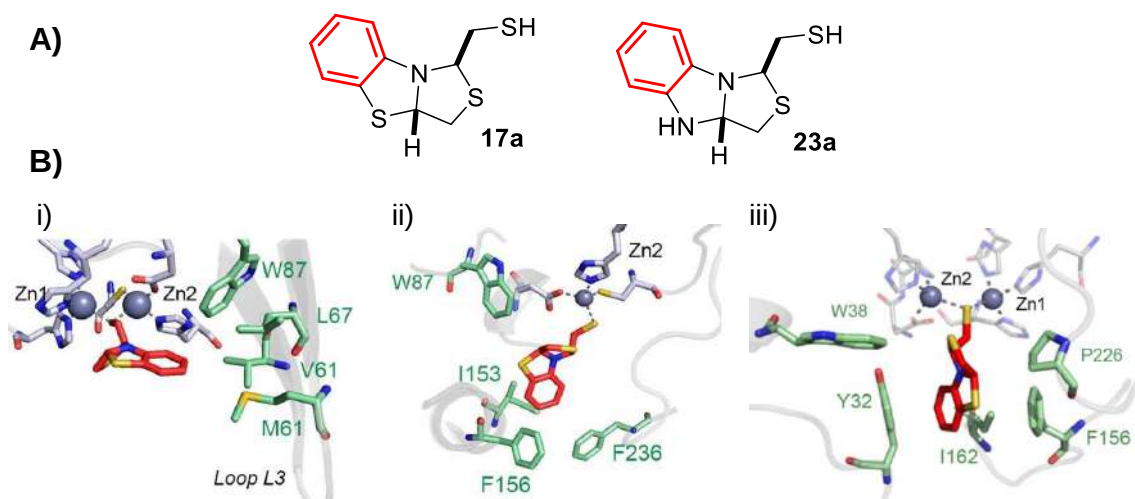


Figura 5.2: A) Estructura de los BBH **17a** y **23a**. B) Complejos simulados de **17a** (rojo) con enzimas representantes de las tres subclases de MBL: i) complejo **17a**:NDM-1; ii) complejo **17a**:Sfh-1 y iii) complejo **17a**:L1. Los iones Zn^{2+} se muestran en gris claro y los residuos involucrados en las interacciones hidrofóbicas en verde claro.

Con el fin de estudiar la capacidad de unión de este tipo de estructuras a las tres subclases de MBL recurrimos a estudios de docking, trabajo en colaboración con el Dr. Diego Moreno y el Lic. Salvador Drusin de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

En un principio, se eligió como modelo de estudio el compuesto **17a** y se obtuvieron los complejos **17a**:enzima para NDM-1, Sfh-1 y L1. Se utilizó el método de docking molecular sesgado por sitios solventes (SSBMD) implementado en el programa Autodock 4.2.6,¹ según se detalló en el Capítulo 4. En la figura 5.2B se representan los complejos **17a**:enzima para NDM-1, Sfh-1 y L1.

En los tres complejos se observa una estrecha interacción entre **17a** y la enzima, en donde el grupo tiol queda en una posición equidistante de ambos iones Zn^{2+} y el anillo aromático interacciona con las regiones hidrofóbicas del sitio activo de las MBL.

En el complejo con NDM-1 se observa que el anillo aromático está en estrecho contacto con los residuos hidrofóbicos M61, V61 y L67 del bucle L3 y también con el W87 (Figura 5.2Bi). De igual modo, en el complejo con Sfh-1 el anillo interacciona con los residuos F156, F236 e I153 (Figura 5.2Bii). Por último, en el complejo modelado con L1, la fracción aromática se ubica en un parche

hidrofóbico del sitio activo conteniendo los residuos Y32, W38, F156 e I162 (Figura 5.2Biii).

Se espera que el compuesto **23a** se una de manera análoga al sitio activo de las MBL, y que a la vez la presencia de la amina aromática secundaria mejore la permeabilidad a través de la envoltura celular bacteriana² y la solubilidad en agua, que podría verse comprometida por la sustitución del ácido carboxílico por un anillo aromático.

En base a los resultados de docking obtenidos para el compuesto más simple **17a**, que mostraron que este compuesto podría unirse a las MBL, se decidió explorar si la introducción de sustituyentes de diferente naturaleza química en el anillo aromático podría incrementar las interacciones en el sitio activo de las MBL.

Se diseñaron una serie de BBH sustituidos en posición 3, 4, 5 o 6 del anillo aromático con: i) grupos atractores de electrones como nitro, ácido sulfónico, ácido carboxílico y ésteres, ii) grupos dadores de electrones como alcohol, metilo y aminas, y iii) halógenos, Figura 5.3.

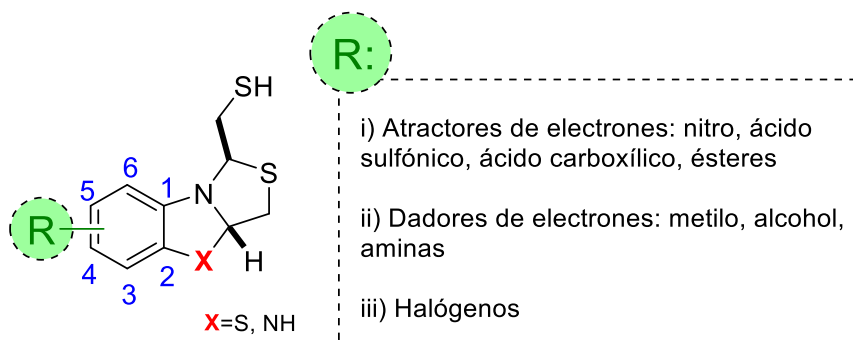


Figura 5.3: Derivados BBH planteados con sustituciones en el anillo aromático: grupos atractores de electrones, dadores de electrones y halógenos.

Para determinar si los derivados conteniendo un sustituyente en el anillo aromático pueden unirse a las MBL, nuevamente recurrimos a estudios *in silico*. Para ello se seleccionaron algunos de los derivados planteados y se realizaron estudios de docking para determinar su capacidad de unión a la enzima NDM-1. Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Diego Moreno y el Lic. Salvador Drusin de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Se utilizó el método de docking molecular sesgado por sitios solventes (SSBMD) implementado en el programa Autodock 4.2.6, tal como se detalló en el Capítulo 4. Con el fin de establecer los mejores ligandos, se asignó a cada compuesto un puntaje a través de un algoritmo de z-scoring, donde se evalúan la energía de interacción y la población de cada conformación. En la Figura 5.4 se representa la energía de unión vs población de conformeros con dicha energía. Los mejores candidatos son aquellos que presentan una mayor población con la menor energía de unión, resaltados en color en la Figura 5.4.

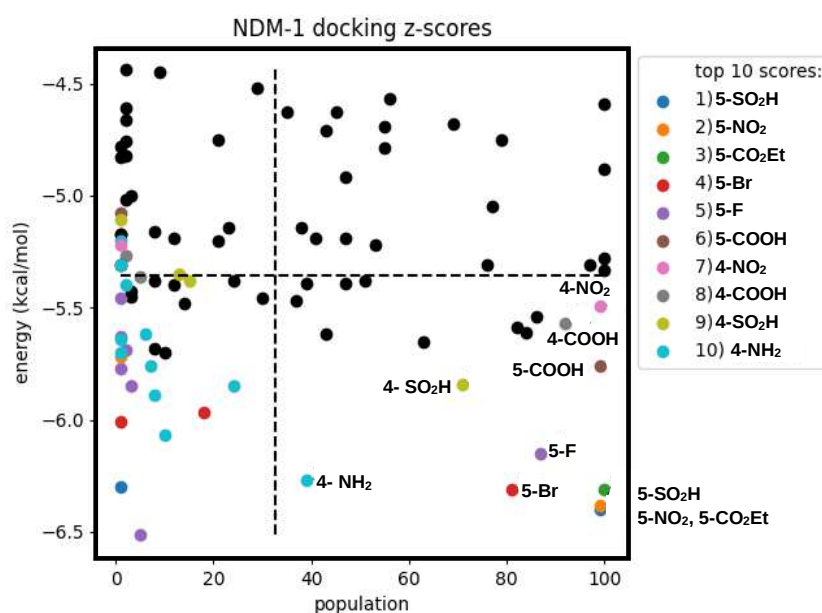


Figura 5.4: Visualización en dos dimensiones del puntaje de z-scoring para los resultados obtenidos en el docking en NDM-1. Los ligandos con mejor puntaje se encuentran en el cuadrante inferior derecho. Se resaltan en color los resultados de los 10 ligandos con mejor puntaje.

Del análisis de los estudios de docking observamos que los compuestos que más fuertemente se unen a la enzima NDM-1 son los derivados 5-sustituídos con sustituyentes electrón-atrayentes. En la Figura 5.5 se muestran como ejemplo los complejos *in silico* inhibidor:NDM-1 para los compuestos 5-NO₂ y 5-SO₂H. El grupo nitro interaccionaría con la Asparagina 178 (N178) y el grupo ácido sulfónico con la Lisina 224 (K224). Estas interacciones podrían mejorar la actividad de los compuestos.

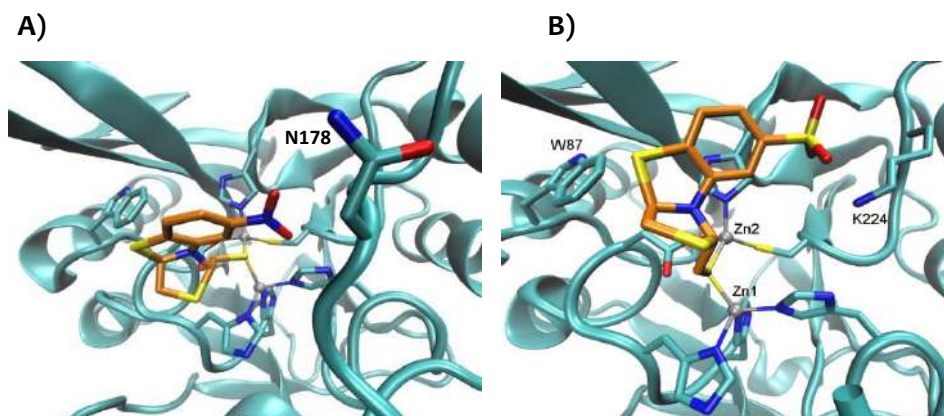
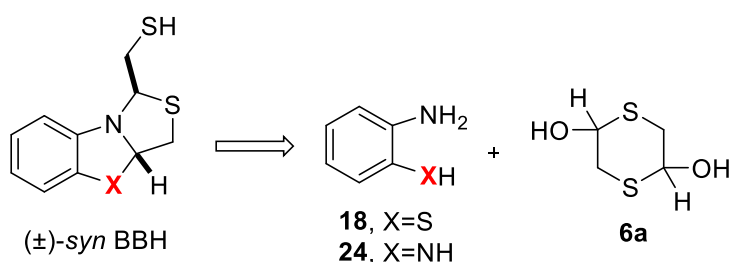


Figura 5.5: Complejos simulados inhibidor:NDM-1 para: A) compuesto 5-NO₂ y B) 5-SO₂H.

Por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos, se decidió explorar diferentes metodologías sintéticas para preparar los BBH sustituidos en el anillo aromático con grupos nitro, éster etílico, ácido carboxílico, halógenos, entre otros.

5.3.2 Síntesis racémica de BBH

Los BBH pueden prepararse por doble ciclación de 2-mercaptoanilinas **18** o 2-aminoanilinas **24** y el ditiano **6a**, de acuerdo al análisis retrosintético mostrado en el Esquema 5.1.³

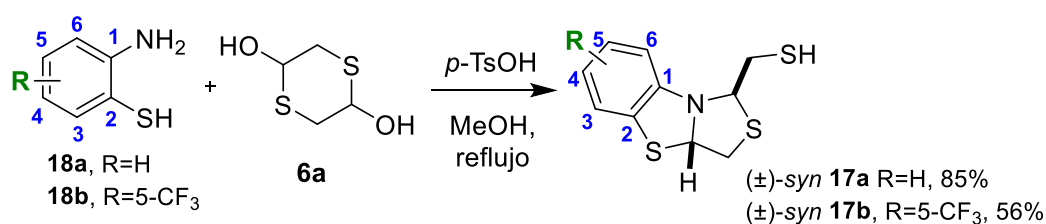


Esquema 5.1: Análisis retrosintético de BBH.

Los derivados se obtienen como mezclas racémicas del diastereómero mayoritario *syn*, porque a diferencia de las BTZ **1**, los materiales de partida no poseen centros quirales y por lo tanto los estados de transición que se forman en el transcurso de la ciclación no son diastereoméricos,^{4,5} tal como se discutió para las BTZ **1** en el Capítulo 1.

Síntesis de BNTZ **17a-e**

Para la síntesis de los compuestos **17a** (R=H) y **17b** (R=5-CF₃), los materiales de partida 2-mercaptoanilina **18a** y 5-trifluorometil-2-mercaptoanilina **18b** se encontraron disponibles comercialmente. Por lo tanto, se exploró la preparación de los derivados de interés utilizando una ruta sintética análoga a la utilizada para BTZ **1a**, por doble condensación de **18** con el ditiano **6a**,³ ver Esquema 5.2.

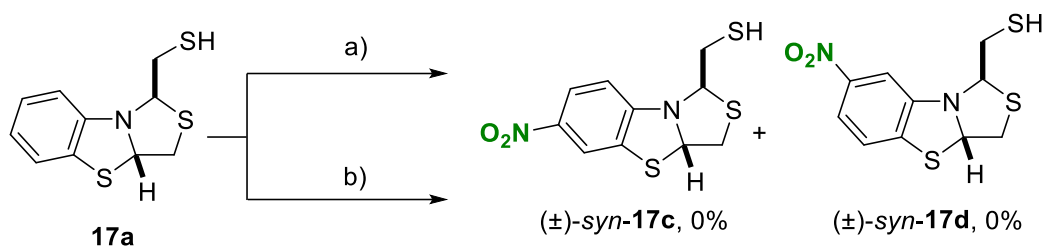


Esquema 5.2: Síntesis de las BNTZ **17a-b** a partir de las 2-mercaptoanilinas **18a-b**.

Los BBH **17a** y **17b** se obtuvieron con 85 y 56% de rendimiento, Esquema 5.2.

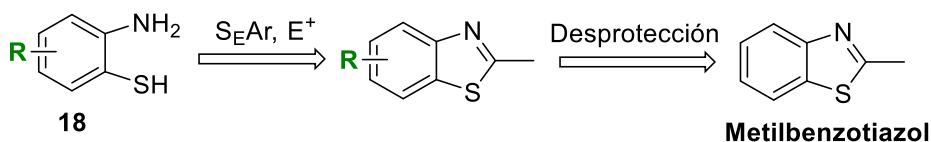
Para la síntesis de los derivados **17c** (4-NO₂) y **17d** (5-NO₂) no se contaba con la 2-mercaptoanilina de partida; por lo tanto, se plantearon dos estrategias sintéticas: i) introducir el grupo de interés una vez sintetizada la BNTZ **17a** a través de una reacción de nitración del tipo S_EAr y ii) sintetizar la 2-mercaptoanilina sustituida **18** necesaria para luego hacerla reaccionar con ditiano **6a**.

Utilizando la estrategia i), se ensayó la preparación de los derivados **17c-d** a partir de **17a**. Para ello se ensayaron dos condiciones de nitración descritas en bibliografía: a) HNO₃ fumante, H₂SO₄, 0°C;⁶ y b) KIO₄, NaNO₂, KHSO₄ en MeCN,⁷ ver Esquema 5.3.



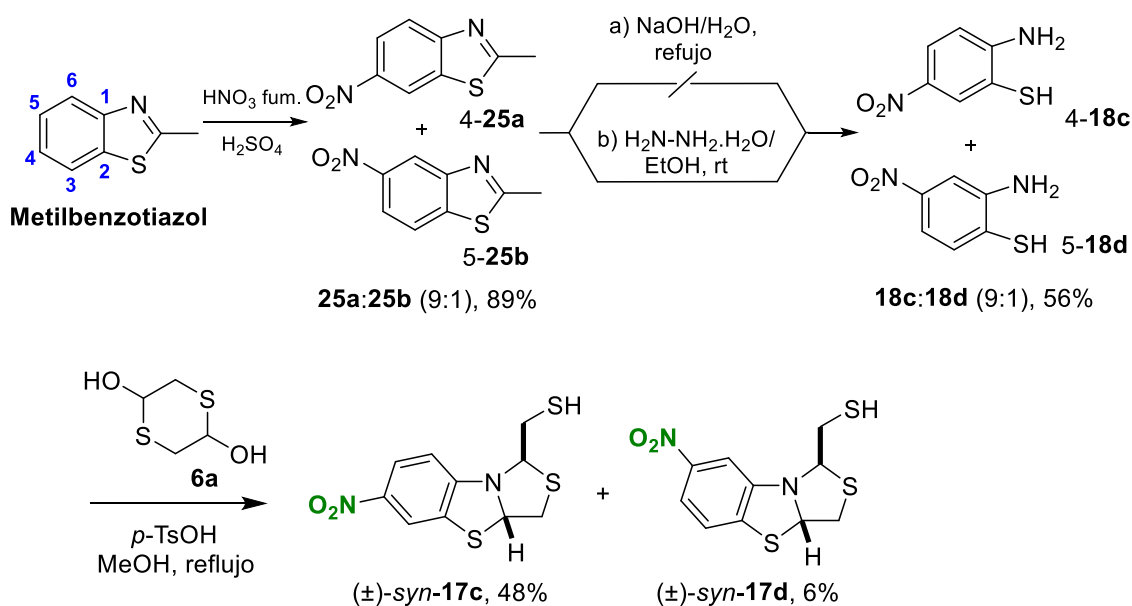
Esquema 5.3: Condiciones de nitración ensayadas sobre **17a**: a) HNO₃ fum, H₂SO₄, 0°C; b) KIO₄, NaNO₂, KHSO₄ en MeCN.

Ambas condiciones resultaron muy drásticas y llevaron a la descomposición del material de partida **17a**. Por lo tanto, se decidió explorar la estrategia ii) y preparar las 2-mercaptoanilinas de partida para luego ciclar, según el análisis retrosintético que se muestra en el Esquema 5.4.



Esquema 5.4: Retrosíntesis de 2-mercaptoanilinas sustituidas **18** a partir de metilbenzotiazol.

Siguiendo esta estrategia sintética, se realiza una reacción de S_EAr sobre el metilbenzotiazol y posteriormente se desprotege el anillo de tiazol. La síntesis de las 2-mercaptoanilinas **18c-e** de interés se muestran en el Esquema 5.5.



Esquema 5.5: Ruta sintética de 4-nitro-2-mercaptoanilina **18c** y 5-nitro-2-mercaptoanilina **18d**.

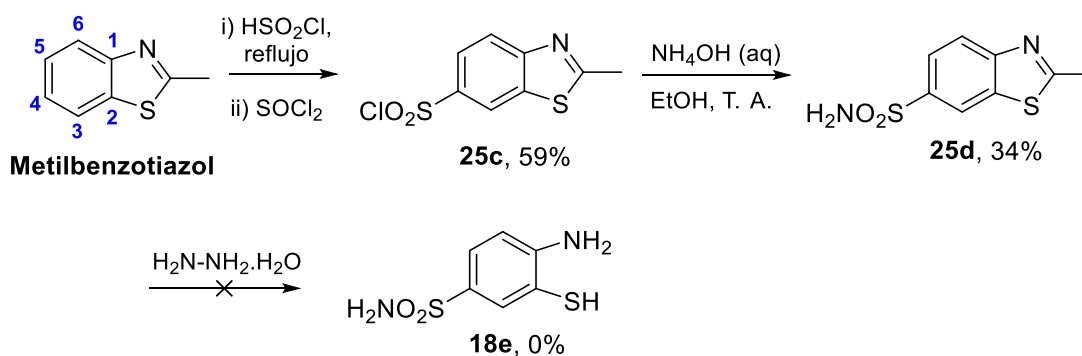
Para la síntesis de **18c** y **18d**, en primer lugar, se llevó a cabo la nitración del metilbenzotiazol, utilizando HNO_3 fumante y H_2SO_4 , metodología descrita por Kele y col.,⁶ obteniéndose una mezcla de isómeros **25a:25b** (89%, 9:1) de acuerdo a lo descrito en bibliografía,⁶ Esquema 5.5. Esta proporción se debe a que el nitrógeno tiene un efecto activante mayor que el azufre, obteniéndose en la $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$ mayoritariamente el compuesto **25a** sustituido en posición 4.

Debido a la dificultad en la separación de los isómeros, se trabajó con mezcla de productos nitrados **25a-b** y se ensayaron dos condiciones de hidrólisis descritas en literatura: a) $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$ a reflujo⁸ y b) NH_2NH_2 en EtOH a temperatura ambiente,⁶ Esquema 5.5.

Utilizando las condiciones a) no se logró obtener los compuestos deseados **18c-d**. El análisis por ^1H RMN del crudo de reacción mostró varias señales correspondientes a productos de degradación, formados probablemente debido a las drásticas condiciones empleadas.

Por otro lado, las condiciones b) llevaron a la obtención de los productos deseados como una mezcla de **18c** y **18d** (56%, 9:1), ver Esquema 5.5. Los isómeros tampoco pudieron ser separados por cromatografía en columna. Esta mezcla se usó para la reacción de ciclocondensación con el ditiano **6a** según Esquema 5.5, dando los compuestos **17c** y **17d** en 48 y 6% de rendimiento, respectivamente.

Para la síntesis de la 2-mercaptoanilina **18e** conteniendo un grupo sulfonamida, se empleó la misma estrategia empleada para los compuestos nitrados, donde se realiza la $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$ sobre el metilbenzotiazol,⁹ y luego se desprotege el grupo amino y el tiol, Esquema 5.6.

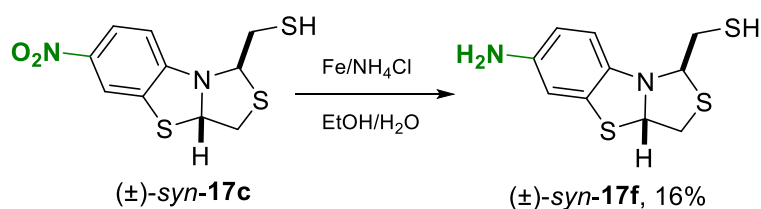


Esquema 5.6: Síntesis del 4-SO₂NH₂-2-mercaptoanilina **18e**.

En primer lugar, se llevó a cabo la clorosulfonación del metilbenzotiazol para dar **25c** (59%). De acuerdo con el trabajo de los autores, sólo se aísla el compuesto sustituido en posición 4. Luego, se hizo reaccionar **25c** con NH₄OH acuoso al 30% para dar la sulfonamida **25d** (34%). Por último, se ensayó la reacción de hidrólisis de **25d** utilizando NH₂NH₂ en EtOH, pero no se obtuvo la 2-mercaptoanilina **18e** deseada. El análisis por TLC mostró que el material de partida no reaccionó, incluso agregando más equivalentes de NH₂NH₂. Un posterior análisis por ¹H RMN confirmó que el material de partida se mantuvo inalterado luego de la reacción. Por lo tanto, no fue posible obtener la 2-mercaptoanilina **18e** necesaria para la preparación de la BNTZ deseada **17e** conteniendo el grupo sulfonamida.

Síntesis de la BNTZ **17f**

La BNTZ **17f** (4-NH₂) se obtuvo a partir de **17c** (4-NO₂) por reducción del grupo NO₂ utilizando hierro en polvo y NH₄Cl⁶ Esquema 5.7.



Esquema 5.7: Síntesis de la BNTZ **17f** a partir de **17c** por reducción del grupo nitro.

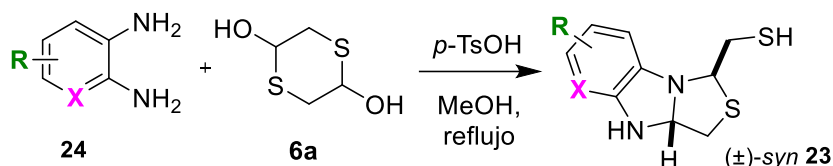
Se obtuvo el compuesto deseado **17f** con un 16% de rendimiento. En el crudo de la reacción se observaron señales pertenecientes a varios productos de degradación, probablemente especies diméricas o productos de apertura del

anillo tiazolidínico, lo que explicaría el bajo rendimiento obtenido. Se probaron otros agentes reductores como zinc en polvo utilizando CuSO_4 como catalizador, pero no se logró mejorar los rendimientos.

Síntesis de BIMi **23**

Dada la mayor variedad de 2-aminoanilinas sustituidas comercialmente disponibles respecto a los 2-mercaptoanilinas sustituidas, la preparación de BBH se enfocó principalmente en la síntesis de BIMi **23**.

Para la síntesis de los compuestos **23a-q** se utilizó como materiales de partida las 2-aminoanilinas **24** disponibles comercialmente y el ditiano **6a**, ver Esquema 5.8 y rendimientos en Tabla 5.1.



Esquema 5.8: Síntesis de las BIMi **23a-q** a partir de los 2-aminoanilinas **24** comercialmente disponibles.

Tabla 5.1: Síntesis de BIMI **23**.

Entrada	Producto	X	-R	Relación de isómeros -4/-5 ^a	23, R _{global} (%) ^b	23, R (%) ^c
1	(±)- 23a	C	H	-	-	58
2	(±)- 23b	C	4-5 naftil	-	-	71
3	(±)- 23c	C	4-CH ₃	6/4	58	17
4	(±)- 23d	C	5-CH ₃			12
5	(±)- 23e	C	4-CO ₂ Et	3/7	49	12
6	(±)- 23f	C	5-CO ₂ Et			26
7	(±)- 23g	C	4-NO ₂	3/7	83	22
8	(±)- 23h	C	5- NO ₂			49
9	(±)- 23i	C	4-F	7/3	75	39
10	(±)- 23j	C	5-F			25
11	(±)- 23k	C	4-Br	7/3	69	36
12	(±)- 23l	C	5-Br			19
13	(±)- 23m	C	4-CO ₂ H	-	-	-
14	(±)- 23n	C	5- CO ₂ H	-	-	-
15	(±)- 23o	C	3-OH	-	-	-
16	(±)- 23p	C	6-OH	-	-	-
17	(±)- 23q	N	H	-	-	-

^aRelación de la mezcla 4-BIMI/5-BIMI determinada por ¹H RMN en el crudo de reacción; ^bRendimiento total de la mezcla de isómeros; ^cProductos aislados luego de purificación cromatográfica.

Las BIMI **23a** y **23b** se obtuvieron a partir de la 2-aminoanilina sin sustituir correspondiente, en 58 y 71% de rendimiento, Tabla 5.1 entradas 1 y 2.

Cuando se utilizan 2-aminoanilinas sustituidas, se pueden obtener dos posibles isómeros de BIMI. En la Figura 5.6 se muestra como ejemplo la obtención de los isómeros 5-BIMI y 4-BIMI a partir de 5-R-2-aminoanilinas.

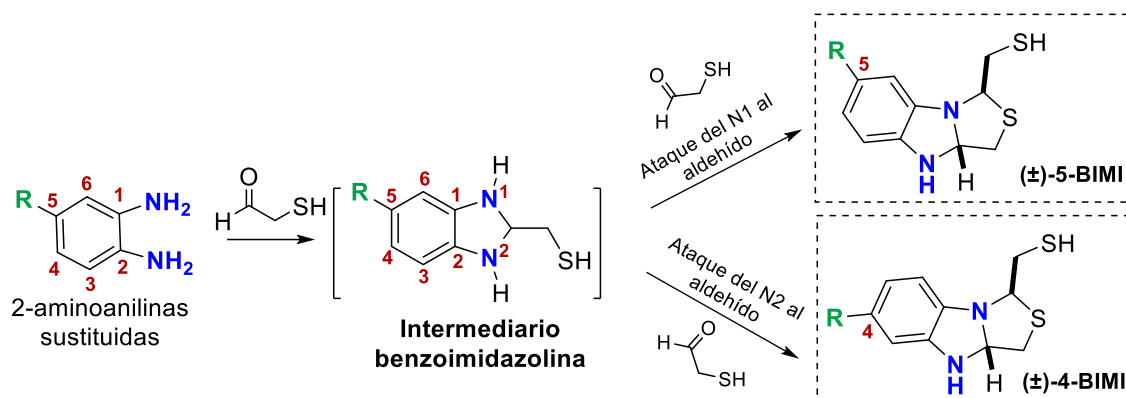


Figura 5.6: Síntesis de isómeros (±)-4-BIMI y (±)-5-BIMI a partir de 5-R-2-aminoanilinas.

Después de la primera ciclación, se forma un intermedio benzoimidazolidina, con dos nitrógenos capaces de reaccionar con una segunda molécula de aldehído. La presencia del sustituyente R dará lugar a una diferencia en la nucleofilia entre el N¹ y N², y determinará la relación 4/5-BIMI, Figura 5.6.

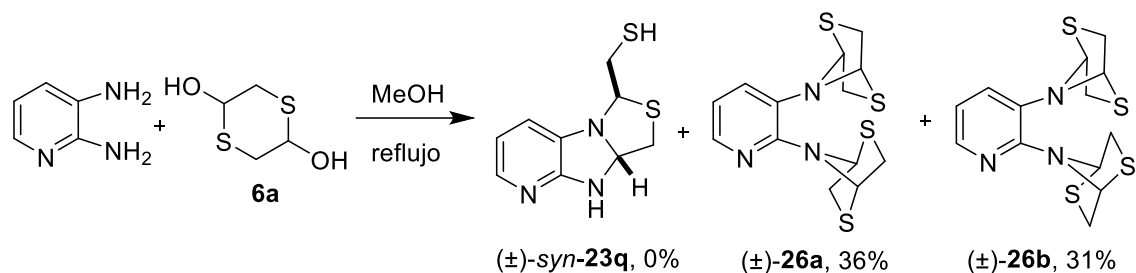
Los grupos atractores de electrones en posición 5 disminuyen la nucleofilia del N² con respecto a N¹. Por lo tanto, el N¹ será preferentemente el nucleófilo en la segunda ciclación, dando el compuesto 5-sustituido (5-BIMI) como mayoritario. Tal es el caso de los productos **23e** (4-CO₂Et) y **23f** (5-CO₂Et), que se obtienen en una relación 3/7 en el crudo de reacción (determinada por ¹H RMN). Estos isómeros se obtienen en un 49% de rendimiento total de la mezcla, y con un rendimiento de 12 y 29% para los isómeros puros **23e** y **23f**, respectivamente, Tabla 5.1 entradas 5 y 6, respectivamente.

Por otro lado, los grupos dadores de electrones en posición 5 aumentan la nucleofilia de N² con respecto a N¹, proporcionando el compuesto 4-BIMI como producto mayoritario. Tal es el caso de los isómeros **23c** (4-CH₃) y **23d** (5-CH₃), que se obtienen en una relación 6/4, con un 58% de rendimiento global, y con un rendimiento de 17 y 12% para los isómeros puros **23c** y **23d**, respectivamente, Tabla 5.1, entradas 3 y 4.

Por otro lado, cuando el sustituyente R es un ácido carboxílico y un alcohol, no se obtuvieron las BIMI deseadas **23m-n** y **23o-p**, respectivamente, Tabla 5.1, entradas 13-17. En los dos casos se obtuvieron mezclas complejas de especies de acuerdo al análisis del crudo de reacción por ¹H RMN. Ambos

sustituyentes tienen en común su característica ácida, lo que podría ser el motivo de la falta de estabilidad de los compuestos.

Al llevar a cabo la síntesis del compuesto **23q** a partir de la 2-3-diamino piridina, no se obtuvo el producto deseado, sino que se aislaron los ditionazabicclos (DTA) **26a** y **26b** como una mezcla racémica de dos diastereómeros en una relación 1:1, ver Esquema 5.9.



Esquema 5.9: Síntesis del compuesto **23q** llevó a la formación de ditionazabicclos (DTA) **26**.

Este tipo de estructuras ya habían sido aisladas cuando el dinucleófilo utilizado era etilendiamina y otros 1,2-aminoalcoholes o 1,2-aminofenol.¹⁰ En la Figura 5.7 se comparan los mecanismos propuestos para la formación de BIMl y DTA.

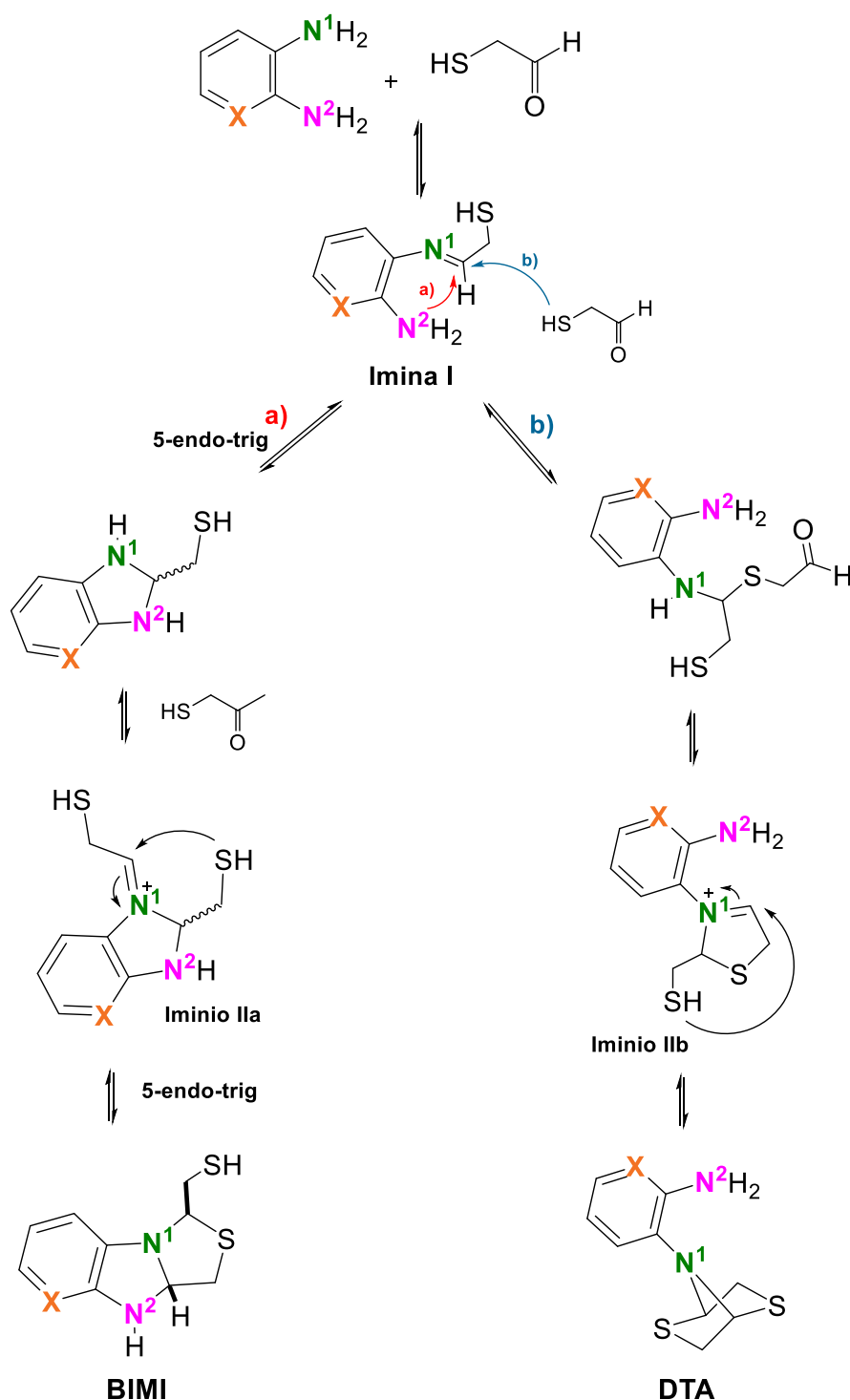


Figura 5.7: Mecanismos propuestos para la formación de BIMI ($X=C$) y DTA ($X=N$).

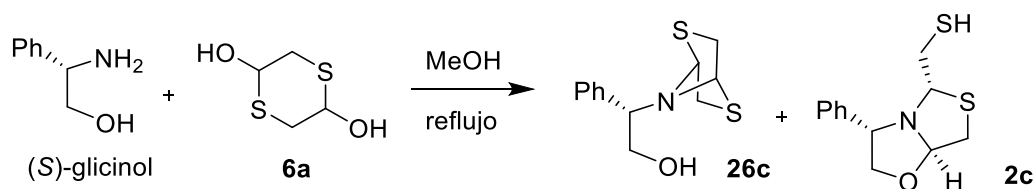
En una primera etapa se forma la imina I entre el N^1 y el primer equivalente de mercaptoacetaldehído. Luego, el mecanismo puede continuar por dos rutas: en la ruta a), se da un ataque intramolecular del N^2 a la imina, formándose el primer ciclo a través de una reacción de ciclación *5-endo-trig*, que luego reacciona con el segundo equivalente de mercaptoacetaldehído para formar la

BIMI. En la ruta b), la imina I es atacada por el grupo tiol de un segundo equivalente de mercaptoacetaldehído, que luego cicla formando el iminio IIb. Finalmente, el ataque intramolecular del tiol al iminio lleva a la formación del primer DTA. La formación del segundo DTA se daría en forma análoga.

Si se compara la reactividad de la 1,2-diaminobenceno con la 2,3-diaminopiridina se observa que, en el segundo caso, el N² será menos nucleófilo por el efecto electrón-atrayente del N de la piridina. Por este motivo, no se ve favorecida la ciclación *5-endo-trig*, y el mecanismo sigue la ruta b).

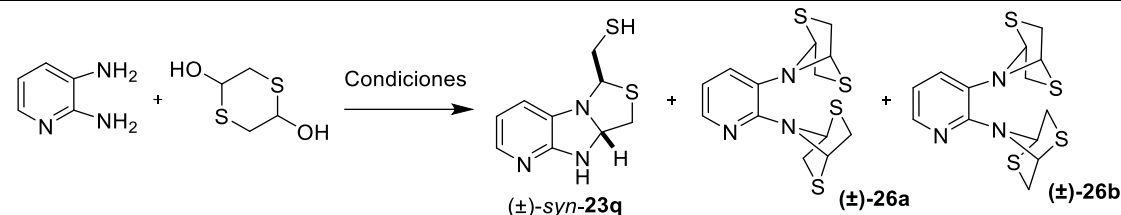
En el caso del 1,2-diaminobenceno, ambos nitrógenos son equivalentes, y se favorece la formación del BBH a través de dos reacciones de ciclación *5-endo-trig* (ruta a).

El uso de 2-aminoalcoholes como materiales de partida es otro ejemplo en donde se obtienen mezclas de DTA y oxazolidinil-tiazolidina OTZ en proporciones que van desde 0:10 hasta 10:0. Por ejemplo, en trabajos previos se ensayó la reacción de condensación entre el ditiano **6a** y (S)-glicinol, y se obtuvo una mezcla de la OTZ **2c** y el DTA **26c**, cuya relación depende fuertemente del solvente de reacción y del pH del medio, ver Esquema 5.10.¹⁰



Esquema 5.10: 2-aminoalcoholes como el (S)-glicinol al reaccionar con ditiano **6a** llevan a una mezcla de DTA **26c** y OTZ **2c**.

En base a este antecedente, se ensayaron diferentes solventes orgánicos (EtOH, Tolueno, Xileno) y buffers acuosos (pH 3, 5 y 7) para favorecer la formación de la BIMi deseada **23q**, ver Tabla 5.2

Tabla 5.2: Ensayo de diferentes condiciones para la obtención de la BMI **23q**.


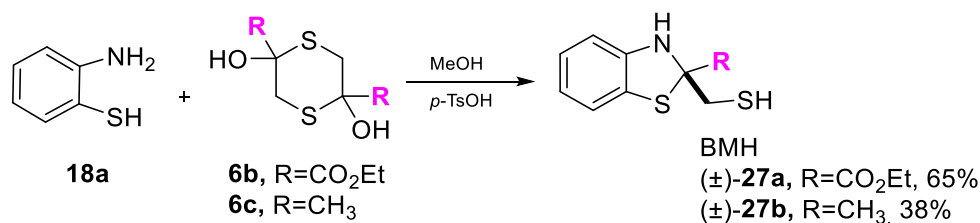
Condiciones	23q, R (%)	26a, R (%) ^a	26b, R (%) ^a
EtOH	0	34	32
Tolueno	0	25	28
Xileno	0	21	23
Buffer pH 3	0	18	15
Buffer pH 5	0	19	25
Buffer pH 7	0	26	24

^aProductos aislados luego de purificación cromatográfica.

En todas las condiciones empleadas se observó la formación de los DTA **26a-b**, mientras que no se observó la formación del producto deseado **23q**.

Síntesis de benzotiazolidinas **27**

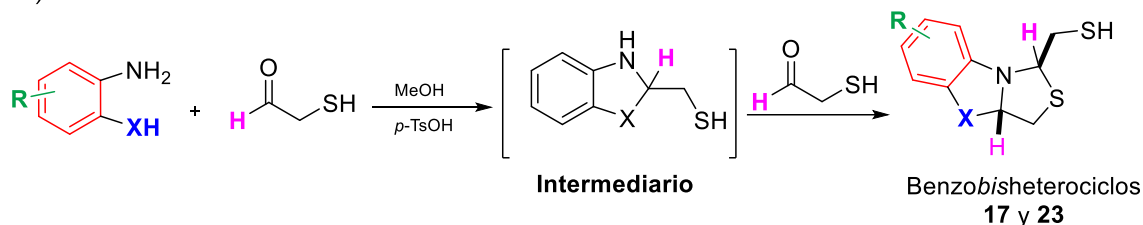
Se decidió explorar la síntesis de benzotiazolidinas **27a** y **27b**, por condensación del 2-aminotiofenol **18a** y ditianos sustituidos **6b** y **6c** en lugar del ditiano **6a**,⁴ ver Esquema 5.11. Esto llevaría a la formación de benzomonoheterociclos (BMH), en forma análoga a lo que sucede en la síntesis de TZ **3** discutido en el Capítulo 1.

**Esquema 5.11:** Síntesis de benzotiazolidinas **27**.

Las benzotiazolidinas **27a-b** se obtuvieron en un 65 y 38% de rendimiento, respectivamente, Esquema 5.11.

Tal como se discutió en el Capítulo 1, cuando se utiliza el ditiano no sustituido **6a**, no se puede detener la reacción en la primera ciclación, sino que, al ser el aldehído muy electrofílico, rápidamente ocurre la segunda ciclación, dando lugar a los benzobisheterociclos BNTZ **17** y BIMi **23**, Figura 5.8A.

A) Ditianos no sustituidos: Síntesis de benzobisheterociclos



B) Ditianos sustituidos: Síntesis de benzomonoheterociclos

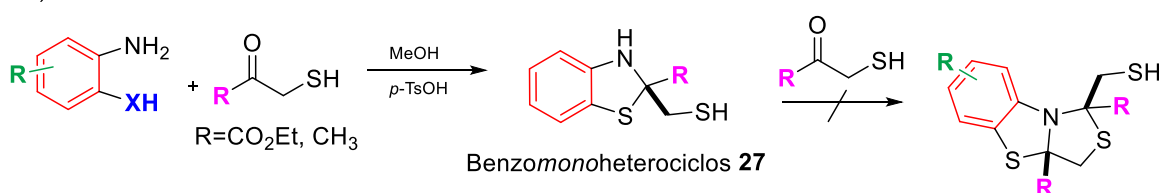


Figura 5.8: A) Síntesis de benzobisheterociclos utilizando ditianos no sustituidos; B) Síntesis de benzomonoheterociclos utilizando ditianos sustituidos.

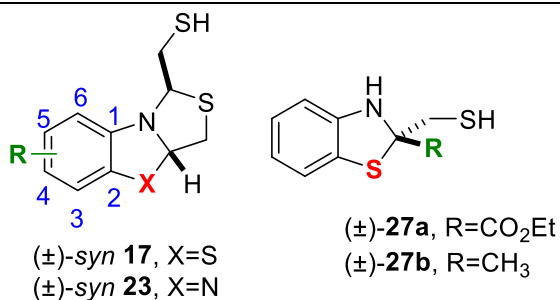
En cambio, cuando el ditiano está sustituido ($R = \text{CO}_2\text{Et}$, CH_3), no se da la segunda ciclación, dando lugar a las benzotiazolidinas **27**, Figura 5.8B. Esto probablemente se debe a que: i) las correspondientes cetonas son menos electrofílicas y ii) el mayor volumen del grupo R que hace que el N encuentre más impedimento para atacar como nucleófilo.

Se realizaron intentos para preparar benzoimidazolidinas a partir de los correspondientes 1,2-diaminobenceno y los ditianos **6b** y **6c**, pero no fue posible aislar los productos de reacción debido principalmente a la descomposición de los mismos.

5.3.3 Ensayos de actividad biológica

Determinación de la actividad inhibitoria frente a MBL de las 3 subclases B1-3

Se caracterizó el modo de inhibición y se determinaron los valores de IC_{50} para las BNTZ **17a-b**, **17f**, **27a-b** y BIMi **23a** y **23e-f** preparadas frente a MBL pertenecientes a las tres subclases: B1, B2 y B3. Los resultados se muestran en la Tabla 5.3, incluidas las actividades del compuesto de referencia **1a**.

Tabla 5.3: Valores de IC₅₀ para los análogos **17a-b**, **17f**, **23a**, **23e-f** y **27a-b** frente a las tres subclases de MBL.

Compuesto	IC ₅₀ μM				
	NDM-1 (B1)	VIM-2 (B1)	IMP-1 (B1)	Sfh-I (B2)	L1 (B3)
1a	13 ± 1	8.5 ± 0.3	17.3 ± 0.9	0.79 ± 0.05	22 ± 1
17a (R=H)	0.29 ± 0.03	0.088 ± 0.002	0.063 ± 0.002	1.4 ± 0.1	0.67 ± 0.06
17b (R=5-CF ₃)	10.0 ± 0.7	0.78 ± 0.08	1.6 ± 0.1	11 ± 2	5.4 ± 0.4
17f (R=4-NH ₂)	0.6	0.27	0.12	0.7	0.79
23a (R=H)	0.77 ± 0.07	1.40 ± 0.05	1.01 ± 0.06	3.7 ± 0.3	0.62 ± 0.03
23e (R=4-CO ₂ Et)	0.38 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.05 ± 0.002	3.6 ± 0.4	0.16 ± 0.02
23f (R=5-CO ₂ Et)	0.072 ± 0.007	2.5 ± 0.2	1.4 ± 0.2	46 ± 3	0.55 ± 0.07
27a	12 ± 2	ND	ND	ND	ND
27b	21 ± 1	ND	ND	ND	ND

ND = No determinado. Código de color: 0.05 0.5 1.0 20 46 μM



Los compuestos BBH **17a** y **23a** sin sustituyentes en el anillo aromático resultaron ser mejores inhibidores de NDM-1, VIM-2, IMP-1 y L1 respecto al compuesto de referencia **1a**. Esto indicaría que la eliminación del ácido carboxílico y la inclusión de un anillo aromático fusionado podría ser una estrategia prometedora para mejorar la actividad *in vitro* de estos compuestos, validando los resultados obtenidos *in silico*.

En particular, **17a** es un inhibidor muy potente frente a VIM-2 e IMP-1 con valores de IC₅₀ en el rango nM, y resultó casi 50 veces más activo frente a NDM-1 que **1a**.

Si se compara la sustitución en el anillo de un S (**17a**) por un grupo NH (**23a**) se observa para el derivado de S una mayor potencia inhibitoria frente a VIM-2 e IMP-1, mostrando **17a** una disminución de los valores de IC₅₀ dos

órdenes de magnitud respecto a **23a**. Este efecto no fue tan relevante en la inhibición de NDM-1, L1 y Sfh-1.

Con respecto a la enzima Sfh-1 perteneciente a la subclase B2, ambos compuestos **17a** y **23a** resultaron ligeramente menos activos que el compuesto **1a**, aunque en el mismo orden. Esto indicaría que la inclusión del anillo bencénico fusionado no compromete la inhibición de esta enzima como ocurría con el derivado **15a** conteniendo el grupo bencilamina en un “brazo flexible”.

La introducción de un grupo CF₃ en el compuesto **17b** (5-CF₃) disminuyó la actividad inhibitoria frente a todas las subclases respecto al compuesto sin sustituir **17a**. La actividad frente a NDM-1 y L1 es del mismo orden que para el compuesto de referencia **1a**, y ligeramente más activo frente a VIM-2 e IMP-1 comparado con **1a**. Respecto a la enzima Sfh-1, resultó un orden de magnitud menos activo respecto a **1a**.

La inclusión de un grupo amino en posición 4 en el derivado **17f** (4-NH₂) logró disminuir las IC₅₀ frente a VIM-2 e IMP-1 respecto a **1a** en uno y dos órdenes de magnitud, respectivamente, pero no logró mejorar la actividad frente a estas enzimas respecto a **17a** sin sustituyentes. Por otro lado, **17f** mantiene el orden de actividad frente a NDM-1 y L1 respecto al compuesto sin sustituir **17a**. Frente a la enzima Sfh-1 lleva a una leve mejora de la IC₅₀, aunque en el mismo orden.

El compuesto **23e** (4-CO₂Et) mantuvo el orden de actividad respecto a **17a** para todas las subclases de MBL.

Por último, el compuesto **23f** (5-CO₂Et) logra aumentar aproximadamente 4 veces la actividad respecto a **17a** en NDM-1, y casi 200 veces respecto a la **1a**. Sin embargo, esta modificación compromete la actividad frente Sfh-1 respecto a **17a** y **1a**. Esta enzima posee un sitio activo más restringido, y la introducción de un sustituyente voluminoso parece no ser una buena estrategia para mejorar la actividad frente a esta clase de enzimas. Para las enzimas VIM-2, e IMP-1, la actividad se ve levemente comprometida, y se mantiene en el mismo orden frente a L1 respecto a **17a**.

Para la benzotiazolidina **27a** (R-CO₂Et) la actividad frente a la enzima NDM-1 se mantiene en el mismo orden respecto al compuesto de referencia **1a**,

mientras que la benzotiazolidina **27b** (R-Me) resultó menos activa frente a esta enzima. Por lo tanto, la síntesis de este tipo de benzomonoheterociclos no parecería ser una estrategia adecuada para mejorar la actividad *in vitro* del compuesto **1a** frente a esta enzima.

El resto de los derivados BNTZ y BIMi preparados fueron enviados al Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Argentina, para su caracterización biológica.

Ensayos de Time-Kill en E. coli expresando NDM-1

Se evaluó la actividad de los inhibidores **17a-b**, **23a** y **23e-f** frente a cepas bacterianas resistentes a través de experimentos del tipo Time-Kill, según se detalló en el Capítulo 4. Para ello, se incubaron células de *E. coli* expresando NDM-1 en presencia y ausencia de inhibidor y concentraciones subletales de imipenem (6 µg/mL). A continuación, se realizó el conteo de células viables a las 1, 3 y 5 hs, ver gráficas en Figura 5.9.

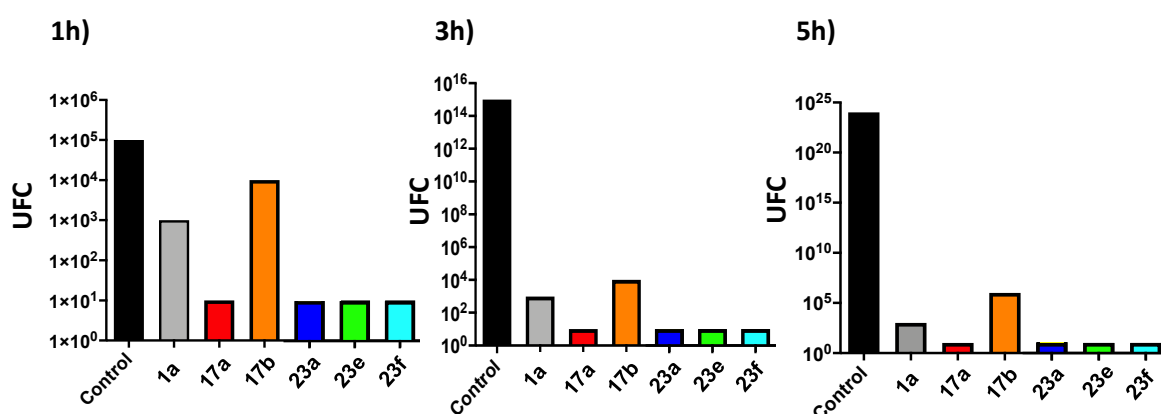


Figura 5.9: Experimentos Time-Kill empleando células de *E. coli* y los inhibidores **1a** (gris), y los nuevos análogos: **17a** (rojo), **17b** (anaranjado), **23a** (azul), **23e** (verde) y **23f** (celeste); Control: imipenem en DMSO (negro). Tiempos: 1, 3 y 5 hs.

Los análogos **17a** (rojo), **23a** (azul) y **23e** (verde) y **23f** (celeste) tuvieron un fuerte efecto sobre el número de células viables, logrando una notoria reducción luego de 1 h de incubación, superior al mostrado por el compuesto de referencia **1a** (gris). A tiempos más prolongados (3 y 5 horas), el efecto fue aún mayor, lo que indica que los compuestos son estables en ese tiempo y en las condiciones del ensayo, y que a medida que transcurre el tiempo aumenta la

cantidad de moléculas que alcanzan el medio intracelular e inhiben a la enzima NDM-1.

Por otro lado, inicialmente el compuesto **17b** (anaranjado) llevó a un conteo de células viables similar al control (imipenem en DMSO, Figura 5.6, negro). Sin embargo, a tiempos mayores el compuesto fue capaz de ingresar en la bacteria e inhibir la enzima NDM-1, reduciendo el número de células viables respecto al control, aunque su efecto no es tan fuerte como el observado para el resto de los compuestos, incluso luego de 5 horas de incubación.

Ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria MIC

En segundo lugar, se estudió el efecto de los compuestos sobre las MIC de imipenem en *E. coli* que expresa NDM-1 (compuestos **1a**, **17a-b**, **23a** y **23e-f**, Tabla 5.4) y de meropenem en *E. coli* que expresa IMP-1 e IMP-6 (compuesto **17f**, Tabla 5.5). Además, el compuesto **17a** también fue probado frente a cepas clínicas de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* que expresan NDM-1, Tabla 5.4.

Tabla 5.4: MIC de imipenem (IMI) en presencia y en ausencia de los inhibidores **1a**, **17a-b**, **23a** y **23e-f** frente a *E. coli* recombinante conteniendo el plásmido DH5α-NDM-1 y las cepas aisladas de casos clínicos: *K. pneumoniae* 1.41-NDM-1 y *E. cloacae* 1.28-NDM-1.

	Cepa	Imi	Imi + 1a	Imi + 17a	Imi + 17b	Imi + 23a	Imi + 23e	Imi + 23f
MIC ^a (μg/mL)	<i>E. coli</i> -NDM-1	16	2	2	4	8	8	8
	<i>K. pneumoniae</i> 1.41-NDM-1	16	ND ^b	4	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
	<i>E. cloacae</i> 1.28-NDM-1	16	ND ^b	4	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b

^aDeterminado por el método de microdilución en caldo siguiendo las directrices del CLSI.¹¹ ^bND = No determinado

Tabla 5.5: MIC de Meropenem (Mer) en presencia y en ausencia de los compuestos **1a** y **17f** frente a *E. coli* DH5α-IMP-1 y DH5α-IMP-6.

Cepa	MIC ^a (μg/mL)		
	Mer	Mer + 1a	Mer + 17f
<i>E. coli</i> -IMP-1	4	0.25	0.25
<i>E. coli</i> -IMP-6	32	1	0.5

^aDeterminado por el método de microdilución en caldo siguiendo las directrices del CLSI.¹¹

Según los resultados, los nuevos análogos ensayados **17a-b**, **17f**, **23a** y **23e-f** fueron capaces de restaurar la susceptibilidad de *E. coli* frente al imipenem o meropenem, según corresponda.

En particular, el compuesto **17a** logró reducir 8 veces la MIC de imipenem frente a *E. coli* expresando NDM-1, similar al resultado obtenido para el compuesto **1a**, Tabla 5.4.

El compuesto **17f** (4-NH₂) mostró una mayor reducción de la MIC de meropenem frente a *E. coli* expresando IMP-6 respecto al compuesto de referencia **1a** (reducción de 64 y 32 veces la MIC de meropenem, respectivamente). Esto podría deberse a la presencia del grupo amino, que se ha reportado que mejora la permeabilidad a través de la pared celular bacteriana, principalmente en Gram(-). Además, logró reducir 16 veces la MIC de meropenem frente a *E. coli* expresando IMP-1, llevando a los mismos resultados que para **1a**, Tabla 5.5.

Por otro lado, los resultados muestran que el compuesto **17a** es capaz de restaurar el efecto de imipenem contra cepas bacterianas aisladas de casos clínicos: *K. pneumoniae* y *E. cloacae* que expresan NDM-1, logrando reducir 4 veces las MICs, resultado altamente prometedor.

5.3.4 Determinación estructural de los complejos MBL:inhibidores

Para comprender mejor la relación estructura-actividad de los nuevos análogos, se realizaron estudios cristalográficos para visualizar y definir el modo de unión de los inhibidores en los sitios activos de MBL de la subclase B1. Estos estudios fueron realizados en la Universidad de Bristol a cargo del Prof. James Spencer.

Se obtuvieron las estructuras cristalinas de alta resolución de los complejos enzima:inhibidor de NDM-1 con **23a** y de VIM-2 con los compuestos **23a** y **23e-f**. No se lograron obtener cristales para los derivados **17a-b** debido a su baja solubilidad en el buffer de cristalización.

Complejo NDM-1:**23a** y VIM-2:**23a**

Se obtuvieron las estructuras cristalinas de **23a** unidas a las MBL NDM-1 y VIM-2 con una resolución de 1.58 Å y 1.56 Å, respectivamente, Figura 5.7.

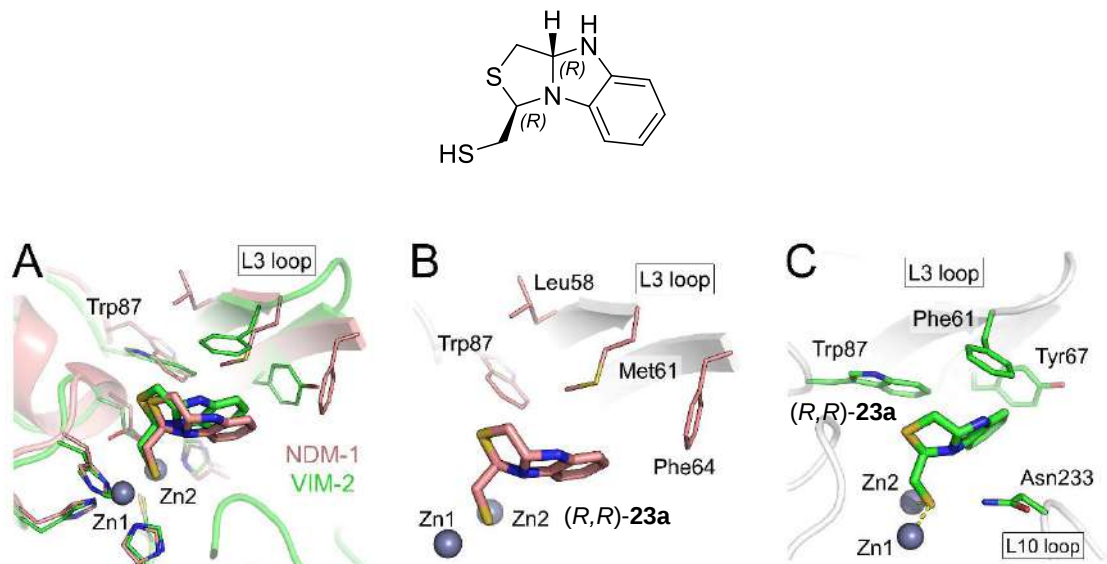


Figura 5.7: Estructuras cristalinas de (R,R)-**23a** unido a MBL. Los iones Zn^{2+} se muestran como esferas grises. Los residuos de unión de zinc y los residuos hidrofóbicos que contribuyen a la unión se muestran como barras. (A) Superposición del complejo NDM-1:**23a** (rosado) y VIM-2:**23a** (verde). (B) Complejo NDM-1:**23a**. Los residuos hidrofóbicos en el bucle L3 y Trp87 marcados contribuyen significativamente a la unión. (C) Complejo VIM-2:**23a**. El residuo de Asn233 en el bucle L10 a menudo está implicado en la unión de sustratos e inhibidores, pero en este caso no contribuye a la unión.

Los resultados muestran que, si bien partimos de la mezcla racémica de **23a**, se pudieron obtener complejos cristalinos únicamente con el enantiómero (R,R)-**23a**, Figura 5.7. Esto puede deberse a que la afinidad de las enzimas por este enantiómero es mayor respecto a su enantiómero (S,S).

El modo de unión es similar para ambas enzimas B1, con el centro de zinc unido por el tiol libre que actúa como puente. Sin embargo, en VIM-2, **23a** adopta una posición ligeramente más sumergida en el sitio activo en comparación con NDM-1. En ninguna de las dos enzimas hay interacciones de enlaces de hidrógeno entre el ligando y la proteína. Además, no existe una interacción S- π significativa entre el azufre de la tiazolidina y el residuo de Trp87, que ha demostrado ser una interacción muy importante en sistemas tiazolidinas **3**.¹² Por lo tanto, además de las interacciones tiol-Zn, la unión en ambas enzimas

se estabiliza predominantemente a través de interacciones hidrofóbicas que recubren el sitio activo, particularmente Trp87 y residuos en el bucle L3, Leu58, Met61 y Phe61 en NDM-1 (Figura 5.7b) y Phe61 y Tyr67 en VIM-2 (Figura 5.7c).

Complejo VIM-2:**23e** y VIM-2:**23f**

Se obtuvieron las estructuras cristalinas de **23e** y **23f** unidas a VIM-2 con una resolución de 1.12 Å y 1.38 Å, respectivamente, Figura 5.8.

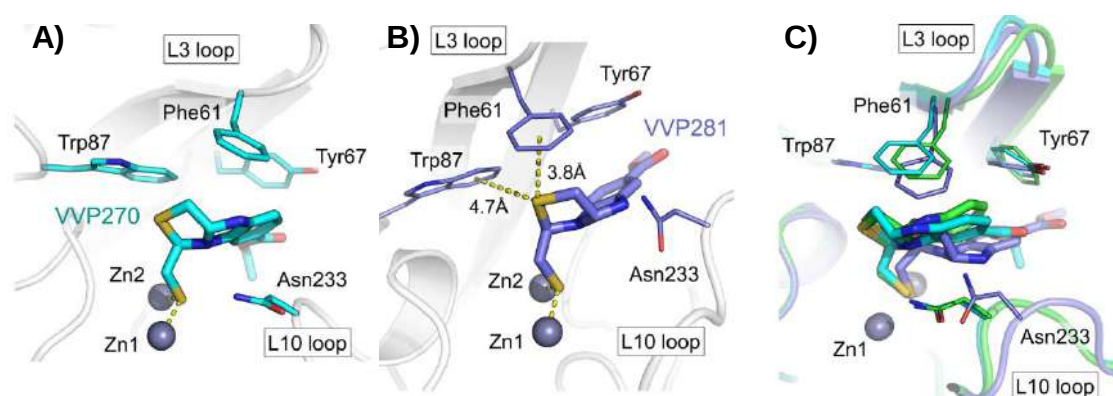


Figura 5.8: Estructuras cristalinas de (*R,R*)-**23e** y (*R,R*)-**23f** unido a VIM-2. Los iones Zn se muestran como esferas grises. Los residuos de unión a zinc y los residuos hidrofóbicos que contribuyen a la unión se muestran como barras. (A) Complejo VIM-2:**23f**, (B) Complejo VIM-2:**23e**. (C) Superposición del complejo VIM-2:**23f** (celeste) y VIM-2:**23e** (verde).

Para los compuestos **23e** y **23f** también se obtuvieron complejos cristalinos únicamente con el enantiómero (*R,R*).

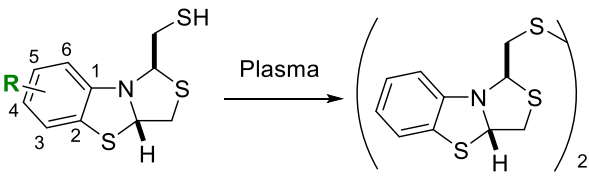
Se observa que la presencia del grupo etil éster afecta la unión en el sitio activo de VIM-2 respecto al compuesto sin sustituir **23a**. Principalmente, la unión provoca una reorganización significativa del bucle L10.

La unión de **23f** presenta mayores diferencias en los modos de unión, principalmente para evitar choques del grupo carbonilo con el residuo de Tyr67 presente en el bucle L3. Esto da como resultado que el anillo de tiazolidina esté menos sumergido en el sitio activo, y gracias a esto el azufre mantiene interacciones S- π tanto con Phe61 como con Trp87, que no se observan para **23a** ni para **23e**. En ningún caso se observan enlaces de hidrógeno entre el ligando y la proteína.

5.3.5 Estudios de estabilidad en plasma humano de las BNTZ 17a y 17f

Para obtener información acerca de la estabilidad en plasma de las BNTZ **17a** y **17f** se incubaron los compuestos en plasma a 37°C y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (10, 20, 30, 45, 60 y 120 min) para su análisis utilizando una técnica validada por HPLC. Se calculó el % remanente de **17a** y **17f** y el $t_{1/2}$ en plasma, ver Tabla 5.6 y las gráficas de la Figura 5.9.

Tabla 5.6: Estudios de estabilidad en plasma de BNTZ **17a** y **17f**. Se muestran los resultados de % remanente de droga vs tiempo y cálculos de tiempo de vida media para una cinética de primer orden.

 (±)-17a, X=S, R=H (±)-17f, X=S, R=4-NH₂				
% Remanente de droga ^a				
Tiempo (h)	% 17a	17a $t_{1/2}$	% 17f	17f $t_{1/2}$
0.5	85		79	
1	62	157 min	55	133 min
2	45		42	
3	18		13	

^aCalculado por HPLC.

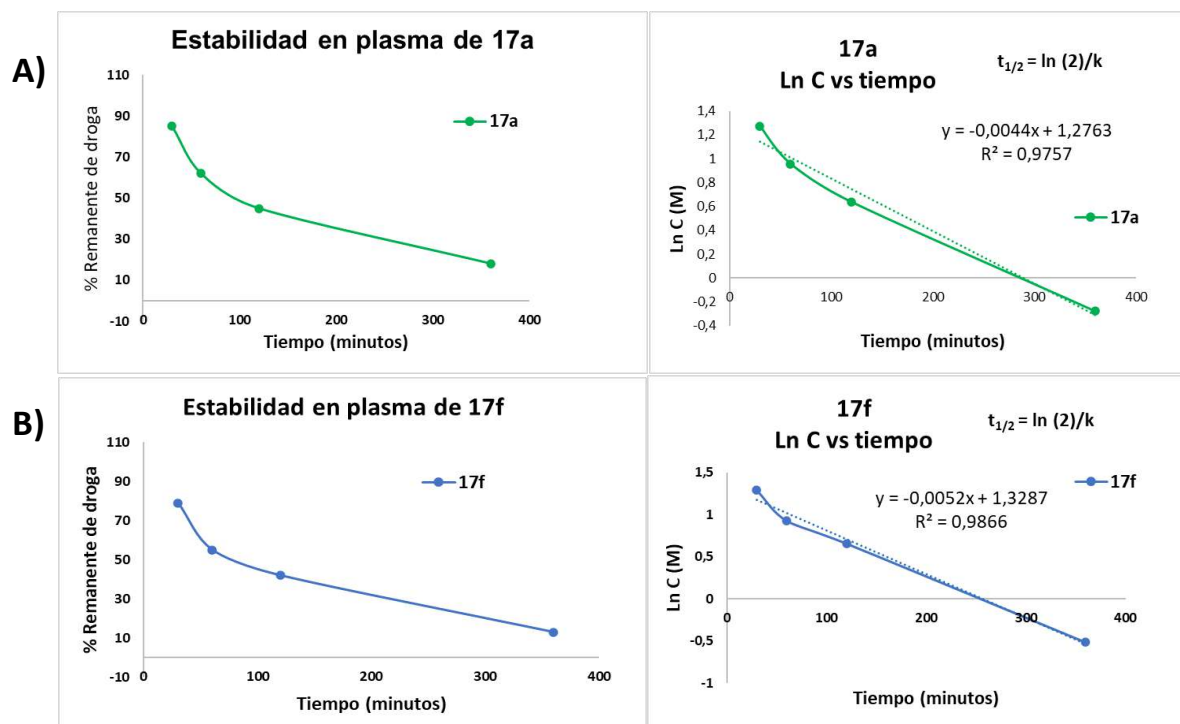


Figura 5.9: Estudios de estabilidad en plasma: Gráficas % remanente vs tiempo y Ln C vs tiempo para los compuestos: A) **17a**; B) **17f**.

Los resultados muestran que en un período de tres horas los compuestos **17a** y **17f** se degradan un 82 y un 87%. Se piensa que la principal especie formada es el dímero, a raíz de los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad de **1a** en plasma, según se discutió en el Capítulo 3.

Además, se calcularon los $t_{1/2}$ para los dos compuestos. El ajuste a un modelo lineal de las gráficas Ln (C) vs tiempo implica que la degradación sigue una cinética de primer orden, ver gráficas en Figura 5.9. A partir de la pendiente de estas gráficas (k) se calcularon los $t_{1/2}$ para **17a**, y **17f** según:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

El compuesto **17a** se degrada en plasma con un $t_{1/2} = 157$ min, Tabla 5.6 y Figura 5.9A, ligeramente mayor que el compuesto **17f**, cuyo $t_{1/2}$ es de 133 minutos, Tabla 5.6 y Figura 5.9B. En la Figura 5.10 se comparan las curvas % remanente de droga vs tiempo para los compuestos **1a**, **17a** y **17e**.

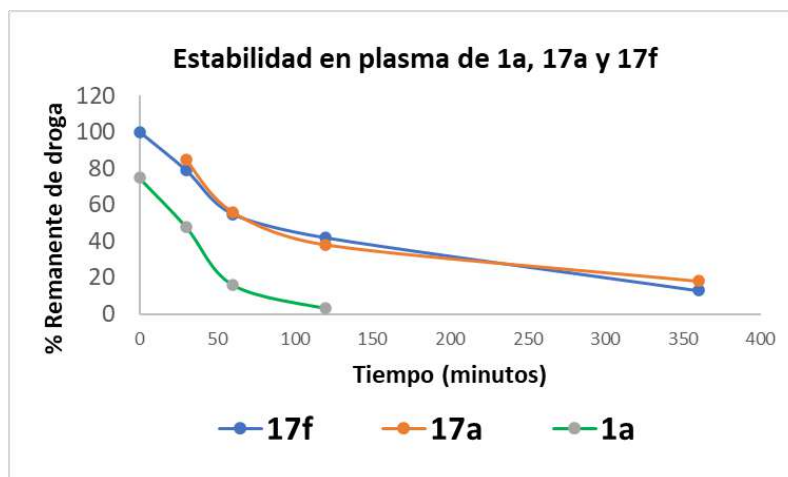


Figura 5.10: Comparación de las curvas % remanente de droga vs tiempo para los compuestos **1a**, **17a** y **17e**.

En su conjunto, estos resultados de estabilidad son alentadores, ya que ambos compuestos resultaron ser significativamente más estables en plasma respecto a **1a** ($t_{1/2}$ = 23 minutos, Capítulo 3, Tabla 3.6 y Figura 3.10a).

5.3.6 Estudios de citotoxicidad

Como último paso de la caracterización de los BBH, se determinó la citotoxicidad de los compuestos **17a**, **23a** y **23e-f** contra fibroblastos de ratón de la línea L929. Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Metaloproteínas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario. Para ello, las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10 %, penicilina G (100 unidades/mL) y estreptomicina (100 mg/L) y se sembraron luego en una placa de 96 pocillos a una densidad de 4500 células por pocillo. Luego de 24 h, se agrega el inhibidor disuelto en DMSO de modo que la concentración final de inhibidor sea 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ y el % final de DMSO sea 1%. Como controles negativos, las células se incuban con la concentración correspondiente de DMSO. La placa se incuba por 24 h.

La viabilidad celular se analiza utilizando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-imetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2Htetrazolio (MTT). Para ello, las células se tiñen con MTT. Luego, los cristales de formazán formados se retiran del medio de cultivo, se disuelven en DMSO y se mide la absorbancia a 562 nm usando un lector de microplacas. Los resultados se muestran en la Figura 5.11.

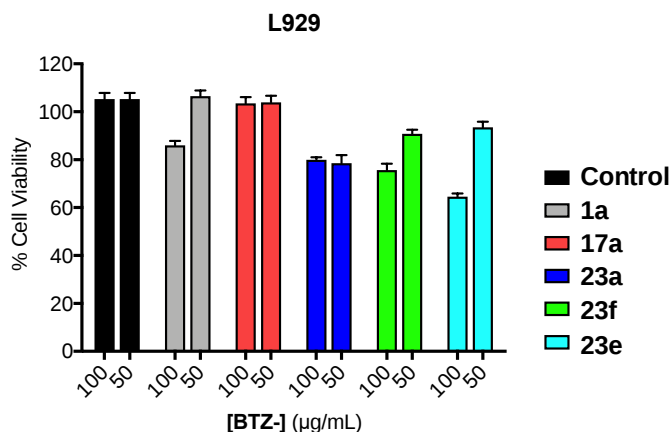


Figura 5.11: Toxicidad de las BNTZ y BIMi en la línea celular L929. Control (negro), **1a** (gris), **17a** (rojo), **23a** (azul), **23f** (verde) y **23e** (celeste).

El compuesto de referencia **1a** mostró una leve citotoxicidad contra la línea celular L929 a la concentración más alta empleada (100 µg/mL). Sin embargo, la BNTZ **17a** no mostró toxicidad en ninguna de las concentraciones ensayadas 50 y 100 µg/mL, resultado altamente prometedor. Por último, los compuestos **23a** y **23e-f** indujeron una disminución en la actividad celular a ambas concentraciones respecto al control de DMSO, Figura 5.11.

5.4 Conclusiones y perspectivas

Se lograron preparar 19 benzoheterociclos: 12 benzoimidazolidinil-tiazolidinas, 5 benzobistiazolidinas y 2 benzotiazolidinas, conteniendo un anillo de benceno fusionado en lugar del ácido carboxílico presente en **1a**. Algunos análogos mantuvieron la actividad en el mismo orden y otros la mejoraron respecto al compuesto de referencia **1a** frente a las MBL probadas.

Según estudios cristalográficos, ambos enantiómeros de **23** poseen diferente afinidad por NDM-1 y VIM-2, siendo el enantiómero (*R,R*)-**23** el que se une preferentemente.

Los derivados **17a** y **17f** mostraron mayor estabilidad en plasma respecto al compuesto original **1a**, resultado altamente prometedor.

Como resultado de este trabajo, se está preparando el manuscrito: “Rational design of a tricyclic bithiazolidine scaffold with a rigid hydrophobic ring improves MBL inhibition”.

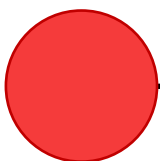
Como perspectivas de este trabajo, se propone sintetizar nuevas BNTZ y BIMl tricíclicas con variaciones a nivel del anillo aromático para aumentar la solubilidad de los compuestos y mejorar la penetración en bacterias Gram-(-) .

Además, se propone trabajar en una metodología para obtener los BBH enantioméricamente puros para su posterior evaluación frente a MBL.

5.5 Bibliografía

- (1) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- (2) Jones, S. Permeability Rules for Antibiotic Design. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35* (7), 639. <https://doi.org/10.1038/nbt.3919>.
- (3) 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.* **2014**, *18* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11030-013-9485-3>.
- (4) Rossi, M. A.; Martinez, V.; Hinchliffe, P.; Mojica, M. F.; Castillo, V.; Moreno, D. M.; Smith, R.; Spellberg, B.; Drusano, G. L.; Banchio, C.; Bonomo, R. A.; Spencer, J.; Vila, A. J.; Mahler, G. 2-Mercaptomethyl-Thiazolidines Use Conserved Aromatic-S Interactions to Achieve Broad-Range Inhibition of Metallo- β -Lactamases. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (8), 2898–2908. <https://doi.org/10.1039/d0sc05172a>.
- (5) 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (26), E3745–E3754. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601368113>.
- (6) Demeter, O.; Fodor, E. A.; Kállay, M.; Mez, G.; Németh, K.; Szabó, P. T.; Kele, P. A Double-Clicking Bis-Azide Fluorogenic Dye for Bioorthogonal Self-Labeling Peptide Tags. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (18), 6382–6388. <https://doi.org/10.1002/chem.201504939>.
- (7) Sriram, Y. H.; Fatima, T.; Rajanna, K. C.; Kumar, M. S.; Raju, R. M. Potassium Periodate/ NaNO_2 / KHSO_4 -Mediated Nitration of Aromatic

- Compounds and Kinetic Study of Nitration of Phenols in Aqueous Acetonitrile. *Int. J. Chem. Kinet.* **2017**, 49 (8), 622–632. <https://doi.org/10.1002/kin.21102>.
- (8) Mor, S.; Sindhu, S. Convenient and Efficient Synthesis of Novel 11: H - Benzo[5,6][1,4]Thiazino[3,4- a] Isoindol-11-Ones Derived from 2-Bromo-(2/3-Substitutedphenyl)-1 H -Indene-1,3(2 H)-Diones. *RSC Adv.* **2019**, 9 (23), 12784–12792. <https://doi.org/10.1039/c9ra02403d>.
- (9) Taylor, P.; Mattu, T. Chlorosulfonation of n-phenylmorpholine, benzothiazole, 2-methyl benzothiazole and triphenyloxazole. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements.* **1992**, 73, 107-120.
- (10) Saiz, C.; Villamil, V.; González, M. M.; Rossi, M. A.; Martínez, L.; Suescun, L.; Vila, A. J.; Mahler, G. Enantioselective Synthesis of New Oxazolidinylthiazolidines as Enzyme Inhibitors. *Tetrahedron Asymmetry* **2017**, 28 (1), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.11.002>.
- (11) Limbago, B. M100-S11, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clin. Microbiol. Newsl.* **2001**, 23 (6), 49. [https://doi.org/10.1016/s0196-4399\(01\)88009-0](https://doi.org/10.1016/s0196-4399(01)88009-0).
- (12) Hinchliffe, P.; Moreno, D. M.; Rossi, M. A.; Mojica, M. F.; Martinez, V.; Villamil, V.; Spellberg, B.; Drusano, G. L.; Banchio, C.; Mahler, G.; Bonomo, R. A.; Vila, A. J.; Spencer, J. 2-Mercaptomethyl Thiazolidines (MMTZs) Inhibit All Metallo- β -Lactamase Classes by Maintaining a Conserved Binding Mode. *ACS Infect. Dis.* **2021**, 7 (9), 2697–2706. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00194>.



CAPÍTULO 6

Enfoques biocatalíticos para la
obtención de benzobisheterociclos
enantioméricamente puros

6.1 Introducción

6.1.1 Estrategias para la obtención de benzobisheterociclos BBH enantioméricamente puros

Los compuestos benzobisheterociclos BNTZ **17a** y BIMl **23a** resultaron buenos inhibidores de todas las subclases de MBL, con valores de IC₅₀ en el orden μM y nM. Estos derivados se obtuvieron como una mezcla racémica del diastereómero mayoritario *syn*, tal como se discutió en el Capítulo 5.

Los estudios cristalográficos realizados en la Universidad de Bristol a cargo del Prof. James Spencer mostraron que los dos enantiómeros de **23a** poseen diferente afinidad por NDM-1 y VIM-2, MBL de relevancia clínica. El enantiómero que se une preferentemente a estas enzimas resultó ser el (*R,R*). Pensamos que, en forma análoga, el enantiómero de **17a** que se une preferentemente a estas enzimas sería el (*S,R*).

En base a estos resultados, se decidió explorar distintas metodologías para obtener el enantiómero puro de interés de los BBH.

Existen dos grandes estrategias para obtener compuestos enantioméricamente puros: la síntesis asimétrica y la resolución de mezclas racémicas.

i) Síntesis asimétrica:

Se utilizan materiales de partida enantioméricamente puros (*chiral pool*), o bien, se introduce la quiralidad en los productos mediante un auxiliar o un catalizador quiral.

Los materiales de partida quirales se pueden obtener a partir de fuentes naturales, por ejemplo, aminoácidos, hidroxiaácidos, hidratos de carbono, terpenos o alcaloides. La estereoquímica de los productos va a estar determinada por la del reactivo quiral empleado como compuesto de partida.

Cuando se utilizan auxiliares quirales o un catalizador químico quiral, durante la reacción se forman estados de transición diastereoméricos y se

favorece la formación de uno de los enantiómeros o diastereómeros respecto al otro.¹ Adicionalmente, los métodos enzimáticos también han sido ampliamente explorados para la síntesis asimétrica de compuestos quirales.²

ii) Resolución de mezclas racémicas por métodos químicos, físicos o cinéticos:

Dentro de los métodos químicos, las estrategias más utilizadas consisten en la resolución de racematos por formación de diastereómeros o mediante cristalización selectiva de sales diastereoméricas.³

El método físico más empleado es la cromatografía quiral, ya sea mediante el uso de fases estacionarias quirales o mediante la adición de un auxiliar quiral en la fase móvil.⁴

Los métodos cinéticos, en cambio, se basan en la diferencia de velocidad de complejos diastereoméricos del compuesto con biocatalizadores o catalizadores quirales. En el caso ideal, la diferencia en la velocidad de reacción es tan elevada que uno de los enantiómeros reacciona muy rápidamente para dar el producto correspondiente mientras que el otro enantiómero no reacciona y puede ser recuperado al final de la reacción. Dentro de los métodos cinéticos, el enfoque más ampliamente explotado para la obtención de compuestos ópticamente puros es el uso de biocatalizadores.⁵

6.1.2 Aplicaciones biocatalíticas para la obtención de compuestos ópticamente puros

El uso de enzimas para la obtención de compuestos ópticamente puros presenta varias ventajas, como condiciones de reacción suaves y amigables con el medio ambiente, alta regioselectividad y estereoselectividad, y posible conversión total del sustrato.^{6,7}

Existen dos enfoques biocatalíticos principales: a) empleo de enzimas para la síntesis enantioselectiva de compuestos, catalizando la formación o eliminación enantioselectiva del producto o intermediario de reacción, o b) enzimas como agentes de resolución de la mezcla racémica final una vez formado el producto.⁸

Basándonos en la estructura de los BBH, los dos principales grupos funcionales sobre los cuales realizar una reacción enzimática enantioselectiva son el tiol y la amina aromática.

Existen pocos ejemplos en literatura de resolución enantiomérica de tioles por métodos enzimáticos. Se han descrito algunas lipasas como la CalA y la CalB que han demostrado enantioselectividad en la hidrólisis de tioésteres derivados principalmente de tioles secundarios quirales.^{9,10} En nuestro caso particular, se trata de un tiol primario y en posición α al centro quiral. Para estos casos, existe solo un número pequeño de ejemplos en bibliografía. Uno de ellos es la resolución enzimática del intermediario metil- α -propiotiolactona por hidrólisis catalizada por una lipasa de *Pseudomonas cepacia* en la síntesis asimétrica del (S)-Captopril.¹¹

Por otro lado, la presencia de grupos amina en la molécula nos permite explorar una extensa variedad de metodologías de resolución. Una estrategia ampliamente utilizada en los últimos años para obtener aminas ópticamente puras es el uso de las enzimas Amino-oxidasas (AO). Las AO son oxidorreductasas que en la naturaleza catalizan la hidrólisis oxidativa de aminas primarias biogénicas a aldehídos. Estas enzimas, pueden subdividirse en enzimas dependientes del cobre y enzimas dependientes de la flavina. Los AO que utilizan el dinucleótido de flavina-adenina (FAD) como cofactor han sido las más exploradas en biocatálisis.^{12,13,14} Este grupo incluye las L-aminoxidasas,¹⁵ D-aminoxidasas,¹⁶ ciclohexilamino-oxidasas (CHAO)¹⁷ y monoamino-oxidasas (MAO).¹⁸

Las enzimas MAO catalizan la desaminación oxidativa de aminas terminales y se encuentra en una amplia gama de organismos desde bacterias y hongos hasta humanos. En vertebrados, los sustratos de la enzima incluyen varios neurotransmisores importantes como la serotonina y la dopamina.

La MAO se aisló por primera vez de *Aspergillus niger* en 1995 y se encontró que estaba presente en dos formas.¹⁹ El tipo 1 es una enzima dependiente de cobre y el tipo 2 una enzima dependiente de flavina llamada MAO-N. Esta última es la MAO mejor caracterizada y más utilizada en biocatálisis.

La enzima nativa no es útil para la resolución de aminas quirales ya que tiene un espectro de actividad restringido hacia aminas primarias y no ha demostrado ser enantioselectiva.²⁰

Sin embargo, en los últimos años el grupo del Prof. J. N. Turner comenzó a explorar diferentes herramientas de biología molecular, como evolución dirigida de proteínas en combinación con métodos de selección de alto rendimiento mediante las cuales desarrolló una serie de variantes mutantes de la MAO-N: D3, D5, D9, D10 y D11, capaces de oxidar enantioselectivamente aminas primarias, secundarias y terciarias a iminas.^{21,22}

Más recientemente, este grupo de trabajo desarrolló un protocolo de desracemización, en donde las iminas formadas durante la catálisis pueden ser interceptados por reductores químicos no selectivos como el $\text{BH}_2\text{-NH}_2$, que junto con la enzima forman ciclos de oxidación-reducción. Esto permite el reciclaje del producto de oxidación, lográndose una resolución cinética dinámica o desracemización que acumula el producto deseado, con potenciales rendimientos de hasta 100% del enantiómero de interés, ver Figura 6.1.^{12,23}

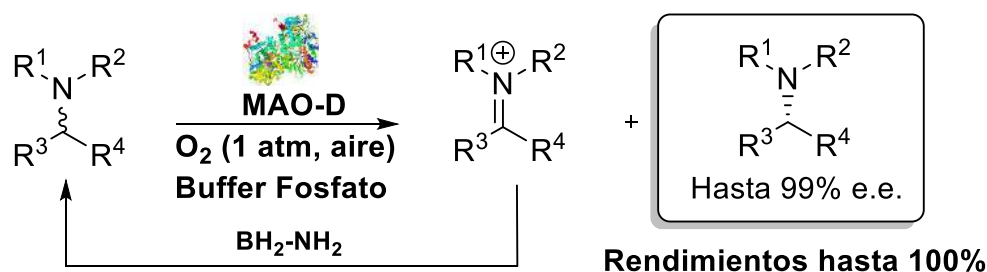


Figura 6.1: Esquema general de un proceso de resolución cinética dinámica o desracemización: la enzima MAO-N cataliza la oxidación de aminas primarias, secundarias y terciarias seguida por una reducción química no selectiva de la imina mediada por $\text{BH}_2\text{-NH}_2$.

Las distintas variantes descritas poseen diferente especificidad y han resultado efectivas para la resolución de una amplia variedad de sustratos. La variante MAO-D3 conteniendo dos mutaciones en el sitio activo (I246M y N336S) posee un rango de actividad mejorada con respecto a la enzima nativa, incluyendo aminas secundarias quirales, ver ejemplos en Figura 6.2.²⁴ La variante MAO-D5 con dos mutaciones adicionales (T384N y D385S) mostró una actividad mejorada y enantioselectividad hacia una amplia gama de aminas

secundarias cíclicas, Figura 6.2.¹² La MAO-D9 que contiene cuatro mutaciones adicionales en el sitio activo de la enzima (F210L, L213T, M242Q, M246T) presenta una buena enantioselectividad frente a aminas cíclicas de gran tamaño. Mutaciones adicionales llevaron a los mutantes D10 y D11, que han logrado ampliar aún más el espectro de actividad de estas enzimas, hasta incluir sustratos voluminosos del tipo amino-difenil metanos, Figura 6.2.¹⁸

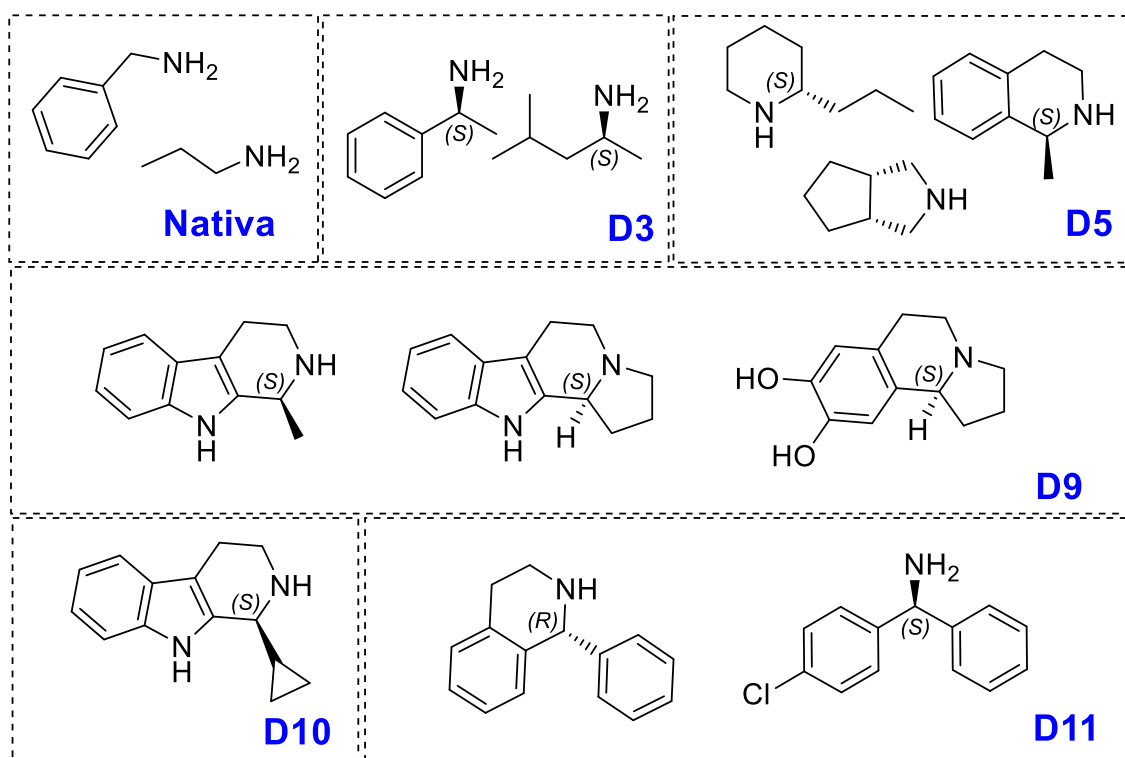


Figura 6.2: Variedad de sustratos que son aceptados por las distintas variantes de MAO-N.

Adicionalmente, estas enzimas se han utilizado como biocatalizadores en una amplia variedad de reacciones químicas que involucran la oxidación selectiva del enlace N-C. Un ejemplo descrito recientemente es la síntesis de heterociclos aromáticos como pirroles, piridinas, furanos e indoles.^{25,18,26} También se ha explorado su utilidad como catalizadores en reacciones de adición nucleofílica a iminas altamente reactivas para formar nuevos enlaces C-C.²⁷

6.2 Objetivo Específico

6.2.1 Explorar diferentes enfoques químicos y biocatalíticos para obtener BBH enantioméricamente puros

Para alcanzar este objetivo específico se propone realizar una resolución de las mezclas racémicas de BBH, ya sea mediante la derivatización para formar diastereómeros o utilizando herramientas biocatalíticas, tales como enzimas Monoamino Oxidasas (MAO).

Por último, se plantea realizar la evaluación biológica de los enantiómeros puros aislados frente a MBL.

6.3 Resultados y Discusión

En el presente Capítulo se muestran los resultados más relevantes en cuanto a la obtención de BBH enantioméricamente puros.

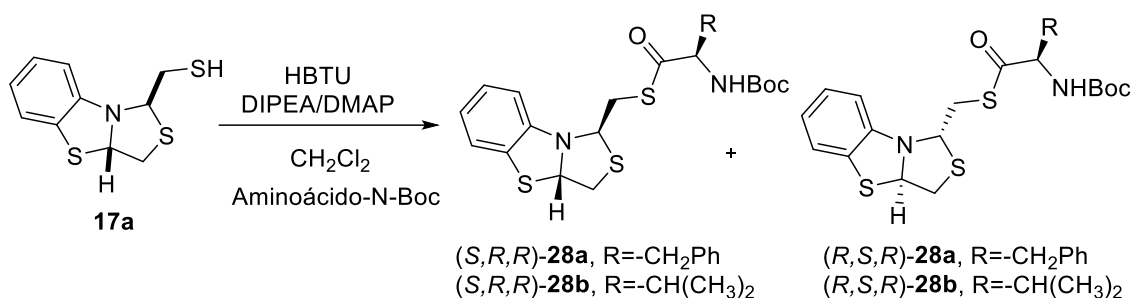
Las principales actividades realizadas en este marco se relacionan con los objetivos específicos y se desarrollan a continuación.

6.3.1 Resolución de mezclas racémicas por formación de diastereómeros

Una estrategia ampliamente utilizada para la resolución de mezclas racémicas es la formación de diastereómeros. Al tratarse de compuestos con distintas propiedades químicas y físicas, pueden ser separados por cromatografía en columna o por recristalización.

La formación de diastereómeros a partir de BBH se puede lograr esterificando el grupo tiol con un ácido carboxílico quiral ópticamente puro.

Para explorar la utilidad de esta metodología, se utilizó como modelo la BNTZ **17a** y se sintetizaron tioésteres con los L-aminoácidos NBoc-fenilalanina y NBoc-valina, utilizando HBTU como agente acoplante para dar los diastereómeros (*S,R,R*)-**28a-b** y (*R,S,R*)-**28a-b**, Esquema 6.1.



Esquema 6.1: Ruta sintética para la síntesis de tioésteres **28a-b** utilizando los L-aminoácidos NBoc-fenilalanina y NBoc-valina.

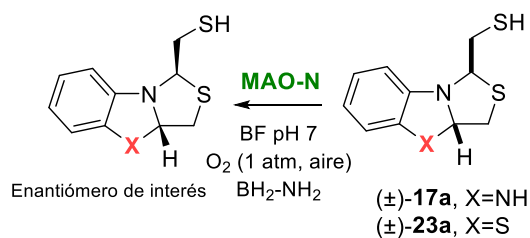
Las mezclas diastereoméricas **28a** y **28b** se obtuvieron con 65 y 74% de rendimiento, respectivamente. Se intentó separar los diastereómeros por recristalización y por purificación por cromatografía en columna utilizando diferentes condiciones, pero ninguna de las técnicas funcionó para obtener los diastereómeros puros. Por lo tanto, se decidió explorar una metodología alternativa para resolver las mezclas racémicas de BBH.

6.3.2 Enfoques biocatalíticos para la obtención de BBH enantioméricamente puros

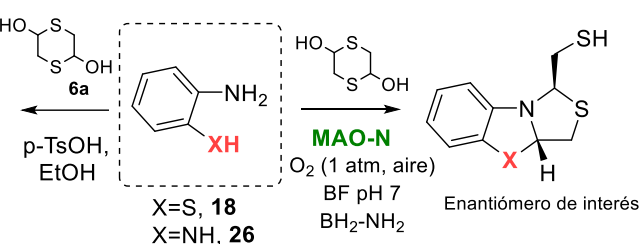
Se trabajó en la optimización de un enfoque biocatalítico para la obtención de BBH enantioméricamente puros. Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones en colaboración con el Dr. César Iglesias y la Dra. Sonia Rodríguez.

Dados los numerosos trabajos en donde se utilizan variantes de MAO para la resolución de aminas primarias, secundarias y terciarias, se decidió explorar dicho enfoque a través de dos estrategias: i) Síntesis racémica de BBH seguida de una reacción de resolución cinética dinámica de los BBH obtenidos utilizando la enzima MAO-N y ii) Síntesis enantioselectiva de BBH a partir de 2-aminotiofenoles **18** o 2-aminoanilinas **26** y ditiano **6a**, utilizando la enzima MAO-N para la catálisis asimétrica, Esquema 6.2.

i) Resolución cinética de BBH



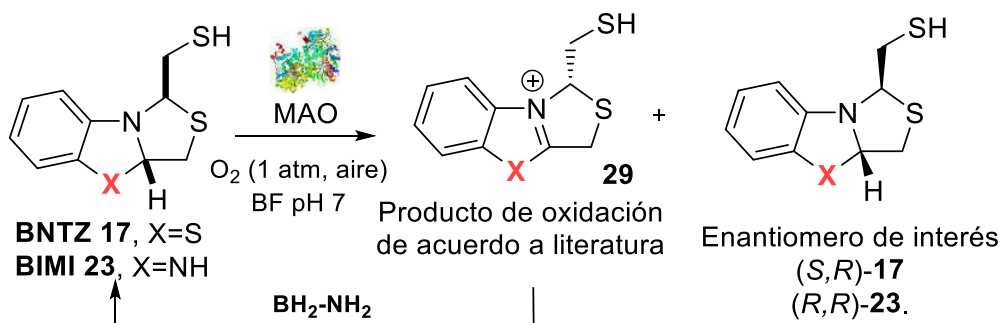
ii) Síntesis enantioselectiva de BBH



Esquema 6.2: Enfoques biocatalíticos para la obtención de BBH: i) Síntesis racémica de BBH y resolución cinética dinámica de la mezcla racémica utilizando diferentes isoenzimas de MAO-N. ii) Síntesis enantioselectiva de BBH utilizando diferentes isoenzimas de MAO-N.

i) Resolución cinética de BBH utilizando la enzima MAO-N

Nuestra hipótesis se basó en que la MAO podría oxidar enantioselectivamente a uno de los enantiómeros de las mezclas racémicas de BBH y que el enantiómero que quedaría sin reaccionar sería el de interés: (*S,R*)-**17** y (*R,R*)-**23**, de acuerdo a lo descrito en bibliografía, Esquema 6.3. En la reacción de oxidación se formaría el iminio **29**, que podría ser reducido nuevamente por el borano y formar ciclos de oxidación/reducción con la enzima.



Esquema 6.3: Hipótesis de resolución de BNTZ **17** y BIMi **23** utilizando diferentes variantes de MAO-N.

De esta manera, se exploró la utilidad del procedimiento descrito por Turner y col. de desracemización utilizando diferentes variantes de la enzima MAO-D aplicado a la resolución de nuestros derivados BBH para obtenerlos ópticamente puros.

Expresión y producción de proteínas recombinantes en cepas de E. coli BL21 DE3

Para los ensayos de resolución enantiomérica se utilizaron las variantes de MAO-N disponibles en el Laboratorio: MAO-D5, D9 y D11.

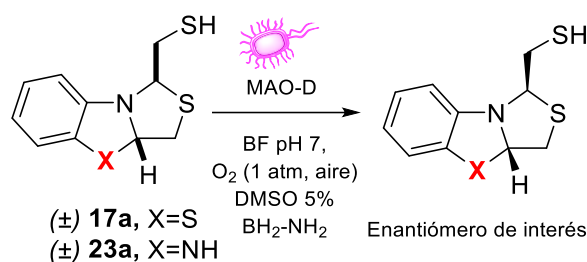
Las enzimas fueron previamente expresadas en *E. coli BL21 DE3* recombinantes. Para ello, en primer lugar, se inoculó una cepa de *E. coli* conteniendo el plásmido que alberga el gen de la enzima [pET16b MAO-N (D5, 9 u 11)] y cuya expresión es inducible con lactosa, en medio LB adicionado con ampicilina como antibiótico de selección.

Luego, con el fin de inducir la expresión de la enzima, el cultivo se inoculó en medio de autoinducción (AIM, 4ZY-LAC-SUC; 100 µg/mL de ampicilina). Luego, las células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en buffer de fosfato (BF) pH 7.7 y fueron centrifugadas nuevamente.

Screening a escala analítica (1 mg) utilizando células enteras expresando las enzimas MAO-D5, D9 y D11

En primer lugar, se exploró la utilidad de las distintas variantes de MAO: D5, D9 y D11 para resolver las mezclas racémicas de BBH. Para ello, se seleccionaron como modelo de estudio la BNTZ **17a** y la BIMi **23a** y se realizó un primer screening a pequeña escala utilizando células enteras de *E. coli* expresando una de las tres variantes de MAO-N para comparar la actividad y la enantioselectividad.

El ensayo se llevó a cabo en BF pH 7, utilizando DMSO al 5%, a una [S] = 1 mg/mL y una [células] = 1 g/mL, a 37°C, Esquema 6.4.



Esquema 6.4: Resolución cinética dinámica de BNTZ **17a** y BIMi **23a** utilizando células de *E. coli* expresando alguna de las tres isoenzimas de MAO-N: D5, D9 y D11.

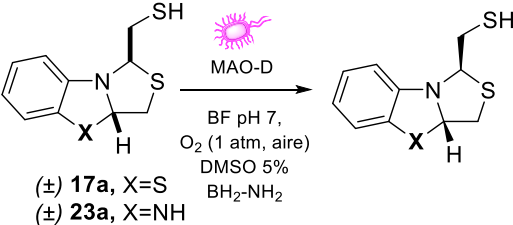
Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de incubación, se extrajeron con AcOEt y se retomaron en una mezcla *n*-hexanos:isopropanol 8:2. Luego, se analizaron las muestras por HPLC quiral y se calcularon los % de exceso enantiomérico (% ee) mediante la ecuación [1]:

$$\%ee = \frac{\hat{A}(I) - \hat{A}(II)}{\hat{A}(I) + \hat{A}(II)} \times 100 \quad [1]$$

Donde:

Los resultados se muestran en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1: Resultados de la resolución cinética de BNTZ **17a** y BIMi **23a** utilizando células de *E. coli* expresando alguna de las tres isoenzimas de MAO-N: D5, D9 y D11 a tiempos 4 y 48 h.

 (±) 17a, X=S (±) 23a, X=NH		% ee (HPLC) ^a	
Compuesto	Isoenzima	4 h	48 h
17a	D5	0	0
	D9	0	0
	D11	0	0
23a	D5	14	56
	D9	28	18
	D11	90	64

^aEl % ee se calculó por HPLC quiral, según ecuación [1].

Para la BIMi **23a** las tres variantes resultaron ser enantioselectivas. En particular, la variante D11 mostró el mejor resultado, proporcionando el producto **23a** con un 90% ee luego de 4 h de reacción, correspondiente a una relación de áreas de 95/5 según el análisis por HPLC quiral. A las 48 h esa relación disminuye, probablemente debido a que la enzima empieza a oxidar al otro enantiómero por estar en mayor concentración, Tabla 6.1. Por el contrario, para la BNTZ **17a** no se obtuvo resolución con ninguna de las tres variantes.

En los cromatogramas de la reacción de desracemización de **23a** se detectó la presencia de un producto de oxidación, ver Figura 6.3. Debido a que estamos en presencia de un agente reductor como el borano $\text{BH}_2\text{-NH}_2$, que podría reducir el iminio **29** formado durante el mecanismo oxidativo de la enzima, nos planteamos la hipótesis de que se estaría formando un producto de oxidación más difícil de reducir, Figura 6.3.

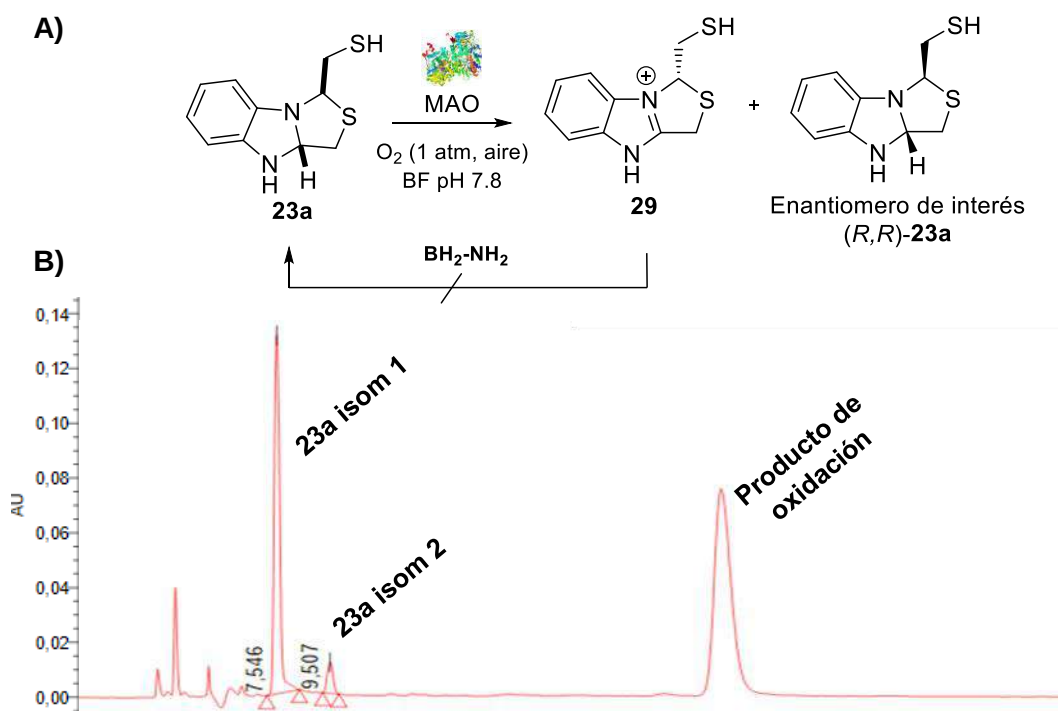


Figura 6.3: A) Hipótesis de resolución de **23a** utilizando la enzima MAO-D11; B) Cromatograma de la reacción de resolución de **23a** utilizando células enteras de *E. coli* expresando la enzima MAO-D11, tiempo = 4 h.

Por lo tanto, decidimos repetir el screening en presencia y ausencia del borano y comparar los resultados obtenidos.

Screening de **23a en escala analítica (1 mg) utilizando células enteras expresando la enzima MAO-D11 en presencia y ausencia de BH₂-NH₂**

Con el fin de evaluar el rol del borano en la reacción de desracemización, en un segundo screening a pequeña escala realizamos la reacción de resolución cinética de **23a** en presencia y en ausencia de BH₂-NH₂ utilizando células de *E. coli* expresando MAO-D11 en BF pH 7 y DMSO 5% como co-solvente. Los tiempos de muestreo fueron 2, 4, 6, 8 y 24 h. A dichos tiempos, se tomaron alícuotas, se extrajeron con AcOEt y el residuo se retomó en una mezcla hexano/isopropanol (8:2). Luego, se analizó por HPLC quiral, y se determinó el % ee y se analizaron los perfiles cromatográficos de las reacciones, ver Tabla 6.2 y cromatogramas en Figura 6.4. Además, se calcularon los rendimientos del enantiómero mayoritario tal como se describe a continuación: %R = (área problema/área referencia) x100, siendo el área de referencia el área del enantiómero mayoritario en las condiciones: Con BH₂-NH₂, 2 h (100%).

Tabla 6.2: Estudio de la reacción de resolución cinética de **23a** en presencia y en ausencia de BH₂-NH₂ utilizando células de *E. coli* expresando la enzima MAO-D11.

R %, ^a (% ee) ^b		
Tiempo (h)	Con BH ₂ -NH ₂	Sin BH ₂ -NH ₂
2	100 (80)	87 (86)
4	65 (87)	49 (89)
6	36 (88)	22 (81)
8	18 (73)	13 (68)

^aLos rendimientos fueron calculados por HPLC quiral como %R = (área problema/área referencia) x100, siendo el área referencia el área del enantiómero mayoritario en las condiciones: Con BH₂-NH₂, 2h (100%).

^bEl % ee se calculó por HPLC quiral, según ecuación [1].

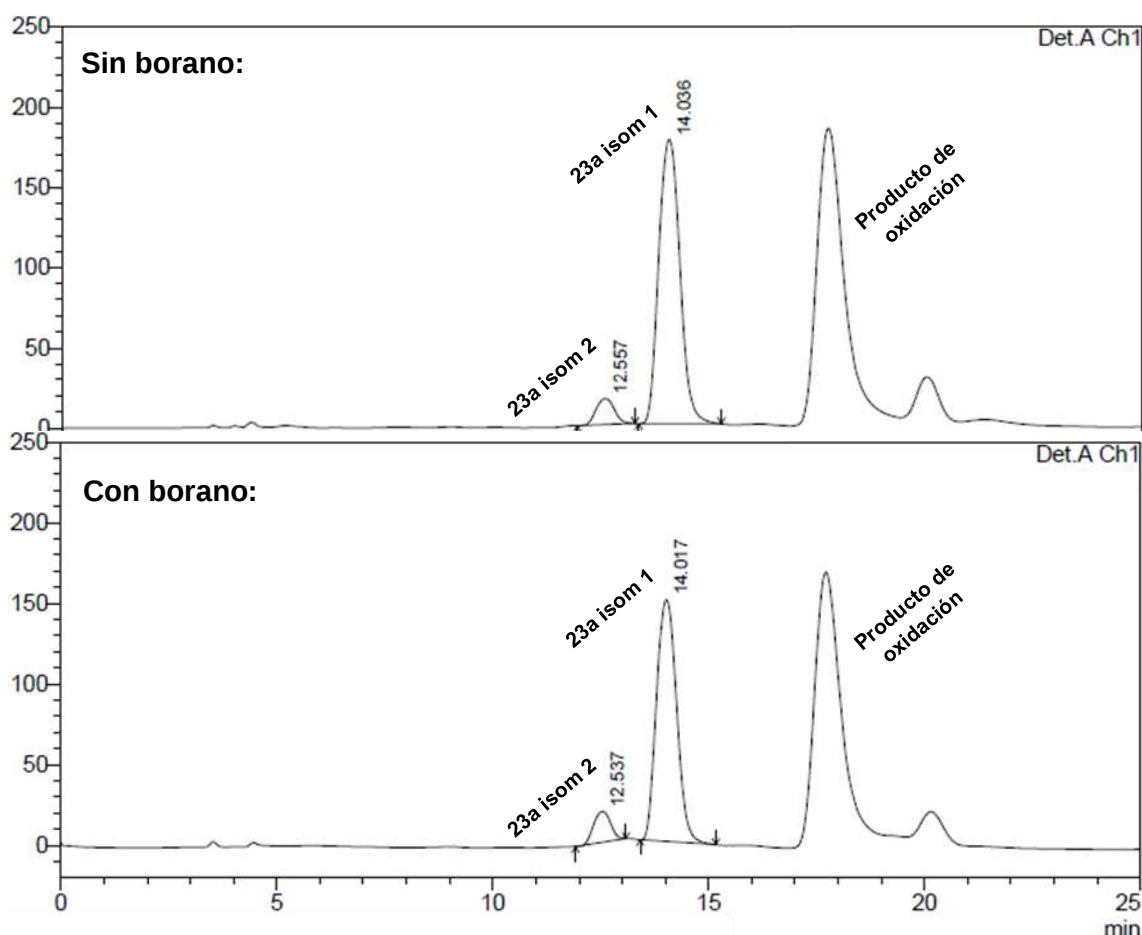


Figura 6.4: Cromatogramas de la reacción de resolución de **23a** en presencia y en ausencia de $\text{BH}_2\text{-NH}_2$ utilizando células de *E. coli* expresando MAO-D11 a las 4 h de reacción.

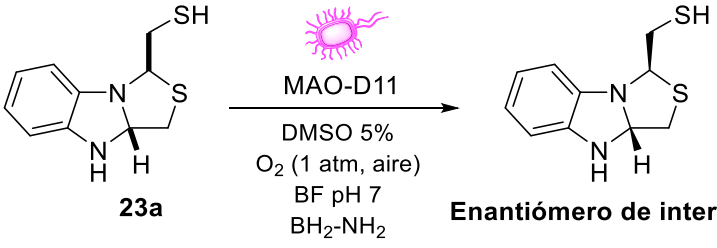
En el análisis de los resultados no se obtuvieron diferencias significativas en los % ee en presencia o ausencia de $\text{BH}_2\text{-NH}_2$ ni tampoco en el perfil cromatográfico. Sin embargo, en todos los tiempos de muestreo se obtuvieron rendimientos mayores en presencia del borano, probablemente debido a que genera un ambiente reductor en la reacción. Esto es importante cuando se utilizan sustratos fácilmente oxidables como los tioles, dado que al utilizar oxígeno en las biotransformaciones catalizadas por MAO-N para regenerar el cofactor FAD, se produce H_2O_2 como producto secundario y podría acelerar la oxidación del tiol del compuesto **23a**. Por este motivo, se decidió mantener el agregado del borano en los siguientes experimentos.

Escalado de la reacción utilizando células enteras expresando la enzima MAO-D11

En base a los resultados alentadores obtenidos al utilizar la variante MAO-D11 en la resolución de (±)-**23a**, se decidió escalar la reacción de resolución cinética en las condiciones optimizadas (MAO D11, $t = 4$ h) con el fin de aislar el enantiómero puro para su evaluación biológica y del posible producto de oxidación para su elucidación estructural.

La reacción de resolución de **23a** a mayor escala (300 mg) se llevó a cabo utilizando células enteras de *E. coli* expresando la variante MAO-D11 en BF pH 7 y DMSO al 5% como co-solvente, y se realizaron muestreos a diferentes tiempos, desde 30 min a 8 h. Los resultados se muestran en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3: Escalado de la reacción de resolución cinética de **23a** utilizando células de *E. coli* expresando la enzima MAO-D11.

	
Tiempo (h)	% ee ^a
0.5	8
1	7
2	37
3	46
4	70
5	70
6	74
8	71

^aEl % ee se calculó por HPLC quiral, según ecuación [1].

Del análisis de la Tabla 6.3 se puede inferir que en el escalado no se pudo reproducir los % ee obtenidos en el screening a pequeña escala; el % ee pasó de 90 a 70 a las 4 h de reacción. Pasadas las 8 h, el % ee comenzó a disminuir

por lo que se decidió realizar el work-up y extraer la reacción con AcOEt. Luego de la purificación cromatográfica, se obtuvo **23a**, 39% de rendimiento y 69% ee.

El bajo rendimiento obtenido confirmaría que no está sucediendo una resolución cinética dinámica, sino que el producto de oxidación de la reacción no es capaz de reducirse nuevamente con el borano para un nuevo ciclo catalítico.

Dadas las dificultades que se presentaron a la hora del escalado utilizando las células enteras de *E. coli*, decidimos llevar a cabo la purificación de la enzima MAO-D11 y su cuantificación. Esto permite variar fácilmente la relación $[E]/[S]$ para encontrar las condiciones óptimas de reacción y además simplificar la etapa de extracción y purificación del compuesto.

Purificación de la enzima MAO-D11

Para la purificación de la enzima, en primer lugar, se realizó la lisis de las células mediante sonicado con posterior centrifugado. Luego, la purificación de la proteína se realizó según el método reportado por Atkin y col,²¹ que consiste en una cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC, del inglés: immobilized metal affinity chromatography).

En la cromatografía de afinidad, la separación se basa en una interacción reversible entre la proteína de interés y un ligando específico que está unido a la fase estacionaria. En particular, la IMAC se basa en la interacción fuerte entre algunos aminoácidos de la superficie de las proteínas, que coordinan metales divalentes como Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} o Co^{2+} , inmovilizados en la matriz.

Las enzimas MAO utilizadas en este trabajo están fusionadas a una cola de seis residuos de histidina en el extremo N-terminal, capaces de formar quelatos con cationes metálicos divalentes. Las columnas de afinidad utilizadas fueron del tipo Niquel HisTrap (GE Healthcare) comercialmente disponibles, que utilizan Ni^{2+} como ligando unido a la matriz de agarosa, Figura 6.5.

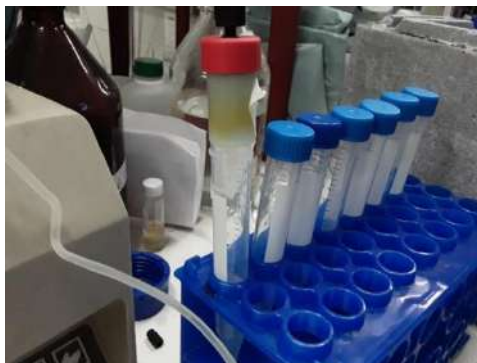


Figura 6.5: Purificación de la enzima MAO-D11 (marrón) en una columna de afinidad de Niquel HisTrap (GE Healthcare).

El proceso de purificación por IMAC puede ser dividido en tres grandes pasos:

- i) Se equilibra la columna en el buffer con una baja concentración de imidazol, con el fin de generar condiciones que favorezcan la unión específica al Ni^{2+} . Luego, se siembra el sobrenadante del lisado celular. En estas condiciones, la enzima queda inmovilizada en la columna debido a la fuerte afinidad entre la etiqueta de histidinas y el Ni^{2+} .
- ii) Se lava la columna en las mismas condiciones para eliminar todo el material no unido a la matriz.
- iii) Como último paso, la proteína inmovilizada en la matriz es eluída aumentando la concentración de imidazol, que compite fuertemente con las cadenas laterales de las histidinas por la unión a Ni^{2+} , liberando la proteína.

La solución conteniendo la enzima eluída fue luego dializada por membrana ON con el fin de eliminar el imidazol del medio y luego cuantificada.

Cuantificación de la enzima MAO-D11

La enzima se cuantificó utilizando el kit PierceTM BCA Protein Assay.²⁸ Este método consiste en la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso (Cu^{1+}) proveniente de la reducción del Cu^{2+} por la proteína de interés en medio alcalino. Al medio de reacción se agrega ácido bicinconínico, que forma un quelato con el Cu^{1+} de color púrpura con un máximo de absorbancia a 562 nm que es lineal con la concentración de proteína en un amplio rango de

trabajo (20–1800 $\mu\text{g/mL}$), Figura 6.6. Se prepararon dos soluciones de la muestra, una diluida al 1/5 y la otra al 1/10, para asegurarnos que alguna de las dos concentraciones entre en el rango lineal del método.

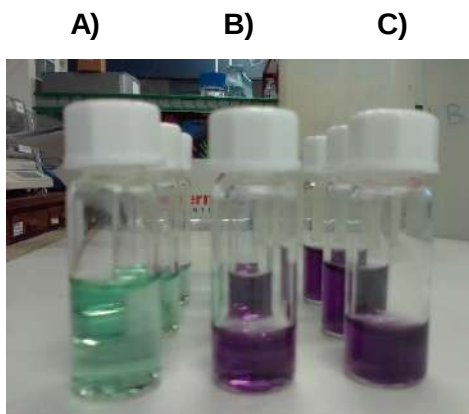


Figura 6.6: Cuantificación de la enzima utilizando el kit Pierce™ BCA Protein Assay. A) Blanco, B) Muestra, dilución 1/5 C) Muestra, dilución 1/10.

La dilución 1/10 de la enzima pudo ser cuantificada adecuadamente por entrar en el rango lineal del método. Por el contrario, la dilución 1/5 sobrepasó el límite superior del rango lineal del método, por lo cual estas medidas se descartaron.

La concentración de la enzima obtenida con este método fue de 9.6 mg enzima/mL. Esta solución se utilizó para un screening a pequeña escala de la reacción de resolución de **23a**.

Screening a escala analítica (1 mg) utilizando la enzima MAO-D11 purificada

Una vez purificada y cuantificada la enzima MAO-D11, se realizó un screening a pequeña escala de la reacción de resolución de **23a** variando $[E]$, $[S]$ y tiempo. El ensayo se llevó a cabo en BF pH 7, a 37°C y utilizando DMSO al 5% como co-solvente. La concentración de sustrato se varió de 0.5 a 2 mg/mL y la concentración de enzima de 0.25 a 1 mg/mL. Los tiempos de muestreo fueron 15, 30 y 60 min. Se tomaron alícuotas a dichos tiempos y se extrajeron con AcOEt. Luego el residuo se retomó en una mezcla hexano/isopropanol (8:2), se analizó por HPLC quiral, y se determinó el % ee, ver resultados en Tabla 6.4. También se calcularon los rendimientos del enantiómero mayoritario tal como se

describe a continuación: %R = (área problema/área referencia) x100, siendo el área de referencia el área del enantiómero mayoritario en las condiciones: [E] = 0.25 mg/mL, 15 min, para cada concentración de sustrato.

Tabla 6.4: Resultados de % ee de la resolución cinética de **23a** utilizando la enzima purificada MAO-D11. La concentración de sustrato se varió de 0.5 a 2 mg/mL, la concentración de enzima de 0.25 a 1 mg/mL.

(±) **23a** $\xrightarrow[\text{DMSO 5\%, BH}_2\text{-NH}_2]{\text{MAO-D11, BF pH 7, O}_2 \text{ (1 atm, aire)}}$ **23a**

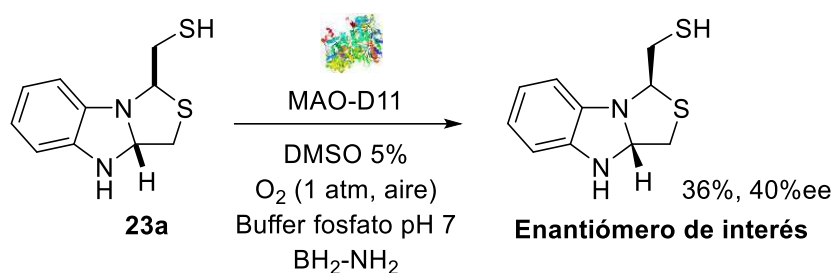
R %^a, (% ee)^b									
[S] (mg/mL)	0.5			1			2		
[E] (mg/mL) \ Tiempo (min)	15	30	60	15	30	60	15	30	60
0,25	100 (63)	85 (58)	56 (53)	100 (66)	86 (51)	61 (54)	100 (61)	88 (58)	60 (53)
0,5	92 (70)	79 (64)	49 (66)	94 (72)	83 (63)	53 (60)	93 (63)	84 (51)	51 (36)
1	87 (79)	68 (75)	41 (77)	89 (86)	72 (70)	46 (71)	90 (71)	75 (70)	53 (65)

^aLos rendimientos (valores en rojo) se calcularon según: %R = (área problema/área referencia) x100, siendo el área de referencia el área del enantiómero mayoritario en las condiciones: [E] = 0.25 mg/mL, 15 min, para cada concentración de sustrato. ^b% ee se calculó por HPLC quiral, según ecuación [1].

Los resultados muestran que la resolución depende de la relación enzima/sustrato y del tiempo de incubación. Los mejores resultados se lograron cuando la [E] = [S] = 1 mg/mL, luego de 15 min, dando lugar a **23a** (89% de rendimiento, 86% ee, Tabla 6.4). Este % corresponde a una relación de áreas 93/7, similar al resultado obtenido en el screening inicial con células enteras. Si bien no se lograron mejorar los resultados, el hecho de trabajar con la enzima purificada podría mejorar las etapas de extracción y purificación en el escalado respecto al trabajo con células enteras. Por este motivo, se decidió escalar la reacción en las nuevas condiciones optimizadas.

Escalado de la reacción utilizando la enzima MAO-D11 purificada

Luego de obtener las condiciones óptimas de [S], [E] y tiempo, se escaló la reacción de resolución de **23a** (300 mg) utilizando la variante MAO-D11 en BF pH 7 y DMSO al 5% como co-solvente, [E] = [S] = 1 mg/mL y $t = 15$ min. La mezcla de reacción se extrajo con AcOEt, se purificó por cromatografía en columna y se analizó por HPLC quiral, Esquema 6.5.



Esquema 6.5: Escalado de la reacción de resolución cinética de **23a** utilizando la enzima purificada MAO-D11 en BF pH 7 y DMSO al 5% como co-solvente, [E] = [S] = 1 mg/mL, $t = 15$ min.

En estas condiciones se obtuvo (+)-**23a** en un 36% de rendimiento, 40% ee, correspondiente a una relación de áreas de 70/30. Nuevamente no se pudo reproducir en el escalado los resultados obtenidos en el screening a pequeña escala. Al utilizar la enzima purificada se obtuvieron en el escalado % ee más bajos respecto a cuando se utilizaron células enteras. Por este motivo, decidimos seguir explorando otras variables experimentales utilizando las células enteras.

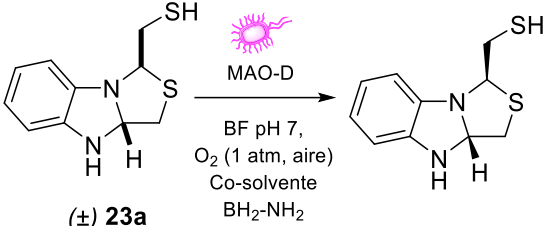
Durante el escalado se detectaron problemas de solubilidad del compuesto en el medio de reacción, por lo que se decidió ensayar otros co-solventes.

Screening de co-solventes a escala analítica (1 mg) utilizando células enteras expresando la enzima MAO-D11

En base a las observaciones realizadas y los problemas de solubilidad detectados, con el fin de optimizar las condiciones, aumentar la solubilidad y lograr una adecuada homogeneidad en la muestra para un escalado exitoso, se realizó un screening de co-solventes en escala analítica (1 mg).²⁵

La reacción de resolución de **23a** se llevó a cabo utilizando células enteras expresando la variante MAO-D11 en BF pH 7 y diferentes co-solventes. Los tiempos de muestreo fueron 2, 4 y 6 h. Se tomaron alícuotas y se extrajeron con AcOEt. Luego el residuo se retomó en una mezcla hexano/isopropanol (8:2), y se determinó el rendimiento y el % ee utilizando HPLC quiral. Los resultados se muestran en la Tabla 6.5.

Tabla 6.5: Screening de solventes a escala analítica (1 mg) para la reacción de resolución cinética de **23a** utilizando células de *E. coli* expresando la enzima MAO-D11.

 (±) 23a			
Solvente	Tiempo (h)	R, % ^a	% ee ^b
DMSO 5%	2	43	82
	4	27	80
	6	8	84
DMSO 10%	2	38	83
	4	14	78
	6	19	80
DMF 5%	2	100 (ref)	90
	4	52	92
	6	16	94
MeOH 5%	2	88	68
	4	39	82
	6	24	80
Tolueno 5%	2	79	68
	4	35	60
	6	26	68

^aLos rendimientos se calcularon según: %R = (área problema/área referencia) x100, siendo el área de referencia el área del enantiómero mayoritario en las condiciones: DMF 5%, 2h. ^bEl % ee se calculó por HPLC quiral, según ecuación [1].

Los resultados muestran que el % ee depende fuertemente del co-solvente utilizado. Los mejores resultados se lograron utilizando DMF al 5%, obteniendo **23a** con un 90% ee luego de 2 h. Esto puede deberse a una mayor

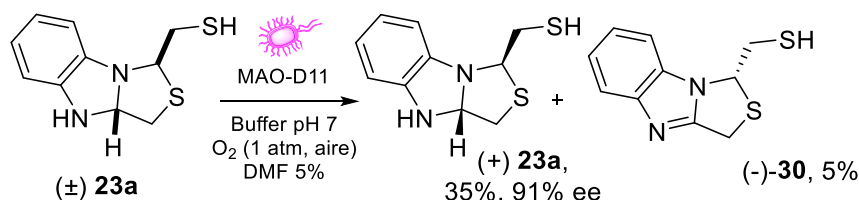
solubilidad del compuesto en DMF, mejorando la dispersión del compuesto en el medio de reacción. Si bien el % ee mejora con el tiempo, se observa una disminución del área del enantiómero de interés. Este resultado podría explicarse por la oxidación del tiol a disulfuro o a que la enzima comienza a oxidar también al otro enantiómero por estar en mayor concentración.

Los % ee más bajos se obtuvieron con tolueno, probablemente debido a que se forma un sistema bifásico donde el compuesto **23a** permanece en el tolueno y prácticamente no se reparte en la fase acuosa.

En base a estos resultados, decidimos llevar a cabo el escalado de la reacción en las nuevas condiciones optimizadas, BF pH 7, DMF 5%.

Escalado de la reacción utilizando células enteras expresando la enzima MAO-D11 en las condiciones optimizadas

Una vez obtenidas las condiciones óptimas, se escaló la reacción (100 mg) utilizando células enteras de *E. coli* expresando enzima MAO-D11, en BF pH 7 y 5% de DMF durante 2 h, Esquema 6.6. Luego se extrajo la reacción y se purificó por cromatografía en columna.



Esquema 6.6: Escalado de la reacción de resolución cinética de **23a** utilizando células de *E. coli* expresando MAO-D11 en BF pH 7 y DMF al 5% como co-solvente, 2 h.

De la reacción se logró aislar el enantiómero (+)-**23a** con un 35% de rendimiento y 91% ee, y como producto de oxidación de la enzima el benzimidazol (-)-**30** con 5% de rendimiento, Esquema 6.6. La estructura de **30** fue confirmada por 1H NMR, ^{13}C NMR y HRMS. Esto indicaría que la MAO oxida a nivel de la amina aromática secundaria y no terciaria, y sería concordante al hecho de que el compuesto BNTZ **17a** no pueda resolverse utilizando este enfoque, ya que a diferencia de **23a**, en lugar una amina secundaria contiene un azufre.

Propuesta de mecanismo de oxidación

Los mecanismos de oxidación más ampliamente estudiados para las enzimas MAO han sido para las isoenzimas MAO-A y MAO-B, presentes en mamíferos. Se han propuesto en literatura al menos cuatro posibles mecanismos, pero aún existen controversias al respecto. Además, se cree que varía según la variante de la enzima y la naturaleza del sustrato.^{29,30} Algunas de estas propuestas incluyen mecanismos radicalarios³¹ y transferencias de hidruros entre el cofactor FAD y el sustrato.³⁰

En el trabajo recientemente publicado por Turner y col.,²⁵ donde describen la oxidación de indolinas a indoles utilizando la enzima MAO-D11, proponen un mecanismo de oxidación para la MAO-N que incluye una transferencia de hidruros del sustrato al FAD como primera etapa.^{32,33}

Basados en el mecanismo biocatalítico propuesto por los autores, la reacción de oxidación de las BIMl podría ocurrir a través de un mecanismo análogo. En una primera etapa se plantea que el cofactor FAD de la enzima abstrae un hidruro de la posición acetálica de la BIMl (protón H_A), como se muestra en la Figura 6.7. Esto llevaría a la formación de un enlace entre el C_A de la BIMl y el N del FAD para dar un aducto BIMl-FAD. Los pasos intermedios de esta etapa del mecanismo aún no han sido elucidados. Luego, ocurre una deprotonación de una molécula de H_2O por parte de la flavina del aducto BIMl-FAD. Una segunda molécula de H_2O del sitio activo toma el protón NH_B , favoreciendo que el N done su par electrónico para la formación del enlace $C=N$, liberando el producto de oxidación de BIMl y formando $FADH_2$, que se reconvierte en FAD por acción del O_2 , liberando H_2O_2 para un nuevo ciclo catalítico.

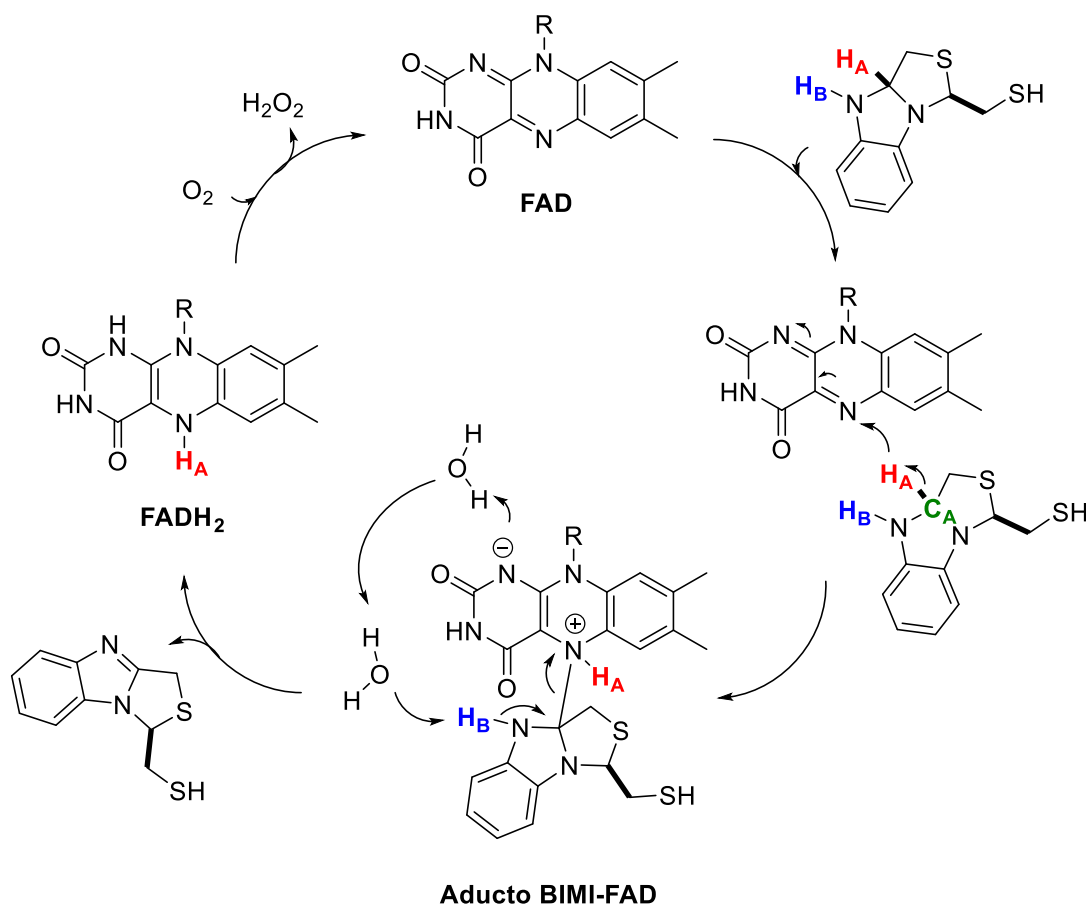


Figura 6.7: Mecanismo de oxidación propuesto para BIMl por MAO-N.²⁵

Determinación de la configuración absoluta del enantiómero aislado (+)-23a

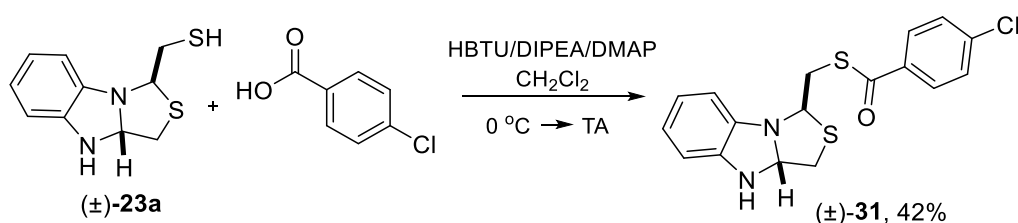
Una vez obtenido el enantiómero puro (+)-**23a**, se exploraron distintas metodologías para la determinación de su configuración absoluta: i) Derivatización del enantiómero puro para obtener un sólido cristalino que pueda resolverse por Rayos X; ii) Cálculos teóricos de alfa D (α_D) de ambos enantiómeros y comparación con el valor experimental, iii) Cálculos teóricos del espectro de dicroísmo circular electrónico (ECD, por sus siglas en inglés) de ambos enantiómeros y comparación con el espectro experimental y iv) Estudios de docking molecular de ambos enantiómeros de BIMl con la enzima MAO-D11.

i) Derivatización del enantiómero puro para obtener cristales

Debido a que el compuesto **23a** es un aceite a temperatura ambiente, se intentó derivatizar a través del tiol formando un tioéster, para luego obtener un sólido cristalino cuya estructura pueda resolverse por difracción de Rayos X.

Nuestro grupo tiene experiencia en la cristalización de diversos sustratos utilizando ácido *p*-clorobenzoico.³⁴

En primer lugar, se trabajó con la mezcla racémica de **23a** para explorar la utilidad de esta metodología. Se sintetizó el tioéster **31** a partir de (±)-**23a**, utilizando ácido *p*-clorobenzoico y HBTU como agente acoplante, Esquema 6.7.



Esquema 6.7: Ruta sintética para la síntesis del tioéster (±)-**31**.

El compuesto **31** se obtuvo con 42% de rendimiento. Luego, la obtención de cristales se realizó mediante la técnica de evaporación lenta de solventes (CH₂Cl₂:*n*-hexanos 1:9). La solución se dejó durante 4-7 días en una cámara saturada con el solvente. De esta manera, se lograron obtener cristales racémicos (±)-**31**, Figura 6.8.

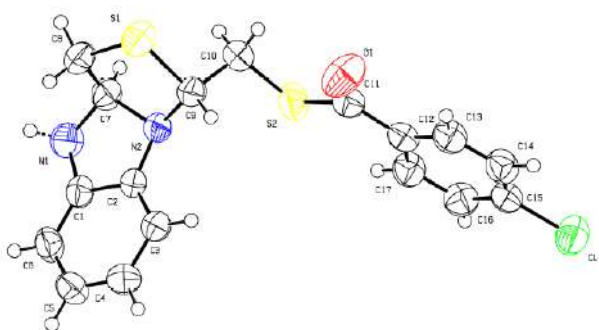


Figura 6.8: ORTEP. Estructura molecular de la mezcla racémica (±)-**31**.

Dado que este enfoque resultó útil para la obtención de cristales de **23a**, decidimos aplicarlo al isómero puro (+)-**23a** con el fin de determinar su configuración absoluta. De esta manera se sintetizó el tioéster **31** a partir de (+)-**23a** y se intentó obtener cristales para difracción por Rayos X. Sin embargo, no se logró obtener cristales del producto ópticamente puro. Esto puede deberse a diferencias en la morfología del cristal y en el crecimiento del cristal entre el

enantiómero puro y la mezcla racémica.³⁵ Al tratarse de un sistema rígido, se propone como posible explicación que el enantiómero puro no puede acomodarse correctamente para formar un cristal. En la mezcla racémica, al ser los enantiómeros imágenes especulares, pueden intercalarse y encajarse entre sí para acomodarse adecuadamente formando un cristal.

En búsqueda de una metodología alternativa para la determinación de la configuración absoluta del isómero (+)-**23a**, decidimos recurrir a estudios *in silico*. La configuración absoluta de una molécula quiral se podría predecir a partir de la comparación del valor teórico y experimental de su rotación óptica (OR) y/o de su espectro de dicroísmo circular electrónico (ECD).³⁶

ii) Determinación de la configuración absoluta mediante cálculos teóricos de rotación óptica

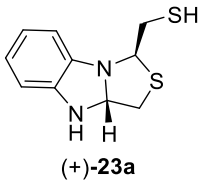
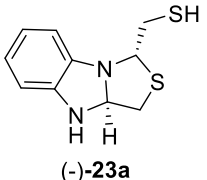
Existen ejemplos en literatura donde a través de medidas de rotación específica experimentales y la comparación con los valores teóricos calculados han permitido predecir la configuración absoluta de varias moléculas orgánicas, principalmente productos naturales.^{37,38} Se decidió aplicar este enfoque para determinar la stereoquímica del enantiómero aislado.

Con este fin, se realizaron cálculos teóricos de α_D para ambos enantiómeros (*R,R*)-**23a** y (*S,S*)-**23a** y se compararon con el valor experimental (+ 90°). Este trabajo se hizo en colaboración con el Lic. Franco Vairoletti.

En primer lugar, se realizó una búsqueda conformacional sistemática de cada enantiómero utilizando el Software MOE, utilizando CH₂Cl₂ como solvente implícito en el modelo de Born generalizado ($\epsilon = 8.93$). para encontrar las conformaciones cercanas a los mínimos energéticos.³⁹ Luego se minimizaron las estructuras por mecánica molecular (campo de fuerza Amber14:EHT) y las tres conformaciones de menor energía fueron optimizadas con el método ub3lyp/6-31++g(d,p) con CH₂Cl₂ como solvente modelado mediante PCM.⁴⁰ Los valores teóricos de α_D fueron calculados con el mismo funcional y función de base. Los resultados de cada isómero se calcularon como el promedio ponderado por el factor de Boltzmann de todas las conformaciones. Los

resultados fueron +46 para el isómero (*R,R*) y -61 para el isómero (*S,S*), Tabla 6.6.

Tabla 6.6: Valores de alfa D teóricos para ambos enantiómeros y experimental del isómero aislado.

Compuesto	Valor teórico	Valor experimental
 (+)- 23a	+46	+91
 (-)- 23a	-61	ND

ND = No determinado.

Estos resultados muestran un valor (+) para el isómero (*R,R*) del mismo signo que el valor experimental del producto de resolución de la MAO aislado. Si bien los valores de OR predicho (+46) y el experimental (+91) no son idénticos, el signo de la predicción es consistente y existen numerosos ejemplos con ese nivel de error.⁴¹ Debido a que el valor predicho es alto podríamos afirmar con confianza que se trata del isómero (*R,R*).

Para confirmar estos resultados se determinó el espectro de dicroísmo circular electrónico ECD teórico y experimental del isómero aislado, ya que al medirse en un amplio rango de longitudes de onda se puede obtener más información estructural.

iii) Determinación de la configuración absoluta mediante Dicroísmo Circular Electrónico (ECD)

Otro enfoque ampliamente utilizado para asignar la configuración absoluta de moléculas pequeñas quirales ha sido mediante espectroscopía electrónica de dicroísmo circular (ECD).⁴²

La luz polarizada circularmente está formada por dos componentes que son imágenes especulares una de la otra: sentido horario y antihorario. El dicroísmo circular es un fenómeno que resulta cuando los cromóforos en un entorno asimétrico interactúan con la luz polarizada, mostrando una diferencia de absorbancia entre sus dos componentes. Además, los vectores eléctricos de la luz polarizada describen una elipse cuyo eje mayor cambia de ángulo de rotación cuando atraviesa un medio quiral. La diferencia de absorbancia de la muestra entre los dos componentes de la luz polarizada se relaciona con el nuevo ángulo de rotación mediante la ecuación [2]:

$$\theta \text{ (deg)} = 32.98 \cdot \Delta A^{43} \quad [2]$$

Existen numerosas publicaciones en donde se utiliza esta técnica para la elucidación estructural de compuestos.⁴⁴ Basados en esto, se decidió aplicar este enfoque para la determinación de la configuración absoluta del enantiómero aislado (+)-**23a**. Para ello, el compuesto (+)-**23a** se disolvió en CHCl_3 (0.2 mg/mL) y se adquirió el espectro de dicroísmo circular electrónico (ECD) realizado en el rango 230-400 nm. Los datos crudos de θ (mdeg) obtenidos se convierten en valores de ΔA según la siguiente ecuación [2], y luego mediante la ley de Lambert-Beer se convierten en valores de $\Delta \epsilon$, según ecuación [3]:

$$\Delta \epsilon = \frac{\Delta A}{c \cdot l} \quad [3]$$

Donde $c = 0.1 \text{ cm}$ y la $[23a] = 9,8 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Luego, se calcularon los espectros de ECD teóricos para (+)-**23a** y (-)-**23a**. Las conformaciones generadas en el punto ii) fueron re-optimizadas en cloroformo con el mismo método químico. Para el cálculo del espectro de ECD se generaron 30 estados excitados por TD-DFT.

En la Figura 6.9 se comparan los espectros de ECD experimental corregido (curva negra) y teóricos para los enantiómeros (*R,R*)-**23a** (curva verde) y (*S,S*)-**23a** (curva rosada).

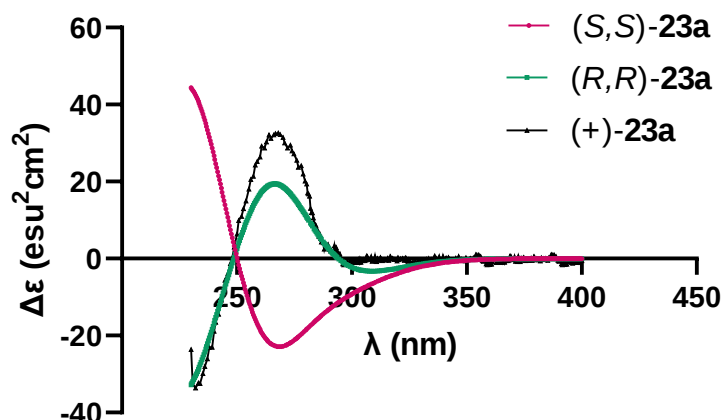


Figura 6.9: Espectros de ECD: Experimental del enantiómero (+)-**23a** (curva negra); calculado para el enantiómero (*R,R*)-**23a** (curva verde) y calculado para el enantiómero (*S,S*)-**23a** (curva rosada).

La comparación entre el espectro experimental y los espectros teóricos calculados para ambos enantiómeros parecen indicar nuevamente que el enantiómero aislado se trata del (*R,R*). Tanto en el espectro de ECD experimental como en el teórico para el isómero (*R,R*) se observa la presencia de un pico negativo cercano a 230 nm y un pico positivo cercano a 270 nm.

iv) Estudios de docking molecular de las BIM1 y la enzima MAO-D11

Se llevaron a cabo estudios de docking molecular con el fin de explicar la enantioselectividad de la reacción de oxidación por la MAO-D11. Para ello se utilizaron técnicas de docking semi-flexible libres y sesgadas en base al conocimiento de la reacción química a catalizar y se analizaron las conformaciones de los sustratos, y las interacciones específicas. Este trabajo fue realizado en colaboración con el Dr. Cesar Iglesias, el Lic. Ariel Tijman y el Lic. Gonzalo López.

En primer lugar, se tomó la estructura cristalina de la MAO-D11 disponible en PDB y se cargó en el Software Amber. Luego, se llevó a cabo la relajación de la proteína hasta la estabilización de la desviación cuadrática media o RMSB (<2.5 Å). Los sustratos BIM1 se parametrizaron con cálculos DFT utilizando el Software Gamess hasta encontrar las conformaciones de menor energía.

El docking se llevó a cabo en AUTODOCK 4/VINA con aminoácidos del sitio activo flexibles, en una caja de 5 Å alrededor de los aminoácidos del sitio

activo. Sobre las mejores conformaciones obtenidas se estimó la energía de unión mediante el comando BindEnergy del Software YASARA.

Las posiciones con un RMSD inferior a 2.5 Å se agruparon y promediaron, y cada grupo se representó por la posición con la energía libre de unión más baja. Se analizó cada grupo obtenido por VINA para cada sustrato y se analizó la energía de unión entre la enzima y el sustrato. Además, se analizó la distancia al cofactor FAD que es esencial para que el mecanismo catalítico tenga lugar.

En la Figura 6.10A-C se muestran los complejos enzima:sustrato para los enantiómeros (*R,R*)-**23a** y (*S,S*)-**23a** y su superposición.

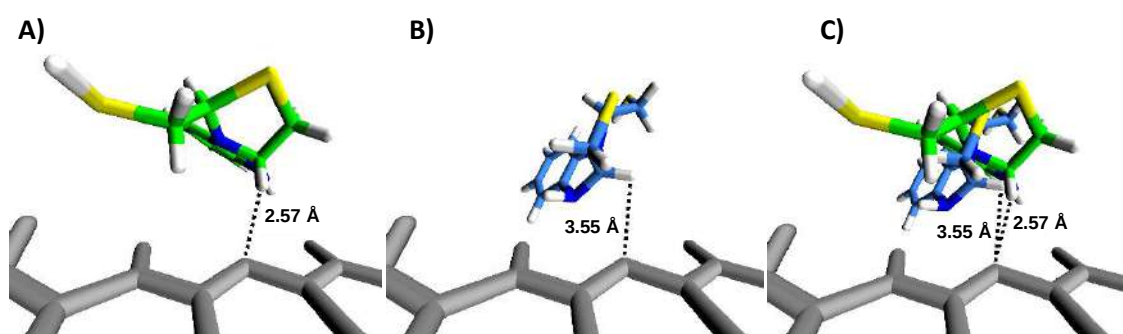


Figura 6.10: Complejos simulados enzima:sustrato para MAO-D11 y los enantiómeros: A) (*R,R*)-**23a**; B) (*S,S*)-**23a** y C) Superposición de ambos complejos.

Para que la oxidación de la amina pueda darse en el sitio activo de la MAO, el sustrato debe acercarse de una manera catalíticamente favorable al cofactor FAD: el hidrógeno de la BIM1 debe orientarse hacia el átomo de nitrógeno del FAD y acercarse a una distancia < 4 Å para que se dé la transferencia del hidruro, según el mecanismo discutido previamente.

Los resultados del docking dan evidencia que, en el caso del enantiómero (*R,R*)-**23a**, cuando el hidrógeno se orienta hacia el cofactor FAD a una distancia catalíticamente favorable, la cadena de mercaptometilo adoptaría una posición que lleva a un impedimento estérico con el FAD, ver Figura 6.10A y representación de superficie en Figura 6.11. Por lo tanto, no permitiría el acercamiento entre el sustrato y el FAD, y obligaría al compuesto a tener una orientación catalíticamente desfavorable.

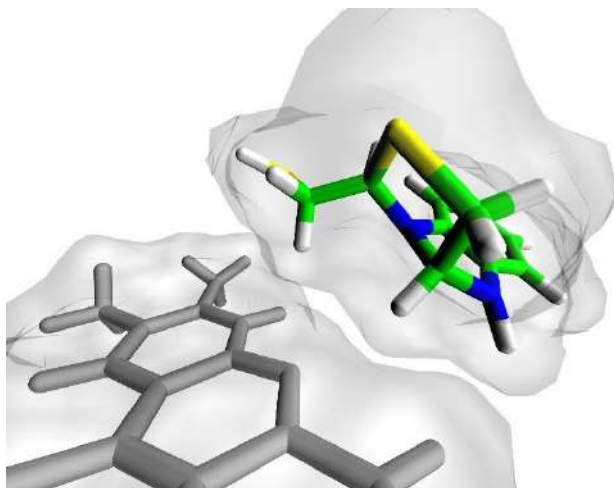


Figura 6.11: Representación de superficie del complejo simulado MAO-D11:(*R,R*)-**23a**

Ese impedimento estérico no se observa para el enantiómero (*S,S*)-**23a**: cuando el hidrógeno de la BIMl está orientado hacia el átomo de nitrógeno del cofactor FAD a una distancia adecuada, la cadena de mercaptometilo queda orientada en dirección opuesta al FAD, Figura 6.10B.

En su conjunto, estos resultados también apuntan a que el enantiómero que oxida la enzima es el (*S,S*)-**23a**, dejando el enantiómero (*R,R*)-**23a** en solución.

Alcance de la reacción de resolución de MAO: screening de compuestos

Se estudió el alcance de la metodología de resolución sobre los heterociclos BIMl **23b-I**, con sustituciones en el anillo aromático. Para ello se realizó un screening a pequeña escala (1 mg) sobre **23b-I**, utilizando células de *E. coli* expresando MAO-D11, en BF pH 7 y DMF 5%. Los tiempos de muestreo fueron 1, 2, 4 y 6 h. Se tomaron alícuotas y se extrajeron con AcOEt. Luego el residuo se retomó en una mezcla hexano/isopropanol (8:2), se analizó por HPLC quiral, y se determinó el rendimiento y % ee, ver resultados en Tabla 6.7. Los rendimientos fueron calculados como: $\%R = (\text{área}_{23(t=x)} / \text{área}_{23(t=1h)}) \times 100$.

Tabla 6.7: Estudio del alcance de la reacción de resolución a BIMl sustituidas utilizando células de *E. coli* expresando MAO-D11 en BF pH 7 y DMF al 5% como co-solvente.

Compuesto	Tiempo (h)							
	1		2		4		8	
	R % ^a	% ee ^b	R % ^a	% ee ^b	R % ^a	% ee ^b	R % ^a	% ee ^b
23a	100	92	68	94	47	94	3	92
23b , 4-5 Ph	100	0	95	0	93	0	91	0
23c , 4-CH ₃	100	70	48	72	26	78	6	64
23d , 5-CH ₃	100	72	39	76	9	74	3	40
23e , 4-CO ₂ Et	100	0	76	0	54	0	38	0
23f , 5-CO ₂ Et	100	0	85	0	69	0	54	0
23g , 4-NO ₂	100	0	93	0	88	0	65	0
23h , 5-NO ₂	100	8	99	10	94	16	75	14
23i , 4-F	100	50	65	44	39	44	5	46
23j , 5-F	100	56	0	-	0	-	0	-
23k , 4-Br	100	0	89	0	42	0	26	0
23l , 5-Br	100	26	31	30	8	90	3	92

^aLos rendimientos fueron calculados como %área/área, tomando como 100% el área del enantiómero mayoritario a tiempo = 1 h. ^bEl exceso enantiomérico se calculó por HPLC quiral, según ecuación [1].

Los mejores resultados se obtuvieron para la BIMl **23a** sin sustituir, con un rendimiento máximo de 68% y 94% ee a las 2 h de reacción.

Con respecto a las BIMl sustituidas **23b-l**, los resultados muestran que todas las sustituciones en el anillo aromático llevaron a una disminución de los % ee respecto a la BIMl sin sustituir **23a**.

Dentro de las BIMl sustituidas, los mejores resultados de enantioselectividad (% ee) se lograron para los compuestos **23c** (4-CH₃) y **23d** (5-CH₃), con rendimientos de 48 y 39% y % ee de 72 y 76, respectivamente, a las 2 h de reacción. Si bien para el compuesto **23c** (4-CH₃) el % ee mejora a 78 % a las 4 h, el rendimiento disminuye a la mitad (26%).

Para el compuesto **23b** conteniendo un segundo anillo aromático fusionado, no se logró enantioselectividad en la reacción. El análisis por HPLC revela que el área de ambos enantiómeros se mantiene prácticamente constante

en el tiempo, obteniendo el compuesto **23b** con un 91% de rendimiento y 0% ee a las 8 h de reacción. Además, no se detectó ningún producto de oxidación en el cromatograma. Por lo tanto, podemos suponer que ninguno de los enantiómeros sería sustrato de la enzima y que la disminución en las áreas se debe a la degradación química del compuesto en el medio de reacción a especies que no se detectan en las condiciones cromatográficas empleadas, por ejemplo, productos de hidrólisis de los heterociclos. El hecho de que este compuesto no sea sustrato de la enzima podría deberse a un efecto de impedimento estérico en el sitio activo de ambos enantiómeros y por este motivo no se logra resolución.

Para los isómeros **23e** (4-CO₂Et) y **23f** (5-CO₂Et) no se logró resolución luego de 8 h de reacción. El análisis por HPLC muestra que las áreas disminuyen a lo largo del tiempo, obteniendo los compuestos **23e** (4-CO₂Et) y **23f** (5-CO₂Et) con 38 y 54% de rendimiento, respectivamente, y 0% ee para ambos luego de 8 h de incubación. Dado que no se detectó ningún producto de oxidación en los cromatogramas, esto indicaría que la MAO no es capaz de oxidar a ninguno de los enantiómeros de **23e** y **23f**, y que la disminución en las áreas se debe a la degradación química del compuesto en el medio de reacción, Tabla 6.7.

Para el compuesto **23g** (4-NO₂) no se logró resolución, obteniéndose con 65% de rendimiento y 0% ee a las 8 h de reacción. Por otro lado, el compuesto **23h** (5-NO₂) se obtuvo con un rendimiento de 75% y 14% ee a las 8 h de reacción, Tabla 6.7.

Para los compuestos **23i** (4-F) y **23j** (5-F) se lograron resultados moderados, obteniendo los compuestos con un 50 y 56% ee, respectivamente, luego de 1 h de reacción. Para **23i** (4-F) la enantioselectividad y los rendimientos emperoran a lo largo del tiempo. Para el caso del compuesto **23j** (5-F), a las 4 h no se observa ninguno de los enantiómeros probablemente debido a la rápida degradación química del compuesto en el medio de reacción, Tabla 6.7.

Para el compuesto **23k** (4-Br) no se logró resolución, obteniéndose con un rendimiento de 26% y 0% ee luego de 8 h de reacción. Por otro lado, el compuesto **23l** (5-Br) se obtuvo con un 8% de rendimiento y un 90% ee luego de 4 h de reacción. Para este último, se logra una buena enantioselectividad a tiempos más largos de reacción, pero comprometiendo el rendimiento de obtención del enantiómero puro. Esto podría deberse a la rápida degradación química del compuesto.

Con el fin de obtener más información y determinar las bases moleculares de la interacción MAO-BIMI que explique estos resultados, se plantea en trabajos futuros realizar estudios de docking molecular.

ii) Síntesis enantioselectiva

Dado que ninguna de las tres variantes de MAO-N logró resolver la mezcla racémica de la BNTZ ($\pm$)-**17a**, decidimos cambiar de estrategia y explorar la síntesis enantioselectiva de **17a**, utilizando la enzima MAO para realizar la oxidación enantioselectiva del intermediario de reacción tiazolidina, Figura 6.12.

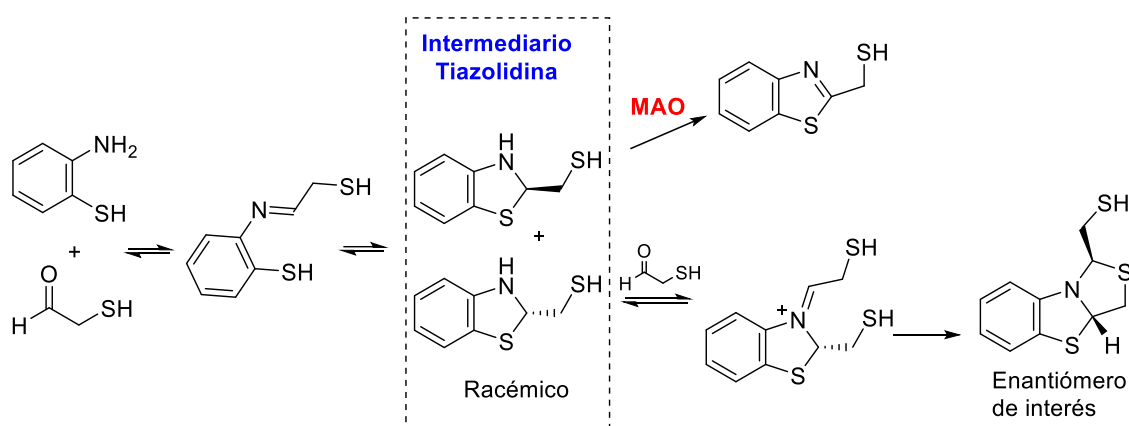
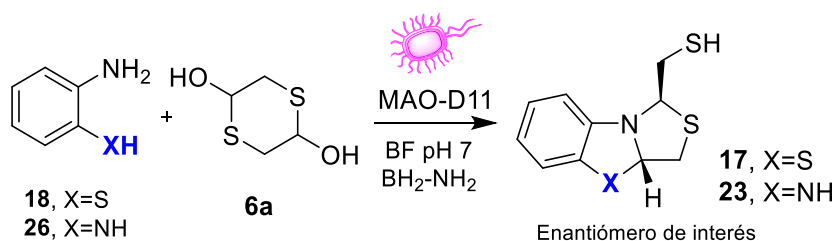


Figura 6.12: Resolución cinética dinámica del intermediario de reacción propuesto para la síntesis enantioselectiva de **17a**.

Se llevó a cabo un screening a pequeña escala de la síntesis de BNTZ y BIMi utilizando células *E. coli* expresando MAO-D11 en BF pH 7 y DMF al 5% como co-solvente, ver Esquema 6.8 y Tabla 6.8.



Esquema 6.8: Síntesis enantioselectiva de BIMi y BTZ utilizando células de *E. coli* expresando MAO-D11 en BF pH 7 y DMF al 5% como co-solvente.

Tabla 6.8: Síntesis enantioselectiva de BIMl y BTZ utilizando células de *E. coli* expresando MAO-D11 en BF pH 7 y DMF al 5% como co-solvente.

Producto		
	17a	23a
Tiempo (h)	R (%)^a, (% ee)^b	
0.5	21 (22)	71 (20)
1	42 (36)	100 (26)
2	100 (28)	69 (18)
4	87 (36)	41 (14)

^a Los rendimientos se calcularon según: %R = (área problema/área referencia) x100, siendo el área de referencia el área del enantiómero mayoritario en las condiciones: t = 1 y 2 h para **23a** y **17a**, respectivamente. ^bEl exceso enantiomérico se calculó por HPLC quiral.

Estos resultados mostraron que la enzima MAO-D11 resulta útil para la síntesis enantioselectiva de **17a** y **23a** con una enantioselectividad moderada (36 y 26 % ee, respectivamente), resultado altamente prometedor para seguir estudiando condiciones y poder mejorar los rendimientos y los % ee.

6.3.3 Determinación de la IC₅₀ de (+)-**23a** y (-)-**30** frente a la enzima NDM-1

Se determinó el valor de IC₅₀ del isómero aislado (+)-**23a** y del benzimidazol (-)-**30** frente a la enzima NDM-1. Los resultados se muestran en la Tabla 6.9, incluidas las actividades de la mezcla racémica (±)-**23a**.

Tabla 6.9: Valores de IC₅₀ para los compuestos (±)-**23a**, (+)-**23a** y (-)-**30** frente a la enzima NDM-1.

Compuesto	IC ₅₀ (NDM-1) (μM)
(±)- 23a	0.77 ± 0.07
(+)- 23a	0.45
(-)- 30	0.024

El compuesto (+)-**23a** resultó levemente más activo que la mezcla racémica, aunque en el mismo orden. Según los estudios cristalográficos el isómero (*R,R*)-**23a** se une preferentemente a NDM-1, por lo tanto sería más activo frente esta enzima. Los resultados de actividad biológica confirmarían las predicciones de la configuración absoluta realizadas utilizando los datos de rotación óptica, el espectro de ECD y los experimentos de docking molecular, que apuntan a que el enantiómero aislado es el (*R,R*)-**23a**.

El compuesto (-)-**30** resultó aproximadamente 30 veces más activo que el compuesto (+)-**23a**. Este compuesto es el mejor inhibidor de la enzima NDM-1 que ha caracterizado el grupo hasta el momento. En base a este resultado, se piensa que la rigidización del anillo de imidazolidina y el aumento de la lipofilia respecto a **23a** podría tener un papel fundamental en el diseño de nuevos inhibidores de MBL.

6.4 Conclusiones y perspectivas

Se exploraron dos enfoques biocatalíticos para la obtención de BIMi y BNTZ enantioméricamente puras.

En este trabajo se describe un nuevo ejemplo de resolución enantiomérica para benzoimidazolidinas utilizando la enzima MAO. Este tipo de heterociclo no había sido probado con estas enzimas hasta ahora.

Respecto a la resolución cinética de mezclas racémicas, las tres variantes de MAO ensayadas resultaron enantioselectivas para la BIMi **23a**. En particular, la variante D11 mostró el mejor resultado, proporcionando el producto (+)-**23a** con un excelente exceso enantiomérico (95%) luego de 4 horas de reacción. En su conjunto, los cálculos teóricos de α_D y ECD, y los estudios de docking realizados para ambos enantiómeros apuntan a que el isómero obtenido corresponde al (*R,R*)-**23a**. Los resultados de actividad biológica confirmarían estas predicciones.

De la reacción de resolución de **23a** se logró aislar el producto de oxidación **30**, que resultó ser un excelente inhibidor de NDM-1, con un valor de IC_{50} en el rango nanomolar.

Por otro lado, ninguna de las variantes fue adecuada para resolver la mezcla racémica de **17a**. Sin embargo, la variante D11 resultó útil para su síntesis enantioselectiva, obteniendo **17a** con un 36 % ee.

Como resultado de este trabajo, se está preparando el manuscrito titulado:

“Novel kinetic resolution of Benzoimidazolines using MAO” para ser enviado a publicar en revistas referadas.

Como perspectivas de este trabajo, se propone explorar otros enfoques biocatalíticos para la obtención de BNTZ o BIMl enantioméricamente puras:

i) Llevar a cabo estudios de docking molecular de las BIMl sustituidas en el anillo aromático con la enzima MAO-D11 para estudiar la relación estructura-actividad.

ii) Utilizar otras AO estereocomplementarias a la MAO, según reportan Reetz y colaboradores,^{45,46} que se han utilizado ampliamente para sustratos voluminosos.

iii) Explorar una resolución cinética dinámica del intermediario de reacción con cascada MAO/IREDs estereocomplementarias a MAO.

iv) Por último, un enfoque más novedoso que se podría implementar a futuro es desarrollar variantes de MAO D-11 con mutaciones sitio dirigidas en el sitio activo de la enzima que podrían resolver los análogos de BIMl que no pudieron ser resueltos con las variantes de MAO ensayadas.

6.5 Bibliografía

- (1) Wojaczyńska, E.; Wojaczyński, J. Modern Stereoselective Synthesis of Chiral Sulfinyl Compounds. *Chem. Rev.* **2020**, *120* (10), 4578–4611. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00002>.
- (2) Wu, S.; Snajdrova, R.; Moore, J. C.; Baldenius, K.; Bornscheuer, U. T. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angew. Chemie.* **2021**, *60* (1), 88–119. <https://doi.org/10.1002/anie.202006648>.
- (3) He, L.; Liang, Z.; Yu, G.; Li, X.; Chen, X.; Zhou, Z.; Ren, Z. Green and Efficient Resolution of Racemic Ofloxacin Using Tartaric Acid Derivatives via Forming Cocrystal in Aqueous Solution. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18* (9), 5008–5020. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00414>.
- (4) Habala, L.; Horáková, R.; Čižmáriková, R. Chromatographic Separations Based on Tartaric Acid and Its Derivatives. *Monatshefte fur Chemie.* **2018**, *149* (5), 873–882. <https://doi.org/10.1007/s00706-018-2160-8>.
- (5) De Risi, C.; Bortolini, O.; Di Carmine, G.; Ragno, D.; Massi, A. Kinetic Resolution, Dynamic Kinetic Resolution and Asymmetric Desymmetrization by N-Heterocyclic Carbene Catalysis. *Synth.* **2019**, *51* (9), 1871–1891. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1612305>.
- (6) Adams, J. P.; Brown, M. J. B.; Diaz-Rodriguez, A.; Lloyd, R. C.; Roiban, G. D. Biocatalysis: A Pharma Perspective. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361* (11), 2421–2432. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900424>.
- (7) Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (2), 801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>.
- (8) Hughes, G.; Lewis, J. C. Introduction: Biocatalysis in Industry. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (1), 1–3. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00741>.
- (9) Chang, C. S.; Tsai, S. W. Lipase-Catalyzed Dynamic Resolution of Naproxen Thioester by Thiotransesterification in Isooctane. *Biochem. Eng. J.* **1999**, *3* (3), 239–242. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00022-4](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00022-4).

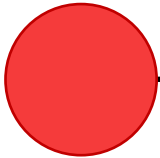
- (10) Um, P. J.; Drueckhammer, D. G. Dynamic Enzymatic Resolution of Thioesters. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (23), 5605–5610. <https://doi.org/10.1021/ja980445b>.
- (11) Hwang, B.; Lee, H. B.; Kim, Y. G.; Kim, B. Kinetic Resolution of Racemic α -Methyl- β -Propiothiolactone by Lipase-Catalyzed Hydrolysis. *Biotechnology progress*. **2000**, *16* (6), 973-978. <https://doi.org/10.1021/bp000120a>
- (12) Dunsmore, C. J.; Carr, R.; Fleming, T.; Turner, N. J. A Chemo-Enzymatic Route to Enantiomerically Pure Cyclic Tertiary Amines. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (7), 2224–2225. <https://doi.org/10.1021/ja058536d>.
- (13) Heath, R. S.; Pontini, M.; Bechi, B.; Turner, N. J. Development of an R-Selective Amine Oxidase with Broad Substrate Specificity and High Enantioselectivity. *Chem. Cat. Chem.* **2014**, *6* (4), 996–1002. <https://doi.org/10.1002/cctc.201301008>.
- (14) Yasukawa, K.; Nakano, S.; Asano, Y. Tailoring D -Amino Acid Oxidase from the Pig Kidney to R -Stereoselective Amine Oxidase and Its Use in the Deracemization of α -Methylbenzylamine . *Angew. Chemie.* **2014**, *126* (17), 4517–4520. <https://doi.org/10.1002/ange.201308812>.
- (15) Nakano, S.; Minamino, Y.; Hasebe, F.; Ito, S. Deracemization and Stereoconversion to Aromatic D-Amino Acid Derivatives with Ancestral L-Amino Acid Oxidase. *ACS Catal.* **2019**, *9* (11), 10152–10158. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b03418>.
- (16) Pollegioni, L.; Rosini, E.; Molla, G. Advances in Enzymatic Synthesis of D-Amino Acids. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093206>.
- (17) Li, G.; Ren, J.; Yao, P.; Duan, Y.; Zhang, H.; Wu, Q.; Feng, J.; Lau, P. C. K.; Zhu, D. Deracemization of 2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroquinoline Using Mutant Cyclohexylamine Oxidase Obtained by Iterative Saturation Mutagenesis. *ACS Catal.* **2014**, *4* (3), 903–908. <https://doi.org/10.1021/cs401065n>.
- (18) Ghislieri, D.; Green, A. P.; Pontini, M.; Willies, S. C.; Rowles, I.; Frank, A.;

- Grogan, G.; Turner, N. J. Engineering an Enantioselective Amine Oxidase for the Synthesis of Pharmaceutical Building Blocks and Alkaloid Natural Products. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (29), 10863–10869. <https://doi.org/10.1021/ja4051235>.
- (19) Schilling, B.; Lerch, K. Amine Oxidases from *Aspergillus Niger*: Identification of a Novel Flavin-Dependent Enzyme. *BBA - Gen. Subj.* **1995**, *1243* (3), 529–537. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(94\)00183-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(94)00183-X).
- (20) Sablin, S. O.; Yankovskaya, V.; Bernard, S.; Cronin, C. N.; Singer, T. P. Isolation and Characterization of an Evolutionary Precursor of Human Monoamine Oxidases A and B. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *253* (1), 270–279. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2530270.x>.
- (21) Atkin, K. E.; Reiss, R.; Turner, N. J.; Brzozowski, A. M.; Grogan, G. Cloning, Expression, Purification, Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis of Variants of Monoamine Oxidase from *Aspergillus Niger*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2008**, *64* (3), 182–185. <https://doi.org/10.1107/S174430910800345X>.
- (22) Rowles, I.; Malone, K. J.; Etchells, L. L.; Willies, S. C.; Turner, N. J. Directed Evolution of the Enzyme Monoamine Oxidase (Mao-N): Highly Efficient Chemo-Enzymatic Deracemisation of the Alkaloid (±)-Crispinea. *Chem. Cat. Chem.* **2012**, *4* (9), 1259–1261. <https://doi.org/10.1002/cctc.201200202>.
- (23) Ghislieri, D.; Houghton, D.; Green, A. P.; Willies, S. C.; Turner, N. J. Monoamine Oxidase (MAO-N) Catalyzed Deracemization of Tetrahydro- β -Carbolines: Substrate Dependent Switch in Enantioselectivity. *ACS Catal.* **2013**, *3* (12), 2869–2872. <https://doi.org/10.1021/cs400724g>.
- (24) Carr, R.; Alexeeva, M.; Dawson, M. J.; Gotor-Fernández, V.; Humphrey, C. E.; Turner, N. J. Directed Evolution of an Amine Oxidase for the Preparative Deracemisation of Cyclic Secondary Amines. *Chem. Bio. Chem.* **2005**, *6* (4), 637–639. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400329>.
- (25) Zhao, F.; Masci, D.; Ferla, S.; Varricchio, C.; Brancale, A.; Colonna, S.; Black, G. W.; Turner, N. J.; Castagnolo, D. Monoamine Oxidase (MAO-N)

- Biocatalyzed Synthesis of Indoles from Indolines Prepared via Photocatalytic Cyclization/Arylative Dearomatization. *ACS Catal.* **2020**, *10* (11), 6414–6421. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c01351>.
- (26) Herter, S.; Medina, F.; Wagschal, S.; Benhaïm, C.; Leipold, F.; Turner, N. J. Mapping the Substrate Scope of Monoamine Oxidase (MAO-N) as a Synthetic Tool for the Enantioselective Synthesis of Chiral Amines. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26* (7), 1338–1346. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.07.023>.
- (27) Batista, V. F.; Galman, J. L.; Pinto, D. C.; Silva, A. M. S.; Turner, N. J. Monoamine Oxidase: Tunable Activity for Amine Resolution and Functionalization. *ACS Catal.* **2018**, *8* (12), 11889–11907. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b03525>.
- (28) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150* (1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- (29) Chajkowski-Scarry, S.; Rimoldi, J. M. Monoamine Oxidase A and B Substrates: Probing the Pathway for Drug Development. *Future Med. Chem.* **2014**, *6* (6), 697–717. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.23>.
- (30) Orru, R.; Aldeco, M.; Edmondson, D. E. Do MAO A and MAO B Utilize the Same Mechanism for the C-H Bond Cleavage Step in Catalysis? Evidence Suggesting Differing Mechanisms. *J. Neural Transm.* **2013**, *120* (6), 847–851. <https://doi.org/10.1007/s00702-013-0991-3>.
- (31) Silverman, B. Radical Ideas about Monoamine Oxidase. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28* (8), 335–342. <https://doi.org/10.1021/ar00056a003>.
- (32) Vianello, R.; Repič, M.; Mavri, J. How Are Biogenic Amines Metabolized by Monoamine Oxidases? *European J. Org. Chem.* **2012**, *36*, 7057–7065. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201201122>.
- (33) Stare, J. Complete Sampling of an Enzyme Reaction Pathway: A Lesson from Gas Phase Simulations. *RSC Adv.* **2017**, *7* (15), 8740–8754. <https://doi.org/10.1039/c6ra27894a>.

- (34) Saiz, C.; Villamil, V.; González, M. M.; Rossi, M. A.; Martínez, L.; Suescun, L.; Vila, A. J.; Mahler, G. Enantioselective Synthesis of New Oxazolidinylthiazolidines as Enzyme Inhibitors. *Tetrahedron Asymmetry* **2017**, 28 (1), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.11.002>.
- (35) Bellies, S.; Cardinael, P.; Ndzié, E.; Petit, S.; Coquerel, G. Preferential Crystallisation and Comparative Crystal Growth Study between Pure Enantiomer and Racemic Mixture of a Chiral Molecule: 5-Ethyl-5-Methylhydantoin. *Chem. Eng. Sci.* **2001**, 56 (7), 2281–2294. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(00\)00442-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(00)00442-5).
- (36) McCann, D. M.; Stephens, P. J. Determination of Absolute Configuration Using Density Functional Theory Calculations of Optical Rotation and Electronic Circular Dichroism: Chiral Alkenes. *J. Org. Chem.* **2006**, 71 (16), 6074–6098. <https://doi.org/10.1021/jo060755+>.
- (37) McCann, D. M.; Stephens, P. J.; Cheeseman, J. R. Determination of Absolute Configuration Using Density Functional Theory Calculation of Optical Rotation: Chiral Alkanes. *J. Org. Chem.* **2004**, 69 (25), 8709–8717. <https://doi.org/10.1021/jo048571n>.
- (38) Zhao, S.-D.; Shen, L.; Luo, D.-Q.; Zhu, H.-J. Progression of Absolute Configuration Determination in Natural Product Chemistry Using Optical Rotation (Dispersion), Matrix Determinant and Electronic Circular Dichroism Methods. *Curr. Org. Chem.* **2012**, 15 (11), 1843–1862. <https://doi.org/10.2174/138527211795656688>.
- (39) Vairoletti, F.; Paulino, M.; Mahler, G.; Salinas, G.; Saiz, C. Structure-Based Bioisosterism Design, Synthesis, Biological Evaluation and In Silico Studies of Benzamide Analogs as Potential Anthelmintics. *Molecules* **2022**, 27 (9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092659>.
- (40) Grauso, L.; Teta, R.; Esposito, G.; Menna, M.; Mangoni, A. Computational Prediction of Chiroptical Properties in Structure Elucidation of Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, 36 (7), 1005–1030. <https://doi.org/10.1039/c9np00018f>.
- (41) Choi, B. K.; Jo, S. H.; Choi, D. K.; Trinh, P. T. H.; Lee, H. S.; van Anh, C.;

- Van, T. T. T.; Shin, H. J. Anti-Neuroinflammatory Agent, Restricticin b, from the Marine-Derived Fungus *Penicillium Janthinellum* and Its Inhibitory Activity on the NO Production in BV-2 Microglia Cells. *Mar. Drugs*. **2020**, *18* (9). <https://doi.org/10.3390/md18090465>.
- (42) Batista, A. N. L.; dos Santos, F. M.; Batista, J. M.; Cass, Q. B. Enantiomeric Mixtures in Natural Product Chemistry: Separation and Absolute Configuration Assignment. *Molecules* **2018**, *23* (2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules23020492>.
- (43) Evans, A. C.; Petit, A. S.; Guillen, S. G.; Neukirch, A. J.; Hoffmann, S. V.; Jones, N. C. Chiroptical Characterization Tools for Asymmetric Small Molecules-Experimental and Computational Approaches for Electronic Circular Dichroism (ECD) and Anisotropy Spectroscopy. *RSC Adv.* **2021**, *11* (3), 1635–1643. <https://doi.org/10.1039/d0ra06832b>.
- (44) Mazzeo, G.; Cimmino, A.; Longhi, G.; Masi, M.; Evidente, A.; Abbate, S. The Assignment of the Absolute Configuration of Non-Cyclic Sesquiterpenes by Vibrational and Electronic Circular Dichroism: The Example of *Chiliadenus Lopadusanus* Metabolites. *Biomolecules* **2021**, *11* (12). <https://doi.org/10.3390/biom11121902>.
- (45) Qu, G.; Li, A.; Acevedo-Rocha, C. G.; Sun, Z.; Reetz, M. T. The Crucial Role of Methodology Development in Directed Evolution of Selective Enzymes. *Angew. Chemie.* **2020**, *59* (32), 13204–13231. <https://doi.org/10.1002/anie.201901491>.
- (46) Li, G.; Yao, P.; Gong, R.; Li, J.; Liu, P.; Lonsdale, R.; Wu, Q.; Lin, J.; Zhu, D.; Reetz, M. T. Simultaneous Engineering of an Enzyme's Entrance Tunnel and Active Site: The Case of Monoamine Oxidase MAO-N. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (5), 4093–4099. <https://doi.org/10.1039/c6sc05381e>.



CAPÍTULO 7

Diseño y síntesis de análogos de
bistiazolidinas y tiazolidinas
conteniendo bioisósteros del grupo
tiol

7.1 Introducción

7.1.1 Diseño de nuevos análogos biosistéricos del grupo mercaptometilo

El grupo tiol es considerado uno de los grupos más versátiles en bioquímica ya que está involucrado en una amplia variedad de procesos y juega un papel importante en muchos aspectos de la función celular. La gran mayoría de los tioles presentes en medios biológicos son derivados de cisteína, aminoácido clave en el sitio activo de muchas enzimas involucradas en procesos redox.^{1,2} Dentro de los tioles biológicos intracelulares, el glutatión es el más abundante en muchos seres vivos y desempeña numerosos roles a nivel celular como regulador del potencial redox y como antioxidante.³

Pese a sus importantes funciones, los tioles son grupos químicamente muy reactivos con alta tendencia a la oxidación para formar dímeros. Los heterociclos de mercaptometil BTZ y TZ, si bien son estables al momento de su síntesis y purificación, una vez que se solubilizan se observa la aparición de dímeros con el correr del tiempo.

En el Capítulo 3 se exploró la síntesis de prodrogas para aumentar la estabilidad del tiol en medios biológicos introduciendo tioésteres. En el presente Capítulo se pretende estudiar la sustitución bioisostérica del grupo tiol en las BTZ **1a** y TZ **3a** por grupos capaces de coordinar con Zn^{2+} , que sean químicamente más estables y que mantengan los buenos valores de inhibición frente a MBL y microorganismos resistentes, Figura 7.1.

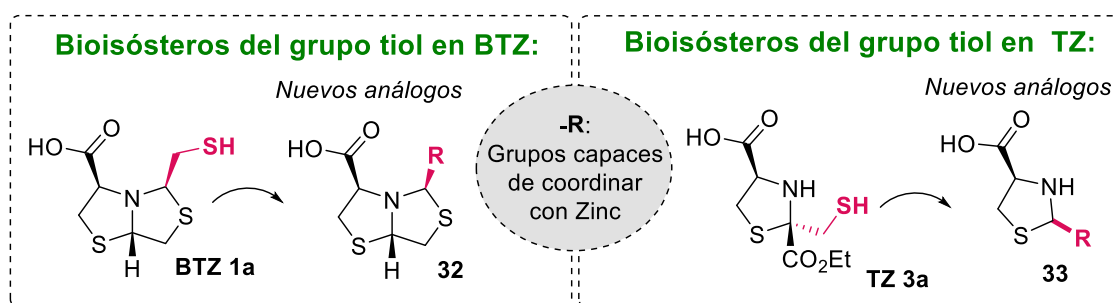


Figura 7.1: Reemplazo bioisostérico de BTZ **1a** y TZ **3a**.

7.1.2 Antecedentes de grupos capaces de coordinar con Zn^{2+}

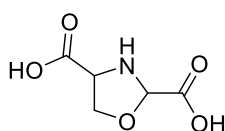
Muchos de los inhibidores de MBL descritos en bibliografía son análogos estructurales a ABL que contienen un grupo funcional capaz de coordinar con Zn^{2+} . Entre ellos, podemos citar: carboxilatos, hidroxamatos, tetrazoles y fosfonatos/bisfosfonatos.

Por ejemplo, Crowder y col. reportaron una serie de heterociclos di-carboxílicos que resultaron activos frente a las enzimas CcrA y L1 con valores de K_i en el rango micromolar,⁴ Figura 7.2a.

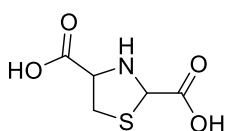
Por otro lado, Buynak y col. se basaron en la estructura de las cefalosporinas y exploraron el reemplazo del grupo N-H por N-OH, formando un hidroxamato capaz de unirse a los iones Zn^{2+} en el sitio activo, obteniendo compuestos con valores de IC_{50} en el rango submicromolar, Figura 7.2b.⁵

Algunos tetrazoles resultaron activos frente a distintas subclases de MBL como VIM-2 y NDM-1, con valores de K_i en el orden micromolar, un ejemplo se muestra en la Figura 7.2c.⁶ Por último, algunos derivados conteniendo un fosfonato o un bisfosfonato resultaron buenos inhibidores de la mayoría de las subclases de MBL, Figura 7.2d.⁷

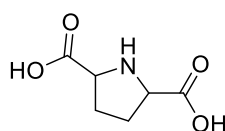
A) Compuestos di-carboxílicos:



K_i (CcrA) = 1.1 μ M

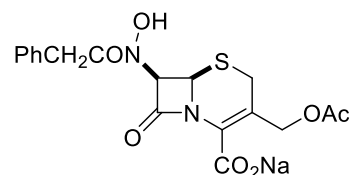


K_i (CcrA) = 0.64 μ M



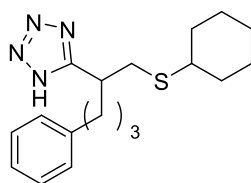
K_i (CcrA) = 0.73 μ M

B) Hidroxamatos:



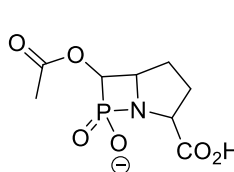
K_i (VIM-2) = 2.0 μ M

C) Tetrazoles:

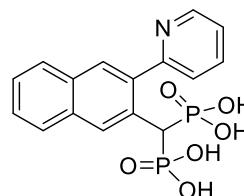


K_i (VIM-2) = 5.0 μ M

D) Fosfonatos y bisfosfonatos:



K_i (NDM-1) = 0.37 μ M



K_i (NDM-1) = 8.5 μ M

Figura 7.2: Inhibidores de MBL como análogos a sustratos conteniendo grupos capaces de coordinar con Zn^{2+} : A) compuestos di-carboxílicos; B) hidroxamatos; C) tetrazoles y D) fosfonatos y bisfosfonatos.

Por otra parte, se describen en bibliografía una serie de inhibidores de proteasas dependientes de Zn^{2+} conteniendo el grupo difluorometil ($-\text{CHF}_2$) como grupo responsable de coordinar con el centro metálico.⁸

7.2 Objetivo específico

7.2.1 Diseñar y sintetizar una serie de análogos a BTZ 1 y TZ 3 en donde el tiol es reemplazado por otros grupos capaces de coordinar con Zn^{2+}

Para alcanzar este objetivo específico se pretende diseñar los nuevos análogos en base a la hipótesis de que el tiol puede ser reemplazado por otros grupos químicamente más estables que mantengan la actividad frente a MBL. Para tales fines, se propone desarrollar una metodología sintética que nos permita preparar dichos derivados.

Por último, se plantea realizar la evaluación biológica de los análogos preparados frente a MBL pertenecientes a las tres subclases y su evaluación contra bacterias resistentes expresando MBL.

7.3 Resultados

En el presente Capítulo se muestran los resultados más relevantes en cuanto al diseño y síntesis de bioisósteros del grupo tiol en BTZ y TZ.

Las principales actividades realizadas en este marco se relacionan con los objetivos específicos y se desarrollan a continuación.

7.3.1 Diseño de nuevos bioisósteros de BTZ y TZ

Se decidió explorar la sustitución de la cadena de mercaptometilo de la BTZ **1a** por otros grupos capaces de coordinar con Zn^{2+} , químicamente más estables.

En base a los antecedentes mencionados, se diseñaron las 2-bistiazolidinas **32a-c**, mostrados en la Figura 7.3. Los nuevos derivados planteados contienen grupos funcionales bioisósteros del grupo tiol, capaces de coordinar con el Zn^{2+} : ácido carboxílico (**32a**), difluor (**32b**) y fosfonato (**32c**).

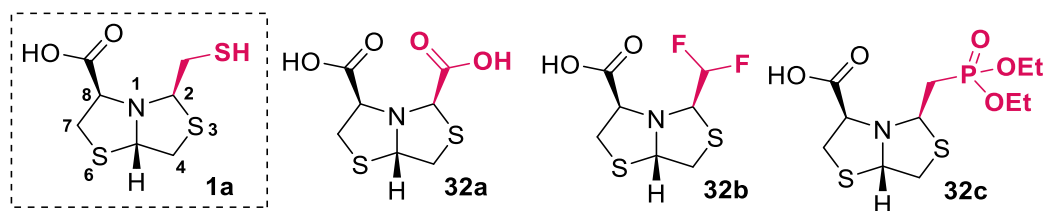


Figura 7.3: Estructura de los bioisómeros de BTZ diseñados **32a-c**.

Además, se diseñaron los bioisómeros de TZ **33a-b** conteniendo un grupo fosfonato en lugar de la cadena de mercaptometilo, según se muestra en la Figura 7.4.

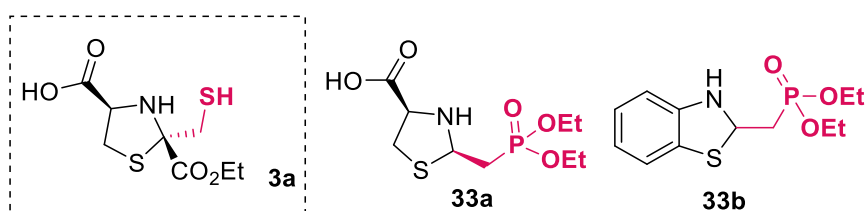
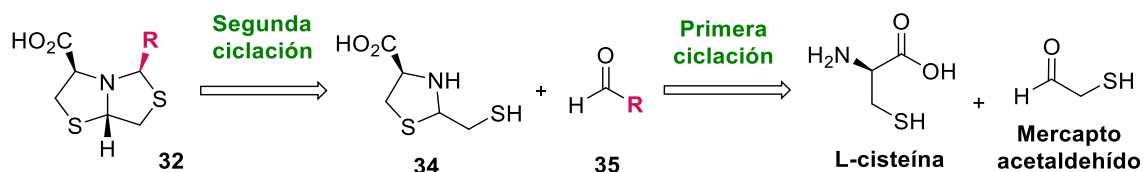


Figura 7.4: Estructura del bioisómero de TZ **33a-b**.

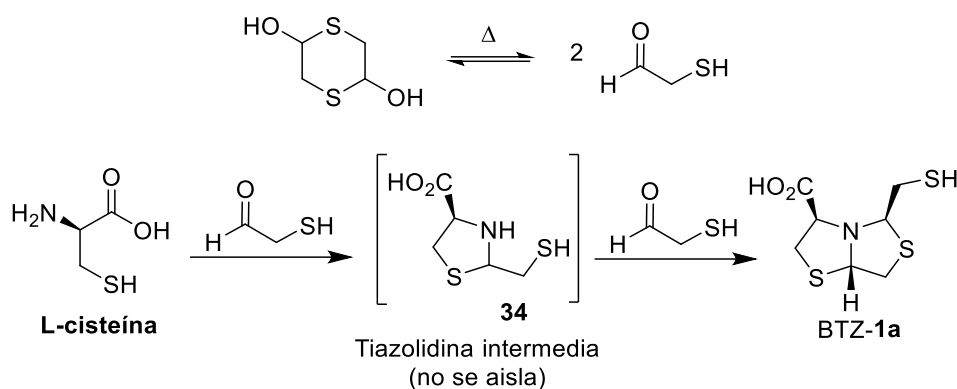
7.3.2 Desarrollo de la metodología sintética para la síntesis de bioisómeros de BTZ

Los bioisómeros **32a-c** podrían prepararse a partir de la tiazolidina intermedia **34** y posterior ciclación con los correspondientes aldehídos (**35a-c**) conteniendo el grupo de interés, Esquema 7.1. A su vez, la tiazolidina **34** podría prepararse a partir de L-cisteína y un equivalente de mercaptoacetaldehído.



Esquema 7.1: Análisis retrosintético de los bioisómeros **32**.

Sin embargo, los intentos de aislar la tiazolidina intermedia **34** no fueron posibles, Esquema 7.2. La reacción no se detiene en la primera ciclación, sino que la tiazolidina que se forma reacciona inmediatamente con una segunda molécula de mercaptoacetaldehído formándose la BTZ **1a**, Esquema 7.2.



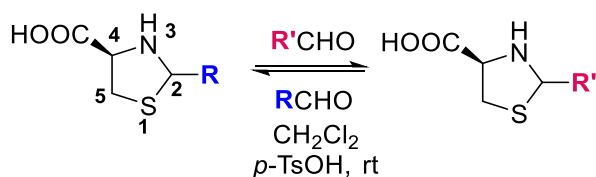
Esquema 7.2: Etapas en la formación de BTZ-**1a** a través de la tiazolidina intermedia **34**.

Esta ruta de síntesis no permitió preparar bioisómeros a nivel de la cadena mercaptometilo en **2**. Por ese motivo, se decidió explorar rutas alternativas para preparar las 2-bistiazolidinas **32**.

*Síntesis de derivados **32** a través de reacciones de intercambio de aldehídos*

Los anillos del tipo tiazolidina son sistemas reversibles capaces de llevar a cabo reacciones de intercambio con aldehídos en la posición acetálica **2** en presencia de ácido *p*-TsOH, como ha sido reportado por nuestro grupo,⁹ Figura 7.5A.

A) Intercambio de aldehídos en sistemas tiazolidinas:



B) Propuesta de Intercambio de aldehídos en sistemas bistiazolidinas:

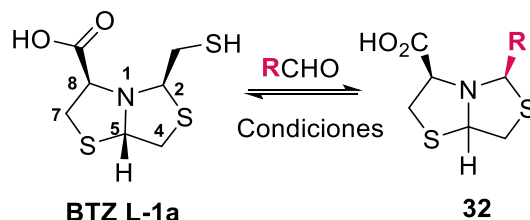
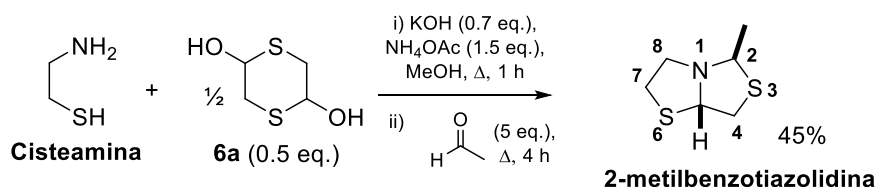


Figura 7.5: A) Intercambio de aldehídos en posición **2** en sistemas tiazolidinas utilizando ácido *p*-TsOH como catalizador. B) Propuesta de intercambio de aldehídos en posición **2** en sistemas bistiazolidinas utilizando diferentes condiciones.

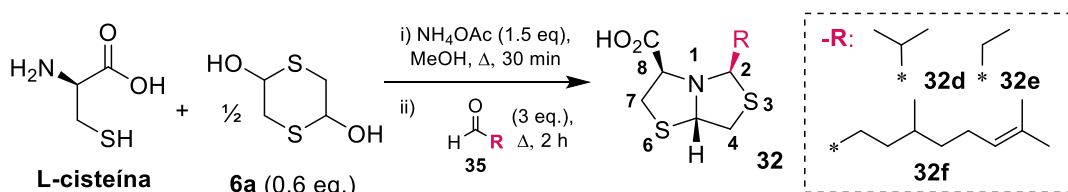
Las bistiazolidinas **1** son compuestos del tipo imino, ya que su formación se da a través de una doble ciclación mediada por formación de enlaces imina, tal como se discutió en el Capítulo 1. Se plantea que estos compuestos podrían ser capaces de intercambiar de forma reversible los sustituyentes en la posición acetálica 2, en forma análoga al proceso que tiene lugar en los sistemas tiazolidinas, Figura 7.5B.

En literatura se describe en una patente la síntesis de la 2-metilbistiazolidina, a partir de cisteamina, ditiano **6a** (0.5 eq.) y el aldehído MeCHO (5 eq.), en presencia de NH₄OAc (1.5 eq.) y KOH (0.7 eq.) en MeOH a reflujo, con un 45% de rendimiento luego de 5 h de reacción, Esquema 7.3A.¹⁰ El procedimiento es en “one-pot”, y no se describe la formación de la 2-mercaptometil bistiazolidina **1e** producto de la doble ciclación con el mercaptoacetaldehído. Sin embargo, dada nuestra experiencia, la hipótesis sería que en el medio se formaría **1e**, y que luego ocurriría un intercambio entre la cadena de mercaptometilo y el aldehído MeCHO.

A) Síntesis de bistiazolidinas sustituidas reportada en bibliografía:



B) Aplicación de la metodología reportada para la síntesis de nuestros derivados: **Método a)**



Esquema 7.3: A) Síntesis de 2-metilbistiazolidina reportada por Kojo y col.; condiciones: i) cisteamina, ditiano **6a** (0.5 eq.), NH₄OAc (1.5 eq.) y KOH (0.7 eq.) en MeOH a reflujo, 1h, luego ii) MeCHO (5 eq.), reflujo, 4h.¹⁰ B) Preparación de nuevos derivados de BTZ **1a** sustituidos en posición 2 utilizando una modificación de las condiciones utilizadas en A); condiciones: i) L-cisteína, ditiano **6a** (0.6 eq.) y NH₄OAc (1.5 eq.) en MeOH a reflujo, 30 min, ii) aldehído **35** (3 eq.), reflujo, 2h (Método a).

Basados en este antecedente, se ensayaron las condiciones “one-pot” para la síntesis de los nuevos análogos **32** con distintos R, pero en ausencia de

KOH. Se utilizaron como materiales de partida L-cisteína, ditiano **6a** (0.6 eq.), aldehídos **35d-f** (3 eq.) y NH₄OAc (1.5 eq.) como catalizador en MeOH a reflujo (Método a), ver Esquema 7.3B.

Primero, para optimizar las condiciones de reacción se utilizaron aldehídos no funcionalizados como el isobutiraldehído **35d**, el propanal **35e** y el citronelal **35f**. Los resultados se muestran en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1: Síntesis de derivados **32d-f** utilizando Método a): i) L-cisteína, ditiano **6a** (0.6 eq.), NH₄OAc (1.5 eq), MeOH a reflujo, 30 min, luego ii) aldehídos RCHO **35d-f** (3 eq.), reflujo, 2 h.

Entrada	Aldehído, 35	32, R (%) ^a
1	Isobutiraldehído, 35d	32d , 58
2	Propanal, 35e	32e , 68
3	Citronelal, 35f	32f , 26

^aProductos aislados luego de purificación cromatográfica.

Los resultados mostraron que esta metodología fue útil para preparar los compuestos **32d-f** con rendimientos entre 26 y 68%, en un tiempo total de reacción de 2.5 h.

Síntesis de derivados **32** por intercambio de aldehídos a partir de BTZ L-**1a**

Si bien las reacciones “one-pot” funcionaron para los aldehídos ensayados, con el fin de mejorar los rendimientos se exploraron las reacciones de intercambio partiendo de la bistiazolidina **1a** y aldehídos conteniendo diferentes grupos funcionales.

Primero se optimizó la reacción partiendo de **1a** e isobutiraldehído **35d** (3 eq.) como aldehído de intercambio en las siguientes condiciones:

i) Método b): *p*-TsOH (5%) en CH₂Cl₂, reflujo, 2 h

ii) Método c): NH₄OAc (1.5 eq.) en MeOH a reflujo, 2 h

iii) Método d): NH_4OAc (1.5 eq.) en MeOH, calentamiento en MW (65W, 60°C), 20 min.

Los resultados se muestran en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2: Reacciones de intercambio de aldehídos utilizando como materiales de partida BTZ **1a** e isobutiraldehído **35d** (3 eq.) en las siguientes condiciones: Método a): i) L-cisteína, ditiano **6a** (0.6 eq.), NH_4OAc (1.5 eq.), MeOH a reflujo, 30 min, luego ii) **35d** (3 eq.), reflujo, 2 h; Método b): *p*-TsOH (5%) en CH_2Cl_2 , reflujo, 2h; Método c): NH_4OAc (1.5 eq.) en MeOH a reflujo, 2 h; y Método d): NH_4OAc (1.5 eq.) en MeOH con calentamiento MW (65W, 60°C), 20 min.

Entrada	Método	Condiciones	32d, R (%) ^a
1	a)	L-Cys, NH_4OAc (1.5 eq.), reflujo	58
2	b)	<i>p</i> -TsOH (5%), reflujo	0
3	c)	NH_4OAc (1.5 eq.), reflujo	65
4	d)	NH_4OAc (1.5 eq.), MW (65W, 60°C)	69

^aProductos aislados luego de purificación cromatográfica.

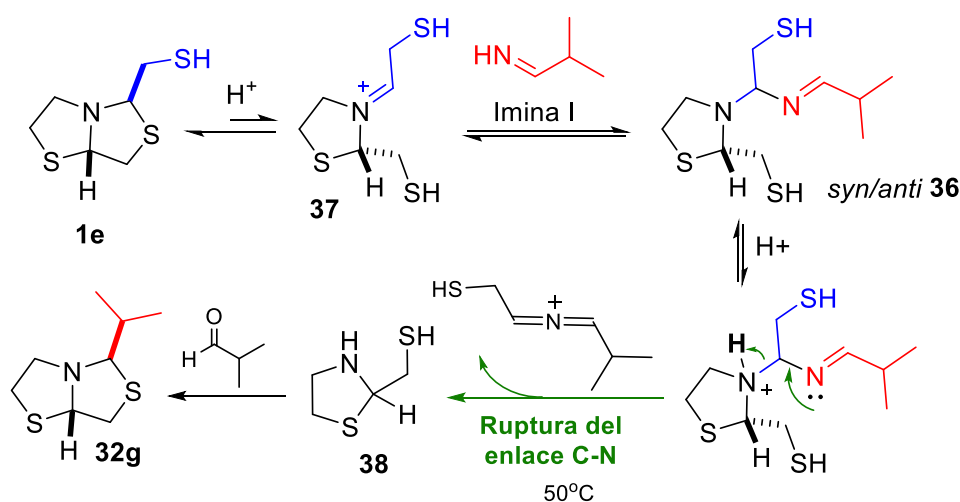
Los resultados muestran que la reacción de intercambio de aldehídos partiendo de BTZ **1a** tiene lugar cuando se utiliza NH_4OAc como catalizador en MeOH a reflujo (Método c) o calentamiento en MW (Método d), obteniendo el producto **32d** con 65 y 69% de rendimiento, respectivamente. Estos resultados son levemente mejores a los obtenidos utilizando el Método a), reacción one-pot. El análisis de los crudos de reacción por ^1H RMN muestran que utilizando el método c) y d) se observan menos productos de degradación respecto al método a). Por otro lado, la reacción de intercambio no ocurre cuando se utiliza ácido *p*-TsOH (5%) como catalizador (Método b).

Estudios mecanísticos de la reacción de intercambio

En base a los antecedentes reportados en bibliografía, se propone como hipótesis inicial que el mecanismo de intercambio de la cadena de

mercaptometilo podría ocurrir a través de un proceso de intercambio de iminas formadas *in situ*, dado el rol fundamental del NH_4OAc en la reacción. En literatura se describe que este proceso puede ocurrir mediante tres tipos principales de reacciones: hidrólisis, intercambio de amina-imina (transiminación) o intercambio de imina-imina (metátesis de imina).¹¹

Con el fin de estudiar el mecanismo de intercambio en los sistemas BTZ, se llevaron a cabo experimentos de RMN en $\text{MeOD-}d_4$ y cálculos DFT. Se utilizó como modelo de estudio la reacción de intercambio entre la BTZ **1e** y el isobutiraldehído **35d** para dar **32g**. Este trabajo fue parte de la Tesis de Doctorado de la Dra. Verónica Martínez, en colaboración con la Dra. Carolina Fontana y el Dr. Nicolás Veiga.¹² El mecanismo propuesto en base a estos experimentos se muestra en el Esquema 7.4.



Esquema 7.4: Propuesta de mecanismo de intercambio de aldehídos en sistemas bistiazolidinas, en base a una combinación de técnicas espectroscópicas de RMN y cálculos DFT.

Según el análisis de los espectros de ^1H RMN, $^1\text{H},^{13}\text{C}$ RMN y $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMBC, se propuso la formación de la tiazolidina intermediaria **36** como una mezcla diastereomérica *syn/anti*, Esquema 7.4. La formación de esta tiazolidina podría darse por una apertura de la BTZ **1e** en medio ácido, dando el iminio **37**, que al ser atacado por la imina I da lugar a la formación de la tiazolidina **36**, Esquema 7.4.

Además, se realizaron cálculos teóricos DFT para obtener información sobre el mecanismo de conversión de la tiazolidina **36** al producto de interés **32g**.

Los resultados sugirieron que la ruta más favorable involucra la formación de la tiazolidina **38** por ruptura del enlace N-C asistida por N, Esquema 7.4. Finalmente, la reacción de la tiazolidina **38** con el aldehído **35d** conduce a la BTZ **32g**.

7.3.3 Síntesis de bioisómeros de BTZ y TZ

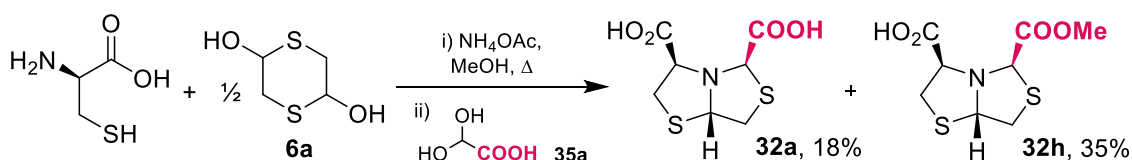
Síntesis de bioisómeros de BTZ **32**

Una vez optimizadas las condiciones para la síntesis del derivado **32d**, se exploró la utilidad de la metodología para la síntesis de los bioisómeros deseados **32a-c**. A continuación se describe la síntesis de los siguientes compuestos: i) Derivado di-carboxílico **32a**, ii) Derivado di-fluor **32b** y iii) Derivado fosfonato **32c**.

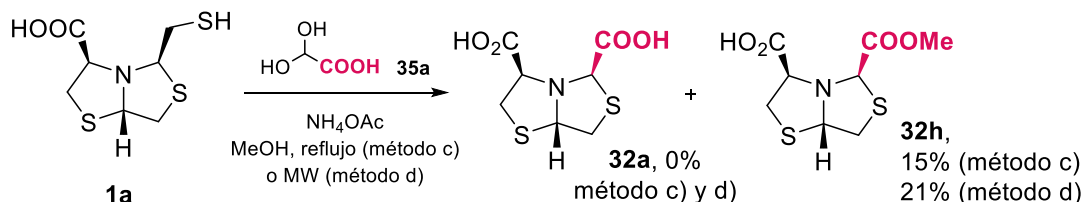
i) Síntesis del derivado di-carboxílico **32a**

Para la síntesis del derivado **32a**, en donde la cadena mercaptometilo se sustituye por un ácido carboxílico, se probaron los Métodos a), c) y d) utilizando como aldehído el ácido glioxílico **35a** en su forma hidratada comercialmente disponible, ver Esquema 7.5.

A) Síntesis de **32a** utilizando el Método a):



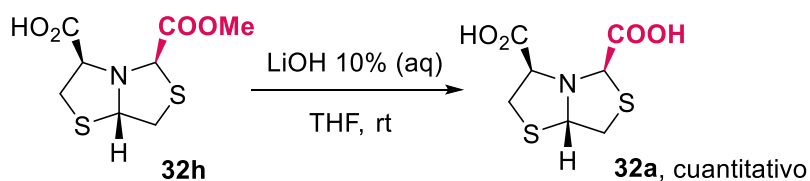
B) Síntesis de **32a** utilizando el Método c) y d):



Esquema 7.5: A) Síntesis del derivado **32a** utilizando Método a): i) L-cisteína, ditiano **6a** (0.6 eq.), NH_4OAc (1.5 eq), MeOH a reflujo, 30 min, luego ii) **35a** (3 eq), reflujo, 2 h; B) Síntesis del derivado **32a** utilizando: Método c): **1a**, **35a** (3eq.), NH_4OAc (1.5 eq) en MeOH a reflujo, 2 h y Método d): **1a**, **35a** (3eq.), NH_4OAc (1.5) en MeOH con calentamiento MW (65W, 60°C), 20 min.

Cuando se utilizó el Método a), se obtuvo una mezcla del producto deseado **32a** y el producto metil-éster **32h**, con 18 y 35% de rendimiento, respectivamente. Por otra parte, utilizando los Métodos c) y d) se obtuvo únicamente el producto esterificado **32h** con 15 y 21% de rendimiento, respectivamente, Esquema 7.5.

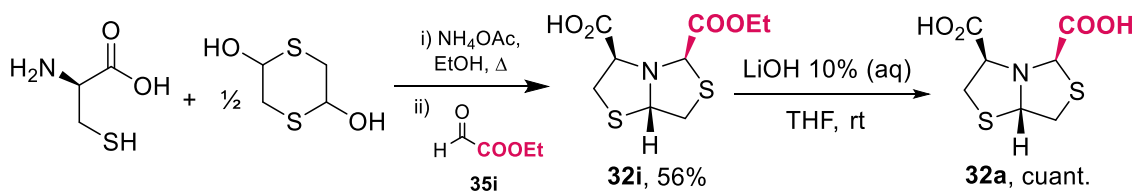
Con el fin de mejorar los rendimientos de obtención de **32a**, y dado que el producto esterificado fue el mayoritario, se llevó a cabo la hidrólisis del éster metílico **32h** utilizando LiOH acuoso al 10% en THF, Esquema 7.6.



Esquema 7.6: Síntesis del di-ácido **32a** a partir de **32h**.

Utilizando estas condiciones se obtuvo el producto deseado **32a** en forma cuantitativa.

En base a estos resultados, decidimos explorar si la síntesis del producto **32i** a partir de **1a** y glioxilato de etilo **35i** conteniendo un éster etílico, seguida por una reacción de hidrólisis podría mejorar los rendimientos de obtención de **32a**, Esquema 7.7. Para llevar a cabo esta reacción, se seleccionó el Método a) dado que llevó a mejores resultados respecto a los Métodos b) y c).



Esquema 7.7: Síntesis de **32i** utilizando Método a): i) L-cisteína, ditiano **6a** (0.6 eq.), NH_4OAc (1.5 eq), MeOH a reflujo, 30 min, luego ii) **35a** (3 eq), reflujo, 2 h; seguida por hidrólisis del ácido carboxílico para obtener **32a**.

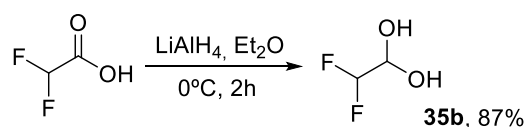
El compuesto **32i** se obtuvo en un 56% de rendimiento. Luego, la hidrólisis utilizando LiOH acuoso al 10% en THF llevó a la formación del compuesto **32a** en forma cuantitativa, Esquema 7.7.

En su conjunto, los resultados muestran que se obtuvieron resultados similares utilizando como aldehído de intercambio ácido glicólico **35a** y glicolato de etilo **35i** seguido de la reacción hidrólisis, obteniendo el compuesto **32a** con 53 y 56% de rendimientos globales, respectivamente.

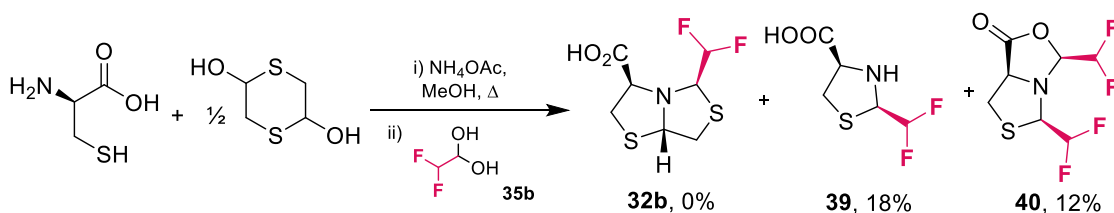
ii) Síntesis del derivado di-fluor **32b**

Para la síntesis del derivado **32b**, el difluoro acetaldehído **35b** conteniendo el grupo $-\text{CHF}_2$ de interés no se encuentra comercialmente disponible. Su preparación se realizó por reducción del ácido difluoroacético utilizando LiAlH_4 de acuerdo con el Esquema 7.8A.¹³

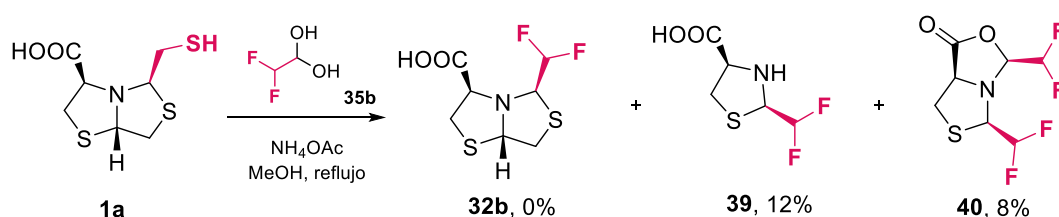
A) Síntesis del aldehído **35b**:



B) Síntesis de **32b** utilizando el Método a):



C) Síntesis de **32b** utilizando el Método c)



Esquema 7.8: A) Síntesis del difluoro acetaldehído **35b** por reducción del ácido difluoroacético utilizando LiAlH_4 ; B) Síntesis del derivado **32b** utilizando Método a): i) L-cisteína, ditiano **6a** (0.6 eq.), NH_4OAc (1.5 eq), MeOH a reflujo, 30 min, luego ii) **35b** (3 eq), reflujo, 2 h; C) Síntesis del derivado **32b** utilizando Método c): **1a**, **35b** (3eq.), NH_4OAc (1.5 eq) en MeOH a reflujo, 2 h.

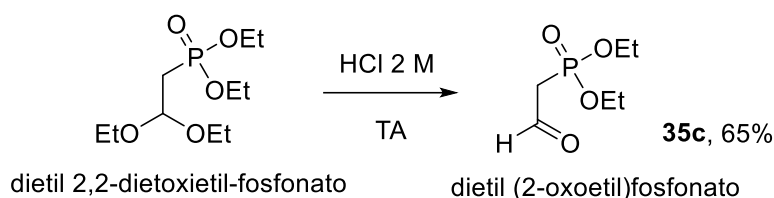
El aldehído de interés **35b** se obtuvo en un 87% de rendimiento bajo su forma de hidrato. Luego, la síntesis del derivado **32b** se llevó a cabo utilizando los Métodos a) y c), Esquema 7.8B y C, respectivamente. En ninguna de las condiciones empleadas se logró obtener el compuesto deseado **32b**. Por el

contrario, se lograron aislar la tiazolidina **39** (18 y 12% de rendimiento, respectivamente) y el compuesto **40** (12 y 8% de rendimiento, respectivamente) producto de la ciclación con el ácido carboxílico.

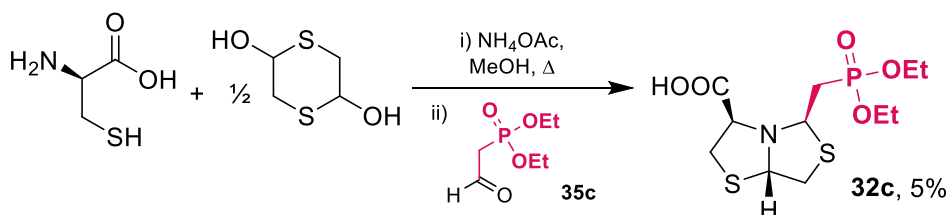
iii) Síntesis del derivado fosfonato **32c**

Para la síntesis del compuesto **32c** se comenzó con la preparación del aldehído **35c** (dietil (2-oxoetil)fosfonato), que se obtuvo por hidrólisis del correspondiente dietil acetal comercialmente disponible,¹⁴ ver Esquema 7.9A.

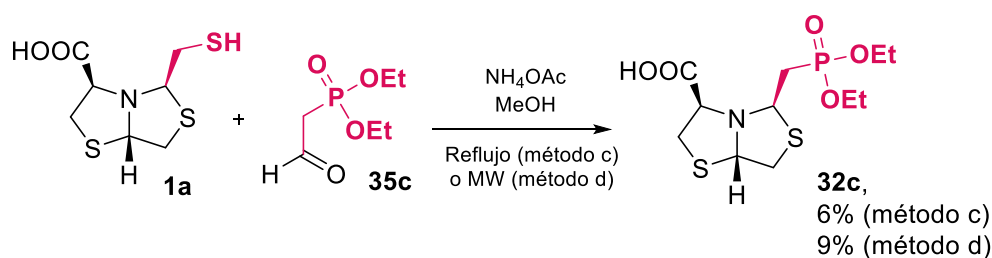
A) Síntesis del aldehído **35c**:



B) Síntesis de **32c** utilizando el Método a):



C) Síntesis de **32c** utilizando el Método c) y d):



Esquema 7.9: A) Síntesis del aldehído dietil (2-oxoetil)fosfonato **35c** por hidrólisis ácida del dietil 2,2-dietoxietil-fosfonato; B) Síntesis del derivado **32c** utilizando Método a): i) L-cisteína, ditiano **6a** (0.6 eq.), NH_4OAc (1.5 eq), MeOH a reflujo, 30 min, luego ii) **35c** (3 eq), reflujo, 2 h; C) Síntesis del derivado **32c** utilizando Método c): **1a**, **35c** (3eq.), NH_4OAc (1.5 eq) en MeOH a reflujo, 2 h; y Método d): **1a**, **35c** (3eq.), NH_4OAc (1.5) en MeOH con calentamiento MW (65W, 60°C), 20 min.

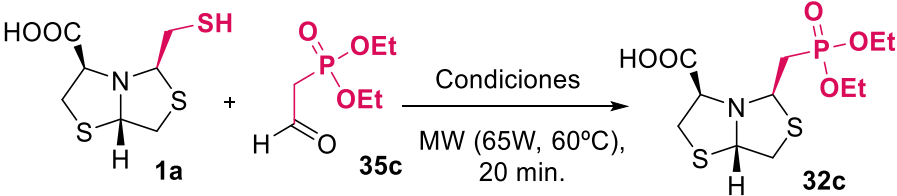
Luego, la síntesis del derivado **32c** se llevó a cabo utilizando los Métodos a), c) y d), Esquema 7.9B y C, respectivamente, obteniendo el compuesto deseado con 5, 6 y 9% de rendimiento, respectivamente. El bajo rendimiento de obtención de **32c** podría deberse a una lenta formación de la imina entre el aldehído **35c** y el NH_4OAc , probablemente debido al impedimento estérico del grupo fosfonato. Esta es una etapa clave para que ocurra la reacción según el mecanismo discutido anteriormente, ver Esquema 7.4.

Por este motivo, se decidió optimizar las condiciones de reacción de modo de favorecer la formación de esta imina para mejorar los resultados.

En bibliografía se ha descripto el uso de ácidos de Lewis como catalizadores en reacciones que involucran la formación de iminas a partir de aminas y aldehídos.¹⁵ Por este motivo, se decidió explorar el agregado de estos agentes a la reacción para aumentar la electrofilia del carbonilo del aldehído **35c** y favorecer la formación de la imina con el NH_4OAc .¹⁶

Para tales fines, se ensayó la síntesis de **32c** utilizando el Método d) y agregando al medio de reacción $\text{In}(\text{OTf})_3$ y $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ en presencia o ausencia de NH_4OAc , Tabla 7.3.

Tabla 7.3: Optimización de la síntesis de **32c** utilizando como material de partida **1a** y **35c** (3 eq.), con el agregado de $\text{In}(\text{OTf})_3$ o $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ (0.1 eq) como ácidos de Lewis, en ausencia o presencia de NH_4OAc (1.5 eq) en EtOH, calentamiento MW (65W, 60°C), 20 min.

		
Entrada	Condiciones	32c, R (%) ^a
1	NH_4OAc (1.5 eq.), EtOH	9
2	NH_4OAc (1.5 eq.), $\text{In}(\text{OTf})_3$ (0.1 eq.), EtOH	53
3	$\text{In}(\text{OTf})_3$ (0.1 eq.), EtOH	21
4	NH_4OAc (1.5 eq.), $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ (0.1 eq.), EtOH	40

^aProductos aislados luego de purificación cromatográfica.

Los resultados muestran que el agregado de ácidos de Lewis logra mejorar notablemente los rendimientos, en particular en presencia de NH_4OAc . Los mejores resultados se lograron utilizando NH_4OAc (1.5 eq.), $\text{In}(\text{OTf})_3$ (0.1 eq.) en EtOH (Método e), obteniendo **32c** en 53% de rendimiento, ver Tabla 7.3, entrada 2.

Una posible explicación de estos resultados sería la habilidad del In^{3+} de actuar como ácido de Lewis y activar el carbonilo del aldehído **35c** para el ataque del NH_3 .¹⁷

Sin embargo, la reacción también ocurre cuando se utiliza únicamente $\text{In}(\text{OTf})_3$ en ausencia de NH_4OAc , obteniendo **32c** con un 21% de rendimiento, Tabla 7.3, entrada 3. Por este motivo, la base de la catálisis podría ser una combinación de distintos mecanismos. Entre ellos, el In^{3+} podría estar implicado en mecanismos de metátesis de iminas. El estudio más detallado de este mecanismo es una de las perspectivas de trabajo futuro de esta tesis.

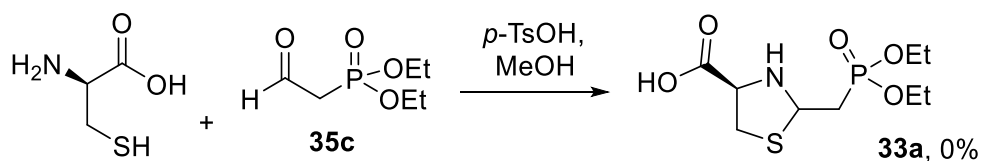
Síntesis de bioisósteros de TZ

Se diseñaron las TZ **33a-b** en donde la cadena de mercaptometilo se sustituye por un metilfosfonato, ver Figura 7.6.



Figura 7.6: Estructura de los compuestos **33a-b**.

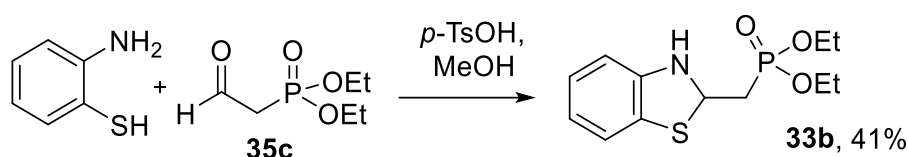
Para la preparación del bioisóster **33a** se utilizó como material de partida L-cisteína y el aldehído **35c**, utilizando *p*-TsOH como catalizador y MeOH como solvente a reflujo, Esquema 7.10.



Esquema 7.10: Ruta sintética para la obtención de **33a**.

En estas condiciones no se logró obtener el compuesto deseado **33a**. El análisis del crudo de la reacción por ^1H RMN mostró la descomposición del aldehído **35c**. Por este motivo, se decidió probar la reacción a temperatura ambiente y utilizando buffer fosfato pH 5 como solvente con el fin de controlar el pH, pero en ningún caso se logró aislar el producto deseado.

Por otro lado, se ensayó la preparación del bioisótero **33b** utilizando como material de partida 2-aminotiofenol **18a** y el aldehído **35c**, utilizando *p*-TsOH como catalizador y MeOH a temperatura ambiente, ver Esquema 7.11.



Esquema 7.11: Ruta sintética para la obtención de **33b**.

En estas condiciones, se logró obtener el compuesto deseado **33b** con un 41% de rendimiento, Esquema 7.11.

7.3.4 Evaluación biológica de los bioisósteros preparados

Determinación de la actividad inhibitoria IC_{50} frente a MBL

Los compuestos preparados **32a**, **32c**, **33b**, **39** y **40** se evaluaron contra la enzima NDM-1 perteneciente a la subclase B1 de MBL, ver estructuras en Figura 7.7.

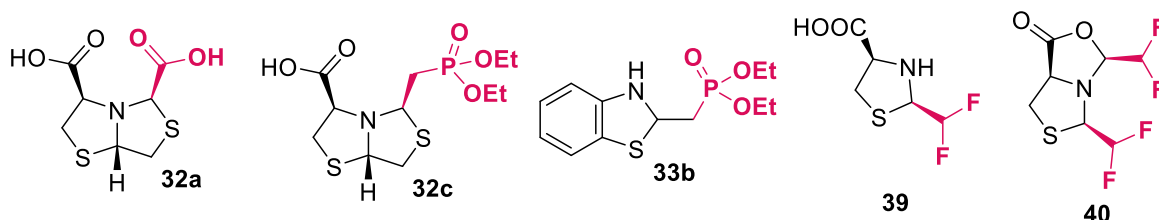


Figura 7.7: Compuestos **32a**, **32c**, **33b**, **39** y **40** evaluados contra la enzima NDM-1.

Todos los bioisósteros ensayados resultaron inactivos frente a la enzima NDM-1, ya que mostraron valores de IC_{50} mayores a 1000 μM . En base a estos resultados, no se continuó con la caracterización biológica de estos compuestos.

7.4 Conclusiones y perspectivas

Se sintetizaron 3 bioisósteros de BTZ y 2 de TZ donde el tiol fue reemplazado por otros grupos de interés capaces de coordinar con Zn^{2+} según reportes bibliográficos.

Para la preparación de los bioisósteros de BTZ, se desarrolló una metodología de intercambio de aldehídos que permitió la sustitución de la cadena de mercaptometilo por otros grupos de interés, a través de dos enfoques principales: i) reacción “one-pot” partiendo del L-cisteína, ditiano, NH_4OAc y el aldehído de interés (método a), y ii) reacción de intercambio a partir de la BTZ **1a**, NH_4OAc y el aldehído correspondiente (métodos c, d y e).

Este trabajo dio lugar a una publicación:

Martínez, V., Villamil, V., Duarte, D., Saiz, C., Davyt, D., Fontana, C., Nicolás Veiga y Mahler, G. (2020). Preparation and Mechanistic Studies of 2-Substituted Bisthiazolidines by Imine Exchange. *European Journal of Organic Chemistry*, 2020(9), 1084-1092.

La metodología desarrollada fue aplicada a la preparación de bioisósteros del grupo tiol. En general, los rendimientos de **32** fueron variables, y la metodología óptima en cada caso dependió del sustrato: para el compuesto **32a** el método a) dio mejores resultados respecto al método c) y d). Para el compuesto **32c**, utilizando los métodos a), c) y d) se obtuvo el producto en bajos rendimientos. El agregado de un ácido de Lewis como $\text{In}(\text{OTf})_3$ incrementó notablemente los resultados. No se logró obtener el compuesto **32b** con ninguna de las metodologías.

En cuanto a la actividad biológica de los compuestos, ninguno de los derivados con reemplazos bioisostéricos logró la inhibición de la enzima NDM-1, de relevancia clínica.

Como perspectivas de trabajo se propone:

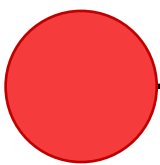
- i) Estudiar el mecanismo de la reacción de intercambio de aldehídos en presencia de Ácidos de Lewis como $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ e $\text{In}(\text{OTf})_3$.

- ii) Explorar la sustitución bioisostérica del tiol por otros grupos capaces de coordinar con Zn^{2+} y que mantengan la actividad frente a MBL. Entre otros, se propone la incorporación de tetrazoles o imidazoles.

7.5 Bibliografía

- (1) Haugaard, N. Reflections on the Role of the Thiol Group in Biology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, 899, 148–158. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06183.x>.
- (2) Giles, N. M.; Giles, G. I.; Jacob, C. Multiple Roles of Cysteine in Biocatalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 300 (1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02770-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02770-5).
- (3) Forman, H. J.; Zhang, H.; Rinna, A. Glutathione: Overview of Its Protective Roles, Measurement, and Biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* **2009**, 30, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.
- (4) Feng, L.; Yang, K. W.; Zhou, L. S.; Xiao, J. M.; Yang, X.; Zhai, L.; Zhang, Y. L.; Crowder, M. W. N-Heterocyclic Dicarboxylic Acids: Broad-Spectrum Inhibitors of Metallo- β -Lactamases with Co-Antibacterial Effect against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (16), 5185–5189. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.06.074>.
- (5) Ganta, S. R.; Perumal, S.; Pagadala, S. R. R.; Samuelsen, Ø.; Spencer, J.; Pratt, R. F.; Buynak, J. D. Approaches to the Simultaneous Inactivation of Metallo- and Serine- β -Lactamases. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, 19 (6), 1618–1622. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.018>.
- (6) Skagseth, S.; Akhter, S.; Paulsen, M. H.; Muhammad, Z.; Lauksund, S.; Samuelsen, Ø.; Leiros, H. K. S.; Bayer, A. Metallo- β -Lactamase Inhibitors by Bioisosteric Replacement: Preparation, Activity and Binding. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 135, 159–173. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.035>.
- (7) Yang, K. W.; Feng, L.; Yang, S. K.; Aitha, M.; Lacuran, A. E.; Oelschlaeger, P.; Crowder, M. W. New β -Phospholactam as a Carbapenem Transition State Analog: Synthesis of a Broad-Spectrum Inhibitor of Metallo- β -Lactamases. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (21), 5855–5859. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.098>.
- (8) Meanwell, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of

- Bioisosteres in Drug Design. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (8), 2529–2591. <https://doi.org/10.1021/jm1013693>.
- (9) 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. <https://doi.org/10.1021/ol901104a>.
 - (10) Okumura, J.; Baba, Y.; Yanai, T.; Kojo, K. 2-Alkylperhydrothiazolo[4.3-b]thiazoles. **1986**, JP 60149592.
 - (11) Ciaccia, M., Di Stefano, S. Mechanisms of imine exchange reactions in organic solvents. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13 (3), 646-654. <https://doi.org/10.1039/C4OB02110J>.
 - (12) Tesis Doctoral de la Msc. Verónica Martínez: "Diseño y Síntesis de Inhibidores Enzimáticos", **2021**, Facultad de Química, UdelAR.
 - (13) Surya Prakash, G. K.; Zhang, Z. 2, 2, 2-Trifluoroacetaldehyde Hydrate. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. **2001**, 1-6.
 - (14) Pallitsch, K.; Happl, B.; Stieger, C. Determination of the Absolute Configuration of (–)-Hydroxynitrilaphos and Related Biosynthetic Questions. *Chem.* **2017**, 23 (62), 15655–15665. <https://doi.org/10.1002/chem.201702904>.
 - (15) Tobisu, M.; Yamaguchi, S.; Chatani, N. Lewis Acid-Promoted Imine Synthesis by the Insertion of Isocyanides into C-H Bonds of Electron-Rich Aromatic Compounds. *Org. Lett.* **2007**, 9 (17), 3351–3353. <https://doi.org/10.1021/ol071314v>.
 - (16) Song, Z. C.; Ma, G. Y.; Zhu, H. L. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activities of N-Tert-Butoxycarbonyl-Thiazolidine Carboxylic Acid. *RSC Adv.* **2015**, 5 (32), 24824–24833. <https://doi.org/10.1039/c4ra15284k>.
 - (17) Ghosh, R.; Maiti, S. Advances in Indium Triflate Catalyzed Organic Syntheses. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2007**, 264 (1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2006.08.086>.



CAPÍTULO 8

Diseño y síntesis de nuevos
análogos de bistiazolidinas
conteniendo ácidos borónicos como
potenciales inhibidores de SBL y
MBL

8.1 Introducción

8.1.1 Aplicaciones del Boro en el campo de la Química Farmacéutica

Los compuestos que contienen boro en su estructura han sido extensamente explorados para su aplicación con fines sintéticos, biológicos, farmacéuticos y médicos desde finales de la década de 1990.¹ Generalmente, en moléculas orgánicas el boro se encuentra formando ácidos o ésteres borónicos, Figura 8.1.

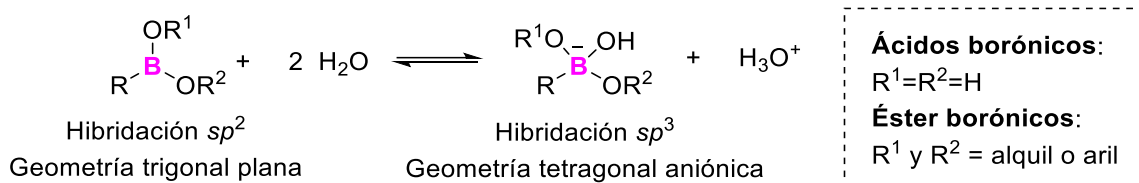


Figura 8.1: Hibridación sp^2 y sp^3 del boro en ácidos y ésteres borónicos.

La utilidad de los ácidos borónicos como compuestos farmacéuticos está estrechamente relacionada a sus peculiares propiedades electrónicas y fisicoquímicas. El boro posee un orbital p vacante que le permite formar un enlace extra y pasar de una hibridación sp^2 con geometría trigonal plana a una hibridación sp^3 con geometría tetragonal aniónica con una barrera energética baja, Figura 8.1.²

Esta característica le permite a los ácidos o ésteres borónicos interactuar reversiblemente con nucleófilos como alcoholes o aminas presentes en el sitio activo de algunas enzimas, Figura 8.2. Además, pueden formar enlaces de hidrógeno con los enlaces amida de las proteínas. De esta manera, los ácidos o ésteres borónicos son capaces de formar complejos enzima:sustrato covalentes o no covalentes, en donde el boro puede presentar geometría tetraédrica o trigonal, ver Figura 8.2.

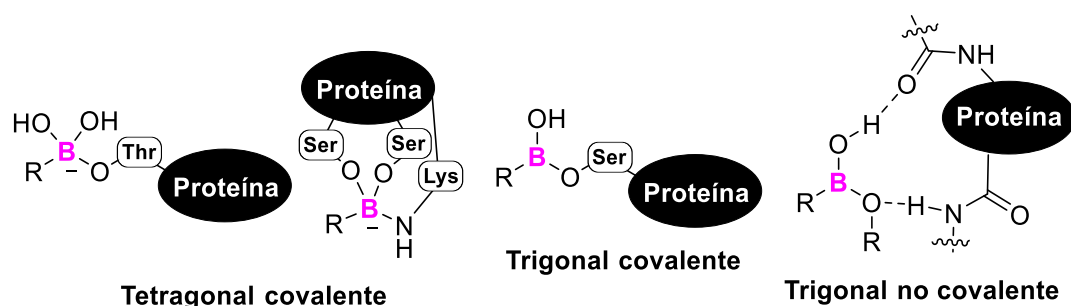


Figura 8.2: Estructura de los cuatro posibles aductos enzima:sustrato de compuestos conteniendo un ácido o un éster borónico: pueden interaccionar covalentemente con residuos oxigenados como serina (Ser) o treonina (Thr), o nitrogenados como lisina (Lys), o formar enlaces de hidrógeno con los enlaces amida de la proteína.

Por ese motivo, muchos derivados de ácidos borónicos han mostrado potente actividad inhibitoria frente a enzimas cuyo mecanismo catalítico incluye un ataque nucleofílico.³ En particular, muchos se han reportado como análogos de estado de transición de enzimas que tienen como sustrato amidas, lactamas o ésteres. Esto se debe a que en su forma hibridada sp^3 pueden adoptar una geometría similar a los intermedios tetraédricos de alta energía propuestos en los mecanismos catalíticos de enzimas tales como hidrolasas, proteasas, entre otras, Figura 8.2.

El primer fármaco aprobado por la FDA que contiene un ácido borónico como grupo funcional farmacológicamente activo fue el bortezomib, en el año 2003. Junto con el ixazomib,⁴ son fármacos inhibidores reversibles del proteasoma que han mostrado una actividad sustancial frente a múltiples tumores, principalmente en mielomas múltiples, Figura 8.3.^{5,6,7} Según estudios cristalográficos realizados por Martinis y col., el ácido borónico del bortezomib interacciona con un residuo de treonina nucleofílica del proteasoma para dar un complejo tetraédrico covalente.⁸

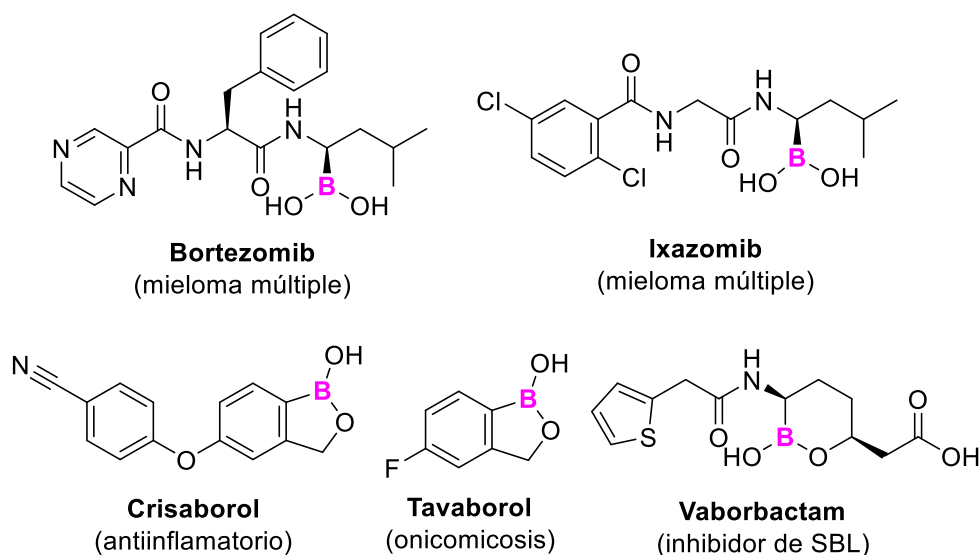


Figura 8.3: Estructura de los fármacos conteniendo ácidos o ésteres borónicos aprobados por la FDA para su uso en clínica.

El tavaborol es un agente antifúngico, aprobado en 2014 por la FDA para el tratamiento de la onicomicosis, Figura 8.3. Este fármaco actúa inhibiendo la leucil-tRNA sintetasa fúngica.⁹

En 2016 la FDA aprobó el crisaborol, un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) y del factor de liberación de citocinas, ambos implicados en la respuesta inflamatoria, Figura 8.3.¹⁰

A fines del año 2017 fue aprobado para su uso clínico el vaborbactam, un inhibidor de SBL clase A y C. Se utiliza en combinación con meropenem para el tratamiento de infecciones urinarias causadas por *K. pneumonia* que expresan carbapenemasas, Figura 8.3.¹¹ Además, se encuentra en ensayos clínicos de fase 3 para el tratamiento de la neumonía.¹²

Actualmente, varios compuestos conteniendo boro en su estructura se encuentran bajo investigación en ensayos clínicos y preclínicos para su aplicación en el tratamiento del cáncer,^{13,14,15,16} HIV¹⁷ e infecciones bacterianas.^{18,19}

8.1.2 Inhibición conjunta de SBL y MBL mediada por ácidos o ésteres borónicos

Las nuevas estrategias para abordar el fenómeno de resistencia bacteriana mediado por β -lactamasas apuntan a la inhibición conjunta de SBL y MBL. Esto se debe a que cada vez es más frecuente el aislamiento en clínica de cepas que han adquirido la capacidad de expresar ambas clases de enzimas, lo que confiere resistencia a una amplia variedad de ABL.²⁰ Adicionalmente, se identificaron varias SBL como KPC-2, NMC-A, SME-1 e IMI-1, que, al igual que las MBL, son capaces de hidrolizar a los ABL de último recurso como los carbapenemos.^{21,22}

Un enfoque exitoso que se ha estado explorando en los últimos años es el diseño de inhibidores conteniendo en su estructura ácidos o ésteres borónicos como inhibidores simultáneos de SBL y MBL.

Estos compuestos son capaces de formar un complejo enzima-inhibidor con las SBL y MBL, donde el boro pasa de una hibridación sp^2 a una hibridación sp^3 que mimetiza el intermediario tetraédrico aniónico de alta energía formado durante el proceso catalítico de estas enzimas, Figura 8.4.

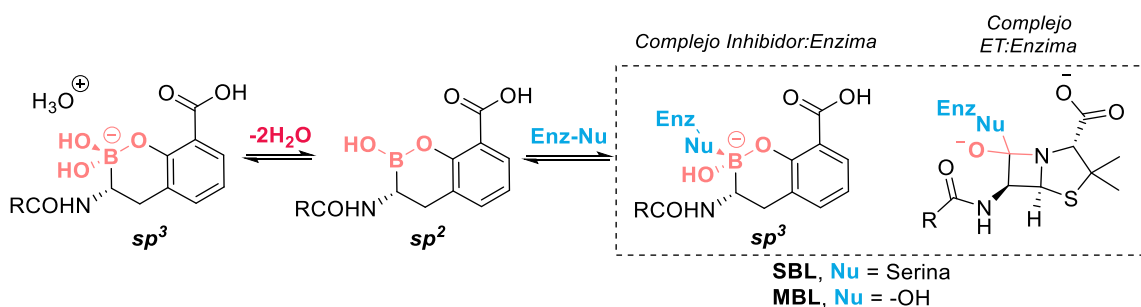


Figura 8.4: Similitud entre el complejo inhibidor:enzima para compuestos conteniendo un ácido o éster borónico y enzima:ET (estado de transición) durante el proceso catalítico de SBL y MBL.

El taniborbactam, ver Figura 8.5, es un ejemplo de boronato bicíclico activo contra la mayoría de las subclases de MBL y SBL. Es un buen inhibidor de las MBL pertenecientes a la subclase B1: NDM-1 ($IC_{50} = 0.19 \mu M$), VIM-2 ($IC_{50} = 0.026 \mu M$) e IMP-1 ($IC_{50} = 2.51 \mu M$); y un inhibidor moderado de las MBL pertenecientes a la subclase B2: CphA ($IC_{50} = 2.51 \mu M$). Por otro lado, resultó inactivo frente a L1, enzima perteneciente a la subclase B3, que ha mostrado

relevancia clínica en los últimos años.²³ Este compuesto mostró buena actividad frente a SBL de clase A: KPC-2 ($IC_{50} = 0.03 \mu M$); clase C: AmpC ($IC_{50} = 0.032 \mu M$); y clase D: OXA-48 ($IC_{50} = 0.42 \mu M$).

En combinación con cefepima, el taniborbactam ha resultado eficaz en la cura de ratones infectados con *K. pneumoniae* CTX-M-14 y *E. coli* CTX-M-15.^{24,25} La presencia de una amina primaria en su estructura incrementa dramáticamente la permeabilidad a través de la pared bacteriana en Gram(-). Actualmente el taniborbactam se encuentra en ensayos clínicos de fase 3 para el tratamiento de infecciones del tracto urinario.

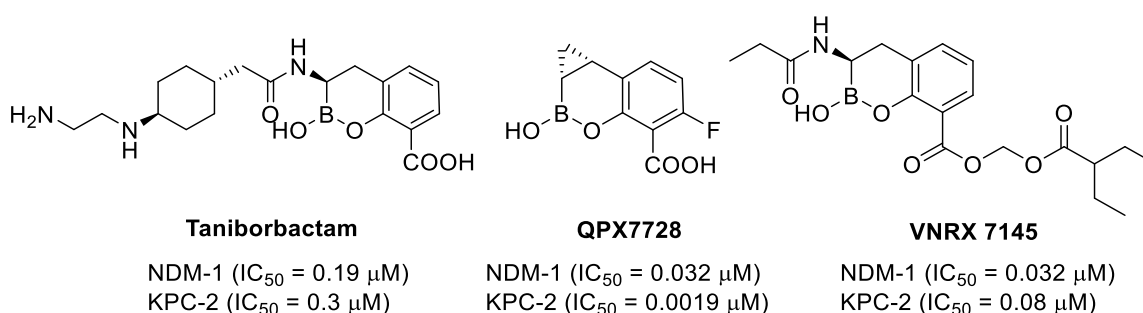


Figura 8.5: Inhibidores de SBL y MBL descritos en literatura en ensayos clínicos: Taniborbactam, QPX7728 y VNRX 7145.

Otro ejemplo es el boronato bicíclico QPX7728, capaz de inhibir MBL pertenecientes a la subclase B1: NDM-1 ($IC_{50} = 0.032 \mu M$), VIM-2 ($IC_{50} = 0.008 \mu M$) e IMP-1 ($IC_{50} = 0.22 \mu M$), Figura 8.5. Sin embargo, resultó inactivo en MBL pertenecientes a las subclases B2 y B3. Además, mostró buena actividad frente a SBL de clase A: KPC-2 ($IC_{50} = 0.0019 \mu M$); clase C: AmpC ($IC_{50} = 0.0085 \mu M$); y clase D: OXA-48 ($IC_{50} = 0.00028 \mu M$).

La adición de un grupo ciclopropilo parece mejorar las interacciones hidrófobas en el sitio activo de las enzimas.²⁶ Las combinaciones de QPX7728 con cefepima, ceftolozano o meropenem demostraron ser efectivas contra *Enterobacteriaceae*, contra cepas que expresan carbapenemasas KPC y OXA-48 y contra *P. aeruginosa*. Este compuesto se encuentra en ensayos clínicos de fase I para el tratamiento de varios tipos de infecciones bacterianas.²⁷

El último compuesto en ingresar a ensayos clínicos es VNRX 7145, Figura 8.5. Este compuesto es un profármaco donde el grupo ácido carboxílico está

protegido con una cadena de 2-((etilbutanil)oxi)metilo, que mostró mejor penetración a través de la pared celular bacteriana y una excelente biodisponibilidad oral en ratas, perros y monos. El fármaco original mostró moderada actividad frente a algunas MBL pertenecientes a la subclase B1: VIM-2 ($IC_{50} = 9.04 \mu M$). Sin embargo, resultó inactivo frente a otras enzimas clínicamente relevantes de esta subclase (NDM-1 e IMP-1) y frente a MBL pertenecientes a las subclases B2 y B3. Por otro lado, este compuesto mostró buena actividad frente a SBL de clase A: KPC-2 ($IC_{50} = 0.08 \mu M$); clase C: AmpC ($IC_{50} = 0.01 \mu M$); y clase D: OXA-48 ($IC_{50} = 0.32 \mu M$).

Estos compuestos tienen como desventaja que no son activos frente a algunas MBL de relevancia clínica. Por lo tanto, se justifica la búsqueda de nuevos inhibidores conteniendo ácidos o ésteres borónicos de amplio espectro capaces de inhibir todas las subclases de MBL.

8.1.3 Estrategias sintéticas para la preparación de ácidos y ésteres borónicos

Los agentes que contienen boro han sido inicialmente reconocidos y desarrollados como reactivos muy versátiles en el campo de la química sintética. Gracias a su orbital *p* vacante, el boro puede interactuar fácilmente con nucleófilos experimentando transformaciones útiles en bloques de construcción que contienen boro a productos con valor sintético.

Se han desarrollado una amplia variedad de métodos sintéticos para formar enlaces C-B e introducir un ácido o éster borónico en una determinada molécula. Dado que los ácidos borónicos son muy hidrofílicos y difíciles de manipular, a menudo se prefiere trabajar con los correspondientes ésteres borónicos u otros derivados como diazaborininas o trifluoroboratos durante las diferentes etapas y desproteger al final de la síntesis. Los grupos protectores más utilizados son el pinacol (pin), pinandiol (pindiol), N-metiliminodiacetilo (MIDA), diaminonaftalenilo (DAN) o trifluoroboratos (BF_3), Figura 8.6.

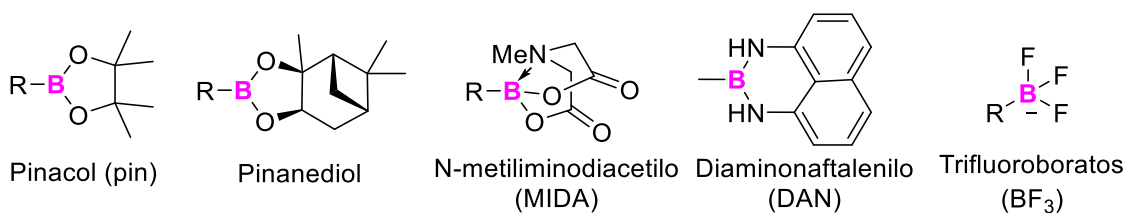


Figura 8.6: Grupos protectores del boro comúnmente utilizados en síntesis orgánica.

El uso de (+)-pinanediol para esterificar el grupo ácido borónico aumenta fuertemente la estabilidad del éster a la hidrólisis, lo que permite el uso de TLC como método de seguimiento de las reacciones y cromatografía en columna en SiO_2 para purificar los compuestos.²⁸

Otro grupo protector muy utilizado es el MIDA, que le confiere al boro una gran estabilidad en la mayoría de las condiciones de reacción. La particular estabilidad del B(MIDA) se debe a que el grupo MIDA logra estabilizar al boro a través del par de electrones no enlazante del nitrógeno que forma un enlace de coordinación con el orbital p vacío del boro.²⁹

En la Figura 8.7 se muestran como ejemplo algunas estrategias sintéticas para la formación del enlace C-B.

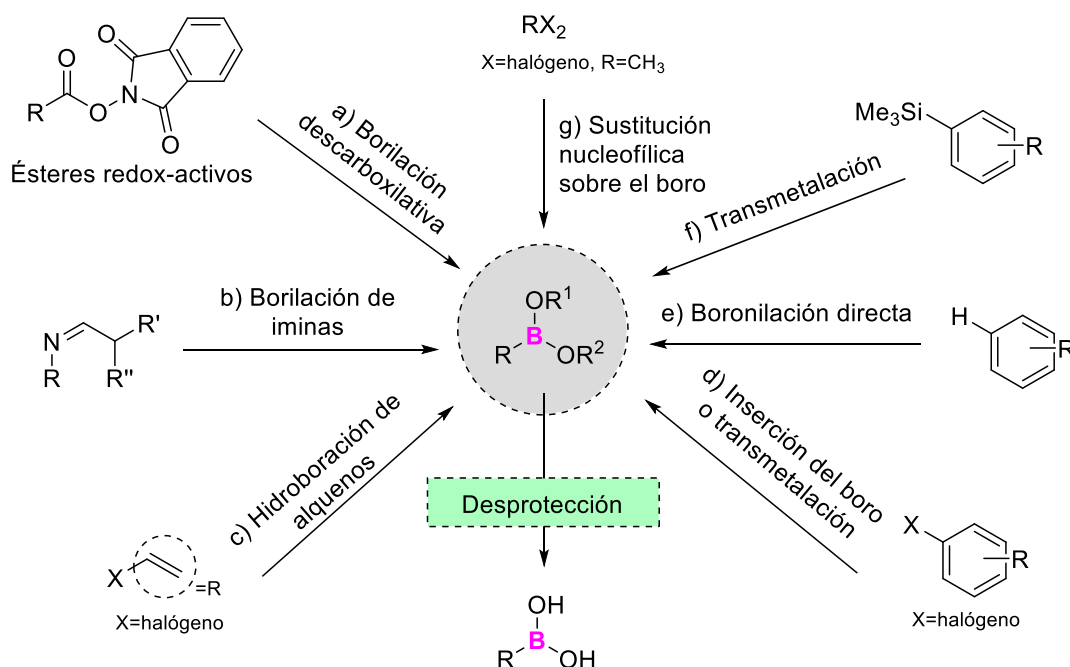


Figura 8.7: Ejemplos de estrategias sintéticas para la preparación de organoboranos: a) Borilación descarboxilativa; b) Borilación de iminas; c) Hidroboración de alquenos; d) Inserción de boro, e) Boronilación directa, f) Transmetalación y g) Sustitución nucleofílica sobre el boro.

La mayoría de las rutas sintéticas descriptas utilizan como fuente de boro el bis(pinacolato)-diboro (B_2pin_2) o el trimetilborato $B(OMe)_3$. A continuación, se describen brevemente las diferentes estrategias:

a) Borilación descarboxilativa: En esta reacción se obtiene un éster borónico de pinacol a partir de un ácido carboxílico, utilizando como intermediario un éster de N-hidroxiftalimida (NHPI) redox-activo, en un proceso que involucra una descarboxilación y posterior borilación. Los ésteres de NHPI permiten generar radicales alquilo a través de un proceso llamado “reducción de un solo electrón”, fundamental para que la reacción tenga lugar. Se utiliza un complejo de Ni con diferentes ligandos bipyridínicos como catalizador.^{30,30} Para que la reacción tenga lugar es necesario mezclar previamente el MeLi con el reactivo de borilación B_2pin_2 para generar el complejo $[B_2pin_2Me]Li$ que permita una transmetalación más eficiente. Además, se adiciona un ácido de Lewis como $MgBr_2 \cdot OEt_2$ ya que se cree que promueve el proceso de transmetalación. El mismo grupo informa que el uso de sales de cobre como $Cu(acac)_2$ lleva a mejores rendimientos en menor tiempo.³¹

b) Borilación de iminas: Esta reacción utiliza B_2pin_2 como fuente de boro y una sal de Cu(II) como catalizador.³²

c) Hidroboración de alquenos: A partir de haluros de vinilo se prepara el correspondiente haluro de alquilmagnesio ($CH_2=CHMgX$) a través de una reacción de Grignard, que al reaccionar con un borato como $B(OMe)_3$ forma el correspondiente éster borónico.³³

d) Inserción del boro o transmetalación: Estas reacciones a partir de haluros de arilo han sido las más exploradas y ampliamente utilizadas para la preparación de ácidos arilborónicos, que luego pueden ser utilizados para reacciones del tipo cross-coupling.³⁴ A partir de haluros de arilo se prepara un compuesto organometálico ($ArMgX$ o $ArLiX$ con Mg o Li, respectivamente) a través de una reacción de Grignard, que luego puede reaccionar con un borato como $B(OMe)_3$ para dar el correspondiente éster borónico.³³ Otra alternativa son las llamadas reacciones de acoplamiento cruzado de ésteres de diboronilo, como el B_2pin_2 ,

con haluros o triflatos de arilo catalizado por Pd(0). Las condiciones para la reacción de acoplamiento implican PdCl₂ como catalizador y KOAc como base.³⁵

e) Boronilación directa de arenos: Esta reacción es promovida por metales de transición como Ir o Rh y usa B₂pin₂ como fuente de boro.³⁶

f) Transmetalación: Los compuestos del tipo aril trimetilsilanos o trimetilestaños pueden sufrir una transmetalación directa con haluros de boro como el BBr₃. El producto se puede tratar con MeOH para formar el correspondiente éster borónico.³⁷

g) Sustitución nucleofílica sobre el boro: Los ésteres metilborónicos, por ejemplo, se pueden preparar por ataque nucleofílico del organometálico LiCH₂Cl al B(OMe)₃ para formar el éster borónico deseado.³⁸

Existen descritas una amplia variedad de estrategias de desprotección de ésteres borónicos para obtener los ácidos borónicos deseados. Algunos de ellos utilizan hidrólisis ácida como por ejemplo H₂SO₄ ac. en THF.³⁹ Otros métodos involucran la hidrólisis en medio básico del éster borónico, por ejemplo, NaOH 1 M en THF,⁴⁰ NaHCO₃ en MeOH³⁴ o K₂CO₃ ac. al 10%.⁴¹ Otros métodos se basan en la ruptura oxidativa con periodato de sodio (NaIO₄)⁴² o a través de la conversión al trifluoroborato intermedio y posterior tratamiento con TMS-Cl/H₂O.⁴³ Un método muy utilizado es la desprotección por transesterificación con ácidos borónicos, que se lleva a cabo en condiciones suaves de reacción y se obtiene el producto desprotegido en buenos rendimientos.^{44,28}

8.2 Objetivo específico

8.2.1 Diseñar y sintetizar una serie de derivados de BTZ y TZ conteniendo ácidos o ésteres borónicos como potenciales inhibidores tanto de MBL como de SBL

Para alcanzar este objetivo específico se pretende diseñar los nuevos análogos, en donde se explora el reemplazo del tiol y del ácido carboxílico de las BTZ y TZ por un ácido o éster borónico.

Luego, se propone desarrollar una metodología sintética que nos permita preparar los nuevos derivados y realizar su caracterización estructural espectroscópica.

Por último, se plantea realizar la evaluación biológica de los análogos preparados frente a SBL y MBL pertenecientes a las tres subclases y su evaluación contra bacterias resistentes.

8.3 Resultados

En el presente capítulo se muestran los resultados más relevantes en cuanto al diseño y síntesis de análogos de BTZ y TZ conteniendo ácidos o ésteres borónicos.

Las principales actividades realizadas en este marco se relacionan con los objetivos específicos y se desarrollan a continuación.

8.3.1 Diseño de nuevos análogos de BTZ y TZ conteniendo boro

Dado que las BTZ y TZ resultaron buenos inhibidores de todas las subclases de MBL, se decidió explorar la incorporación de ácidos o ésteres borónicos en estos compuestos. Tanto las BTZ como las TZ contienen un grupo ácido carboxílico y un tiol que pueden derivatizarse, según Figura 8.8.

Incorporación de ácidos o ésteres borónicos

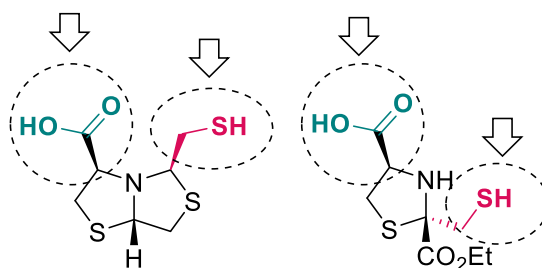


Figura 8.8: Las flechas indican los lugares de posibles sustituciones para la incorporación de ácidos o ésteres borónicos en BTZ y TZ.

Se propone conservar la estructura de BTZ y TZ y reemplazar el tiol y/o el ácido carboxílico por un ácido o éster borónico con el fin de incrementar la actividad de los compuestos originales y ampliar el espectro de acción, a través de:

- i) Síntesis de amidas entre el ácido carboxílico y aminas conteniendo en su estructura ácidos borónicos.
- ii) Sustitución de la cadena de mercaptometilo por una cadena de ácido metilborónico.
- iii) Transformación del grupo ácido carboxílico en un ácido borónico.

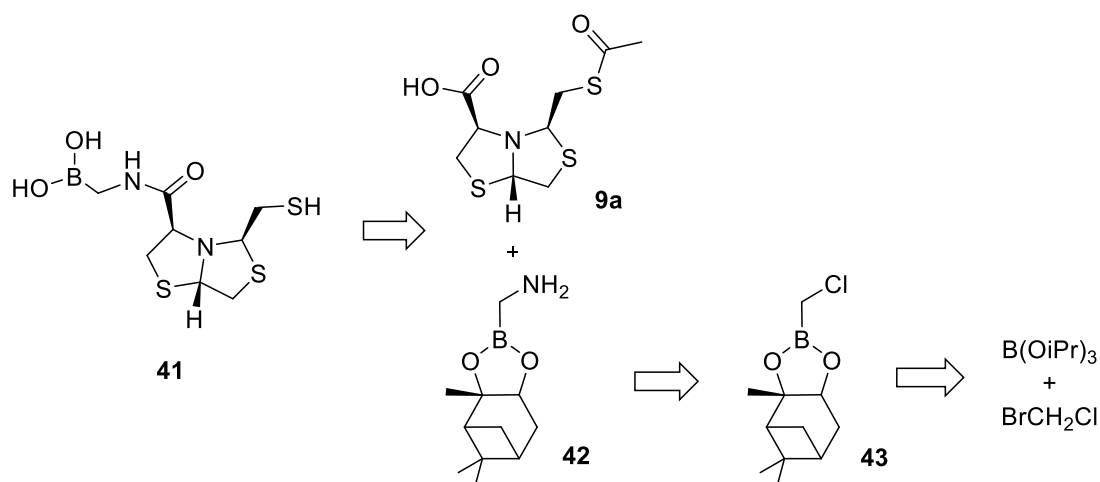
8.3.2 Síntesis de los nuevos análogos

El trabajo con compuestos conteniendo boro representa un gran desafío para los químicos orgánicos, debido a su alta reactividad. Para adquirir experiencia en el trabajo con estructuras conteniendo boro, se realizó una pasantía de investigación en el Laboratorio de Chimica Medicinale, Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli studi di Modena e Reggio Emilia, bajo la supervisión del Prof. Fabio Prati, donde se sintetizaron algunos de los compuestos conteniendo boro. El grupo del Prof. Prati tiene una amplia experiencia en la síntesis de compuestos conteniendo ácidos y ésteres borónicos, capaces de inhibir SBL.^{38,28}

Síntesis de derivados de BTZ conteniendo boro

- i) Síntesis de amidas de BTZ

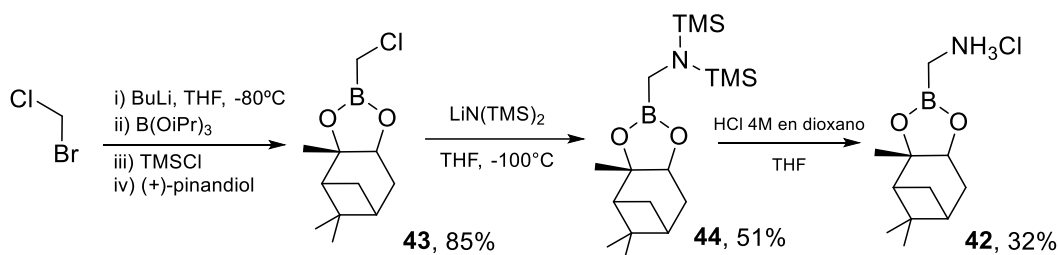
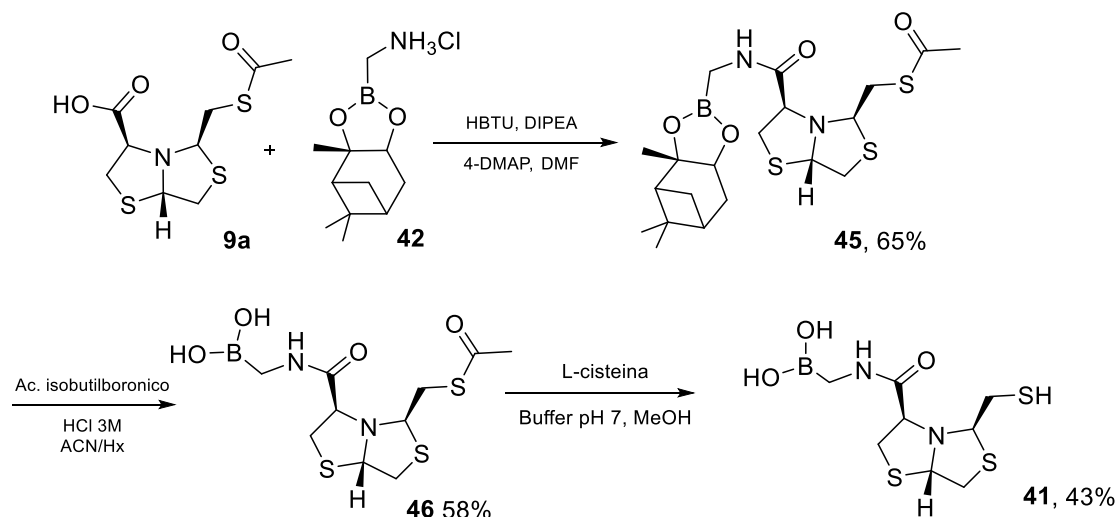
A partir del ácido carboxílico de la BTZ **1a** se puede formar fácilmente un enlace amida con una amina conteniendo el grupo borónico de interés. Para este fin, se diseñó el compuesto **41**, cuyo análisis retrosintético se muestra en el Esquema 8.1.



Esquema 8.1: Análisis retrosintético del compuesto **41**.

El compuesto **41** se puede obtener a partir de la BTZ **9a**, donde el tiol está protegido como S-acetilo, por formación de una amida con el aminometilboronato **42**, donde el ácido borónico está protegido como éster de pinandiol. El compuesto **42** puede prepararse a partir del clorometilboronato **43** correspondiente, que a su vez se prepara a partir de BrCH_2Cl y B(OiPr)_3 en una reacción de sustitución nucleofílica del organometálico formado *in situ* sobre el átomo de boro, seguida de una transesterificación con pinandiol.^{38,45}

La ruta sintética para la preparación del compuesto **41** se muestra en el Esquema 8.2.

A) Síntesis del éster aminometilboronato **42**B) Síntesis del compuesto **41**:Esquema 8.2: A) Síntesis del éster aminometilboronato **42**; Síntesis del compuesto **41**.

En primer lugar, se preparó el clorometilboronato **43** según se describe en bibliografía, a partir de BrCH_2Cl y $\text{B}(\text{O}i\text{Pr})_3$ utilizando BuLi como base, que forma el organometálico LiCH_2Cl capaz de atacar el boro y formar el éster borónico deseado.³⁸ El éster de isopropilo se transforma en éster de pinandiol por transesterificación con (+)-pinandiol para aumentar la estabilidad del compuesto, Esquema 8.2A.

Luego, a partir de **43** se preparó la amina protegida **44** a través de una reacción de sustitución con bis(trimetilsilil)amida de litio ($\text{LiN}(\text{TMS})_2$),⁴⁶ que luego se desprotegió en medio ácido con HCl 4M en dioxano para dar el clorhidrato de **42** con un 32% de rendimiento, Esquema 8.2A.

Luego, a partir de la BTZ S-acetilada **9a**, preparada según se detalló en el Capítulo 3, se formó la amida con la amina **42** utilizando HBTU como agente acoplante, DIPEA como base y DMF como solvente, y se obtuvo el compuesto di protegido **45** con un 65% de rendimiento, Esquema 8.2B.

El éster borónico de pinandiol se desprotegió por transesterificación con ácido isobutilborónico para dar lugar al compuesto **46**, donde el ácido borónico está desprotegido y el tior se encuentra como S-acetilo. La desprotección del tior se llevó a cabo mediante una reacción de transesterificación con L-cisteína a pH 7, según se desarrolló en el Capítulo 4, y se obtuvo el producto tior **41** con un 43% de rendimiento, Esquema 8.2B.

ii) Sustitución de la cadena de mercaptometilo por un ácido borónico.

Con el fin de sustituir la cadena de mercaptometilo, se diseñaron los compuestos **47a-b** y **32j**, ver Figura 8.9.

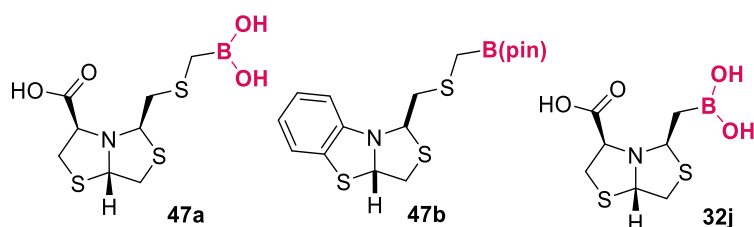
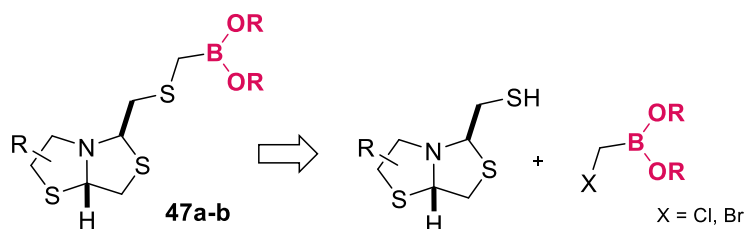


Figura 8.9: Estructura de los compuestos **47a-b** y **32j** conteniendo en su estructura ácidos o ésteres borónicos.

Síntesis del compuesto **47a**

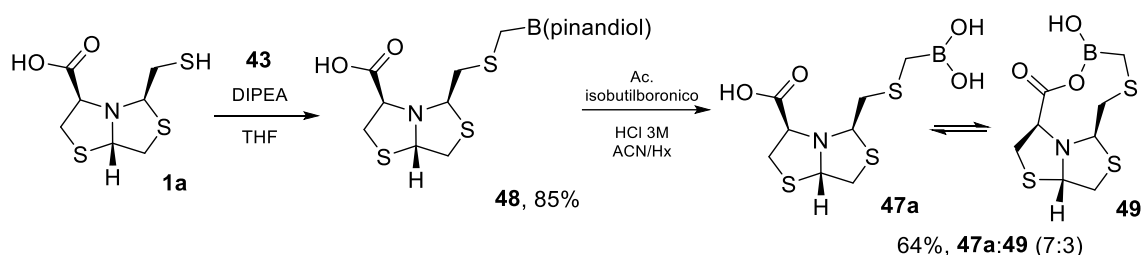
Los compuestos **47a-b** se pueden preparar a partir de la BTZ **1a** y de la BNTZ **17a**, respectivamente, y el halometil boronato correspondiente, según el análisis retrosintético mostrado en el Esquema 8.3.



Esquema 8.3: Análisis retrosintético de los compuestos **47a-b**.

El compuesto **47a** se preparó siguiendo la ruta sintética que se muestra en el Esquema 8.4. En primer lugar, se hizo reaccionar la BTZ **1a** con el

clorometilboronato **43**, preparado acorde a lo descrito anteriormente, utilizando DIPEA como base y THF como solvente.



Esquema 8.4: Síntesis del ácido borónico **47a**.

El compuesto **48** se obtuvo en un 85% de rendimiento, en donde el ácido borónico se encuentra protegido como un éster de pinandioli.

Luego, la desprotección del éster borónico se llevó a cabo por transesterificación con ácido isobutilborónico. El análisis del producto obtenido por RMN mostró que se obtuvo una mezcla del compuesto deseado **47a** en su forma abierta y la forma cíclica **49**, en una relación **47a:49** (7:3), con un 64% de rendimiento global, ver Esquema 8.4.

Con el fin de determinar si dicha mezcla está en equilibrio, se decidió estudiar la proporción de ambas especies a lo largo del tiempo. Para tales fines, se adquirieron los espectros de ^1H RMN a diferentes tiempos de incubación ($t = 0, 16$ y 48 h) utilizando $\text{DMSO-}d_6$ como solvente y se monitoreó la relación **47a:49**, ver Figura 8.10.

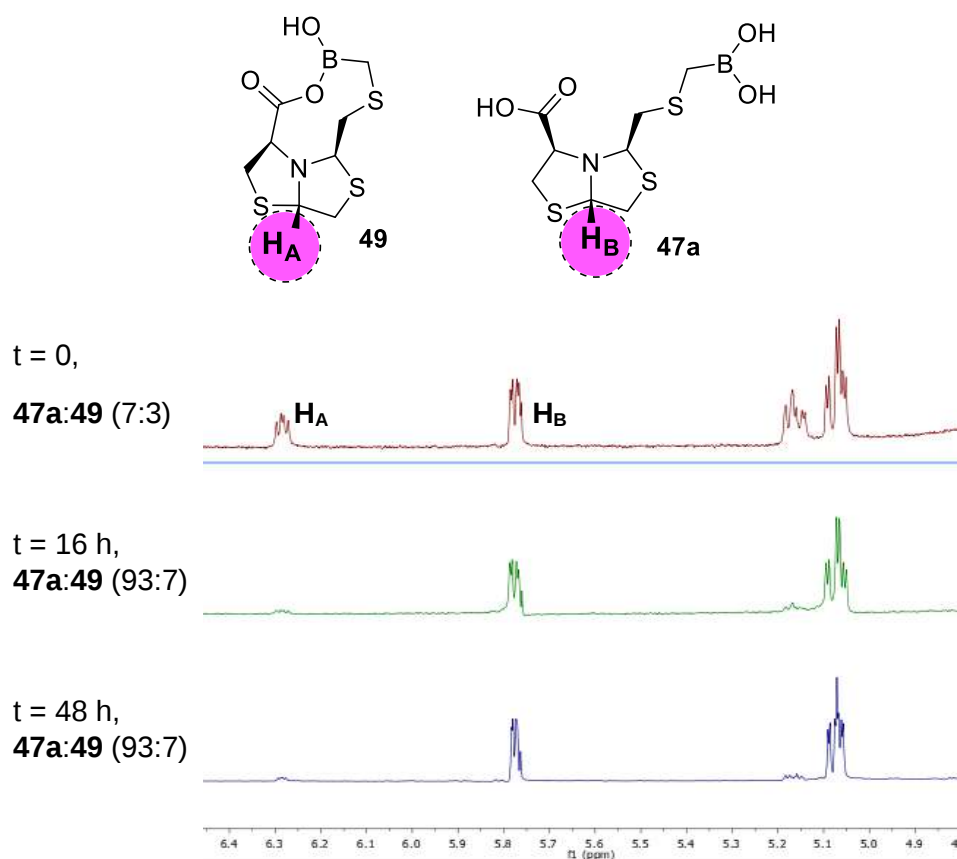


Figura 8.10: Espectros de ^1H RMN de la mezcla **47a:49** en $\text{DMSO}-d_6$ a 25°C , a tiempos: 0, 16 y 48 h.

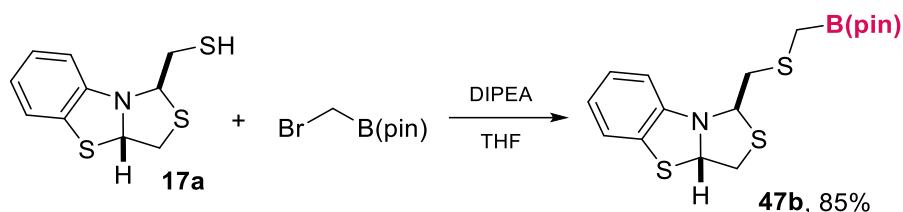
Los resultados muestran que en $\text{DMSO}-d_6$, el compuesto cíclico **49** se hidroliza para dar **47a**, hasta llegar al equilibrio en donde la relación **47a:49** es 93:7, que se mantiene constante a tiempos 16 y 48 h, ver Figura 8.10. El espectro de ^{11}B RMN muestra un solo pico a las 16 horas con un desplazamiento de 28 ppm típico de un ácido borónico libre.

Nuestra hipótesis sería que una vez desprotegido el compuesto **48**, se forma el éster borónico intramolecular **49** en el medio de reacción. A pesar de ser un ciclo de 9 miembros, estaría favorecido ya que los ésteres borónicos son más estables respecto a los ácidos borónicos.⁴⁴ Luego, cuando se incubaba en $\text{DMSO}-d_6$, el H_2O presente en el solvente hidroliza el compuesto **49** para dar lugar a la forma abierta **47a**.

Como perspectiva del trabajo se planea estudiar el sistema en buffer acuosos entre **47a** y **49** y determinar si en presencia de un exceso de H_2O se da la hidrólisis completa.

Síntesis del compuesto **47b**

El compuesto **47b** se preparó siguiendo la ruta sintética que se muestra en el Esquema 8.5, a partir de **17a** y el reactivo comercial bromometilboronato éster de pinacol.

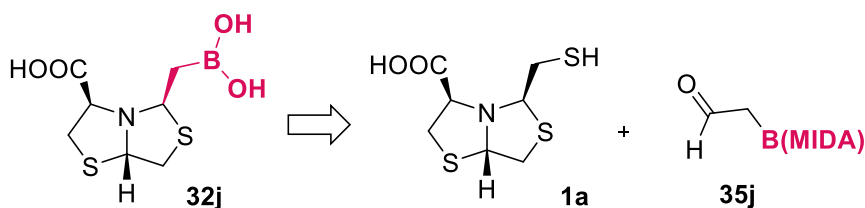


Esquema 8.5: Síntesis del compuesto **47b**.

El compuesto **47b** se obtuvo en un 85% de rendimiento como éster de pinacol. A diferencia del éster de pinandiol, el éster de pinacol se hidroliza rápidamente en buffer acuoso pH 6.8, condiciones en que se realizan los ensayos biológicos.⁴⁴ Por lo tanto, se envió a ensayar este compuesto como tal.

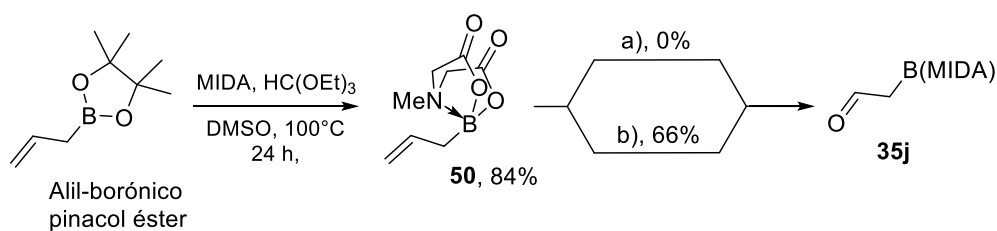
Síntesis del compuesto **32j**

El compuesto **32j** se puede preparar a partir de la BTZ **1a** y el aldehído **35j** conteniendo el grupo boronato de interés, a través de una reacción de intercambio de aldehídos desarrollada en el Capítulo 7, ver Esquema 8.6.



Esquema 8.6: Análisis retrosintético del compuesto **32j**.

El aldehído **35j**, conteniendo el ácido borónico protegido con MIDA, se preparó a partir del alil-borónico pinacol éster según bibliografía,⁴⁷ Esquema 8.7.



Esquema 8.7: Ruta sintética para la preparación del aldehído **35j**. Condiciones: a) O₃, Py, CH₂Cl₂/MeOH, -78°C; b) i) O₃, CH₂Cl₂/MeOH, -78°C, ii) PPh₃.

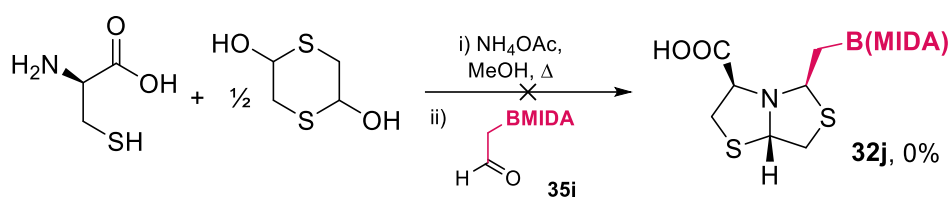
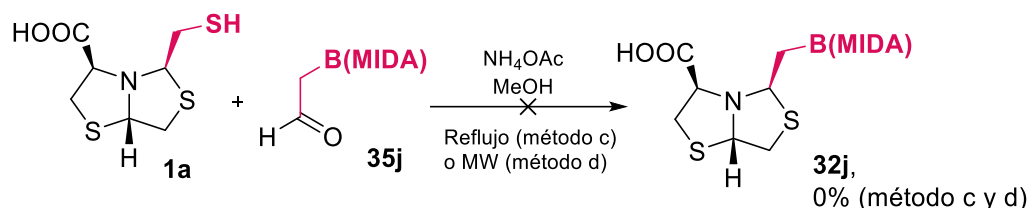
La primera etapa de la síntesis consiste en una transesterificación del alil-borónico pinacol éster, donde el ácido borónico pasa de estar protegido con un grupo pinacol a un grupo MIDA, para dar el compuesto **50**, ver Esquema 8.7.²⁹

La segunda etapa consiste en una reacción de ozonólisis del doble enlace en condiciones reductivas. En bibliografía se utiliza Me₂S como agente reductor, dando el aldehído B(MIDA) **35j** en excelente rendimiento.⁴⁷ Al no contar con este reactivo, decidimos explorar otros agentes reductores para la ozonólisis como piridina y trifenilfosfina (PPh₃) en una mezcla CH₂Cl₂/MeOH, Esquema 8.7.

La PPh₃ resultó un adecuado agente reductor, dando el aldehído **35j** en 66% de rendimiento, Esquema 8.7. Por otro lado, no se logró obtener el aldehído de interés utilizando piridina como agente reductor.

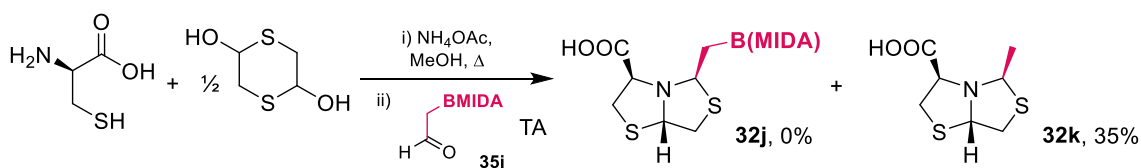
Una vez obtenido el aldehído, se exploró la síntesis del producto deseado **32j**. Para ello, se ensayó una reacción de intercambio de aldehídos según se desarrolló en el Capítulo 7.

Se probaron las siguientes condiciones: A) i) L-cisteína, ditiano **6a** (0.6 eq.) y NH₄OAc (1.5 eq.) MeOH a reflujo y ii) aldehído **35j** (3 eq.) (Método a, one-pot); y B) **1a**, NH₄OAc (1.5 eq.) en MeOH a reflujo, 2 h (Método c) o con calentamiento en MW (65W, 60°C), 20 min (Método d), Esquema 8.8.

A) Síntesis de **32j** utilizando el Método a):B) Síntesis de **32j** utilizando el Método c) y d)

Esquema 8.8: A) Síntesis del derivado **32j** utilizando Método a): i) L-cisteína, ditiano **6a** (0.6 eq.), NH_4OAc (1.5 eq), MeOH a reflujo, 30 min, ii) **35j** (3 eq), reflujo, 2 h; B) Síntesis del derivado **32j** utilizando Método c): **1a**, **35j** (3eq.), NH_4OAc (1.5 eq) en MeOH a reflujo, 2 h; y Método d): **1a**, **35j** (3eq.), NH_4OAc (1.5) en MeOH con calentamiento MW (65W, 60°C), 20 min.

No se logró obtener el compuesto deseado utilizando los métodos a), c) y d). En todos los casos se recuperó el material de partida, y no se observaron señales del aldehído en el crudo de reacción según el análisis por ^1H RMN. Esto indicaría que el aldehído no es estable en estas condiciones. Por este motivo, decidimos modificar el Método a) one-pot, y realizar el agregado del aldehído a temperatura ambiente, en lugar de hacerlo a reflujo, ver Esquema 8.9.



Esquema 8.9: Síntesis del compuesto **32j** utilizando Método a): i) L-cisteína, ditiano **6a** (0.6 eq.), NH_4OAc (1.5 eq), MeOH a reflujo, 30 min, ii) **35j** (3 eq), temperatura ambiente, 2 h.

En estas condiciones tampoco se logró obtener el producto deseado, sino que se aisló el compuesto **32k**, producto de eliminación del boro.

Existen ejemplos en literatura donde se mencionan este tipo de reacciones en donde el boro se elimina, llamadas protodesboronaciones o

protodesborilaciones, y consisten en la sustitución del ácido borónico por un protón liberando ácido bórico.⁴⁸ Esta reacción secundaria se observa a menudo en reacciones del tipo Suzuki-Miyaura, y se ha reportado que algunos ácidos borónicos, como los ácidos 2-heteroaril- y polifluoroaril borónicos, son particularmente propensos a la protodesboronación.⁴⁹

Aunque existen algunas propuestas mecanísticas descritas en literatura, aún existen controversias al respecto. En una publicación de Cox y col., los autores realizan cálculos DFT para obtener información acerca del mecanismo de la protodesboronación del ácido piridin-2-il borónico, Figura 8.12.⁵⁰ En este trabajo, se plantea una serie de rutas posibles para la protodesboronación; la ruta con menor energía de activación sería aquella que involucra los estados de transición I y II.

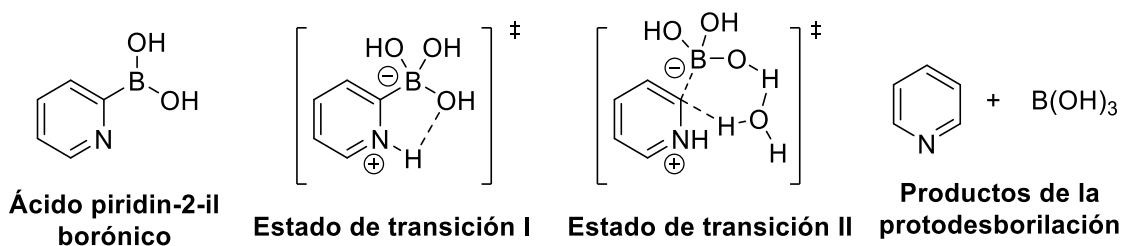


Figura 8.12: Mecanismo propuesto para la protodesboronación del ácido piridin-2-il borónico descrito en literatura.

Según los cálculos teóricos realizados por los autores, el nitrógeno de la piridina tomaría un protón del agua, liberando un hidroxilo que se une covalentemente al boro, pasando a una geometría tetraédrica con hibridación sp^3 (Estado de transición I). Luego, otra molécula de agua del medio de reacción favorecería la formación del estado de transición II, que evoluciona dando piridina como producto de eliminación. La inserción del protón y la eliminación del ácido bórico se darían en forma concertada.

Este mecanismo se ha utilizado para explicar la protodesborilación de varios sustratos aromáticos y alquílicos;⁵⁰ nuestra hipótesis es que estaría sucediendo un mecanismo análogo en nuestros derivados.

Este tipo de reacciones de protodesborilación sólo se dan con ácidos borónicos y no así con ésteres como el B(MIDA). Por lo tanto, proponemos que: i) la reacción de intercambio entre la BTZ **1a** y el aldehído **35j** B(MIDA) tiene

lugar en estas condiciones y ii) el grupo MIDA se desprotege *in situ* para liberar el ácido borónico, seguido por una reacción de protodesborilación. Esto parecería indicar que el producto final no es estable, por lo que no se realizaron más intentos para la preparación de **32j**.

iii) Transformación del grupo ácido carboxílico en ácido borónico.

Se diseñaron los compuestos **51a-b** en donde el ácido carboxílico se sustituye por un ácido borónico, Figura 8.13. El compuesto **51a** contiene la cadena de mercaptometilo, mientras que el compuesto **51b** tiene una cadena de isopropilo.

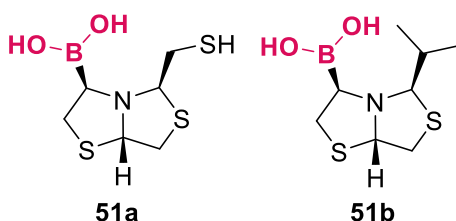
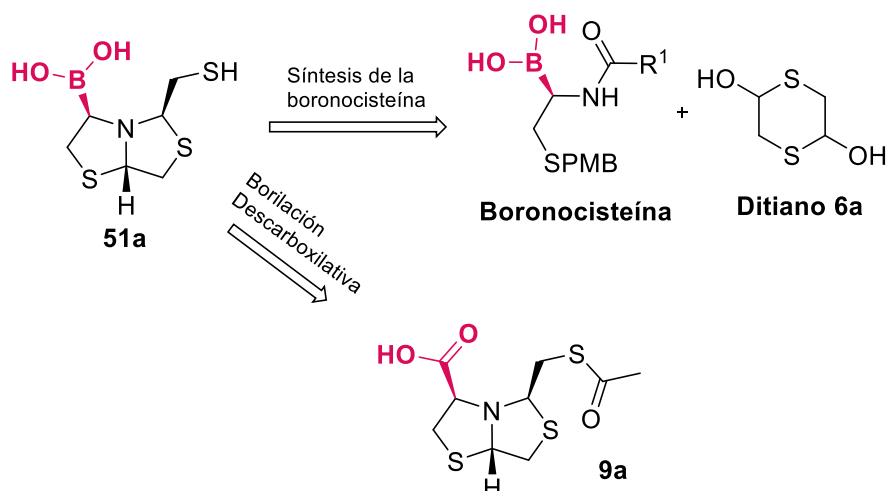


Figura 8.13: Estructura de los compuestos **51a-b**.

En el Esquema 8.10 se muestra como ejemplo el análisis retrosintético del compuesto **51a**.



Esquema 8.10: Análisis retrosintético del compuesto **51a**.

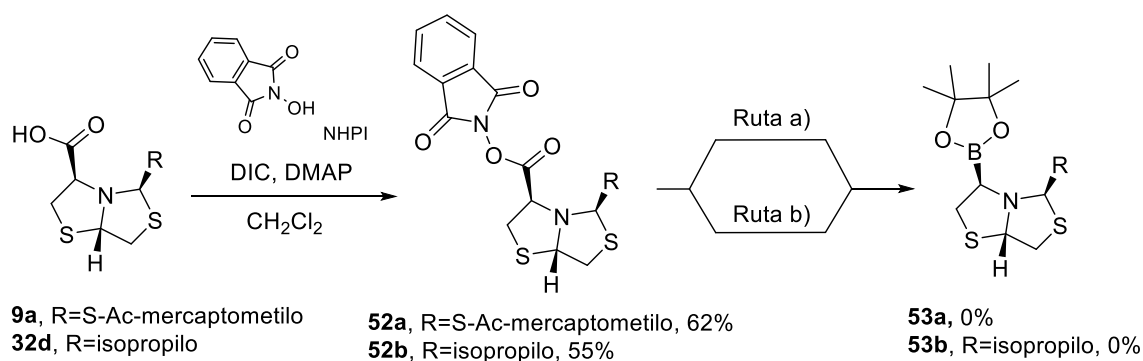
Una estrategia podría ser preparar la boronocisteína, para luego ciclar con ditiono **6a**. La síntesis de la boronocisteína fue reportada por Gibson y col.⁵¹ La

incorporación del boro se da a través de una reacción de borilación de iminas catalizada por cobre. La síntesis consiste en 5 etapas de reacción.

Los compuestos **51a-b** también podrían prepararse a través de una reacción de borilación descarboxilativa reportada por Baran y col.,^{30,31} a partir del ácido carboxílico correspondiente. Existen varios ejemplos descriptos en bibliografía, en donde se utilizan como material de partida ácidos carboxílicos con una amplia gama de funcionalidades, como bromuros o cloruros de alquilo, éteres, ésteres, amidas, carbamatos, cetonas y alcoholes o fenoles. Además, se han utilizado como sustrato algunos aminoácidos como prolina, valina, aspártico, entre otros.

Se decidió ensayar las condiciones de borilación descarboxilativa para la preparación de los compuestos **51a-b** deseados, según se muestra en el Esquema 8.11.^{30,31}

En esta ruta sintética, primero se preparan los ésteres redox-activos a partir del ácido carboxílico y la N-hidroxiftalimida (NHPI), utilizando DIC como agente acoplante. Luego, en condiciones de borilación descarboxilativa, se elimina el éster y se introduce un boronato éster de pinacol utilizando como fuente de boro B₂pin₂, Esquema 8.11.



Esquema 8.11: Ruta de síntesis para la obtención de **53a-b**. Ruta a): MeLi, MgBr₂·Et₂O, NiCl₂·6H₂O, B₂pin₂, 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina en THF; Ruta b) LiOH·H₂O, MgCl₂·6H₂O, Cu(acac)₂, B₂pin₂ en Dioxano/THF (1:4).

Los ésteres redox-activos **52a-b** se prepararon a partir de **9a** y **32d**, con un 62 y 55% de rendimiento, respectivamente. La formación de este tipo de ésteres es fundamental para que la siguiente reacción tenga lugar, ya que la N-

hidroxifitalimida forma especies radicalarias necesarias para el mecanismo de la borilación descarboxilativa.

Luego, se ensayaron dos condiciones para llevar a cabo la borilación descarboxilativa: ruta a) MeLi, MgBr₂·Et₂O, NiCl₂·6H₂O, B₂pin₂, 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina en THF³⁰ y ruta b) LiOH·H₂O, MgCl₂·6H₂O, Cu(acac)₂, B₂pin₂ en Dioxano/THF (1:4).³¹ Ambas rutas sintéticas utilizan el borano B₂pin₂ como fuente de boro.

En primer lugar, se probó la ruta a), que utiliza un complejo de NiCl₂ con el ligando 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina (L1) como catalizador, ya que según el trabajo publicado por los autores mejora los rendimientos de la reacción.³⁰ Luego, se agrega MeLi que actúa como base fuerte y forma un complejo con el B₂pin₂: [B₂pin₂Me]Li.⁵² De esta manera se logra activar el diborano para la transmetalación en presencia de MgBr₂·OEt₂.³⁰ La propuesta de mecanismo descripta en bibliografía se muestra en la Figura 8.14.

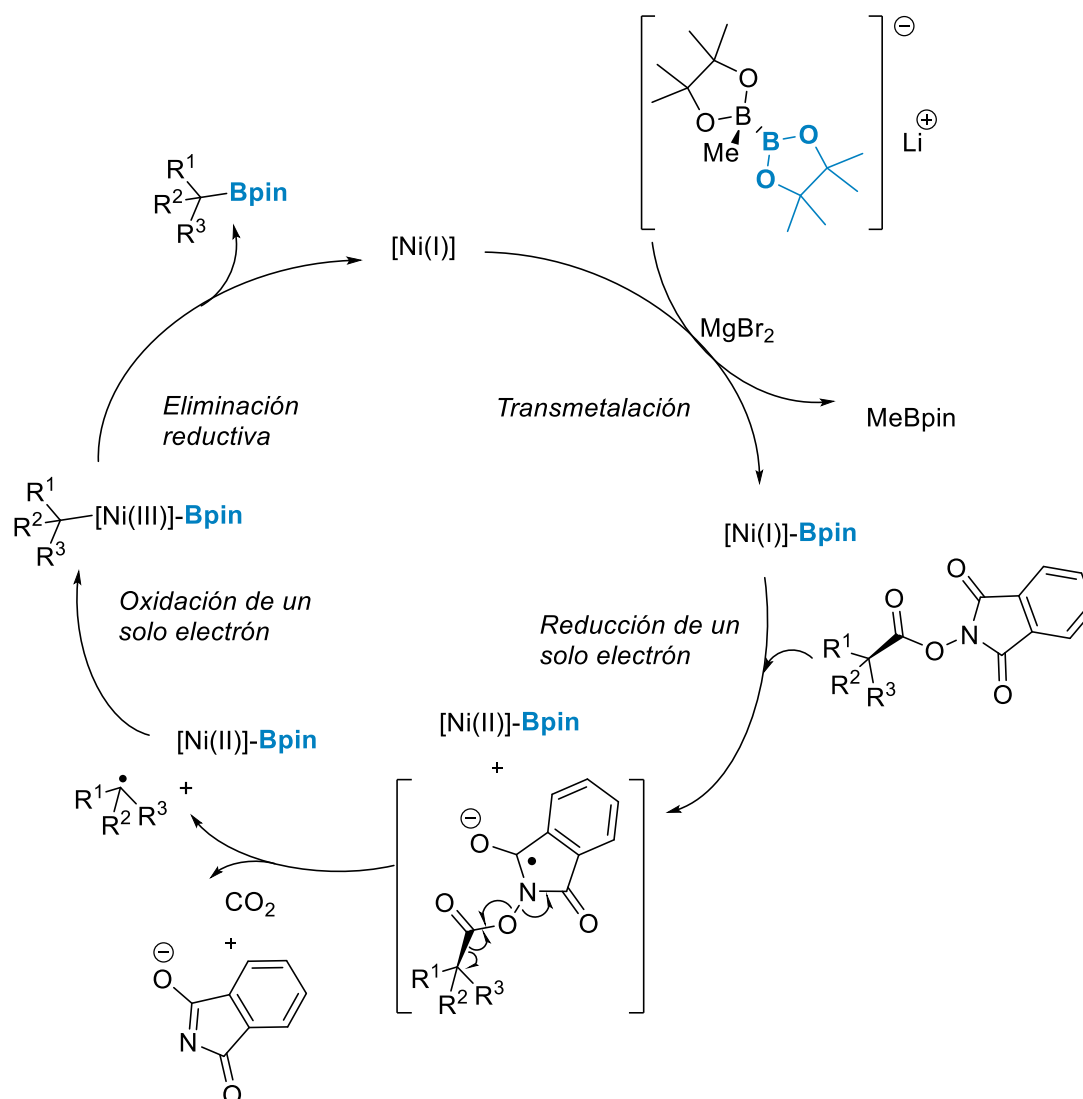


Figura 8.14: Propuesta de mecanismo de borilación descarboxilativa.⁵²

La borilación descarboxilativa procede a través de un mecanismo organometálico, que involucra una transmetalación del reactivo de borilación y $Ni(II)$ como catalizador.

En el mecanismo propuesto por los autores, la especie transitoria de $Ni(I)$ podría reaccionar con el complejo $[B_2pin_2Me]Li$ mediante un proceso de transmetalación catalizado por $MgBr_2 \cdot OEt_2$, proporcionando un intermedio $[Ni(I)]-Bpin$ según se muestra en la Figura 8.14. Posteriormente, a través de un proceso llamado “reducción de un solo electrón” se podrían generar los radicales alquilo a partir del éster redox-activo, con la formación de especies de $[Ni(II)]$ -borilo y CO_2 . En un siguiente paso, a través de un proceso de “oxidación de un solo electrón”, se daría la reacción entre los radicales alquilo y el $[Ni(II)]-Bpin$,

generando complejos del tipo alquilo-[Ni(III)]-Bpin, que podrían sufrir una eliminación reductiva para producir los ésteres borónicos de alquilo y regenerar los complejos [Ni(I)] activos, Figura 8.14.⁵³

Utilizando la ruta sintética a) no se pudieron obtener los compuestos deseados **53a-b**, sino que se obtuvo una mezcla compleja de especies según el análisis por ¹H RMN. Esto podría deberse a que el MeLi es una base muy fuerte y puede llevar a la hidrólisis del anillo de tiazolidina.

La segunda estrategia utilizada fue la ruta b), según Esquema 8.11. Estas condiciones para la borilación descarboxilativa fueron reportadas un año después por el mismo grupo de investigación, llevando a reacciones más limpias por utilizar condiciones más suaves de reacción. La catálisis está mediada por Cu(II) y utiliza LiOH como base, a través de un mecanismo análogo al que se da utilizando Ni como catalizador.³¹ Sin embargo, utilizando estas condiciones de reacción tampoco se logró obtener los compuestos deseados **53a-b**. En este trabajo, los autores reportan la formación de varios complejos con Cu(I) y Cu(II) durante el mecanismo de borilación descarboxilativa, que podría llegar a ser incompatible con el azufre de tiazolidina de nuestros compuestos, formándose complejos que evolucionan hacia la descomposición del bicyclo. Además, la formación de especies radicalarias a partir de la N-hidroxifthalimida podrían también reaccionar con el bicyclo y llevar a su descomposición. Esta característica es común tanto para la ruta a) como para la ruta b).

En conclusión, no se logró obtener los compuestos deseados utilizando cualquiera de las dos rutas. Como perspectiva de trabajo futuro, se plantea explorar la preparación de la boronocisteína para luego ciclar con ditiano **6a**.

Síntesis de derivados de TZ conteniendo boro

i) Sustitución de la cadena de mercaptometilo por un ácido borónico.

Se diseñaron las TZ **54a-b** en donde la cadena de mercaptometilo se sustituye por un ácido metilborónico, ver Figura 8.15.

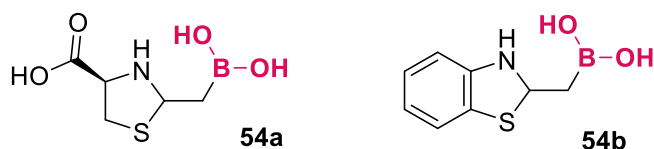
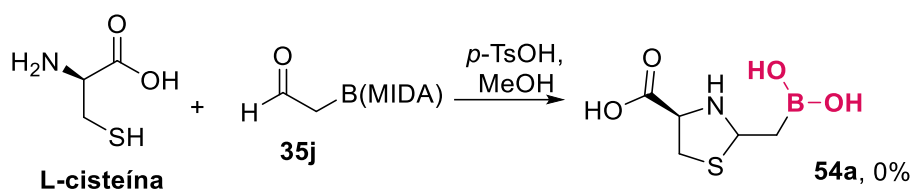


Figura 8.15: Estructura de los compuestos **54a-b**.

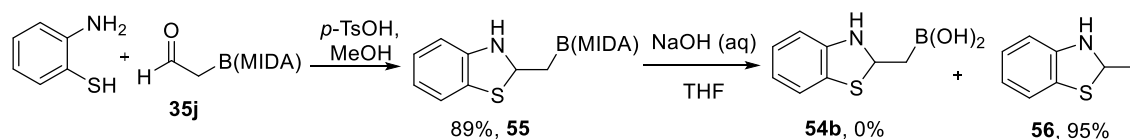
Para la preparación del compuesto **54a** se utilizó como material de partida L-cisteína y el aldehído **35j**, utilizando *p*-TsOH como catalizador y MeOH como solvente a temperatura ambiente, Esquema 8.12.



Esquema 8.12: Síntesis del compuesto **54a**.

En estas condiciones no se logró obtener el compuesto deseado **54a**. El análisis del crudo de la reacción por ^1H RMN mostró la descomposición del aldehído **35j**. Por este motivo, se decidió probar la reacción en baño de hielo y utilizando buffer fosfato pH 5 como solvente con el fin de controlar el pH, pero en ningún caso se logró aislar el producto deseado.

Por otro lado, se ensayó la preparación del compuesto **54b** utilizando como material de partida 2-aminotiofenol **18a** y el aldehído **35j**, según Esquema 8.13.



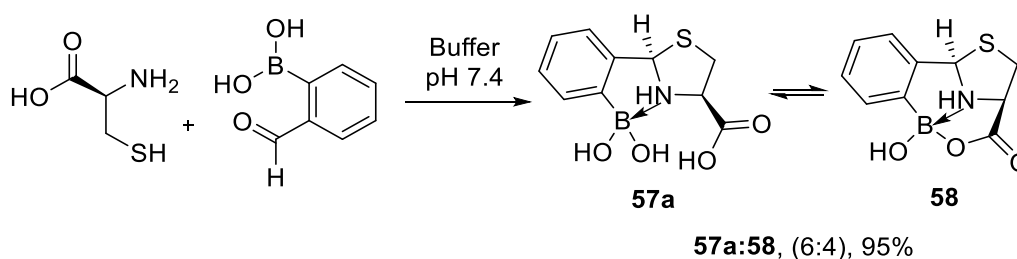
Esquema 8.13: Síntesis del compuesto **54b**.

En primer lugar, se obtuvo la tiazolidina **55** conteniendo el boro protegido como éster de MIDA. Luego, se intentó hidrolizar el grupo MIDA utilizando las condiciones reportadas en bibliografía (NaOH 1M en THF),⁴⁰ que llevaron a la formación del producto de protodeboronación **56**, Esquema 8.13. Esto indicaría

que el compuesto deseado **54b** no sería estable, y por lo tanto no se realizaron más intentos para su preparación.

ii) Síntesis de TZ tricíclicas

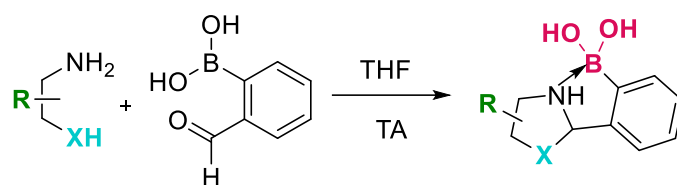
En un artículo recientemente publicado por Gao y col., se reportó la síntesis de la tiazolidina tricíclica **57a** conteniendo un ácido borónico, preparada a partir del ácido *o*-formilfenilborónico y L-cisteína a pH neutro.⁵⁴ Este compuesto se estabiliza debido a la coordinación interna del nitrógeno heterocíclico y el átomo de boro, Esquema 8.14, y se obtiene como una mezcla entre la forma abierta **57a** y la forma cíclica **58** en proporción **57a:58** 6:4 a pH 7.4.



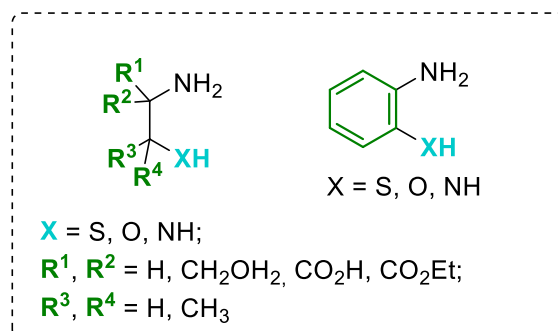
Esquema 8.14: Síntesis de la tiazolidina tricíclica **57a** en equilibrio con la forma cíclica **58** descrito en bibliografía.

Estos compuestos contienen un heterociclo de tiazolidina al igual que nuestros derivados TZ **3**, y además contienen un borónico cíclico en su estructura. Por lo tanto, se decidió explorar si este tipo de derivados podrían ser buenos inhibidores de SBL y MBL.

Para ello, se ensayó su preparación a partir de diferentes 2-aminoalcoholes, 2-aminotioles o 2-diaminos y *o*-formilfenilborónico, Esquema 8.15, para su posterior evaluación frente a SBL y MBL. Para la síntesis de estos compuestos se decidió utilizar THF en lugar de buffer acuosos como solvente.



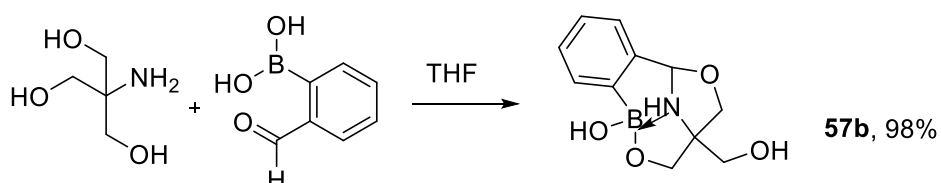
Materiales de partida:



Esquema 8.15: Síntesis de benzoheterociclos tricíclicos a partir de 2-aminoalcoholes, 2-aminotioles o 2-diaminos y *o*-formilfenilborónico.

El compuesto **57a** fue obtenido como una mezcla **57a:58** 8:2 en un 95% de rendimiento, ligeramente superior a la obtenida por Gao y col. (**57a:58** 6:4 a pH 7.4). Este resultado demuestra que la relación entre la forma abierta y la cerrada depende del solvente en que se realice la reacción y probablemente del pH del medio.

También se logró obtener la oxazolidina **57b** utilizando 2-Amino-2-hidroxi-metil-propano-1,3-diol (TRIS) como material de partida ($X=O$, $R^1=R^2=CH_2OH$, $R^3=R^4=H$). Este compuesto no ha sido descrito hasta el momento. Se obtuvo cuantitativamente en su forma cíclica, confirmado por HRMS, ver Esquema 8.16.



Esquema 8.16: Síntesis del compuesto **57b**.

La reacción también se ensayó con otros 2-aminoalcoholes, 2-aminotioles o 2-diaminos de partida, pero no se logró obtener el compuesto deseado. Este resultado indicaría que cuando se utilizan materiales de partida que no contienen

en la posición R¹ o R² un grupo capaz de formar un ciclo adicional (COOH, OH) como se da para **57a-b**, la reacción no tiene lugar.

8.3.3 Evaluación biológica de los bioisómeros preparados

Determinación de la actividad inhibitoria IC₅₀ frente a MBL y SBL

Los boronatos preparados **41**, **47a** y **57a-b** se evaluaron contra enzimas representantes de MBL y SBL, Figura 8.16.

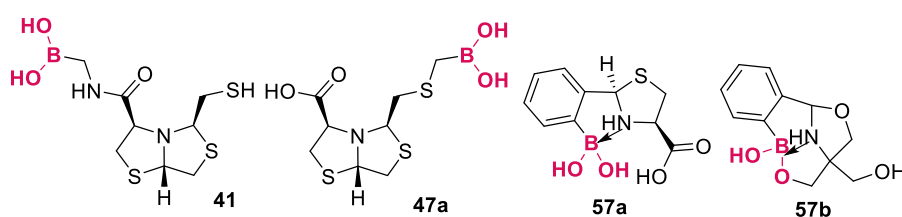


Figura 8.16: Compuestos **41**, **47a** y **57a-b** evaluados contra enzimas representantes de MBL y SBL.

Los resultados se muestran en la Tabla 8.1, donde también se incluyen los resultados de actividad del compuesto de referencia **1a**. Este compuesto es activo frente a MBL con valores de IC₅₀ en el orden μM para todas las subclases, pero no es activo frente a SBL.

Tabla 8.1: Valores de IC₅₀ de los compuestos preparados frente a las enzimas: NDM-1, IMP-1 y VIM-2 (MBL, subclase B1), L1 (MBL, subclase B3), KPC-2 (SBL, clase A) y OXA-23 (SBL, clase D).

Compuesto	IC ₅₀ (μM)					
	MBL				SBL	
	NDM-1 (B1)	VIM-2 (B1)	IMP-1 (B1)	L1 (B3)	KPC-2 (A)	OXA-23 (D)
1a	13	7.2	16	24	> 50	> 50
41	ND	2.28	0.74	5.65	0.20	ND
47a	ND	2.5	27.4	7.6	0.93	ND
57a	> 50	ND	ND	ND	ND	> 50
57b	> 50	ND	ND	ND	ND	> 50

ND = No determinado. Código de color: 0.2 10 15 25 50 μM



Los compuestos **57a-b** fueron evaluados frente a NDM-1, MBL perteneciente a la subclase B1, y OXA-23, SBL perteneciente a la clase D. Frente a ambas enzimas, los compuestos ensayados resultaron inactivos, con valores de $IC_{50} > 1000 \mu M$ y $> 50 \mu M$ para NDM-1 y OXA-23, respectivamente. No se continuó con la caracterización biológica de estos compuestos.

El compuesto **41** conteniendo el ácido borónico y el tiol resultó más activo frente a las MBL ensayadas respecto a la BTZ original **1a**, mostrando valores de IC_{50} frente a IMP-1, VIM-2 y L1, de 0.74, 2.28 y 5.65 μM , respectivamente. Además, mostró un valor de IC_{50} de 0.2 μM frente a la enzima KPC-2, SBL perteneciente a la clase A.

El compuesto **47a**, conteniendo el ácido borónico y el ácido carboxílico, resultó activo frente a las MBL ensayadas IMP-1, VIM-2 y L1, mostrando valores de IC_{50} de 27.4, 2.5 y 7.6 μM , respectivamente. Además, resultó activo frente a la SBL KPC-2, mostrando un valor de IC_{50} de 0.93 μM .

Los compuestos **41** y **47a** son los primeros ejemplos preparados por el grupo que logran la inhibición simultánea de MBL y SBL, resultado altamente prometedor. Un aspecto para destacar es que el compuesto **47a** es el primer ejemplo de BTZ que no presenta tiol libre y mantiene la actividad frente a MBL.

Determinación de MIC frente a cepas de E. coli expresando IMP-1 e IMP-6

Con el fin de continuar la caracterización biológica de los compuestos **41** y **47a**, se realizaron ensayos de MIC frente a cepas de *E. coli* expresando dos tipos de MBL: IMP-1 e IMP-6, utilizando meropenem como antibiótico, Tabla 8.2.

Tabla 8.2: Ensayos de MIC de los compuestos **1a**, **41** y **47a** frente a cepas *E. coli* expresando dos tipos de MBL: IMP-1 e IMP-6, utilizando meropenem como antibiótico.

		<i>E. coli</i> DH10B IMP-1	<i>E. coli</i> DH10B IMP-6
MIC ($\mu g/mL$)	Meropenem*	4	32
	1a	0.25	1
	41	0.5	8
	47a	0.5	4

* Control sin inhibidor.

Los resultados muestran que tanto **41** como **47a** son capaces de disminuir la MIC de meropenem respecto al control sin inhibidor, aunque los mejores resultados se obtuvieron con el compuesto de referencia **1a**. Estos resultados son prometedores ya que indican que los nuevos compuestos conteniendo ácidos borónicos logran atravesar la pared celular bacteriana y ejercer su acción frente a las MBL intrabacterianas.

8.4 Conclusiones y perspectivas

Se sintetizaron 3 análogos a BTZ y 2 análogos a TZ conteniendo ácidos o ésteres borónicos en su estructura.

Los compuestos **41** y **47a** resultaron buenos inhibidores de MBL pertenecientes a la B1 (IMP-1 y VIM-2) y B3 (L1), y de SBL pertenecientes a la clase A (KPC-2), logrando por primera vez la inhibición conjunta de SBL y MBL en sistemas del tipo BTZ.

El compuesto **47b** fue enviado para su evaluación frente a SBL y MBL.

Por el contrario, los compuestos **57a-b** no lograron inhibir la enzima NDM-1 ni OXA-23.

Como perspectivas de trabajo se propone:

- i) Completar la caracterización biológica de los compuestos **41** y **47a**, y realizar ensayos *in vitro* frente a otras enzimas MBL y SBL.
- ii) Preparar análogos a **41** y **47a** con el fin de mejorar la actividad frente a bacterias resistentes que expresan SBL y MBL. Por ejemplo, se plantea explorar la preparación de la boronocisteína para luego ciclar con ditiano **6a**.
- iii) Expandir el perfil de sustrato y sintetizar otros derivados borónicos, trabajando sobre nuevos bloques de construcción.

8.5 Bibliografía

- (1) Yang, W.; Gao, X.; Wang, B. Boronic Acid Compounds as Potential Pharmaceutical Agents. *Med. Res. Rev.* **2003**, 23 (3), 346–368. <https://doi.org/10.1002/med.10043>.
- (2) Hall, D. G. *Structure, Properties, and Preparation of Boronic Acid Derivatives. Overview of Their Reactions and Applications*; **2005**. <https://doi.org/10.1002/3527606548.ch1>.
- (3) Diaz, D. B.; Yudin, A. K. The Versatility of Boron in Biological Target Engagement. *Nat. Chem.* **2017**, 9 (8), 731–742. <https://doi.org/10.1038/NCHEM.2814>.
- (4) Shirley, M. Ixazomib: First Global Approval. *Drugs*. **2016**, 76 (3), 405–411. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0548-5>.
- (5) San Miguel, J. F.; Mateos, M. V. Bortezomib in the Upfront Treatment of Multiple Myeloma. *Milestones Drug Ther.* **2010**, 2 (3), 53–68. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8948-2_4.
- (6) Huber, E. M.; Heinemeyer, W.; Groll, M. Bortezomib-Resistant Mutant Proteasomes: Structural and Biochemical Evaluation with Carfilzomib and ONX 0914. *Structure* **2015**, 23 (2), 407–417. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.11.019>.
- (7) Chauhan, D.; Tian, Z.; Zhou, B.; Kuhn, D.; Orlowski, R.; Raje, N.; Richardson, P.; Anderson, K. C. In Vitro and in Vivo Selective Antitumor Activity of a Novel Orally Bioavailable Proteasome Inhibitor MLN9708 against Multiple Myeloma Cells. *Clin. Cancer Res.* **2011**, 17 (16), 5311–5321. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0476>.
- (8) Zhao, H.; Palencia, A.; Seiradake, E.; Ghaemi, Z.; Cusack, S.; Luthey-Schulten, Z.; Martinis, S. Analysis of the Resistance Mechanism of a Benzoxaborole Inhibitor Reveals Insight into the Leucyl-TRNA Synthetase Editing Mechanism. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10 (10), 2277–2285. <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00291>.
- (9) Markham, A. Tavaborole: First Global Approval. *Drugs* **2014**, 74 (13),

- 1555–1558. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0276-7>.
- (10) Akama, T.; Baker, S. J.; Zhang, Y. K.; Hernandez, V.; Zhou, H.; Sanders, V.; Freund, Y.; Kimura, R.; Maples, K. R.; Plattner, J. J. Discovery and Structure-Activity Study of a Novel Benzoxaborole Anti-Inflammatory Agent (AN2728) for the Potential Topical Treatment of Psoriasis and Atopic Dermatitis. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (8), 2129–2132. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.03.007>.
 - (11) Tsivkovski, R.; Lomovskayaa, O. Biochemical Activity of Vaborbactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64* (2), 1–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.01935-19>.
 - (12) Groft, L. M.; Claeys, K. C.; Heil, E. L. An Evaluation of Meropenem/Vaborbactam for the Treatment of Nosocomial Pneumonia. *Expert Opin. Pharmacother.* **2021**, *22* (3), 265–271. <https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1840552>.
 - (13) Wen, Z.; Liu, Q.; Wu, J.; Xu, B.; Wang, J.; Liang, L.; Guo, Y.; Peng, M.; Zhao, Y.; Liao, Q. Fibroblast Activation Protein α -Positive Pancreatic Stellate Cells Promote the Migration and Invasion of Pancreatic Cancer by CXCL1-Mediated Akt Phosphorylation. *Ann. Transl. Med.* **2019**, *7* (20), 532–532. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.09.164>.
 - (14) Poplawski, S. E.; Lai, J. H.; Sanford, D. G.; Sudmeier, J. L.; Wu, W.; Bachovchin, W. W. Pro-Soft Val-BoroPro: A Strategy for Enhancing in Vivo Performance of Boronic Acid Inhibitors of Serine Proteases. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (7), 2022–2028. <https://doi.org/10.1021/jm100972f>.
 - (15) Zhou, Y.; Liu, X.; Xue, J.; Liu, L.; Liang, T.; Li, W.; Yang, X.; Hou, X.; Fang, H. Discovery of Peptide Boronate Derivatives as Histone Deacetylase and Proteasome Dual Inhibitors for Overcoming Bortezomib Resistance of Multiple Myeloma. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (9), 4701–4715. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02161>.
 - (16) Liu, J.; Zheng, S.; Akerstrom, V. L.; Yuan, C.; Ma, Y.; Zhong, Q.; Zhang, C.; Zhang, Q.; Guo, S.; Ma, P.; Skripnikova, E. V.; Bratton, M. R.; Pannuti, A.; Miele, L.; Wiese, T. E.; Wang, G. Fulvestrant-3 Boronic Acid (ZB716):

- An Orally Bioavailable Selective Estrogen Receptor Downregulator (SERD). *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (17), 8134–8140. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00753>.
- (17) Ghosh, A. K.; Xia, Z.; Kovala, S.; Robinson, W. L.; Johnson, M. E.; Kneller, D. W.; Wang, Y. F.; Aoki, M.; Takamatsu, Y.; Weber, I. T.; Mitsuya, H. Potent HIV-1 Protease Inhibitors Containing Carboxylic and Boronic Acids: Effect on Enzyme Inhibition and Antiviral Activity and Protein-Ligand X-Ray Structural Studies. *Chem. Med. Chem.* **2019**, 14 (21), 1863–1872. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900508>.
- (18) Pechenov, A.; Stefanova, M. E.; Nicholas, R. A.; Peddi, S.; Gutheil, W. G. Potential Transition State Analogue Inhibitors for the Penicillin-Binding Proteins. *Biochemistry.* **2003**, 42 (2), 579–588. <https://doi.org/10.1021/bi026726k>.
- (19) Newman, H.; Krajnc, A.; Bellini, D.; Eyermann, C. J.; Boyle, G. A.; Paterson, N. G.; McAuley, K. E.; Lesniak, R.; Gangar, M.; Von Delft, F.; Brem, J.; Chibale, K.; Schofield, C. J.; Dowson, C. G. High-Throughput Crystallography Reveals Boron-Containing Inhibitors of a Penicillin-Binding Protein with Di- And Tricovalent Binding Modes. *J. Med. Chem.* **2021**, 64 (15), 11379–11394. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00717>.
- (20) Lomovskaya, O.; Tsivkovski, R.; Nelson, K.; Rubio-Aparicio, D.; Sun, D.; Totrov, M.; Dudley, M. N. Spectrum of Beta-Lactamase Inhibition by the Cyclic Boronate QPX7728, an Ultrabroad-Spectrum Beta-Lactamase Inhibitor of Serine and Metallo-Beta-Lactamases: Enhancement of Activity of Multiple Antibiotics against Isogenic Strains Expressing Single Beta-La. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, 64 (6), 1–20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00212-20>.
- (21) Naas, T.; Vandel, L.; Sougakoff, W.; Livermore, D. M.; Nordmann, P. Cloning and Sequence Analysis of the Gene for a Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase, Sme-1, from *Serratia Marcescens* S6. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38 (6), 1262–1270. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.6.1262>.

- (22) Hecker, S. J.; Reddy, K. R.; Totrov, M.; Hirst, G. C.; Lomovskaya, O.; Griffith, D. C.; King, P.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Sabet, M.; Tarazi, Z.; Clifton, M. C.; Atkins, K.; Raymond, A.; Potts, K. T.; Abendroth, J.; Boyer, S. H.; Loutit, J. S.; Morgan, E. E.; Durso, S.; Dudley, M. N. Discovery of a Cyclic Boronic Acid β -Lactamase Inhibitor (RPX7009) with Utility vs Class A Serine Carbapenemases. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (9), 3682–3692. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00127>.
- (23) M.; Mojica, M. F.; Rutter, J. D.; Taracila, M.; Abriata, L. A.; Fouts, D. E.; Papp-wallace, K. M.; Walsh, T. J.; Lipuma, J. J.; Vila, A. J.; Bonomo, A. Population structure, molecular epidemiology, and β -lactamase diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* isolates in the United States. *MBio.* **2019**, *10* (4), e00405-e00419. <https://doi.org/10.1128/mBio.00405-19>.
- (24) Krajnc, A.; Brem, J.; Hinchliffe, P.; Calvopiña, K.; Panduwawala, T. D.; Lang, P. A.; Kamps, J. J. A. G.; Tyrrell, J. M.; Widlake, E.; Saward, B. G.; Walsh, T. R.; Spencer, J.; Schofield, C. J. Bicyclic Boronate VNRX-5133 Inhibits Metallo- And Serine- β -Lactamases. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (18), 8544–8556. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00911>.
- (25) Liu, B.; Trout, R. E. L.; Chu, G. H.; McGarry, D.; Jackson, R. W.; Hamrick, J. C.; Daigle, D. M.; Cusick, S. M.; Pozzi, C.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Mangani, S.; Docquier, J. D.; Weiss, W. J.; Pevear, D. C.; Xerri, L.; Burns, C. J. Discovery of Taniborbactam (VNRX-5133): A Broad-Spectrum Serine- And Metallo- β -Lactamase Inhibitor for Carbapenem-Resistant Bacterial Infections. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (6), 2789–2801. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01518>.
- (26) Hecker, S. J.; Reddy, K. R.; Lomovskaya, O.; Griffith, D. C.; Rubio-Aparicio, D.; Nelson, K.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Sabet, M.; Tarazi, Z.; Parkinson, J.; Totrov, M.; Boyer, S. H.; Glinka, T. W.; Pemberton, O. A.; Chen, Y.; Dudley, M. N. Discovery of Cyclic Boronic Acid QPX7728, an Ultrabroad-Spectrum Inhibitor of Serine and Metallo- β -Lactamases. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (14), 7491–7507. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01976>.
- (27) Veeraraghavan, B.; Bakthavatchalam, Y. D.; Sahni, R. D. Oral Antibiotics in Clinical Development for Community-Acquired Urinary Tract Infections.

- Infect. Dis. Ther.* **2021**, 10 (4), 1815–1835. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00509-4>.
- (28) Morandi, S.; Morandi, F.; Caselli, E.; Shoichet, B. K.; Prati, F. Structure-Based Optimization of Cephalothin-Analogue Boronic Acids as β -Lactamase Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, 16 (3), 1195–1205. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.075>.
- (29) Churches, Q. I. N-Methyliminodiacetate (MIDA): A Useful Protecting Group for the Generation of Complex Organoboron Compounds. *Aust. J. Chem.* **2011**, 64 (11), 1474. <https://doi.org/10.1071/CH11303>.
- (30) Li, C.; Wang, J.; Barton, L. M.; Yu, S.; Tian, M.; Peters, D. S.; Kumar, M.; Yu, A. W.; Johnson, K. A.; Chatterjee, A. K.; Yan, M.; Baran, P. S. Decarboxylative Borylation. *Science*. **2017**, 356, 3319–3342. <https://doi.org/10.1126/science.aam7355>.
- (31) Wang, J.; Shang, M.; Lundberg, H.; Feu, K. S.; Hecker, S. J.; Qin, T.; Blackmond, D. G.; Baran, P. S. Cu-Catalyzed Decarboxylative Borylation. *ACS Catal.* **2018**, 8 (10), 9537–9542. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b02928>.
- (32) Beenen, M. A.; An, C.; Ellman, J. A. Asymmetric Copper-Catalyzed Synthesis of α -Amino Boronate Esters from N-Tert-Butanesulfinyl Aldimines. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (22), 6910–6911. <https://doi.org/10.1021/ja800829y>.
- (33) Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, 95 (7), 2457–2483. <https://doi.org/10.1021/cr00039a007>.
- (34) Li, J.; Grillo, A. S.; Burke, M. D. From Synthesis to Function via Iterative Assembly of N-Methyliminodiacetic Acid Boronate Building Blocks. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48 (8), 2297–2307. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00128>.
- (35) Yi, J.; Liu, J. H.; Liang, J.; Dai, J. J.; Yang, C. T.; Fu, Y.; Liu, L. Alkylboronic Esters from Palladium- and Nickel-Catalyzed Borylation of Primary and Secondary Alkyl Bromides. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354 (9), 1685–1691.

<https://doi.org/10.1002/adsc.201200136>.

- (36) Evans, K. J.; Morton, P. A.; Luz, C.; Miller, C.; Raine, O.; Lynam, J. M.; Mansell, S. M. Rhodium Indenyl NHC and Fluorenyl-Tethered NHC Half-Sandwich Complexes: Synthesis, Structures and Applications in the Catalytic C–H Borylation of Arenes and Alkanes. *Chem. - A Eur. J.* **2021**, 27 (71), 17824–17833. <https://doi.org/10.1002/chem.202102961>.
- (37) Frey, L.; Jarju, J. J.; Salonen, L. M.; Medina, D. D. Boronic-Acid-Derived Covalent Organic Frameworks: From Synthesis to Applications. *New J. Chem.* **2021**, 45 (33), 14879–14907. <https://doi.org/10.1039/d1nj01269j>.
- (38) Introvigne, M. L.; Taracila, M. A.; Prati, F.; Caselli, E.; Bonomo, R. A. α -Triazolylboronic Acids: A Promising Scaffold for Effective Inhibitors of KPCs. *Chem. Med. Chem.* **2020**, 15 (14), 1283–1288. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000126>.
- (39) Noguchi, H.; Hojo, K.; Suginome, M. Boron-Masking Strategy for the Selective Synthesis of Oligoarenes via Iterative Suzuki-Miyaura Coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (4), 758–759. <https://doi.org/10.1021/ja067975p>.
- (40) Gillis, E. P.; Burke, M. D. A Simple and Modular Strategy for Small Molecule Synthesis: Iterative Suzuki-Miyaura Coupling of B-Protected Haloboronic Acid Building Blocks. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (21), 6716–6717. <https://doi.org/10.1021/ja0716204>.
- (41) Wallow, T. I.; Novak, B. M. Highly Efficient and Accelerated Suzuki Aryl Couplings Mediated by Phosphine-Free Palladium Sources. *J. Org. Chem.* **1994**, 59 (17), 5034–5037. <https://doi.org/10.1021/jo00096a056>.
- (42) Coutts, S. J.; Adams, J.; Krolikowski, D.; Snow, R. J. Two Efficient Methods for the Cleavage of Pinanediol Boronate Esters Yielding the Free Boronic Acids. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35 (29), 5109–5112. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)77040-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)77040-7).
- (43) Yuen, A. K. L.; Hutton, C. A. Deprotection of Pinacolyl Boronate Esters via Hydrolysis of Intermediate Potassium Trifluoroborates. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46 (46), 7899–7903. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.09.101>.

- (44) Roy, C. D.; Brown, H. C. Stability of boronic esters – Structural effects on the relative rates of transesterification of 2-(phenyl)-1,3,2-dioxaborolane. **2007**, 692, 784–790. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2006.10.013>.
- (45) Caselli, E.; Powers, R. A.; Blaszczak, L. C.; Wu, C. Y. E.; Prati, F.; Shoichet, B. K. Energetic, Structural, and Antimicrobial Analyses of β -Lactam Side Chain Recognition by β -Lactamases. *Chem. Biol.* **2001**, 8 (1), 17–31. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00052-1](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00052-1).
- (46) Trout, R. E.; Zulli, A.; Mesaros, E.; Jackson, R. W.; Boyd, S.; Liu, B.; Hamrick, J.; Daigle, D.; Chatwin, C. L.; John, K.; McLaughlin, L.; Cusick, S. M.; Weiss, W. J.; Pulse, M. E.; Pevear, D. C.; Moeck, G.; Xerri, L.; Burns, C. J. Discovery of VNRX-7145 (VNRX-5236 Etzadroxil): An Orally Bioavailable β -Lactamase Inhibitor for Enterobacterales Expressing Ambler Class A, C, and D Enzymes. *J. Med. Chem.* **2021**, 64 (14), 10155–10166. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00437>.
- (47) Taguchi, J.; Ikeda, T.; Takahashi, R.; Sasaki, I.; Ogasawara, Y.; Dai, T.; Kato, N.; Yamamoto, Y.; Bode, J. W.; Ito, H. Synthesis of Acylborons by Ozonolysis of Alkenylboronates: Preparation of an Enantioenriched Amino Acid Acylboronate. *Angew. Chemie.* **2017**, 56 (44), 13847–13851. <https://doi.org/10.1002/anie.201707933>.
- (48) Thakur, A.; Zhang, K.; Louie, J. Suzuki-Miyaura Coupling of Heteroaryl Boronic Acids and Vinyl Chlorides. *Chem. Commun.* **2012**, 48 (2), 203–205. <https://doi.org/10.1039/c1cc15990a>.
- (49) Lennox, A. J. J.; Lloyd-Jones, G. C. The Slow-Release Strategy in Suzuki-Miyaura Coupling. *Isr. J. Chem.* **2010**, 50 (5–6), 664–674. <https://doi.org/10.1002/ijch.201000074>.
- (50) Cox, P. A.; Leach, A. G.; Campbell, A. D.; Lloyd-Jones, G. C. Protodeboronation of Heteroaromatic, Vinyl, and Cyclopropyl Boronic Acids: PH-Rate Profiles, Autocatalysis, and Disproportionation. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138 (29), 9145–9157. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b03283>.
- (51) Gibson, S. M.; Macmillan, D.; Sheppard, T. D. Synthesis of Boronocysteine.

- Synlett* **2018**, 29 (3), 314–317. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1591491>.
- (52) Xu, L. Decarboxylative Borylation: New Avenues for the Preparation of Organoboron Compounds. *European J. Org. Chem.* **2018**, 29, 3884–3890. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201800534>.
- (53) Dang, L.; Lin, Z.; Marder, T. B. Boryl Ligands and Their Roles in Metal-Catalysed Borylation Reactions. *Chem. Commun.* **2009**, 27, 3987–3995. <https://doi.org/10.1039/b903098k>.
- (54) Bandyopadhyay, A.; Cambray, S.; Gao, J. Fast and Selective Labeling of N-Terminal Cysteines at Neutral PH: Via Thiazolidino Boronate Formation. *Chem. Sci.* **2016**, 7 (7), 4589–4593. <https://doi.org/10.1039/c6sc00172f>.

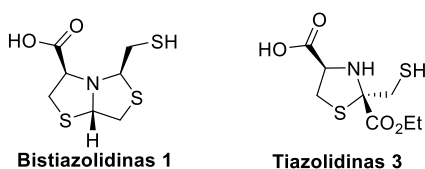
CAPÍTULO 9

Conclusiones y perspectivas

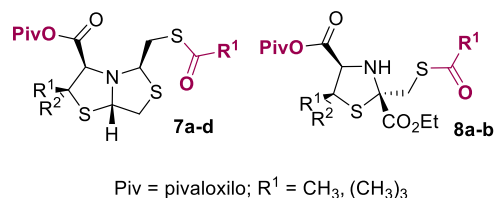
9.1 Conclusiones

Durante el transcurso de esta tesis, se trabajó en el diseño y síntesis de inhibidores de β -lactamasas basados en estructuras líderes de bistiazolidinas BTZ **1** y tiazolidinas TZ **3**, ver Figura 9.1.

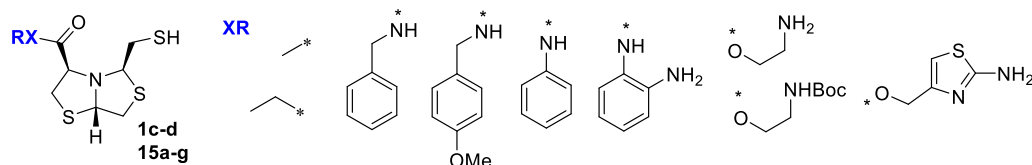
A) Antecedentes de grupo:



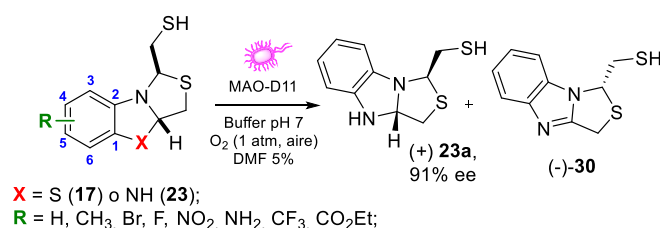
B) Prodrogas de BTZ y TZ preparadas:



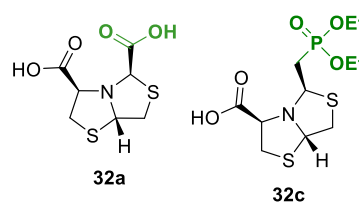
C) Ésteres y amidas de BTZ preparadas:



D) Benzobisheterociclos preparados:



E) Bioisósteros del grupo tiol preparados:



F) Derivados conteniendo ácidos o ésteres borónicos preparados:

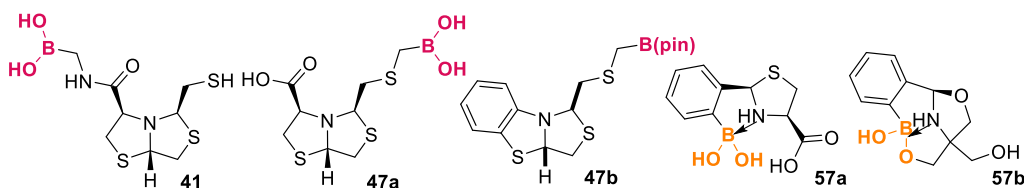


Figura 1: A) Antecedentes de grupo; B) Prodrogas de BTZ y TZ preparadas; C) Ésteres y amidas de BTZ preparadas; D) Benzobisheterociclos preparados; E) Bioisósteros del grupo tiol preparados y F) Derivados conteniendo ácidos o ésteres borónicos preparados.

El trabajo realizado durante este período se puede resumir en los siguientes puntos:

1) Fue posible la preparación de prodrogas de BTZ y TZ protegiendo el tiol y el carboxilato. Los derivados fueron evaluados respecto a su estabilidad en buffer acuoso a diferentes pHs y en plasma, Figura 9.1-B). Los compuestos preparados mostraron una estabilidad adecuada en las diferentes condiciones

ensayadas, a diferencia de los compuestos originales que se degradan más fácilmente. En particular, el compuesto **7c**, en donde el ácido carboxílico está protegido como pivaloxilo y el tiol como tioéster de pivaloilo, mostró el mejor perfil y, por lo tanto, sería un buen candidato a prodroga. Un resultado interesante es que la prodroga **7a** logró reducir la MIC de meropenem frente a cepas resistentes en el mismo orden que la droga original **1a**. Esto indicaría que las esterasas microbianas activan el profármaco en el periplasma bacteriano.

2) Se sintetizaron análogos de BTZ **1a** en donde el ácido carboxílico está formando un éster o una amida con alcoholes o aminas conteniendo grupos aromáticos y/o conteniendo aminas primarias, Figura 9.1C). Para la preparación de estos compuestos se desarrolló una metodología de desprotección de acetil-tioésteres en condiciones suaves mediante intercambios tiol/tioéster usando tioles (en fase homogénea y heterogénea) y 2-aminotioles.

Los compuestos **1c-d** (éster metílico y etílico, respectivamente) resultaron ligeramente más activos que el compuesto original **1a** en enzimas de relevancia clínica: NDM-1, IMP-1, VIM-2 y L1. El resto de los análogos **15a-g**, mantuvieron los valores de IC_{50} en el rango micromolar para NDM-1 y L1 y resultaron inactivos frente a Sfh-1. Sin embargo, los experimentos Time-kill y MIC mostraron que ninguno de estos compuestos es activo frente a células de *E. coli* que expresan NDM-1.

3) Se diseñaron y prepararon benzoheterociclos racémicos del tipo benzobisheterociclos (BBH) y benzomonoheterociclos (BMH), Figura 9.1D. En términos generales, estos compuestos resultaron ser mejores inhibidores de MBL respecto a los compuestos originales, con valores de K_i en el orden μM y nM. En particular, los compuestos BBH **17a** (X=S, R=H), **17f** (X=S, R=4-NH₂), **23e** (X=NH, R=4-CO₂Et) y **23f** (X=NH, R=5-CO₂Et) resultaron inhibidores muy potentes frente a NDM-1, IMP-1, VIM-2 y L1, con valores de K_i en el orden submicromolar.

4) Se logró realizar una resolución enantiomérica de BBH por métodos cinéticos utilizando isoenzimas de MAO-N. En particular, la variante D11 mostró los mejores resultados para el compuesto más simple sin sustituir **23e** (X=NH, R=4-CO₂Et), con un 95% ee y 35% de rendimiento del enantiómero puro. Este

sustrato de benzoimidazolidinil-tiazolidinas no se había utilizado hasta ahora en una resolución enantiomérica mediada por MAO.

Se realizaron cálculos teóricos de α_D y dicroísmo circular electrónico, que nos permitieron, mediante la comparación con los datos experimentales, asignar el enantiómero aislado como el (*R,R*)-**23e**. Este compuesto fue evaluado frente a NDM-1, y resultó ligeramente más activo que la mezcla racémica. El producto de oxidación bencimidazol aislado de la reacción de resolución también fue evaluado y mostró un valor de $K_i = 0.024 \mu\text{M}$ frente a NDM-1, casi 300 veces más potente que el compuesto de referencia **1a**. Este compuesto es el más activo preparado hasta el momento por el grupo. Esto supone un punto de partida para la síntesis de nuevos análogos.

5) Se prepararon 2 análogos de BTZ **1a** en donde la cadena de mercaptometilo se sustituye por otros grupos capaces de coordinar con zinc: -CO₂H y -PO(OEt)₂, Figura 9.1E). Para la síntesis de estos compuestos se desarrolló una metodología de síntesis a través de reacciones de intercambio de aldehídos utilizando NH₄OAc como catalizador y MeOH como solvente. Ambos compuestos preparados resultaron inactivos frente a la enzima NDM-1.

6) Se prepararon derivados de BTZ y TZ con sustituciones a nivel del tiol o el ácido carboxílico, por grupos conteniendo ácidos o ésteres borónicos, Figura 9.1F). Algunos de estos compuestos resultaron activos frente a SBL y MBL, e inhibieron el crecimiento bacteriano de microorganismos resistentes. Estos son los primeros ejemplos de inhibición conjunta de SBL y MBL en sistemas BTZ.

En su conjunto, en este trabajo se logró diseñar y preparar una serie de análogos de BTZ y TZ, lográndose resultados altamente prometedores. Los nuevos compuestos se ensayaron frente a enzimas β -lactamasas, y se lograron identificar las características estructurales claves que orienten al diseño racional de nuevos inhibidores en trabajos futuros.

9.2 Perspectivas

Una estrategia que mejoró notablemente el orden de actividad de los compuestos originales fue la síntesis de BBH a través de la inclusión de un anillo aromático sustituido con diferentes grupos. Otro enfoque muy prometedor es la

inclusión de ácidos o ésteres borónicos en las BTZ, que además de mejorar la actividad frente a MBL respecto al compuesto original **1a**, expande el espectro de acción para incluir también SBL.

Los resultados obtenidos justifican la búsqueda de compuestos con mayor potencia inhibitoria tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Como perspectivas a futuro, nos planteamos:

1) Síntesis de nuevos BBH, explorando otras sustituciones en posición -5 del anillo aromático, en particular grupos electrón-atrayentes como ácidos sulfónicos, sulfonamidas, dado que según estudios de docking aumentarían las interacciones con la enzima. Además, se propone la introducción de grupos alquilaminas para aumentar la solubilidad de los derivados y la penetración a través de la pared celular bacteriana.

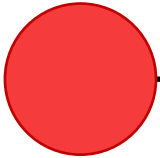
Por último, dado el excelente resultado obtenido para el compuesto benzimidazol, se plantea cambiar el scaffold bistiazolidina por otros heterociclos aromáticos como piridinas, pirrol o imidazol.

2) Estudiar otras metodologías para introducir ácidos borónicos en BTZ y TZ. En particular, se plantea la síntesis de la boronocisteína para luego ciclar con ditianos **6a-c** y obtener una nueva serie de derivados borónicos. Además, se plantea sustituir el tiol y el ácido carboxílico en las TZ.

3) Explorar otros enfoques biocatalíticos para la obtención de BBH enantioméricamente puras, en particular para aquellos sustratos que no pudieron ser resueltos con la MAO D11, como las BNTZ **17** y las BIMi **23** sustituidas.

En primer lugar, se propone explorar la síntesis enantioselectiva de BBH utilizando otras variantes de MAO-N y variando las condiciones experimentales como pH, solvente, temperatura.

Por otro lado, se plantea utilizar otras AminoOxidasas estereocomplementarias a la MAO-N, o diseñar una estrategia de resolución cinética dinámica con cascada MAO/IREDs. Por último, un enfoque más novedoso sería desarrollar variantes de la MAO D-11 con mutaciones sitio dirigidas en el sitio activo de la enzima.



CAPÍTULO 10

Parte experimental

10.1 Generalidades

10.1.1 Disolventes y Reactivos

Los reactivos utilizados fueron adquiridos comercialmente y utilizados sin previa purificación. Los disolventes fueron destilados previamente a su uso y los disolventes anhidros fueron secados de acuerdo a bibliografía.¹ Los disolventes calidad HPLC fueron filtrados a través de filtros 0.2 μm y sonicados. Las soluciones amortiguadoras fueron preparadas acorde a métodos reportados.

10.1.2 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 I_2 o reveladores irreversibles por inmersión con posterior calentamiento. Los reveladores irreversibles utilizados fueron: 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 μm diámetro (Merck grado 60, 230-400 mesh) y cromatografía en capa fina preparativa con fase estacionaria de sílica gel F-254 de 500 μm (SAI, 20x20 cm).

10.1.3 Puntos de fusión

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

10.1.4 Espectrometría de masas

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

10.1.5 Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en espectrómetros Bruker Avance (400 o 600 MHz para ^1H RMN y 100 o 125 MHz para ^{13}C RMN) a 21 °C. Se utilizó CDCl_3 como solvente, a menos que se indique lo contrario. Los desplazamientos químicos (δ) se informan en ppm y de la siguiente manera: multiplicidad (s = singulete, d= doblete, t = triplete, q = cuarteto, m = multiplete, br = señal ancha), constantes de acoplamiento (J) en Hz, e integración. Las asignaciones de ^1H y ^{13}C RMN fueron hechas basadas en una combinación de espectros COSY, HSQC y HMBC.

10.1.6 Rotación específica

Las medidas de Rotación Óptica fueron realizadas utilizando un polarímetro JASCO p-2000 con una celda de 2.0 mL (concentración expresada en g/100 mL), camino óptico de 100 mm y lámpara de sodio a 20°C.

10.1.7 Difractómetro Rayos X

La resolución de las estructuras cristalinas de los compuestos sintetizados se realizó por difracción de rayos X de un monocristal a través de un difractómetro automático Bruker D8 Venture.

10.1.8 Equipo HPLC y validación de métodos

Los análisis por HPLC fueron realizados usando un equipo Waters HPLC con bombas binarias (Waters 1525) y un detector de arreglo de diodos (Waters 2996), equipado con un loop de inyección de 20 μL (Rheodyne 1727).

10.1.9 Dicroísmo Circular Electrónico

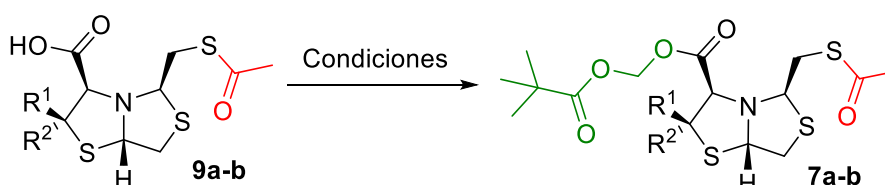
Los experimentos de ECD se realizaron en un instrumento Chirascan V100 con muestras disueltas en CHCl_3 a una concentración de 0,2 mg/mL en cubetas de cuarzo de 1 mm. Se adquirieron 3 barridos por espectro. Los espectros ECD del disolvente se registraron en las mismas condiciones y luego

se restaron de los espectros ECD de la muestra. Los espectros UV se obtuvieron del mismo aparato, a partir de señales de CC ajustadas por voltaje.

10.2 Procedimientos Sintéticos

10.2.1 Procedimientos Generales

Procedimientos generales para la síntesis de prodrogas:



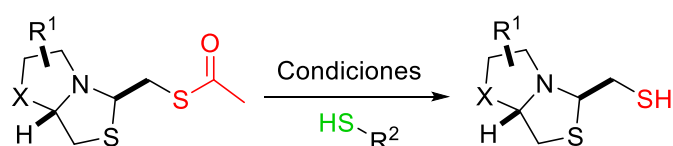
Método a: En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se transfiere **9a** (350 mg, 1.25 mmol), y se agrega con agitación clorometil pivalato (565 mg, 3.75 mmol) y TEA (177 mg, 1.75 mmol) en baño de hielo. La mezcla se lleva a temperatura ambiente y se agita 24 h. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida. Se purifica por cromatografía en columna sobre SiO₂, fase móvil *n*-hexanos:AcOEt (8:2) para dar **10** (186 mg, 48%). No se detectó el producto **7a** en el crudo de reacción según el análisis del crudo por ¹H RMN.

Método b: En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se disuelve **9a** (150 mg, 0.5 mmol) en DMF (1 mL), y se agrega clorometil pivalato (242 mg, 1.6 mmol) y TEA (76 mg, 0.5 mmol) bajo baño de hielo. La mezcla se lleva a temperatura ambiente y se agita 24 h. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida, y se purifica por cromatografía en columna sobre SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/CH₂Cl₂ (8:2) para dar **7a** (104 mg, 53%).

Método c: En un balón de una boca, se suspende **9a** (150 mg, 1.25 mmol) en AcOEt (4 mL) y se agrega NaOAc (103 mg, 1.25 mmol). La mezcla se agita 2 h, para luego concentrar y lavar con hexano (3x5 mL). El crudo de la reacción se

retoma en DMF (1 mL), se agrega clorometil pivalato (242 mg, 1.6 mmol) y la mezcla se agita durante 24 h. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida, y se purifica por cromatografía en columna sobre SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/CH₂Cl₂ (8:2) para dar **7a** (127 mg, 65%).

Procedimientos generales para la desprotección de tioésteres:



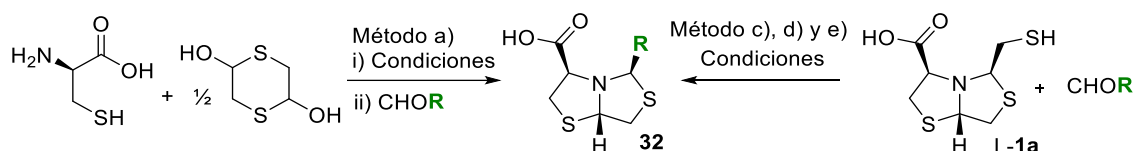
Método a: En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se disuelve **9a** (50 mg, 0.18 mmol) en MeOH (1 mL) y se agrega buffer fosfato pH 8 (19 mL) y ácido tioglicólico (25 µL, 0.36 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 24 h. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar **1a** (32 mg, 74%)

Método b: A un cartucho de plástico para fase sólida provisto con filtro conteniendo el catalizador soportado en polímero (TG-NCO-SH, 396.1 mg, 0.162 mmol) se añade una solución de **9a** (22.7 mg, 0.081 mmol) en MeOH (0.5 mL) y buffer fosfato pH 8 (1.0 mL) y se agita durante 24 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Luego, el polímero se filtra y se lava con MeOH. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar **1a** (18 mg, 94%). La preparación del polímero se detalla en la sección **10.2.3 Preparación del reactivo soportado en polímero (TG-NCO-SH)**.

Método c: En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se suspende **9a** (100 mg, 0.36 mmol) en MeOH (2 mL) y se agrega buffer fosfato pH 8 (18 mL) y cisteamina clorhidrato (85 mg, 0.72 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. El crudo de la reacción se vuelca sobre una

solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar **1a** (67 mg, 78%).

*Procedimientos generales para la síntesis de bioisómeros **32**:*



Método a: En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se suspende L-cisteína (100 mg, 0.8 mmol) en MeOH (20 mL), y se agrega 1,4-ditiano-2,5-diol (150 mg, 0.6 mmol) y NH₄OAc (92 mg, 1.2 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 1 h, y luego se enfría. Se agrega isobutiraldehído (173 mg, 2.4 mmol) y se calienta a reflujo 2 h. La mezcla se enfría y se agita durante 16 h a temperatura ambiente. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida, y se purifica por cromatografía en columna sobre SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar **32d** (108 mg, 58%).

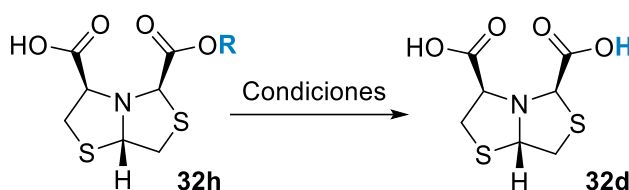
Método c: En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se suspende BTZ **1a** (50 mg, 0.2 mmol) en MeOH (5 mL) y se agrega NH₄OAc (23 mg, 0.3 mmol) e isobutiraldehído (44 mg, 0.6 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 2 h, y luego se enfría. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en columna sobre SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar **32d** (40 mg, 65%).

Método d: En un vial para microondas de 7 mL se suspende BTZ **1a** (50 mg, 0.2 mmol) en MeOH (1 mL) y se agrega NH₄OAc (23 mg, 0.3 mmol) e isobutiraldehído (44 mg, 0.6 mmol). La mezcla se calienta con agitación en microondas a 65 °C, Pmax 60W durante 25 minutos. El crudo de la reacción se

vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida, y se purifica por cromatografía en columna sobre SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar **32d** (43 mg, 69%).

Método e: En un vial para microondas de 7 mL se suspende BTZ **1a** (50 mg, 0.2 mmol) en EtOH (1 mL) y se agrega NH₄OAc (23 mg, 0.3 mmol), dietil (2-oxoetil)fosfonato (108 mg, 0.6 mmol) y In(OTf)₃ (11 mg, 0.02 mmol). La mezcla se calienta con agitación en microondas a 65 °C, Pmax 60W durante 25 minutos. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida, y se purifica por cromatografía en columna sobre SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt/AcOH (2:8:0.1) para dar **32c** (35 mg, 54%).

Procedimiento general para la hidrólisis de ésteres:



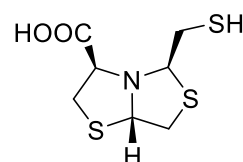
Hidrólisis de 32h: En un balón de dos bocas se disuelve **32h** (50 mg, 0.2 mmol) en THF (5 mL) y se agrega una solución acuosa de LiOH (10%, 1 mL). La mezcla de reacción se agita por 30 min a temperatura ambiente. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución de HCl 5% y se extrae con AcOEt (4x25 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida para dar **32a** (47 mg, 100%).

10.2.2 Síntesis

Síntesis representativa de BTZ 1a-e:

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-(mercaptometil)tetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-ácido

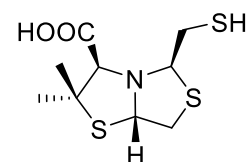
carboxílico (L-1a): En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se suspende L-cisteína (500 mg, 4.1 mmol) en MeOH (20 mL), y se agrega 1,4-ditiano-2,5-diol (749 mg, 4.9 mmol)



y *p*-TsOH (69 mg, 0.4 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 1 h, y luego se enfría. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida. El crudo purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar una mezcla **L-1a** (807 mg, 83%, *syn:anti* 95:5) + **13** (49 mg, 5%). **L-1a**: sólido blanco; ¹H RMN δ 5.05 (dd, *J* = 5.8, 4.2 Hz, 1H), 4.32 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 7.1, 3.3 Hz, 1H), 3.55 (dd, *J* = 12.0, 5.8 Hz, 1H), 3.43 (dd, *J* = 11.4, 3.3 Hz, 1H), 3.33 (dd, *J* = 11.4, 7.1 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 12.0, 4.2 Hz, 1H), 2.81 (dd, *J* = 8.5, 6.9 Hz, 2H), 1.86 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H). Las propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las descritas en la literatura.²

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-(mercaptometil)-2,2-dimetiltetrahidro-5H-tiazol[4,3-*b*]tiazol-

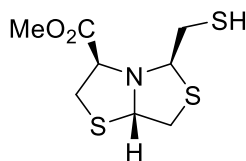
3- ácido carboxílico (L-1b): El compuesto **L-1b** fue preparado de manera análoga a **L-1a** utilizando como aminotiol de partida la L-penicilamina (500 mg, 3.4 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-



hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar **L-1b** (713 mg, 79%, *syn:anti* 95:5), como sólido blanco; PF 89-92 °C; ¹H RMN δ 4.98 (dd, *J* = 6.6, 5.4 Hz, 1H), 4.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.43 (dd, *J* = 11.7, 6.6 Hz, 1H), 3.06 (dd, *J* = 11.7, 5.4 Hz, 1H), 2.81 (m, 2H), 1.89 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.52 (s, 3H). Las propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las descritas en la literatura.²

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-(mercaptometil)tetrahidro-5H-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-

metil carboxilato (L-1c): En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se suspende L-cisteína metil éster clorhidrato (200 mg, 1.17 mmol) en MeOH (20 mL), y se

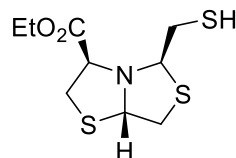


agrega 1,4-ditiano-2,5-diol (214 mg, 1.4 mmol) y TEA (169 μL, 1.17 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 1 h, y luego se enfría. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (8:2) para dar **L-1c** (185 mg, 63%, *syn:anti* 95:5), como un aceite transparente: ¹H RMN δ 5.08 (dd, *J* = 5.2, 3.9 Hz, 1H), 4.29 (dd, *J* = 7.6, 6.1 Hz, 1H), 4.23 (dd, *J* = 6.5, 5.2 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.53 (dd, *J* = 11.9, 5.4 Hz, 1H),

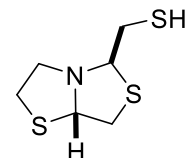
3.33 (dd, $J = 11.0, 5.0$ Hz, 1H), 3.27 (dd, $J = 10.9, 6.7$ Hz, 1H), 3.08 (dd, $J = 11.9, 3.8$ Hz, 1H), 2.87 (dt, $J = 13.7, 7.5$ Hz, 1H), 2.63 (ddd, $J = 13.6, 9.5, 6.0$ Hz, 1H), 1.96 (dd, $J = 9.5, 7.4$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 171.1, 75.1, 73.5, 70.5, 52.8, 39.2, 34.3, 33.9.

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-(mercaptometil)tetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-etil

carboxilato (L-1d): El compuesto L-1d fue preparado de manera análoga a L-1c utilizando como aminotiol de partida la L-cisteína etil éster clorhidrato (200 mg, 1.01 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (8:2) para dar L-1d (173 mg, 68%, *syn:anti* 95:5), como un aceite transparente: ^1H RMN δ 5.08 (dd, $J = 5.3, 4.0$ Hz, 1H), 4.30 (dd, $J = 7.5, 6.1$ Hz, 1H), 4.21 (m, 3H), 3.53 (dd, $J = 11.9, 5.4$ Hz, 1H), 3.33 (dd, $J = 10.9, 5.2$ Hz, 1H), 3.27 (dd, $J = 10.9, 6.7$ Hz, 1H), 3.08 (dd, $J = 11.9, 3.9$ Hz, 1H), 2.88 (dt, $J = 13.6, 7.5$ Hz, 1H), 2.63 (ddd, $J = 13.6, 9.5, 6.1$ Hz, 1H), 1.97 (dd, $J = 9.5, 7.4$ Hz, 1H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). Las propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las descritas en la literatura.³



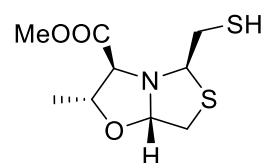
(±)-(-tetrahydro-5*H*-thiazolo[4,3-*b*]thiazol-5-yl)methanethiol (1e): El compuesto 1e fue preparado de manera análoga a L-1c utilizando como aminotiol de partida cisteamina clorhidrato (100 mg, 0.88 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (8:2) para dar 1e (90 mg, 53%, *syn:anti* 95:5), como un aceite transparente: ^1H RMN δ 4.97 (dd, $J = 5.0, 3.8$ Hz, 1H), 4.24 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 3.54 (dd, $J = 11.5, 5.1$ Hz, 1H), 3.48 (dt, $J = 10.9, 5.3$ Hz, 1H), 3.21 (dt, $J = 11.5, 6.9$ Hz, 1H), 3.10 (m, 3H), 2.81 (dt, $J = 13.8, 7.3$ Hz, 1H), 2.65 (ddd, $J = 13.6, 9.1, 6.0$ Hz, 1H), 1.83 (dd, $J = 9.1, 7.6$ Hz, 1H). Las propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las descritas en la literatura.³



Síntesis representativa de OTZ 2a-b:

(2*R*,3*S*,5*R*,7*aS*)-5-(mercaptometil)-2-metiltetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]oxazol-

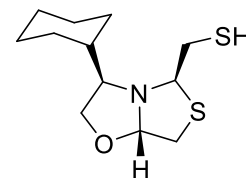
3- metil carboxilato (L-2a): En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N_2 , se suspende L-treonina metil éster clorhidrato (200 mg, 1.18 mmol) en buffer fosfato pH 5 (20



mL), y se agrega 1,4-ditiano-2,5-diol (213 mg, 1.42 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 1 h, y luego se enfría. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (7:3) para dar **L-2a** (232 mg, 79%), como aceite transparente: ¹H RMN δ 5.21 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 8.2, 6.1 Hz, 1H), 4.07 (dq, *J* = 8.4, 6.0 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.29 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.24 (dd, *J* = 12.9, 4.4 Hz, 1H), 3.07 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 2.76 (ddd, *J* = 13.5, 8.2, 7.1 Hz, 1H), 2.55 (ddd, *J* = 13.5, 9.3, 6.1 Hz, 1H), 2.03 (dd, *J* = 9.3, 7.0 Hz, 1H), 1.42 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H). Las propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las descritas en la literatura.⁴

((3R,5R,7aS)-3-ciclohexiltetrahydro-5H-thiazol[4,3-b]oxazol-5-il)metanetiol

(2b): En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se suspende (*R*)-ciclohexilglicinol (100 mg, 0.7 mmol) en tolueno (20 mL), y se agrega 1,4-ditiano-2,5-diol (127 mg, 0.84 mmol) y *p*-TsOH (12 mg, 0.07 mmol). La mezcla se calienta a reflujo

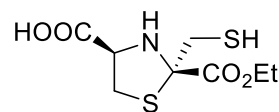


durante 1 h, y luego se enfría. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (9:1) para dar **2b** (161 mg, 89%) como un aceite transparente: ¹H RMN δ 5.04 (dd, *J* = 4.2, 0.8 Hz, 1H), 4.22 (dd, *J* = 7.7, 5.9 Hz, 1H), 3.99 (dd, *J* = 8.4, 6.8 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J* = 8.4, 7.2 Hz, 1H), 3.23 (dd, *J* = 12.5, 4.3 Hz, 1H), 3.04 (dd, *J* = 12.5, 1.0 Hz, 1H), 2.91 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 2.76 (ddd, *J* = 13.7, 8.8, 5.9 Hz, 1H), 2.62 (dt, *J* = 13.6, 7.8 Hz, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.79 (dd, *J* = 8.7, 7.9 Hz, 1H), 1.72 (m, 4H), 1.40 (m, 1H), 1.20 (m, 3H), 0.96 (m, 2H). Las propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las descritas en la literatura.⁴

Síntesis representativa de TZ **3a-b**:

(2S,4R)-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)thiazolidin-4-ácido carboxílico (L-anti 3a): En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂,

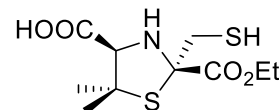
se suspende L-cisteína (500 mg, 4.1 mmol) en EtOH (20 mL), y se agrega dietil-2,5-dihidroxi-1,4-ditiano-2,5-



dicarboxilato (729 mg, 2.5 mmol) y *p*-TsOH (69 mg, 0.4 mmol). La mezcla se refluxa por 1 h, luego se enfría y concentra. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar L-anti **3a** (422 mg, 41%), como sólido blanco; ¹H RMN δ 4.32 (m, 2H), 4.17 (dd, *J* = 9.0, 6.2 Hz, 1H), 3.43 (dd, *J* = 10.7, 6.2 Hz, 1H), 3.10 (dd, *J* = 10.7, 9.0 Hz, 1H), 3.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 1.95 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). Las propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las descritas en la literatura.⁵

(2S,4R)-2-(etoxicarbonil)-2-(mercaptometil)-5,5-dimetil-thiazolidin-4-ácido carboxílico (L-anti 3b): El compuesto L-anti **3b** fue

preparado de manera análoga a L-anti **3a** utilizando como aminotiol de partida la L-penicilamina (500 mg, 3.4 mmol).

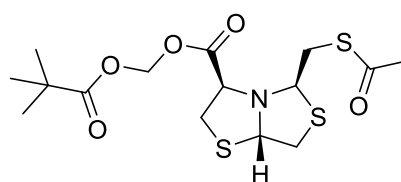


Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar L-anti **3b** (332 mg, 35%), como un aceite transparente: ¹H RMN δ 4.31 (m, 2H), 3.84 (s, 1H), 3.02 (dd, *J* = 13.6, 4.7 Hz, 1H), 2.93 (dd, *J* = 13.6, 10.9 Hz, 1H), 2.00 (dd, *J* = 10.9, 4.7 Hz, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.29 (s, 3H). Las propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las descritas en la literatura.⁵

Síntesis de **7a-d**:

(3R,5R,7aS)-(pivaloiloxi)metil 5-((acetiltio) metil)tetrahydro-2H-thiazol[4,3-b]thiazol-3-carboxilato (7a): El compuesto **7a** se

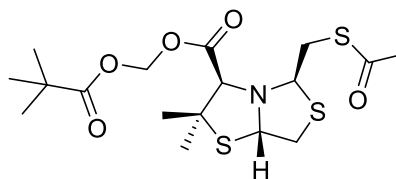
prepara según procedimiento general para la preparación de prodrogas, **método c**: **7a**: sólido blanco; PF = 48–52°C; ¹H RMN δ 5.82 (d, *J* = 5.4



Hz, 1H), 5.79 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.18 (dd, $J = 5.2, 2.8$ Hz, 1H), 4.31 (dd, $J = 6.4, 4.5$ Hz, 1H), 4.23 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.60 (ddd, $J = 12.0, 5.2, 0.5$ Hz, 1H), 3.26 (m, 3H), 3.09 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.22 (s, 9H); ^{13}C RMN δ 195.5, 177.2, 169.3, 80.0, 74.3, 71.7, 70.3, 38.9, 38.5, 37.9, 34.4, 30.8, 27.0; HRMS calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{NaS}_3^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 416.0636, valor encontrado 416.0636; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -60.7$ (CH_2Cl_2 , $c = 2.0$).

(3*R*,5*R*,7*aS*)-(pivaloiloxi)metil-5-((acetiltio)metil)-2,2-dimetiltetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-carboxilato (7b):** El

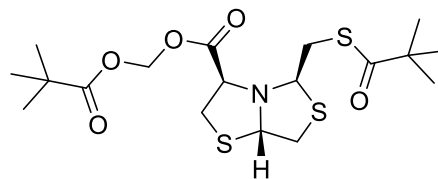
compuesto **7b** se prepara según procedimiento general para la preparación de prodrogas, **método c)** utilizando como material de partida **9b**



(200 mg, 0.65 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos/ CH_2Cl_2 (8:2) para dar **7b** (162 mg, 59%) como un aceite transparente: ^1H RMN δ 5.92 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.76 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.96 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.38 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 3.72 (s, 1H), 3.37 (m, 2H), 3.04 (ddd, $J = 15.5, 12.6, 7.0$ Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.20 (s, 9H); ^{13}C RMN δ 195.3, 176.9, 168.1, 79.8, 76.7, 72.3, 68.8, 55.5, 40.9, 38.8, 36.9, 30.6, 28.6, 27.9, 27.0; HRMS calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NNaO}_5\text{S}_3^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 444.0946, valor encontrado 444.0949; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -52.6$ (CH_2Cl_2 , $c = 0.21$).

(3*R*,5*R*,7*aS*)-(pivaloiloxi)metil-5-((pivaloyltio)metil)tetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-carboxilato (7c):** El compuesto **7c**

se prepara según procedimiento general para la preparación de prodrogas, **método c)**, utilizando como material de partida **1a** (200 mg,

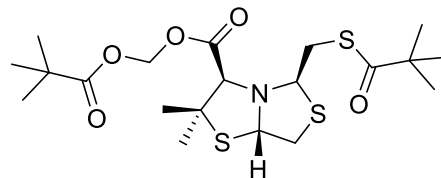


0.84 mmol) y clorometil pivalato (222 mg, 1.84 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos/ CH_2Cl_2 (8:2) para dar **7c** (209 mg, 61%) y **11a** (152 mg, 26%). **7c**: sólido blanco; PF = 66-72°C; ^1H RMN δ 5.81 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 5.77 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 5.22 (dd, $J = 5.1, 2.7$ Hz, 1H), 4.34 (dd, $J = 6.7, 4.1$ Hz, 1H), 4.19 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.61 (dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, 1H), 3.30 (dd, $J = 11.1, 6.8$ Hz, 1H), 3.24 (dd, $J = 10.8, 4.5$ Hz, 1H), 3.23 (dd, $J = 13.6, 6.3$ Hz, 1H), 3.10 (dd, $J = 12.0, 2.7$ Hz, 1H), 3.05 (dd, $J = 13.7, 7.2$ Hz, 1H), 1.23 (s, 9H), 1.22 (s, 9H); ^{13}C RMN δ 206.0, 181.4, 176.9, 168.1, 79.8, 72.6, 69.0, 55.4, 46.5, 40.8, 38.8, 36.2, 28.7, 27.8, 27.4, 26.9; HRMS calculado para

$C_{18}H_{29}NO_5NaS_3^+$ $[M+Na]^+$ 458.1107, valor encontrado 458.1108; $[\alpha]_D^{20} = -53.6$ (CH_2Cl_2 , $c = 0.5$).

(3R,5R,7aS) (pivaloiloxi)metil -2,2-dimetil-5-((pivaloiltio)metil)tetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol-3-carboxilato (7d): El

compuesto **7d** se prepara según procedimiento general para la preparación de prodrogas, **método c)**, utilizando como material de partida

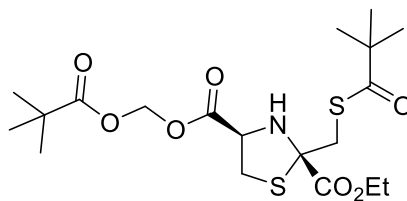


1b (200 mg, 0.75 mmol) y clorometil pivalato (181 mg, 1.5 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil n -hexanos/ CH_2Cl_2 (8:2) para dar **7d** (150 mg, 43%) y **11b** (176 mg, 31%). **7d**: sólido blanco; PF = 60-65°C; 1H RMN δ 5.92 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.75 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.99 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.36 (dd, $J = 7.7, 6.9$ Hz, 1H), 3.72 (s, 1H), 3.39 (dd, $J = 11.4, 6.4$ Hz, 1H), 3.31 (dd, $J = 13.7, 6.9$ Hz, 1H), 3.01 (ddd, $J = 10.1, 7.1, 4.2$ Hz, 2H), 1.55 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.23 (s, 9H), 1.20 (s, 9H); ^{13}C RMN δ 206.1, 177.0, 168.2, 79.9, 76.9, 72.7, 69.1, 55.5, 46.6, 40.9, 38.9, 36.3, 28.8, 27.9, 27.5, 27.0; HRMS calculado para $C_{20}H_{33}NO_5NaS_3^+$ $[M+Na]^+$ 486.1419, valor encontrado 486.1413; $[\alpha]_D^{20} = -53.1$ (CH_2Cl_2 , $c = 1.93$).

Síntesis de 8a-b:

(2S,4R)-2-etil-4-((pivaloiloxi)metil) -2-((pivaloiltio)metil)tiazolidin-2,4-dicarboxilato (8a): El compuesto **8a** se prepara

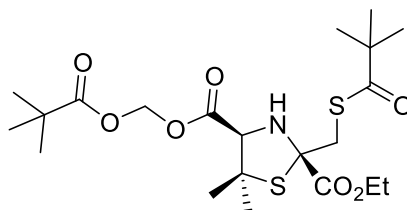
según procedimiento general para la preparación de prodrogas, **método c)**, utilizando como material de partida **3a** (200 mg, 0.8 mmol) y



clorometil pivalato (205 mg, 1.7 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil n -hexanos/ $AcOEt$ (8:2) para dar **8a** (111 mg, 31%) y **12a** (87 mg, 15%). **8a**: aceite transparente: 1H RMN δ 5.87 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.79 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.26 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.15 (ddd, $J = 12.5, 10.4, 5.8$ Hz, 1H), 3.64 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 3.56 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 3.40 (m, 2H), 2.85 (t, $J = 10.3$ Hz, 1H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.21 (s, 9H), 1.20 (s, 9H); ^{13}C RMN δ 205.2, 177.1, 170.7, 169.0, 80.0, 78.5, 65.0, 62.8, 46.7, 40.1, 38.9, 36.8, 27.4, 27.0, 14.1; HRMS calculado para $C_{19}H_{31}NO_7NaS_2^+$ $[M+Na]^+$ 472.1440, valor encontrado 472.1441; $[\alpha]_D^{20} = -59.8$ (CH_2Cl_2 , $c = 0.16$).

(2*S*,4*R*)-2-etil-4-((pivaloiloxi)metil)-5,5-dimetil-2-((pivaloitio)metil)thiazolidin-2,4-dicarboxilato (8b**):**

El compuesto **8b** se prepara según procedimiento general para la preparación de prodrogas, **método c**), utilizando como material de partida **3b** (200 mg, 0.7 mmol)

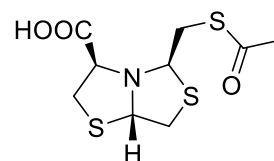


y clorometil pivalato (205 mg, 1.7 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (8:2) para dar **8b** (97 mg, 29%) y **12b** (99 mg, 18%). **8b**: aceite transparente: ¹H RMN δ 5.93 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 5.73 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.27 (m, 3H), 3.95 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.51 (m, 2H), 1.54 (s, 6H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.21 (s, 9H), 1.20 (s, 9H); ¹³C RMN δ 205.2, 177.0, 171.3, 167.5, 79.9, 75.4, 72.8, 62.7, 61.5, 46.7, 38.9, 37.1, 27.5, 27.0, 26.8, 26.4, 14.1; HRMS calculado para C₂₁H₃₅NO₇NaS₂⁺ [*M*+Na]⁺ 500.1753, valor encontrado 500.1751; [α]_D²⁰ = -43.8 (CH₂Cl₂, *c* = 0.55).

Síntesis representativa de S-acetil BTZ **9a-b**

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-((acetiltio)metil)tetrahidro-5*H*-tiazolo [4,3-*b*]tiazol-3-ácido carboxílico (9a**):**

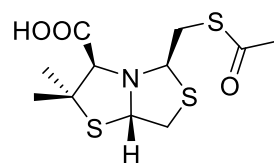
En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se disuelve L-**1a** (500 mg, 2.1 mmol) en CH₂Cl₂ (1 mL) y se enfría en baño de hielo. Luego, se agrega gota a gota una mezcla de Ac₂O:Py 1:1 (2 mL). La



mezcla de reacción se lleva a temperatura ambiente y se agita por 2 h. Se agrega hielo y se agita 15 min. El crudo de la reacción se vuelca sobre Et₂O y se extrae con una solución saturada de NaHCO₃ (3x15 mL). La fase acuosa se lleva a pH 3 y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida para dar **9a** (560 mg, 96%), como un aceite transparente: ¹H RMN δ 5.08 (dd, *J* = 6.0, 4.0 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 8.1, 5.4 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J* = 7.1, 2.8 Hz, 1H), 3.61 (dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H), 3.41 (dd, *J* = 11.4, 2.8 Hz, 1H), 3.31 (dd, *J* = 11.5, 7.1 Hz, 1H), 3.23 (dd, *J* = 14.2, 5.5 Hz, 1H), 3.18 (dd, *J* = 14.2, 8.2 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 12.0, 4.0 Hz, 1H), 2.39 (s, 1H); ¹³C RMN δ 195.7, 172.3, 73.4, 72.1, 71.8, 39.4, 37.5, 33.6, 30.9; HRMS calculado para C₉H₁₃NO₃NaS₃, [*M*+Na]⁺ 301.9950, valor encontrado 301.9957; [α]_D²⁰ = -43.0 (AcOEt, *c* = 1.1).

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-((acetiltio)metil)-2,2-dimetiltetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-

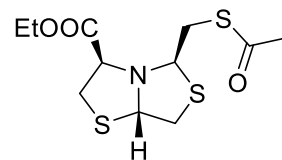
3- ácido carboxílico (9b): El compuesto **9b** fue preparado de manera análoga a **9a** utilizando como material de partida **1b** (500 mg, 1.9 mmol), para dar **9b** (362 mg, 62%)



como un aceite transparente: ^1H RMN δ 8.48 (br, 1H), 5.03 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.41 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 3.75 (s, 1H), 3.49 (dd, J = 11.7, 6.6 Hz, 1H), 3.24 (dd, J = 14.2, 6.6 Hz, 1H), 3.19 (dd, J = 14.1, 7.6 Hz, 1H), 3.04 (dd, J = 11.7, 5.4 Hz, 1H), 2.39 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.49 (s, 3H); ^{13}C RMN δ 195.6, 172.0, 78.5, 72.4, 69.3, 55.1, 40.7, 36.7, 30.7, 28.1, 27.9; HRMS calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{Na}_2\text{S}_3$, $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$ 352.0088, valor encontrado 352.0088; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -38.2 (CH_2Cl_2 , c = 1.1).

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-((acetiltio)metil)tetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-etil

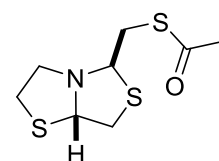
carboxilato (9d): El compuesto **9d** fue preparado de manera análoga a **9a** utilizando como material de partida **1d** (50 mg, 0.19 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2/n$ -hexanos (2:1) para dar



9d (0.041 g, 71%) como un aceite transparente: ^1H RMN δ 5.16 (dd, J = 5.4, 3.5 Hz, 1H), 4.29 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 4.23 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.20 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 3.58 (dd, J = 11.9, 5.4 Hz, 1H), 3.30 (m, 3H), 3.09 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.31 (t, J = 7.1, 3H); ^{13}C RMN δ 195.5, 170.5, 74.0, 71.6, 69.9, 61.7, 38.5, 37.8, 34.5, 30.7, 14.3; HRMS calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{NaS}_3$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 330.0268, valor encontrado 330.0268; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -32.4 (CH_2Cl_2 , c = 1.59).

(±) ((tetrahidro-2*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-5-il)metil)etanetioato (9e):

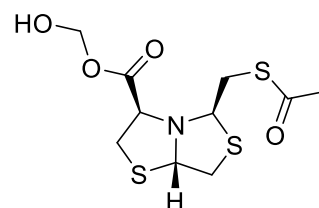
El compuesto **9e** fue preparado de manera análoga a **9a** utilizando como material de partida **1e** (0.05 g, 0.26 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil n -hexanos/ AcOEt



(8:2) para dar **9e** (0.04 g, 65%) como un aceite transparente: ^1H RMN δ 5.02 (dd, J = 5.1, 3.1 Hz, 1H), 4.21 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 3.54 (m, 2H), 3.25 (dd, J = 13.6, 6.2 Hz, 1H), 3.10 (m, 5H), 2.36 (s, 3H); ^{13}C RMN δ 195.6, 75.4, 69.9, 56.9, 38.1, 38.0, 32.1, 30.8; HRMS calculado para $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NONaS}_3$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 258.0057, valor encontrado 258.0061.

(3*R*,5*R*,7*aS*)-hidroximetil-5-((acetiltio)metil)tetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-carboxilato (10):** El compuesto **10** se obtuvo como

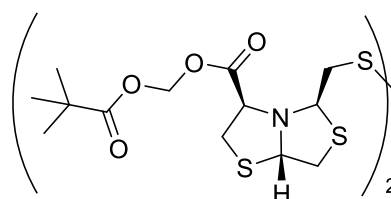
subproducto en la síntesis de **7a** utilizando el **método a)**. Aceite transparente: ^1H RMN 5.48 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 5.46 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 5.16 (dd, $J = 5.3, 3.3$ Hz, 1H), 4.30 (q, $J = 6.9, 6.1$ Hz, 2H), 3.59 (dd, $J = 11.9, 5.3$ Hz, 1H), 3.29 (m, 3H), 3.09 (m, 2H), 2.35 (s, 3H); ^{13}C RMN δ 195.6, 169.9, 88.0, 74.2, 71.8, 70.1, 38.6, 37.8, 34.3, 30.8; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -61.0$ (CH_2Cl_2 , $c = 0.65$).



(3*R*,3'*R*,5*R*,5'*R*,7*aS*,7*a*'*S*)-bis((pivaloiloxi)metil) 5,5'-(disulfanedilbis(metilen)) bis(tetrahidro-5*H*-tiazolo[4,3-*b*]tiazole-3-**

carboxilato) (11a): El compuesto **11a** se obtuvo como subproducto en la síntesis de **7c** utilizando el **método c)**. Aceite transparente: ^1H RMN δ 5.83 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.78 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 5.15

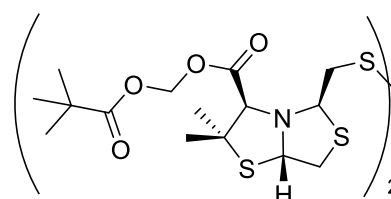
(dd, $J = 5.3, 3.5$ Hz, 1H), 4.46 (dd, $J = 7.4, 6.2$ Hz, 1H), 4.30 (dd, $J = 6.7, 4.7$ Hz, 1H), 3.55 (dd, $J = 11.9, 5.3$ Hz, 1H), 3.33 (dd, $J = 11.0, 6.7$ Hz, 1H), 3.26 (dd, $J = 11.0, 4.7$ Hz, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.93 (dd, $J = 13.6, 6.3$ Hz, 1H), 1.22 (s, 9H); ^{13}C RMN δ 177.1, 169.3, 80.0, 74.1, 71.3, 70.2, 48.5, 38.9, 34.4, 27.0; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -58.3$ (CH_2Cl_2 , $c = 0.69$).



bis((pivaloiloxi)metil) 5,5'-(disulfanedilbis(metilen)) (3*R*,3'*R*,5*R*,5'*R*,7*aS*,7*a*'*S*)-bis(2,2-dimetiltetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-carboxilato) (11b):** El

compuesto **11b** se obtuvo como subproducto en la síntesis de **7d** utilizando el **método c)**. Aceite transparente: δ 5.91 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.75 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.90 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.56 (dd, J

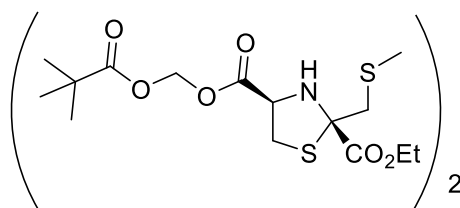
$= 8.7, 5.6$ Hz, 1H), 3.77 (s, 1H), 3.33 (ddd, $J = 13.5, 9.5, 6.0$ Hz, 2H), 3.04 (dd, $J = 11.4, 7.0$ Hz, 1H), 2.85 (dd, $J = 13.5, 8.7$ Hz, 1H), 1.57 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.20 (s, 9H); ^{13}C RMN δ 177.0, 168.3, 79.9, 76.5, 72.5, 69.1, 55.5, 47.2, 41.1, 38.9, 28.9, 28.0, 27.0; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 23.4$ (CH_2Cl_2 , $c = 2.43$).



(2*S*,2'*S*,4*R*,4'*R*)-2-dietil-4-bis((pivaloiloxi)metil (metilen))bis(tiazolidin-2,4-dicarboxilato)

2,2'-(disulfanedilbis

(12a): El compuesto **12a** se obtuvo como subproducto en la síntesis de **8a** utilizando el **método c)**. Aceite transparente: ^1H RMN δ 5.89 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.80 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.30

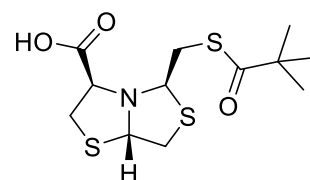


(q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.04 (ddd, $J = 12.4, 10.5, 5.7$ Hz, 1H), 3.70 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 3.42 (m, 3H), 2.85 (t, $J = 10.3$ Hz, 1H), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.22 (s, 9H); ^{13}C RMN δ 177.1, 170.6, 168.9, 80.1, 78.4, 65.0, 62.9, 51.3, 39.9, 38.9, 27.0, 14.2; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -229.5$ (CH_2Cl_2 , $c = 0.18$).

Síntesis de 13:

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-((pivaloil tio)metil)tetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazole-3-ácido

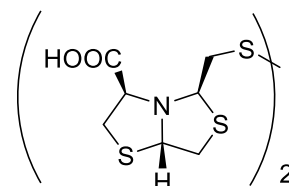
carboxílico (13): En un balón de una boca, se suspende **7c** (20 mg, 0.05 mmol) en buffer fosfato pH 7.4 (10 mL) y se agrega extracto de pancreatina (1 g). La mezcla se agita durante 4 h a temperatura ambiente. El crudo de la



reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida, y se purifica por cromatografía en columna sobre SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar **13** (9 mg, 56%) como un aceite transparente: ^1H RMN δ 5.06 (dd, $J = 6.2, 4.2$ Hz, 1H), 4.39 (dd, $J = 8.7, 4.9$ Hz, 1H), 4.13 (dd, $J = 7.2, 2.5$ Hz, 1H), 3.61 (dd, $J = 12.0, 6.2$ Hz, 1H), 3.43 (dd, $J = 11.5, 2.5$ Hz, 1H), 3.32 (dd, $J = 11.5, 7.2$ Hz, 1H), 3.22 (dd, $J = 14.2, 4.9$ Hz, 1H), 3.13 (m, 2H), 1.26 (s, 9H); ^{13}C RMN δ 206.8, 171.5, 73.1, 72.3, 72.1, 47.0, 39.7, 36.9, 33.4, 27.5; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 119.8$ (CH_2Cl_2 , $c = 0.335$).

(3*R*,3'*R*,5*R*,5'*R*,7*aS*,7*a'S*)-5,5'-(disulfanedilbis(metilen))bis(tetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol-3-ácido carboxílico (14):

El compuesto **14** se obtuvo como subproducto en la síntesis de **1a**. Aceite: ^1H RMN δ 5.04 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.53 (dd, $J = 8.2, 6.0$ Hz, 1H), 4.15 (dd, $J = 7.2, 4.0$ Hz, 1H), 3.53



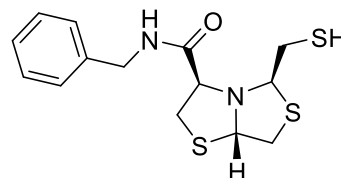
(dd, $J = 11.8, 6.1$ Hz, 1H), 3.41 (dd, $J = 11.5, 4.0$ Hz, 1H), 3.34 (dd, $J = 11.5, 7.2$

Hz, 1H), 3.08 (m, 2H), 2.95 (dd, $J = 13.0, 6.0$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 173.0, 72.9, 72.1, 70.6, 57.3, 39.5, 39.3, 33.6, 31.3; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7.8$ (CH_2Cl_2 , $c = 1.02$).

Síntesis de **15a-g**

(3R,5R,7aS)-N-benzil-5-(mercaptometil)tetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol-3-carboxamida (15a): El compuesto **15a** se prepara

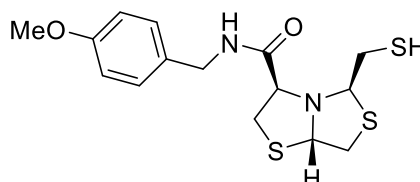
según procedimiento general para la desprotección de tioésteres, **método c**), utilizando como material de partida **16a** (40 mg, 0.11 mmol). Se purifica por



cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2/n$ -hexanos (3:1) para dar **15a** (23 mg, 64%); aceite transparente: ^1H RMN δ 7.77 (br, 1H), 7.32 (m, 5H), 4.88 (dd, $J = 5.8, 5.0$ Hz, 1H), 4.49 (qd, $J = 14.8, 6.0$ Hz, 2H), 4.31 (dd, $J = 8.1, 5.3$ Hz, 1H), 4.07 (dd, $J = 7.3, 3.7$ Hz, 1H), 3.49 (dd, $J = 11.0, 3.9$ Hz, 1H), 3.46 (dd, $J = 11.6, 5.7$ Hz, 1H), 3.34 (dd, $J = 11.2, 7.3$ Hz, 1H), 3.06 (dd, $J = 11.8, 4.8$ Hz, 1H), 2.77 (ddd, $J = 13.4, 8.1, 5.3$ Hz, 1H), 2.69 (dd, $J = 13.9, 8.4$ Hz, 1H), 1.55 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 170.3, 138.2, 128.9, 127.9, 127.7, 74.9, 72.9, 72.1, 43.6, 39.5, 33.8, 33.3; HRMS calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{ONaS}_3$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 349.0479, valor encontrado 349.0478; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -80.0$ (CH_2Cl_2 , $c = 0.66$).

(3R,5R,7aS)-5-(mercaptometil)-N-(4-metoxibenzil) tetrahidro-2H-tiazol[4,3-b]tiazol-3-carboxamida (15b). El compuesto

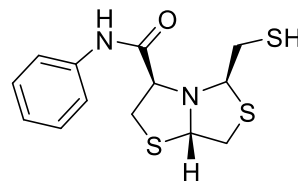
15b se prepara según procedimiento general para la desprotección de tioésteres, **método c**), utilizando como material de partida **16b** (18.1



mg, 0.05 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil n -hexanos/ AcOEt (3:1) para dar **15b** (9 mg, 50%) como un aceite transparente: ^1H RMN δ 7.69 (br, 1H), 7.22 (m, 2H), 6.87 (m, 2H), 4.86 (dd, $J = 5.8, 4.9$ Hz, 1H), 4.42 (m, 2H), 4.29 (dd, $J = 8.1, 5.3$ Hz, 1H), 4.05 (dd, $J = 7.3, 3.8$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.46 (dd, $J = 11.2, 3.8$ Hz, 1H), 3.44 (dd, $J = 11.8, 6.0$ Hz, 1H), 3.32 (dd, $J = 11.2, 7.3$ Hz, 1H), 3.05 (dd, $J = 11.8, 4.8$ Hz, 1H), 2.76 (ddd, $J = 13.6, 8.1, 5.3$ Hz, 1H), 2.68 (dt, $J = 14.0, 8.4$ Hz, 1H), 1.56 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 170.2, 159.2, 130.3, 129.2, 114.3, 74.9, 72.8, 72.1, 55.4, 43.0, 39.5, 33.8, 33.3; HRMS calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{NaS}_3$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 379.0585, valor encontrado 379.0591; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -108.5$ (CH_2Cl_2 , $c = 1.0$).

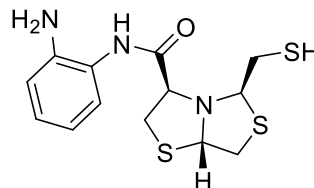
(3*R*,5*R*,7*a*S)-5-(mercaptometil)-N-feniltetrahidro-2H-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-carboxamida (15c):

El compuesto **15c** se prepara según procedimiento general para la desprotección de tioésteres, **método c)**, utilizando como material de partida **16c** (16.1 mg, 0.05 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (3:1) para dar **15c** (9.3 mg, 58%) como un aceite transparente: ¹H RMN δ 9.44 (br, 1H), 7.65 (dd, *J* = 8.5, 1.0 Hz, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.13 (m, 1H), 4.99 (dd, *J* = 5.9, 5.2 Hz, 1H), 4.43 (dd, *J* = 8.4, 4.7 Hz, 1H), 4.11 (dd, *J* = 7.5, 3.5 Hz, 1H), 3.57 (dd, *J* = 11.5, 3.7 Hz, 1H), 3.54 (dd, *J* = 12.0, 5.9 Hz, 1H), 3.38 (dd, *J* = 11.4, 7.5 Hz, 1H), 3.12 (dd, *J* = 11.8, 5.0 Hz, 1H), 2.96 (ddd, *J* = 14.0, 7.8, 4.7 Hz, 1H), 2.84 (dd, *J* = 14.1, 8.5 Hz, 1H), 1.82 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H); ¹³C RMN δ 168.6, 137.7, 129.2, 124.7, 119.8, 74.6, 72.8, 72.4, 39.5, 33.6, 33.3; HRMS calculado para C₁₃H₁₆N₂ONaS₃, [M+Na]⁺ 335.0322, valor encontrado 335.0321; [α]_D²⁰ = -116.6 (CH₂Cl₂, *c* = 0.25).



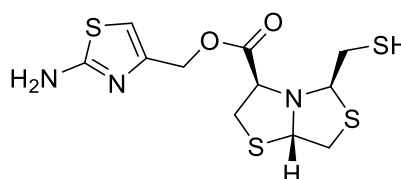
(3*R*,5*R*,7*a*S)-N-(2-aminofenil)-5-(mercaptometil) tetrahidro-2H-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-carboxamida (15d):

El compuesto **15d** se prepara según procedimiento general para la desprotección de tioésteres, **método c)**, utilizando como material de partida **16d** (16.8 mg, 0.05 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil CH₂Cl₂/AcOEt (9:1) para dar **15d** (12.8 mg, 78%) como un aceite transparente: ¹H RMN δ 9.19 (br, 1H), 7.29 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H), 7.08 (td, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 6.82 (m, 2H), 5.06 (dd, *J* = 5.6, 4.7 Hz, 1H), 4.45 (dd, *J* = 8.2, 5.0 Hz, 1H), 4.24 (dd, *J* = 7.2, 2.7 Hz, 1H), 3.60 (dd, *J* = 11.3, 2.7 Hz, 1H), 3.55 (dd, *J* = 12.0, 5.9 Hz, 1H), 3.35 (dd, *J* = 11.3, 7.2 Hz, 1H), 3.13 (dd, *J* = 11.9, 4.5 Hz, 1H), 2.88 (m, 2H), 1.84 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H); ¹³C RMN δ 169.1, 140.4, 127.5, 125.1, 123.9, 119.8, 118.3, 75.0, 73.2, 73.1, 39.6, 33.7, 33.5; HRMS calculado para C₁₃H₁₇N₃ONaS₃, [M+Na]⁺ 350.0431, valor encontrado 350.0430; [α]_D²⁰ = -68.3 (CH₂Cl₂, *c* = 1.85).



(3*R*,5*R*,7*a*S)-(2-aminotiazol-4-il)metil 5-(mercaptometil) tetrahidro-2H-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-carboxilato (15e):

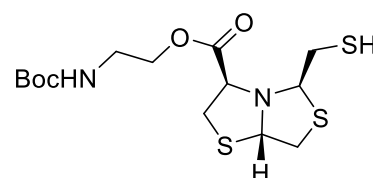
El compuesto **15e** se prepara según procedimiento general para la desprotección de tioésteres, **método c)**, utilizando como material de partida **16e** (17.8 mg,



0.05 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (2:3) para dar **15e** (11.9 mg, 68%) como un aceite transparente: ¹H RMN δ 6.52 (s, 1H), 5.38 (br, 2H), 5.09 (dd, *J* = 5.2, 4.1 Hz, 1H), 5.06 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 5.03 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 4.32 (dd, *J* = 7.2, 6.4 Hz, 1H), 4.26 (dd, *J* = 6.6, 5.3 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J* = 11.9, 5.4 Hz, 1H), 3.35 (dd, *J* = 11.0, 5.2 Hz, 1H), 3.28 (dd, *J* = 11.0, 6.7 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 11.9, 4.0 Hz, 1H), 2.87 (dt, *J* = 13.7, 7.4 Hz, 1H), 2.62 (ddd, *J* = 13.6, 9.4, 6.3 Hz, 1H), 1.97 (dd, *J* = 9.4, 7.6 Hz, 1H); ¹³C RMN δ 170.4, 168.5, 146.2, 108.0, 75.2, 73.5, 70.4, 62.8, 39.2, 34.3, 33.8; HRMS calculado para C₁₁H₁₅N₃O₂NaS₄, [M+Na]⁺ 371.9945, valor encontrado 371.9945; [α]_D²⁰ = -33.4 (CH₂Cl₂, *c* = 1.63).

(3*R*,5*R*,7*aS*)-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)etil 5-(mercaptometil)tetrahydro-2H-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-carboxilato (15g):** El

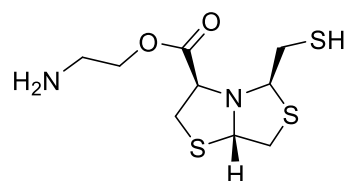
compuesto **15g** se prepara según procedimiento general para la desprotección de tioésteres, método c) utilizando como material de partida **16g** (19.2 mg,



0.05 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (8:2) para dar **15g** (13.3 mg, 70%) como un aceite transparente: ¹H RMN δ 5.08 (dd, *J* = 5.3, 3.8 Hz, 1H), 4.83 (br, 1H), 4.31 (dd, *J* = 7.8, 5.9 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 6.6, 4.8 Hz, 1H), 4.24 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.54 (dd, *J* = 12.0, 5.4 Hz, 1H), 3.43 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.34 (dd, *J* = 11.0, 4.9 Hz, 1H), 3.27 (dd, *J* = 11.0, 6.6 Hz, 1H), 3.09 (dd, *J* = 11.9, 3.8 Hz, 1H), 2.88 (dt, *J* = 13.6, 7.5 Hz, 1H), 2.64 (ddd, *J* = 13.6, 9.6, 5.9 Hz, 1H), 1.97 (dd, *J* = 9.6, 7.2 Hz, 1H), 1.45 (s, 9H); ¹³C RMN δ 170.6, 155.9, 79.9, 75.0, 73.5, 70.6, 64.8, 39.7, 39.3, 34.3, 33.9, 28.5; HRMS calculado para C₁₄H₂₄N₂O₄NaS₃, [M + Na]⁺ 403.0796, valor encontrado 403.0796; [α]_D²⁰ = -35.9 (CH₂Cl₂, *c* = 2.13).

Síntesis de 15f:

(3*R*,5*R*,7*aS*)-2-aminoetil 5-(mercaptometil) tetrahydro-2H-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-carboxilato (15f):** En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se disuelve **15g** (15 mg, 0.04 mmol) en CH₂Cl₂ (1 mL) y se enfría en baño de hielo. Luego, se agrega gota a gota ácido trifluoroacético (0.5 mL).



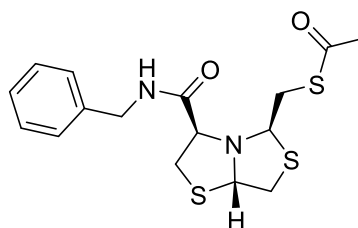
La mezcla de reacción se agita por 30 min a 0°C. El crudo de la reacción se

vuelca sobre una solución saturada de NaHCO_3 y se extrae con AcOEt (3x15 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (9:1) para dar **15f** (18 mg, 82%) como un aceite transparente: ^1H RMN δ 7.79 (br, 1H), 4.93 (dd, J = 5.6, 5.2 Hz, 1H), 4.35 (dd, J = 8.0, 5.4 Hz, 1H), 4.03 (dd, J = 7.4, 3.7 Hz, 1H), 3.76 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.48 (m, 4H, CH_2), 3.33 (dd, J = 11.3, 7.4 Hz, 1H), 3.07 (dd, J = 11.8, 5.0 Hz, 1H), 2.83 (m, 2H, CH_2), 2.39 (br, 1H), 1.80 (t, J = 8.3 Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 171.7, 74.9, 72.8, 72.0, 62.4, 42.5, 39.5, 33.8, 33.3; HRMS calculado para $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{NaS}_3$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 303.0272, valor encontrado 303.0273; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -65.1 (CH_2Cl_2 , c = 0.44).

Síntesis representativa de **16a-g**

S-(((3R,5R,7aS)-3-(benzilcarbamoil)tetrahidro-2H-tiazol [4,3-b]tiazol-5-il)

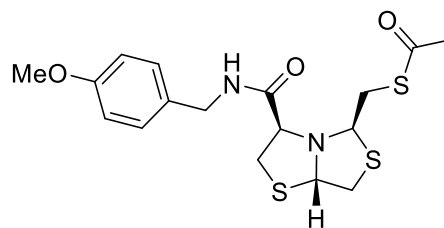
metil) etanetioato (16a): En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N_2 , se disuelve **9a** (100 mg, 0.36 mmol) en CH_2Cl_2 seco (8 mL) y la solución se lleva a 0°C . Se agrega HBTU (163 mg, 0.43 mmol), DIPEA (189 μL , 1.08 mmol), 4-DMAP (4 mg, 0.036 mmol), y



bencilamina (43 mg, 0.4 mmol). La mezcla de reacción se lleva a temperatura ambiente y se agita por 2 h. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida, y se purifica por cromatografía en columna sobre SiO_2 , fase móvil n -hexanos/ AcOEt (3:1) para dar **16a** (51 mg, 38%) como un sólido blanco: PF = 62-66 $^\circ\text{C}$; ^1H RMN δ 7.51 (br, 1H), 7.33 (m, 5H), 4.94 (dd, J = 5.8, 4.1 Hz, 1H), 4.53 (dd, J = 14.9, 6.3 Hz, 1H), 4.44 (dd, J = 14.9, 5.7 Hz, 1H), 4.33 (dd, J = 8.1, 5.2 Hz, 1H), 4.09 (dd, J = 7.1, 2.9 Hz, 1H), 3.55 (dd, J = 11.9, 5.8 Hz, 1H), 3.52 (dd, J = 11.5, 2.5 Hz, 1H), 3.27 (dd, J = 11.1, 7.1 Hz, 1H), 3.19 (dd, J = 14.0, 5.2 Hz, 1H), 3.13 (dd, J = 14.0, 8.1 Hz, 1H), 3.09 (dd, J = 11.9, 4.0 Hz, 1H), 2.14 (s, 3H); ^{13}C RMN δ 195.1, 170.3, 138.2, 128.9, 127.8, 127.7, 73.3, 72.8, 72.0, 43.6, 39.7, 37.8, 33.6, 30.6; HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{NaS}_3$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 391.0585, valor encontrado 391.0585; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -54.9 (CH_2Cl_2 , c = 0.91).

S-(((3R,5R,7aS)-3-((4-metoxibenzil)carbamoyl)tetrahidro-2H-tiazol[4,3-b]tiazol-5-il)metil) etanetioato (16b):

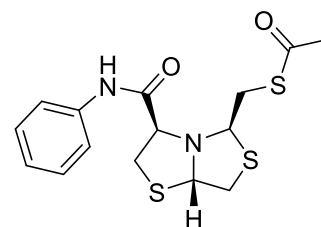
El compuesto **16b** fue preparado de manera análoga a **16a** utilizando como material de partida **9a** (120 mg, 0.43 mmol) y metoxibencilamina (65 mg, 0.47 mmol). Se



purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (2:1) para dar **16b** (127 mg, 74%) como un aceite transparente: ¹H RMN δ 7.43 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.22 (dt, *J* = 4.9, 2.9 Hz, 2H), 6.88 (dt, *J* = 5.0, 3.0 Hz, 2H), 4.92 (dd, *J* = 5.8, 4.1 Hz, 1H), 4.46 (dd, *J* = 14.6, 6.3 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J* = 14.6, 5.6 Hz, 1H), 4.31 (dd, *J* = 7.9, 5.4 Hz, 1H), 4.07 (dd, *J* = 7.1, 2.9 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.54 (dd, *J* = 11.9, 5.8 Hz, 1H), 3.50 (dd, *J* = 11.1, 2.9 Hz, 1H), 3.26 (dd, *J* = 11.1, 7.1 Hz, 1H), 3.17 (dd, *J* = 13.6, 5.0 Hz, 1H), 3.12 (dd, *J* = 13.7, 7.5 Hz, 1H), 3.08 (dd, *J* = 11.9, 4.1 Hz, 1H), 2.17 (s, 3H); ¹³C RMN δ 195.1, 170.1, 159.2, 130.3, 129.2, 114.2, 73.3, 72.7, 71.9, 55.4, 43.1, 39.6, 37.8, 33.6, 30.6; HRMS calculado para C₁₇H₂₂N₂O₃NaS₃, [M+Na]⁺ 421.0690, valor encontrado 421.0687; [α]_D²⁰ = -73.6 (CH₂Cl₂, *c* 1.96).

S-(((3R,5R,7aS)-3-(fenilcarbamoyl)tetrahidro-2H-tiazol[4,3-b]tiazol-5-il)metil) etanetioato (16c):

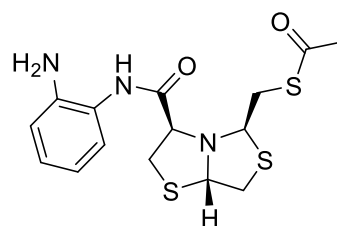
El compuesto **16c** fue preparado de manera análoga a **16a** utilizando como material de partida **9a** (150 mg, 0.54 mmol) y anilina (55 mg, 0.59 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (5:2) para



dar **16c** (77 mg, 41%) como un aceite transparente: ¹H RMN δ 9.03 (br, 1H), 7.65 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.35 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.13 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.03 (dd, *J* = 5.7, 4.6 Hz, 1H), 4.42 (dd, *J* = 9.0, 4.2 Hz, 1H), 4.12 (dd, *J* = 7.2, 3.1 Hz, 1H), 3.63 (dd, *J* = 11.9, 5.9 Hz, 1H), 3.54 (dd, *J* = 11.2, 3.0 Hz, 1H), 3.33 (dd, *J* = 14.4, 3.9 Hz, 1H), 3.32 (dd, *J* = 11.7, 7.9 Hz, 1H), 3.20 (dd, *J* = 14.1, 9.1 Hz, 1H), 3.12 (dd, *J* = 11.9, 4.3 Hz, 1H), 2.25 (s, 3H); ¹³C RMN δ 195.3, 168.3, 137.6, 129.2, 124.7, 119.7, 73.2, 73.1, 71.9, 39.8, 37.8, 33.5, 30.8; HRMS calculado para C₁₅H₁₈N₂O₂NaS₃, [M+Na]⁺ 377.0428, valor encontrado 377.0428; [α]_D²⁰ = -177.5 (CH₂Cl₂, *c* = 1.84).

S-(((3R,5R,7aS)-3-((2-aminophenyl)carbamoyl)tetrahydro-2H-thiazolo[4,3-b]thiazol-5-yl)methyl) ethanethioate (16d):

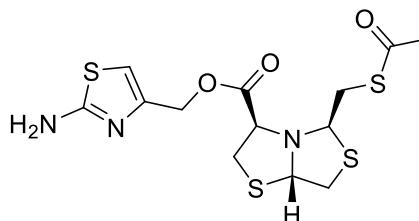
El compuesto **16d** fue preparado de manera análoga a **16a** utilizando como material de partida **9a** (100 mg, 0.36 mmol) y o-fenilendiamina (43 mg, 0.40 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil



n-hexanos/AcOEt (3:2) para dar **16d** (74 mg, 56%) como un aceite transparente: ¹H RMN δ 8.86 (br, 1H), 7.22 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.05 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.79 (t, *J* = 7.5, 2H), 5.06 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.42 (dd, *J* = 8.1, 5.1 Hz, 1H), 4.15 (dd, *J* = 7.0, 2.4 Hz, 1H), 3.89 (br, 2H), 3.56 (dd, *J* = 11.9, 5.9 Hz, 1H), 3.50 (dd, *J* = 11.3, 2.3 Hz, 1H), 3.23 (m, 3H), 3.08 (dd, *J* = 11.9, 4.1 Hz, 1H), 2.25 (s, 3H); ¹³C RMN δ 195.4, 169.1, 140.8, 127.5, 125.3, 123.4, 119.4, 117.9, 73.2, 72.9, 72.0, 39.7, 37.7, 33.6, 30.7; HRMS calculado para C₁₅H₁₉N₃O₂NaS₃, [M+Na]⁺ 392.0537, valor encontrado 392.0540; [α]_D²⁰ = -100.7 (CH₂Cl₂, *c* = 4.49).

(3R,5R,7aS)-(2-aminothiazol-5-yl)methyl 5-((acetylthio) methyl)tetrahydro-2H-thiazolo[4,3-b]thiazole-3-carboxylate (16e):

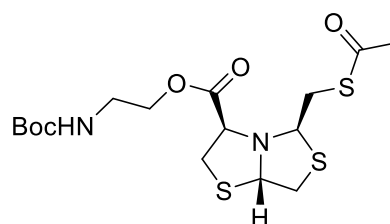
El compuesto **16e** fue preparado de manera análoga a **16a** utilizando como material de partida **9a** (200 mg, 0.72 mmol) y (2-aminothiazol-4-il)metanol (100 mg, 0.77 mmol). Se purifica por



cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (2:3) para dar **16e** (137 mg, 50%) como un aceite transparente: ¹H RMN δ 6.51 (s, 1H), 5.64 (br, 2H), 5.18 (dd, *J* = 5.3, 3.3 Hz, 1H), 5.06 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 5.02 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 4.29 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.28 (dd, *J* = 6.5, 5.0 Hz, 1H), 3.58 (dd, *J* = 11.9, 5.4 Hz, 1H), 3.29 (m, 3H), 3.08 (m, 2H), 2.34 (s, 3H); ¹³C RMN δ 195.7, 170.3, 168.7, 146.1, 107.6, 74.1, 71.5, 69.9, 62.7, 38.5, 37.7, 34.5, 30.7; HRMS calculado para C₁₃H₁₇N₃O₃NaS₄, [M+Na]⁺ 414.0050, valor encontrado 414.0041; [α]_D²⁰ = -33.8 (CH₂Cl₂, *c* = 2.3).

(3*R*,5*R*,7*aS*)- 2-((*t*-butoxicarbonil)amino)etil -5-((acetiltio)metil)tetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-carboxilato (16*g*):**

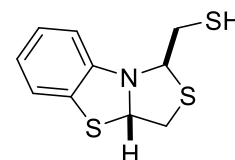
El compuesto **16g** fue preparado de manera análoga a **16a** utilizando como material de partida **9a** (100 mg, 0.36 mmol) y N-boc etanolamina (69 mg, 0.43 mmol). Se purifica por cromatografía en columna



SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (7:3) para dar **16g** (120 mg, 79%) como un sólido blanco: PF = 65-71°C; ¹H RMN δ 5.15 (dd, *J* = 5.3, 3.4 Hz, 1H), 5.05 (br, 1H), 4.31 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.24 (m, 3H), 3.58, (dd, *J* = 11.9, 5.4 Hz, 1H), 3.44 (m, 2H), 3.30 (m, 3H, CH₂), 3.10 (dd, *J* = 11.6, 3.7 Hz, 1H), 3.08 (dd, *J* = 13.9, 7.4 Hz, 1H), 2.36 (s, 3H), 1.45 (s, 9H); ¹³C RMN δ 195.8, 170.5, 155.9, 79.7, 74.1, 71.6, 70.0, 64.9, 39.6, 38.4, 37.7, 34.3, 30.7, 28.5; HRMS calculado para C₁₆H₂₆N₂O₅NaS₃, [M+Na]⁺ 445.0902, valor encontrado 445.0906; [α]_D²⁰ = -74.0 (CH₂Cl₂, *c* = 3.25).

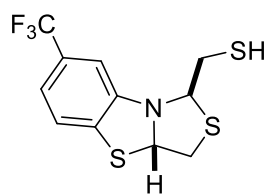
Síntesis representativa de 17a-d:**((±)-3,3a-dihidro-1*H*-benzo[*d*]tiazol[4,3-*b*]tiazol-1-il)metanetiol (17a):**

En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se suspende 2-aminotiofenol (500 mg, 4.0 mmol) en MeOH (20 mL), y se agrega 1,4-ditiano-2,5-diol (730 mg, 4.8 mmol) y *p*-TsOH (69 mg, 0.4 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 1 h, y luego se enfría. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/CH₂Cl₂ (8:2) para dar **17a** (821 mg, 85%), como un aceite transparente: ¹H RMN δ 7.12 (ddd, *J* = 7.6, 1.3, 0.4 Hz, 1H), 7.09 (ddd, *J* = 7.9, 7.4, 1.1 Hz, 1H), 6.88 (dt, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 6.86 (ddd, *J* = 8.0, 1.1, 0.6 Hz, 1H), 5.18 (dd, *J* = 9.0, 4.8 Hz, 1H), 5.11 (dd, *J* = 9.9, 5.3 Hz, 1H), 3.22 (dd, *J* = 10.6, 5.3 Hz, 1H), 2.98 (ddd, *J* = 13.8, 9.0, 6.2 Hz, 1H), 2.93 (dd, *J* = 14.8, 9.5 Hz, 1H), 2.72 (ddd, *J* = 13.8, 10.8, 4.8 Hz, 1H), 1.91 (dd, *J* = 10.8, 6.3 Hz, 1H); ¹³C RMN δ 145.2, 126.2, 124.5, 123.0, 122.2, 110.9, 70.5, 70.2, 40.0, 33.5; HRMS calculado para C₁₀H₁₂NS₃⁺ [M+H]⁺ 242.0132, valor encontrado 242.0119.



((±)-7-(trifluorometil)-3,3a-dihidro-1H-benzo[d]tiazol[4,3-b]tiazol-1-il)

metanetiol (17b): En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se suspende 2-amino-4-(trifluorometil)bencenotiol clorhidrato (225 mg, 1.17 mmol) en MeOH (20 mL), y se agrega 1,4-ditiano-2,5-diol (214 mg,

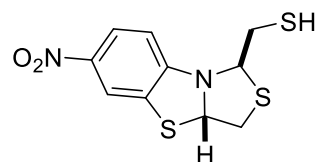


1.4 mmol) y TEA (169 µL, 1.17 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 1 h y luego se enfría. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (8:2) para dar **17b**, (145 mg, 40%) como un sólido blanco: ¹H RMN δ 7.18 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.13 (dd, *J* = 8.0, 0.7 Hz, 1H), 7.02 (s, *J* = 1H), 5.21 (dd, *J* = 9.9, 5.3 Hz, 1H), 5.17 (dd, *J* = 8.8, 4.9 Hz, 1H), 3.26 (dd, *J* = 10.7, 5.3 Hz, 1H), 2.99 (ddd, *J* = 13.9, 8.8, 6.6 Hz, 1H), 2.94 (t, *J* = 10.3, 1H), 2.76 (ddd, *J* = 13.9, 10.6, 4.9 Hz, 1H), 1.89 (dd, *J* = 10.6, 6.6 Hz, 1H); ¹³C RMN δ 146.1, 129.7 (q, *J*_{C-F} = 1.5 Hz), 128.9 (q, *J*_{C-F} = 32.4 Hz), 124.3 (q, *J*_{C-F} = 272.0 Hz), 123.0, 119.3 (q, *J*_{C-F} = 4.1 Hz), 107.4 (q, *J*_{C-F} = 3.9 Hz), 71.1, 70.2, 40.1, 33.4; HRMS calculado para C₁₁H₉F₃NS₃⁺ [M-H]⁺ 307.9849, valor encontrado 307.9850.

((±)-6-nitro-3,3a-dihidro-1H-benzo[d]tiazol[4,3-b]tiazol-1-il)metanetiol (17c)**y ((±)-7-nitro-3,3a-dihidro-1H-benzo[d]tiazol[4,3-b]tiazol-1-il) metanetiol (17d):**

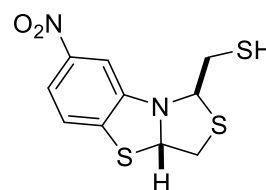
Los compuestos **17c** y **17d**, isómeros de posición, fueron preparados de manera análoga a **17a** utilizando como material de partida una mezcla de 4-nitro-2-mercaptoanilina **18c** y 5-nitro-2-mercaptoanilina **18d** (9:1, 270 mg, 1.6 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/CH₂Cl₂ (8:2) para dar **17c** (220 mg, 48%) y **17d** (28 mg, 6%).

17c: aceite amarillo: ¹H RMN δ 8.00 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.32 (dd, *J* = 10.1, 5.2 Hz, 1H), 5.18 (dd, *J* = 8.8, 4.7 Hz, 1H), 3.29 (dd, *J* = 10.7, 5.2 Hz, 1H), 2.97 (m, 2H), 2.78



(ddd, *J* = 14.0, 10.5, 4.7 Hz, 1H), 1.85 (dd, *J* = 10.5, 6.9 Hz, 1H); ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 150.7, 142.6, 126.7, 123.8, 118.6, 109.1, 71.1, 68.8, 40.0, 33.1.

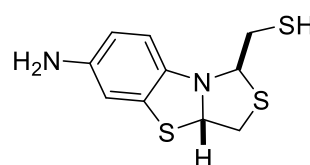
17d: aceite amarillo: ^1H RMN δ 7.78 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 5.31 (dd, $J = 9.8, 5.3$ Hz, 1H), 5.19 (dd, $J = 8.6, 4.9$ Hz, 1H), 3.31 (dd, $J = 10.8, 5.3$ Hz, 1H), 2.97 (m, 2H), 2.80 (ddd, $J = 14.0, 10.4, 4.9$ Hz, 1H), 1.88 (dd, $J = 10.4, 7.0$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 147.1, 146.8, 134.4, 122.4, 118.1, 105.4, 71.8, 70.0, 40.2, 33.3.



Síntesis de **17f**:

((±)-6-amino-3,3a-dihidro-1H-benzo[d]thiazol[4,3-b]thiazol-1-il) metanetiol

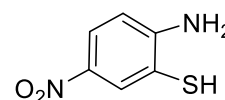
(17f): En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N_2 , se suspende **17c** (100 mg, 0.4 mmol) en una mezcla EtOH:H $_2$ O (19:1, 10 mL) y se agrega hierro en polvo (225 mg, 4 mmol) y cloruro de amonio (212 mg, 4 mmol). La mezcla se calienta a 60°C durante 15 minutos y luego se enfría. Se agrega una solución de NH_4OH acuosa al 30% y se filtra por celite a vacío. El sólido se lava con AcOEt (4x15 mL). El filtrado se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x15 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en columna con SiO_2 flash, fase móvil Hex/ CH_2Cl_2 (2:1) para dar **17f** (16 mg, 16%) como un aceite: ^1H RMN δ 6.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.55 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.46 (dd, $J = 8.4, 2.3$ Hz, 1H), 5.12-5.04 (m, 2H), 3.23 (dd, $J = 10.7, 5.4$ Hz, 1H), 2.95 (m, 2H), 2.69 (ddd, $J = 13.8, 10.7, 4.9$ Hz, 1H), 1.92 (dd, $J = 10.7, 6.2$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 141.8, 138.5, 126.2, 113.3, 112.1, 110.8, 71.8, 71.5, 40.1, 33.7.



Síntesis de **18c-d**:

2-amino-5-nitrobenzenethiol (18c) y 2-amino-4-nitrobenzenethiol (18d):

En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N_2 , se suspende una mezcla de 2-metil-6-nitrobenzo[d]thiazol **25a** y 2-metil-5-nitrobenzo[d]thiazol **25b** (9:1, 500 mg, 2.6 mmol) en EtOH absoluto (10 mL). Luego, se agrega gota a gota hidrazina monohidrato (0.5 mL, 15.6 mmol). La mezcla de reacción se agita por 4 h a temperatura ambiente. El crudo de la reacción se diluye con agua fría (10 mL) y se agrega lentamente HCl 2M hasta pH 3. La solución se extrae con AcOEt (3x15 mL). La fase orgánica se seca con

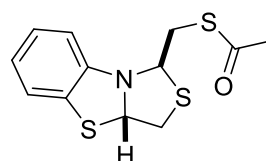


Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida para dar una mezcla **18c:18d** (9:1, 248 mg, 56%) como un sólido anaranjado inseparable por cromatografía en columna: ¹H RMN δ 8.32 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.06* (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 8.01 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 6.74* (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.17* (s, 1H), 4.97 (s, 2H), 3.01 (s, 1H). *isómero minoritario.

Síntesis de **19-20**:

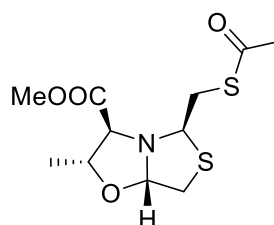
S-(((±)-3,3a-dihidro-1H-benzo[d]tiazol[4,3-b]tiazol-1-il)metil) etanetioato

(19): El compuesto **19** fue preparado de manera análoga a **9a** utilizando como material de partida **17a** (100 mg, 0.41 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/CH₂Cl₂ (8:2) para dar **19** (93 mg, 79%) como un sólido rosado: ¹H RMN δ 7.08 (m, 2H), 6.86 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.18 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 5.15 (dd, *J* = 5.4, 3.9 Hz, 1H), 3.32 (dd, *J* = 13.8, 8.6 Hz, 1H), 3.25 (dd, *J* = 10.6, 5.3 Hz, 1H), 3.22 (dd, *J* = 13.8, 5.8 Hz, 1H), 2.92 (t, *J* = 10.1 Hz, 1H), 2.39 (s, 3H); ¹³C RMN δ 195.5, 145.3, 126.4, 124.7, 123.1, 122.2, 110.9, 70.8, 67.3, 40.3, 37.8, 30.8; HRMS calculado para C₁₂H₁₃NONaS₃, [M + Na]⁺ 306.0057, valor encontrado 306.0056.



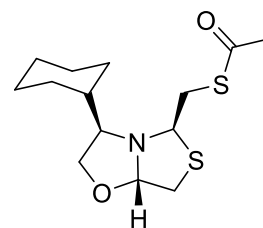
(2R,3S,5R,7aS)-metil 5-((acetiltio)metil)-2-metiltetrahidro-2H-tiazol[4,3-b]oxazol-3-carboxilato (20a)

El compuesto **20a** fue preparado de manera análoga a **9a** utilizando como material de partida **2a** (100 mg, 0.4 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (9:1) para dar **20a** (92 mg, 79%) como un aceite transparente: ¹H RMN δ 5.22 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.29 (dd, *J* = 8.2, 6.7 Hz, 1H), 4.10 (dq, *J* = 8.5, 6.0 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.31 (dd, *J* = 12.9, 4.5 Hz, 1H), 3.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.18 (dd, *J* = 13.8, 8.3 Hz, 1H), 3.09 (dd, *J* = 12.9, 0.7 Hz, 1H), 3.05 (dd, *J* = 13.7, 6.6 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.40 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H); ¹³C RMN δ 195.2, 171.0, 99.2, 76.4, 74.7, 73.3, 52.3, 37.4, 36.4, 30.6, 18.0; HRMS calculado para C₁₁H₁₇NO₄NaS₂, [M + Na]⁺ 314.0497, valor encontrado 314.0501; [α]_D²⁰ = -61.1 (CH₂Cl₂, c = 0.96).



S-(((3R,5R,7aS)-3-ciclohexiltetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]oxazol-5-il)metil)etanetioato (20b):

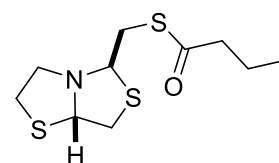
El compuesto **20b** fue preparado de manera análoga a **9a** utilizando como material de partida **2b** (100 mg, 0.4 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (9:1) para dar **20b** (72 mg, 62%) como un aceite transparente: ¹H RMN δ



5.06 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 4.20 (dd, *J* = 7.4, 6.9 Hz, 1H), 3.98 (dd, *J* = 8.4, 6.8 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J* = 8.4, 7.3 Hz, 1H), 3.28 (dd, *J* = 12.5, 4.3 Hz, 1H), 3.26 (dd, *J* = 13.8, 6.8 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 12.6, 1.0 Hz, 1H), 2.98 (dd, *J* = 13.7, 7.7 Hz, 1H), 2.90 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.94 (m, 1H), 1.74 (m, 4H), 1.38 (m, 1H), 1.21 (m, 3H), 0.98 (m, 2H); ¹³C RMN δ 195.5, 99.5, 75.0, 71.2, 68.4, 41.7, 37.2, 37.0, 30.7, 30.6, 29.1, 26.6, 26.4, 26.3; HRMS calculado para C₁₄H₂₃NO₂NaS₂, [M + Na]⁺ 324.1068, valor encontrado 324.1068; [α]_D²⁰ = -24.4 (CH₂Cl₂, *c* = 0.96).

Síntesis de 21:

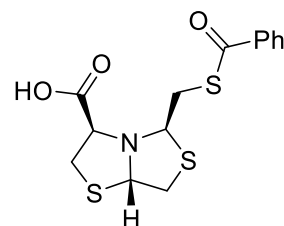
(±)((tetrahidro-2H-tiazol[4,3-b]tiazol-5-il)metil) butanetioato (21): En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se disuelve **1e** (40 mg, 0.21 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL) y se enfría en baño de hielo. Luego, se agrega gota a gota cloruro de butirilo (27 mg, 0.25 mmol) y TEA (36 μL, 0.25 mmol). La mezcla de reacción se lleva a temperatura ambiente y se agita por 1 h. Se agrega hielo y se agita 15 min. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (9:1) para dar **21** (38 mg, 69%), como un aceite transparente: ¹H RMN δ 5.02 (dd, *J* = 5.1, 3.1 Hz, 1H), 4.20 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.58 (dd, *J* = 11.4, 4.9 Hz, 1H), 3.52 (m, 1H), 3.25 (dd, *J* = 13.6, 6.2 Hz, 1H), 3.09 (m, 5H), 2.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.70 (sext, *J* = 7.4, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H); ¹³C RMN δ 199.3, 75.5, 70.0, 57.0, 46.1, 38.0, 37.6, 32.1, 19.3, 13.6; HRMS calculado para C₁₀H₁₇NONaS₃, [M+Na]⁺ 286.0370, valor encontrado 286.0370.



Síntesis de **22**:

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-((benzoiltio)metil)tetrahidro-2*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-ácido carboxílico (22**):** El compuesto **22** fue preparado de

manera análoga a **21** utilizando como material de partida **L-1a** (350 mg, 1.5 mmol) y cloruro de benzoilo (230 mg, 1.6 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil CH₂Cl₂/AcOEt/AcOH (9:1:0.1) para dar **22** (360

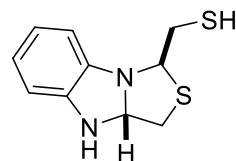


mg, 71%) como un sólido blanco: PF = 71-76°C; ¹H RMN δ 7.98 (m, 2H), 7.62 (m, 1H), 7.48 (m, 2H), 5.12 (dd, *J* = 6.0, 3.9 Hz, 1H), 4.50 (dd, *J* = 8.3, 5.0 Hz, 1H), 4.23 (dd, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 1H), 3.67 (dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H), 3.46 (dd, *J* = 14.2, 5.0 Hz, 1H), 3.44 (dd, *J* = 11.6, 2.4 Hz, 1H), 3.37 (dd, *J* = 14.1, 8.3 Hz, 1H), 3.32 (dd, *J* = 11.4, 7.1 Hz, 1H), 3.14 (dd, *J* = 12.0, 3.9 Hz, 1H); ¹³C RMN δ 191.7, 171.7, 136.4, 134.3, 129.0, 127.7, 73.5, 72.3, 72.1, 39.5, 37.4, 33.5; HRMS calculado para C₁₄H₁₄NO₃Na₂S₃, [M+2Na-H]⁺ 385.9931, valor encontrado 385.9931; [α]_D²⁰ = -27.8 (CH₂Cl₂, *c* = 1.72).

Síntesis de **23a-l**:

((±)-3*a*,4-dihydro-1*H*,3*H*-benzo[4,5]imidazo[1,2-*c*]thiazol-1-yl)methanethiol

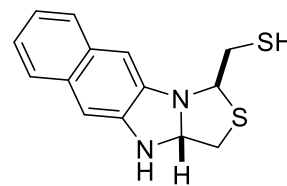
(23a): El compuesto **23a** fue preparado de manera análoga a **17a** utilizando como material de partida *o*-fenilendiamina (500 mg, 4.7 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂,



fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (8:2) para dar **23a** (553 mg, 53%) como un aceite amarillo: ¹H RMN δ 6.81 (m, 3H), 6.70 (dd, *J* = 6.4, 2.4 Hz, 1H), 5.34 (dd, *J* = 7.5, 5.4 Hz, 1H), 4.97 (dd, *J* = 9.0, 4.6 Hz, 1H), 4.19 (br, 1H), 3.15 (dd, *J* = 10.6, 5.4 Hz, 1H), 2.90 (ddd, *J* = 13.7, 9.0, 6.3 Hz, 1H), 2.82 (dd, *J* = 10.6, 7.5 Hz, 1H), 2.69 (ddd, *J* = 13.6, 10.6, 4.7 Hz, 1H), 1.90 (dd, *J* = 10.6, 6.3 Hz, 1H); ¹³C RMN δ 140.8, 138.0, 121.9, 121.9, 111.8, 110.0, 83.1, 71.5, 38.9, 33.9; HRMS calculado para C₁₀H₁₂N₂NaS₂⁺ [M+H]⁺ 247.0340, valor encontrado 247.0341.

((±)3a,4-dihidro-1H,3H-nafto[2',3':4,5]imidazo[1,2-c]tiazol-1-il)metanetiol

(23b): El compuesto **23b** fue preparado de manera análoga a **17a** utilizando como material de partida 2,3-diamino naftaleno (200 mg, 1.26 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-

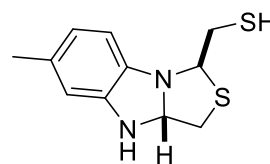


hexanos/AcOEt (8:2) para dar **23b** (246 mg, 71%) como un sólido amarronado: PF = 165-173°C; ¹H RMN δ 7.62 (m, 1H), 7.56 (m, 1H), 7.23 (m, 2H), 7.04 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 5.48 (dd, *J* = 7.6, 5.2 Hz, 1H), 5.08 (dd, *J* = 8.8, 4.7 Hz, 1H), 4.48 (br, 1H), 3.19 (dd, *J* = 10.6, 5.2 Hz, 1H), 3.00 (ddd, *J* = 14.9, 8.7, 6.4 Hz, 1H), 2.82 (dd, *J* = 10.5, 7.4 Hz, 1H), 2.78 (ddd, *J* = 13.8, 10.8, 5.3 Hz, 1H), 1.93 (dd, *J* = 10.6, 6.3 Hz, 1H); ¹³C RMN δ 141.3, 139.1, 131.2, 130.7, 126.6, 126.2, 123.8, 123.8, 105.5, 104.74, 83.0, 70.8, 39.1, 33.8; HRMS calculado para C₁₄H₁₃N₂S₂, [M-H]⁻ 273.0520, valor encontrado 273.0521.

((±)-6-metil-3a,4-dihidro-1H,3H-benzo[4,5]imidazo[1,2-c]tiazol-1-il)

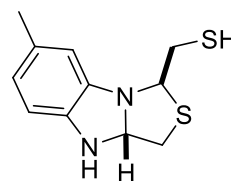
metanetiol (23c) y ((±)-7-metil-3a,4-dihidro-1H,3H-benzo[4,5]imidazo[1,2-c]tiazol-1-il)metanetiol (23d): Los compuestos **23c** y **23d** isómeros de posición fueron preparados de manera análoga a **17a** utilizando como material de partida 4-metil-*o*-fenilendiamina (120 mg, 1.0 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil CH₂Cl₂:*n*-hexanos (1:1) para dar **23c** (40.5 mg, 17%) y **23d** (27.9 mg, 12%).

23c: aceite transparente: ¹H RMN δ 6.66 (m, 2H), 6.54 (t, *J* = 11.2 Hz, 1H), 5.33 (dd, *J* = 7.1, 5.5 Hz, 1H), 4.93 (dd, *J* = 9.0, 4.7 Hz, 1H), 4.13 (br, 1H), 3.16 (dd, *J* = 10.7, 5.4 Hz, 1H), 2.89 (ddd, *J* = 13.7, 9.0, 6.2 Hz, 1H), 2.83 (dd, *J* = 10.7,



7.3 Hz, 1H), 2.68 (ddd, *J* = 13.6, 10.6, 4.7 Hz, 1H), 2.24 (s, 3H), 1.91 (dd, *J* = 10.6, 6.2 Hz, 1H); ¹³C RMN δ 138.6, 138.3, 131.7, 122.0, 112.9, 109.8, 83.4, 72.1, 39.0, 33.9, 21.2; HRMS calculado para C₁₁H₁₄N₂NaS₂, [M-H]⁻ 261.0496, valor encontrado 261.0500.

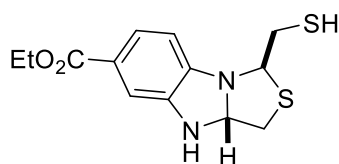
23d: aceite transparente: ¹H RMN δ 6.63 (m, 3H), 5.32 (dd, *J* = 7.7, 5.5 Hz, 1H), 4.97 (dd, *J* = 9.0, 4.7 Hz, 1H), 3.14 (dd, *J* = 10.6, 5.4 Hz, 1H), 2.90 (ddd, *J* = 13.6, 9.0, 6.2 Hz, 1H), 2.81 (dd, *J* = 10.6, 7.7 Hz, 1H), 2.69 (ddd, *J* = 13.6, 10.6, 4.6 Hz,



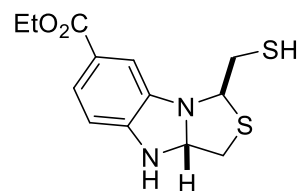
1H), 2.28 (d, $J = 0.7$ Hz, 3H), 1.91 (dd, $J = 10.6, 6.2$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 141.4, 135.6, 132.2, 122.1, 112.5, 110.9, 83.4, 77.5, 71.3, 38.7, 34.0, 21.4.

((±)-1-(mercaptometil)-3a,4-dihidro-1H,3H-benzo[4,5]imidazo[1,2-c]tiazol-6-etil carboxilato (23e) y ((±)-1-(mercaptometil)-3a,4-dihidro-1H,3H-benzo[4,5]imidazo [1,2-c]tiazol-7- etil carboxilato (23f): Los compuestos **23e** y **23f** isómeros de posición fueron preparados de manera análoga a **17a** utilizando como material de partida 3,4-diaminobenzoato de etilo (180 mg, 1.0 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos:AcOEt (8:2) para dar **23e** (35.6 mg, 12%) y **23f** (77.1 mg, 26%).

23e: aceite transparente: ^1H RMN δ 7.61 (dd, $J = 8.1, 1.6$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.42 (dd, $J = 7.8, 5.3$ Hz, 1H), 5.00 (dd, $J = 8.8, 4.6$ Hz, 1H), 4.31 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.16 (dd, $J = 10.6, 5.3$ Hz, 1H), 2.91 (ddd, $J = 13.8, 8.8, 6.6$ Hz, 1H), 2.80 (dd, $J = 10.6, 7.8$ Hz, 1H), 2.72 (ddd, $J = 13.8, 10.5, 4.7$ Hz, 1H), 1.86 (dd, $J = 10.5, 6.5$ Hz, 1H), 1.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); ^{13}C RMN δ 166.8, 144.7, 138.2, 125.0, 124.0, 111.9, 108.4, 83.2, 70.2, 60.7, 38.8, 33.7, 14.5.



23f: aceite transparente: ^1H RMN δ 7.57 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.48 (dd, $J = 6.8, 5.3$ Hz, 1H), 5.00 (dd, $J = 8.4, 5.1$ Hz, 1H), 4.32 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.20 (dd, $J = 10.7, 5.3$ Hz, 1H), 2.90 (ddd, $J = 13.6, 8.4, 6.7$ Hz, 1H), 2.82 (dd, $J = 10.7, 6.9$ Hz, 1H), 2.73 (ddd, $J = 13.7, 10.2, 5.1$ Hz, 1H), 1.88 (dd, $J = 10.2, 6.7$ Hz, 1H), 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); ^{13}C RMN δ 166.9, 142.9, 139.7, 125.6, 122.8, 110.5, 108.4, 83.6, 72.0, 60.7, 39.4, 33.6, 14.6.

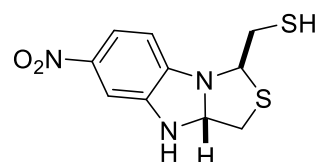


((±)-6-nitro-3a,4-dihidro-1H,3H-benzo[4,5]imidazo[1,2-c]tiazol-1-yl)metanetiol (23g) y ((±)-7-nitro-3a,4-dihidro-1H,3H-benzo[4,5]imidazo[1,2-c]tiazol-1-il)metanetiol (23h):

Los compuestos **23g** y **23h** isómeros de posición fueron preparados de manera análoga a **17a** utilizando como material de partida 4-nitro-*o*-fenilendiamina (150 mg, 1.0 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos:AcOEt (8:2) para dar **23g** (59.2 mg, 22%) y **23h** (132 mg, 49%).

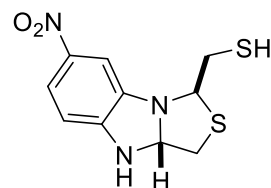
23g: sólido rojo: PF = 206-208°C; ^1H RMN δ 7.80 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.74 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.54 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.99 (dd, J = 8.8, 4.6 Hz, 1H), 4.59 (s, 1H), 3.22 (dd, J = 10.6, 5.2 Hz, 1H),

2.90 (dt, J = 8.8, 7.0 Hz, 1H), 2.84 (dd, J = 10.6, 7.9 Hz, 1H), 2.75 (ddd, J = 14.0, 10.5, 4.6 Hz, 1H), 1.83 (dd, J = 10.5, 6.8 Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 146.0, 142.6, 138.9, 119.5, 107.3, 105.0, 83.4, 69.4, 38.9, 33.4.



23h: sólido anaranjado: PF = 128-134°C; ^1H RMN δ 7.81 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.62 (ddd, J = 6.7, 5.1, 1.5 Hz, 1H), 4.97 (dd, J = 8.5, 4.9 Hz, 1H), 4.92 (s, 1H), 3.28 (dd, J = 10.8, 5.2 Hz,

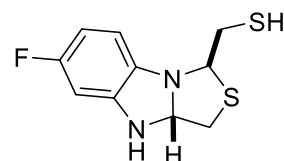
1H), 2.90 (m, 2H), 2.77 (ddd, J = 13.9, 10.2, 4.9 Hz, 1H), 1.87 (dd, J = 10.2, 6.9 Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 144.8, 141.5, 140.0, 120.8, 106.4, 105.0, 84.0, 71.9, 39.5, 33.4.



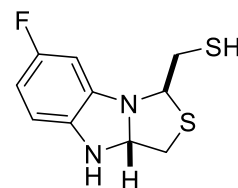
(($\pm$)-6-fluoro-3a,4-dihidro-1H,3H-benzo[4,5]imidazo[1,2-c]thiazol-1-yl)metanetiol (23i) y (($\pm$)-7-fluoro-3a,4-dihidro-1H,3H-benzo[4,5]imidazo[1,2-c]thiazol-1-yl)metanetiol (23j): Los compuestos **23i** y **23j** isómeros de posición fueron preparados de manera análoga a **17a** utilizando como material de partida 4-fluoro-*o*-fenilendiamina (126 mg, 1.0 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos:AcOEt (8:2) para dar **23i** (94.5 mg, 39%) y **23j** (60.6 mg, 25%).

23i: sólido rojo: PF = 82-85°C; ^1H RMN δ 6.66 (dd, J = 8.4, 4.7 Hz, 1H), 6.47 (td, J = 9.4, 2.4 Hz, 1H), 6.38 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 5.39 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.86 (dd, J = 9.0, 4.7 Hz, 1H), 4.28 (br, 1H), 3.18 (dd, J = 10.8, 5.3 Hz, 1H), 2.86

(m, 2H), 2.68 (ddd, J = 13.7, 10.4, 4.7 Hz, 1H), 1.90 (dd, J = 10.4, 6.4 Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 159.17 (d, J = 237.2 Hz), 139.51 (d, J = 12.0 Hz), 136.56 (d, J = 1.7 Hz), 109.84 (d, J = 9.8 Hz), 106.40 (d, J = 23.6 Hz), 99.30 (d, J = 28.0 Hz), 84.0, 72.7, 39.2, 33.7.

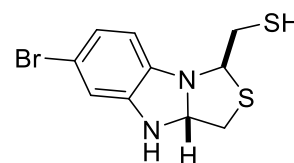


23j: aceite rojo: ^1H RMN δ 6.62 (dd, $J = 8.3, 4.7$ Hz, 1H), 6.54 (dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz, 1H), 6.46 (ddd, $J = 9.3, 8.4, 2.5$ Hz, 1H), 5.35 (dd, $J = 7.9, 5.5$ Hz, 1H), 4.89 (dd, $J = 9.0, 4.5$ Hz, 1H), 3.14 (dd, $J = 10.7, 5.4$ Hz, 1H), 2.82 (dd, $J = 10.6, 7.8$ Hz, 1H), 2.70 (ddd, $J = 13.8, 10.5, 4.5$ Hz, 1H), 1.86 (dd, $J = 10.5, 6.4$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 159.6 (d, $J = 238.0$ Hz), 142.9 (d, $J = 11.7$ Hz), 133.8 (d, $J = 1.8$ Hz), 112.7 (d, $J = 9.7$ Hz), 107.0 (d, $J = 23.5$ Hz), 98.6 (d, $J = 28.5$ Hz), 83.9, 70.9, 38.5, 33.7.

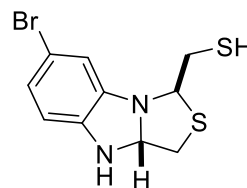


((±)-7-bromo-3a,4-dihidro-1H,3H-benzo[4,5]imidazo[1,2-c]tiazol-1-il)metanetiol (23k) y ((±)-6-bromo-3a,4-dihidro-1H,3H-benzo[4,5]imidazo[1,2-c]tiazol-1-il)metanetiol (23l): Los compuestos **23k** y **23l** isómeros de posición fueron preparados de manera análoga a **17a** utilizando como material de partida 4-bromo-*o*-fenilendiamina (190 mg, 1.0 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos:AcOEt (8:2) para dar **23i** (109.2 mg, 36%) y **23j** (57.6 mg, 19%).

23k: sólido blanco: PF = 146-152°C; ^1H RMN δ 6.90 (dd, $J = 8.1, 1.8$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.37 (dd, $J = 7.1, 5.4$ Hz, 1H), 4.88 (dd, $J = 8.9, 4.6$ Hz, 1H), 4.26 (br, 1H), 3.17 (dd, $J = 10.7, 5.3$ Hz, 1H), 2.87 (ddd, $J = 13.0, 8.5, 6.0$ Hz, 1H), 2.82 (dd, $J = 10.8, 7.2$ Hz, 1H), 2.68 (ddd, $J = 13.7, 10.5, 4.7$ Hz, 1H), 1.87 (dd, $J = 10.5, 6.4$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 139.8, 139.8, 123.9, 114.0, 113.7, 110.9, 83.5, 71.7, 39.1, 33.7.

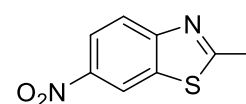


23l: sólido blanco: PF = 102-105°C; ^1H RMN δ 6.88 (m, 2H), 6.52 (m, 1H), 5.37 (dd, $J = 7.5, 5.4$ Hz, 1H), 4.89 (dd, $J = 8.9, 4.6$ Hz, 1H), 4.17 (br, 1H), 3.16 (dd, $J = 10.7, 5.3$ Hz, 1H), 2.88 (ddd, $J = 14.1, 9.1, 6.6$ Hz, 1H), 2.82 (dd, $J = 10.7, 7.6$ Hz, 1H), 2.69 (ddd, $J = 13.8, 10.6, 4.6$ Hz, 1H), 1.86 (dd, $J = 10.5, 6.5$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 142.4, 137.5, 124.3, 113.7, 113.1, 112.5, 83.5, 71.2, 38.9, 33.7.



Síntesis de **25a**:

2-metil-6-nitrobenzo[d]tiazol (25a): En un balón de una boca se suspende 2-metilbenzotiazol (500 mg, 3.4 mmol) en H_2SO_4 (1.5 mL) y se enfría en baño de hielo. Luego, se

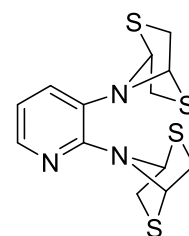


agrega gota a gota HNO_3 fumante (1 mL). La mezcla de reacción se agita a 0°C por 20 min y luego se lleva a temperatura ambiente y se agita por 2 h. Se agrega lentamente NaOH 2 M hasta pH 8. El sólido se filtra a vacío, se lava con agua fría y se seca a vacío para dar una mezcla **25a:25b** (9:1, 587 mg, 89%) como un sólido amarillo: ^1H RMN δ 8.80 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H)*, 8.78 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.35 (dd, $J = 9.0, 2.3$ Hz, 1H), 8.26 (dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 1H)*, 8.05 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H)*, 2.94 (s, 4H), 2.92 (s, 1H)*. *isómero minoritario.

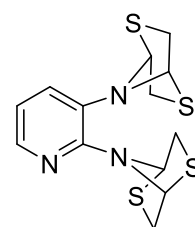
Síntesis de **26a-b**:

(±)-7,7'-(piridin-2,3-diil)bis(2,5-ditia-7-azabicyclo[2.2.1]heptano) (26a-b): En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N_2 , se suspende 2,3-diaminopiridina (200 mg, 1.8 mmol) en MeOH (20 mL), y se agrega 1,4-ditiano-2,5-diol (335 mg, 2.2 mmol) y *p*-TsOH (31 mg, 0.18 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 1 h, y luego se enfría. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (95:5) para dar para dar **26a** (221 mg, 36%) y **26b** (190 mg, 31%).

26a: sólido blanco: ^1H RMN δ 7.96 (dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz, 1H), 7.57 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H), 6.90 (dd, $J = 7.9, 4.8$ Hz, 1H), 6.33 (d, $J = 3.5$ Hz, 2H), 5.64 (d, $J = 3.1$ Hz, 2H), 3.94 (dd, $J = 9.2, 3.5$ Hz, 2H), 3.45 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.30 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 3.21 (dd, $J = 9.8, 3.2$ Hz, 2H); ^{13}C RMN δ 148.0, 142.8, 128.9, 127.4, 118.7, 65.4, 64.5, 45.4, 44.8.

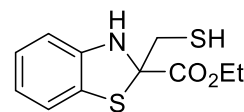


26b: sólido blanco: ^1H RMN δ 8.07 (dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz, 1H), 7.50 (dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 1H), 6.92 (dd, $J = 7.9, 4.8$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 3.1$ Hz, 2H), 5.74 (d, $J = 3.1$ Hz, 2H), 3.32 (d, $J = 9.5$ Hz, 4H), 3.22 (dd, $J = 9.5, 3.2$ Hz, 4H); ^{13}C RMN δ 146.3, 142.9, 128.8, 127.2, 118.5, 65.4, 63.5, 44.4, 44.3.

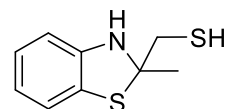


Síntesis representativa de **27a-b**:**(±)-2-(mercaptometil)-2,3-dihidrobenczo[d]tiazol-2-carboxilato de etilo (27a):**

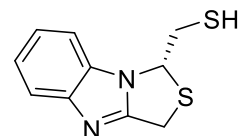
En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se suspende 2-aminotiofenol (100 mg, 0.8 mmol) en EtOH (20 mL), y se agrega dietil 2,5-dihidroxi-1,4-ditiano-2,5-dicarboxilato **6b** (142 mg, 0.5 mmol) y *p*-TsOH (14 mg, 0.08 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 1 h y luego se enfría. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/CH₂Cl₂ (8:2) para dar **27a** (133 mg, 65%), como un aceite transparente: ¹H RMN δ 6.99 (m, 2H), 6.84 (m, 2H), 5.15 (s, 1H), 4.33 (qd, *J* = 7.1, 3.1 Hz, 1H), 3.20 (dd, *J* = 13.6, 7.2 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 13.6, 10.4 Hz, 1H), 1.86 (dd, *J* = 10.4, 7.2 Hz, 1H), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C RMN δ 170.7, 145.0, 127.2, 126.0, 122.4, 121.5, 113.5, 78.2, 63.1, 35.5, 14.3; HRMS calculado para C₁₁H₁₃NO₂NaS₂ [M+Na]⁺ 278.0285, valor encontrado 278.0291.

**(±)-(2-metil-2,3-dihidrobenczo[d]tiazol-2-il)metanetiol (27b):** El compuesto **27b**

fue preparado de manera análoga a **27a** utilizando como material de partida 2,5-dimetil-1,4-ditiano-2,5-diol **6c** (54 mg, 0.3 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (8:2) para dar **27b** (22 mg, 38%) como un aceite transparente: ¹H RMN δ 7.05 (dd, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 6.93 (td, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 6.76 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 4.48 (s, 1H), 3.05 (dd, *J* = 13.8, 9.3 Hz, 1H), 2.89 (dd, *J* = 13.8, 8.4 Hz, 1H), 1.79 (s, 3H), 1.69 (dd, *J* = 9.3, 8.4 Hz, 1H); ¹³C RMN δ 145.5, 127.3, 125.5, 122.3, 121.2, 111.4, 77.6, 37.8, 26.7; HRMS calculado para C₉H₁₀NS₂ [M-H]⁻ 196.0255, valor encontrado 196.0254.

**(S)-(1H,3H-benzo[4,5]imidazo[1,2-c]tiazol-1-il)metanetiol (30):** Este producto

se obtiene como producto de oxidación de **23a** en presencia de la MAO-N-D11. Aceite transparente: ¹H RMN δ 7.74 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.30 (m, 2H), 5.79 (m, 1H), 4.47 (dd, *J* = 14.6, 2.0 Hz, 1H), 4.18 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H), 3.23 (m, 2H), 1.51 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H);

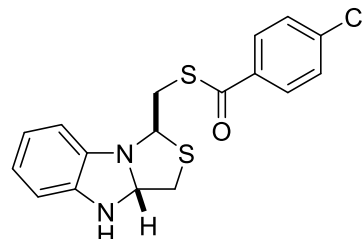


^{13}C RMN δ 158.2*, 132.0*, 123.2, 120.5, 109.8, 62.3, 32.4, 28.1. *asignados por ^1H - ^{13}C -HMBC; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -55.6$ (CH_2Cl_2 , $c = 0.21$).

Síntesis de **31**:

S-(((±)-3a,4-dihidro-1H,3H-benzo[4,5]imidazo[1,2-c]tiazol-1-il)metil) 4-cloro benzotioato (31): En un balón de dos bocas, bajo

atmósfera de N_2 , se disuelve ácido *p*-clorobenzoico (62 mg, 0.4 mmol) en CH_2Cl_2 seco (8 mL) y la solución se lleva a 0°C . Se agrega HBTU (163 mg, 0.43 mmol), DIPEA (189 μL , 1.08 mmol), 4-DMAP (4

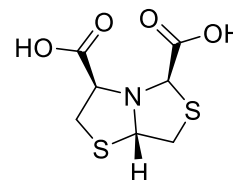


mg, 0.036 mmol) y **23a** (80 mg, 0.36 mmol). La mezcla de reacción se lleva a temperatura ambiente y se agita por 2 h. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida, y se purifica por cromatografía en columna sobre SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos/ AcOEt (7:3) para dar **31** (55 mg, 42%) como un sólido verde-amarillo: 7.94 (m, 2H), 7.43 (m, 2H), 6.78 (m, 2H), 6.66 (m, 2H), 5.43 (ddd, $J = 7.3, 5.2, 1.8$ Hz, 1H), 5.05 (dd, $J = 8.5, 5.7$ Hz, 1H), 3.44 (m, 2H), 3.22 (ddd, $J = 10.8, 5.5, 1.5$ Hz, 1H), 2.85 (ddd, $J = 11.0, 7.2, 1.4$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 190.3, 140.7, 140.2, 138.2, 135.2, 129.1, 128.9, 121.9, 111.9, 109.9, 83.3, 68.5, 39.2, 37.9.

Síntesis representativa de **32a-i**

(3R,5R,7aS)-tetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol-3,5-ácido di-carboxílico (32a):

El compuesto **32a** se prepara según procedimiento general para la síntesis de bioisómeros **32**, **método a**), utilizando como aldehído de intercambio ácido glioxílico (230 mg, 2.5 mmol). Se purifica por cromatografía en columna sobre SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos/ AcOEt / AcOH (1:1:0.1) para dar **32a** (106 mg, 18%) y **32h** (218 mg, 35%)

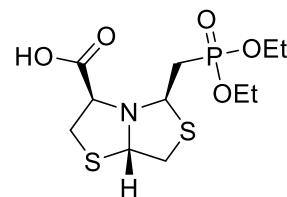


32a: sólido blanco: PF = $86-96^\circ\text{C}$; ^1H RMN ($\text{Acetona-}d_6$) δ 5.14 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.36 (dd, $J = 4.8, 6.3$ Hz, 1H), 3.48 (dd, $J = 5.5, 11.4$ Hz, 1H), 3.37 (dd, $J = 11.2, 6.4$ Hz, 1H), 3.33 (dd, $J = 11.3, 4.7$ Hz, 1H), 3.07 (dd, $J = 11.4,$

5.9 Hz, 1H); ^{13}C RMN (Acetona- d_6) δ 172.63, 172.57, 74.0, 70.5, 69.7, 39.8, 33.2; $[\alpha]_D^{20} = -1$ (acetona, $c = 0.64$).

(3R,5R,7aS)-5-((dietoxifosforil)metil)tetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol-3-ácido carboxílico (32c):

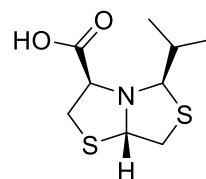
El compuesto **32c** se prepara según procedimiento general para la síntesis de bioisósteros **32**, **método e**): aceite transparente: ^1H RMN



δ 5.03 (dd, $J = 5.2, 1.9$ Hz, 1H), 4.56 (ddd, $J = 10.9, 7.6, 3.6$ Hz, 1H), 4.34 (dd, $J = 6.2, 1.5$ Hz, 1H), 4.09-4.22 (m, 4H), 3.67 (dd, $J = 12.4, 5.3$ Hz, 1H), 3.60 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 3.23 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 3.13 (dd, $J = 10.6, 6.3$ Hz, 1H), 2.35 (dt, $J = 16.5_{(\text{H-P})}$ Hz, 15.4, 10.6 Hz, 1H), 2.21 (dt, $J = 17.9_{(\text{H-P})}$ Hz, 15.4, 3.6 Hz, 1H), 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); ^{13}C RMN δ 170.9, 73.38, 73.35, 68.1 (d, $J_{\text{C-P}} = 5.7$ Hz), 63.3 (d, $J_{\text{C-P}} = 6.7$ Hz), 62.4 (d, $J_{\text{C-P}} = 6.9$ Hz), 40.2, 37.5, 36.2, 33.3, 16.6 (t, $J_{\text{C-P}} = 5.3$ Hz); ^{31}P RMN (162 MHz, CDCl_3) δ 26.93; $[\alpha]_D^{20} = -7$ (acetona, $c = 0.76$).

(3R,5R,7aS)-5-isopropiltetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol-3-ácido carboxílico (32d):

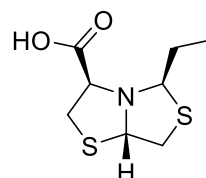
El compuesto **32d** se prepara según procedimiento general para la síntesis de bioisósteros **32**, **método d**): aceite transparente: ^1H RMN δ 5.02 (t, $J = 4.3$ Hz 1H), 4.12 (dd, $J =$



7.1, 3.0 Hz, 1H), 4.06 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 3.42 (m, 2H), 3.33 (dd, $J = 11.3, 7.1$ Hz, 1H), 3.02 (dd, $J = 11.9, 4.3$ Hz, 1H), 1.91 (m, $J = 13.3, 6.7$ Hz, 1H), 1.04 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H); ^{13}C RMN δ 173.6, 79.7, 73.9, 71.2, 38.2, 35.3, 33.3, 20.0, 18.5; HRMS calculado para $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 234.0617, valor encontrado 234.0607; $[\alpha]_D^{20} = -31.3$ (MeOH, $c = 3.2$).

(3R,5R,7aS)-5-etiltetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol-3-ácido carboxílico (32e):

El compuesto **32e** se prepara según procedimiento general para la síntesis de bioisósteros **32**, **método a**), utilizando como aldehído de intercambio 1-propanal (140 mg, 2.4 mmol). Se purifica por cromatografía en columna sobre SiO_2 , fase móvil n -hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar **32e** (119 mg, 68%) como un aceite transparente: ^1H RMN δ 5.04 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.18 (dd, $J = 5.4, 8.3$ Hz, 1H), 4.09 (dd, $J = 3.6, 7.1$ Hz, 1H), 3.45 (m, 1H), 3.37 (m, 2H), 3.05 (dd, $J = 5.1, 8.3$ Hz, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.71 (t, $J = 7.3, 14.3$ Hz, 1H), 1.02 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); ^{13}C

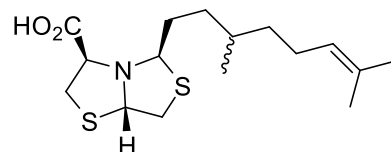


RMN δ 172.6, 74.6, 73.2, 70.2, 37.9, 33.3, 31.6, 11.3; HRMS calculado para

$C_8H_{12}NO_2S_2$ $[M-H]^-$ 218.0315, valor encontrado 218.0309; $[\alpha]_D^{20} = +96.1$ (MeOH, $c = 0.2$).

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-(3,7-dimetiloct-6-en-1-il)tetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-

ácido carboxílico (32f): El compuesto **32f** se prepara según procedimiento general para la síntesis de bioisómeros **32**, **método a**), utilizando

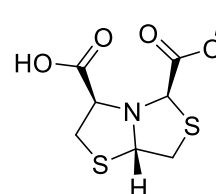


como aldehído de intercambio ($\pm$) citronelal (370 mg, 2.4 mmol). Se purifica por cromatografía en columna sobre SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar una mezcla de epímeros de *syn/anti* **32f** (69 mg, 26%, *syn/anti* 90:10) como un aceite transparente: 1H RMN δ 5.07 (m, 2H), 4.87* (m, 1H), 4.70* (m, 1H), 4.32 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.37 (m, 2H), 3.05 (m, 1H), 1.97 (m, 2H), 1.75 (m, 1H), 1.69 (s, 3H), 1.65 (m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.54 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 1.15 (m, 1H), 0.92 (q, $J = 6.4$ Hz, 3H); ^{13}C RMN δ 174.1, 131.3, 124.3, 124.2, 73.1, 72.9, 71.1, 70.9*, 70.8*, 69.2, 69.1, 46.1, 45.4, 38.0, 37.6, 36.1, 37.4, 33.5, 30.6, 30.4, 25.6, 25.2, 25.1, 19.8, 19.7, 19.1*, 19.0*, 17.6, 17.5*. *Isómero minoritario; HRMS calculado para $C_{16}H_{27}NO_2NaS_2$ $[M+Na]^+$ 352.1375, valor encontrado 352.1394.

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-(metoxicarbonil)tetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]

tiazol-3-ácido

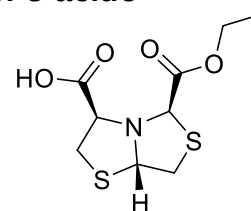
carboxílico (32h): Este compuesto se obtiene como subproducto en la síntesis del diácido **32a**. Aceite transparente:



1H RMN (Acetona- d_6) δ 5.19 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 5.13 (s, 1H), 4.28 (dd, $J = 6.6, 5.1$ Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.52 (dd, $J = 11.3, 5.7$ Hz, 1H), 3.35 (dd, $J = 11.1, 6.6$ Hz, 1H), 3.29 (dd, $J = 11.1, 5.2$ Hz, 1H), 3.08 (dd, $J = 11.4, 5.2$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 171.9, 171.9, 74.1, 70.2, 69.7, 52.8, 40.1, 33.6.

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-(etoxicarbonil)tetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-ácido

carboxílico (32i): El compuesto **32i** se prepara según procedimiento general para la síntesis de bioisómeros **32**, **método a**), utilizando como aldehído de intercambio glioxilato de etilo al 50% en tolueno (0.5 mL, 2.4 mmol). Se purifica por

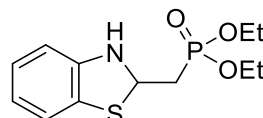


cromatografía en columna sobre SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos/AcOEt/AcOH (7:3:0.1) para dar **32i** como un aceite amarillado: 1H RMN (Acetona- d_6) δ 5.29 (dd, $J = 4.1, 1.8$ Hz, 1H), 4.71 (s, 1H), 4.26 (dd, $J = 10.2, 5.8$ Hz, 1H), 4.12 (m,

2H), 3.67 (ddd, $J = 11.7, 4.1, 1.0$ Hz, 1H), 3.29 (dd, $J = 10.3, 5.8$ Hz, 1H), 3.20 (t, $J = 10.2$ Hz, 1H), 3.12 (dd, $J = 11.7, 1.8$ Hz, 1H), 2.05 (q, $J = 2.2$ Hz, 3H); ^{13}C RMN (Acetona- d_6) δ 170.6, 169.7, 76.1, 69.3, 63.4, 60.4, 37.6, 34.2, 13.5. HRMS calculado para $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NO}_4\text{S}_2^- [\text{M-H}]^-$, 262.0208, valor encontrado 262.0207.

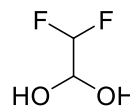
Síntesis de **33b**

Dietil ((2,3-dihidrobenczo[d]tiazol-2-il)metil)fosfonato (33b): En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N_2 , se suspende 2-aminotiofenol (60 mg, 0.5 mmol) en MeOH (10 mL), y se agrega dietil-(2-oxoetil)fosfonato **35c** (110 mg, 0.6 mmol) y p -TsOH (10 mg, 0.05 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 1 h y luego se enfría. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil n -hexanos/AcOEt (1:1) para dar **33b** (59 mg, 41%) como un aceite transparente: ^1H RMN δ 7.04 (dd, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H), 6.92 (td, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 1H), 6.71 (td, $J = 7.6, 1.1$ Hz, 1H), 6.64 (dd, $J = 7.8, 1.1$ Hz, 1H), 5.52 (ddd, $J = 10.2, 5.8, 2.9$ Hz, 1H), 5.16 (s, 1H), 4.14 (m, 4H), 2.52 (td, $J = 15.0, 10.2$ Hz, 1H), 2.15 (ddd, $J = 19.1, 15.1, 2.9$ Hz, 1H), 1.35 (dt, $J = 9.0, 7.1$ Hz, 6H); ^{13}C RMN δ 145.8, 125.8, 124.8, 122.2, 120.3, 110.2, 62.4 (m), 36.1, 34.8, 16.6 (m); HRMS calculada para $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{NaPS} [\text{M-2H+Na}]^-$ 308.0486, valor encontrado 308.0494.



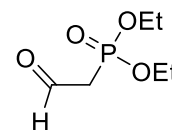
Síntesis de **35b-d**

2,2-difluoroetano-1,1-diol (35b): En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N_2 , se suspende LiAlH_4 (8.2 mL, 8.2 mmol) en Et_2O (20 mL) y se enfría en baño de hielo. Luego, se agrega gota a gota ácido difluoroacético (1g, 10.4 mmol). La mezcla de reacción se agita por 2 h. Luego, se agrega H_2O hasta que no se observa formación de gas (0.5 mL). El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución de HCl 5% y se extrae con Et_2O (3x20 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida para dar **35b** (0.9 g, 91%) como un líquido incoloro: ^1H RMN δ 5.73 (m,

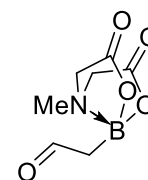


2H_{OH}), 5.56 (td, $^2J_{H-F} = 55.7$, $^3J_{H-H} = 4.0$, 1H), 4.95 (m, 1H). Las propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las descritas en la literatura.⁶

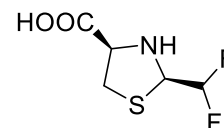
Dietil-(2-oxoetil)fosfonato (35c): En un balón de una boca, se suspende dietil-(2,2-dietoxietil)fosfonato (300 mg, 1.2 mmol) en HCl 2 M (5 mL). La mezcla de reacción se agita por 20 h a temperatura ambiente. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl y se extrae con CH₂Cl₂ (3x20 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida para dar **35c** (140 mg, 65%) como un aceite transparente: ^1H RMN δ 9.67 (td, $J = 3.2$, 0.9 Hz, 1H), 4.16 (m, 4H), 3.09 (dd, $J = 21.9_{(H-P)}$, 3.2 Hz, 2H), 1.36 (td, $J = 7.1$, 0.2 Hz, 6H). Las propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las descritas en la literatura.⁷



α -MIDA boril acetaldehído (35j): En un balón de tres bocas, se suspende alil-MIDA boronato **50** (200 mg, 1.0 mmol) en una mezcla MeOH:CH₂Cl₂ 1:3 (10 mL) y se enfría con cooler a -78°C. La mezcla de reacción se agita por 10 min. Se introduce el difusor de gas en la mezcla de reacción y se barbotea O₃. La mezcla de reacción se agita por 4 h a -78°C, hasta que la solución se torna azul. Se detiene el flujo de O₃ y se barbotea N₂ hasta la desaparición del color azul. Se agrega PPh₃ (530 mg, 2 mmol) y la mezcla se agita por 2 h a temperatura ambiente. Se concentra a presión reducida y se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil AcOEt:Acetona (95:5) para dar **35j** (131 mg, 66%) como un sólido blanco: ^1H RMN (DMSO-*d*₆) δ 9.66 (t, $J = 3.8$ Hz, 1H), 4.27 (d, $J = 17.0$ Hz, 2H), 4.03 (d, $J = 17.0$ Hz, 2H), 2.89 (s, 3H). Las propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las descritas en la literatura.⁸

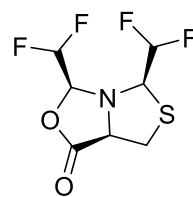


(2R,4R)-2-(difluorometil)tiiazolidin-4- ácido carboxílico (39): Este compuesto se obtiene como producto en la síntesis del difluor **32b**. Aceite: ^1H RMN δ 5.80 (td, $J = 56.2_{H-F}$, 4.5 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.75 (td, $J = 10.1$, 4.4 Hz, 1H), 4.27 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.32 (m, 1H), 3.25 (dd, $J = 11.1$, 6.7 Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 172.37, 113.17 (td, $J = 247.1$, 228.6 Hz), 93.61 (t, $J = 27.0$ Hz), 75.67 (t, $J = 24.8$ Hz), 65.26, 35.30.



(3*S*,5*R*,7*aR*)-3,5-bis(difluorometil)dihidro-1*H*,3*H*,5*H*-tiazol[3,4-*c*]oxazol-1-

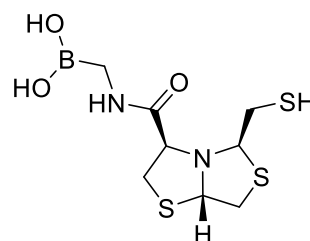
ona (40): Este compuesto se obtiene como producto en la síntesis del difluor **32b**. Aceite: ^1H RMN δ 5.75 (m, 2H), 5.10 (ddd, $J = 9.5, 7.2, 2.7$ Hz, 1H), 4.57 (td, $J = 12.9, 2.7$ Hz, 1H), 4.28 (dd, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 3.51 (ddt, $J = 12.0, 7.7, 1.3$ Hz, 1H), 3.40 (dq, $J = 12.0, 2.2$ Hz, 1H); ^{13}C RMN δ 172.37, 113.17 (td, $J = 247.1, 228.6$ Hz), 93.61 (t, $J = 27.0$ Hz), 75.67 (t, $J = 24.8$ Hz), 65.26, 35.30.



Síntesis de 41

Ácido (((3*R*,5*R*,7*aS*)-5-(mercaptometil)tetrahidro-5*H*-tiazol[4,3-*b*]tiazol-3-carboxamido)metil) borónico (41): El compuesto **41** se

prepara según procedimiento general para la desprotección de tioésteres, método c) utilizando como material de partida **46** (50 mg, 0.15 mmol). Se purifica por trituración con Et₂O (3 x 2 mL) para dar **41** (19 mg,

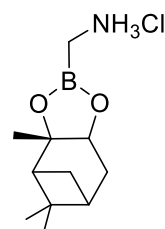


43%) como un sólido amarillo: ^1H RMN (MeOH-*d*₄) δ 4.56 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.39 (dd, $J = 7.7, 5.9$ Hz, 1H), 3.59 (dd, $J = 12.1, 5.4$ Hz, 1H), 3.34 (m, 3H), 3.10 (dd, $J = 12.3, 3.9$ Hz, 1H), 2.88 (dd, $J = 13.7, 7.7$ Hz, 1H), 2.74 (dd, $J = 13.7, 6.0$ Hz, 1H), 2.53 (m, 2H); ^{13}C RMN (MeOH-*d*₄) δ 177.4, 76.9, 74.9, 54.8, 39.9, 38.9, 34.1; HRMS calculado para C₈H₁₄BN₂O₃S₃ [M-H]⁻ 293.0254, valor encontrado 293.0266.

Síntesis de 42

(((3*aS*)-3*a*,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[*d*][1,3,2]dioxaborol-2-il)metil)-l-5-azane clorhidrato (42): En un balón de dos bocas, bajo

atmósfera de Ar, se suspende **44** (1.1 g mg, 3.1 mmol) en THF (18 mL), y se enfría en baño de acetona/hielo. Luego, se agrega gota a gota HCl 4M en dioxano (2.7 mL, 10.9 mmol). La mezcla de reacción se lleva a temperatura ambiente, y se agita por 2 h. Luego,



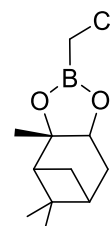
se filtra y concentra a presión reducida. Se purifica por trituración con Et₂O (3 x 2 mL) para dar **42** (243 mg, 32%) como un sólido beige: ^1H RMN (DMSO-*d*₆) δ 7.93 (s, 1H), 7.47 (t, $J = 50.2$ Hz, 1H), 4.42 (dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 1H), 2.40 (m, 1H), 2.31 (m, 1H), 2.17 (m, 1H), 1.98 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.76 (m,

1H), 1.37 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.23 (m, 1H), 0.82 (s, 3H); ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 86.6, 82.8, 77.6, 75.6, 51.2, 50.7, 37.9, 37.8, 35.6, 34.6, 28.5, 28.2, 26.9, 26.8, 25.9, 24.0, 23.7, 23.6.

Síntesis de **43**

(3a*S*)-2-(clorometil)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]

dioxaborol (43): En un balón de tres bocas, bajo atmósfera de Ar, se suspende CH_2BrCl (1.31 mL, 20.1 mmol) en THF seco (15 mL) y se enfría a -80°C . Luego, se agrega triisopropilborano (4 mL, 17.3 mmol), y BuLi (7.28 mL, 18.2 mmol) gota a gota con un ecualizador en un período de 40 min. La mezcla de reacción se agita por 1 h a -80°C .

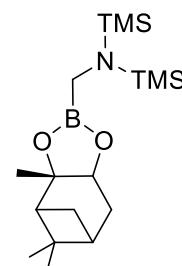


Luego, se agrega TMS-Cl (2.55 mL, 20.1 mmol) gota a gota con un ecualizador en un período de 15 min. La mezcla de reacción se agita por 1 h a -80°C , se lleva a temperatura ambiente y se agita por 12 h. Se agrega (+)-pinandiol (2.5 g, 17.3 mmol) y se agita por 3 h a temperatura ambiente. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida. Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos: CH_2Cl_2 (1:1) para dar **43** como un aceite transparente: ^1H RMN δ 4.38 (dd, $J = 8.7, 1.8$ Hz, 1H), 3.01 (s, 2H), 2.36 (m, 1H), 2.25 (m, 1H), 2.09 (dd, $J = 6.1, 4.9$ Hz, 1H), 1.92 (m, 2H), 1.43 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.16 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 0.85 (s, 3H); ^{13}C RMN δ 87.2, 78.9, 51.4, 39.6, 38.4, 35.3, 28.6, 27.2, 26.5, 24.1.

Síntesis de **44**

1,1,1-trimetil-N-(((3a*S*)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]

dioxaborol-2-il)metil)-N-(trimetilsilil)silanamina (44): En una bomba de Slenck, bajo atmósfera de Ar, se suspende **43** (1.0 g mg, 4.38 mmol) en THF (12 mL), y se enfría a -100°C con cooler y N_2 líquido. Luego, se agrega gota a gota $\text{LiN}(\text{TMS})_2$ 1 M (4.81 mL, 4.81 mmol). La mezcla de reacción se agita 2 h a -100°C y 16



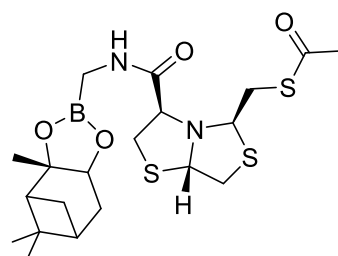
h a temperatura ambiente. Luego, se agrega éter de petróleo (40 mL), se filtra por Celite y se concentra a presión reducida para dar **44** (0.8 g, 51%) como un

sólido marrón: ^1H RMN δ 4.27 (dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 1H), 2.49 (s, 2H), 2.32 (ddt, $J = 14.2, 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 2.21 (m, 1H), 2.03 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 1.90 (tt, $J = 5.8, 3.0$ Hz, 1H), 1.83 (ddd, $J = 14.6, 3.4, 2.1$ Hz, 1H), 1.36 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.15 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 0.84 (s, 3H), 0.07 (s, 18H); ^{13}C RMN δ 83.7, 76.9, 51.8, 39.7, 38.5, 36.1, 28.7, 27.3, 26.5, 24.1, 1.8, 1.0.

Síntesis de **45**

S-(((3R,5R,7aS)-3-((((3aS)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-il)metil)carbamoil)tetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol-5-il)metil) etanotioato (45**):**

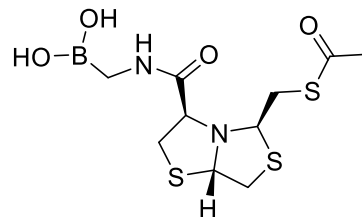
En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de Ar, se suspende **9a** (100 mg, 0.36 mmol) en DMF (5 mL), y se enfría en baño de hielo. Luego, se agrega el HBTU (150 mg, 0.4 mmol), el



clorhidrato **42** (88 mg, 0.36 mmol) y la DIPEA (0.13 mL, 0.72 mmol). La mezcla de reacción se lleva a temperatura ambiente y se agita por 30 min. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con Et₂O (3x15 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra a presión reducida para dar **45** (110 mg, 65%) como un aceite marrón: ^1H RMN δ 7.19 (br, 1H), 4.99 (dd, $J = 5.7, 4.1$ Hz, 1H), 4.32 (m, 2H), 4.05 (dd, $J = 7.2, 3.6$ Hz, 1H), 3.55 (dd, $J = 11.9, 5.7$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 11.0, 3.7$ Hz, 1H), 3.25 (dd, $J = 11.0, 7.2$ Hz, 1H), 3.21 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.07 (dd, $J = 11.9, 4.1$ Hz, 1H), 2.89 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.33 (m, 1H), 2.22 (m, 1H), 2.03 (m, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.85 (ddd, $J = 14.5, 3.4, 2.0$ Hz, 1H), 1.41 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 0.84 (s, 3H); ^{13}C RMN δ 195.1, 170.9, 86.6, 78.4, 73.4, 72.1, 71.7, 51.5, 39.7, 39.3, 38.8, 38.3, 37.8, 35.5, 33.8, 30.8, 28.7, 27.2, 26.5, 24.1; HRMS calculado para C₂₀H₃₂BN₂O₄S₃⁺ [M+H]⁺ 471.1612, valor encontrado 471.1615; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -29.6$ (CH₂Cl₂, $c = 3.52$).

Síntesis de **46****((((3R,5R,7aS)-5-((acetiltio)metil)tetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol-3-**

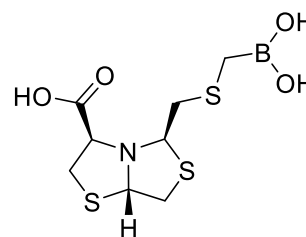
carboxamido)metil) ácido borónico (46): En un balón de una boca, bajo atmósfera de Ar, se suspende **45** (300 mg, 0.64 mmol) en MeCN (3 mL), y se agrega HCl (3M, 1.50 mmol), ácido isobutilborónico (65 mg, 0.64 mmol) y *n*-hexano (3



mL). La solución bifásica se agita vigorosamente por 30 min. Luego, se elimina la capa de *n*-hexano conteniendo el boronato de isobutilo y se agrega nuevamente *n*-hexano (3 mL). El último procedimiento se repite varias veces hasta no detectarse boronato de isobutilo en la capa de *n*-hexano, monitoreado por TLC (FM: *n*-hexanos:CH₂Cl₂ 8:2). Luego, la fase de acetonitrilo se concentra y el crudo se purifica por trituración con MeCN (3 x 2 mL) y Et₂O (3 x 2 mL) para dar **46** (125 mg, 58%) como un sólido blanco: ¹H RMN (MeOH-*d*₆) δ 5.08 (dd, *J* = 5.4, 3.5 Hz, 1H), 4.51 (dd, *J* = 6.3, 2.9 Hz, 1H), 4.40 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.63 (dd, *J* = 12.1, 5.4 Hz, 1H), 3.30 (m, 2H), 3.24 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.12 (dd, *J* = 12.1, 3.5 Hz, 1H), 2.91 (br, 1H), 2.54 (s, 2H), 2.36 (s, 3H); HRMS calculado para C₁₀H₁₆BN₂O₄S₃⁻ [M-H]⁻ 335.0360, valor encontrado 335.0376; [α]_D²⁰ = -140 (MeOH, *c* = 0.21).

Síntesis de **47a-b****(3R,5R,7aS)-5-(((boronometil)tio)metil)tetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol-3-**

ácido carboxílico (47a): El compuesto **47a** fue preparado de manera análoga a **46** utilizando como material de partida **48** (215 mg, 0.50 mmol). Se purifica por trituración con Et₂O (3 x 2 mL) para dar **47a** (95 mg, 64%) como un sólido violeta: PF = 305-320°C (desc); ¹H

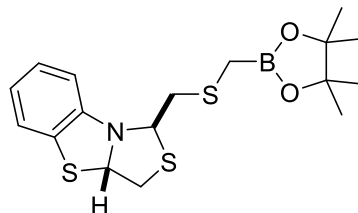


RMN (DMSO-*d*₆) δ 5.77 (m, 1H), 5.06 (m, 2H), 3.67 (dd, *J* = 12.6, 5.7 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J* = 11.4, 5.9 Hz, 1H), 3.44 (dd, *J* = 11.3, 2.7 Hz, 1H), 3.17 (m, 2H), 2.74 (dd, *J* = 14.6, 2.7 Hz, 1H) 1.60 (s, 2H); ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ 169.3, 75.3, 74.8, 40.1, 39.1, 33.3, 29.9, 15.2*. *asignado por HMBC; HRMS calculado para

$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{BNO}_4\text{S}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 294.0094, valor encontrado 294.0110; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -21.4$ (MeOH, $c = 1.09$).

1-((((4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)metil)tio)metil)-3,3a-dihidro-1H-benzo[d]tiazol[4,3-b]tiazol (47b):

En un balón de una boca, bajo atmósfera de N_2 , se suspende **17a** (100 mg, 0.41 mmol) en THF (10 mL), y se enfría en baño de hielo. Luego, se agrega 2-(bromometil)-

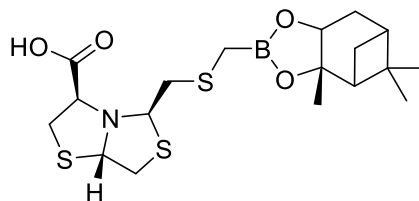


4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (90 mg, 0.41 mmol) y DIPEA (106 mg, 0.82 mmol). La mezcla de reacción se agita por 1 h a temperatura ambiente. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida para dar **47b** (133 mg, 85%) como un aceite marrón: ^1H RMN δ 7.09 (m, 2H), 6.85 (m, 2H), 5.28 (dd, $J = 8.5, 5.5$ Hz, 1H), 5.15 (dd, $J = 9.8, 5.3$ Hz, 1H), 3.20 (dd, $J = 10.6, 5.3$ Hz, 1H), 3.09 (dd, $J = 13.9, 8.5$ Hz, 1H), 2.90 (dd, $J = 10.6, 9.8$ Hz, 1H), 2.78 (dd, $J = 13.9, 5.5$ Hz, 1H), 2.17 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H), 2.09 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H), 1.28 (s, 12H); ^{13}C RMN δ 145.4, 126.3, 124.8, 123.1, 122.0, 111.0, 84.2, 70.9, 68.5, 43.1, 40.0, 24.9.

Síntesis de 48

(3R,5R,7aS)-5-((((4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)metil)tio)metil)tetrahidro-5H-tiazol[4,3-b]tiazol-3-ácido carboxílico (48):

En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de Ar, se suspende **1a** (200 mg, 0.84 mmol) en THF (3 mL), y se enfría en baño



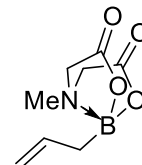
de hielo. Luego, se agrega **43** (202 mg, 0.89 mmol) y DIPEA (0.37 mL, 2.1 mmol). La mezcla de reacción se agita por 1 h a 0°C . El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida para dar **48** (269 mg, 85%) como un aceite violeta: ^1H RMN δ 4.96 (dd, $J = 6.3, 4.6$ Hz, 1H), 4.50 (dd, $J = 9.6, 5.0$ Hz, 1H), 4.31 (dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 1H), 4.17 (dd, $J = 7.3, 3.0$ Hz, 1H), 3.51 (dd, $J = 11.9, 6.3$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 11.4, 3.0$ Hz, 1H), 3.31 (dd, $J = 11.4, 7.3$ Hz, 1H), 3.09 (dd, $J = 11.9, 4.6$ Hz, 1H), 2.88 (dd, $J = 14.0, 5.0$ Hz, 1H), 2.82 (dd, $J = 14.0, 9.6$ Hz, 1H), 2.33 (ddt, $J = 14.7, 8.8, 2.4$

Hz, 1H), 2.24 (m, 1H), 2.05 (m, 3H), 1.92 (m, 1H), 1.85 (m, 1H), 1.40 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.10 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 0.83 (s, 3H); ^{13}C RMN δ 172.2, 86.8, 78.5, 72.5, 71.8, 71.7, 51.3, 43.3, 39.8, 39.6, 38.3, 35.4, 33.3, 28.6, 27.1, 26.6, 24.1; HRMS calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{BNO}_4\text{S}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 428.1190, valor encontrado 428.1199.

Síntesis de **50**

8-alil-4-metildihidro-4H,8H-[1,3,2]oxazaborolo[2,3-b][1,3,2]oxazaborol-2,6 (3H,5H)-diona (**50**):

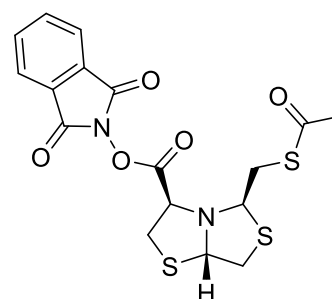
En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de Ar, se suspende alil-boronato pinacol éster (1 g, 5.6 mmol) en DMF (2.5 mL), y se agrega MIDA (0.96 g, 6.6 mmol) y trimetilortoformiato (4 mL). La mezcla se calienta a reflujo durante 5 h, y luego se enfría. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida y luego se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil AcOEt/Acetona (95:5) para dar **50** como un aceite transparente: ^1H RMN (Acetona- d_6) δ 5.87 (ddt, $J = 17.7, 10.2, 7.6$ Hz, 1H), 4.99 (ddt, $J = 17.0, 2.9, 1.5$ Hz, 1H), 4.89 (ddt, $J = 10.1, 2.5, 1.3$ Hz, 1H), 4.19 (d, $J = 16.9$ Hz, 2H), 3.97 (d, $J = 16.9$ Hz, 2H), 3.12 (s, 3H); ^{13}C RMN (Acetona- d_6) δ 168.7, 137.0, 115.3, 62.9, 46.3.



Síntesis de **52a-b**

1,3-dioxoisindolin-2-il (3R,5R,7aS)-5-((acetiltio)metil)tetrahidro-5H-tiazol [4,3-b]tiazol-3-carboxilato (**52a**):

En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de Ar, se suspende **9a** (500 mg, 1.79 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL), y se agrega N-hidroxiftalimida (292 mg, 1.79 mmol), 4-DMAP (22 mg, 0.18 mmol) y DCC (406 mg, 1.97 mmol). La mezcla de reacción se agita por 1 h a temperatura ambiente. El

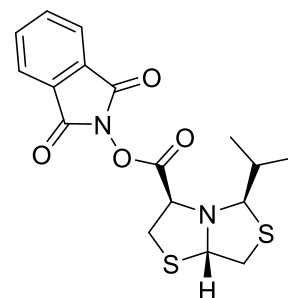


crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con AcOEt (3x30 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida. Se purifica por cromatografía en columna sobre SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (8:2) para dar **52a** (470 mg, 62%) como un aceite marrón: ^1H RMN δ 7.90 (dd, $J = 5.5, 3.1$ Hz, 2H), 7.81 (dd, $J = 5.5, 3.1$ Hz,

2H), 5.26 (dd, $J = 5.3, 2.9$ Hz, 1H), 4.65 (dd, $J = 6.8, 4.5$ Hz, 1H), 4.35 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.65 (dd, $J = 12.0, 5.4$ Hz, 1H), 3.51 (dd, $J = 11.3, 4.5$ Hz, 1H), 3.46 (dd, $J = 11.3, 6.8$ Hz, 1H), 3.31 (dd, $J = 13.8, 7.2$ Hz, 1H), 3.15 (m, 2H), 2.37 (s, 3H); HRMS calculado para $C_{17}H_{17}N_2O_5S_3$ $[M+H]^+$ 425.0294, valor encontrado 425.0293; $[\alpha]_D^{20} = -17.7$ (CH_2Cl_2 , $c = 1.27$).

1,3-dioxoisindolin-2-yl (3*R*,5*R*,7*aS*)-5-isopropyltetrahydro-5*H*-thiazolo[4,3-*b*]thiazole-3-carboxylate (52*b*):**

El compuesto **52b** fue preparado de manera análoga a **52a** utilizando como material de partida **32d** (200 mg, 0.9 mmol). Se purifica por cromatografía en columna SiO_2 , fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (8:2) para dar **52b** (179 mg, 55%) como un sólido blanco: 1H RMN δ 7.89 (dd, $J = 5.5, 3.1$ Hz, 2H),

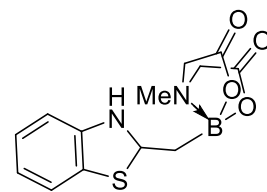


7.80 (dd, $J = 5.5, 3.1$ Hz, 2H), 5.16 (dd, $J = 5.5, 3.6$ Hz, 1H), 4.51 (dd, $J = 6.7, 5.1$ Hz, 1H), 4.07 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.49 (h, $J = 5.9$ Hz, 3H), 3.07 (dd, $J = 11.8, 3.6$ Hz, 1H), 1.88 (h, $J = 6.7$ Hz, 1H), 1.04 (d, $J = 3.9$ Hz, 3H), 1.02 (d, $J = 3.8$ Hz, 3H); ^{13}C RMN δ 167.6, 161.7, 135.0, 129.0, 124.2, 79.8, 74.0, 68.3, 38.6, 36.0, 20.0, 18.7.

Síntesis de 55

8-((2,3-dihidrobenczo[d]tiazol-2-il)metil)-4-metildihidro-4 λ^4 ,8 λ^4 -[1,3,2]oxazaborol[2,3-*b*][1,3,2]oxazaborol-2,6(3*H*,5*H*)-diona

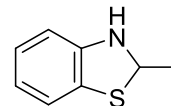
(55): En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N_2 , se suspende 2-aminotiofenol **18a** (100 mg, 0.8 mmol) en MeOH (5 mL) y se enfría en baño de hielo. Luego, se agrega



el aldehído **35j** (160 mg, 0.8 mmol) y *p*-TsOH (14 mg, 0.08 mmol). La mezcla de reacción se agita por 30 min a 0°C. El crudo de la reacción se vuelca sobre una solución saturada de NaCl (15 mL) y se extrae con CH_2Cl_2 (3x15 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra a presión reducida para dar **55** (218 mg, 89%) como un aceite transparente: 1H RMN (Acetona- d_6) δ 7.05 (dd, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H), 6.90 (td, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 1H), 6.69 (qd, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 2H), 5.59 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 5.35 (s, 1H), 4.33 (d, $J = 16.9$ Hz, 2H), 4.18 (dd, $J = 16.9, 6.7$ Hz, 2H), 3.23 (s, 3H), 1.59 (dd, $J = 14.2, 8.1$ Hz, 1H), 1.42 (dd, $J = 14.3, 5.5$

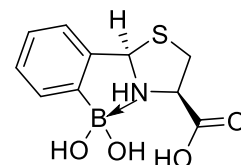
Hz, 1H); ^{13}C RMN (Acetona- d_6) 168.5, 148.3, 128.0, 125.6, 122.0, 120.0, 110.4, 67.1, 63.5, 62.7, 46.5.

2-metil-2,3-dihidrobenczo[d]tiazol (56): Este compuesto se obtiene como producto en la síntesis de **54b**. Aceite transparente: ^1H RMN δ 7.08 (dd, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H), 6.91 (td, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H), 6.76 (td, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 5.40 (q, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.01 (s, 1H), 1.62 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H); ^{13}C RMN δ 146.5, 128.2, 125.3, 122.2, 121.2, 111.3, 64.0, 24.5.



Síntesis representativa de **57a-b**

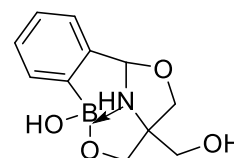
(2R,4R)-2-(2-boronofenil)tiazolidin-4- ácido carboxílico (57a): En un balón de una boca, se suspende L-cisteína (100 mg, 0.8 mmol) en THF (5 mL), y se agrega o-formilfenilborónico (120 mg, 0.8 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 24 h. El crudo de la reacción se seca con Na_2SO_4 , se filtra y concentra



a presión reducida para dar **57a** (192 mg, 95%), como sólido blanco: ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 8.73 (s, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.24 (m, 2H), 7.15 (m, 1H), 6.12 (s, 1H)*, 6.10 (s, 1H), 4.66 (dd, $J = 5.9, 2.7$ Hz, 1H), 4.57 (dd, $J = 6.2, 3.4$ Hz, 1H)*, 3.53 (dd, $J = 12.4, 6.3$ Hz, 1H)*, 3.47 (dd, $J = 12.2, 6.0$ Hz, 1H), 3.38 (dd, $J = 12.2, 2.7$ Hz, 1H), 3.29 (m, 1H), 2.89 (dd, $J = 14.0, 4.2$ Hz, 1H)*, 2.79 (dd, $J = 14.0, 6.6$ Hz, 1H)*; ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 172.1, 171.9*, 142.7, 142.5*, 129.8*, 129.7, 128.0, 127.9, 127.9*, 127.8*, 122.5, 122.3*, 72.4*, 72.1, 65.4*, 64.7, 37.4, 36.6*. *producto minoritario.

4-(hidroximetil)-4,5-dihidro-3H-4,7-epiminobenzo[c][1,6,2]dioxaboronin-

1(7H)-ol (57b): El compuesto **57b** fue preparado de manera análoga a **57a** utilizando como material de partida TRIS (250 mg, 2.1 mmol). Se evapora bajo presión reducida para dar **57b**



(484 mg, 98%) como un sólido blanco: PF = 330-338°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7.21 (m, 4H), 6.89 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 6.00 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 5.25 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, B-OH), 3.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.76 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.69 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.64 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.09 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H); ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 142.5, 129.5, 128.4, 126.9, 123.2, 93.0, 72.1, 70.5, 66.3, 60.5;

HRMS calculada para $C_{11}H_{14}^{10}BNO_4Na^+$ $[M+Na]^+$ 257.0950, valor encontrado 257.0944.

10.2.3 Preparación del reactivo soportado en polímero (TG-NCO-SH).

En un cartucho para fase sólida provisto con un filtro, se añade la resina TentaGel® O-(2-aminoetil) (100 mg, 0.4 mmol/g, 1 % de DVB reticulado, malla 100–200) y se hincha con DMF (2 mL, 30 min). Se agrega una solución de ácido 2-(acetiltio)acético (26.2 mg, 0.19 mmol), HBTU (73.1 mg, 0.19 mmol) y DIPEA (0.054 mL, 0.29 mmol) en DMF (0.5 mL). La resina se agita durante 2 h a temperatura ambiente. El punto final de la reacción se determina mediante la prueba de Kaiser (test de ninhidrina, ver 9.5 Test Colorimétricos). Cuando se obtiene una prueba de Kaiser negativa (2 ciclos), la resina se filtra y se lava con DMF (2 mL x 3). Finalmente, los sitios sin reaccionar se tapan mediante tratamiento con una solución de Ac_2O (300 μ L), DIPEA (150 μ L) en DMF (2.5 mL) durante 15 min. La resina se filtra y se lava con DMF (2 mL x 5). La resina se trata con una mezcla de 2-mercaptoetanol (0.1 mL) y DIPEA (0.1 mL) en DMF (1.8 mL) y se agita bajo atmósfera de N_2 (3x15 min). La resina se filtra y se lava con DMF (2 mL x 7) y la carga de tiol se calcula mediante el método de Ellman (ver 10.5 Test Colorimétricos).

10.3 Screening a pequeña escala: Miniaturización de reacción

10.3.1 Optimización del tiempo de reacción de la desprotección de **9a con el reactivo en fase sólida TG-NCO-SH como agente de desprotección**

En un cartucho para fase sólida provisto con un filtro, conteniendo el catalizador soportado en polímero (TG-NCO-SH, 0.9 g, 0.03 mmol), se añade una solución de **9a** (4.2 mg, 0.015 mmol) en MeOH (0.1 mL) y BP desgasificado pH 8 (0.4 mL) y se agita bajo atmósfera de N_2 a temperatura ambiente. A intervalos adecuados de tiempo (2, 6 y 24 h), el polímero se filtra, se diluye y se inyecta en un equipo HPLC. Luego, se calcula el % rendimiento de **1a** a través de una técnica analítica validada, según se detalla en la Sección 10.7 Métodos HPLC.

10.3.2 Optimización de las condiciones de desprotección de **9a utilizando 2-aminotioles**

En Eppendorf® individuales de 2 mL se incubaba una solución de **9a** (100 μ L de una solución 42 mM en MeOH) en buffer acuosos 1 M (pH 5, 6, 7 u 8, volumen final 1 mL). y se añade el 2-aminotiol (10, 20, 60 o 100 μ L de una solución 420 mM en MeOH, correspondientes a 1, 2, 6 o 10 equivalentes). La solución de reacción se mantuvo a 25 °C y a intervalos de tiempo adecuados se toman alícuotas de 100 μ L y se añadió acetonitrilo (400 μ L). La solución se agita, se filtra y se inyecta en un equipo HPLC. Luego, se calcula el % rendimiento de **1a** a través de una técnica analítica validada, según se detalla en la Sección 10.7 Métodos HPLC.

10.4 Difracción de Rayos X

10.4.1 Técnica de evaporación del disolvente para la obtención de cristales

En un vial se disuelve ($\pm$)-**31** (10 mg, 0.03 mmol) en CH_2Cl_2 (0.5 mL) y se agrega *n*-hexano (5 mL). 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.

10.4.2 Datos recabados de la estructura molecular de ($\pm$)-31****

Para la determinación de la estructura cristalina se seleccionó un cristal adecuado de ($\pm$)-**31** y se colocó en un difractor 'Bruker APEX-II CCD'. El cristal se mantuvo a 295.57 K durante la recogida de datos. Usando Olex2,⁹ la estructura se resolvió con el programa de solución de estructura SHELXT¹⁰ usando Intrinsic Phasing y se refinó con el paquete de refinamiento XL usando la minimización por mínimos cuadrados.

Datos del cristal: monoclinico, space group $P2_1/c$ (no. 14), $a = 15.6486(13)$ Å, $b = 5.8283(5)$ Å, $c = 19.6468(16)$ Å, $\beta = 112.631(2)^\circ$, $V = 1653.9(2)$ Å³, $Z = 4$, $T = 295.57$ K, $\mu(\text{CuK}\alpha) = 4.442$ mm⁻¹, $D_{\text{calc}} = 1.457$ g/cm³, 31279 reflexiones medidas ($9.31^\circ \leq 2\theta \leq 136.576^\circ$), 3010 único ($R_{\text{int}} = 0.0398$, $R_{\text{sigma}} = 0.0282$) el cual fue usado para todas los cálculos. El R_1 final fue 0.0405 ($I > 2\sigma(I)$) y wR_2 fue 0.1100 para todos los datos.

Table 1: Crystal data and structure refinement for cu_200213_AP_VV01.

Identification code	cu_200213_AP_VV01_0m_ a
Empirical formula	C ₁₇ H _{14.99} ClN ₂ OS ₂
Formula weight	362.87
Temperature/K	295.57
Crystal system	monoclinic
Space group	P2 ₁ /c
a/Å	15.6486(13)
b/Å	5.8283(5)
c/Å	19.6468(16)
α /°	90
β /°	112.631(2)
γ /°	90
Volume/Å ³	1653.9(2)
Z	4
ρ_{calc} /cm ³	1.457
μ /mm ⁻¹	4.442
F(000)	752.0
Crystal size/mm ³	0.543 × 0.356 × 0.218
Radiation	CuK α (λ = 1.54178)
2 Θ range for data collection/°	9.31 to 136.576
Index ranges	-18 ≤ h ≤ 18, -7 ≤ k ≤ 7, -23 ≤ l ≤ 23
Reflections collected	31279
Independent reflections	3010 [R _{int} = 0.0398, R _{sigma} = 0.0282]
Data/restraints/parameters	3010/0/216
Goodness-of-fit on F ²	1.064
Final R indexes [$ I \geq 2\sigma(I)$]	R ₁ = 0.0405, wR ₂ = 0.1083

Final R indexes [all data] $R_1 = 0.0428$, $wR_2 = 0.1100$

Largest diff. peak/hole / e Å⁻³ 0.62/-0.47

Table 2: Fractional Atomic Coordinates ($\times 10^4$) and Equivalent Isotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for cu_200213_AP_VV01_0m_a. U_{eq} is defined as 1/3 of the trace of the orthogonalised U_{ij} tensor.

Atom	x	y	z	U(eq)
S1	7075.9(4)	5628.7(10)	904.6(3)	64.2(2)
S2	8072.4(4)	3251.6(12)	3227.9(3)	68.0(2)
Cl1	9352.2(5)	6101.4(13)	6923.9(3)	78.0(2)
N2	6341.5(10)	3200(3)	1696.8(8)	46.1(4)
O1	8740.3(17)	7422(3)	3394.2(11)	88.1(6)
N1	5342.2(14)	671(4)	858.3(12)	60.1(5)
C2	5426.0(12)	3816(3)	1584.4(10)	43.7(4)
C12	8718.4(12)	5825(3)	4494.9(11)	49.2(4)
C1	4825.0(14)	2230(3)	1103.3(10)	49.1(4)
C7	6251.7(14)	1722(4)	1060.3(11)	53.0(5)
C11	8546.7(14)	5818(4)	3693.4(12)	54.2(5)
C9	7053.4(13)	4885(4)	1825.5(11)	50.4(5)
C15	9108.0(14)	5995(4)	5987.5(12)	54.7(5)
C3	5098.5(14)	5538(4)	1899.0(11)	52.6(5)
C13	9144.4(15)	7726(4)	4906.6(13)	57.6(5)
C17	8478.3(16)	4016(4)	4845.3(13)	58.7(5)
C6	3889.5(15)	2313(4)	946.2(12)	59.9(5)
C14	9345.6(15)	7818(4)	5653.2(13)	61.2(5)
C16	8674.5(16)	4091(4)	5593.3(13)	60.9(5)
C4	4148.9(15)	5633(4)	1724.8(13)	61.9(6)
C5	3559.6(15)	4035(4)	1263.4(13)	63.1(6)
C8	6323.6(16)	3290(4)	456.9(12)	60.5(5)
C10	7997.3(14)	3954(5)	2314.1(12)	62.4(6)

Table 3: Anisotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for cu_200213_AP_VV01. The Anisotropic displacement factor exponent takes the form: $2\pi^2[h^2a^{*2}U_{11}+2hka^*b^*U_{12}+\dots]$.

Atom	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
S1	79.4(4)	60.0(4)	58.0(3)	-5.0(2)	31.6(3)	-10.8(3)
S2	62.1(3)	78.9(4)	54.0(3)	-5.6(3)	12.3(3)	-22.8(3)
Cl1	82.2(4)	92.1(5)	55.6(3)	-2.1(3)	21.8(3)	3.0(3)
N2	44.0(8)	48.8(9)	43.7(8)	-7.5(7)	14.9(6)	-1.2(7)
O1	139.0(18)	63.4(11)	79.0(12)	1.9(9)	61.0(12)	-12.7(11)
N1	65.1(11)	49.5(11)	66.3(12)	-16.0(9)	26.0(9)	-9.0(8)
C2	43.5(9)	48.7(10)	37.1(9)	-3.1(7)	13.5(7)	-2.4(8)
C12	38.3(9)	50.3(11)	57.9(11)	1.7(8)	17.4(8)	2.5(8)
C1	52.1(10)	49.2(10)	42.7(9)	-4.6(8)	14.5(8)	-5.1(8)
C7	54.6(11)	47.9(11)	54.9(11)	-13.8(9)	19.4(9)	2.0(9)
C11	48.4(10)	56.1(12)	59.1(12)	2.5(10)	21.9(9)	3.2(9)
C9	48.7(10)	54.4(11)	50.0(10)	-12.5(9)	20.9(8)	-6.4(9)

C15	43.8(10)	63.1(13)	55.1(11)	-0.1(9)	16.7(9)	6.9(9)
C3	50.7(10)	56.4(12)	50.7(11)	-11.3(9)	19.5(9)	-2.8(9)
C13	56.0(11)	51.1(11)	66.2(13)	-0.3(10)	24.0(10)	-6.8(9)
C17	61.7(12)	52.4(12)	61.2(13)	-2.8(9)	22.8(10)	-8.8(10)
C6	49.6(11)	68.1(14)	53.0(11)	-6.3(10)	10.0(9)	-13.0(10)
C14	56.5(12)	56.7(13)	66.9(14)	-8.7(11)	20.0(10)	-7.2(10)
C16	63.1(12)	58.3(13)	63.4(13)	5.0(10)	26.8(10)	-4.6(10)
C4	54.8(11)	69.1(15)	65.6(13)	-5.1(11)	27.4(10)	7.7(10)
C5	43.5(10)	79.6(15)	62.3(13)	3.4(11)	16.0(9)	1.8(10)
C8	65.1(13)	69.4(14)	51.4(11)	-13.5(10)	27.1(10)	-6.2(11)
C10	45.6(10)	84.7(16)	56.2(12)	-10.3(11)	18.8(9)	-6.2(10)

Table 4 Bond Lengths for cu_200213_AP_VV01_0m_a.

Atom	Atom	Length/Å	Atom	Atom	Length/Å
S1	C9	1.874(2)	C12	C11	1.492(3)
S1	C8	1.795(2)	C12	C13	1.382(3)
S2	C11	1.761(2)	C12	C17	1.388(3)
S2	C10	1.801(2)	C1	C6	1.376(3)
Cl1	C15	1.730(2)	C7	C8	1.535(3)
N2	C2	1.409(2)	C9	C10	1.519(3)
N2	C7	1.480(2)	C15	C14	1.373(3)
N2	C9	1.432(3)	C15	C16	1.374(3)
O1	C11	1.204(3)	C3	C4	1.392(3)
N1	C1	1.419(3)	C13	C14	1.378(3)
N1	C7	1.458(3)	C17	C16	1.382(3)
C2	C1	1.396(3)	C6	C5	1.382(3)
C2	C3	1.377(3)	C4	C5	1.377(3)

Table 5 Bond Angles for cu_200213_AP_VV01_0m_a.

Atom	Atom	Atom	Angle/°	Atom	Atom	Atom	Angle/°
C8	S1	C9	92.57(10)	O1	C11	C12	122.4(2)
C11	S2	C10	100.22(11)	C12	C11	S2	114.79(15)
C2	N2	C7	104.80(14)	N2	C9	S1	106.89(13)
C2	N2	C9	121.86(16)	N2	C9	C10	111.60(19)
C9	N2	C7	111.25(15)	C10	C9	S1	108.54(14)
C1	N1	C7	105.25(16)	C14	C15	Cl1	119.43(17)
C1	C2	N2	108.48(16)	C14	C15	C16	121.4(2)
C3	C2	N2	130.30(17)	C16	C15	Cl1	119.17(18)
C3	C2	C1	121.09(18)	C2	C3	C4	117.74(19)
C13	C12	C11	118.06(19)	C14	C13	C12	121.0(2)
C13	C12	C17	118.7(2)	C16	C17	C12	120.8(2)
C17	C12	C11	123.23(19)	C1	C6	C5	118.3(2)
C2	C1	N1	109.28(17)	C15	C14	C13	119.1(2)
C6	C1	N1	130.02(19)	C15	C16	C17	119.0(2)
C6	C1	C2	120.68(19)	C5	C4	C3	121.1(2)
N2	C7	C8	107.15(17)	C4	C5	C6	121.1(2)
N1	C7	N2	103.89(16)	C7	C8	S1	107.63(14)
N1	C7	C8	113.22(19)	C9	C10	S2	112.70(15)
O1	C11	S2	122.77(18)				

Table 6 Torsion Angles for cu_200213_AP_VV01_0m_a.

A	B	C	D	Angle/°	A	B	C	D	Angle/°
S1	C9	C10	S2	178.32(12)	C7	N1	C1	C2	-14.2(2)
Cl1	C15	C14	C13	-179.66(17)	C7	N1	C1	C6	167.2(2)
Cl1	C15	C16	C17	179.82(18)	C11	S2	C10	C9	-94.40(18)
N2	C2	C1	N1	-4.2(2)	C11	C12	C13	C14	-178.3(2)
N2	C2	C1	C6	174.57(18)	C11	C12	C17	C16	178.4(2)
N2	C2	C3	C4	-175.0(2)	C9	S1	C8	C7	-11.98(16)
N2	C7	C8	S1	31.5(2)	C9	N2	C2	C1	147.80(17)
N2	C9	C10	S2	-64.1(2)	C9	N2	C2	C3	-36.4(3)
N1	C1	C6	C5	179.9(2)	C9	N2	C7	N1	-162.10(18)
N1	C7	C8	S1	145.43(15)	C9	N2	C7	C8	-42.0(2)
C2	N2	C7	N1	-28.6(2)	C3	C2	C1	N1	179.54(19)
C2	N2	C7	C8	91.51(18)	C3	C2	C1	C6	-1.7(3)
C2	N2	C9	S1	-92.27(17)	C3	C4	C5	C6	-1.4(4)
C2	N2	C9	C10	149.21(17)	C13	C12	C11	S2	175.96(15)
C2	C1	C6	C5	1.4(3)	C13	C12	C11	O1	-2.2(3)
C2	C3	C4	C5	1.1(3)	C13	C12	C17	C16	-1.1(3)
C12	C13	C14	C15	-0.7(3)	C17	C12	C11	S2	-3.5(3)
C12	C17	C16	C15	0.4(3)	C17	C12	C11	O1	178.3(2)
C1	N1	C7	N2	26.0(2)	C17	C12	C13	C14	1.3(3)
C1	N1	C7	C8	-89.9(2)	C14	C15	C16	C17	0.2(3)
C1	C2	C3	C4	0.4(3)	C16	C15	C14	C13	-0.1(3)
C1	C6	C5	C4	0.1(4)	C8	S1	C9	N2	-10.80(15)
C7	N2	C2	C1	20.5(2)	C8	S1	C9	C10	109.71(17)
C7	N2	C2	C3	-163.7(2)	C10	S2	C11	O1	-1.1(2)
C7	N2	C9	S1	32.11(19)	C10	S2	C11	C12	-179.23(15)
C7	N2	C9	C10	-86.4(2)					

Table 7 Hydrogen Atom Coordinates ($\text{\AA} \times 10^4$) and Isotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for cu_200213_AP_VV01_0m_a.

Atom	x	y	z	U(eq)
H1A	5080.57	232.9	406.89	80(30)
H7	6738.19	550.6	1202.07	64
H9	6910.44	6254.32	2051.16	61
H3	5498.21	6600.9	2217.13	63
H13	9297.63	8961.74	4676.07	69
H17	8181.83	2737.54	4573.35	70
H6	3489.38	1237.53	634.37	72
H14	9638.25	9096.19	5927.06	73
H16	8515.56	2871.14	5826.46	73
H4	3908.44	6795.16	1923.15	74
H5	2929.2	4115.82	1163.73	76
H8A	5716.18	3864.36	146.96	73
H8B	6573.46	2444.89	149.86	73

Table 7 Hydrogen Atom Coordinates ($\text{\AA} \times 10^4$) and Isotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for cu_200213_AP_VV01_0m_a.

Atom	x	y	z	U(eq)
H10A	8465.91	5088.74	2349.32	75
H10B	8126.58	2589.96	2087.35	75
H1B	5380(40)	-700(110)	1030(30)	90(30)

10.5 Tests Colorimétricos

10.5.1 Test de Ninhidrina:

Blanco: En un vial de 2 mL se pesa una alícuota correspondiente a 3 mg de resina seca TG-HL-NH₂. Se añade una solución de fenol en etanol absoluto (42.5 mM, 100 μL), una solución de ninhidrina en etanol absoluto (280 mM, 100 μL) y una solución de NaCN en agua (2 mM, 100 μL), se mezcla y se coloca en un bloque calefactor preajustado a 100 °C. El color de esta solución es azul oscuro, Figura 10.1a.

Muestra: En un vial de 2 mL se pesa una alícuota correspondiente a 3 mg de resina seca luego de la reacción de acoplamiento. Se añade una solución de fenol en etanol absoluto (42.5 mM, 100 μL), una solución de ninhidrina en etanol absoluto (280 mM, 100 μL) y una solución de NaCN en agua (2 mM, 100 μL), se mezcla y se coloca en un bloque calefactor preajustado a 100 °C. Prueba negativa: El color no se desarrolla luego de 10 min de incubación, Figura 10.1b.

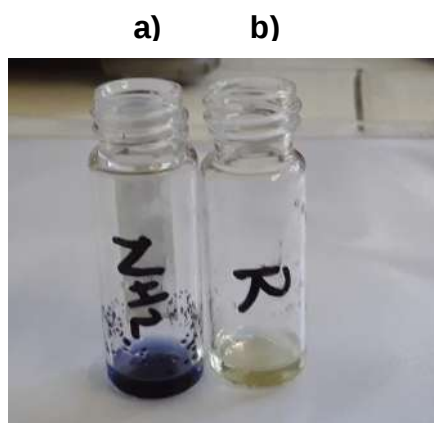


Figura 10.1: Test de ninhidrina: a) Positivo (azul): Blanco, b) Negativo (sin color): Muestra.

10.5.2 Cuantificación de tioles mediante el método de Ellman

Blanco: En un vial de 15 mL, se añade THF (1 mL), una solución de reactivo de Ellman en MeOH (5.0×10^{-3} M, 1 mL) y DIPEA (5 μ L). La mezcla se agita por 30 min y se diluye a 5.0 mL con MeOH. Luego, la solución se diluye con MeOH (1/10) y se mide la absorbancia a 412 nm. Esta solución se utiliza como referencia, Figura 10.2a.

Muestra: En un vial de 15 mL se pesa una alícuota correspondiente a 3 mg de resina seca. Se añade THF (1 mL), una solución de reactivo de Ellman en MeOH (5.0×10^{-3} M, 1 mL) y DIPEA (5 μ L). La mezcla se agita por 30 min y se diluye a 5.0 mL con MeOH. Luego, la solución se diluye con MeOH (1/10) y se mide la absorbancia a 412 nm ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) utilizando el blanco como referencia, Figura 10.2b.

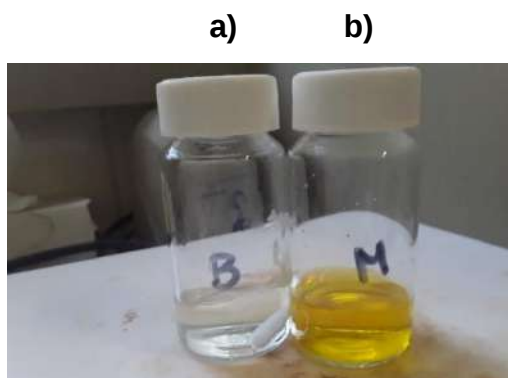


Figura 10.2: Cuantificación de tioles mediante el método de Ellman: a) Blanco, b) Muestra.

10.6 Ensayos de estabilidad en buffer o plasma humano

La metodología descrita para **7a** es representativa:

En Eppendorf® individuales de 2 mL se incubaba una solución de **7a** en MeOH (30 mM, 40 μ L) en buffer (pH 1.2, 4.5, 6.8 o 7.4, 960 μ L) o plasma (960 μ L). Las soluciones se mantienen a 37 °C y a intervalos adecuados de tiempo la reacción se detiene mediante la adición de ACN (1000 μ L). Las soluciones se someten a vórtex, se filtran y se inyectan en un equipo HPLC fase reversa. Cada condición se ensaya por triplicado.

10.7 Métodos HPLC

10.7.1 Equipo HPLC fase reversa

Se utiliza una columna fase reversa C18 (Kinetex NUCLEOSIL® C18, 150 mm × 4 mm, 5 µm) con detección a 205 y 254 nm para todos los compuestos a 37 °C. La fase móvil consiste en TFA 0.003 M (fase móvil A) y ACN (fase móvil B) a una velocidad de flujo de 1.2 mL/min. Las condiciones iniciales 70/30 (fase móvil A/fase móvil B) cambian en 2 min a 55/45, se mantienen durante 3.5 min y cambian en 0.1 min a 5/95, manteniéndose durante 2.4 min. Los datos y los cromatogramas se recopilan y analizan utilizando el programa Empower System Waters Corporation, 2002. La cuantificación se realiza de acuerdo con un método validado en el que se verifica la linealidad, la precisión y la especificidad. Los tiempos de retención para los compuestos de interés se muestran en la Tabla 10.1 y las curvas de calibración en las Figuras 10.3-9.

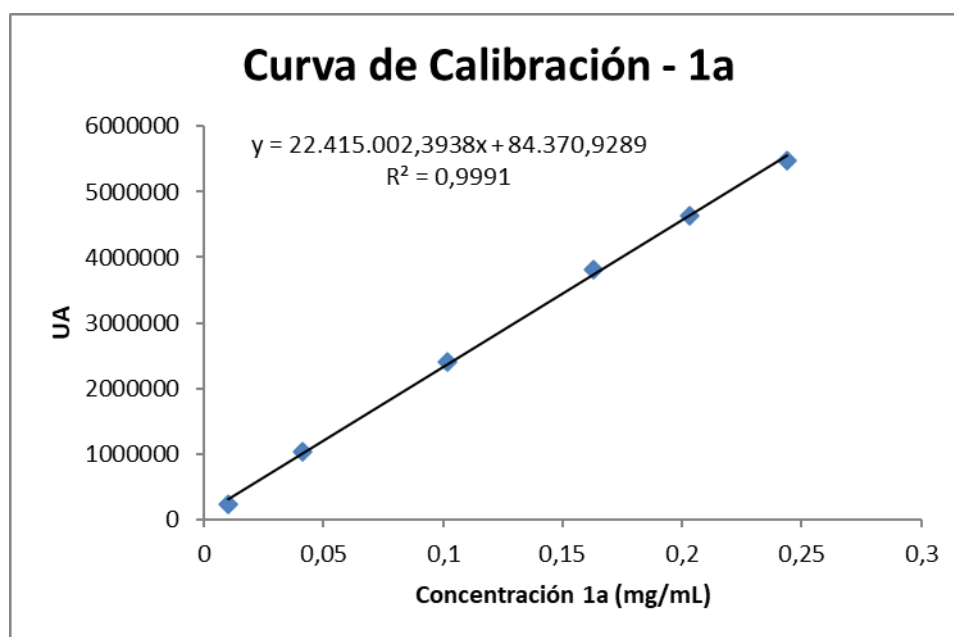


Figura 10.3: Curva de Calibración de **1a**.

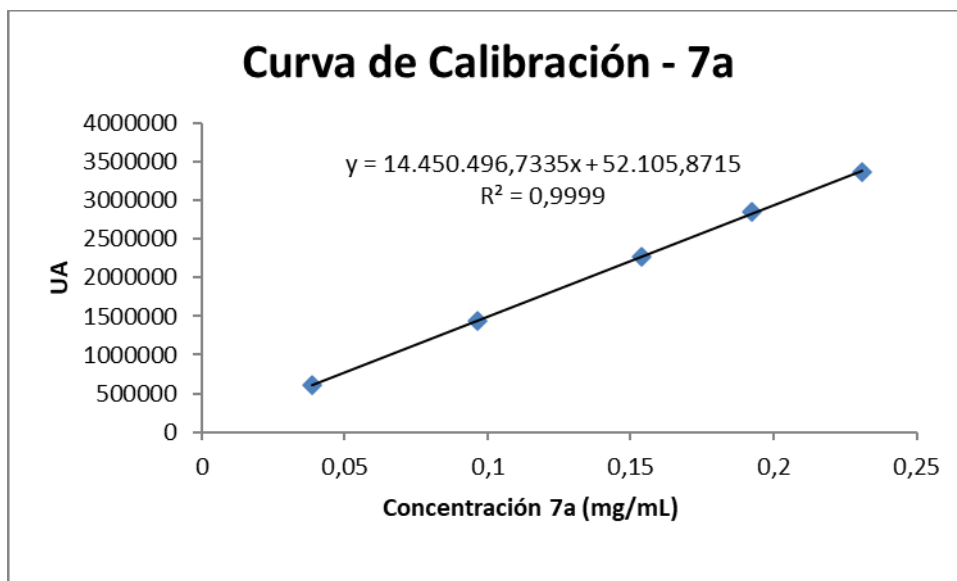


Figura 10.4: Curva de Calibración de 7a.

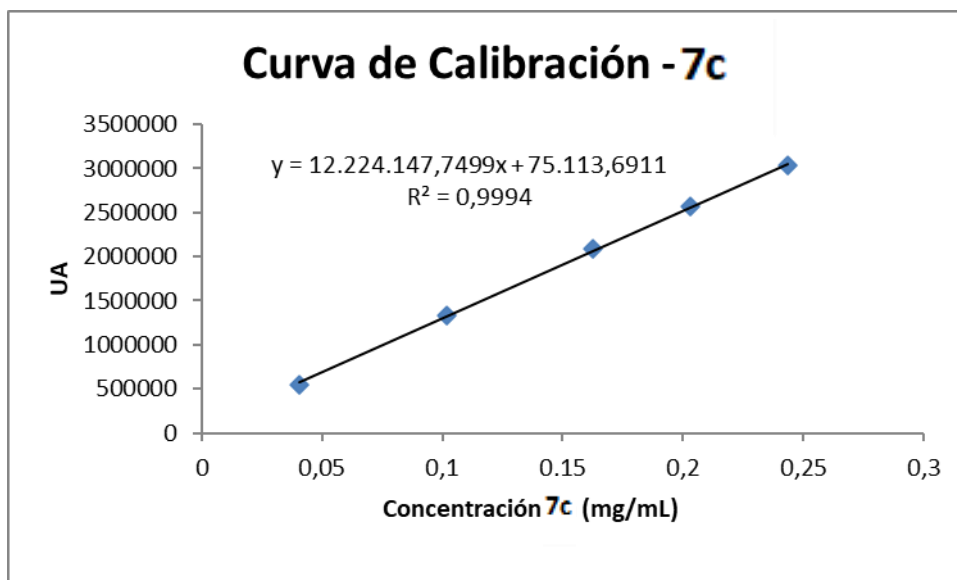


Figura 10.5: Curva de Calibración de 7c.

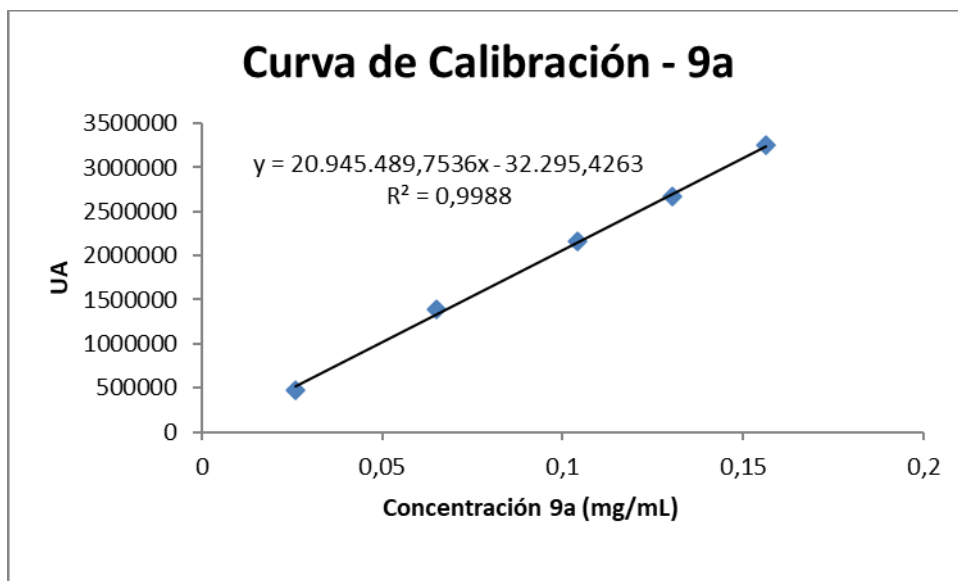


Figura 10.6: Curva de Calibración de **9a**.

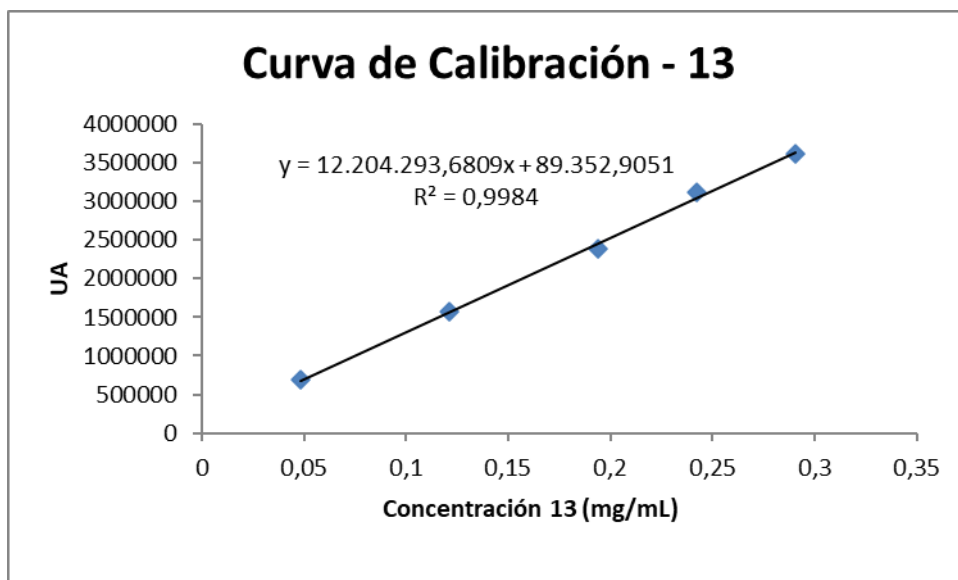


Figura 10.7: Curva de Calibración de **13**.

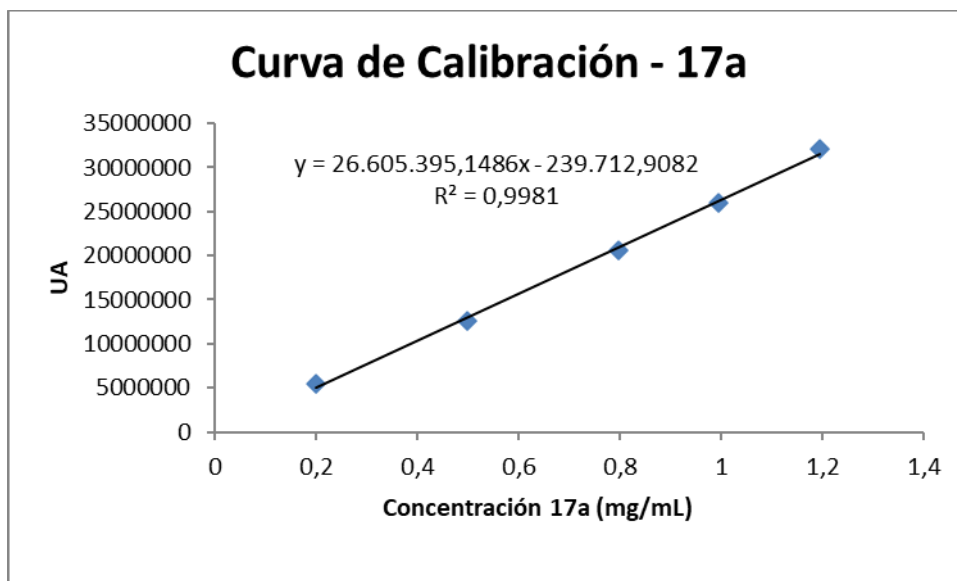


Figura 10.8: Curva de Calibración de 17a.

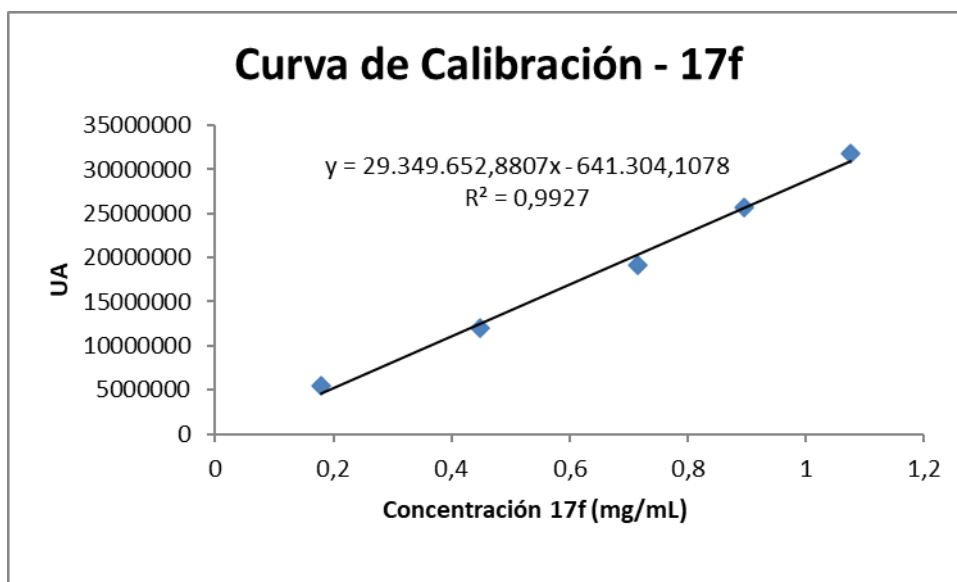


Figura 10.8: Curva de Calibración de 17f.

Tabla 10.1: Tiempos de retención de los compuestos de interés.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
1a	2.6
7a	9.2
7c	10.5
9a	2.9
10	6.7
11a	14.2
13	4.0
14	5.5
17a	5.2
17f	3.1

10.7.2 Equipo HPLC fase quiral

Se utilizó una columna PHENOMENEX-LUX CELULLOSE (4.6 X 250 mm, 5 μ m); fase móvil n-hexanos/isOH (8/2) y flujo 1 mL/min. Los tiempos de retención para los compuestos de interés se muestran en la Tabla 10.2.

Tabla 10.2: Tiempos de retención de los compuestos de interés.

Compuesto	Isómero	Tiempo de retención (min)
17a	1	7.8
	2	10.1
23a	1	7.3
	2	9.4
23b	1	14.8
	2	17.8
23c	1	8.0
	2	9.6
23d	1	8.1
	2	9.8
23e	1	6.7
	2	19.0
23f	1	6.8
	2	10.6
23g	1	14.2
	2	21.3
23h	1	9.0
	2	13.5
23i	1	7.9
	2	8.6
23j	1	8.6
	2	11.5
23k	1	8.4
	2	10.1
23l	1	9.1
	2	15.1

10.8 Dicroísmo Circular Electrónico

En un vial de 2 mL, se disuelve (+)-**23a** en CHCl_3 (300 μL) y se diluye con CHCl_3 (1/32, $c = 0.2 \text{ mg/mL}$). Se adquiere el espectro de dicroísmo circular electrónico (ECD) en el rango 230-400 nm utilizando CHCl_3 como referencia. Los datos crudos de θ (mdeg) obtenidos se convierten en valores de ΔA según la siguiente ecuación:

$$\theta \text{ (deg)} = 32.98 \cdot \Delta A^{11}$$

Mediante la ley de Lambert-Beer se convierten en valores de $\Delta\epsilon$, según:

$$\Delta A = \Delta\epsilon \cdot c \cdot [\mathbf{23a}]$$

Donde $c = 0.1 \text{ cm}$ y la $[\mathbf{23a}] = 9,8 \times 10^{-7} \text{ M}$

10.9 Estudios computacionales

10.9.1 Complejos *in silico* MBL:inhibidores

Los complejos de MBLs con los inhibidores se acoplaron en Autodock 4.2.6 utilizando el método de acoplamiento Autodock4 sesgado por sitios solventes (SSBMD).¹² Basado en la información disponible en las estructuras cristalográficas que muestran la interacción del grupo tiol con el sitio metálico, se modificó la función de puntuación de Autodock4 agregando un término de energía para el átomo de azufre del tiol a la función original para describir mejor esta interacción. Las estructuras de todos los compuestos se optimizaron en vacío al nivel de Hartree-Fock/6-31G* usando Gaussian 09.¹³ Los archivos pdbqt de los compuestos necesarios para los estudios de acoplamiento se prepararon con AutoDock-Tools4.¹² La proteína receptora se obtuvo de Protein Data Bank (entrada PDB = 3SPU). El mapa de cuadrícula se estableció en $40 \times 40 \times 40$ puntos con un espaciado de cuadrícula de $0.375 \text{ \AA}$ centrado en el sitio catalítico. Para cada cálculo, se realizaron 100 ejecuciones de acoplamiento diferentes y las 100 poses resultantes se agruparon de acuerdo con un límite de ligando

RMSD de 2 Å. Las poses seleccionadas fueron aquellas con alta población y una puntuación de energía libre de unión negativa.

10.9.2 Cálculos teóricos de Alfa D

Se realizó una búsqueda conformacional sistemática de cada enantiómero de ($\pm$)-**23a** utilizando el Software MOE, utilizando CH₂Cl₂ como solvente implícito en el modelo de Born generalizado ($\epsilon = 8.93$). para encontrar las conformaciones cercanas a los mínimos energéticos.¹⁴ Luego se minimizaron las estructuras por mecánica molecular (campo de fuerza Amber14:EHT) y las tres conformaciones de menor energía fueron optimizadas con el método ub3lyp/6-31++g(d,p) con CH₂Cl₂ como solvente modelado mediante PCM.¹⁵ Los valores teóricos de alfa D fueron calculados con el mismo funcional y función de base. Los resultados de cada isómero se calcularon como el promedio ponderado por el factor de Boltzmann de todas las conformaciones. Los resultados fueron: α_D (*R,R*)-**23a** = +46 y α_D (*S,S*)-**23a** = -61.

10.9.3 Cálculos de espectros teóricos de Dicroísmo Circular Electrónico

Se calcularon los espectros de ECD teóricos para (+)-**23a** y (-)-**23b**. Las conformaciones generadas en el punto 10.9.3 fueron re-optimizadas en CHCl₃ con el mismo método químico. Para el cálculo del espectro de ECD se generaron 30 estados excitados por TD-DFT.

10.9.4 Complejos in silico MAO-D11:BIMI

Los experimentos se realizaron a 298 K y pH 7.4. La simulación se realizó en solvente explícito con modelo de agua TIP3P, densidad 0.997. Las estructuras representativas finales se seleccionaron sobre la base de la energía más baja.

La proteína MAO-D11 se obtuvo de Protein Data Bank y se cargó en el Software Amber. Luego, se llevó a cabo la relajación de la proteína hasta la estabilización de la desviación cuadrática media o RMSB (<2.5 Å).

Los sustratos BIMI se parametrizaron con cálculos DFT utilizando el Software Gamess hasta encontrar las conformaciones de menor energía. La

solvatación de los ligandos antes de la minimización se llevó a cabo en una capa de disolvente explícita a pH 7.4 y NaCl al 0.9 %. Cada ligando se sometió a minimización de energía para refinar las longitudes de enlace y los ángulos de enlace. Para los experimentos de docking se utilizó la conformación minimizada con la energía más baja para cada ligando.

El docking se llevó a cabo en AUTODOCK 4/VINA con aminoácidos del sitio activo flexibles. El tamaño de la caja de docking se estableció en 5 Å alrededor de los aminoácidos en el sitio activo de cada estructura. Las posiciones con una desviación cuadrática media (RMSD) inferior a 2.5 Å se agruparon, y cada grupo se representó por la posición con la energía libre de unión más baja. Sobre las mejores conformaciones obtenidas se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular convencionales y aceleradas de los complejos enzima:sustratos que permitieron el cálculo de energías de unión, y la identificación de residuos claves en la interacción y estabilización de sustratos en el sitio activo. Para el cálculo de la energía libre de unión se utilizó MMPBSA (solvente implícito) y RE+FEP (solvente explícito, Replica Exchange y Free Energy Perturbation). Finalmente se analizaron y compararon la energía de unión y las distancias para la transferencia de hidruro de la BIM1 al FAD.

10.10 Ensayos de Actividad Biológica

10.10.1 Determinación de la constante de inhibición (K_i) e IC_{50} en las diferentes subclases de MBL

Se monitorea la hidrólisis de imipenem frente a las MBL: NDM-1 e IMP-1 (B1); Sfh-1 (B2) y L1 (B3), previamente expresadas en *E. coli* y purificadas por cromatografía de afinidad,² con un espectrofotómetro Jasco V-670 a una longitud de onda de 300 nm ($\Delta\epsilon_{300} = -9000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para la MBL VIM-2 (B1) se monitorea nitrocefina a 482 nm ($\Delta\epsilon_{482} = -17400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Los ensayos se llevan a cabo en buffer pH 7.5 (HEPES 10 mM, NaCl 200 mM, 50 µg/ml BSA) para Shf-1 (B2) y buffer pH 7.5 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 1 nM (o 3 nM para VIM-2). Los compuestos a ensayar se disuelven en DMSO a una concentración final de 100 mM, y se diluyen con buffer pH 7.5 hasta 10

mM. Luego, se diluyen adecuadamente hasta obtener la concentración final deseada. El ensayo se inicia con el agregado de la enzima a la mezcla del sustrato con el inhibidor. Las constantes de inhibición (K_i) e IC_{50} se determinan por el ajuste al modo de inhibición competitiva utilizando el Software GraphPad 5.0. Para la determinación de K_i se utiliza la ecuación $v_o = (v_{max} \times [S]) / (K_M \times (1 + [I]/K_i) + [S])$, siendo v_o la velocidad inicial, $[S]$ la concentración del sustrato (imipenem o nitrocefina) y $[I]$ la concentración del inhibidor.

10.10.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) se determinaron siguiendo las pautas CLSI.¹⁶ Se emplearon cepas de *E. coli* DH5 α portando el plásmido pMBLe-NDM116, DH10B IMP-1 o DH10B IMP-6, y cepas patógenas aisladas de casos clínicos: *E. cloacae* 1.28-NDM-1 y *K. pneumoniae* 1.41-NDM-1. Se utilizó imipenem o meropenem como antibiótico. La expresión de la enzima se indujo con IPTG 0.1 mM.

Los experimentos se realizaron en una placa de 96 pocillos. Los inhibidores en estudio se disolvieron en DMSO y se diluyeron hasta una concentración final de 100 μ g/mL en placa. Luego, se realizaron diluciones dobles seriadas de imipenem o meropenem a lo largo de la placa (de 32 mg/L a 0.25 mg/L). Se incluye un control de DMSO y un control de crecimiento sin inhibidor con antibiótico. La placa se incubó a 37°C a 16 horas. Luego de la incubación, se observan los pocillos y se determina la menor concentración de antibiótico que a simple vista inhibe completamente el crecimiento del microorganismo estudiado. Cada experimento se realiza por triplicado.

10.10.3 Ensayos de Curva de Mortalidad o Time-Kill

Los ensayos de Time-Kill se realizaron utilizando cepas de *E. coli* DH5 α portando el plásmido pMBLe-NDM116. Las bacterias se inoculan en medio LB complementado con gentamicina (25 mg/L) e IPTG (100 μ M) y se incuban 24 h a 37 °C. Luego, se inocula 1.5 μ L del cultivo en 1 mL de medio LB hasta obtener una suspensión de 10⁶ CFU/mL. Esta suspensión se deja a 37 °C en diferentes condiciones: 1) suplementado con 1 % de DMSO (control de crecimiento), 2) concentraciones subletales de imipenem, 3) 100 μ g/mL de cada inhibidor, y 4)

una combinación de imipenem e inhibidor (100 µg/mL). Luego, se toma una muestra de 100 µL a las 1, 3 y 5 h, se realizan diluciones 1/10 seriadas en LB (desde 10^0 hasta 10^{10}) y se inoculan 20 µL de cada dilución en placas LB-Agar. Las placas se incubaron (37 °C, 24 h) y se cuenta el número de colonias; estas se realizan por triplicado.

10.11 Estructura cristalina de los complejos MBL:Inhibidor

10.11.1 Complejos con la enzima NDM-1

Para la obtención de los complejos cristalinos se utiliza una solución de 35 mg/mL de NDM-1 en buffer pH 6.5 suplementado con ácido 2-etanosulfónico (MES) 100 mM y PEG 200 25% monometil éter (p/v). Se agrega una solución del inhibidor (5 mM) disuelto en DMSO y se incuba por 10 min a temperatura ambiente. Luego, 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.¹⁷ 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.

10.11.1 Complejos con la enzima VIM-2

Para la obtención de los complejos cristalinos se utiliza una solución de 15 mg/mL de la enzima VIM-2, y se incuba con una solución del inhibidor (10 mM) disuelto en DMSO, en buffer pH 9.0 suplementado con N,N-Bis(2-hidroxietil)glicina (Bicine) 0.1 M 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.

10.12 Ensayos de citotoxicidad en células

Las líneas celulares L929 (fibroblastos de ratón) se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10 %, penicilina G (100 unidades/mL) y estreptomicina (100 mg/L) y se mantuvieron en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C. Luego, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 4500 células por pocillo. Los compuestos a estudiar se disolvieron en DMSO y luego se diluyeron en medio de cultivo para lograr la concentración final para los diferentes tratamientos (50 y 100 µM). Como controles negativos, las células se incubaron con la concentración correspondiente de DMSO según la dilución. Las células se incubaron 24 h.

La viabilidad celular se analizó utilizando el ensayo MTT. Las células se tiñeron con bromuro de 3-(4,5-imetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2Htetrazolio (MTT) (0,5 mg/mL) durante 4 h a 37 °C. Después de retirar el medio de cultivo, los cristales de formazán se disolvieron en DMSO y se midió la absorbancia a 562 nm usando un lector de microplacas.

10.13 Ensayos Biocatalíticos

10.13.1 Sobreexpresión de MAO-N D5, D9 y D11 en cepas de *E. coli*

Se inocula una sola colonia de *E. coli* C43(DE3) que alberga el plásmido [pET16b MAO-N (D5, 9 u 11)] y cuya expresión es inducible con lactosa, en 5 mL de medio LB (con 100 µg/mL de ampicilina) y se incuba durante 16 h a 37 °C y 150 rpm. Este cultivo se utiliza para inocular 600 mL de medio de autoinducción (AIM, 4ZY-LAC-SUC; 100 µg/mL de ampicilina), que se incuba 2 h a 37°C y 150 rpm y luego 48 h a 25°C y 150 rpm. Luego, las células se recolectan por centrifugación (8000 rpm, 20 min), se resuspenden en buffer fosfato (100 mM K-Pi, pH 7.7) y se centrifugan nuevamente (4000 rpm, 20 min). Los gránulos celulares se almacenan a -20 °C hasta su utilización.

10.13.2 Purificación de la enzima MAO-D11

Se descongelan 5 g de pasta celular congelada en hielo y se resuspenden en 25 mL de buffer fosfato (100 mM K-Pi, pH 7,7; conteniendo 1 mg/mL de lisozima de clara de huevo de gallina), y se incuba a 30 °C durante 30 min. La suspensión se enfría a 4 °C y las células se lisan por ultrasonido (30 s encendido, 30 s apagado; 20 ciclos). Los restos celulares se eliminan por centrifugación (15000 g, 40 min). Posteriormente, los extractos libres de células se cargan en una columna de HisTrap Ni-sefarosa (1 mL, GE Healthcare) pre-equilibrada con buffer (100 mM K-Pi, pH 7,7, 300 mM NaCl). La proteína es eluída usando un gradiente escalonado en un sistema explorador Äkta de GE Healthcare. Las fracciones que contienen MAO-D11 fueron agrupadas y se desalinizaron por diálisis.

10.13.3 Screening a pequeña escala de la reacción de resolución de BIM1

En un tubo falcon conteniendo 10 mL de buffer fosfato pH=7, se agrega una solución de **23a** (10 mg, 0.04 mmol) disuelto en DMF (0.5 mL) y BH₃-NH₃ (6 mg, 0.04 mmol). Se añade a la solución sedimento celular de cultivos de *E. coli* (1 g) que expresan las variantes MAO-N D5, D9 o D11 y se incuba a 37°C, 250 rpm. A intervalos adecuados de tiempo se toma una alícuota de 1 mL, se vuelca en una solución saturada de NaCl (1 mL) y se extrae con AcOEt (3x1 mL). La fase orgánica se concentra y retoma en una mezcla 9/1 de *n*-hexanos/isOH. Se filtra y se inyecta en un equipo HPLC.

10.13.4 Escalado de la reacción de resolución de BIM1

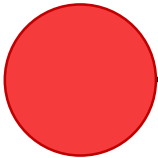
En un matraz Erlenmeyer conteniendo 100 mL de buffer fosfato pH=7, se agrega una solución de **23a** (100 mg, 0.4 mmol) disuelto en DMF (5 mL) y BH₃-NH₃ (60 mg, 0.4 mmol). Se añade a la solución sedimento celular de cultivos de *E. coli* (10 g) que expresan la variante MAO-D11 y se incuba a 37°C, 250 rpm, por 2 h. El crudo de la reacción se vuelca en una solución saturada de NaCl (1 mL) y se extrae con AcOEt (3x1 mL). La fase orgánica se evapora a presión reducida y se purifica por cromatografía en columna SiO₂, fase móvil *n*-hexanos/AcOEt (8:2) para dar **23a** (35 mg, 35%, 92%ee).

10.14 Bibliografía

- (1) Armarego, W. L. F. Purification of Laboratory Chemicals. *Purif. Lab. Chem.* **2017**, 1–1176. [https://doi.org/10.1016/s0022-328x\(00\)82974-5](https://doi.org/10.1016/s0022-328x(00)82974-5).
- (2) 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. *ACS Infect. Dis.* **2016**, 1 (11), 544–554. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00046>.
- (3) 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.* **2014**, 18 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11030-013-9485-3>.
- (4) Saiz, C.; Villamil, V.; González, M. M.; Rossi, M. A.; Martínez, L.; Suescun, L.; Vila, A. J.; Mahler, G. Enantioselective Synthesis of New Oxazolidinylthiazolidines as Enzyme Inhibitors. *Tetrahedron Asymmetry* **2017**, 28 (1), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.11.002>.
- (5) Rossi, M. A.; Martinez, V.; Hinchliffe, P.; Mojica, M. F.; Castillo, V.; Moreno, D. M.; Smith, R.; Spellberg, B.; Drusano, G. L.; Banchio, C.; Bonomo, R. A.; Spencer, J.; Vila, A. J.; Mahler, G. 2-Mercaptomethyl-Thiazolidines Use Conserved Aromatic-S Interactions to Achieve Broad-Range Inhibition of Metallo- β -Lactamases. *Chem. Sci.* **2021**, 12 (8), 2898–2908. <https://doi.org/10.1039/d0sc05172a>.
- (6) Surya Prakash, G. K.; Zhang, Z. 2, 2, 2-Trifluoroacetaldehyde Hydrate. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. **2001**, 1-6.
- (7) Pallitsch, K.; Happl, B.; Stieger, C. Determination of the Absolute Configuration of (–)-Hydroxynitrilaphos and Related Biosynthetic Questions. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, 23 (62), 15655–15665. <https://doi.org/10.1002/chem.201702904>.
- (8) St. Denis, J. D.; Zajdlik, A.; Tan, J.; Trinchera, P.; Lee, C. F.; He, Z.; Adachi, S.; Yudin, A. K. Boron-Containing Enamine and Enamide Linchpins in the

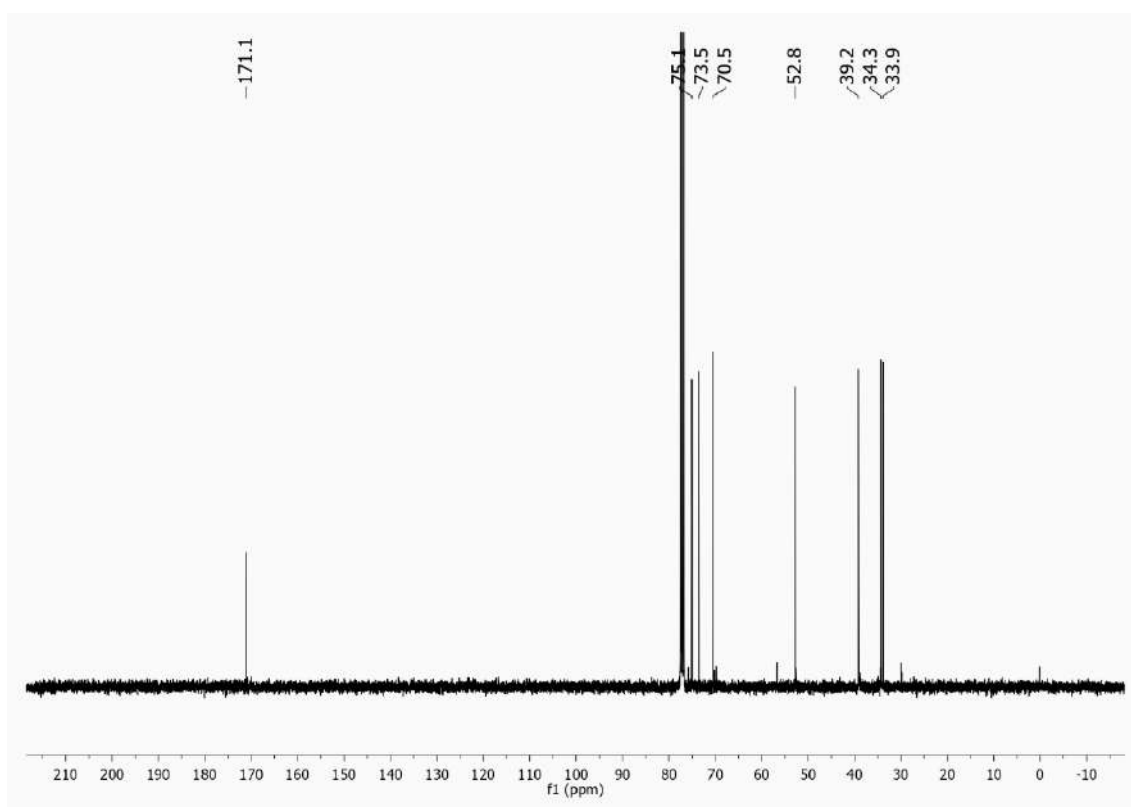
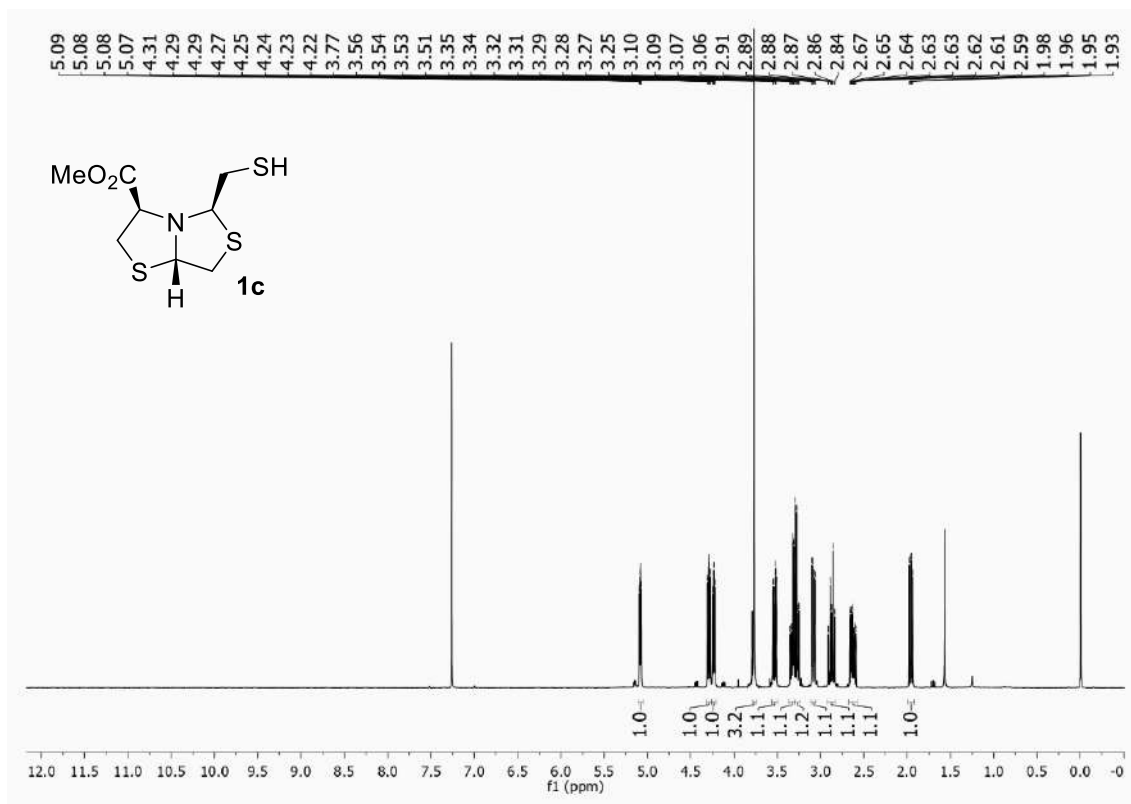
- Synthesis of Nitrogen Heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (50), 17669–17673. <https://doi.org/10.1021/ja510963k>.
- (9) Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. OLEX2: A Complete Structure Solution, Refinement and Analysis Program. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, 42 (2), 339–341. <https://doi.org/10.1107/S0021889808042726>.
- (10) Sheldrick, G. M. Crystal Structure Refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2015**, 71 (Md), 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
- (11) Evans, A. C.; Petit, A. S.; Guillen, S. G.; Neukirch, A. J.; Hoffmann, S. V.; Jones, N. C. Chiroptical Characterization Tools for Asymmetric Small Molecules-Experimental and Computational Approaches for Electronic Circular Dichroism (ECD) and Anisotropy Spectroscopy. *RSC Adv.* **2021**, 11 (3), 1635–1643. <https://doi.org/10.1039/d0ra06832b>.
- (12) Arcon, J. P.; Modenutti, C. P.; Avendaño, D.; Lopez, E. D.; Defelipe, L. A.; Ambrosio, F. A.; Turjanski, A. G.; Forli, S.; Marti, M. A. AutoDock Bias: Improving Binding Mode Prediction and Virtual Screening Using Known Protein-Ligand Interactions. *Bioinformatics* **2019**, 35 (19), 3836–3838. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz152>.
- (13) Allouche, A. Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. *J. Comput. Chem.* **2012**, 32, 174–182. <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- (14) Vairoletti, F.; Paulino, M.; Mahler, G.; Salinas, G.; Saiz, C. Structure-Based Bioisosterism Design, Synthesis, Biological Evaluation and In Silico Studies of Benzamide Analogs as Potential Anthelmintics. *Molecules* **2022**, 27 (9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092659>.
- (15) Grauso, L.; Teta, R.; Esposito, G.; Menna, M.; Mangoni, A. Computational Prediction of Chiroptical Properties in Structure Elucidation of Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, 36 (7), 1005–1030. <https://doi.org/10.1039/c9np00018f>.
- (16) Limbago, B. M100-S11, Performance Standards for Antimicrobial

- Susceptibility Testing. *Clin. Microbiol. Newsl.* **2001**, 23 (6), 49. [https://doi.org/10.1016/s0196-4399\(01\)88009-0](https://doi.org/10.1016/s0196-4399(01)88009-0).
- (17) Hinchliffe, P.; Moreno, D. M.; Rossi, M. A.; Mojica, M. F.; Martinez, V.; Villamil, V.; Spellberg, B.; Drusano, G. L.; Banchio, C.; Mahler, G.; Bonomo, R. A.; Vila, A. J.; Spencer, J. 2-Mercaptomethyl Thiazolidines (MMTZs) Inhibit All Metallo- β -Lactamase Classes by Maintaining a Conserved Binding Mode. *ACS Infect. Dis.* **2021**, 7 (9), 2697–2706. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00194>.

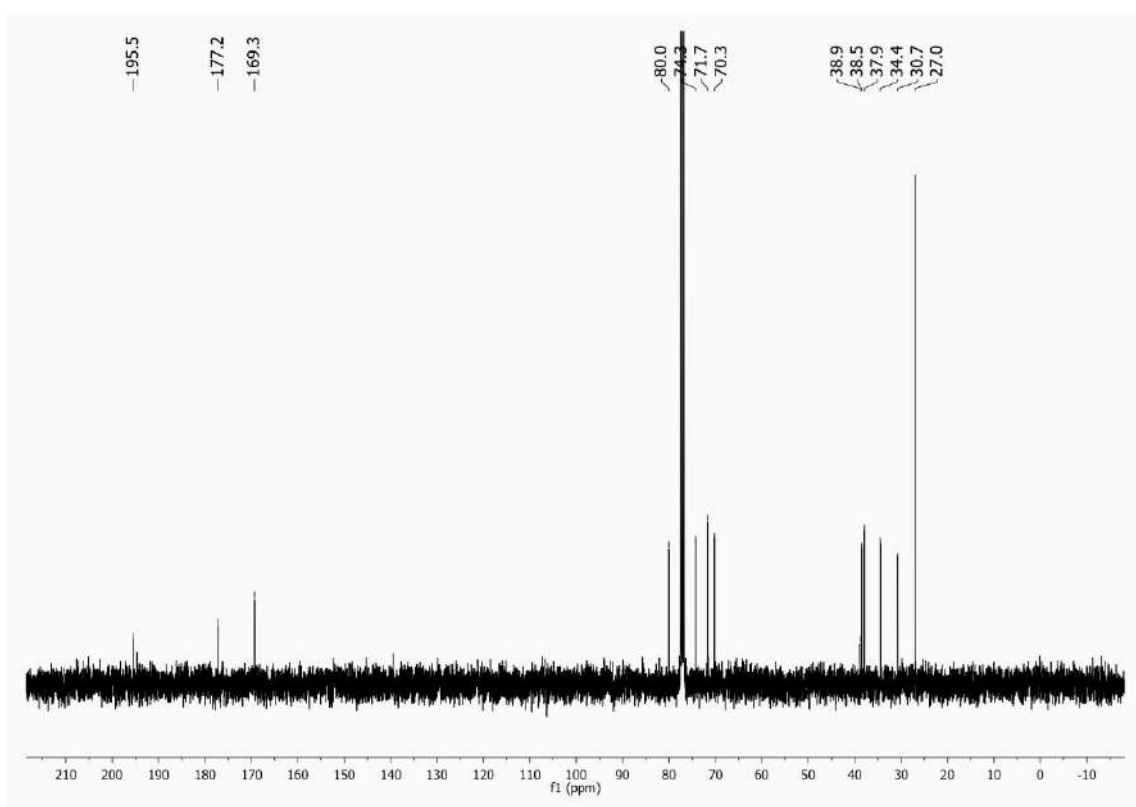
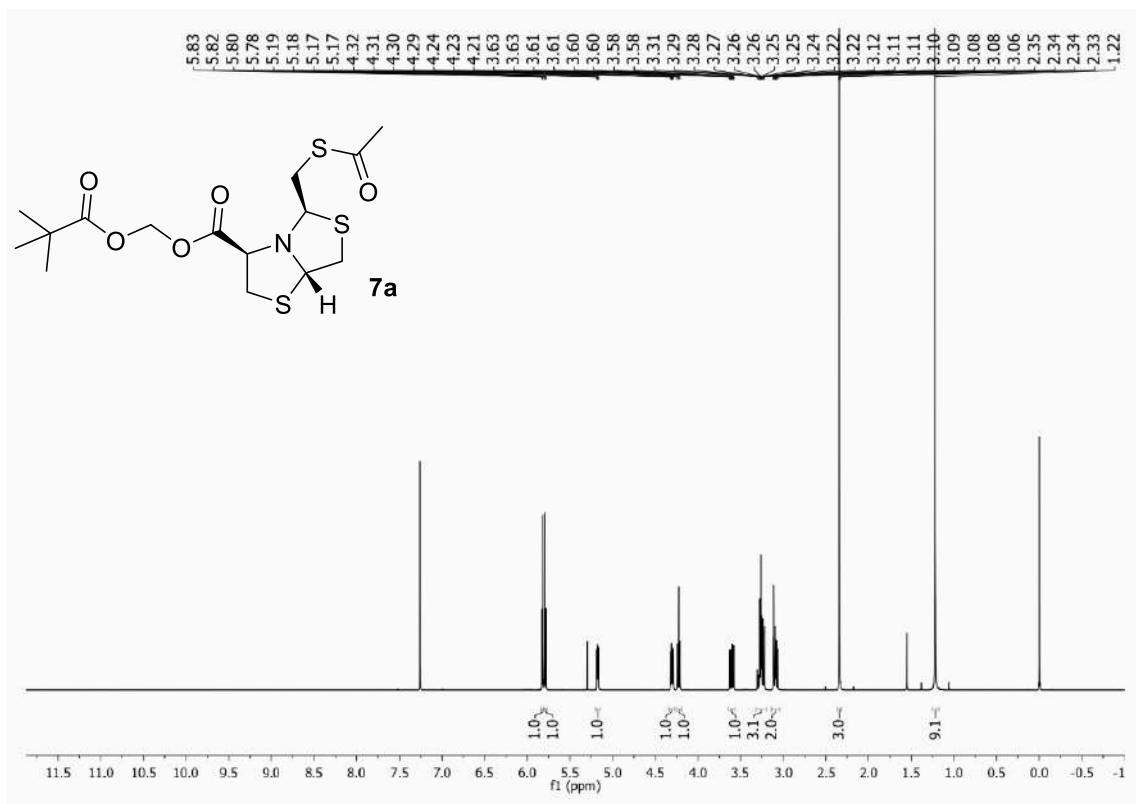


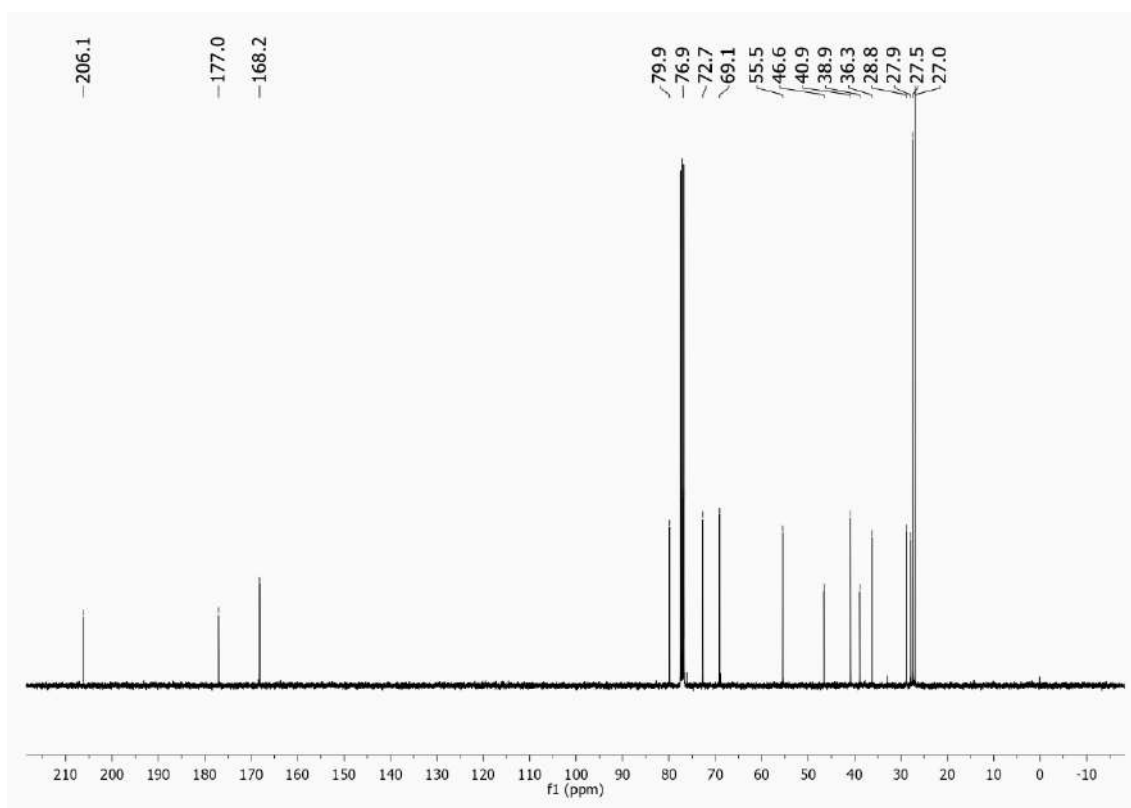
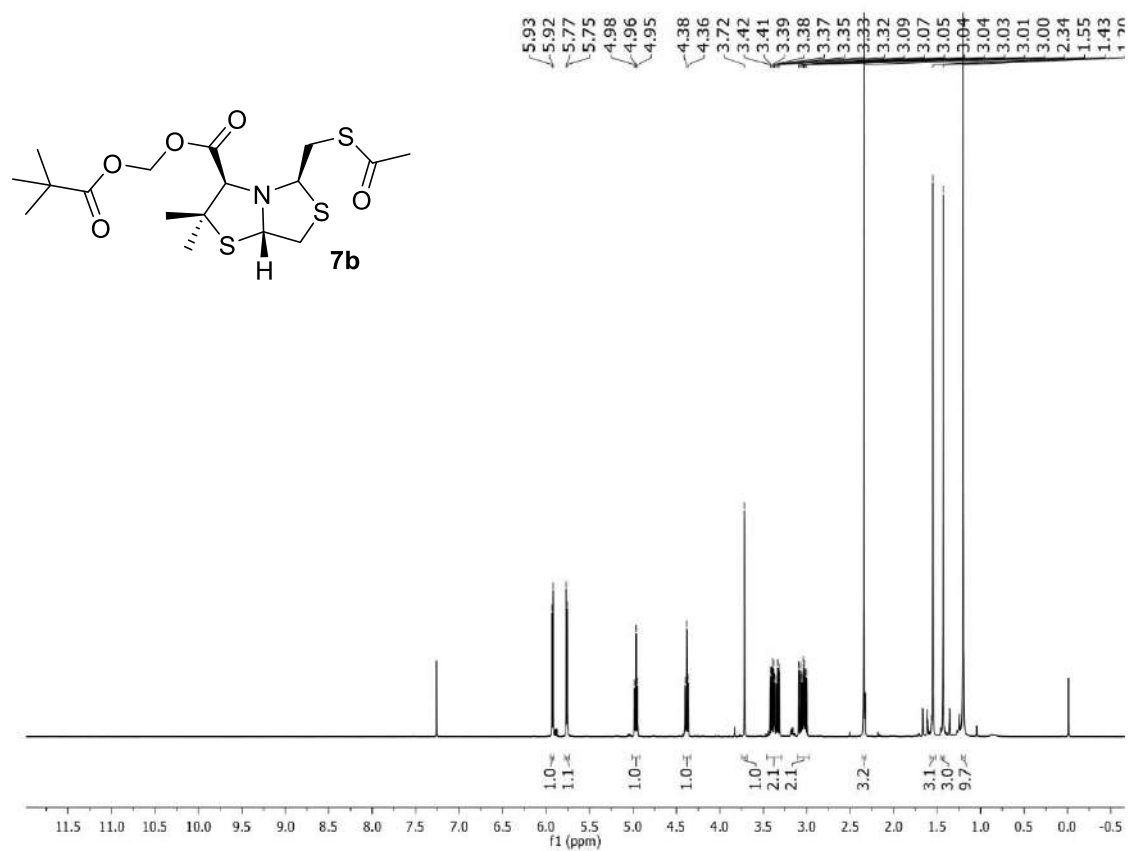
ANEXO I

Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN

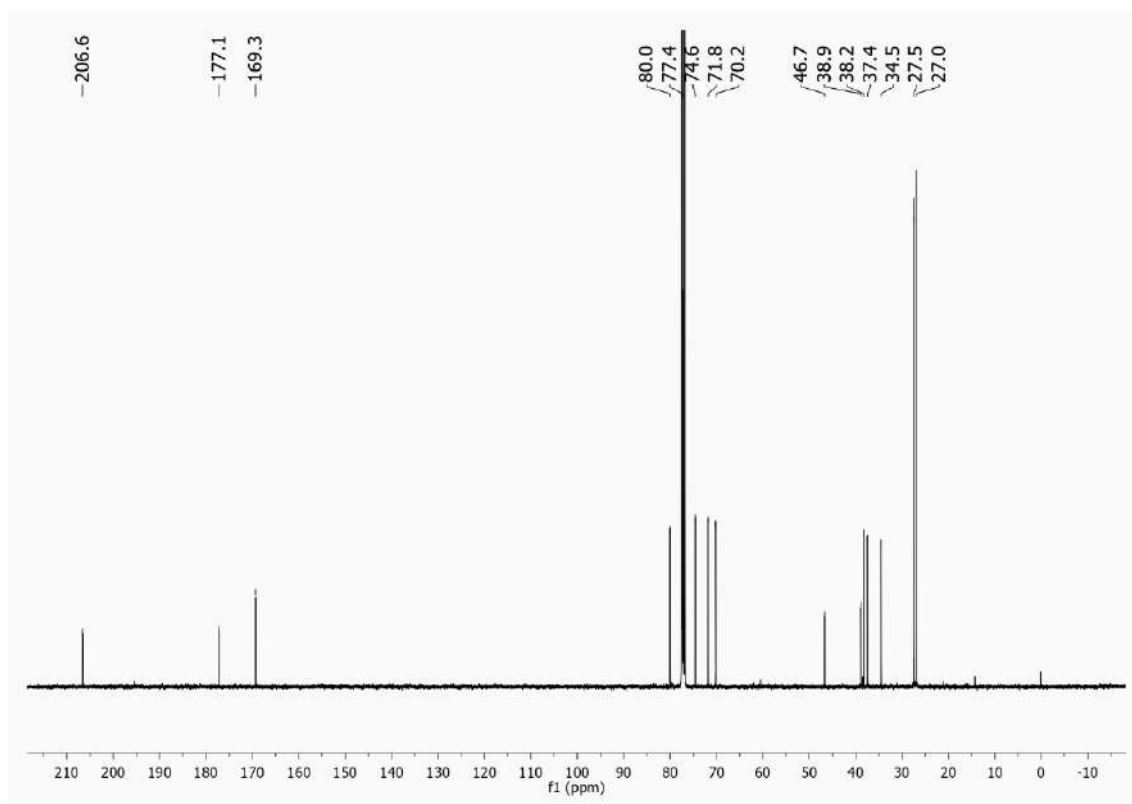
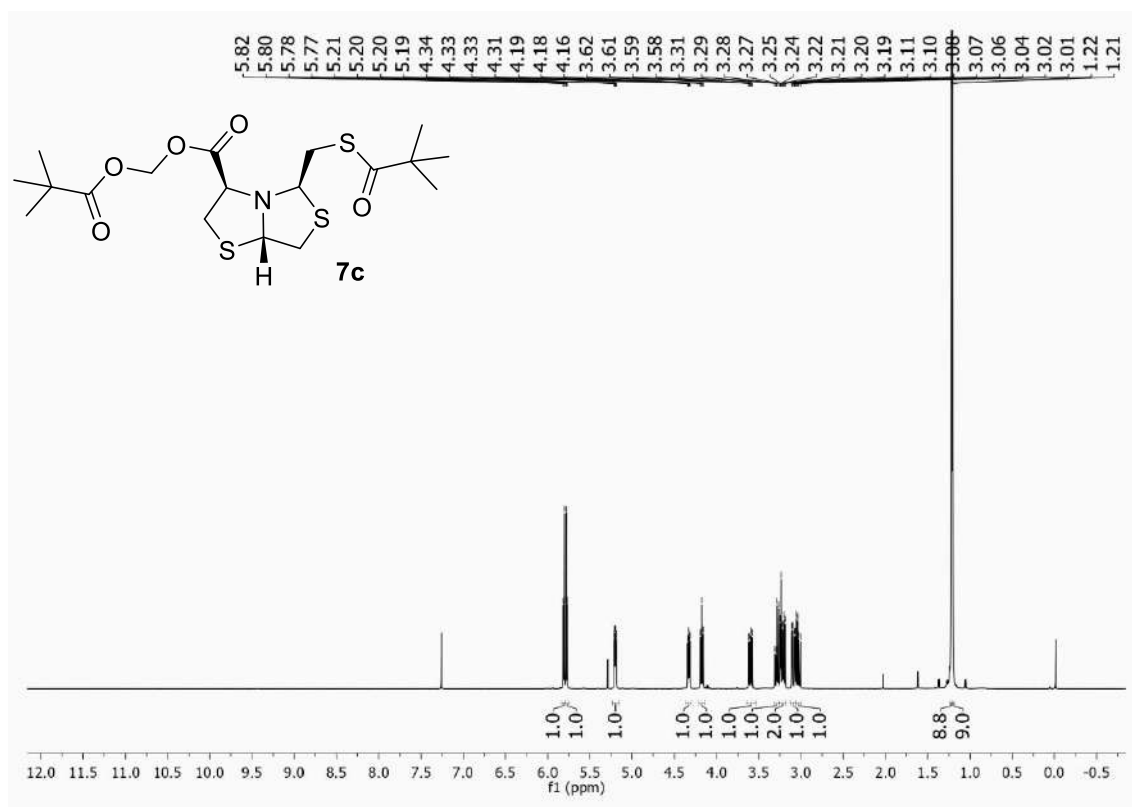
Compuesto **1c**:

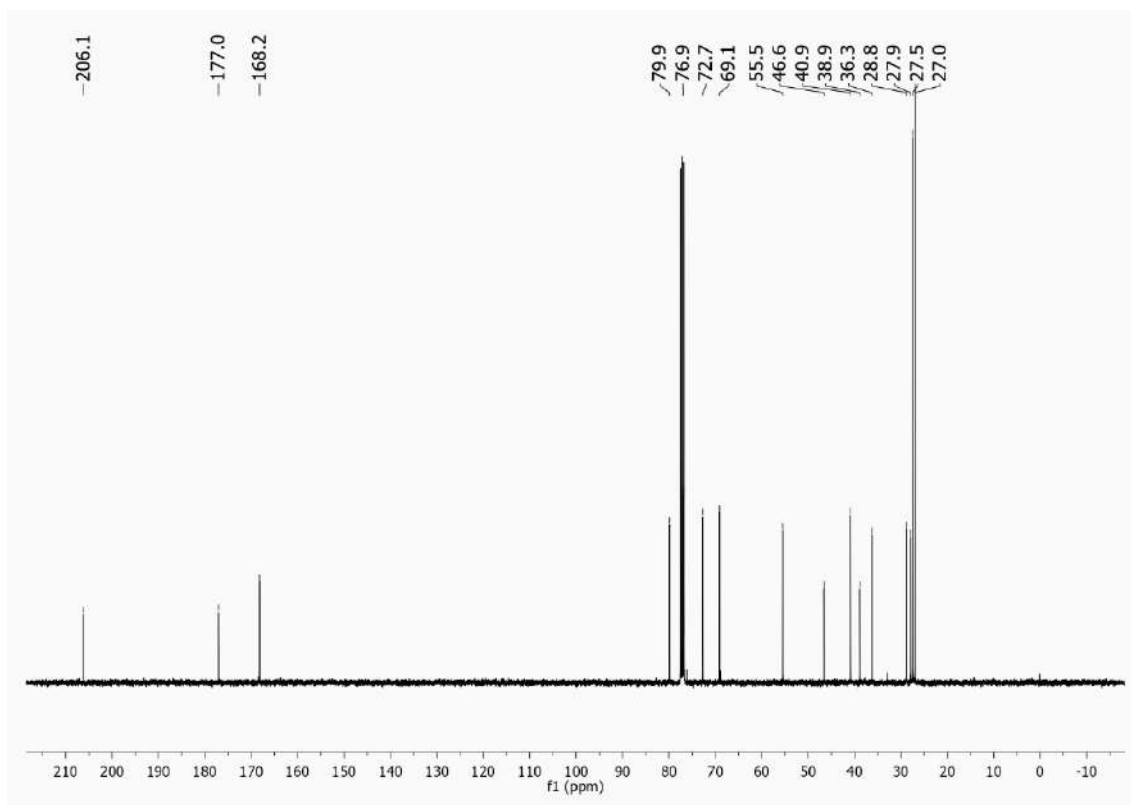
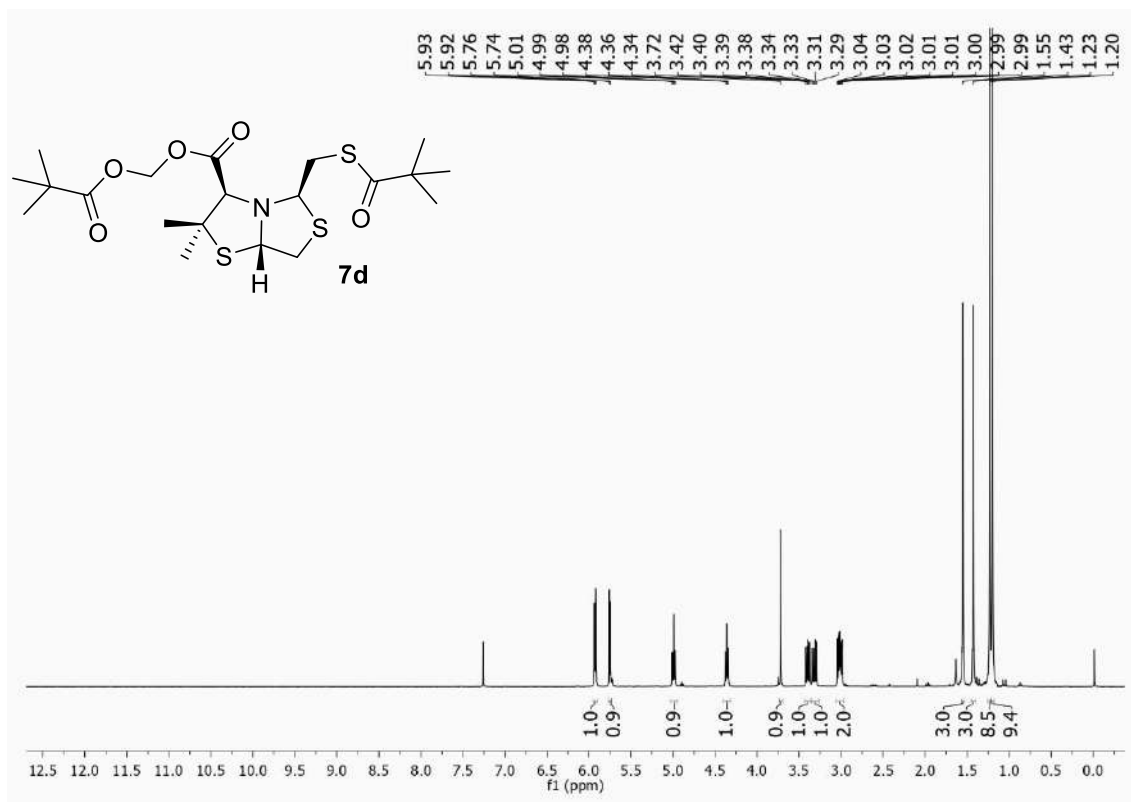
Compuesto **7a**:



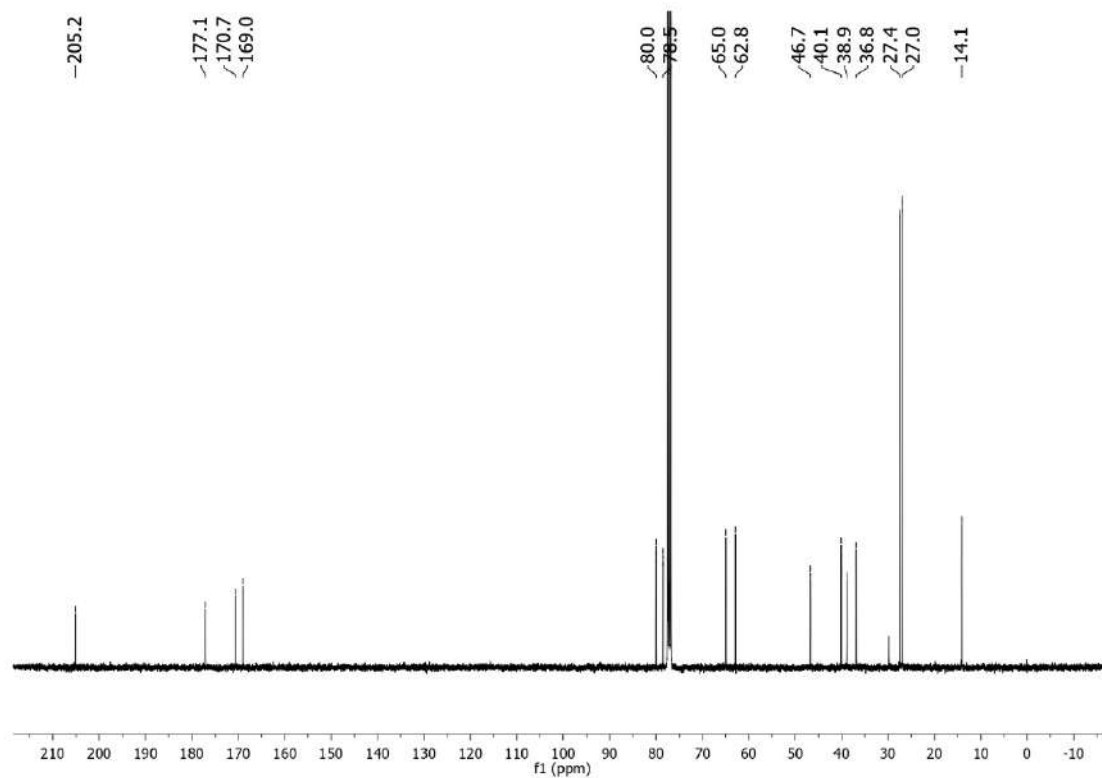
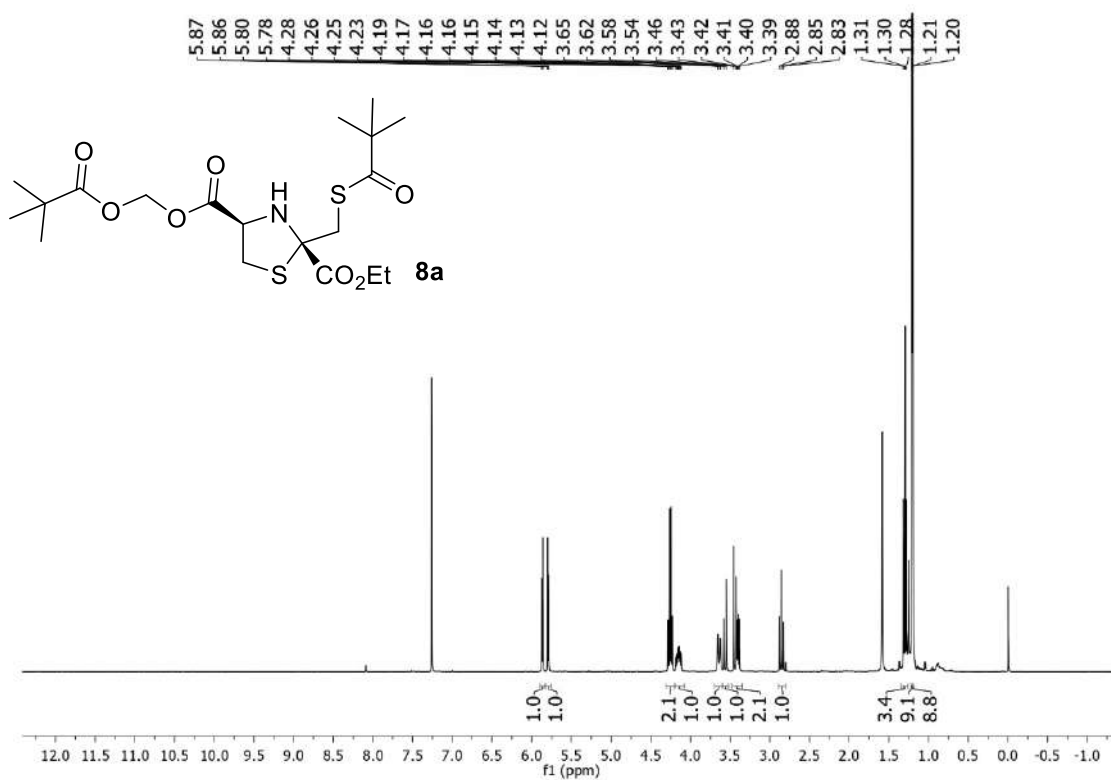
Compuesto **7b**:

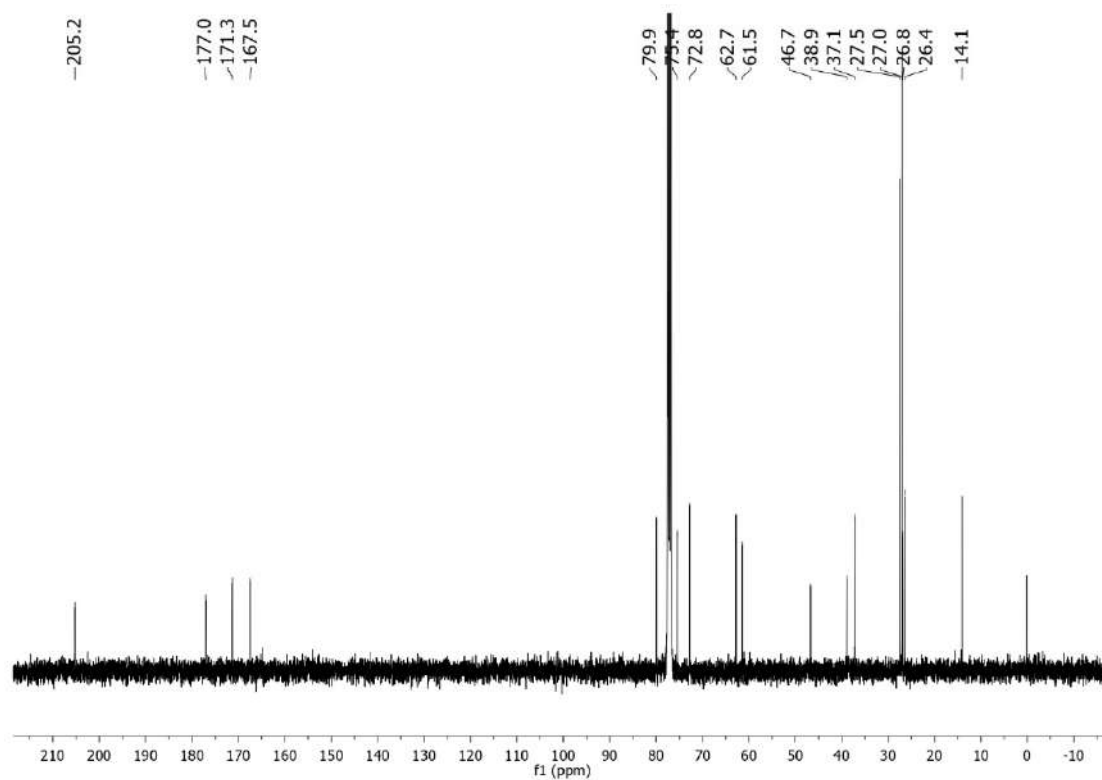
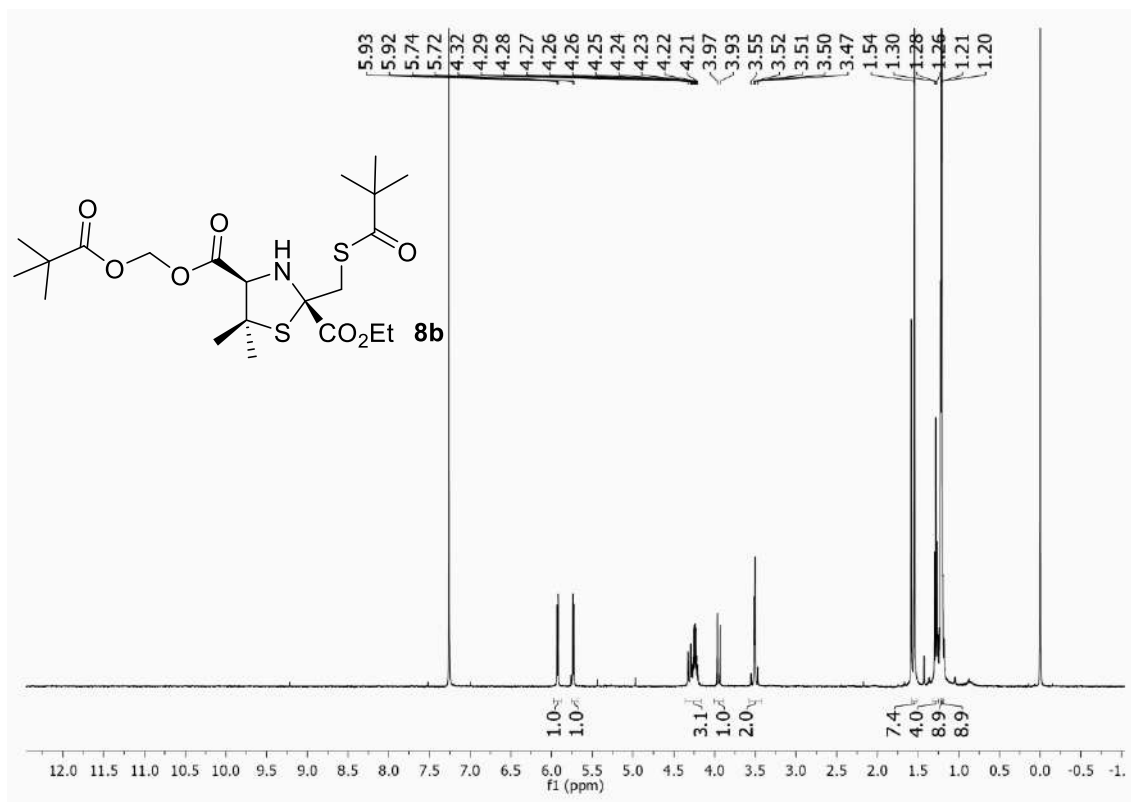
Compuesto **7c**:



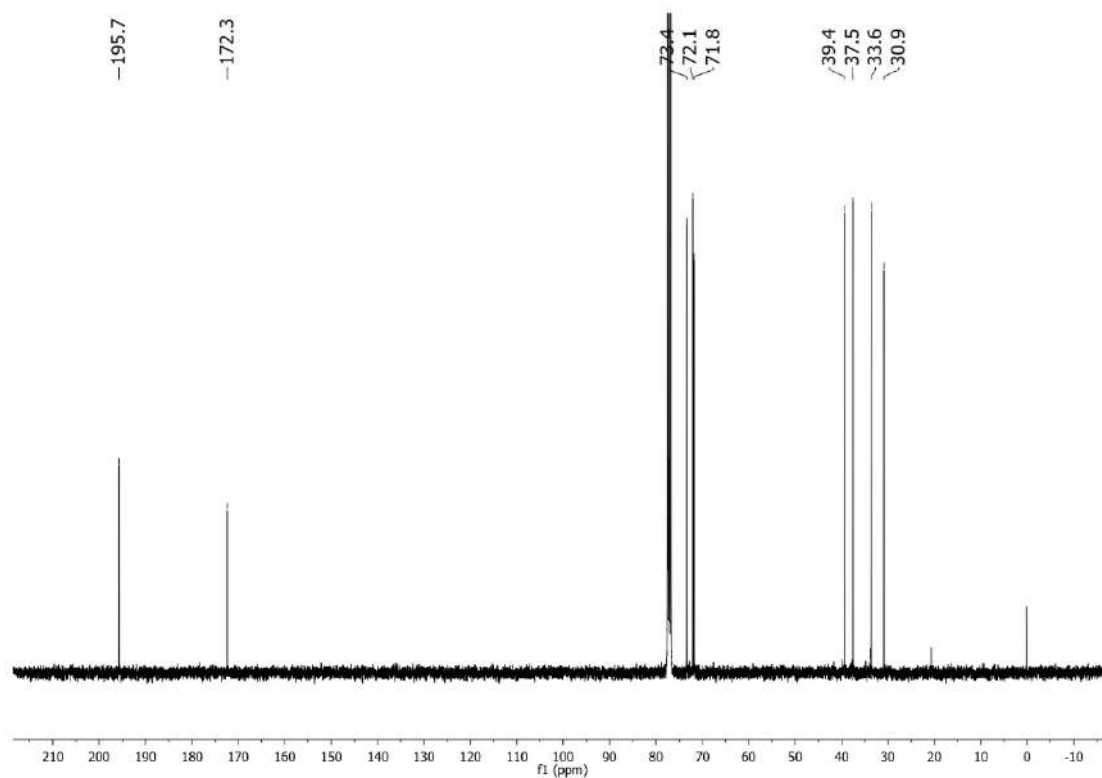
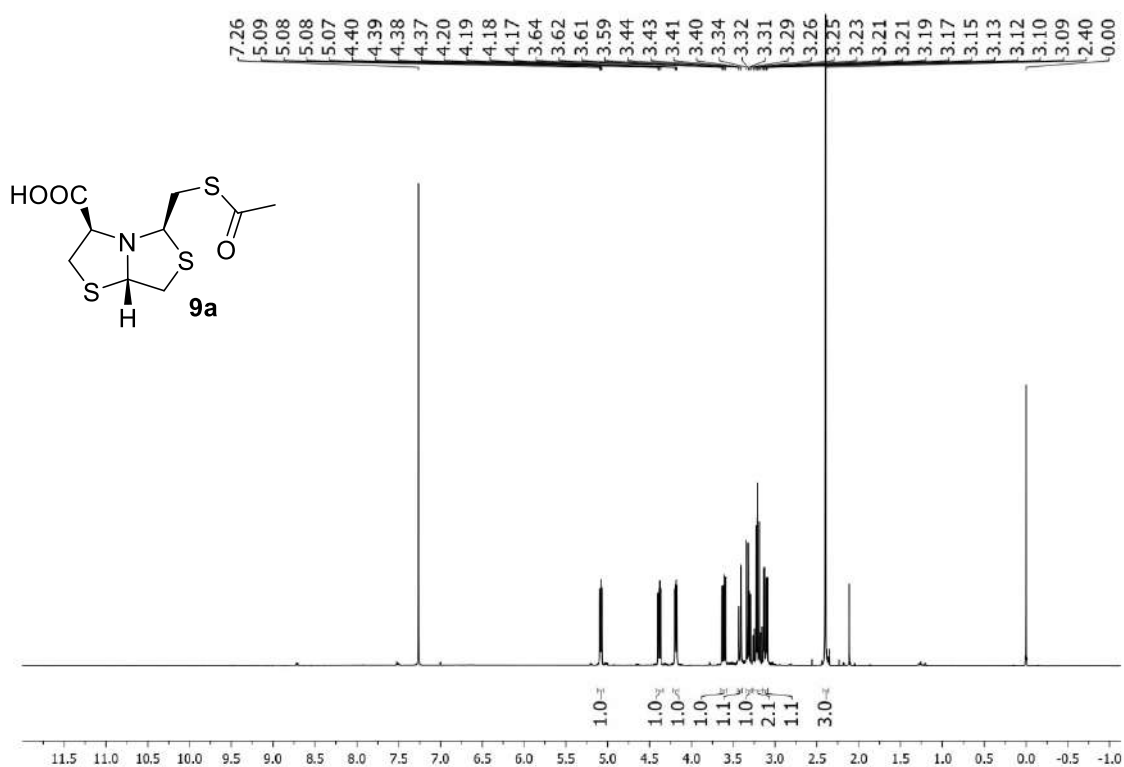
Compuesto **7d**:

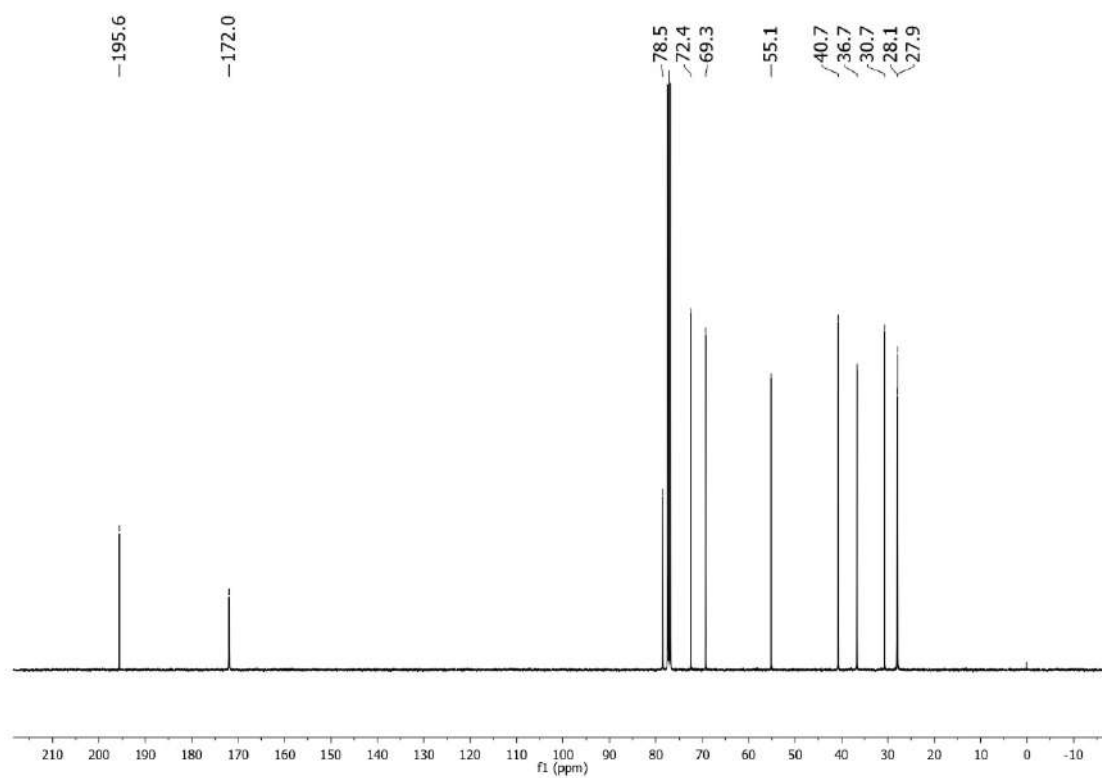
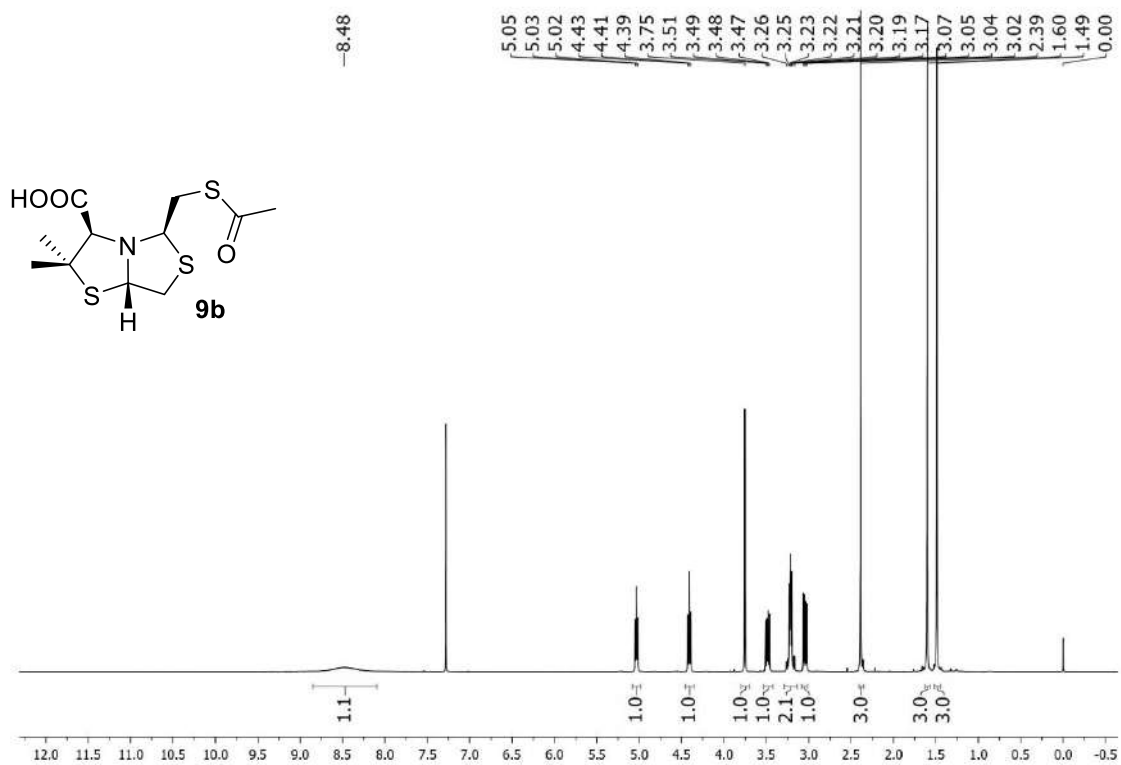
Compuesto **8a**:



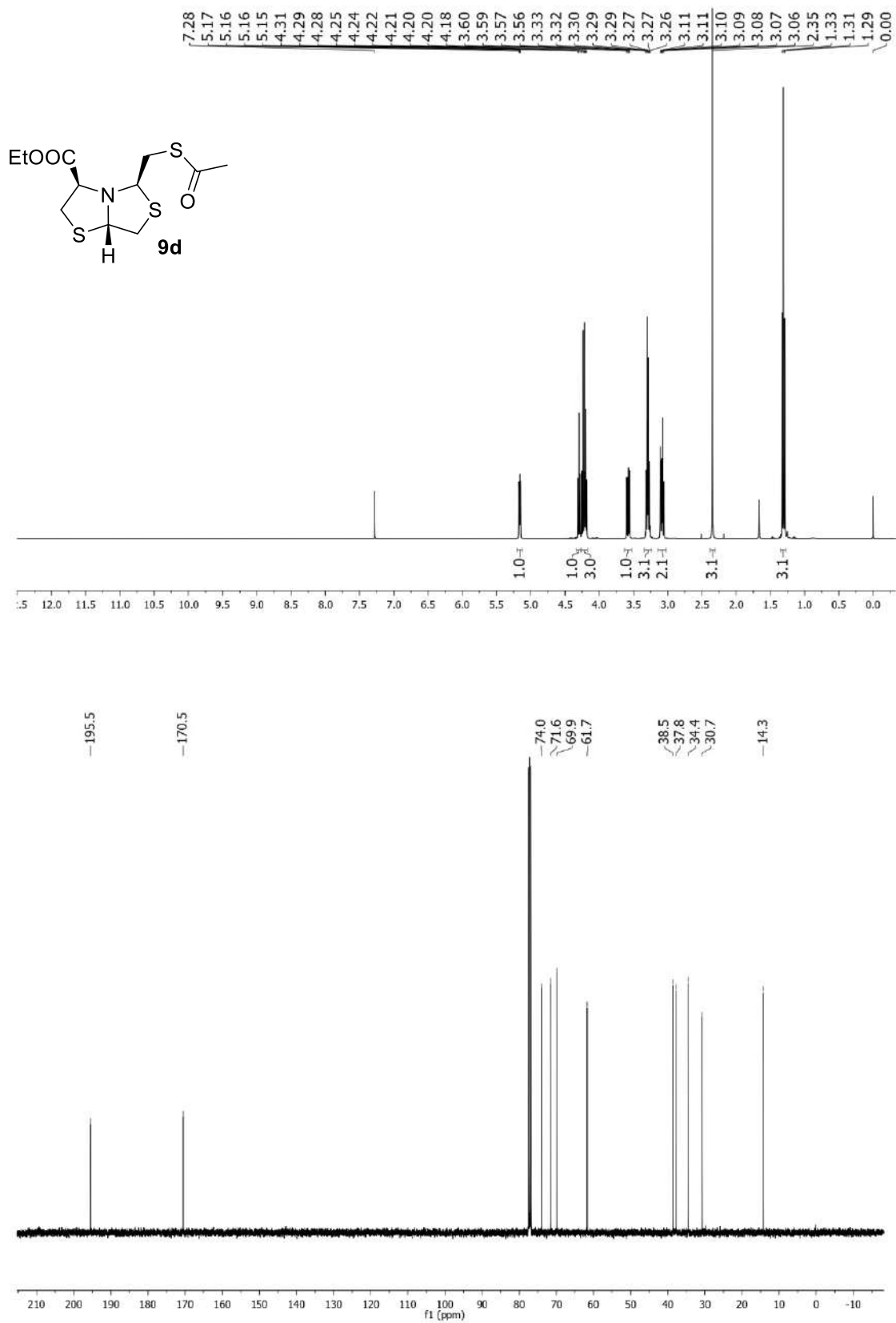
Compuesto **8b**:

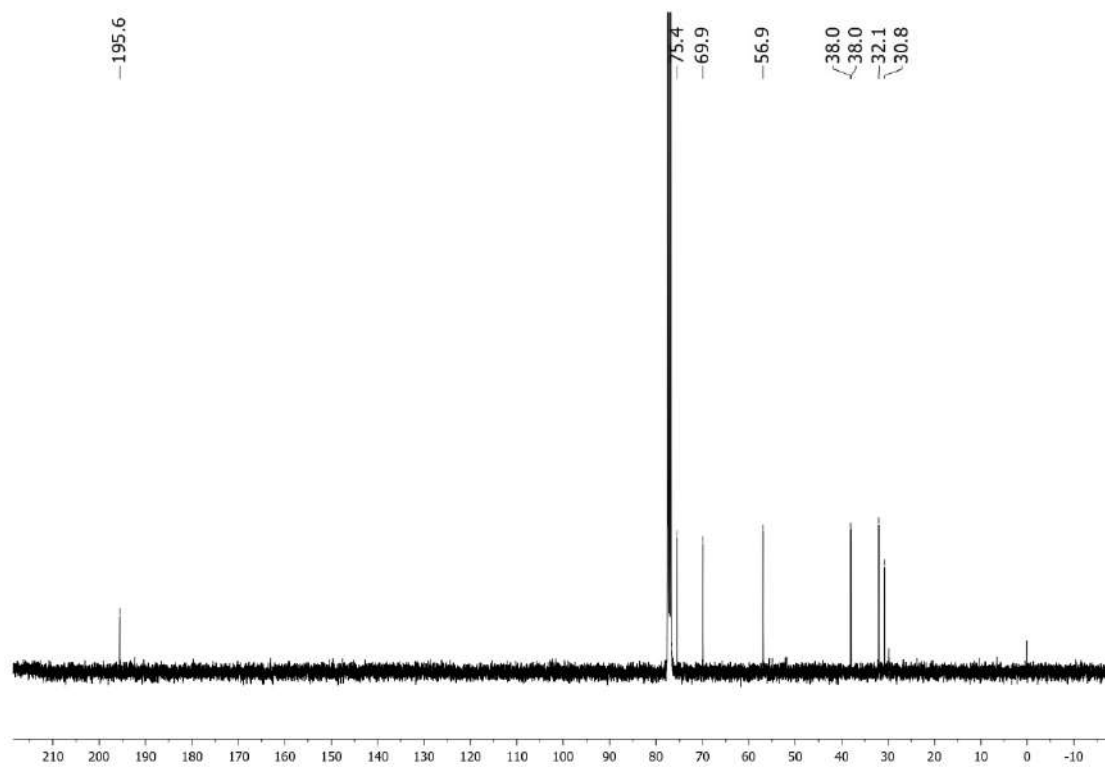
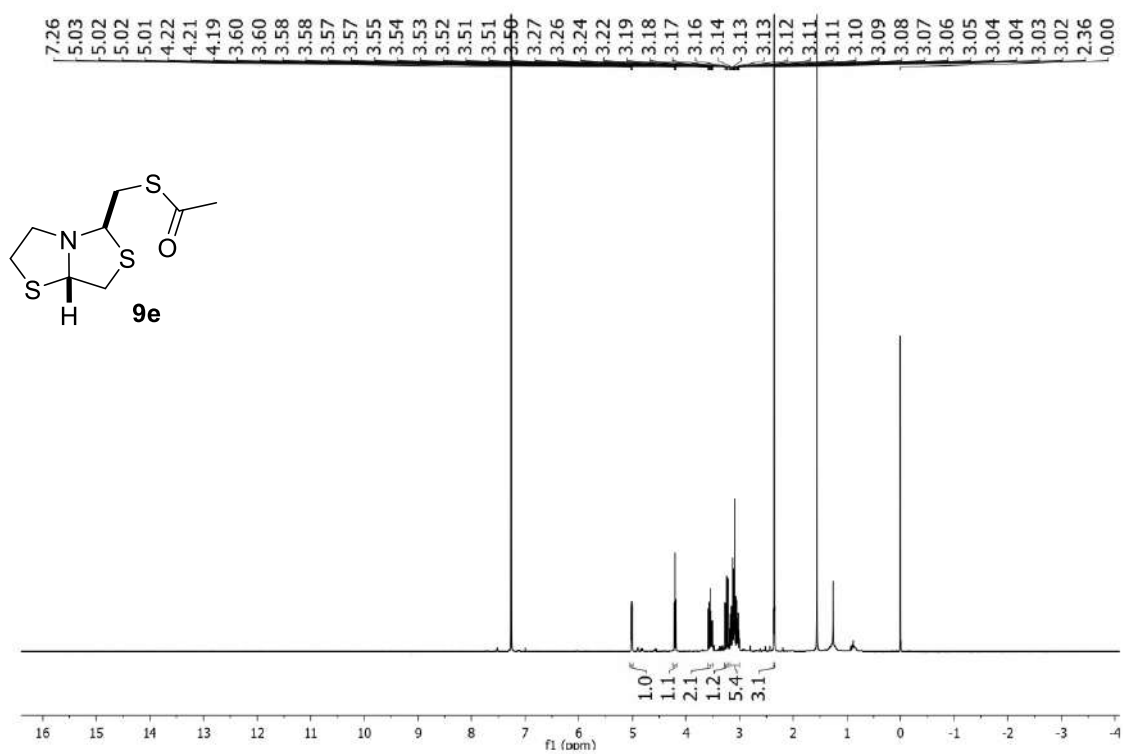
Compuesto **9a**:



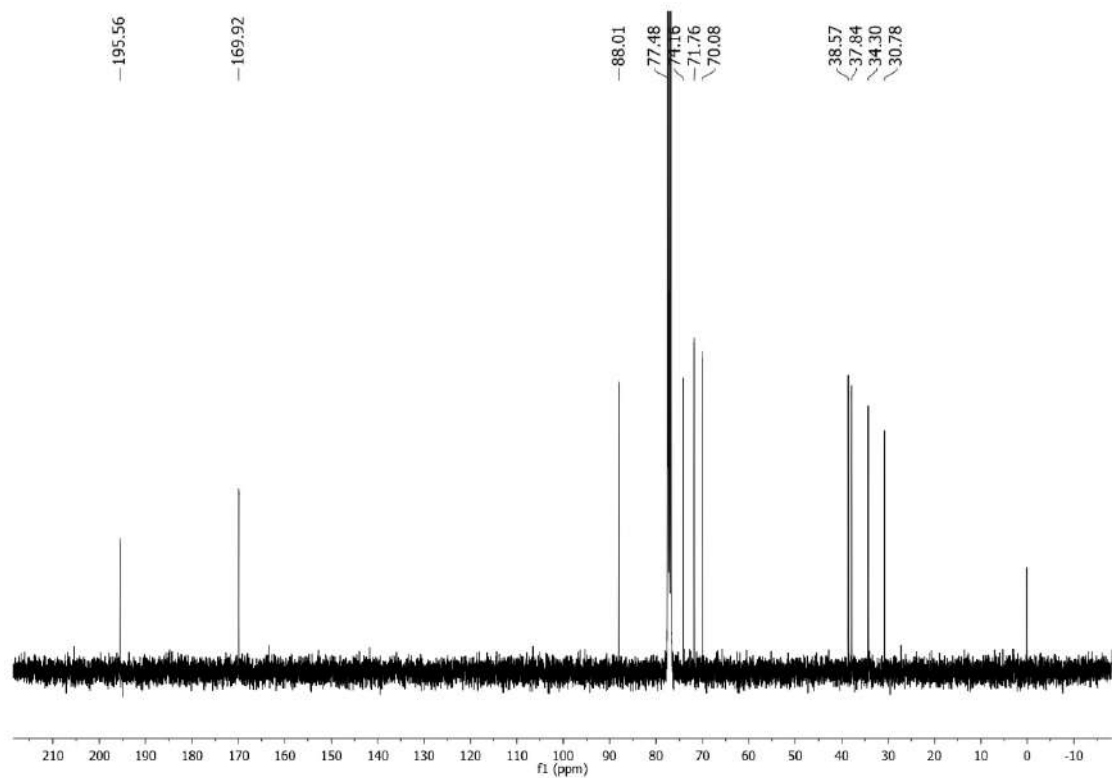
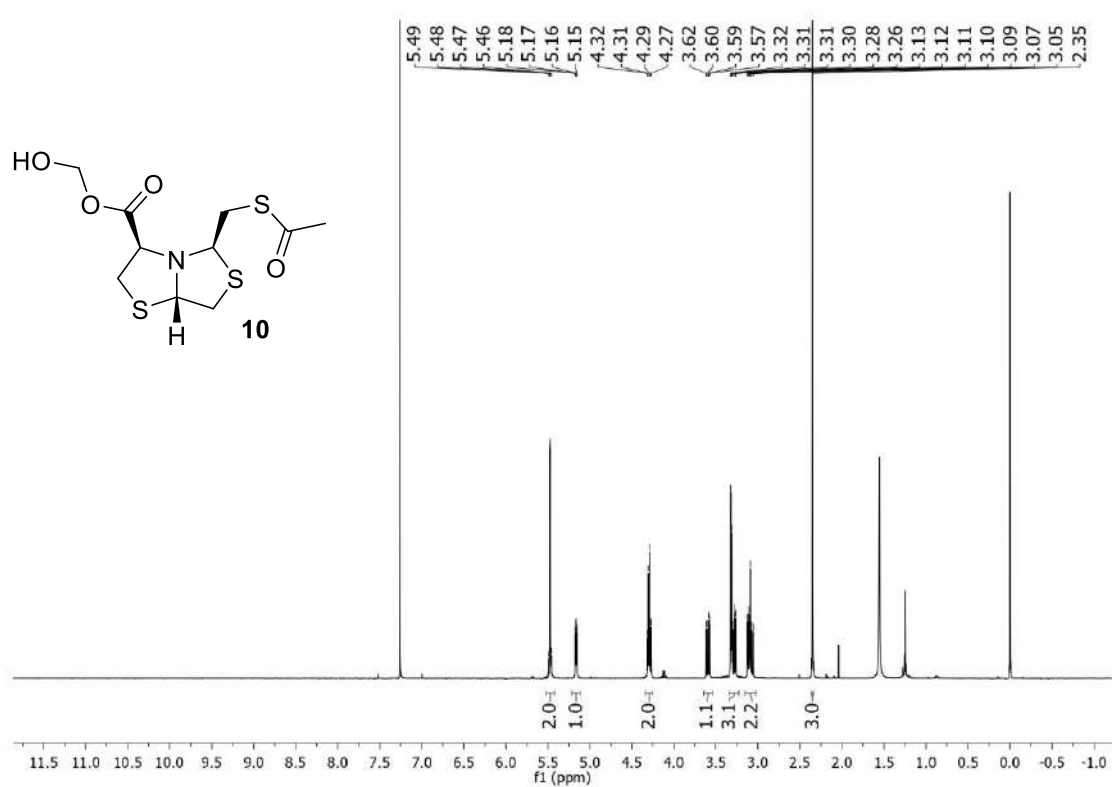
Compuesto **9b**:

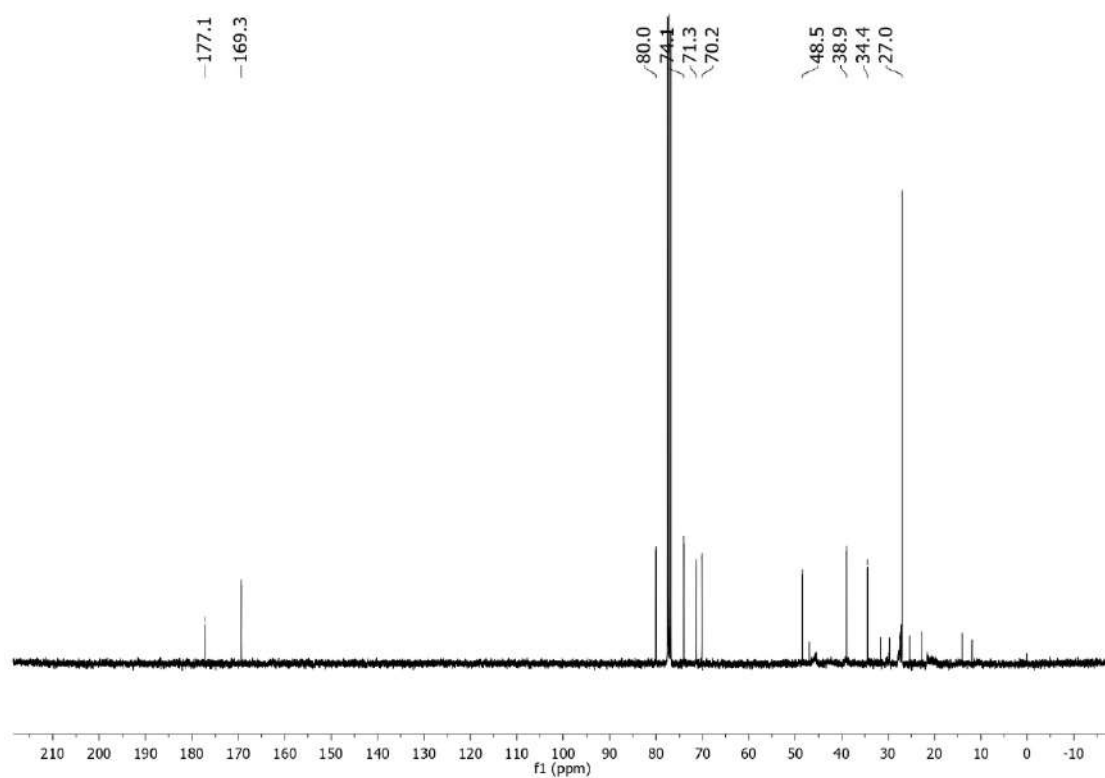
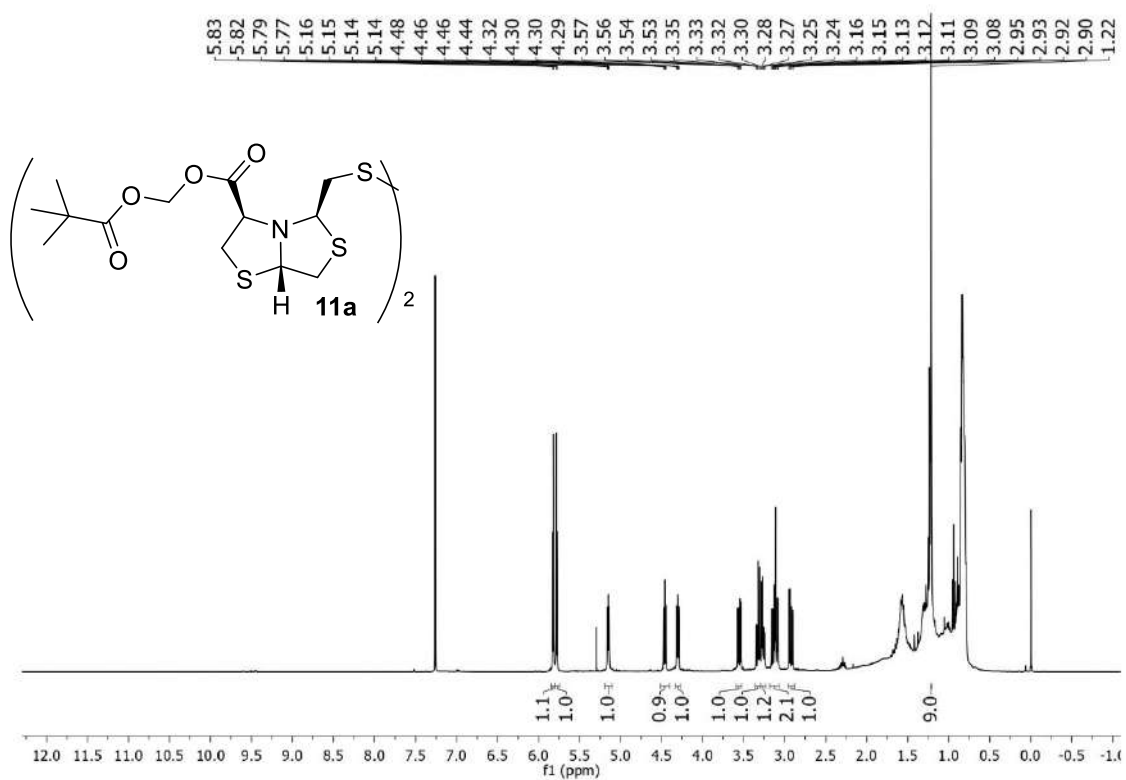
Compuesto **9d**:



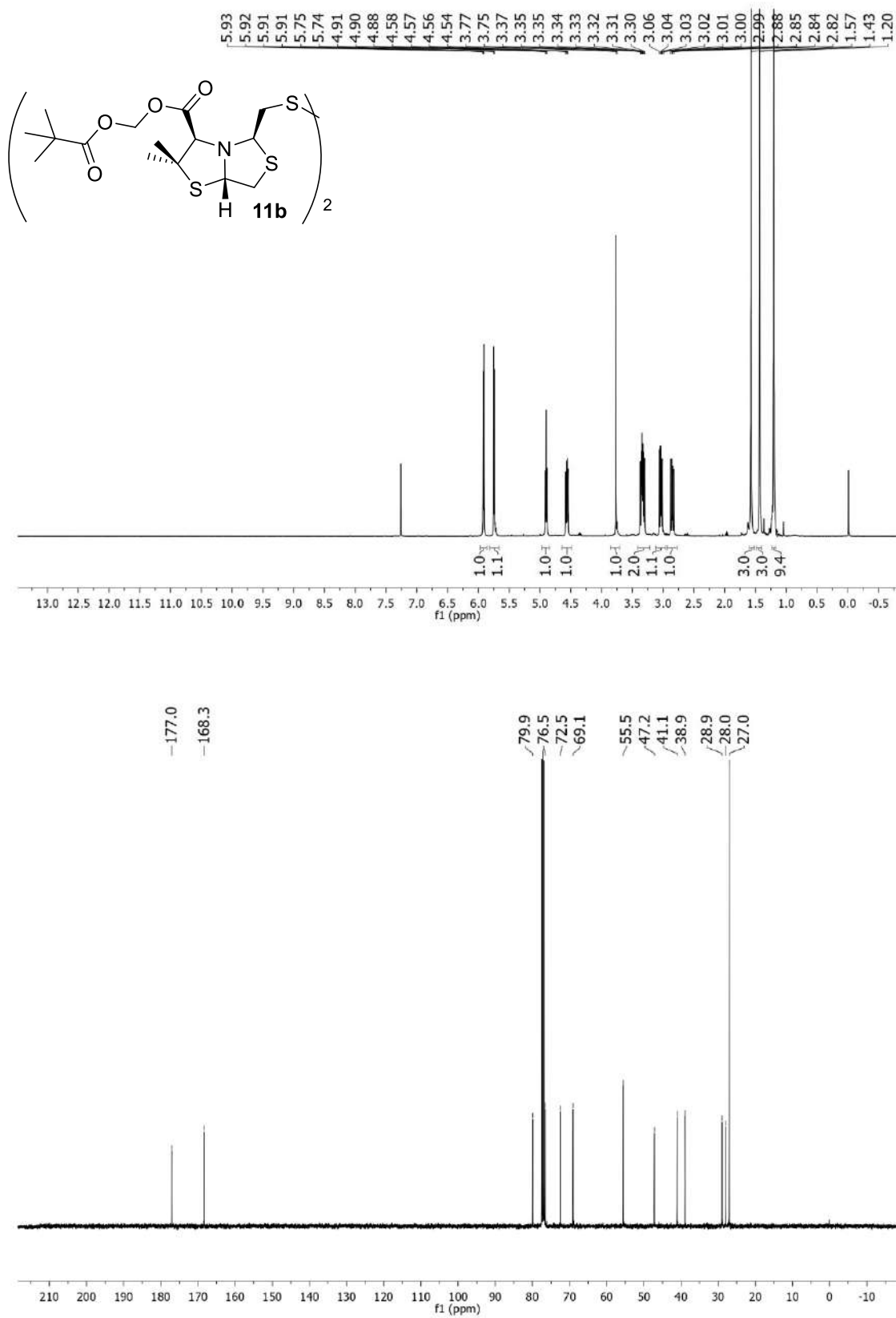
Compuesto **9e**:

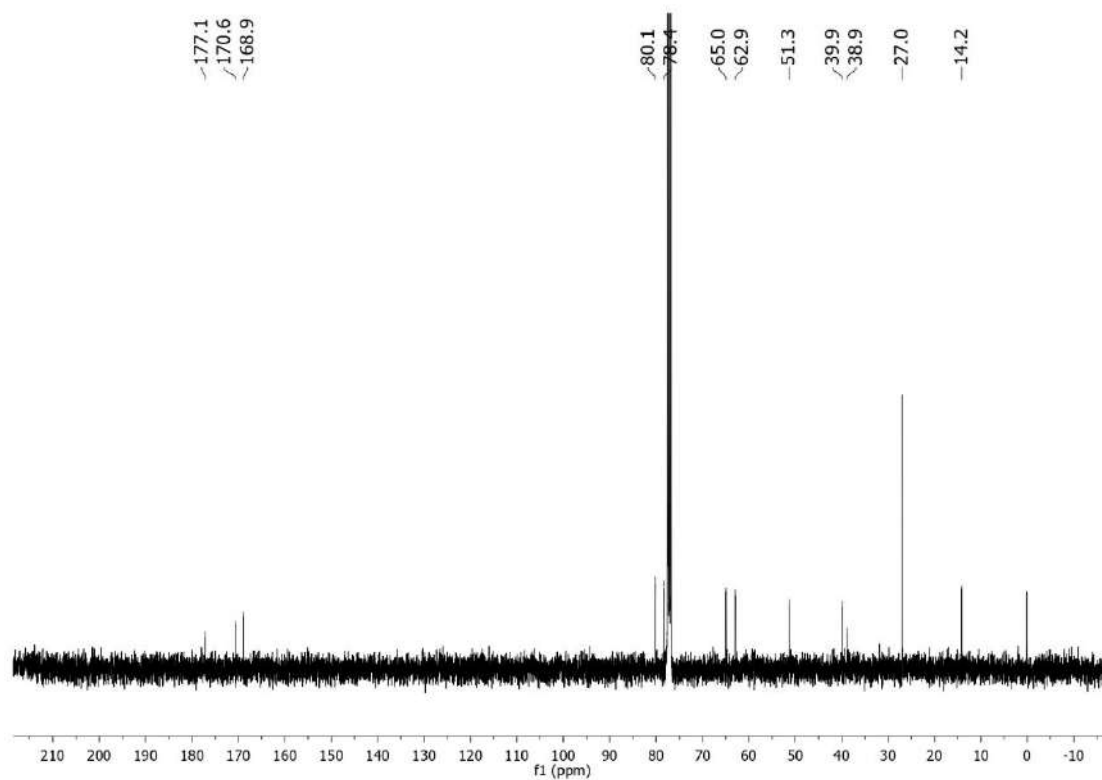
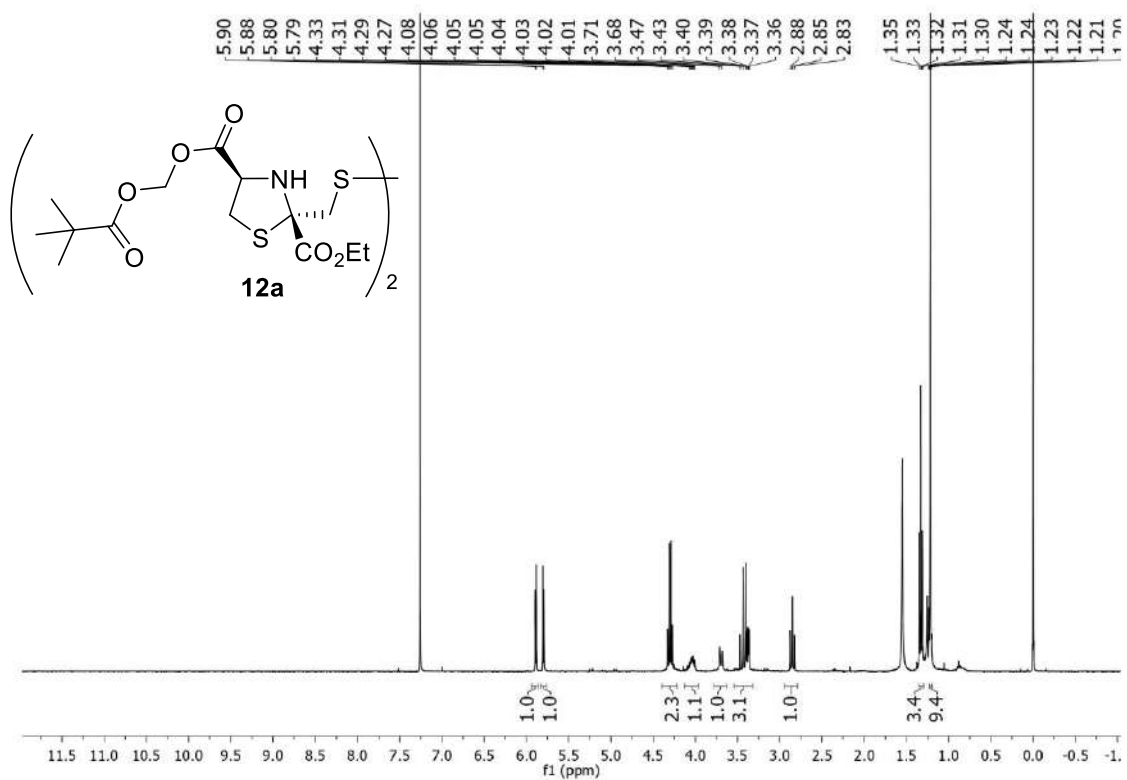
Compuesto **10**:



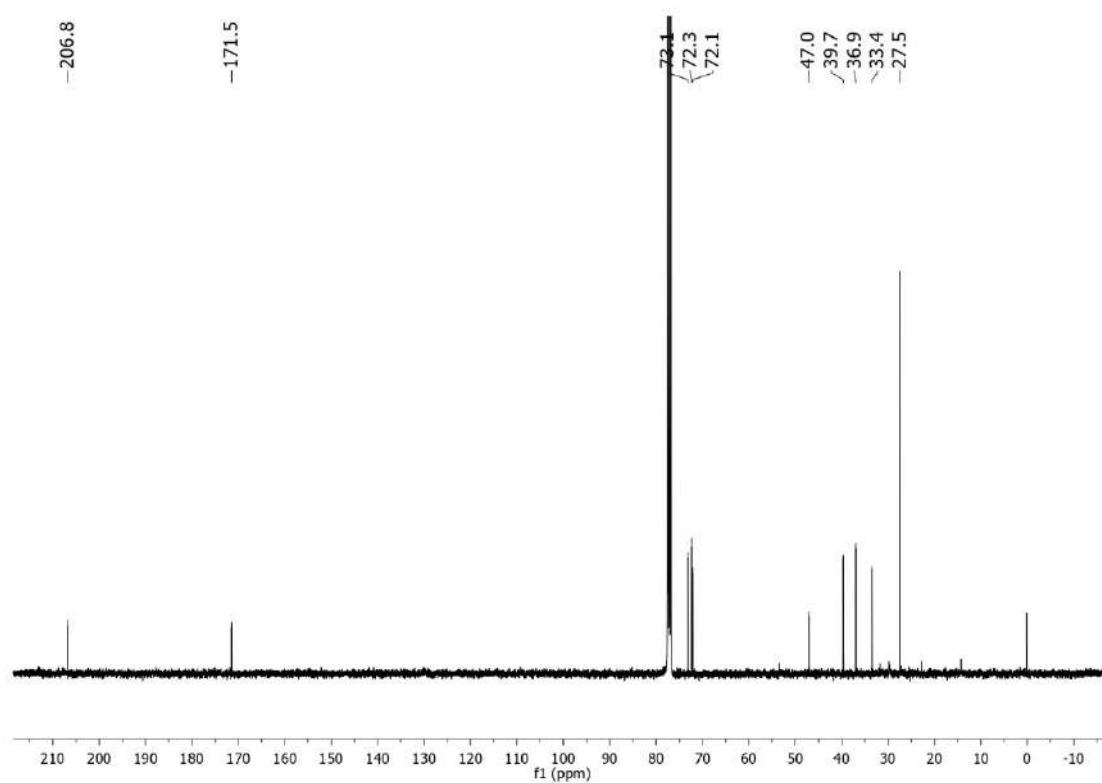
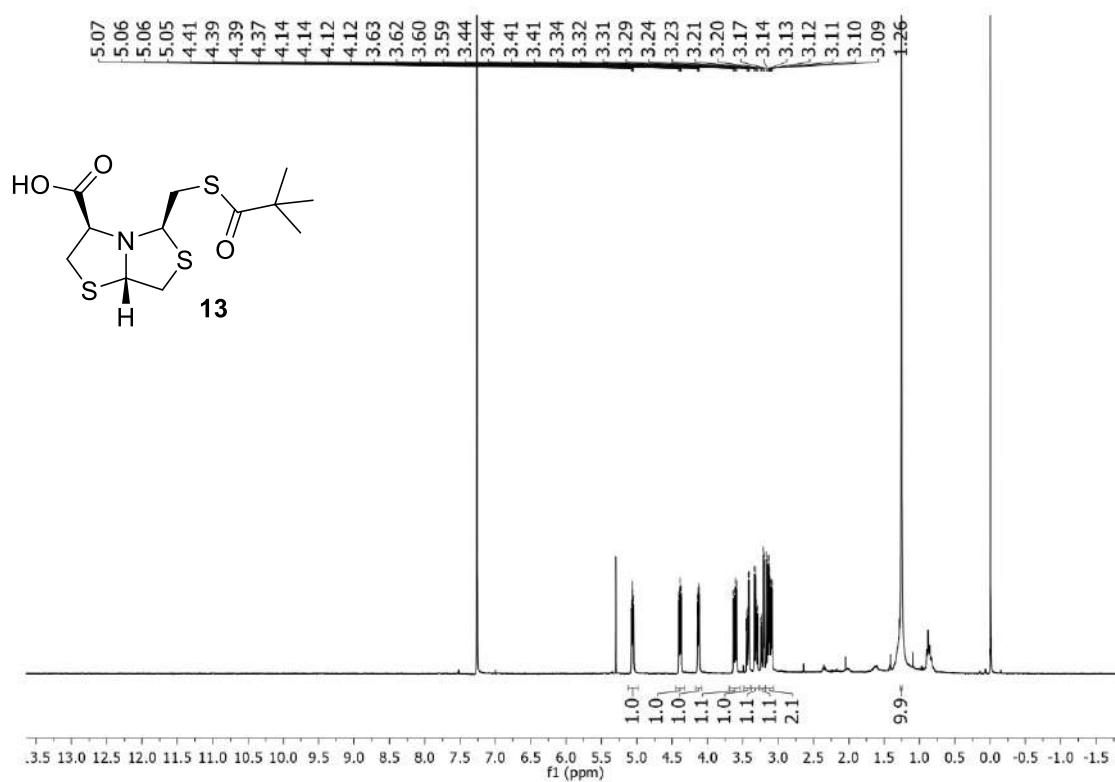
Compuesto **11a**:

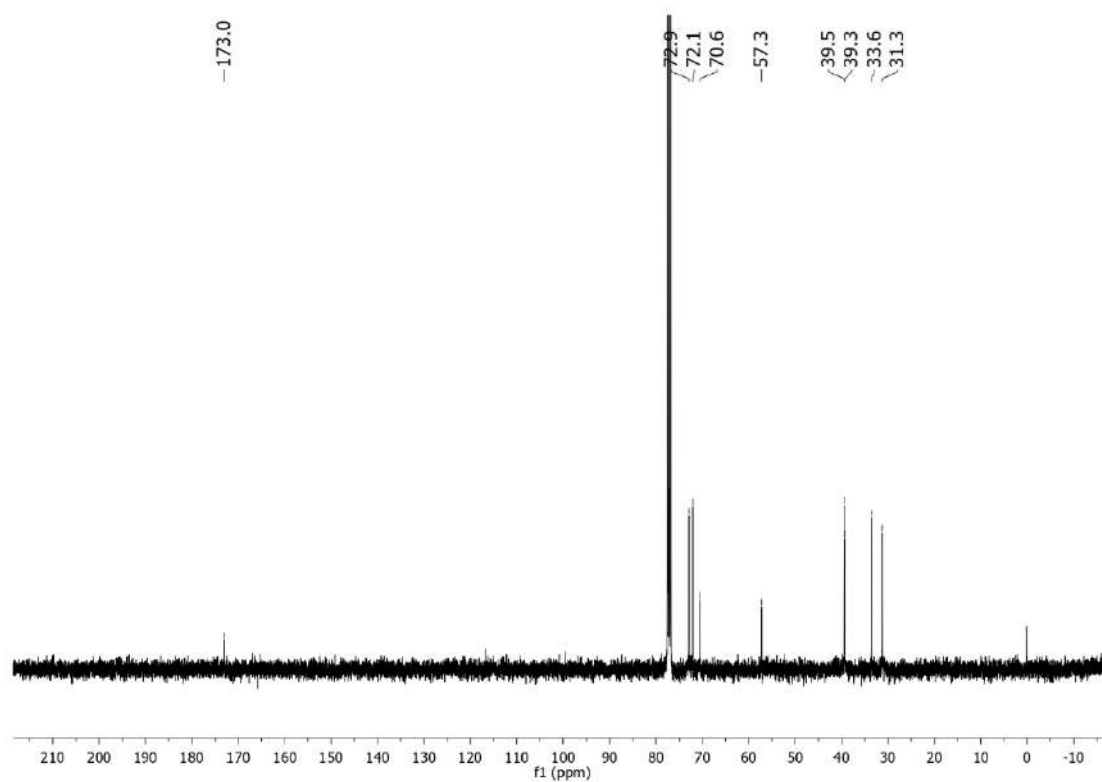
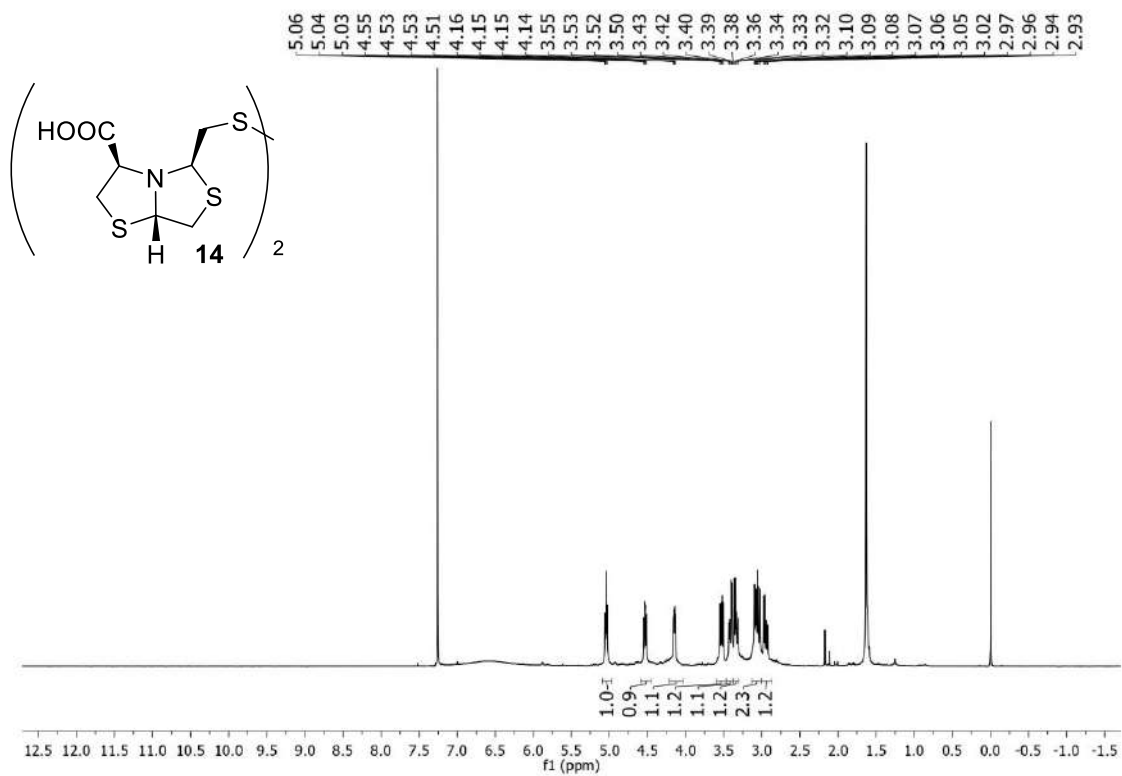
Compuesto **11b**:



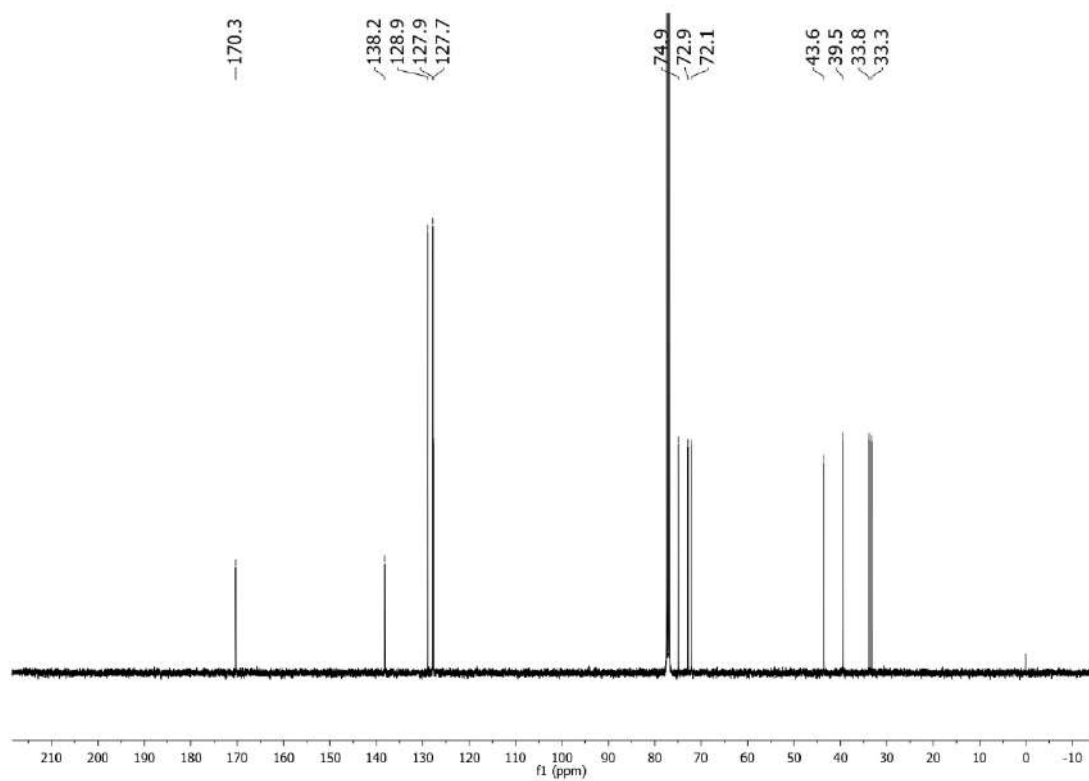
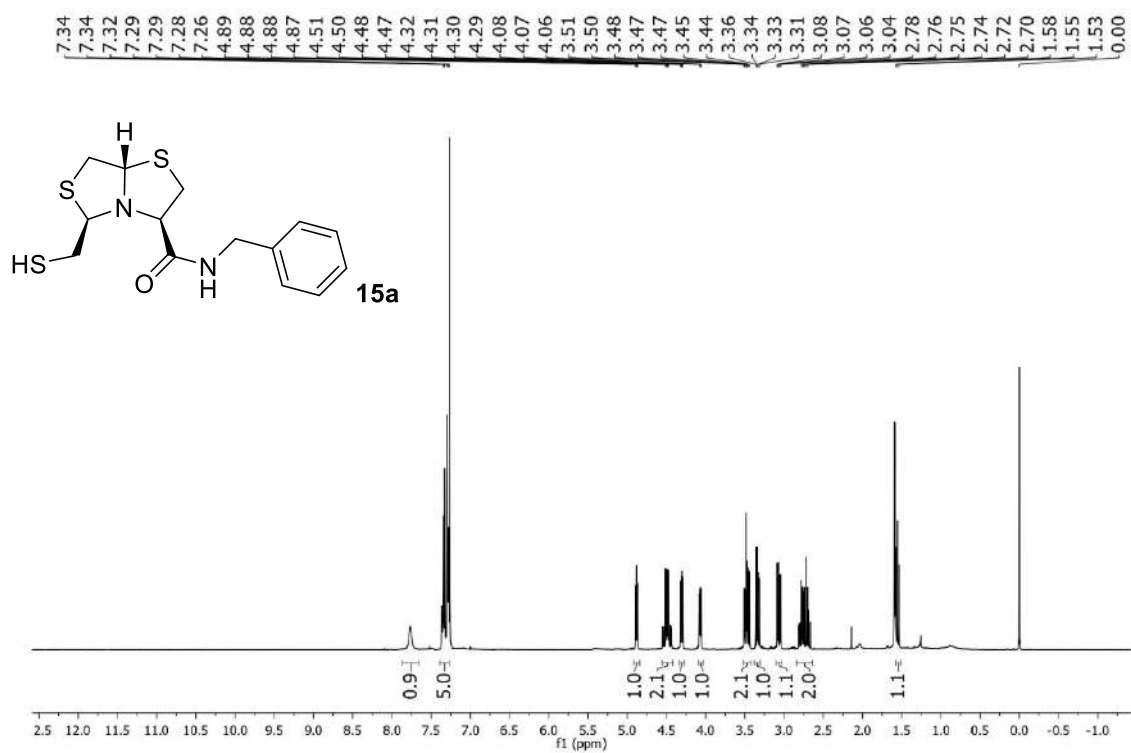
Compuesto **12a**:

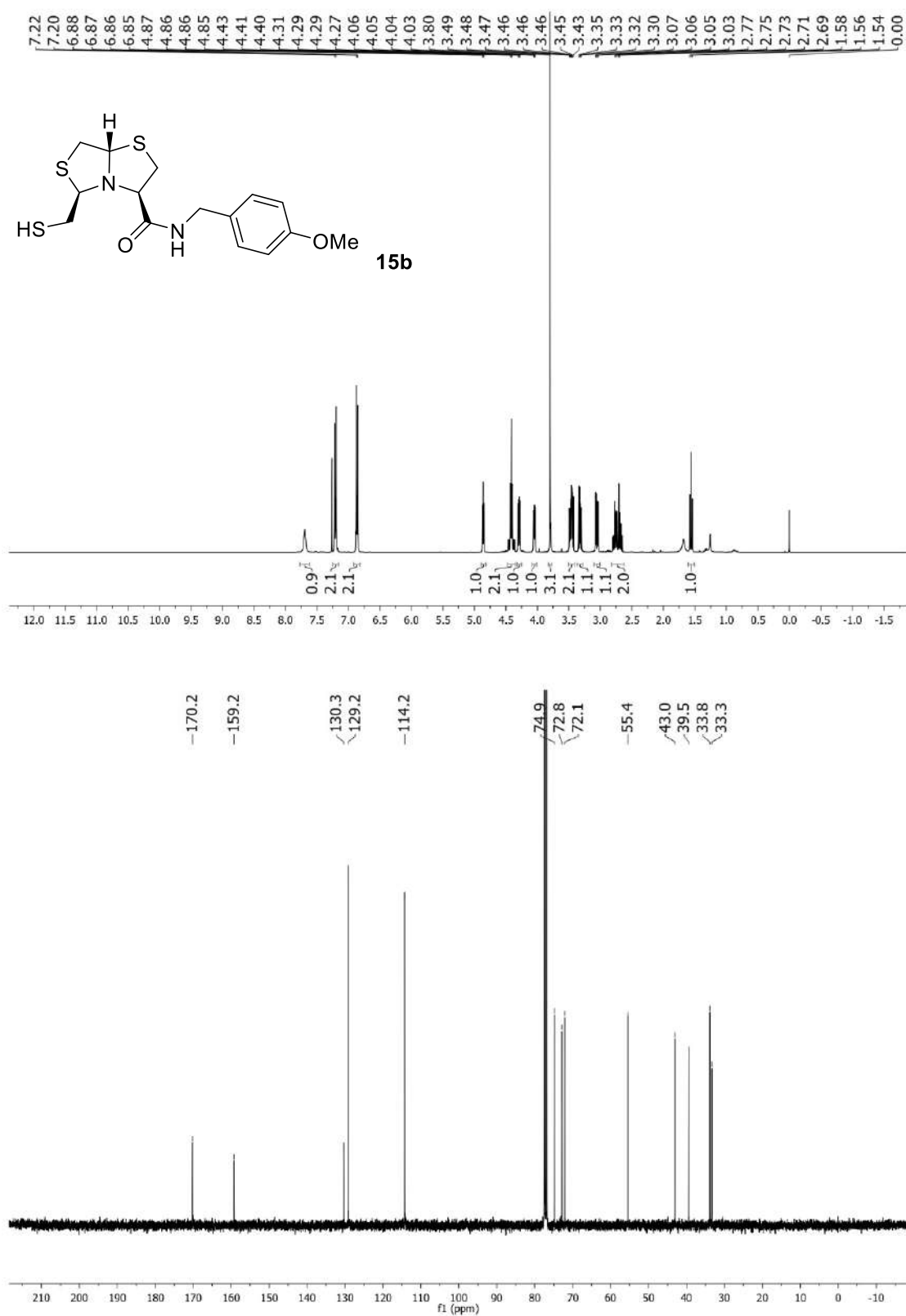
Compuesto **13**:



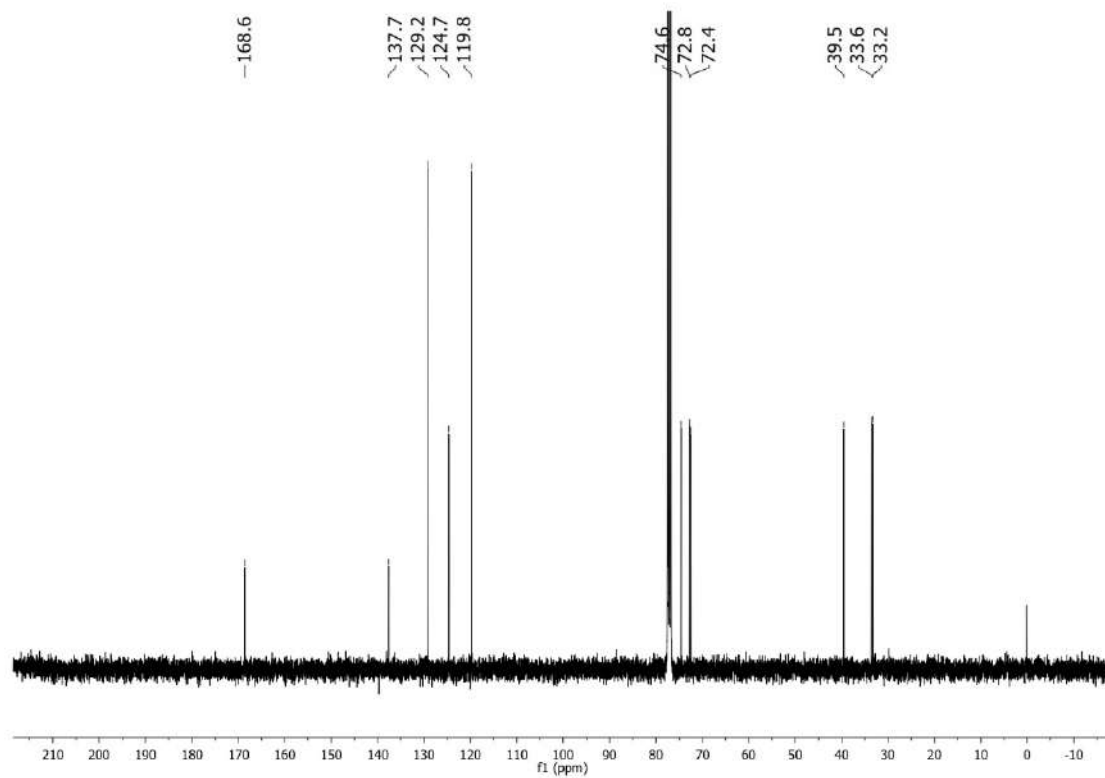
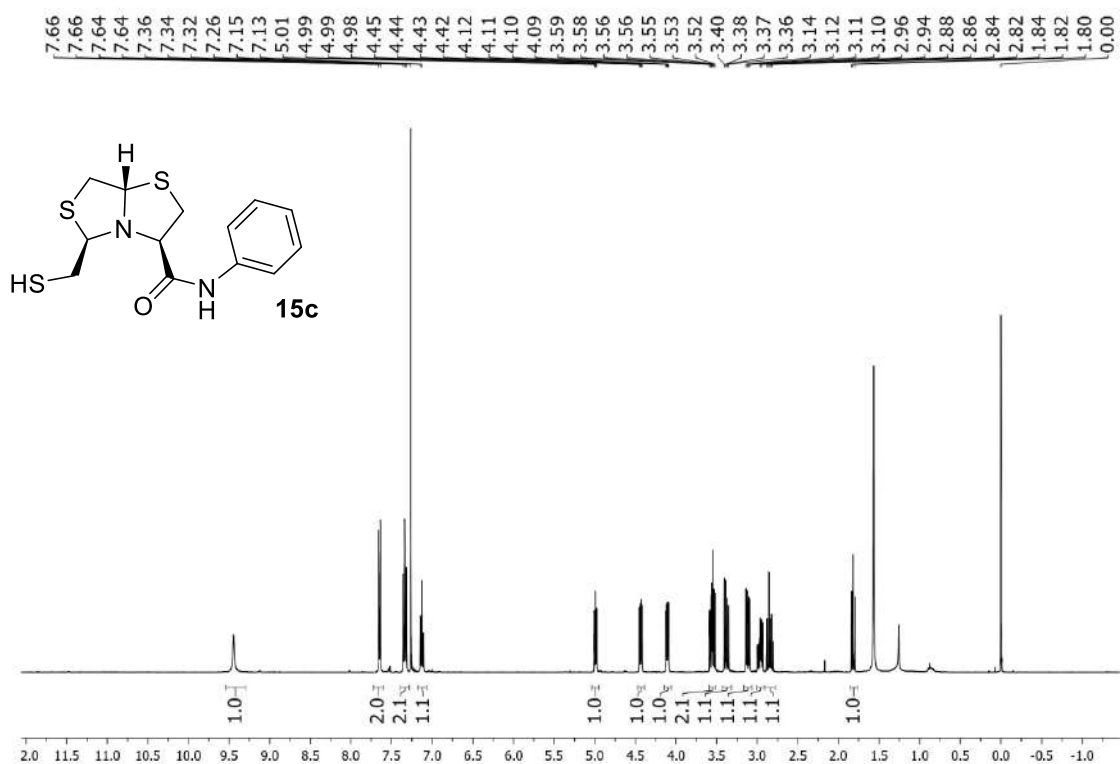
Compuesto **14**:

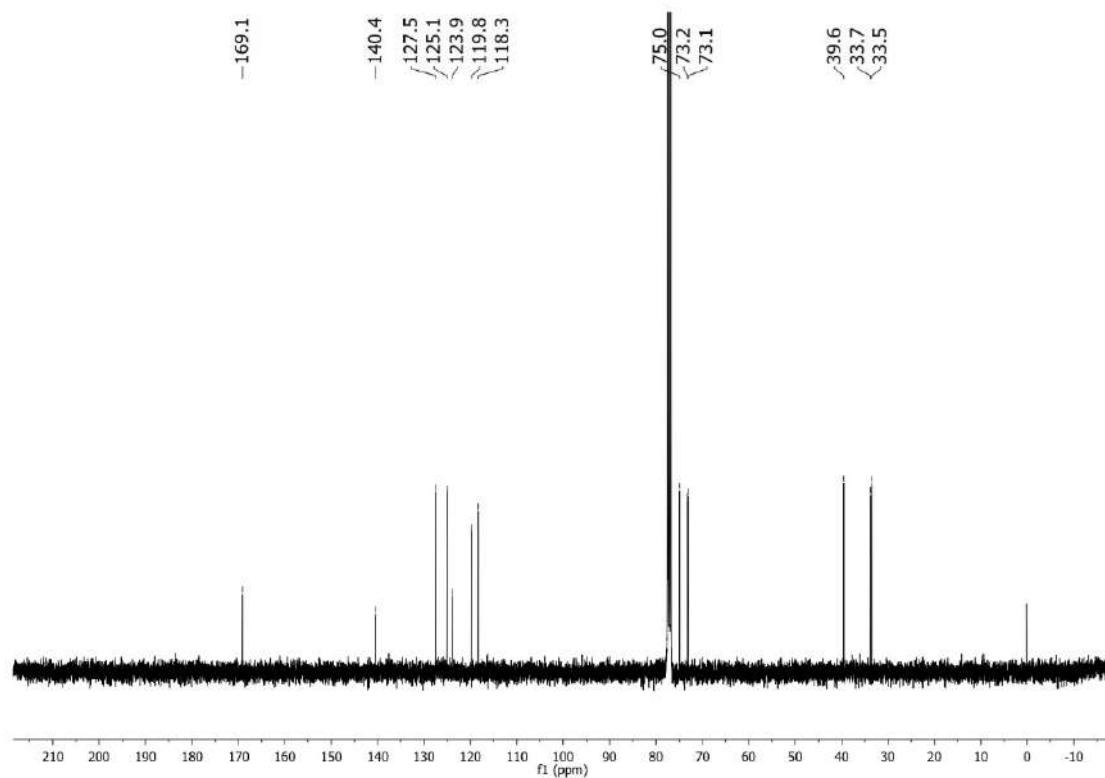
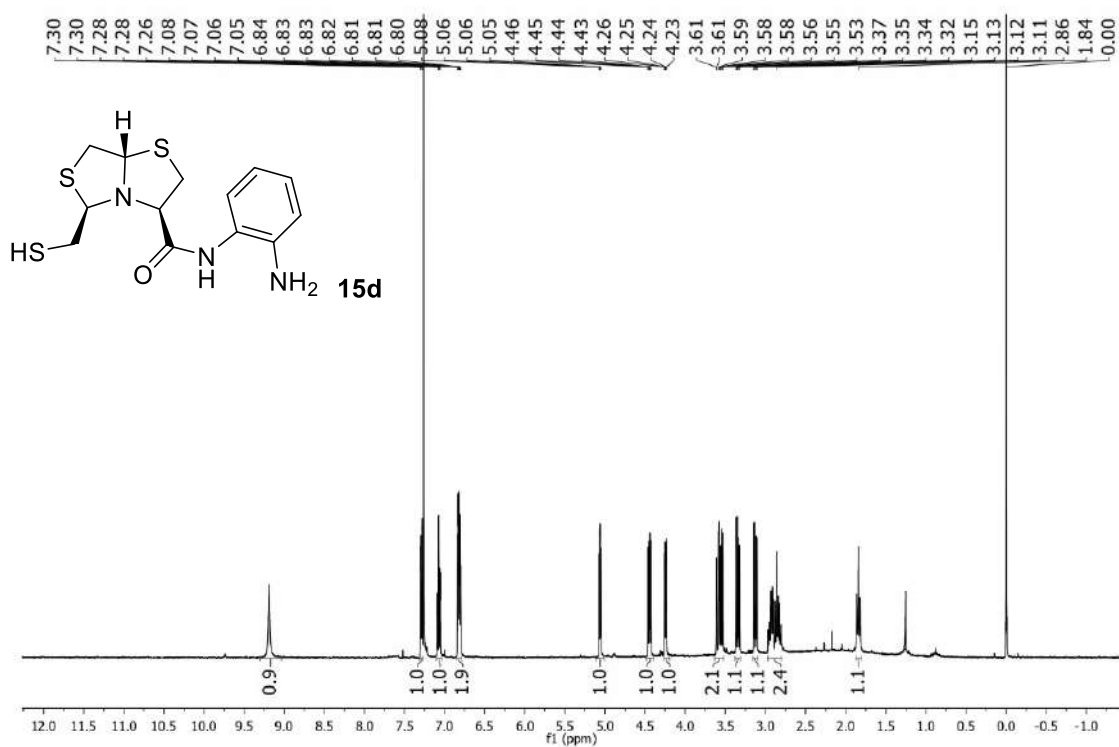
Compuesto **15a**:



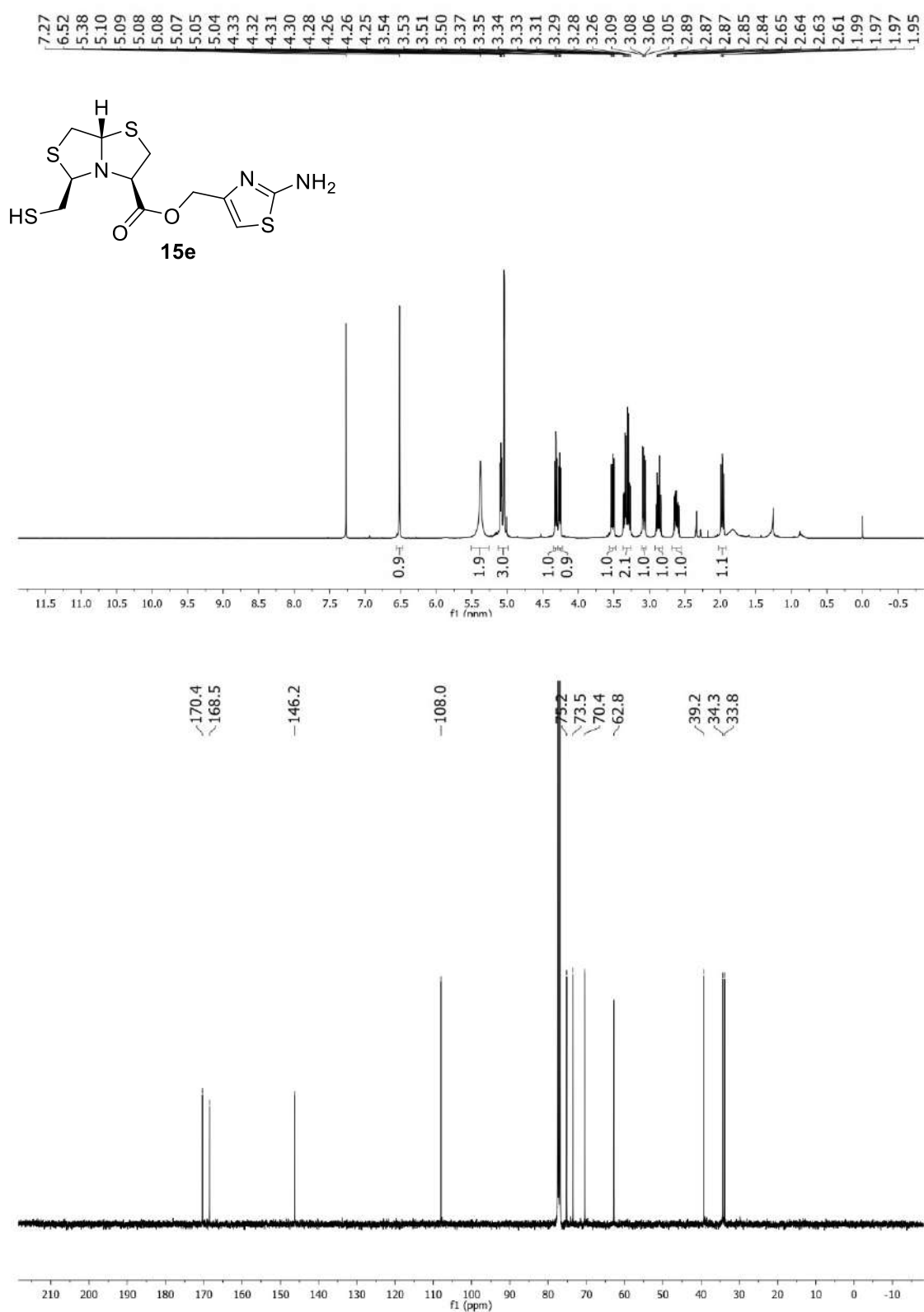
Compuesto **15b**:

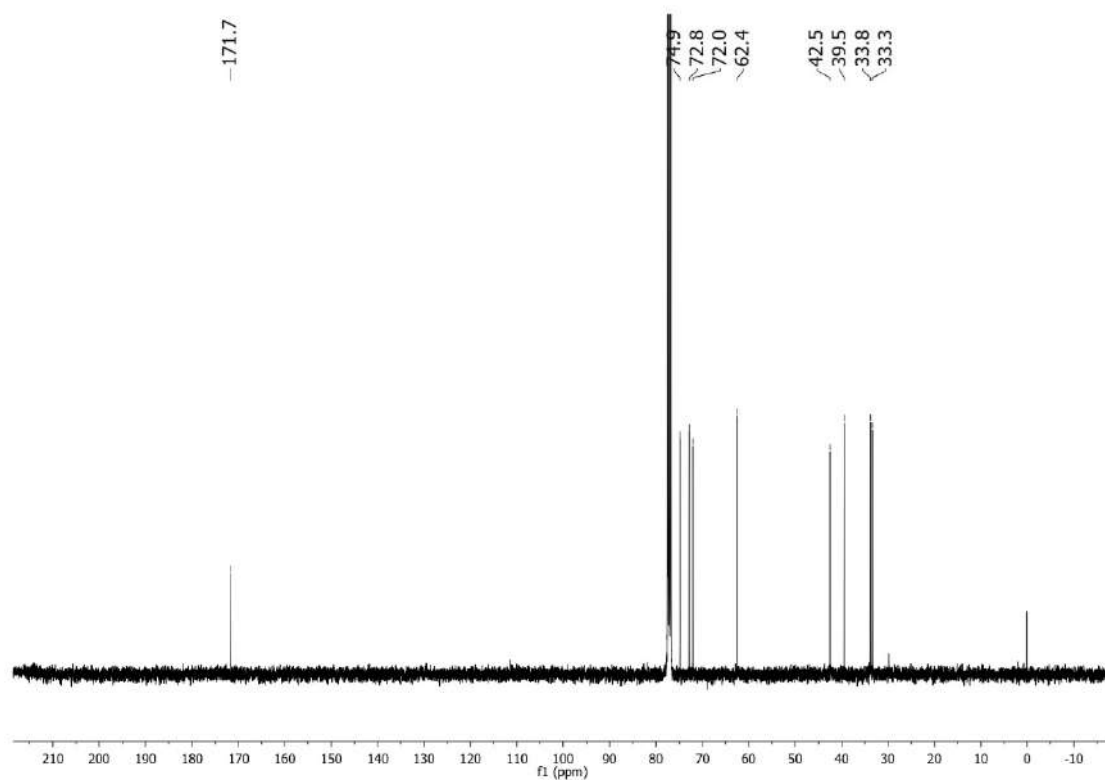
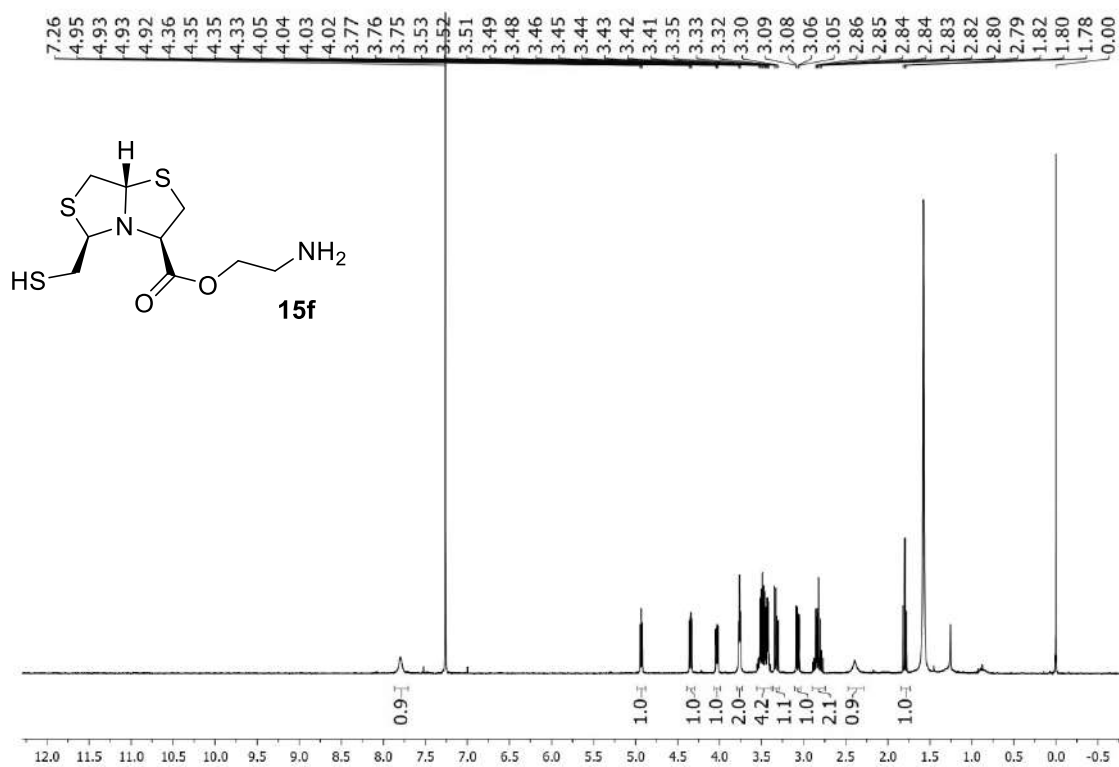
Compuesto **15c**:



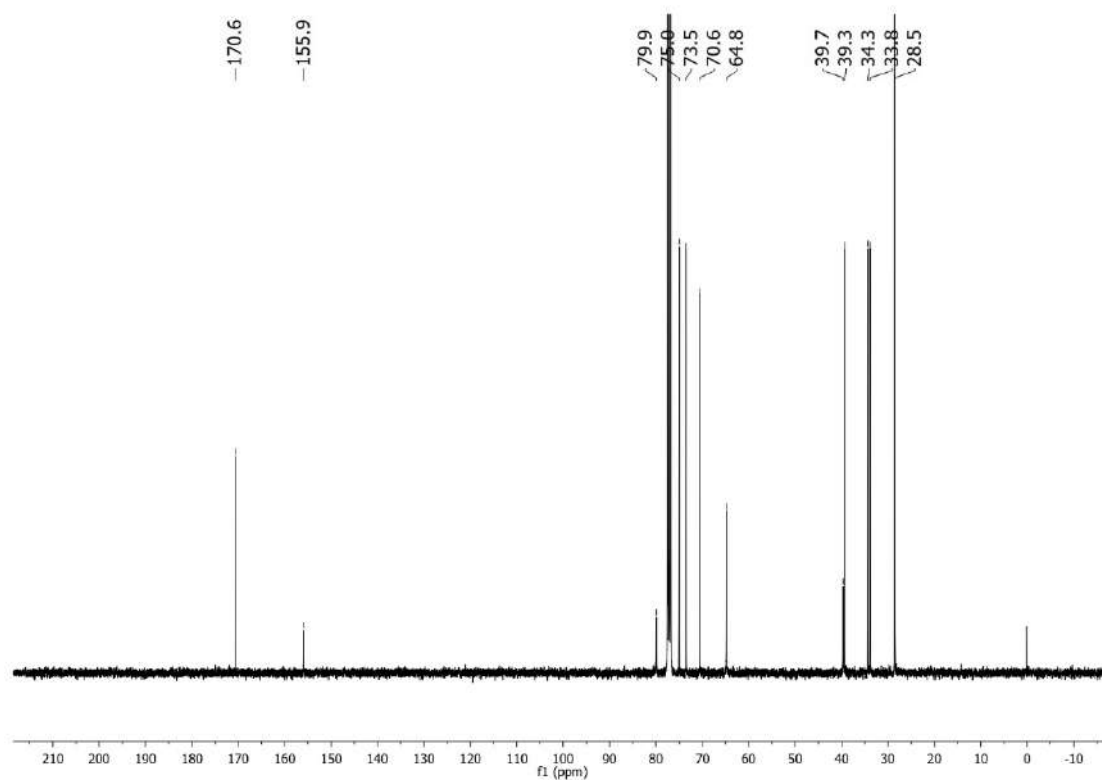
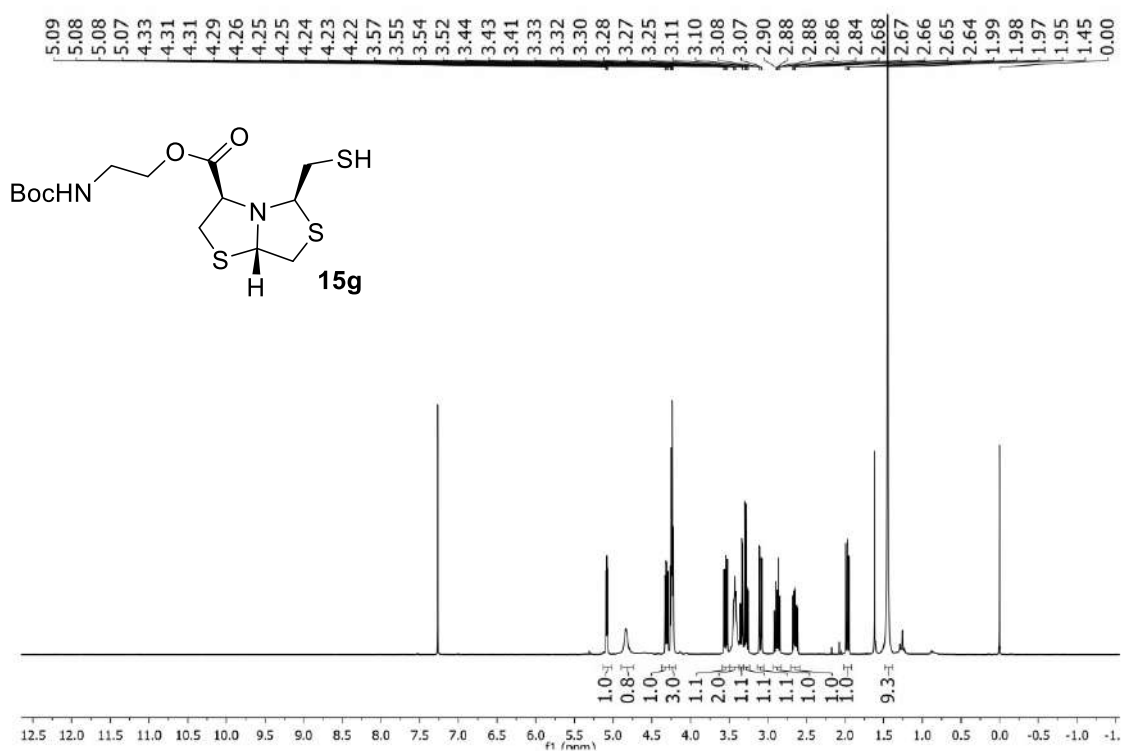
Compuesto **15d**:

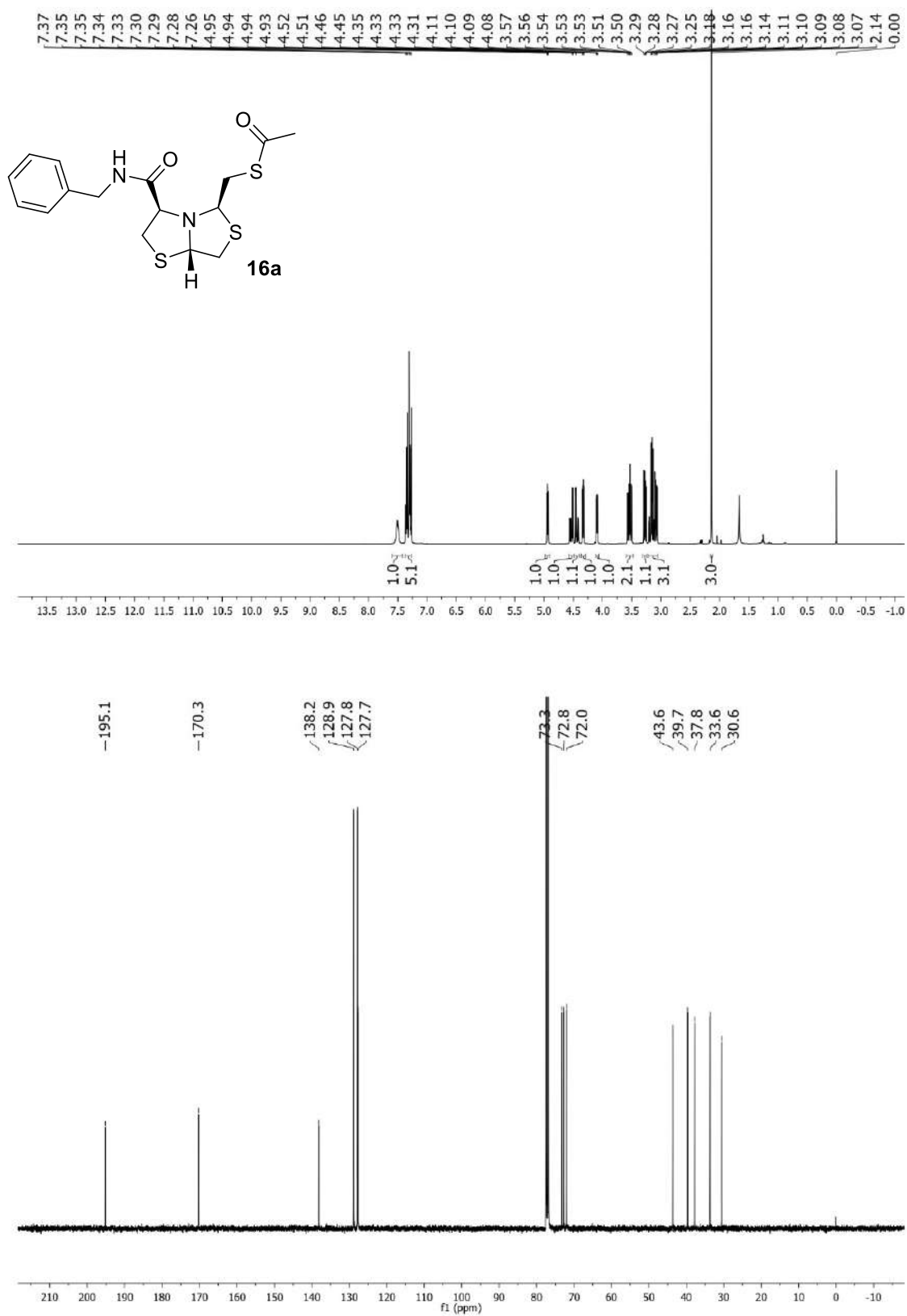
Compuesto **15e**:



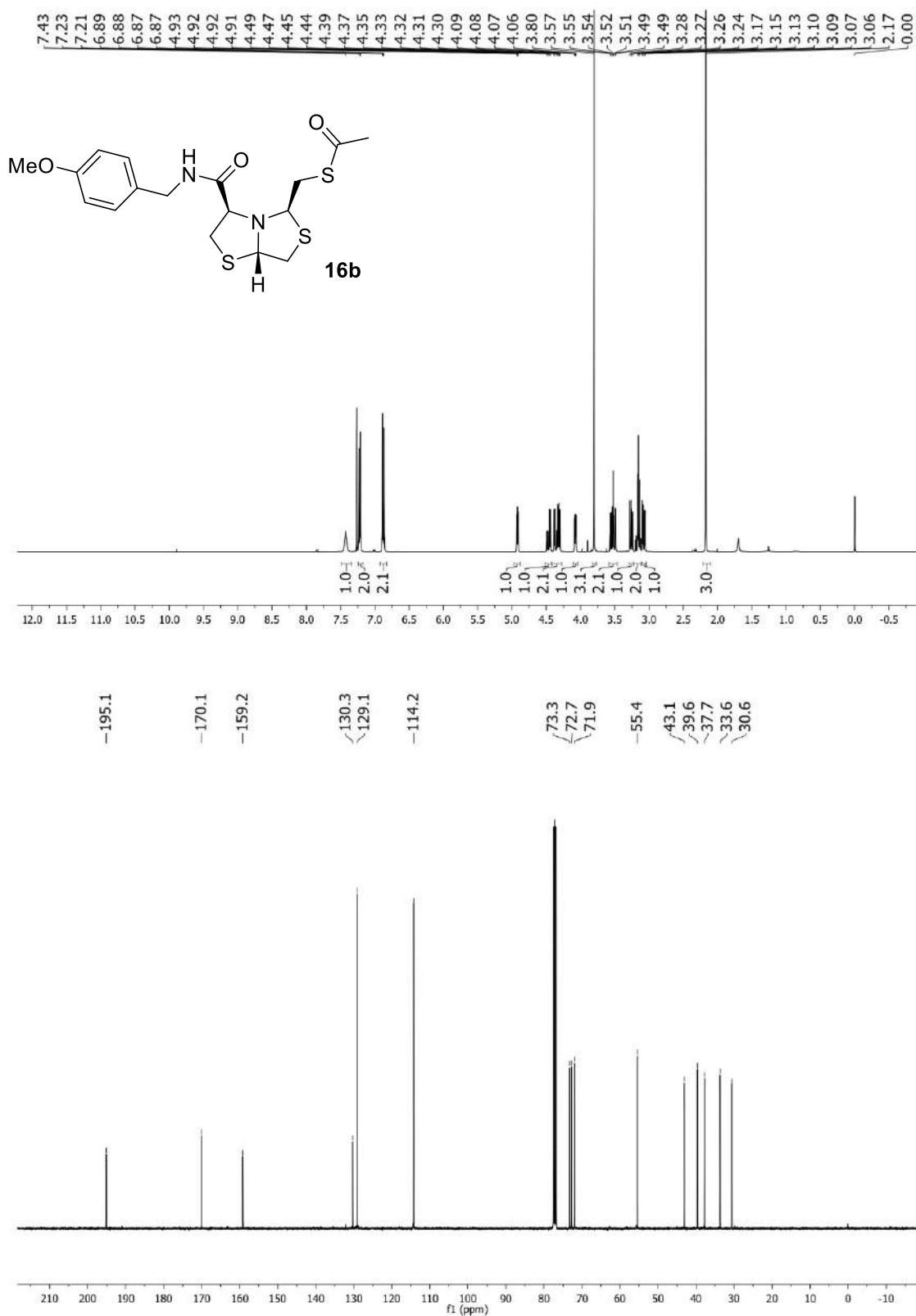
Compuesto **15f**:

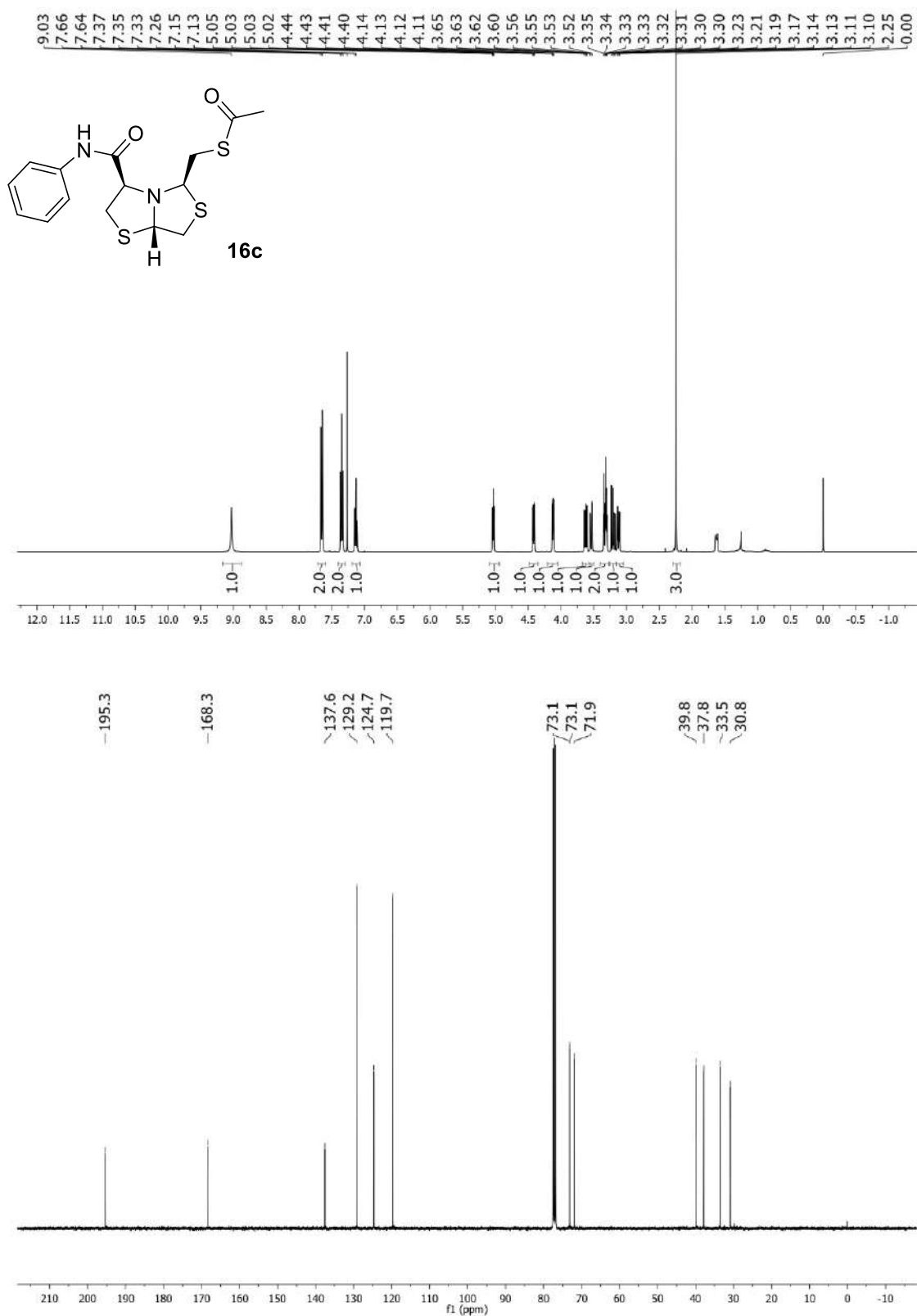
Compuesto **15g**:



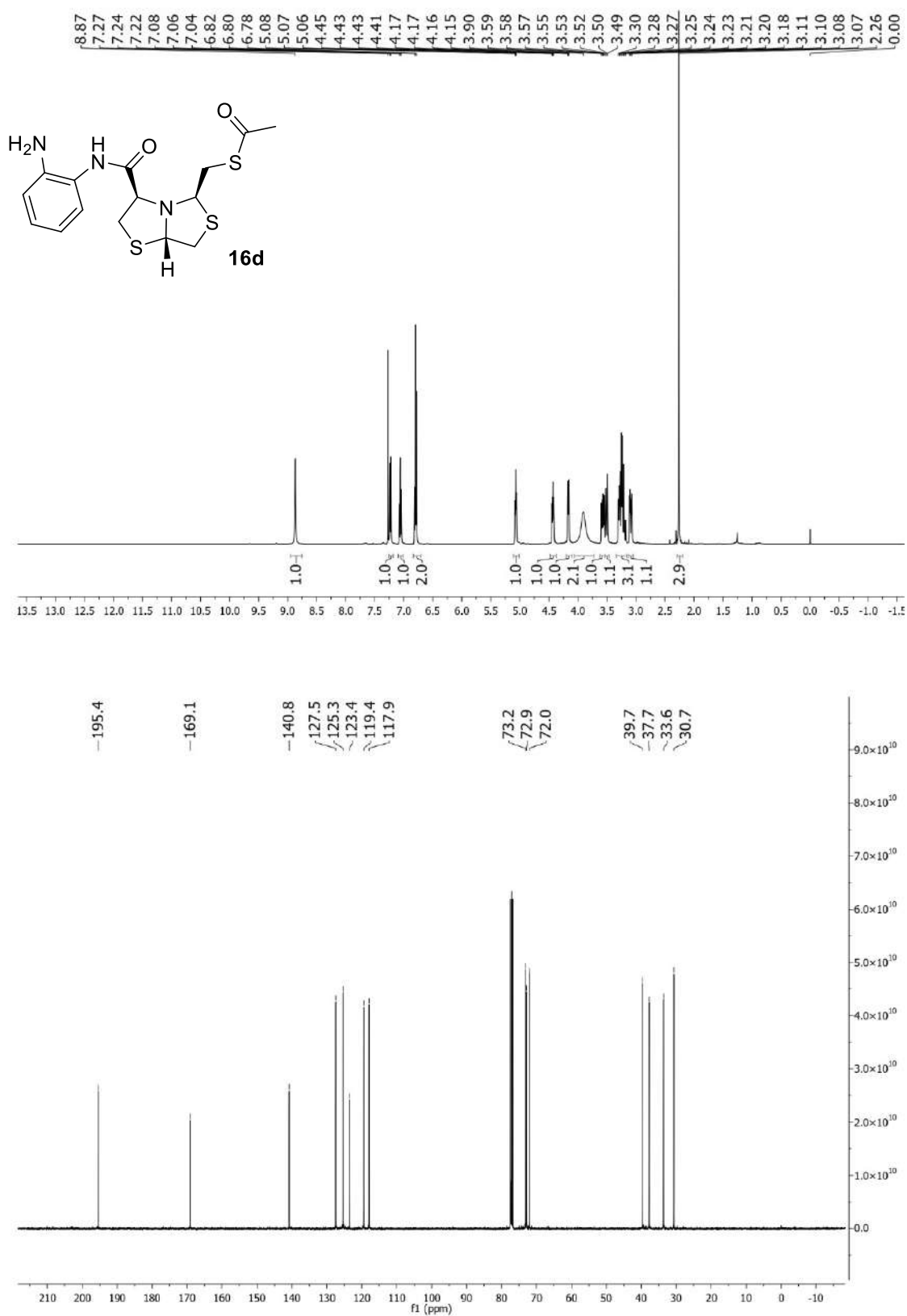
Compuesto **16a**:

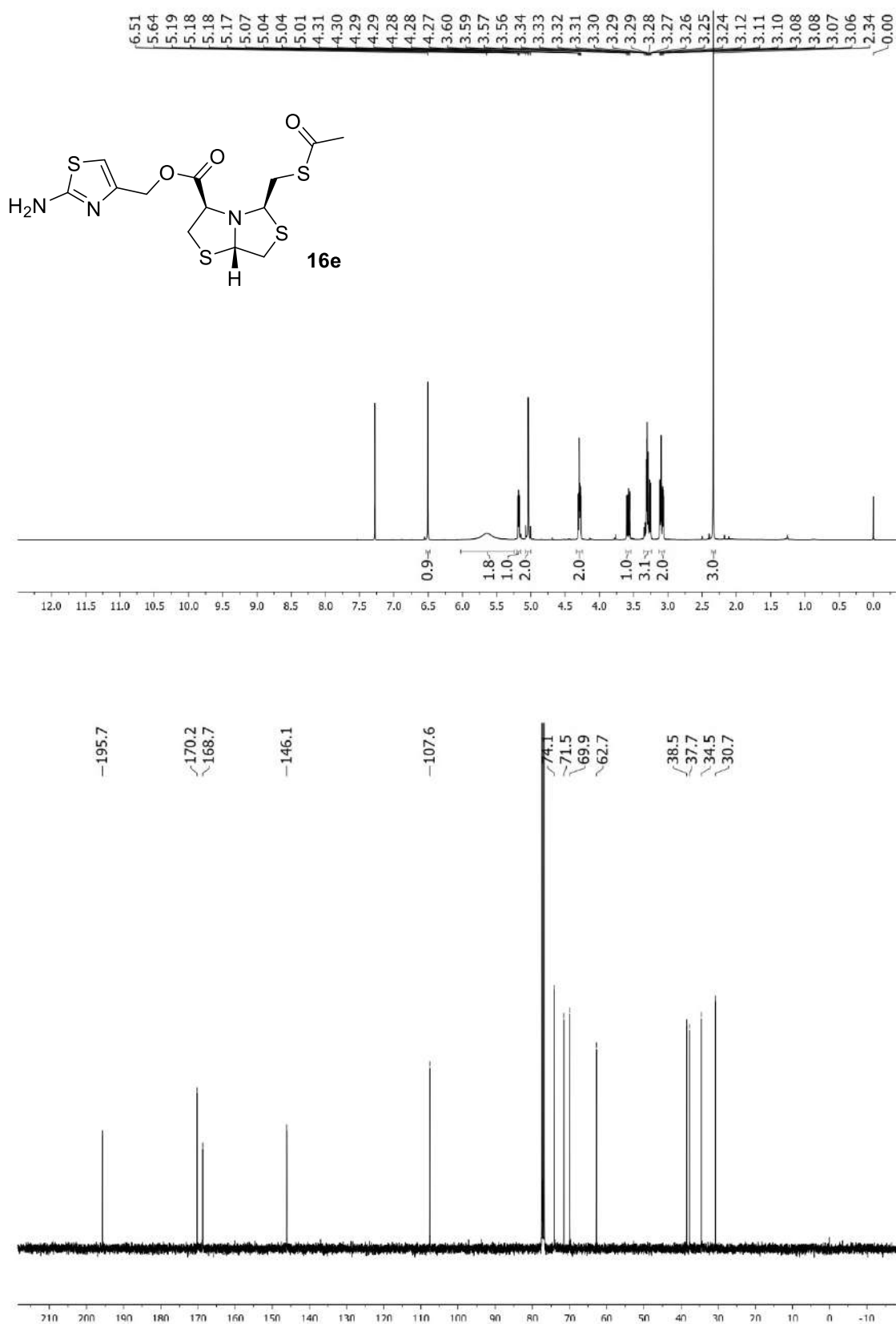
Compuesto **16b**:



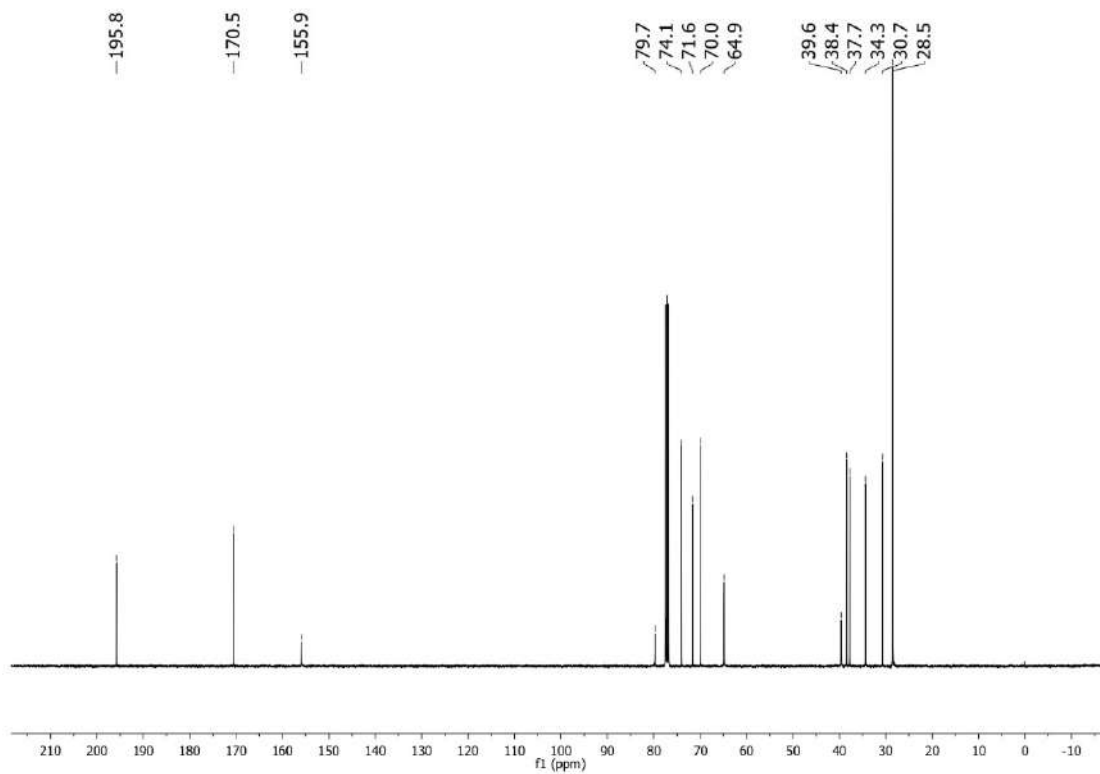
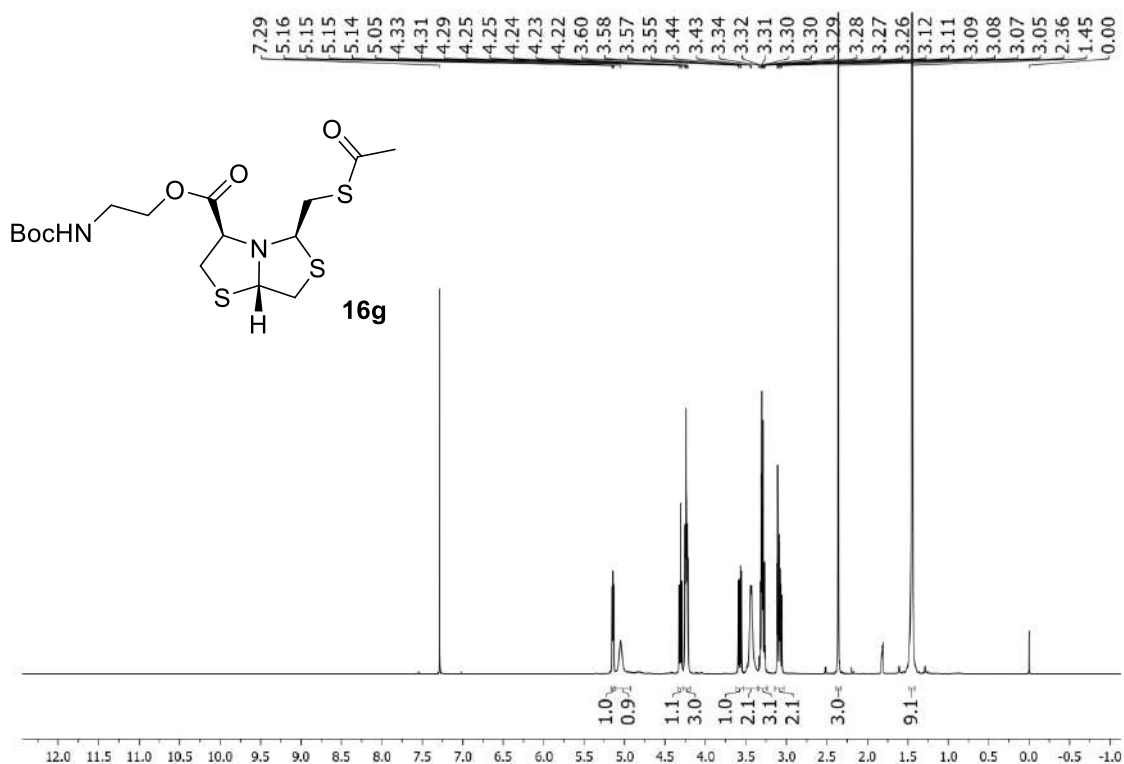
Compuesto **16c**:

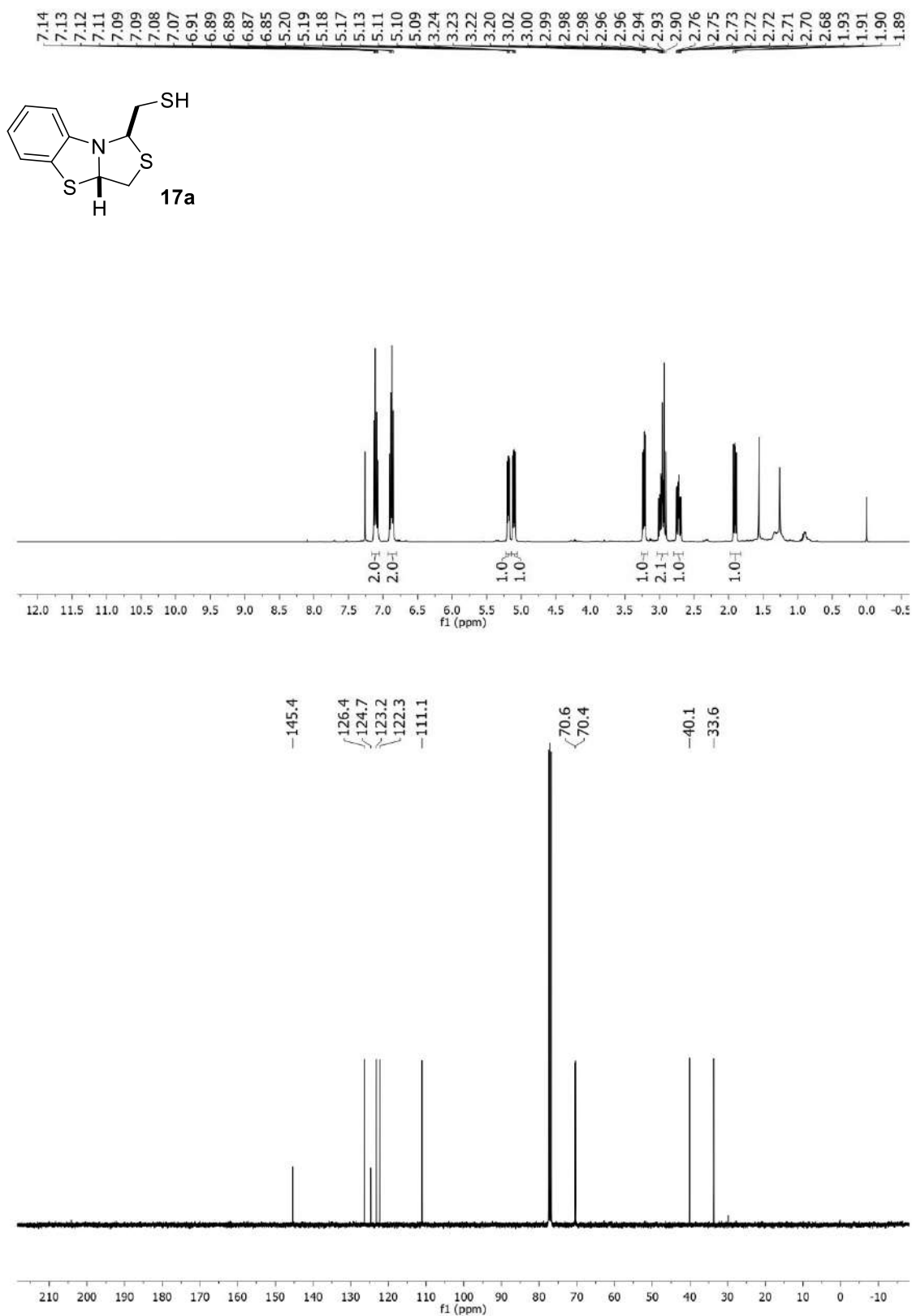
Compuesto **16d**:



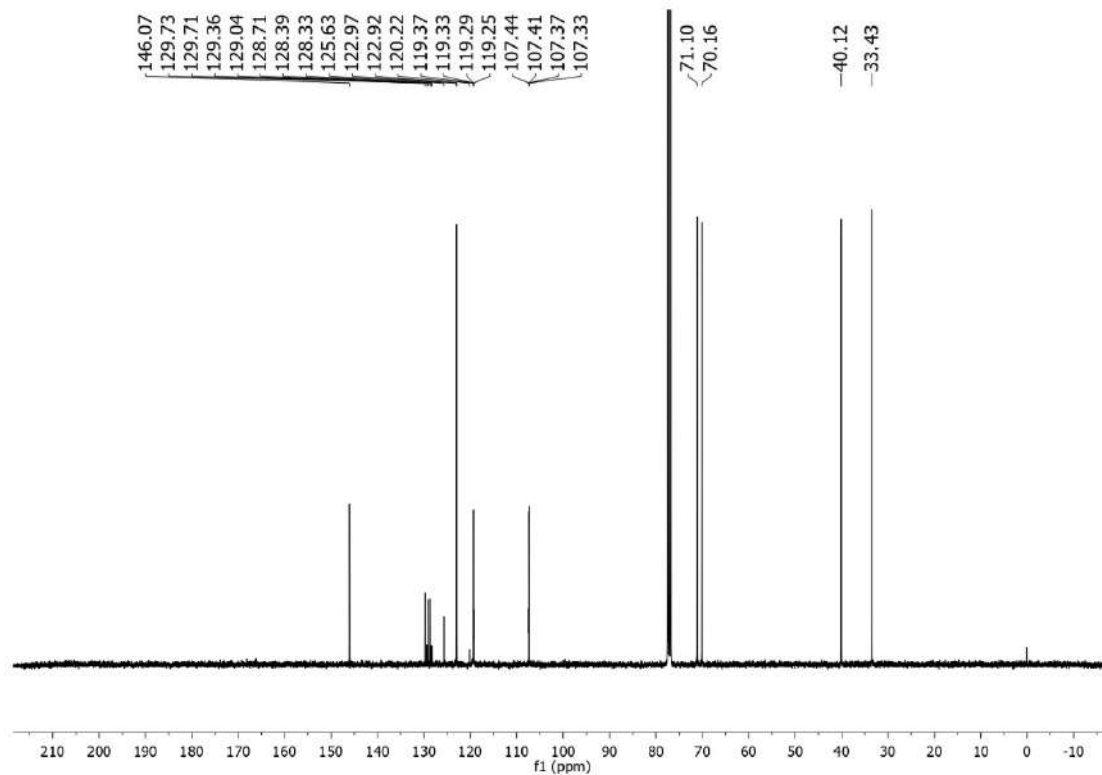
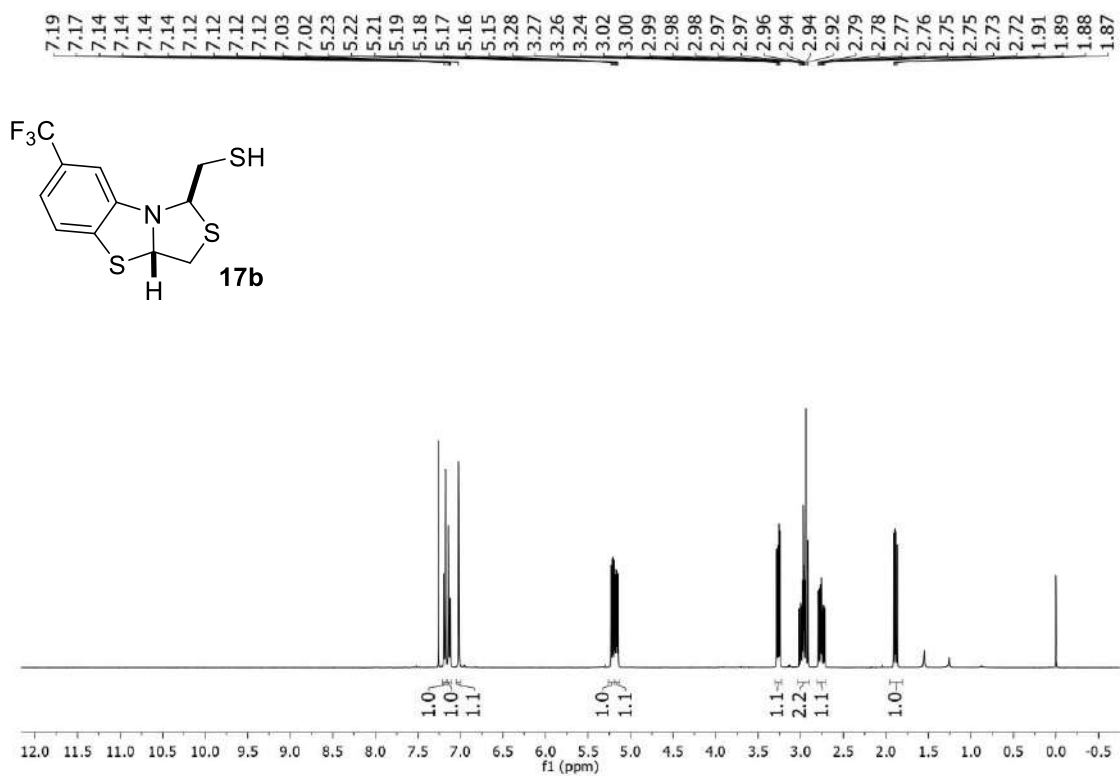
Compuesto **16e**:

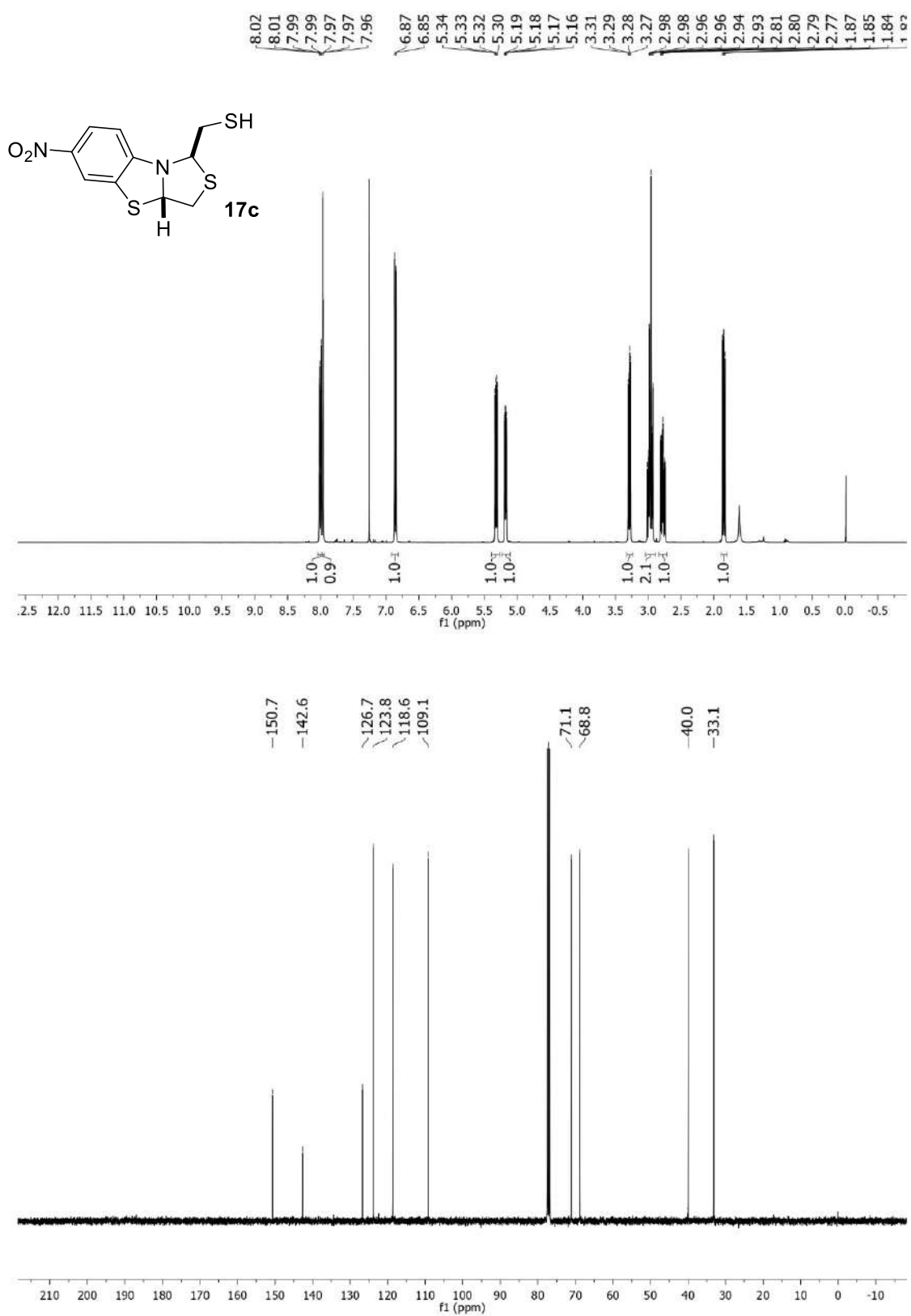
Compuesto **16g**:



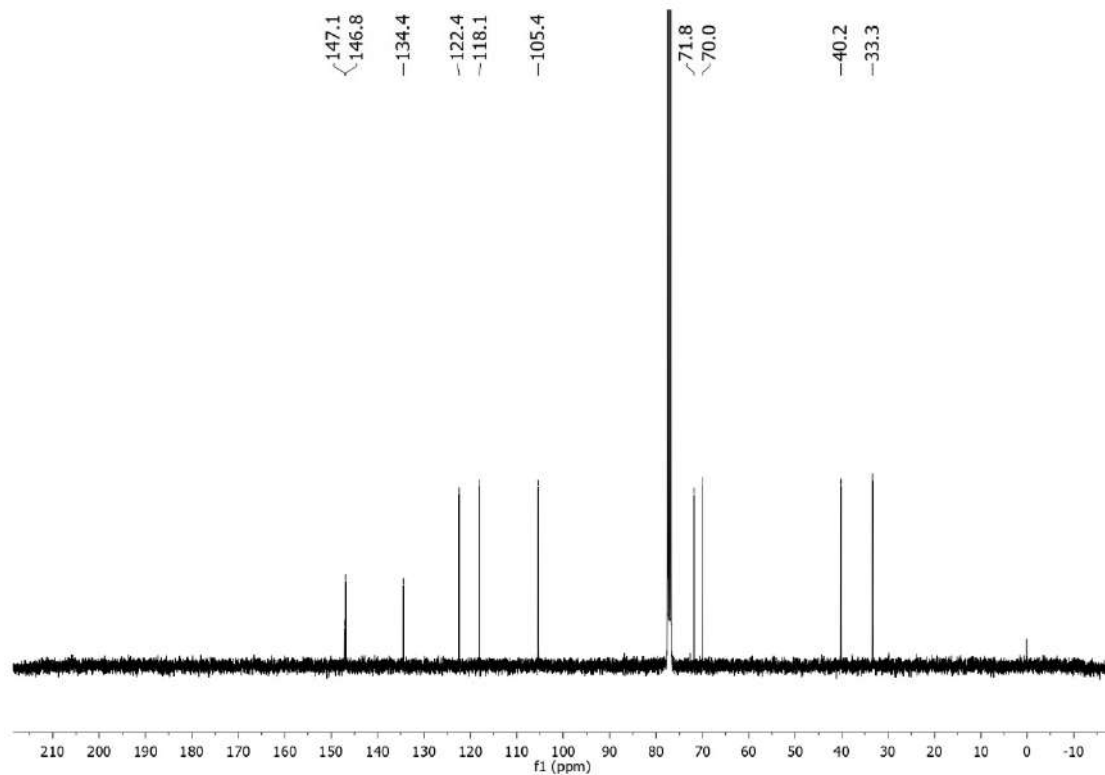
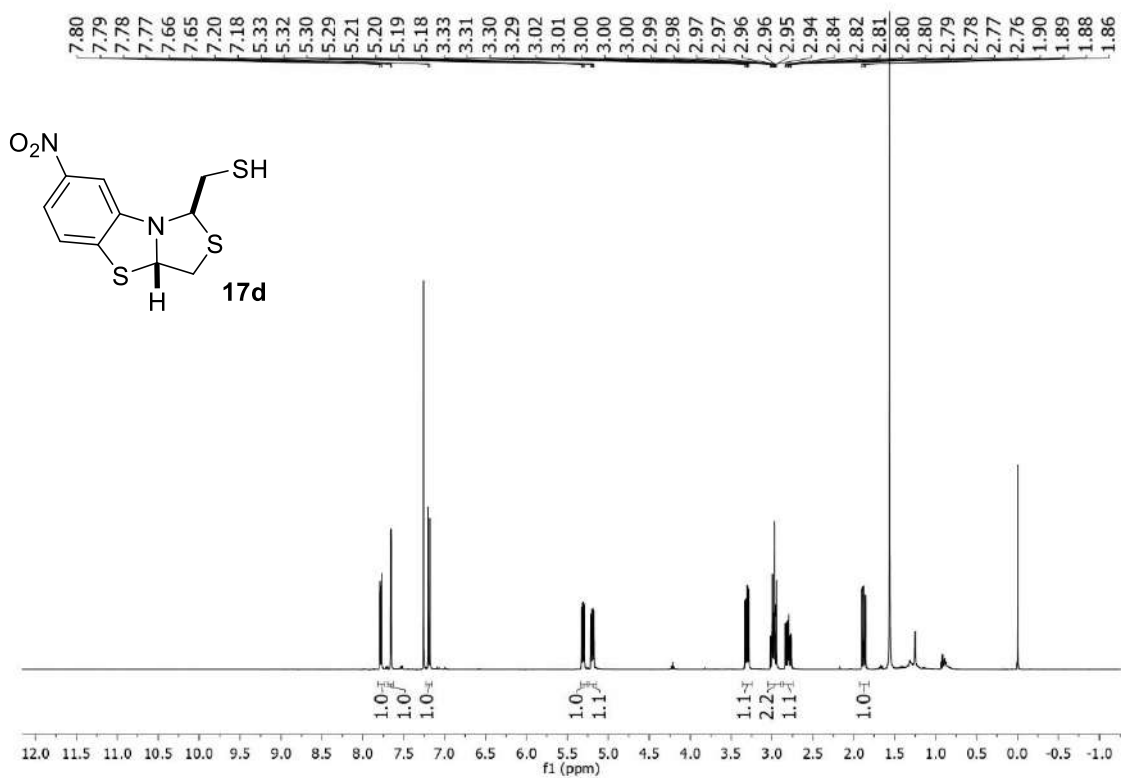
Compuesto **17a**:

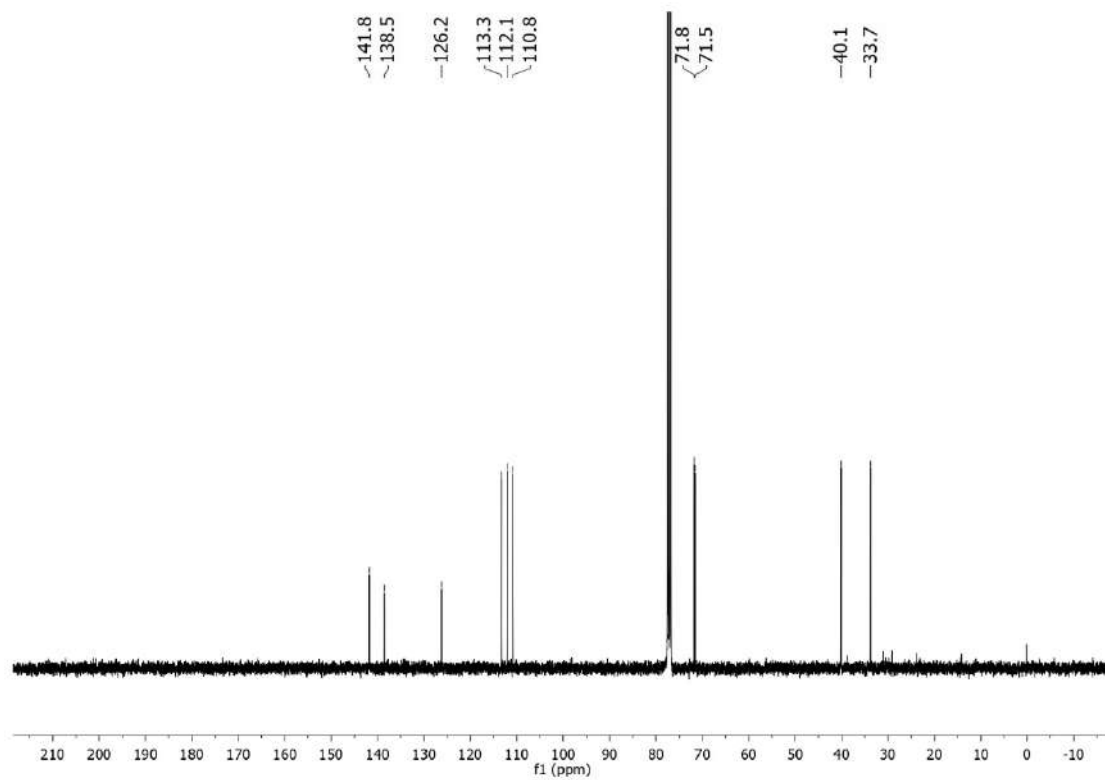
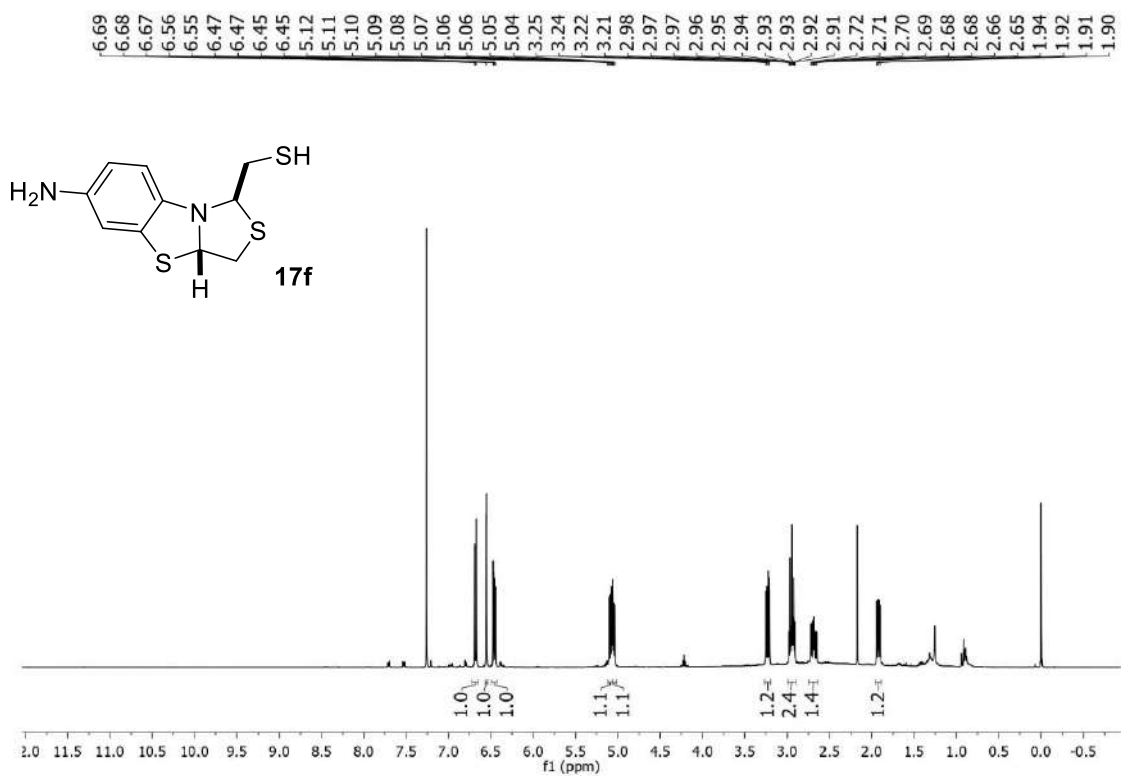
Compuesto **17b**:



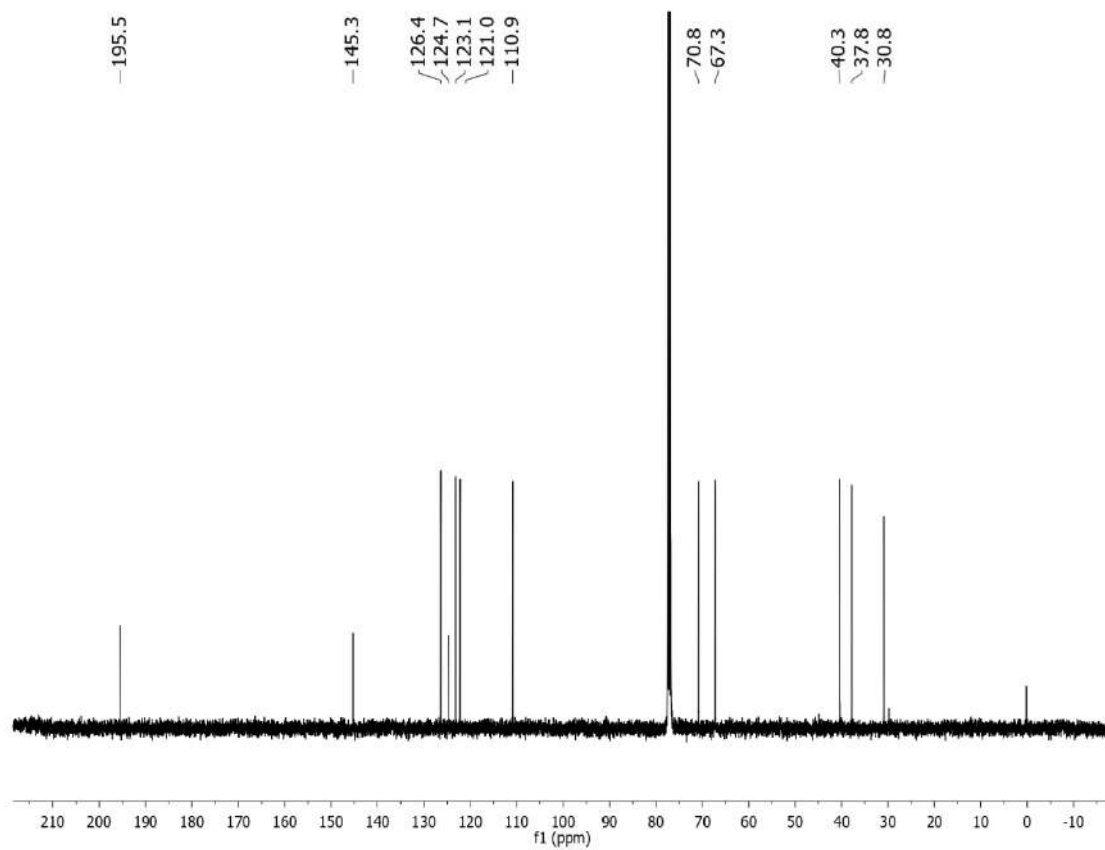
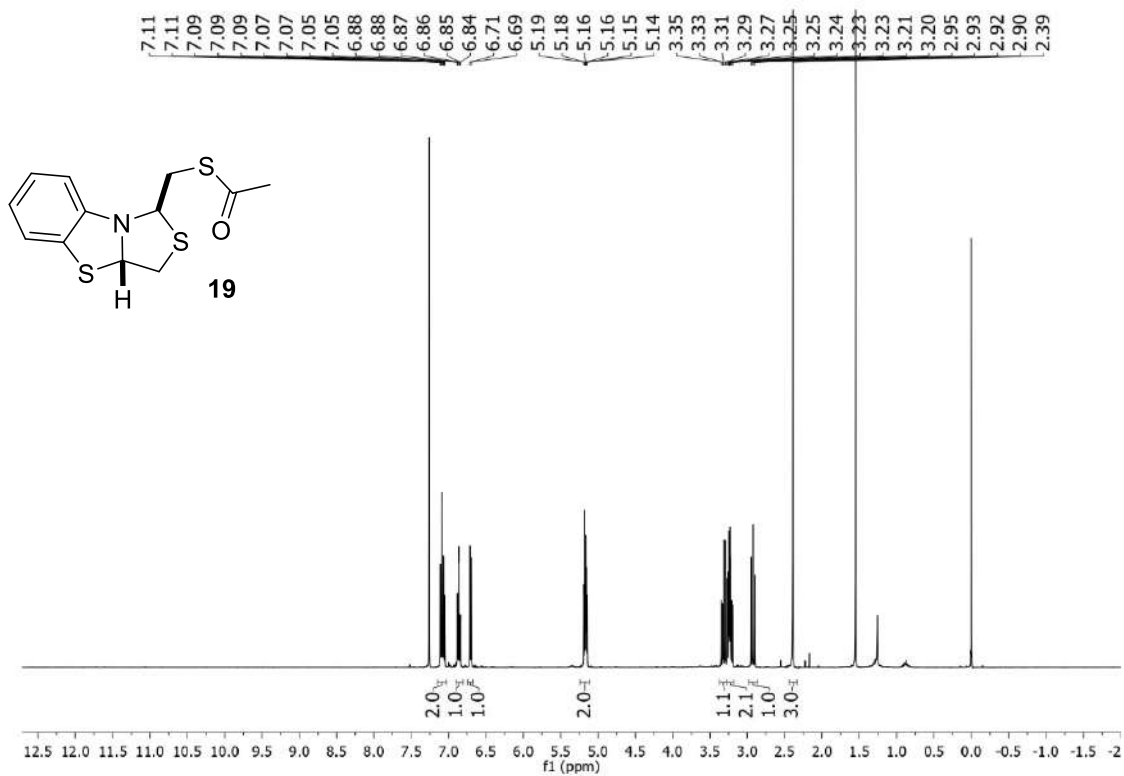
Compuesto **17c**:

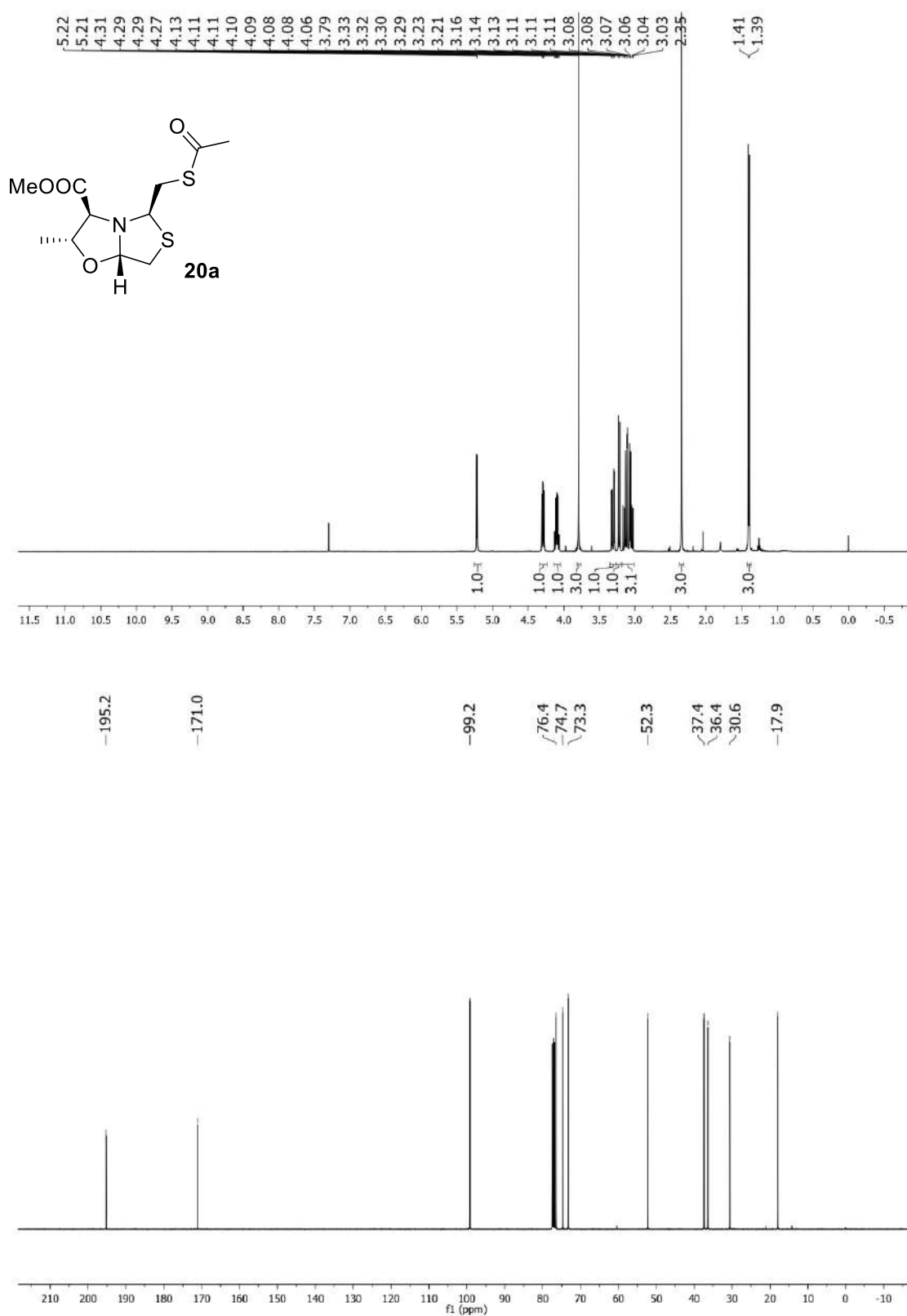
Compuesto **17d**:



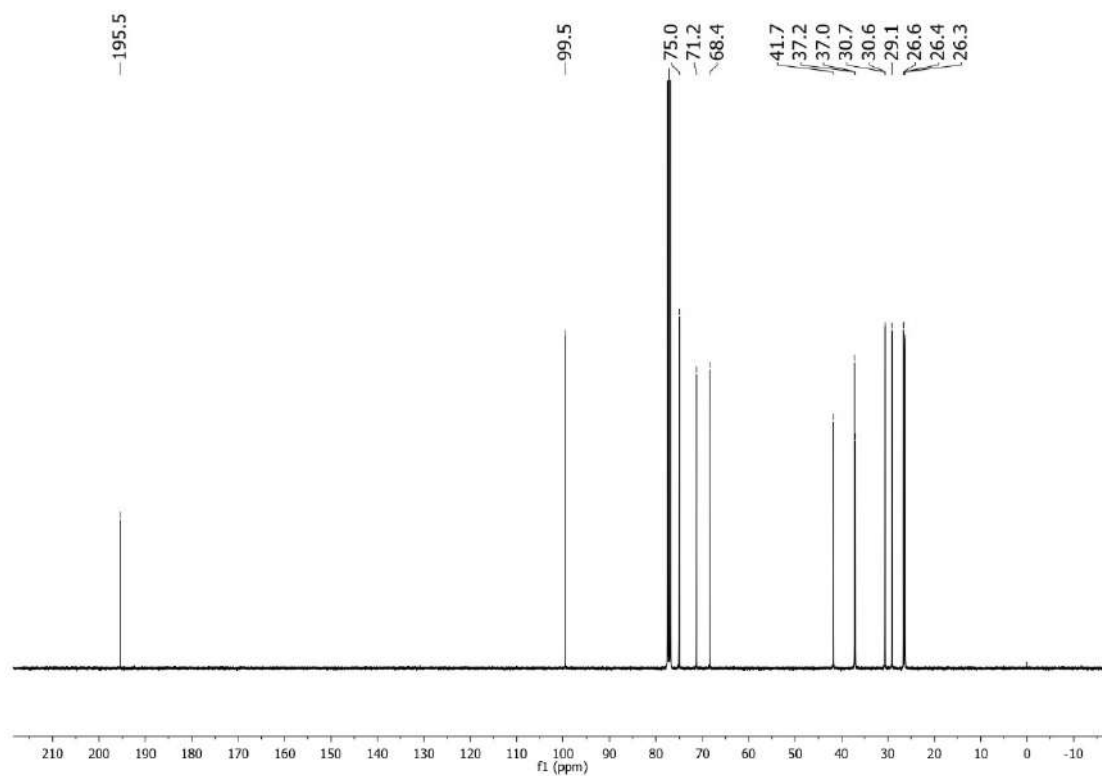
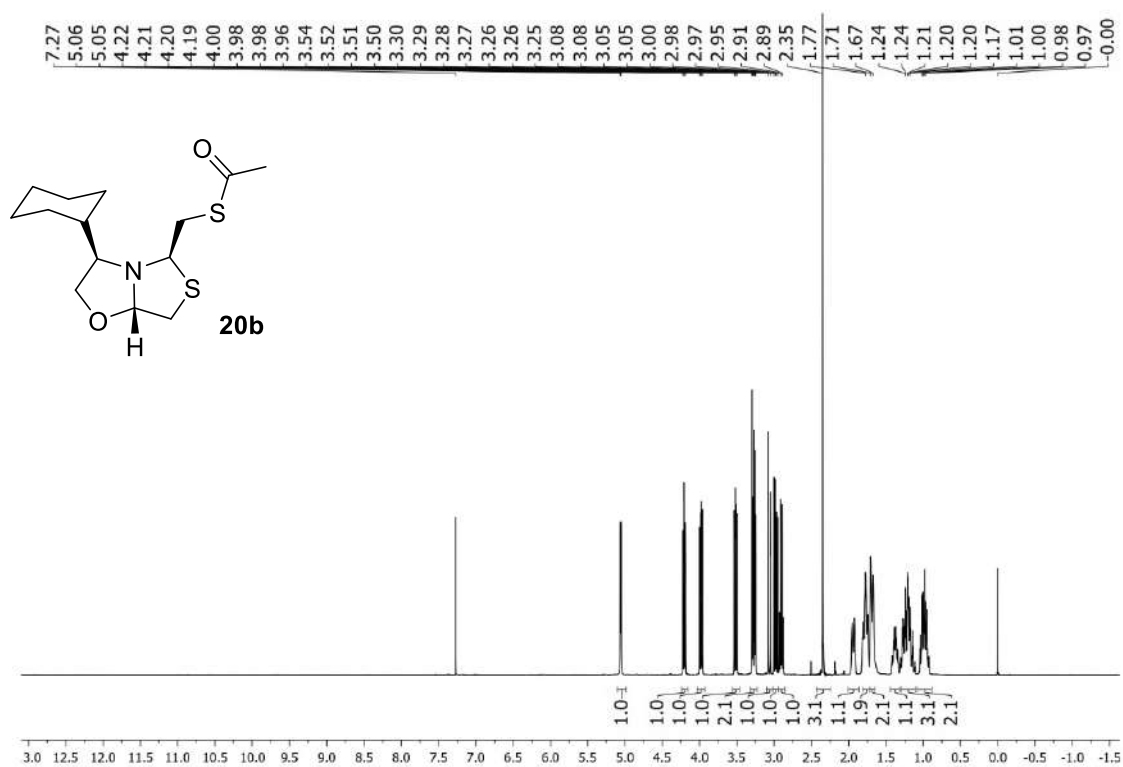
Compuesto **17f**:

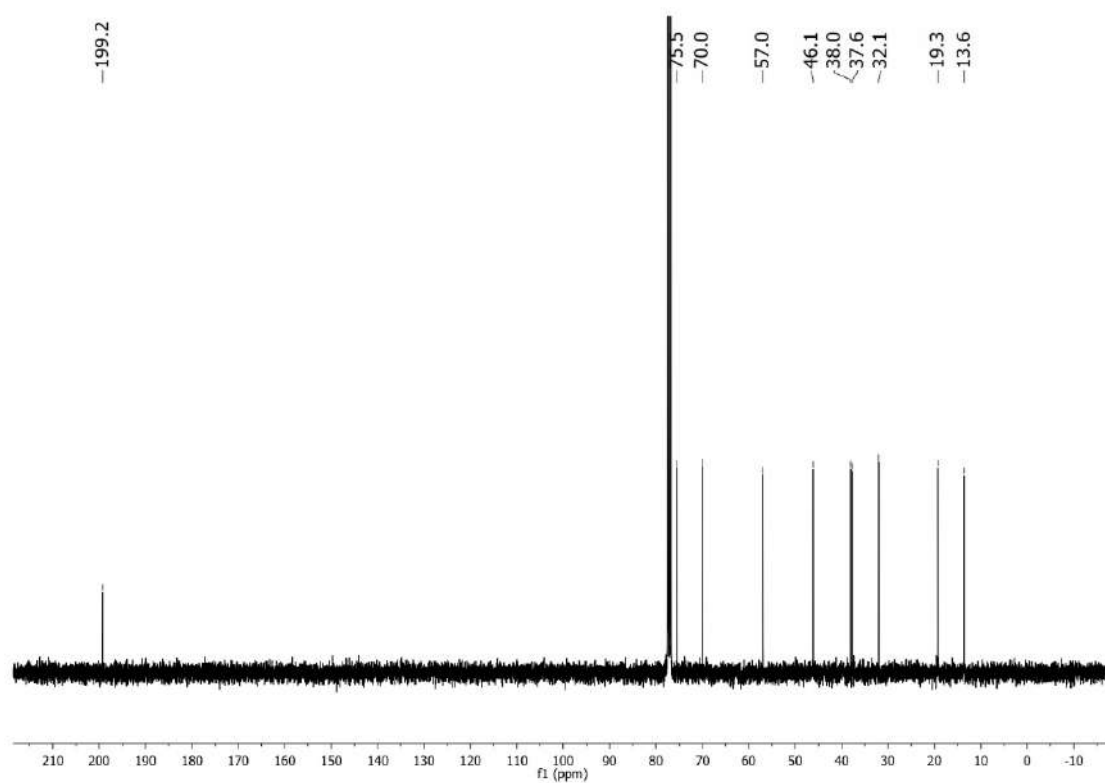
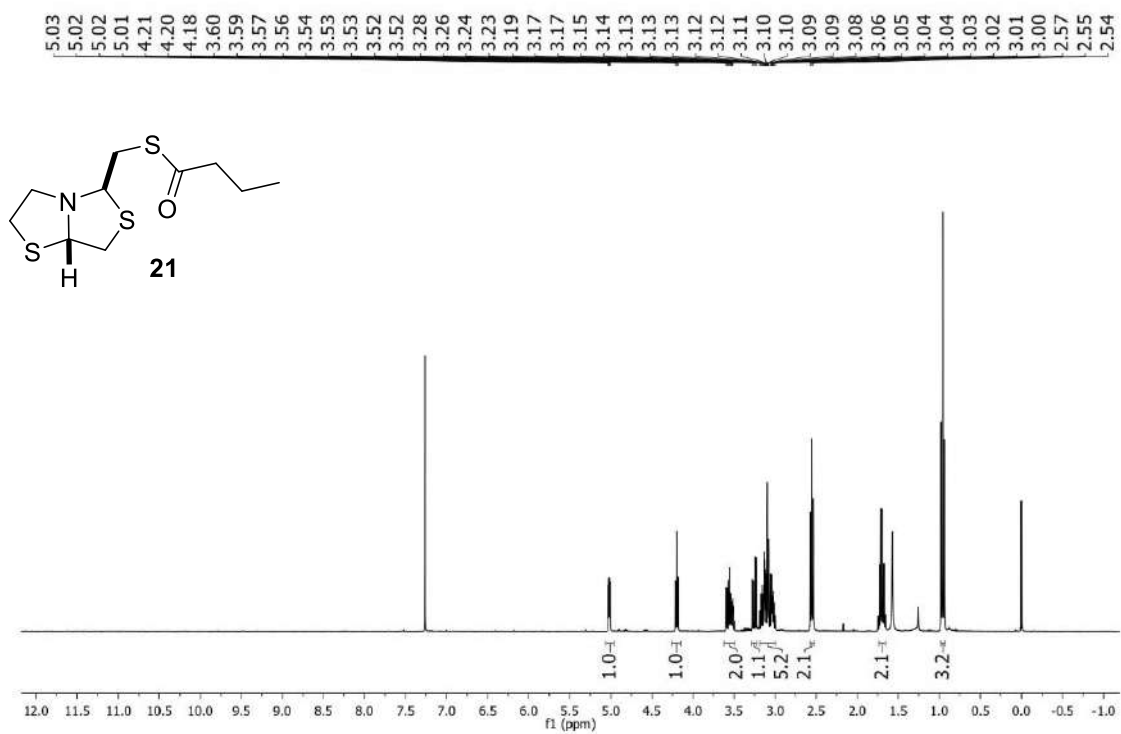
Compuesto **19**:



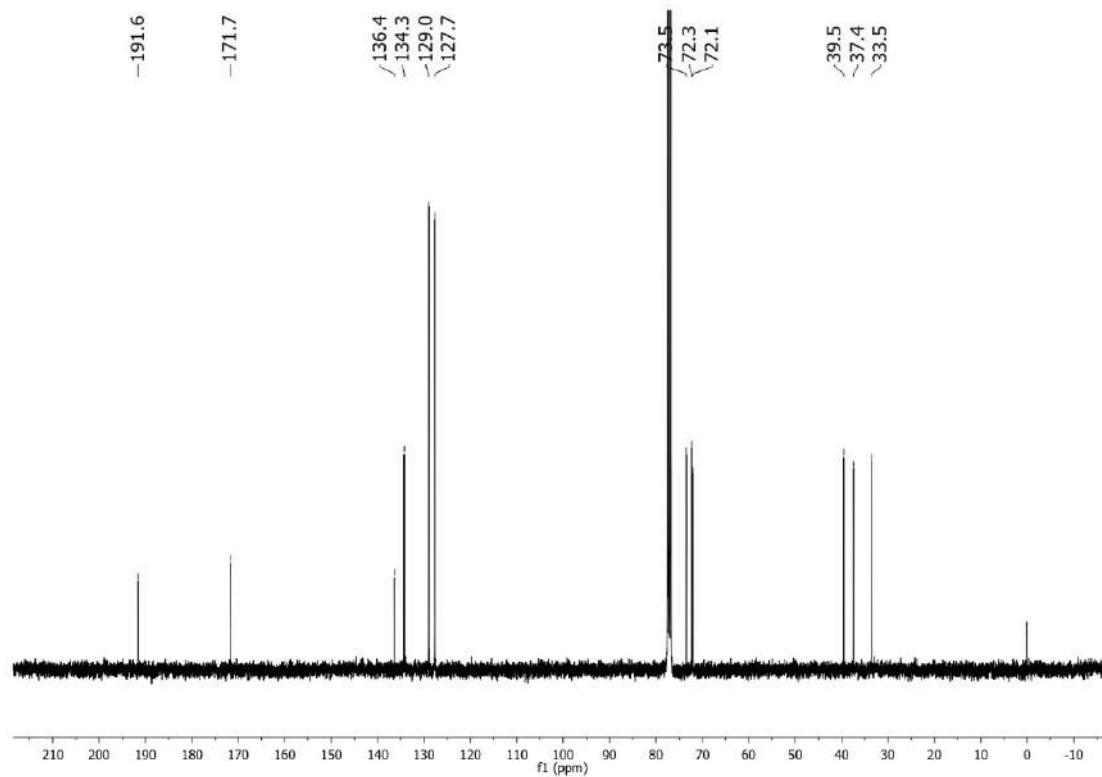
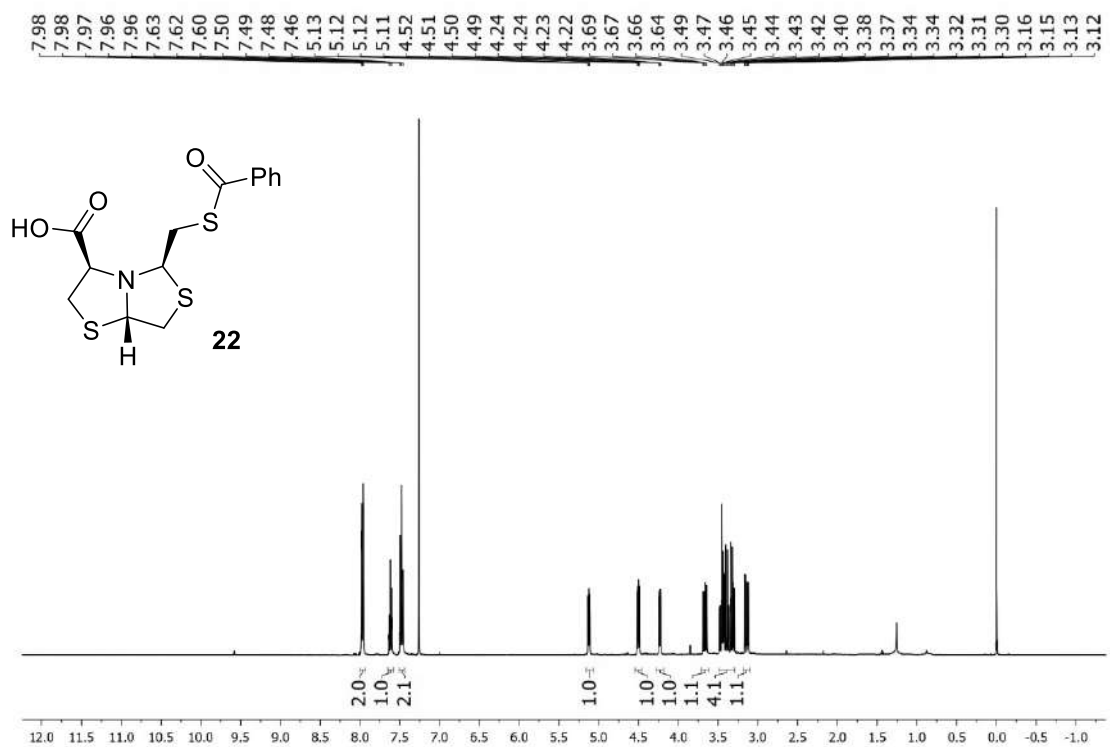
Compuesto **20a**:

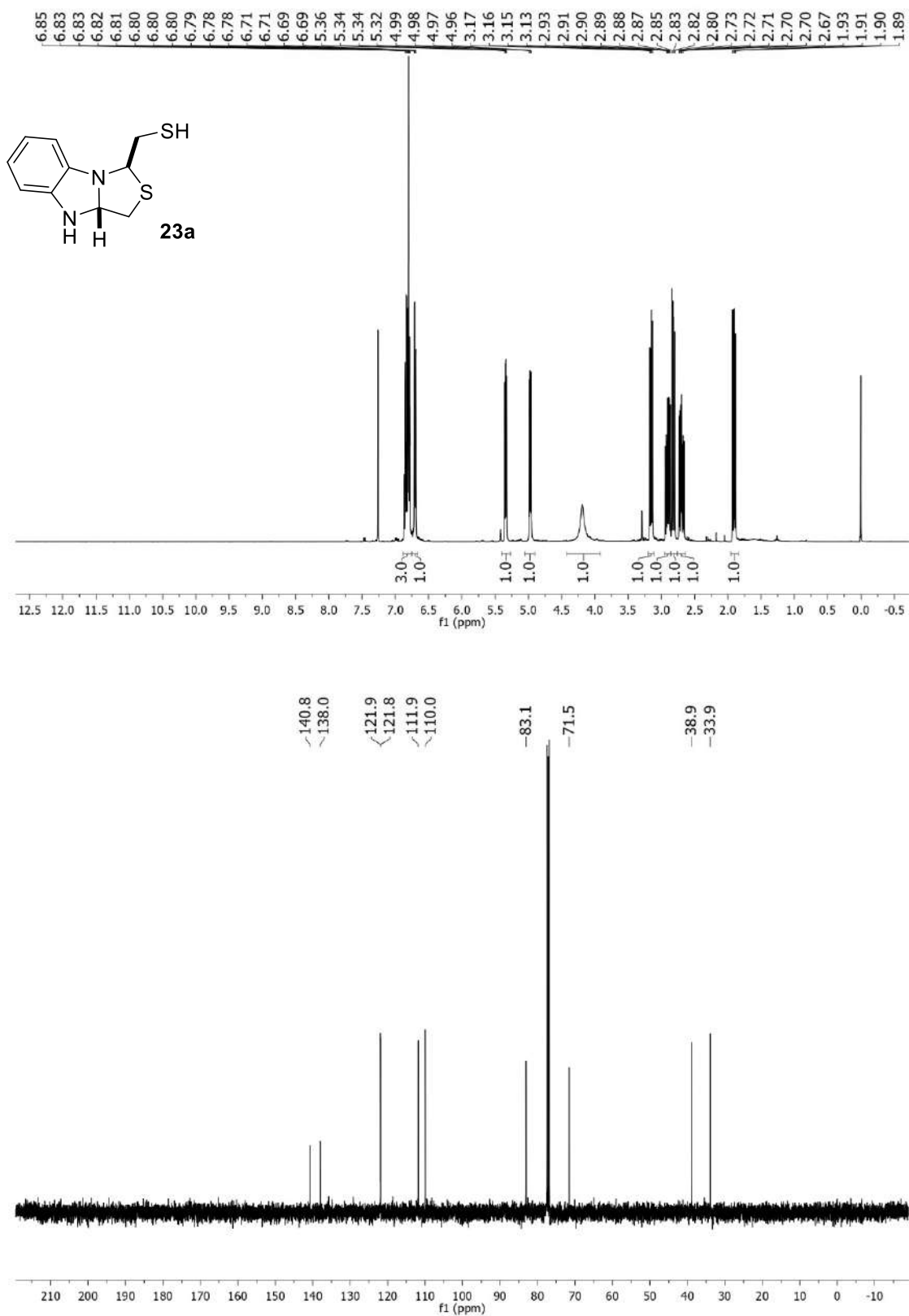
Compuesto **20b**:



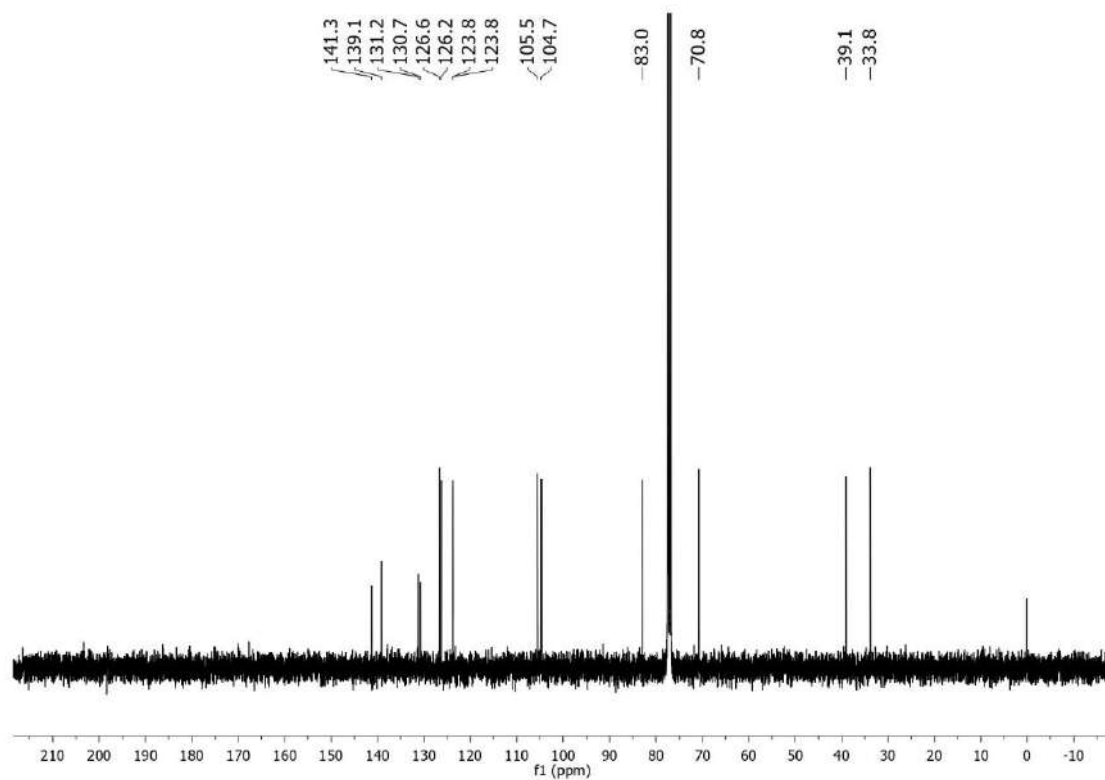
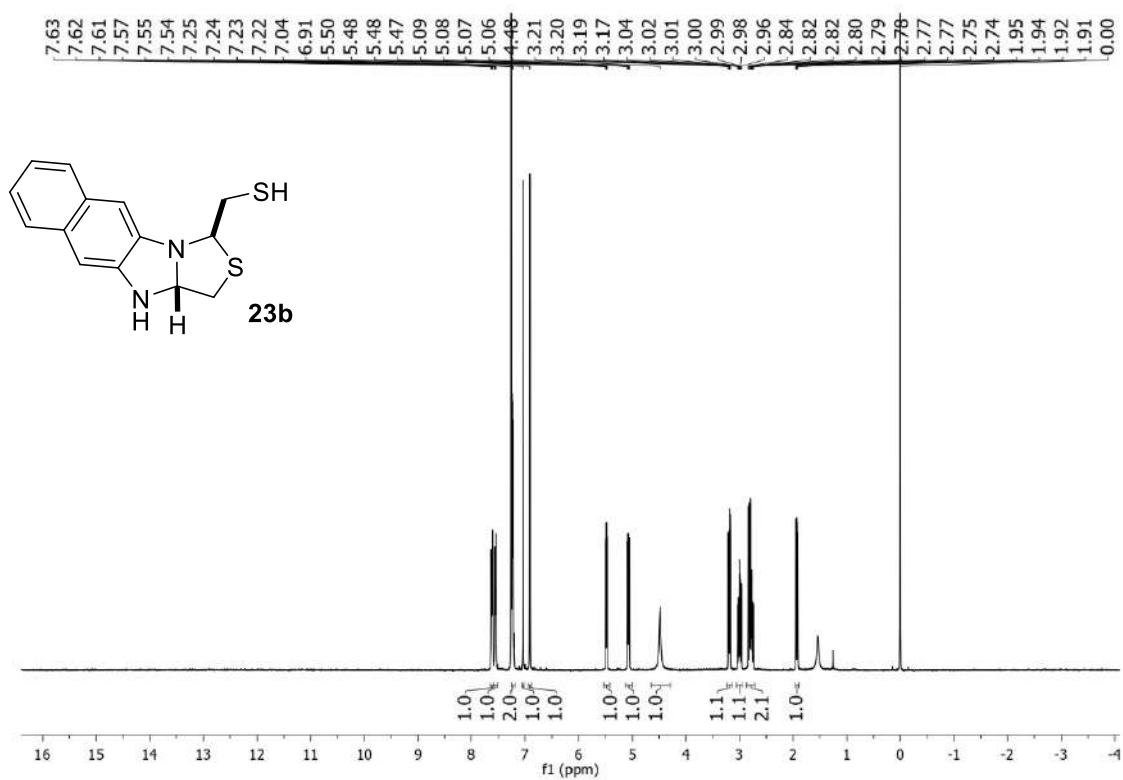
Compuesto **21**:

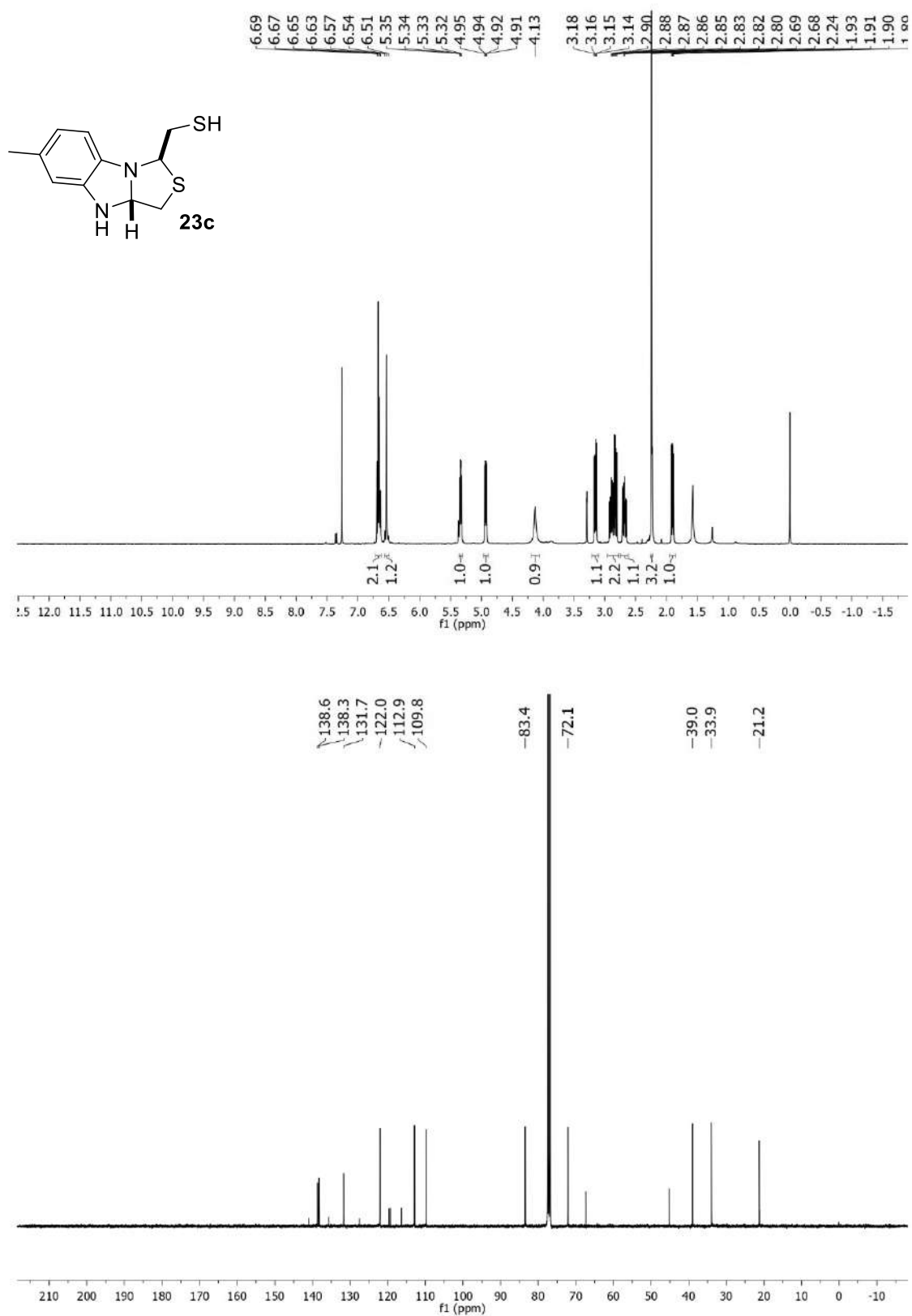
Compuesto **22**:



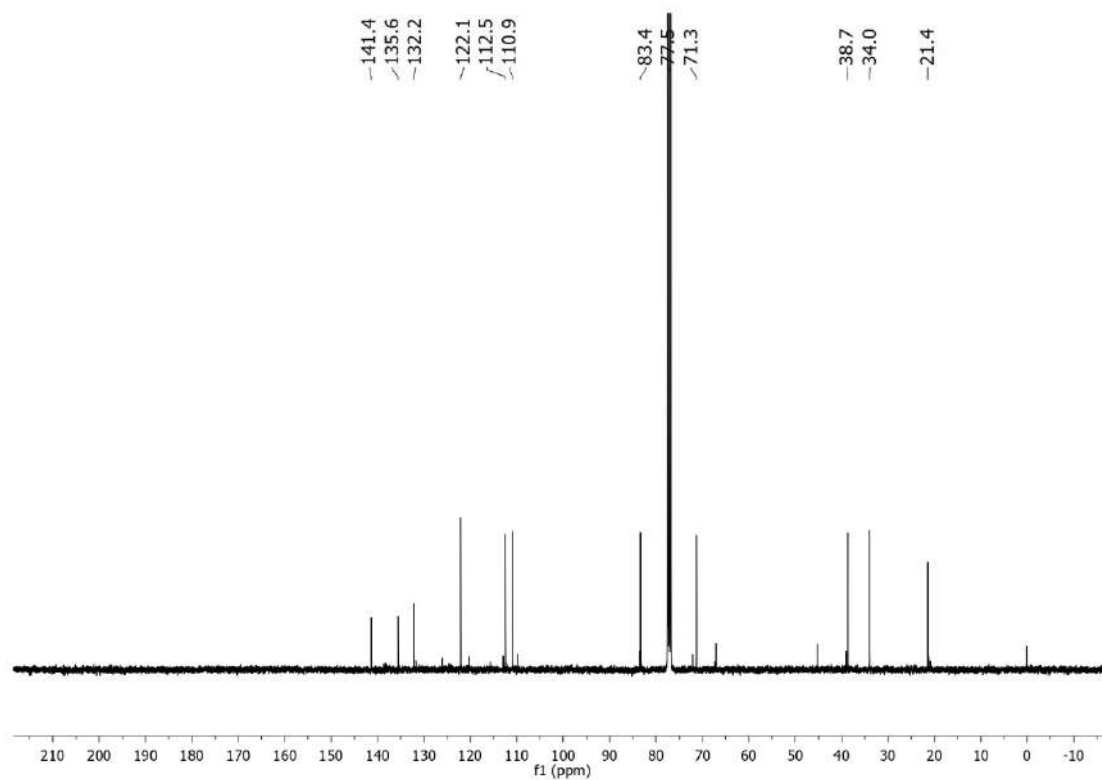
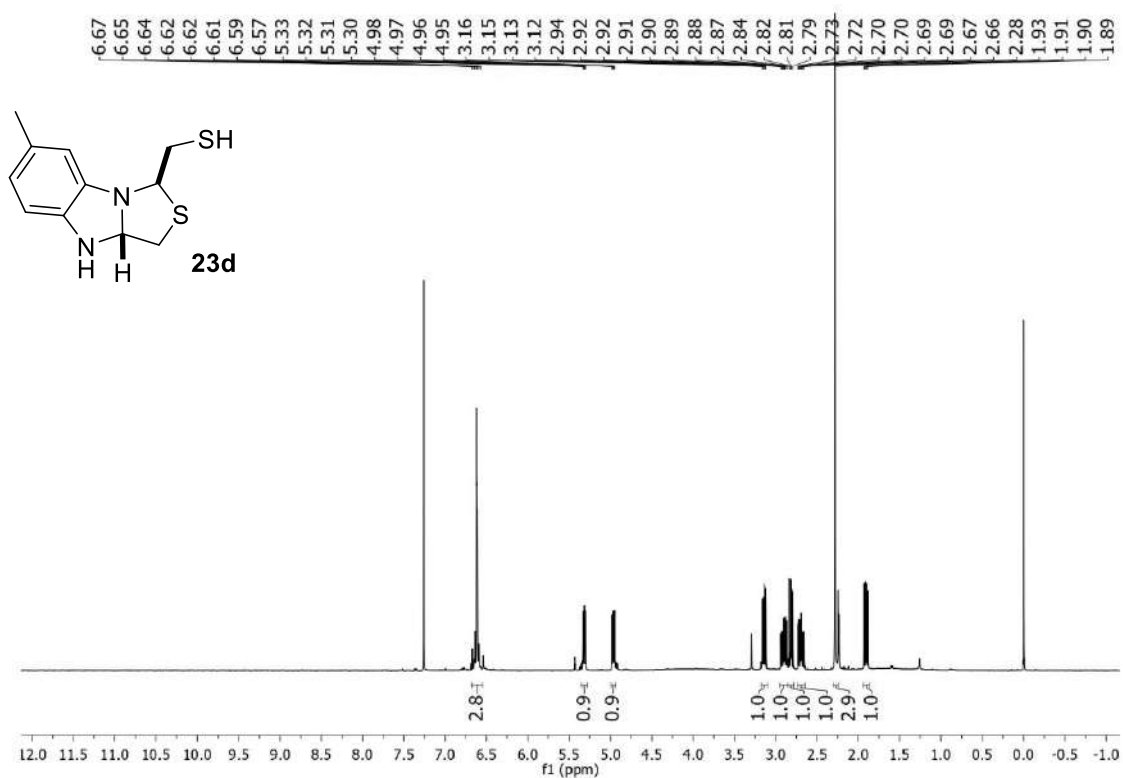
Compuesto **23a**:

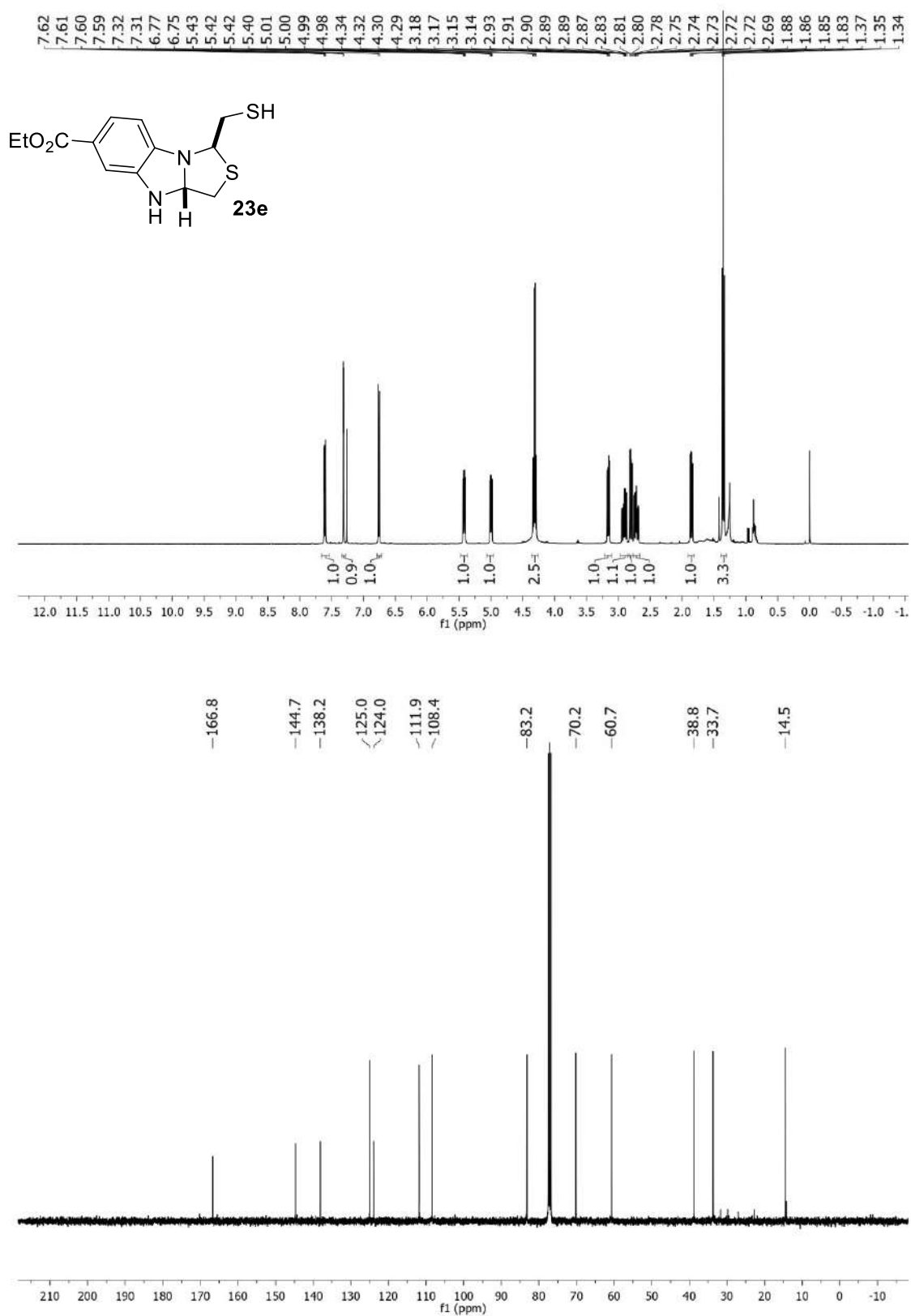
Compuesto **23b**:



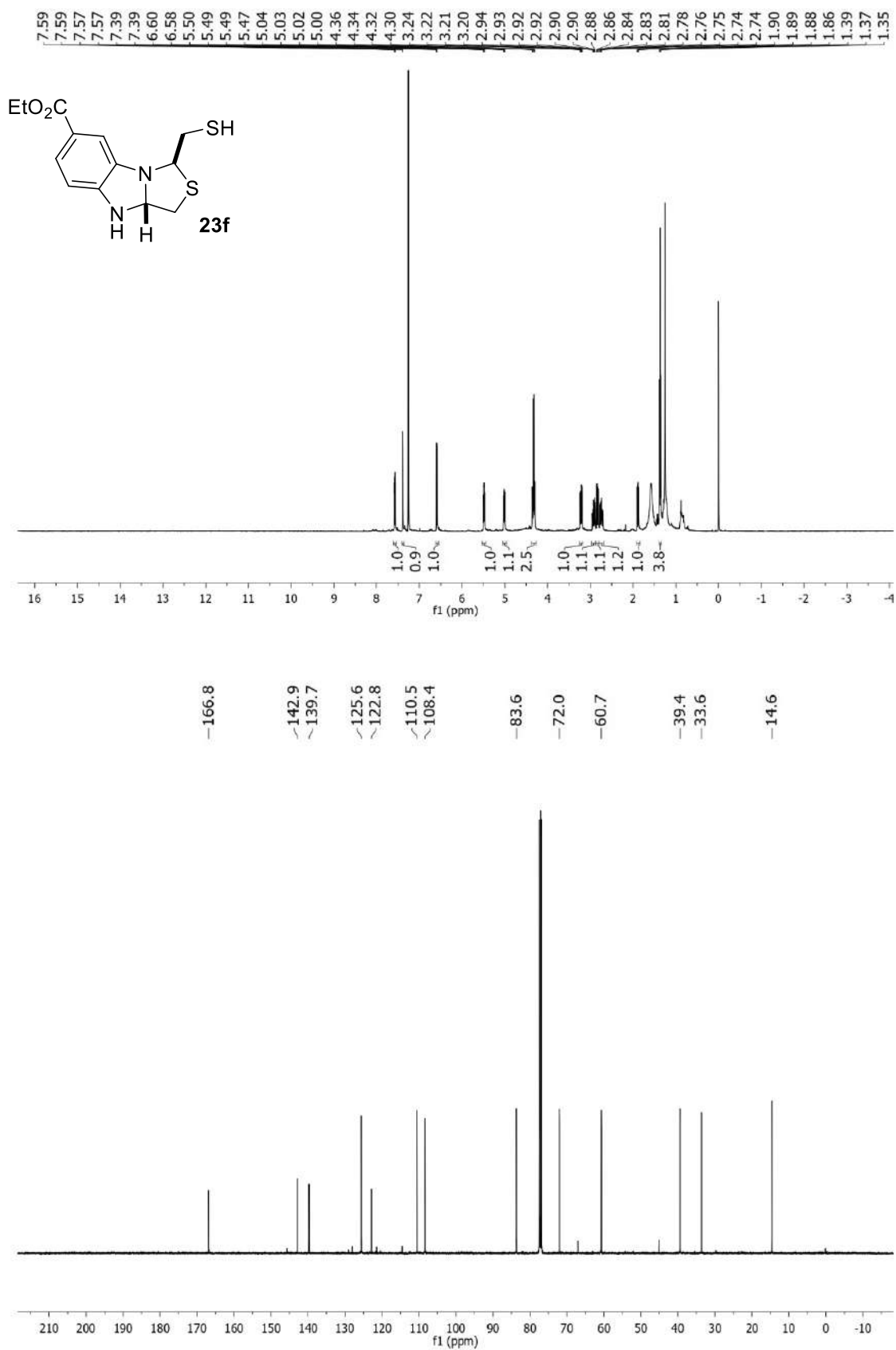
Compuesto **23c**:

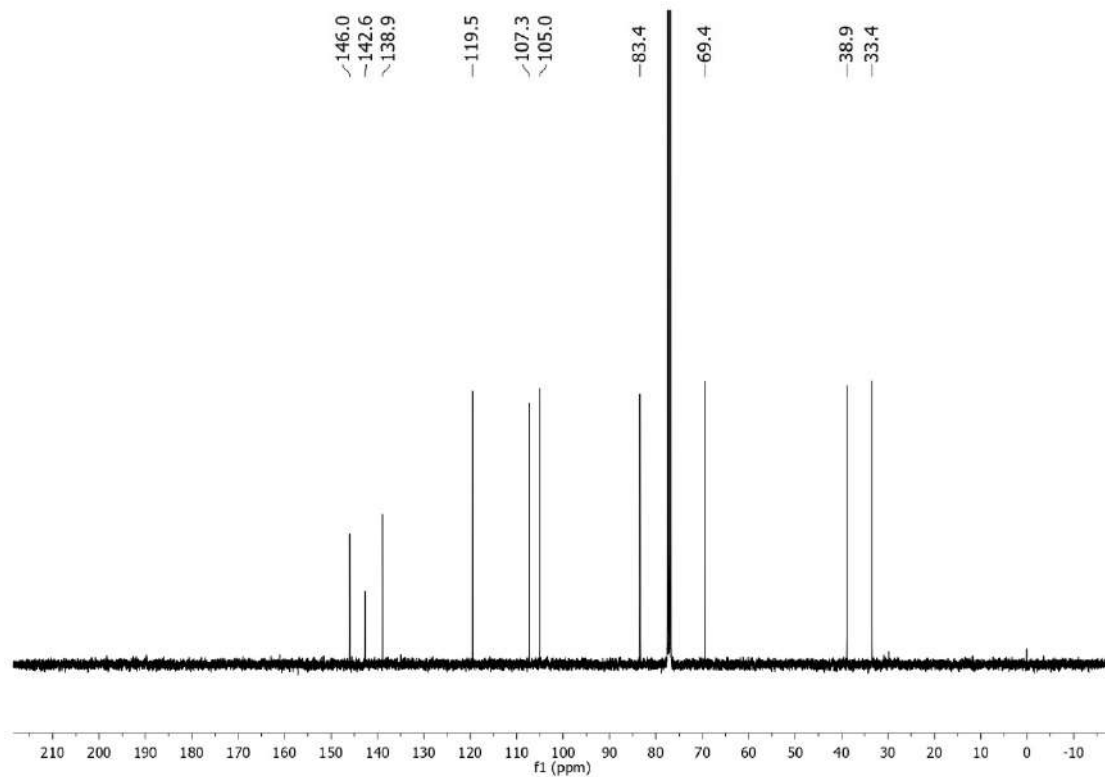
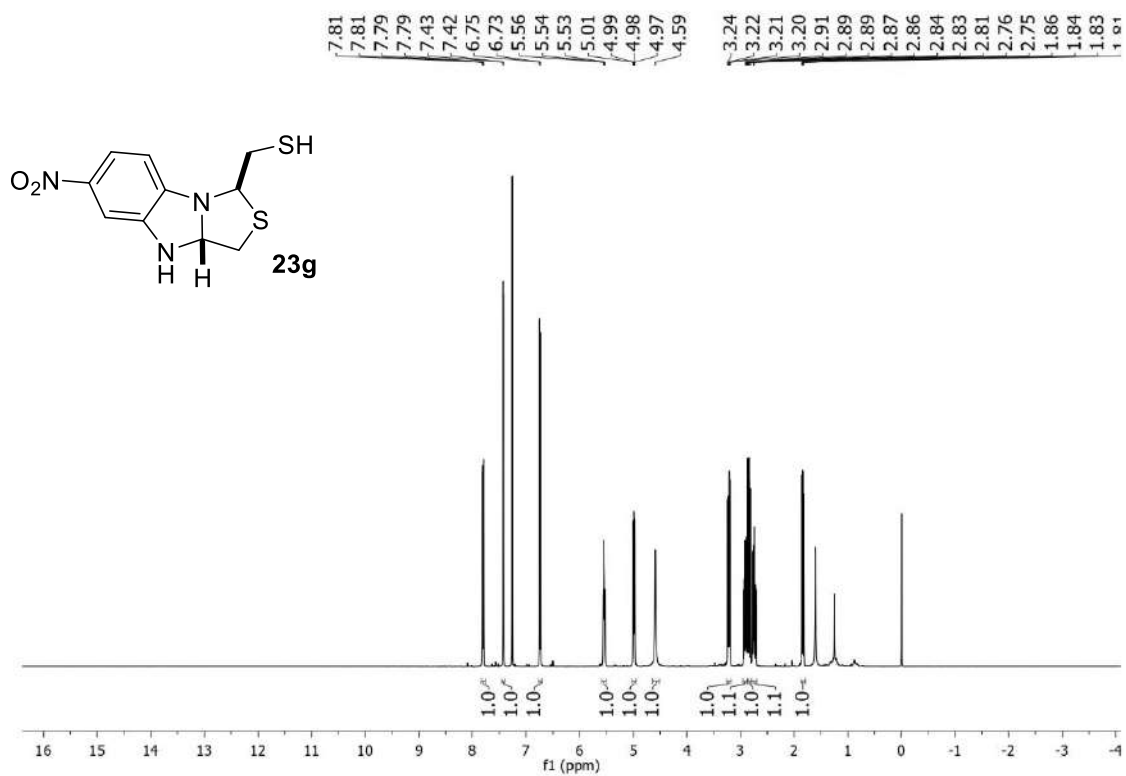
Compuesto **23d**:



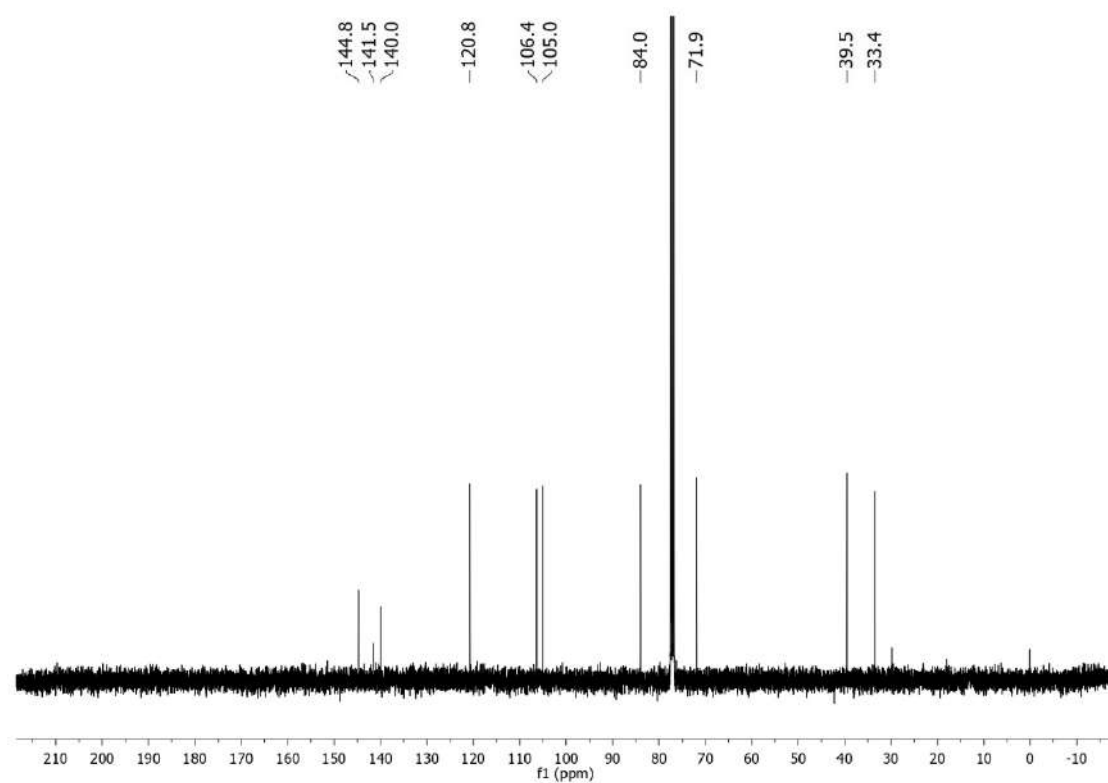
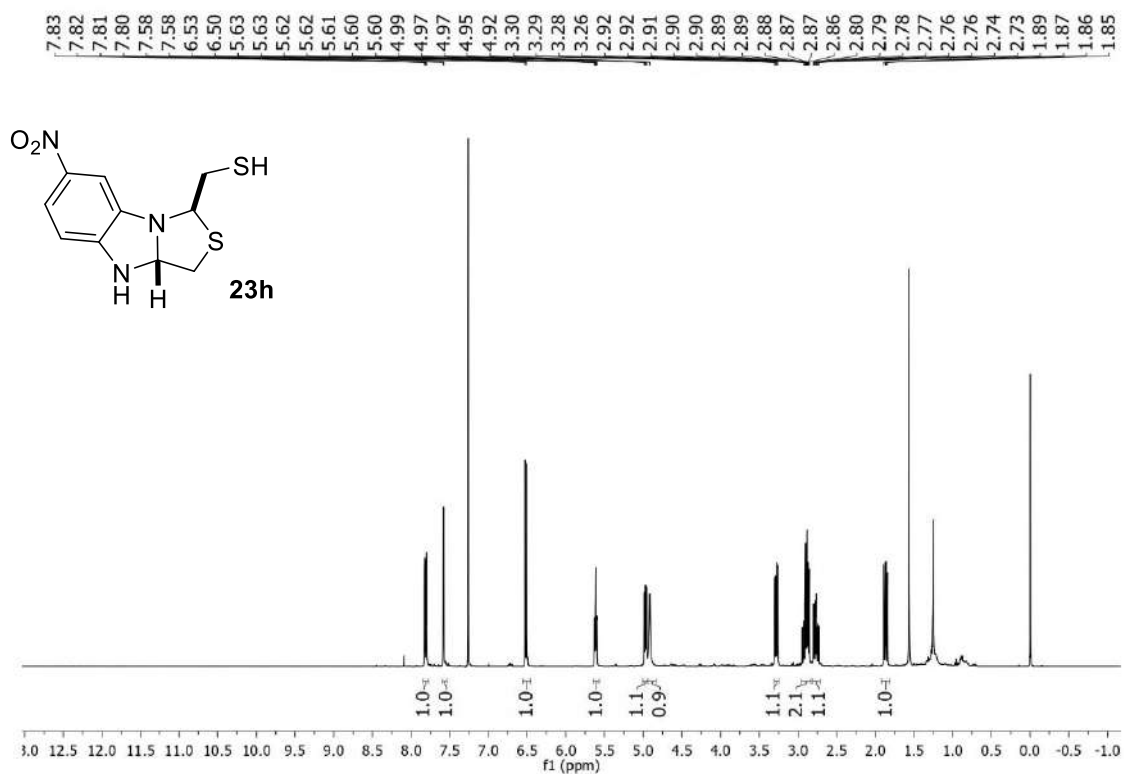
Compuesto **23e**:

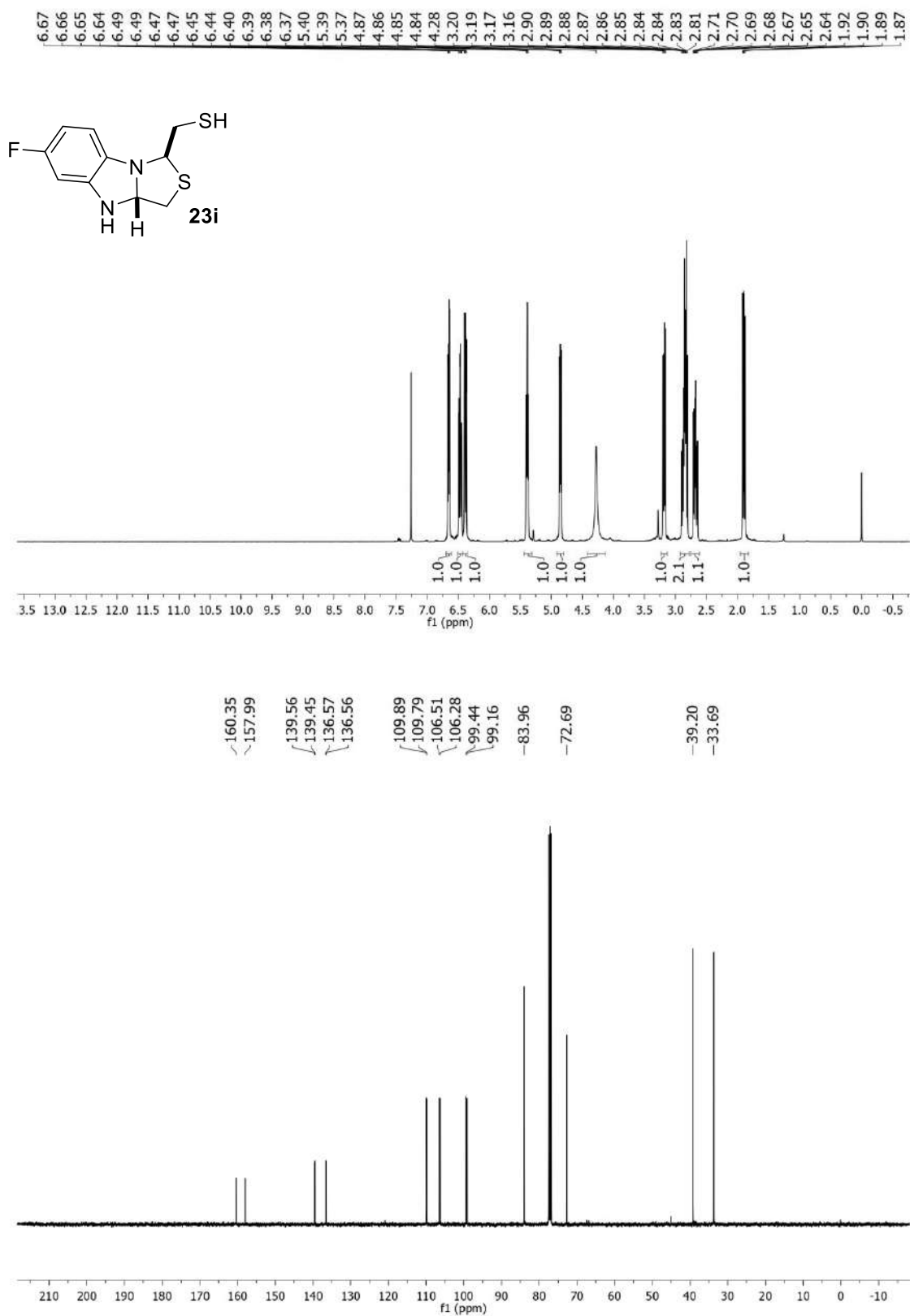
Compuesto **23f**:



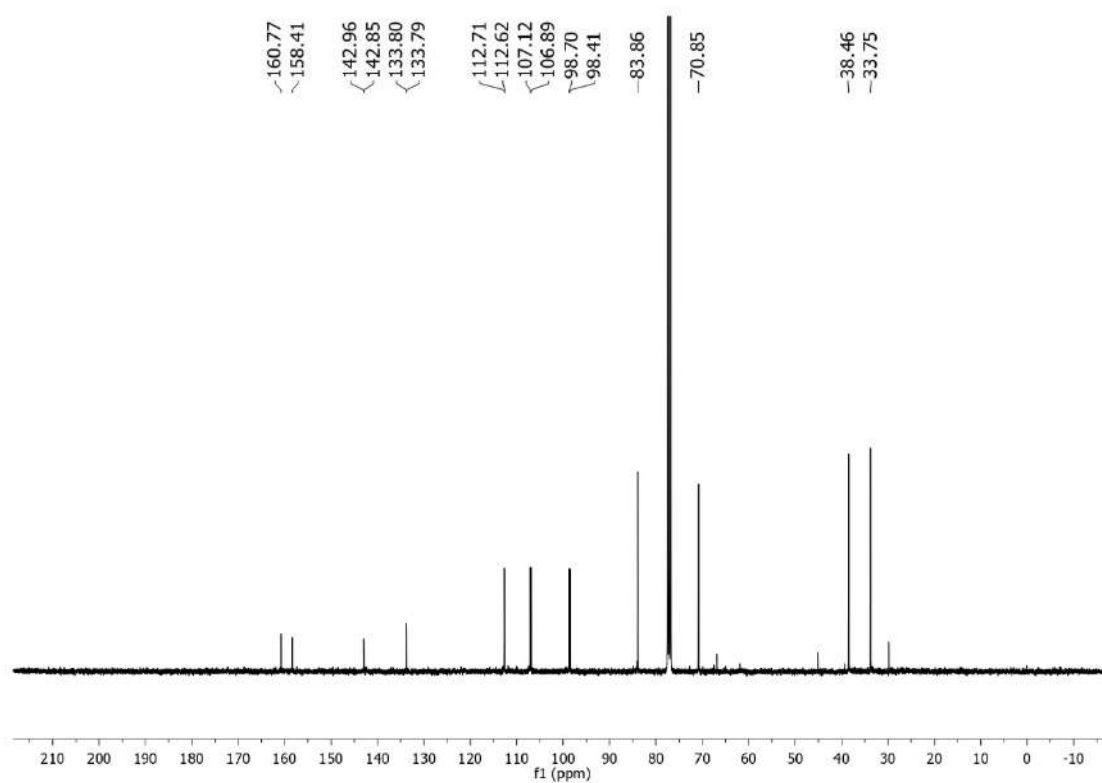
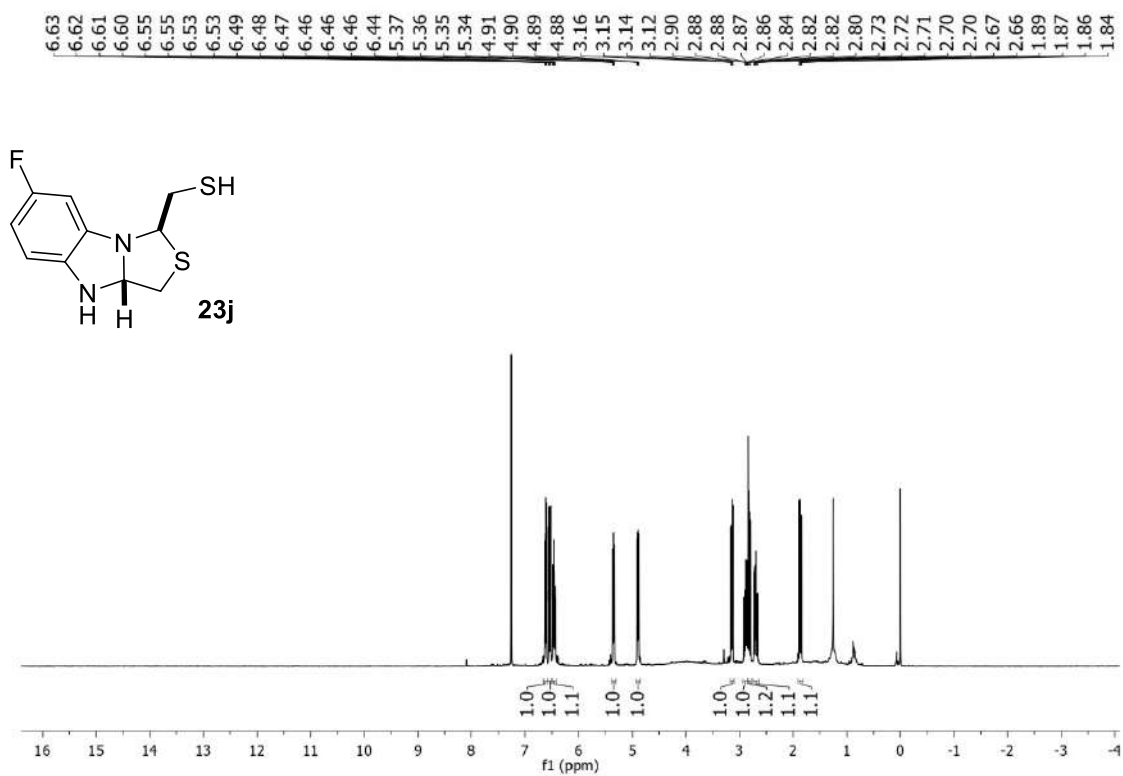
Compuesto **23g**:

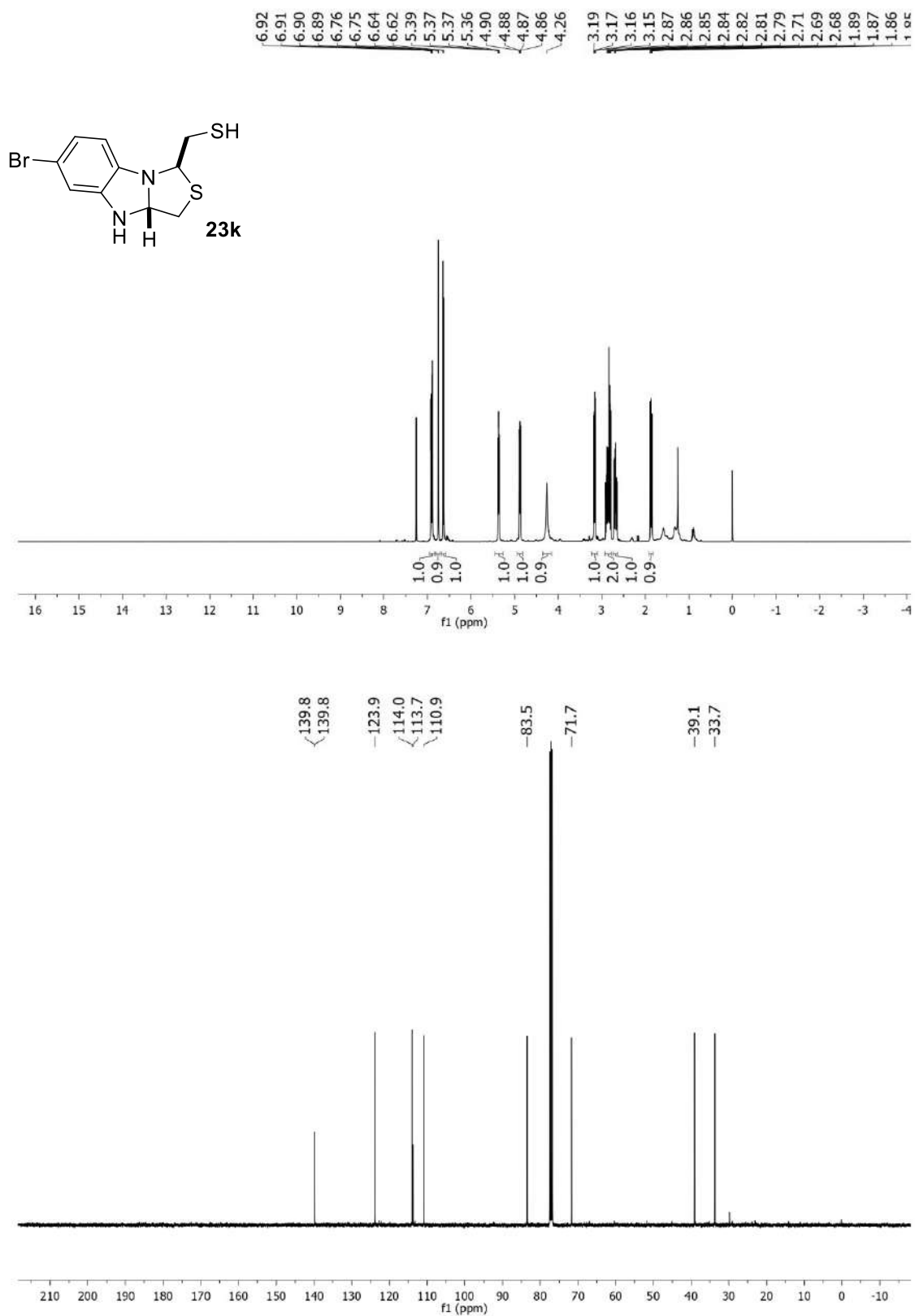
Compuesto **23h**:



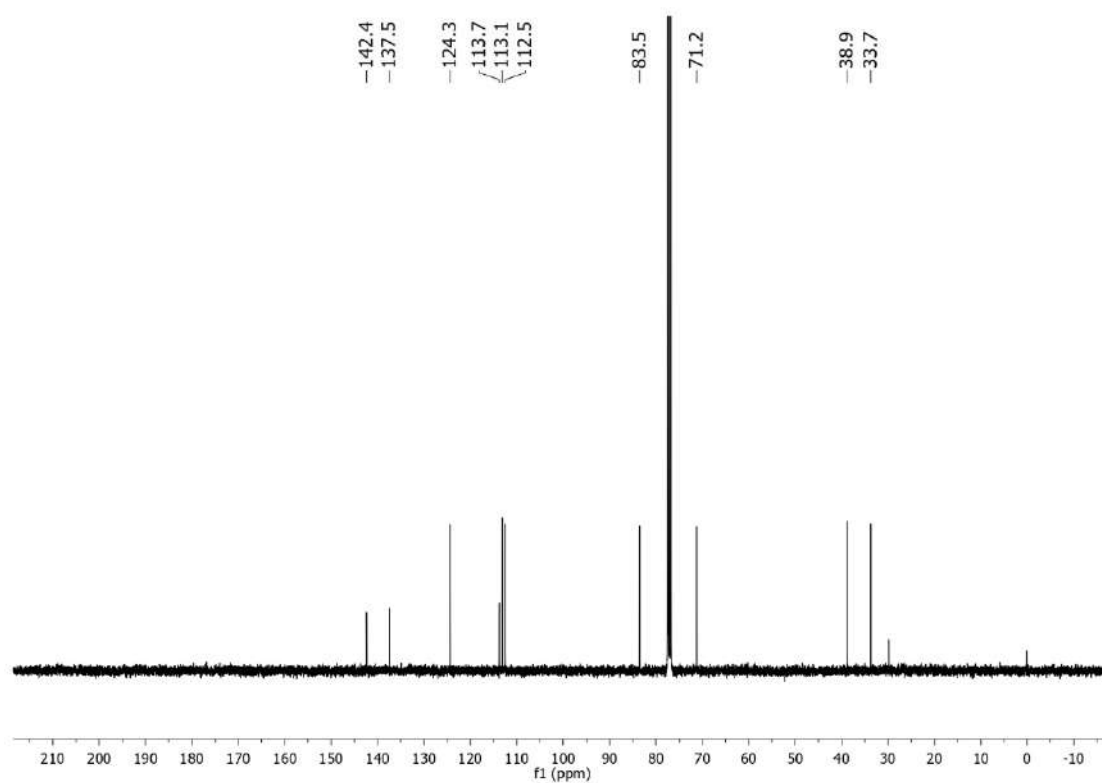
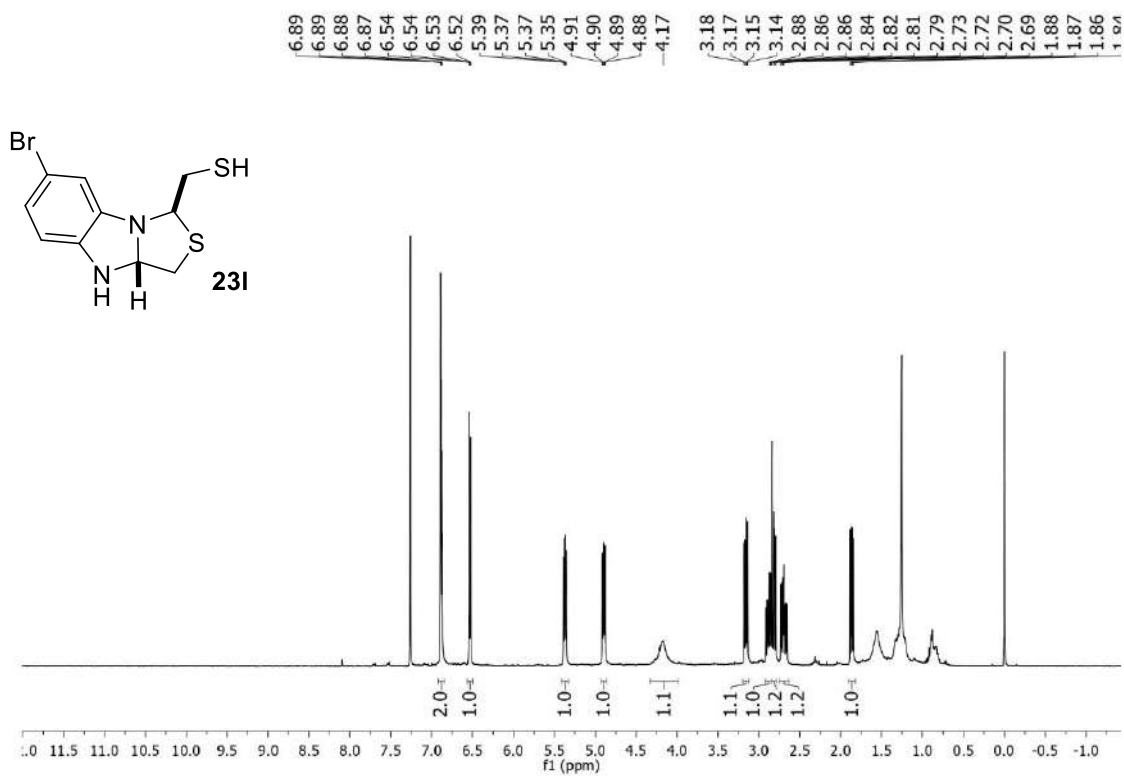
Compuesto **23i**:

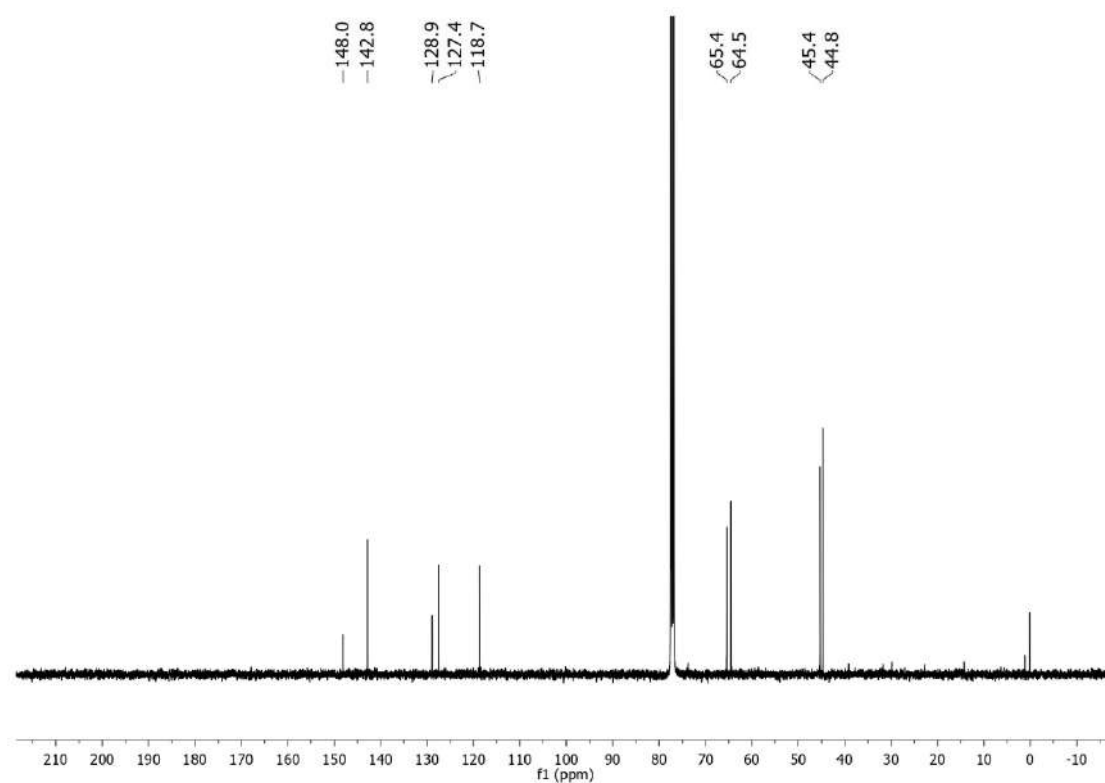
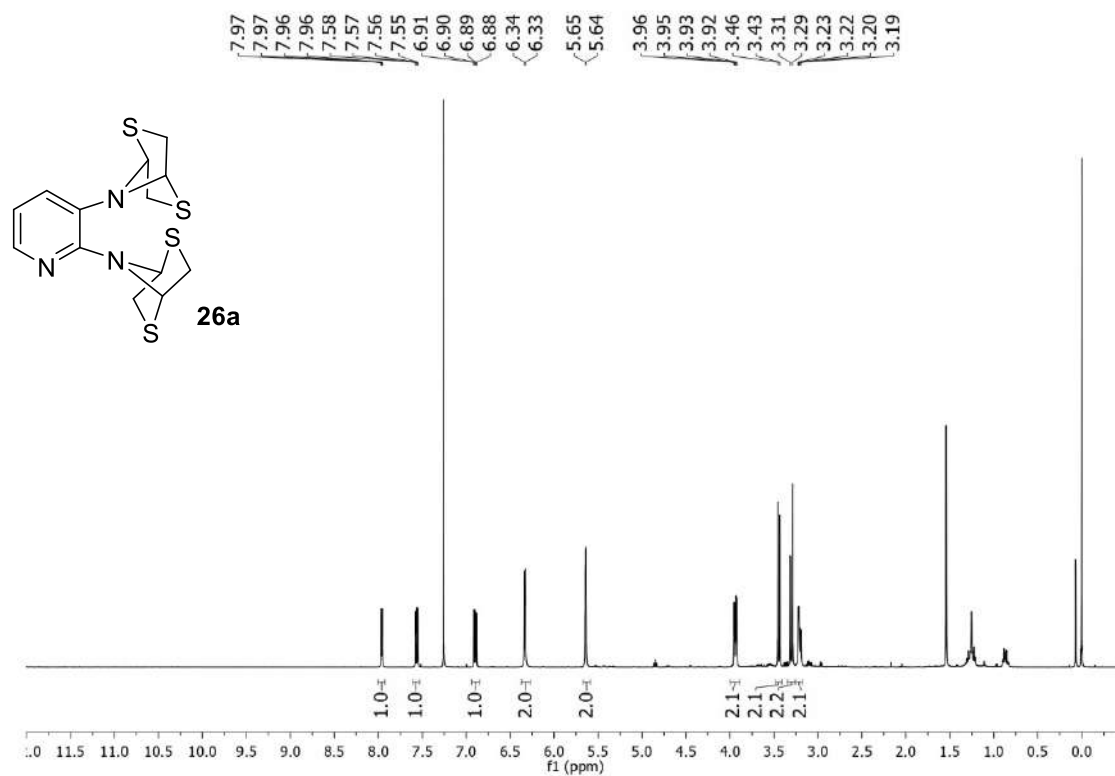
Compuesto **23j**:



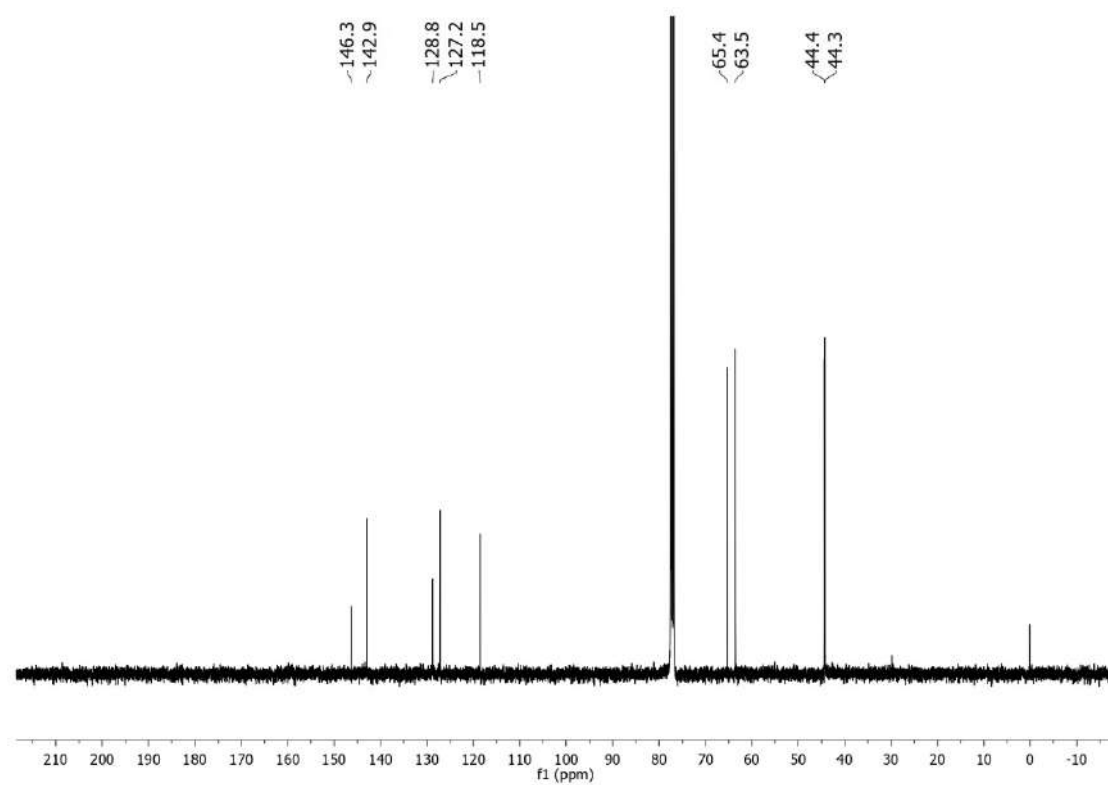
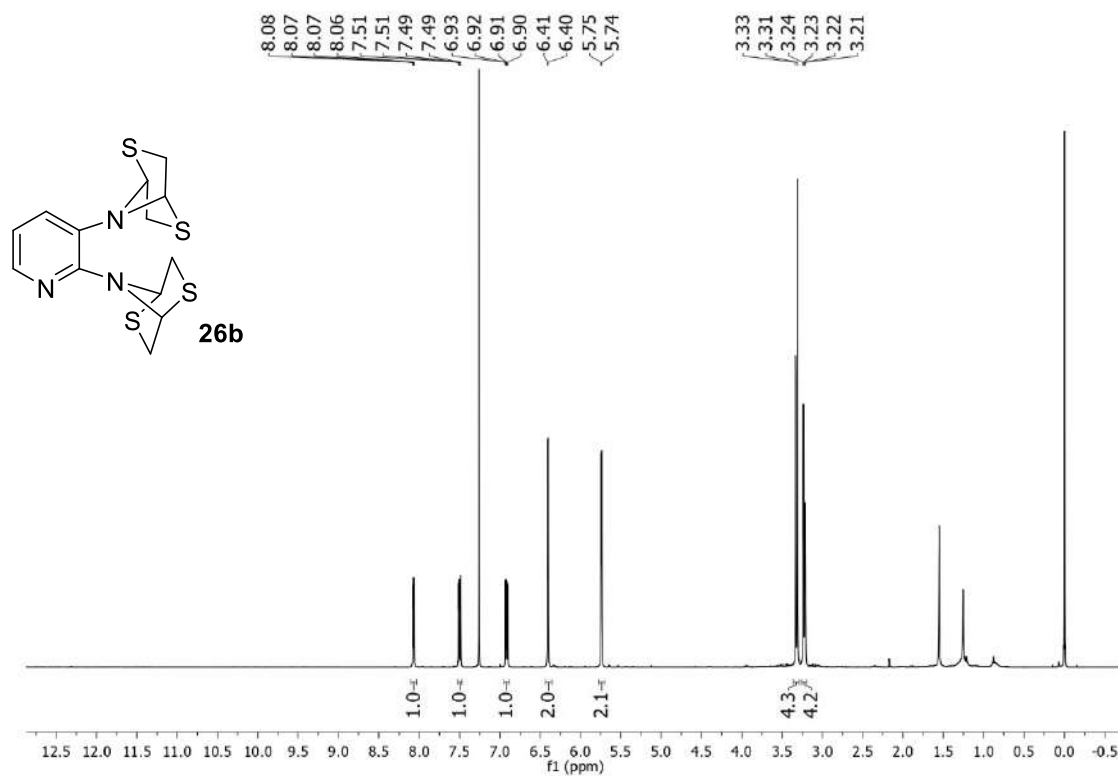
Compuesto **23k**:

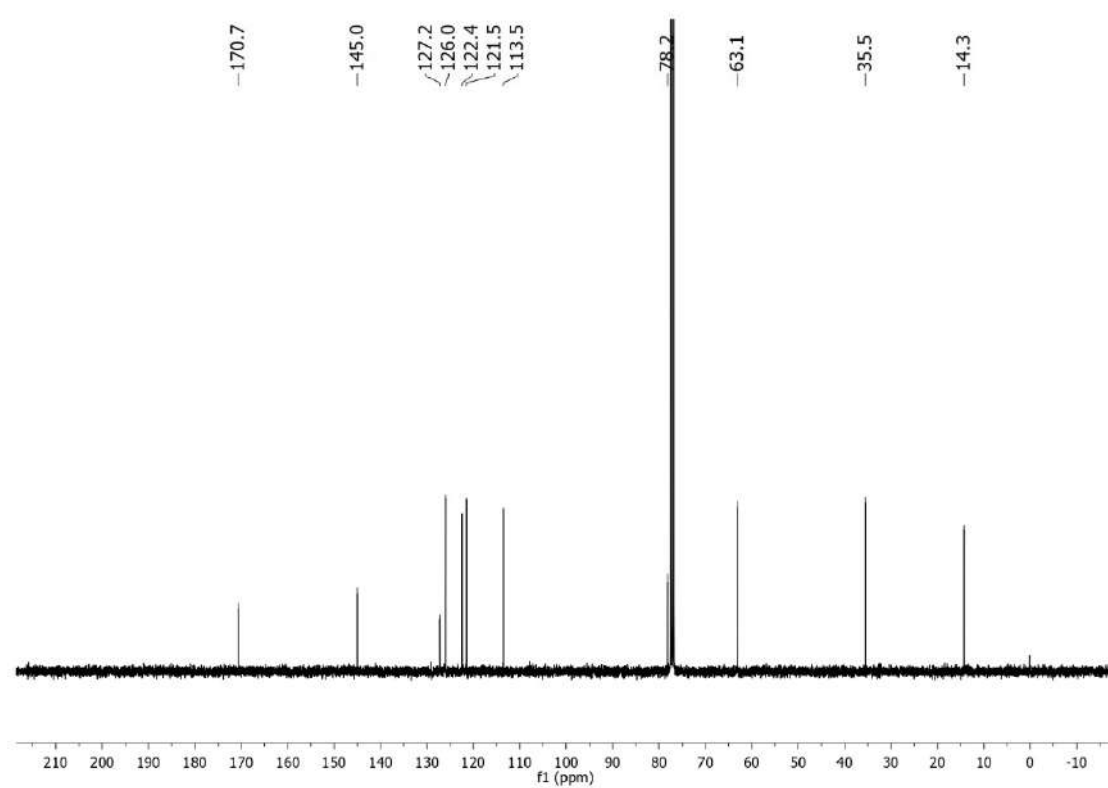
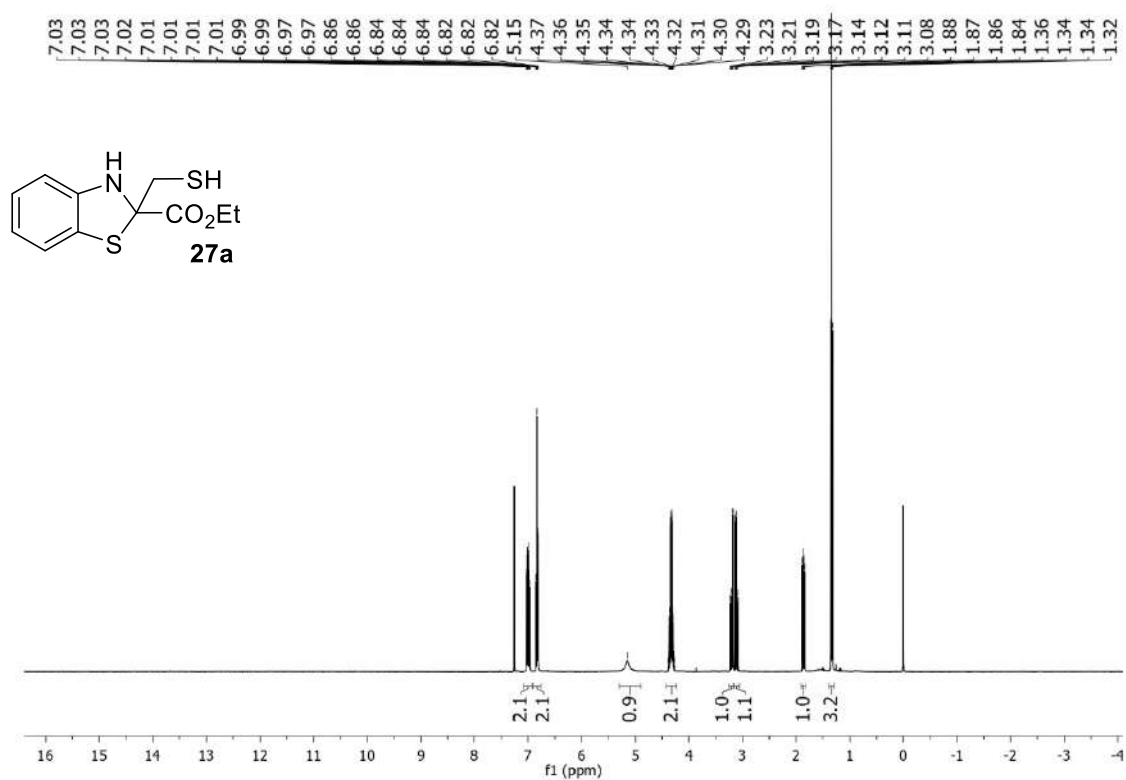
Compuesto **23I**:



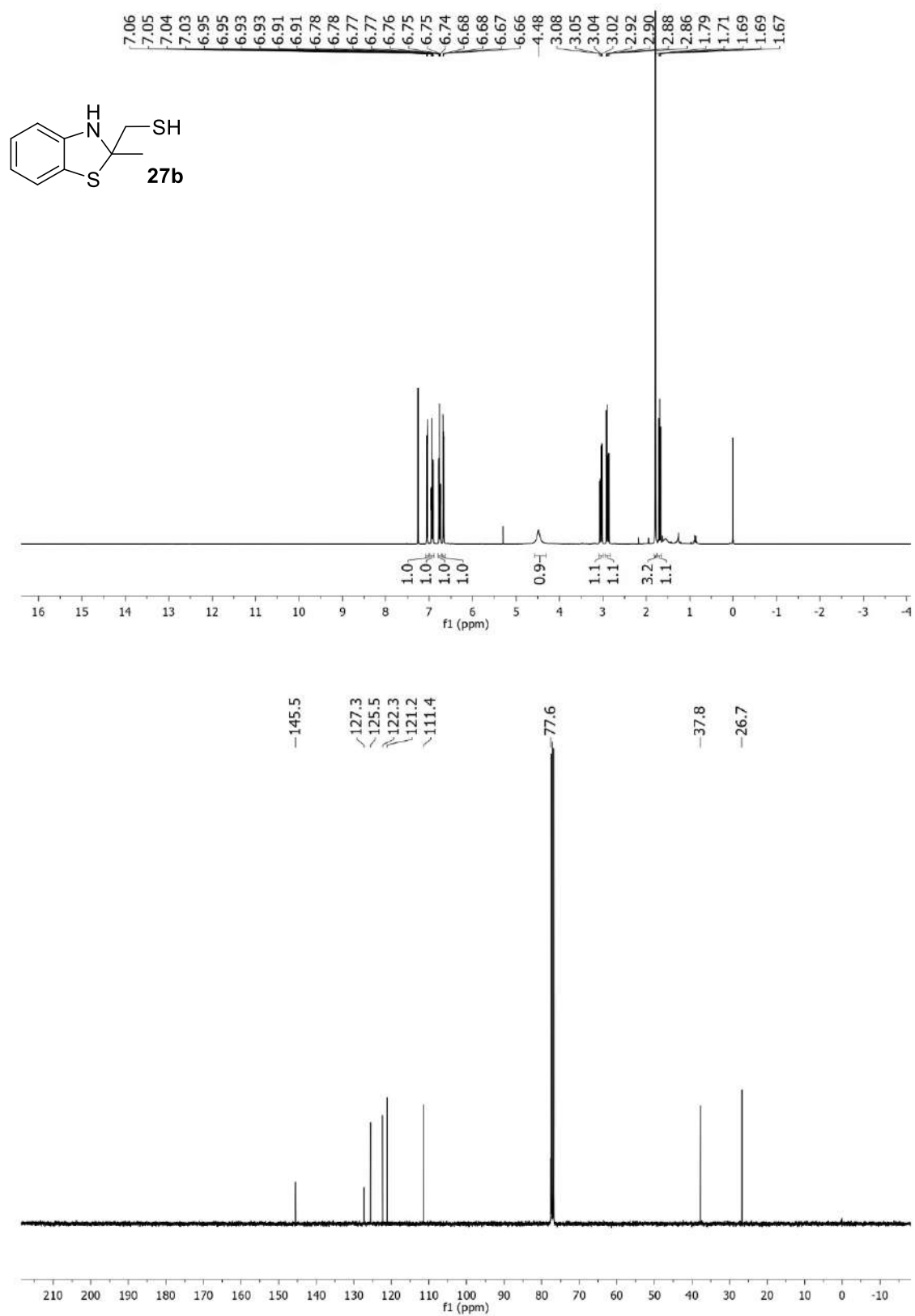
Compuesto **26a**:

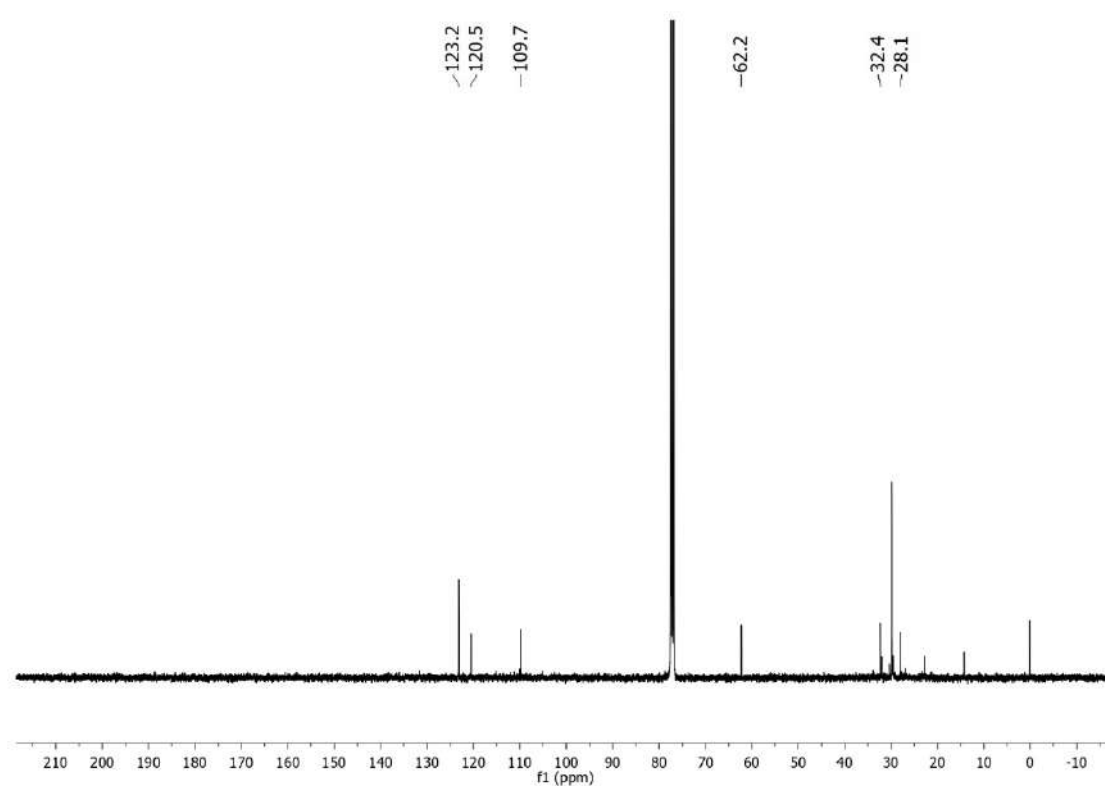
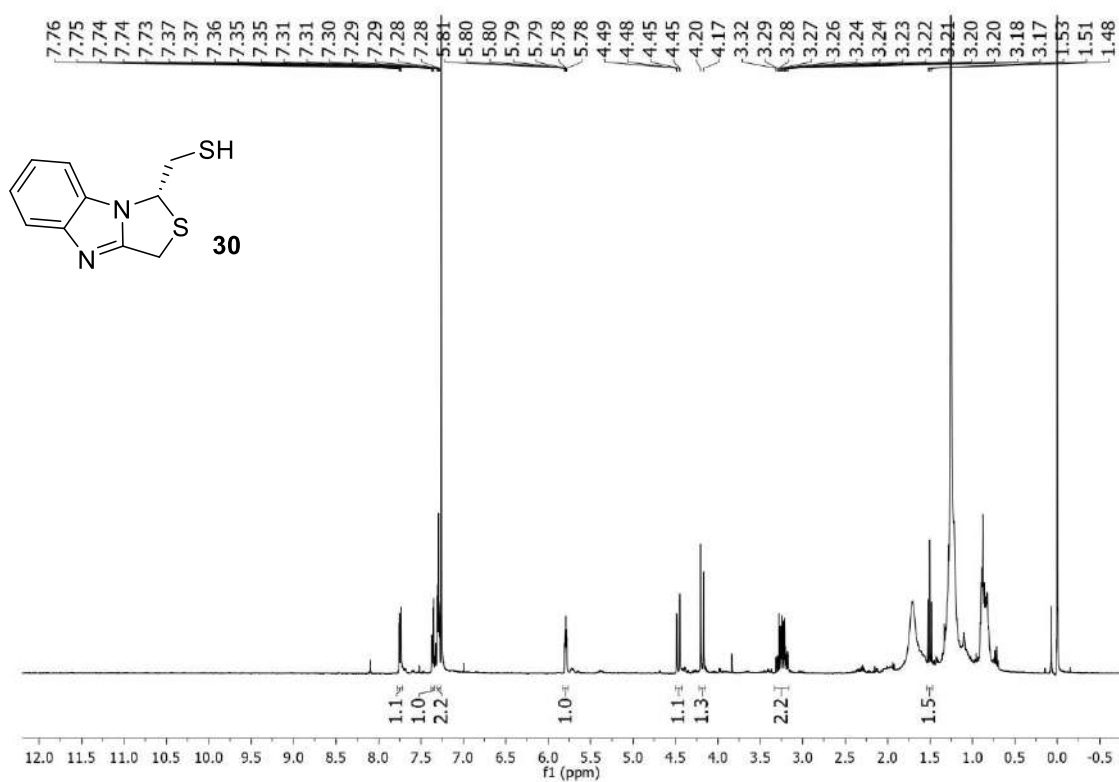
Compuesto **26b**:



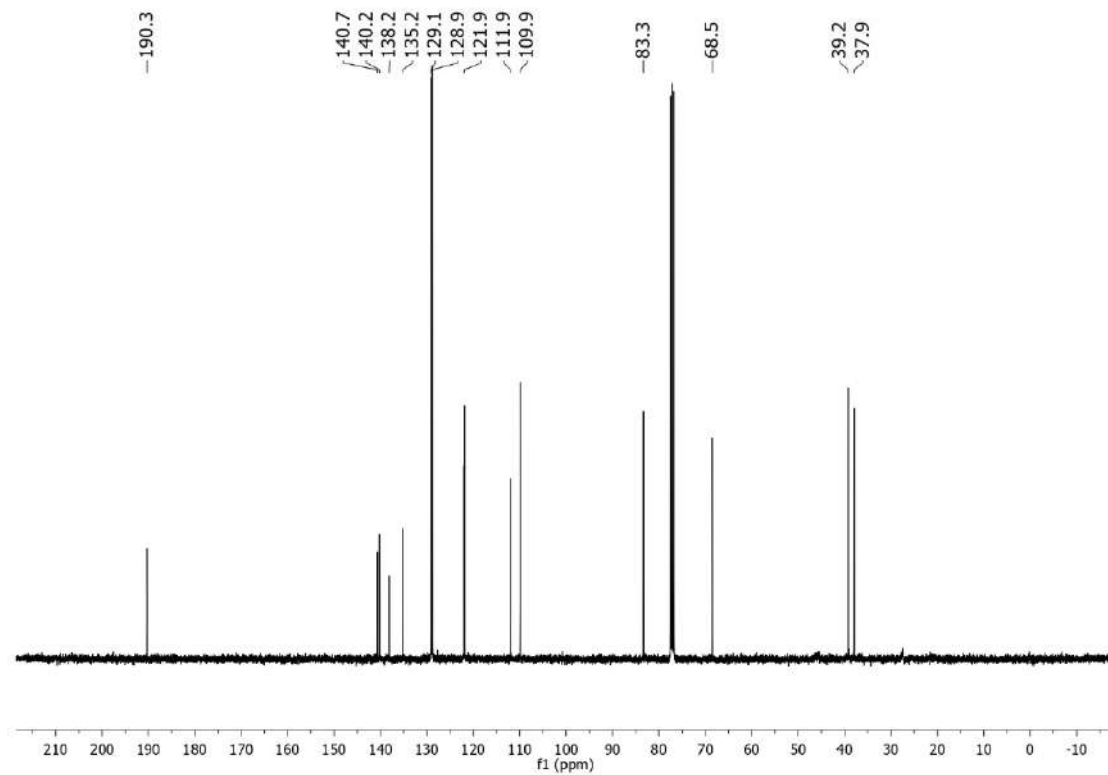
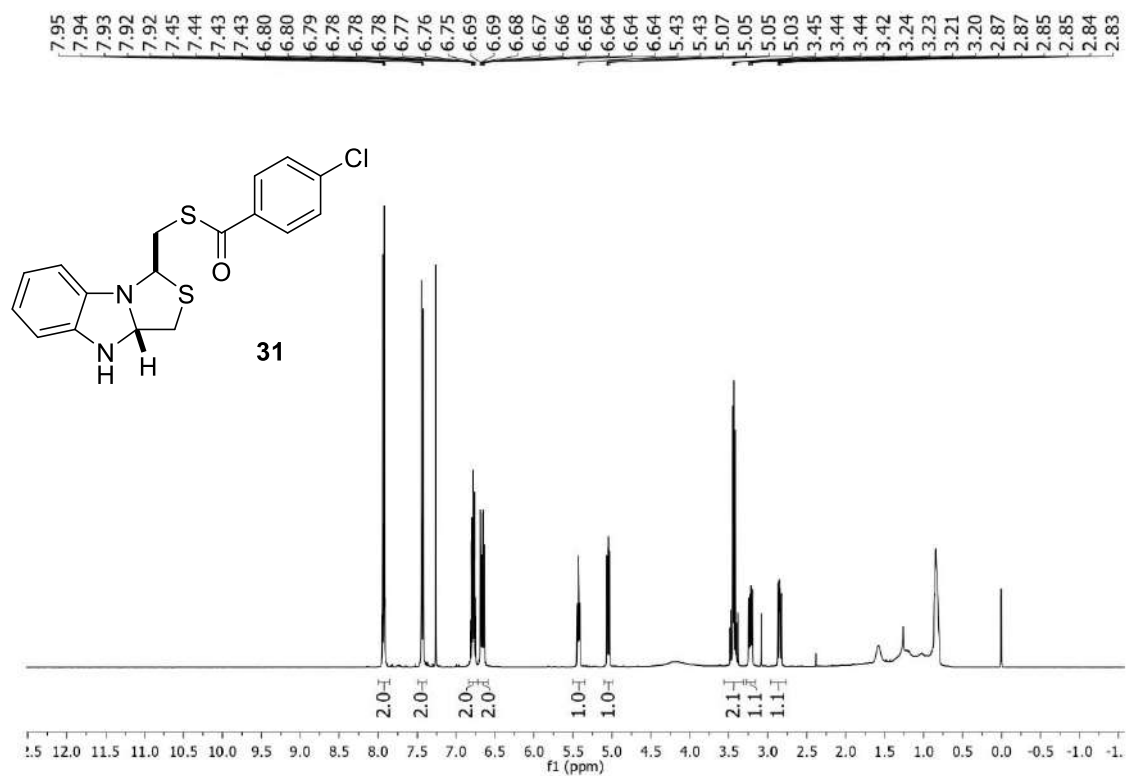
Compuesto **27a**:

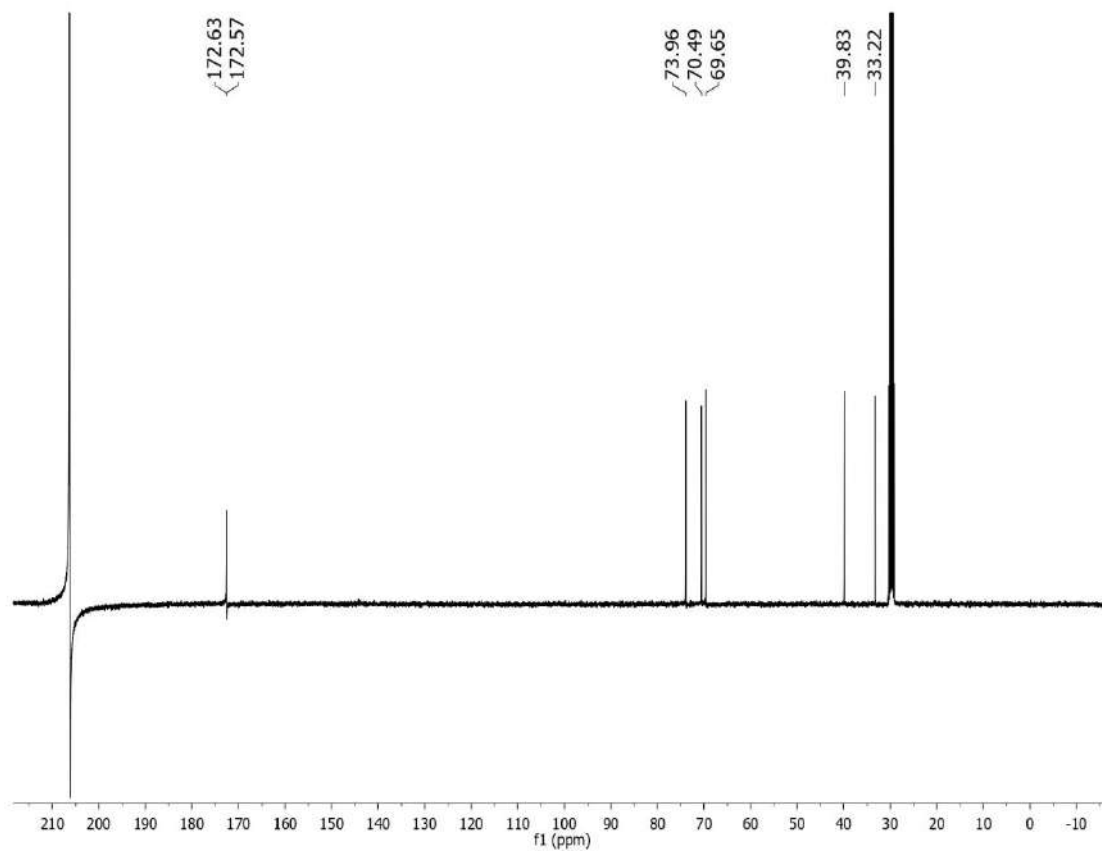
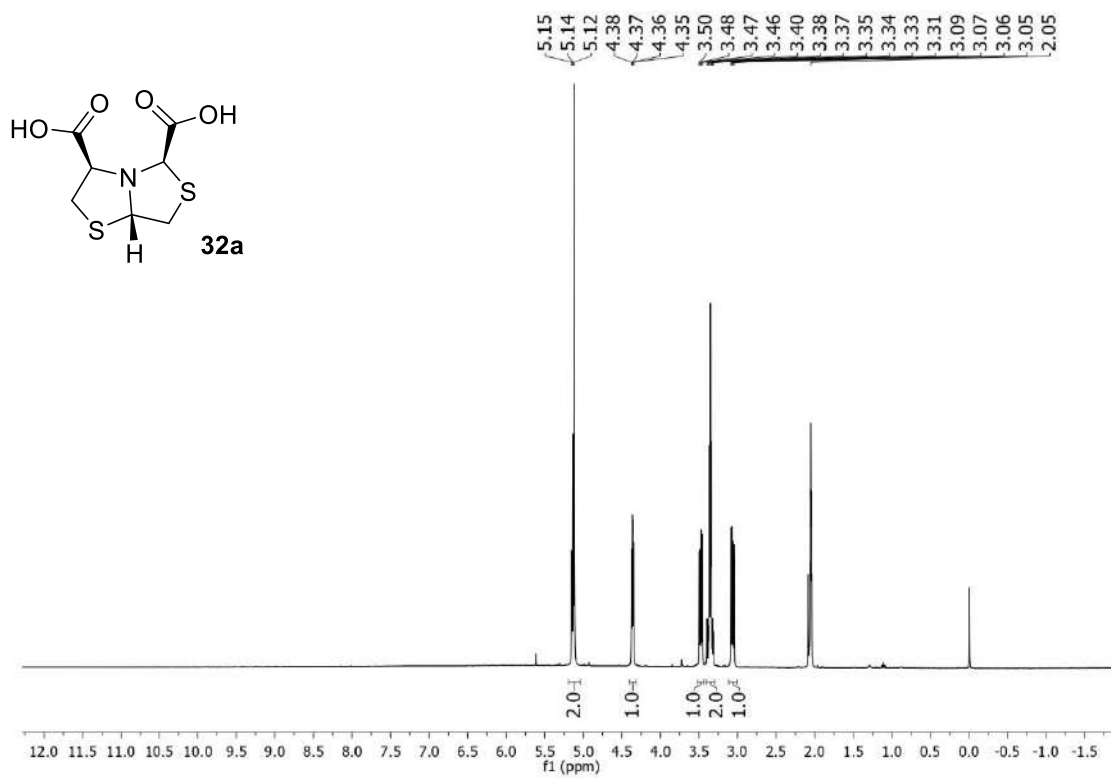
Compuesto **27b**:



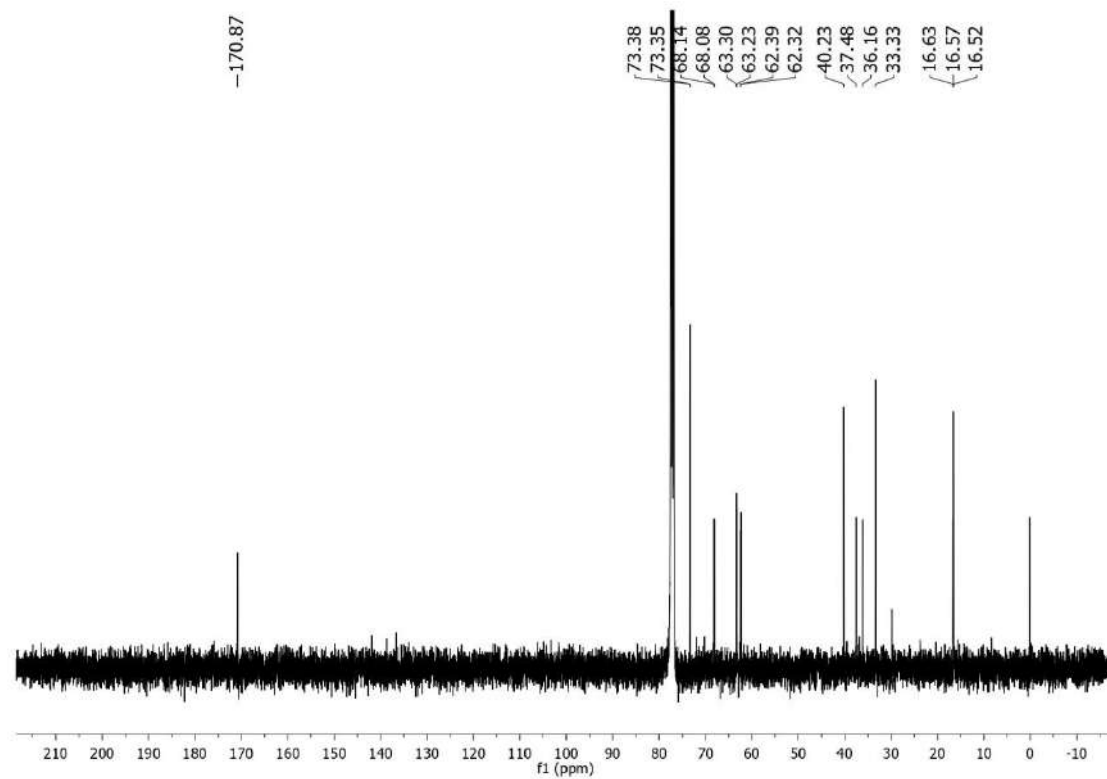
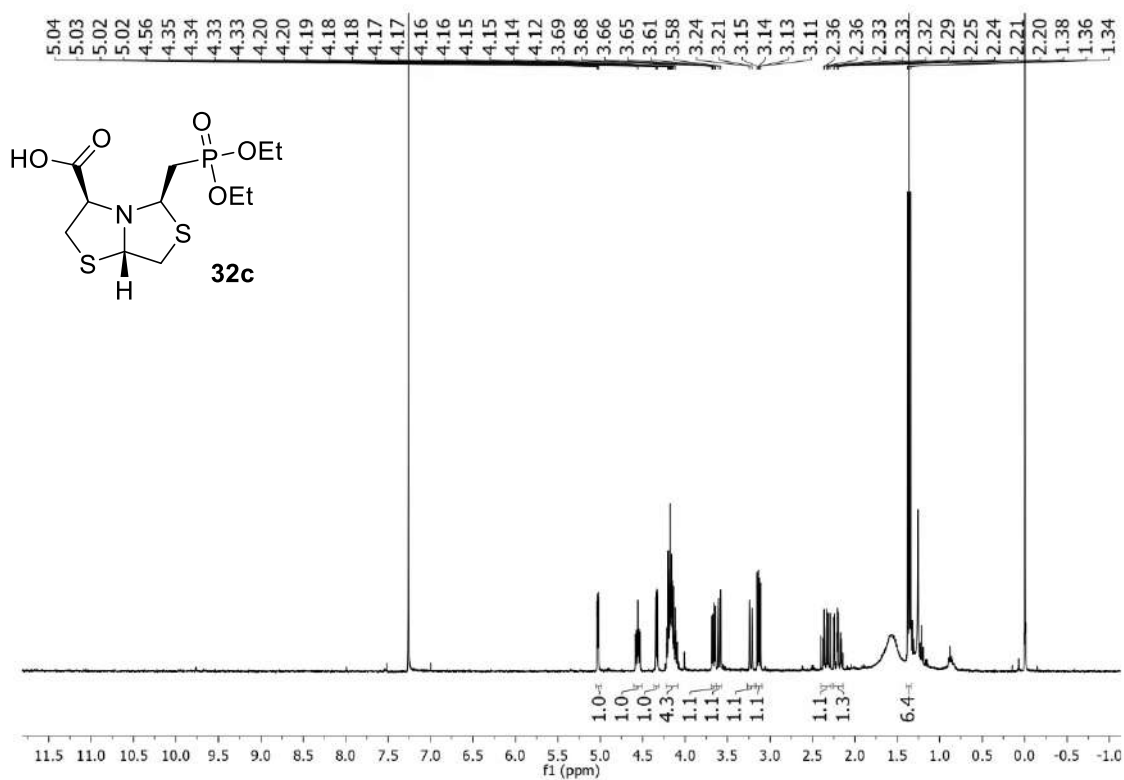
Compuesto **30**:

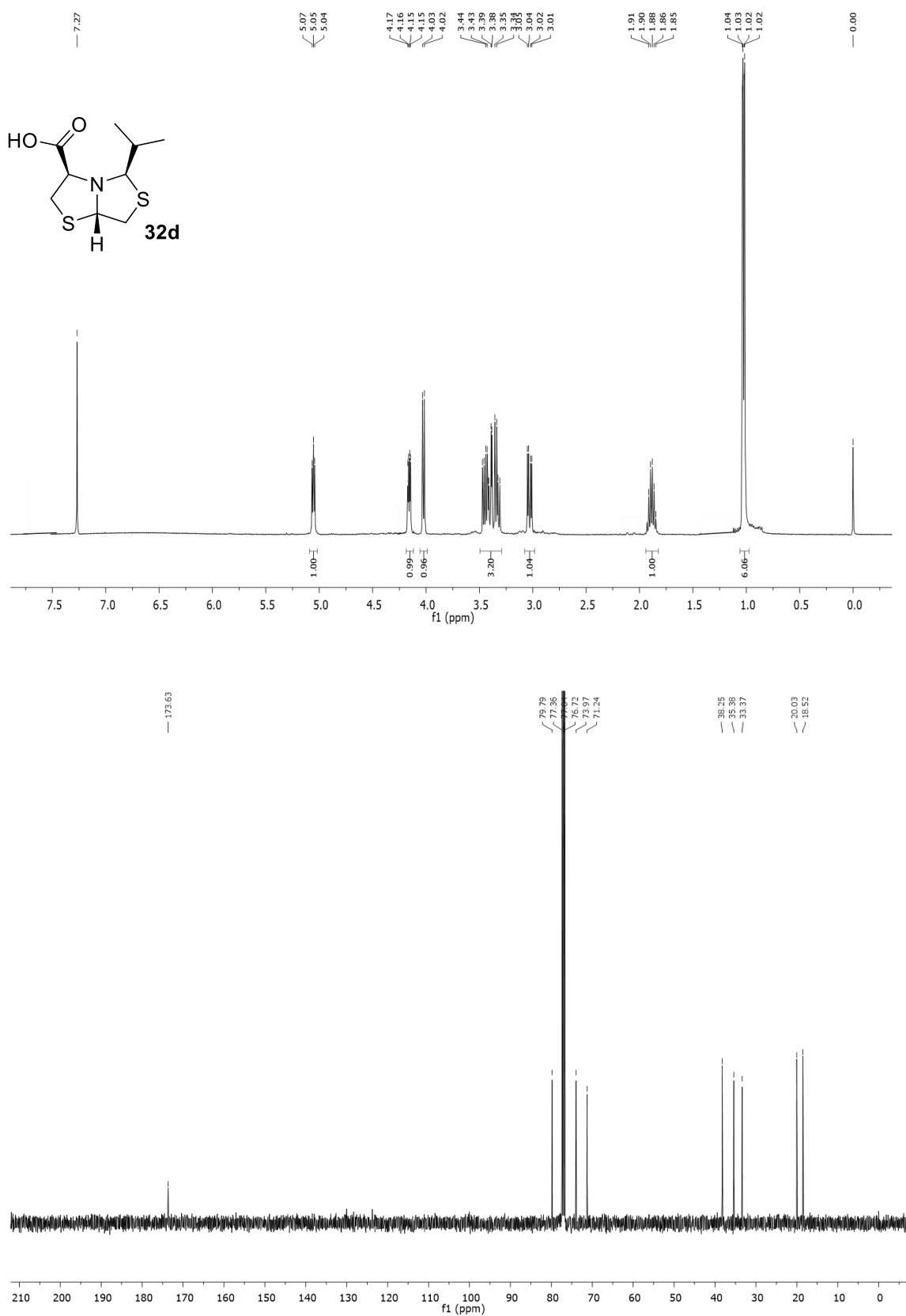
Compuesto **31**:



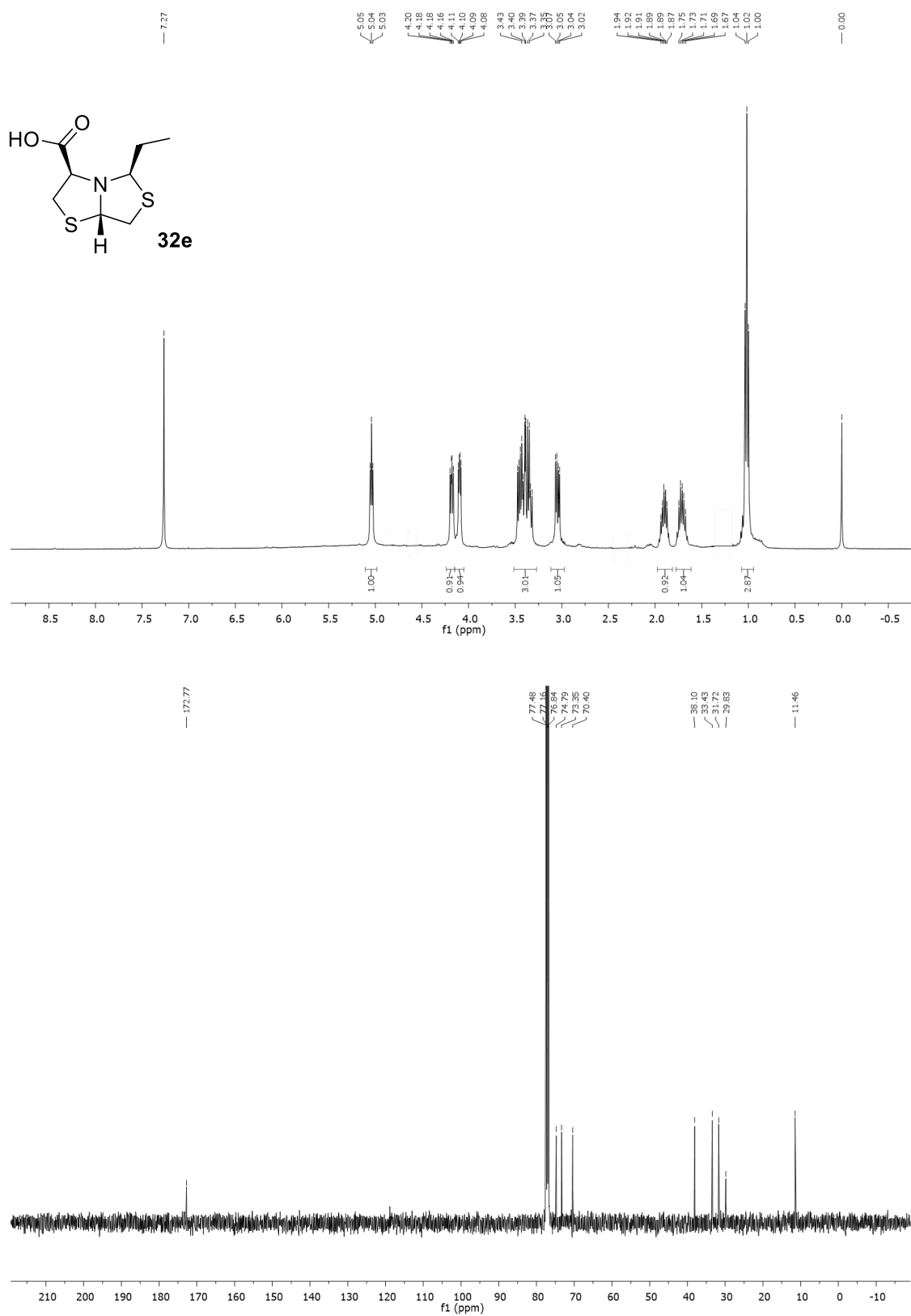
Compuesto **32a**:

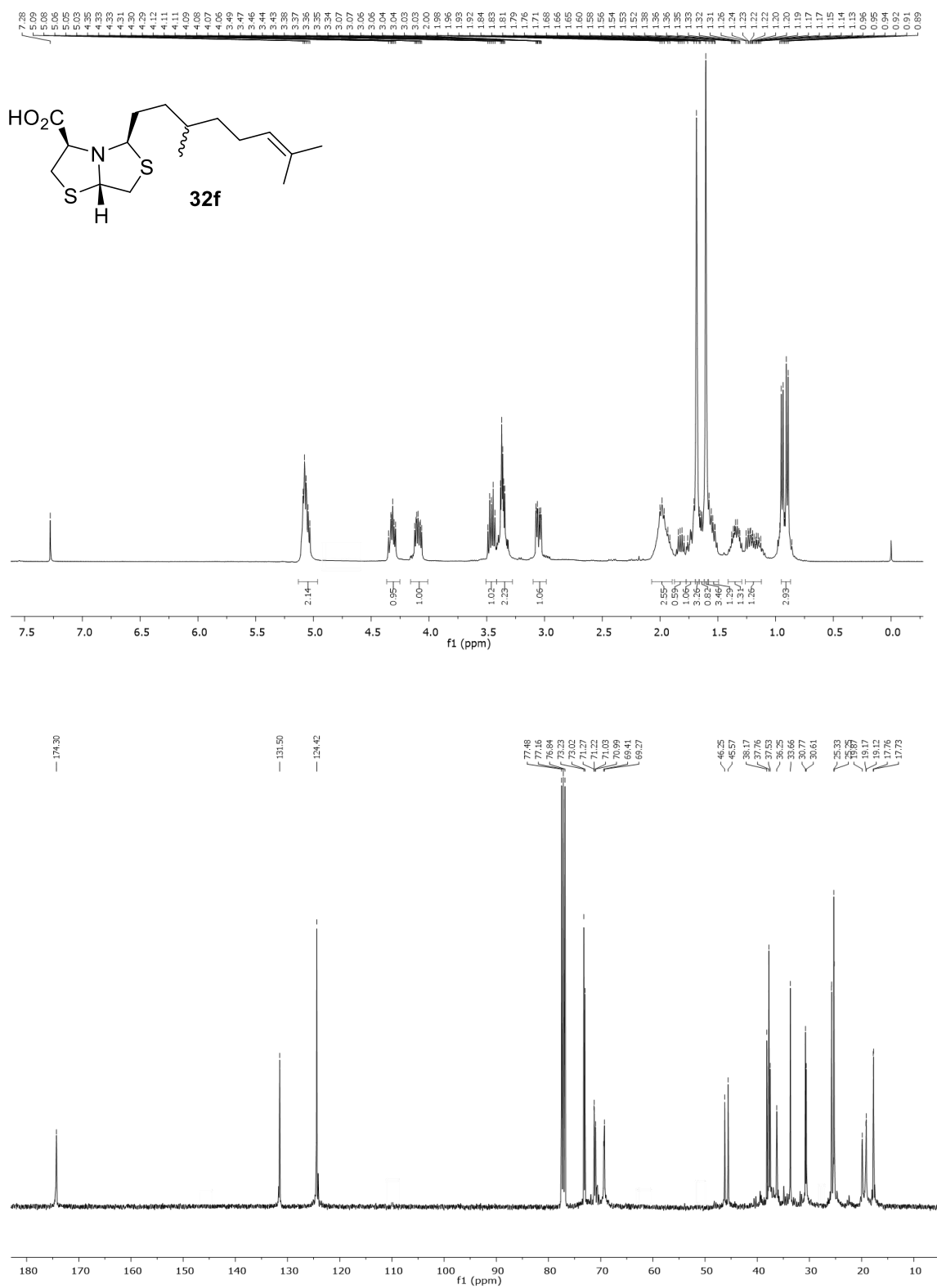
Compuesto **32c**:



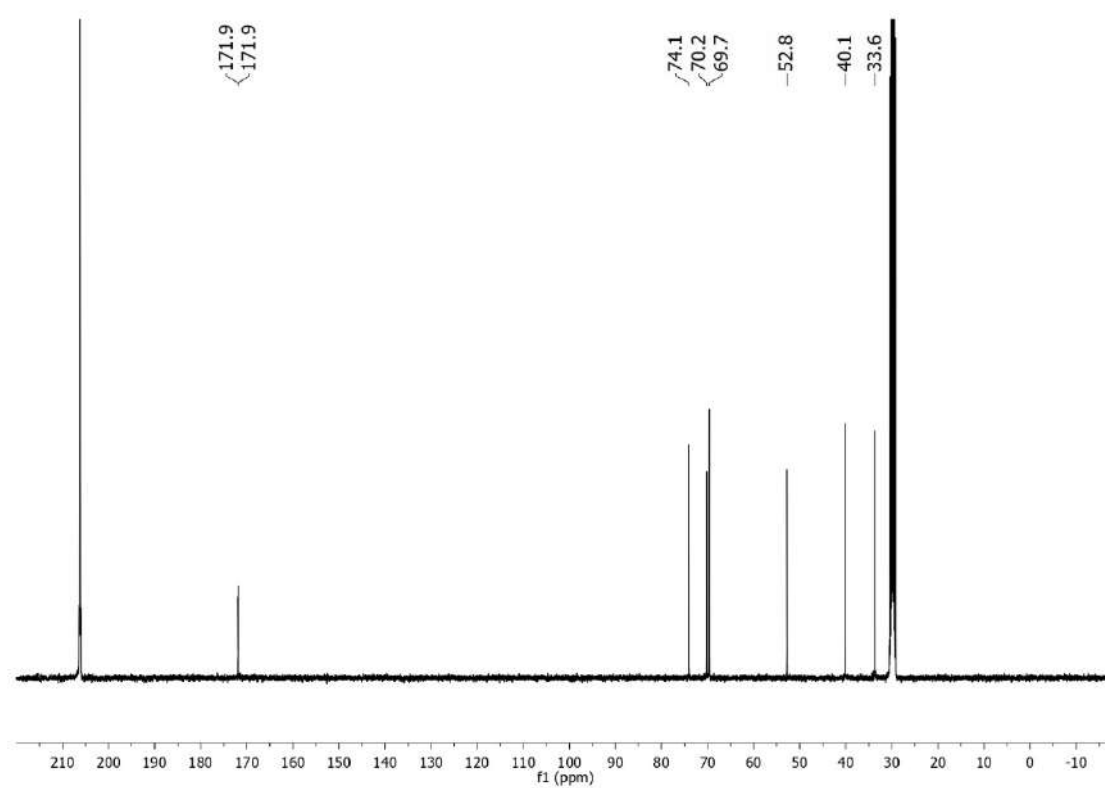
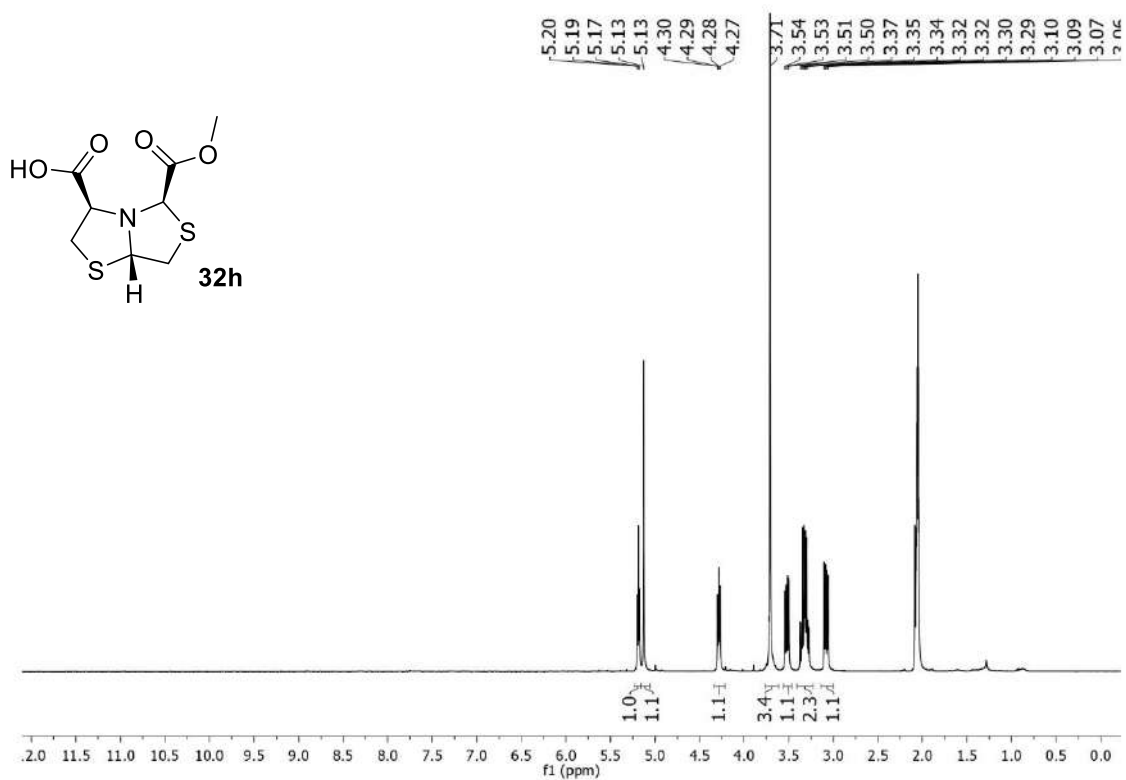
Compuesto **32d**:

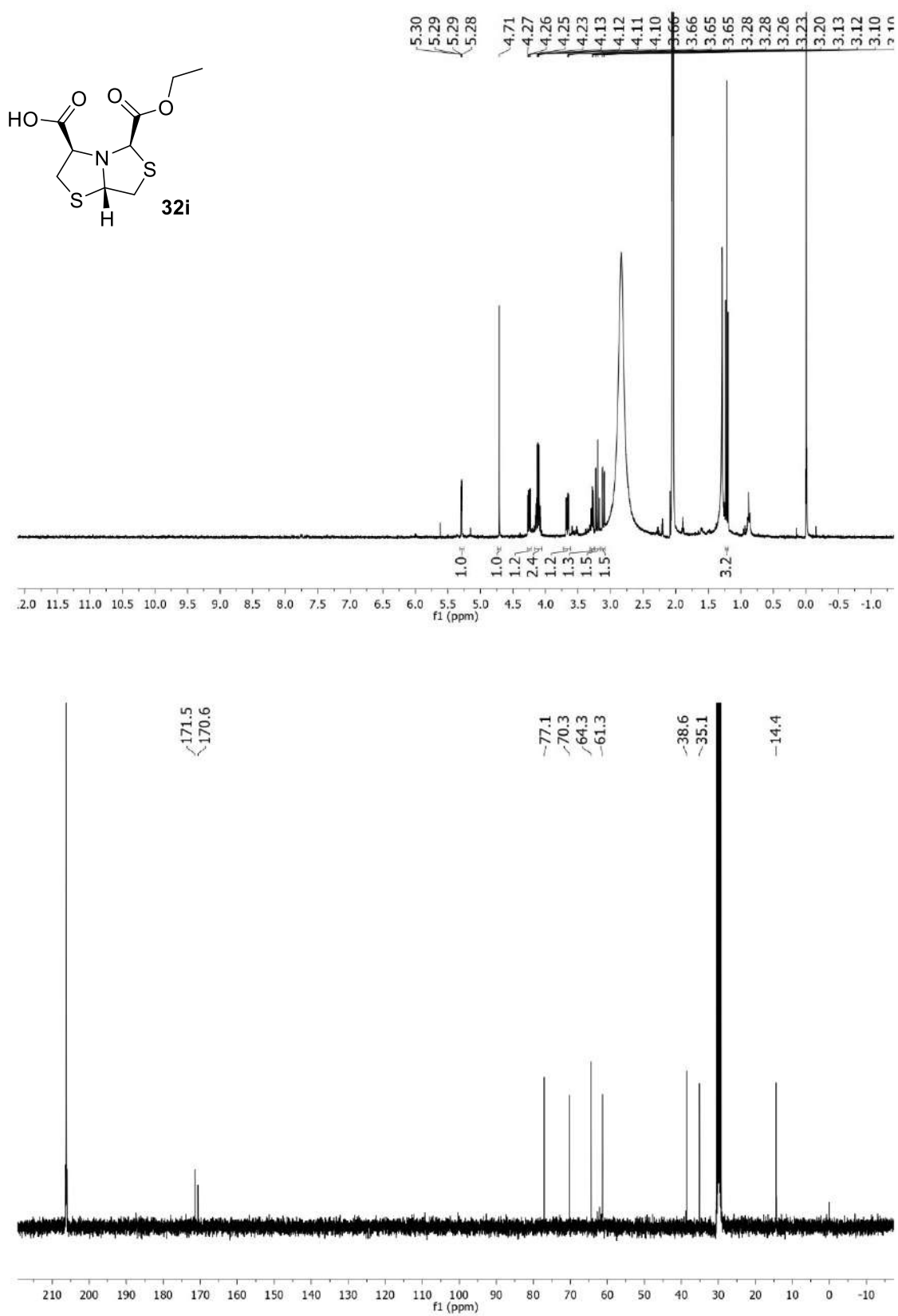
Compuesto **32e**:



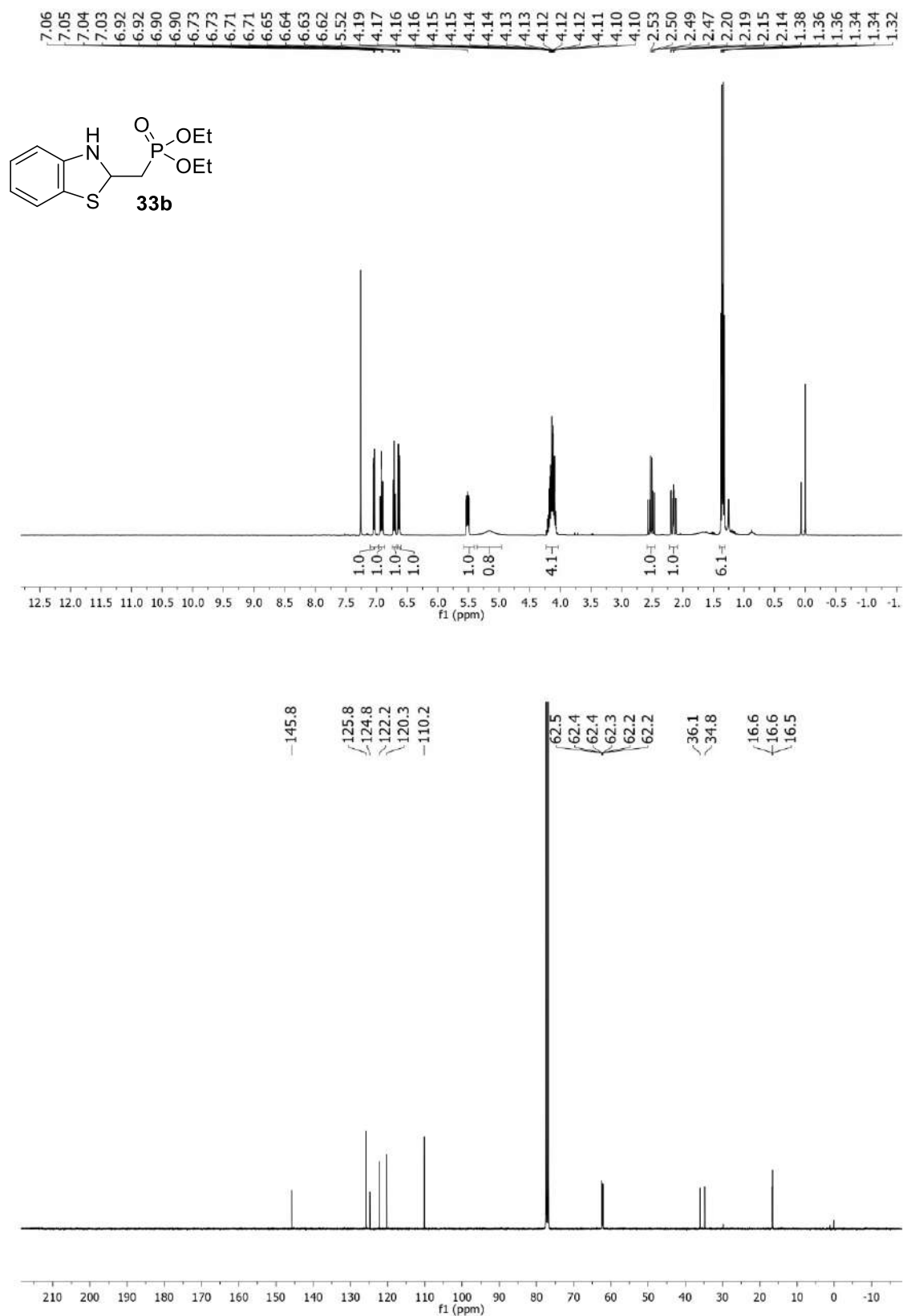
Compuesto **32f**:

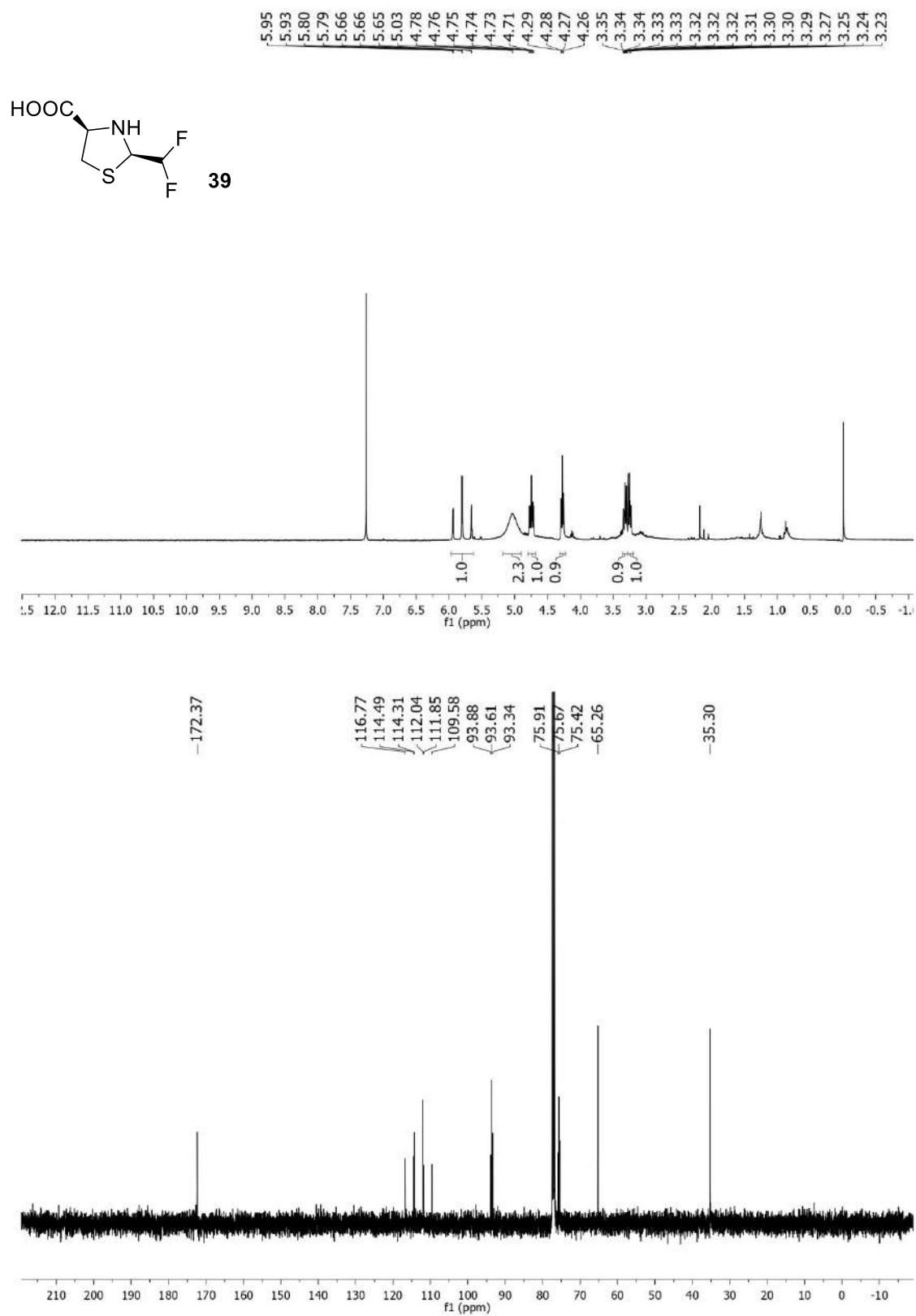
Compuesto **32h**:



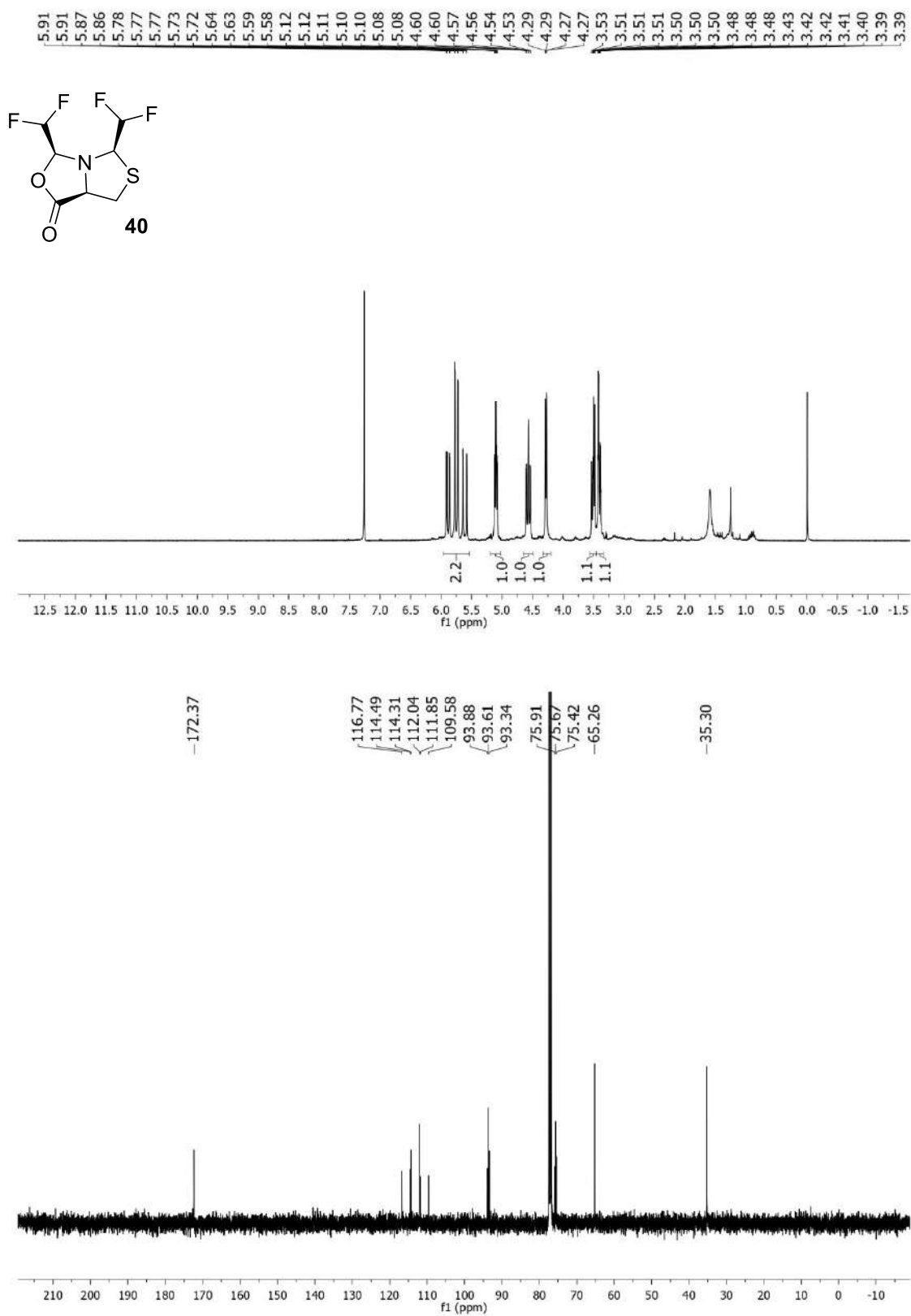
Compuesto **32i**:

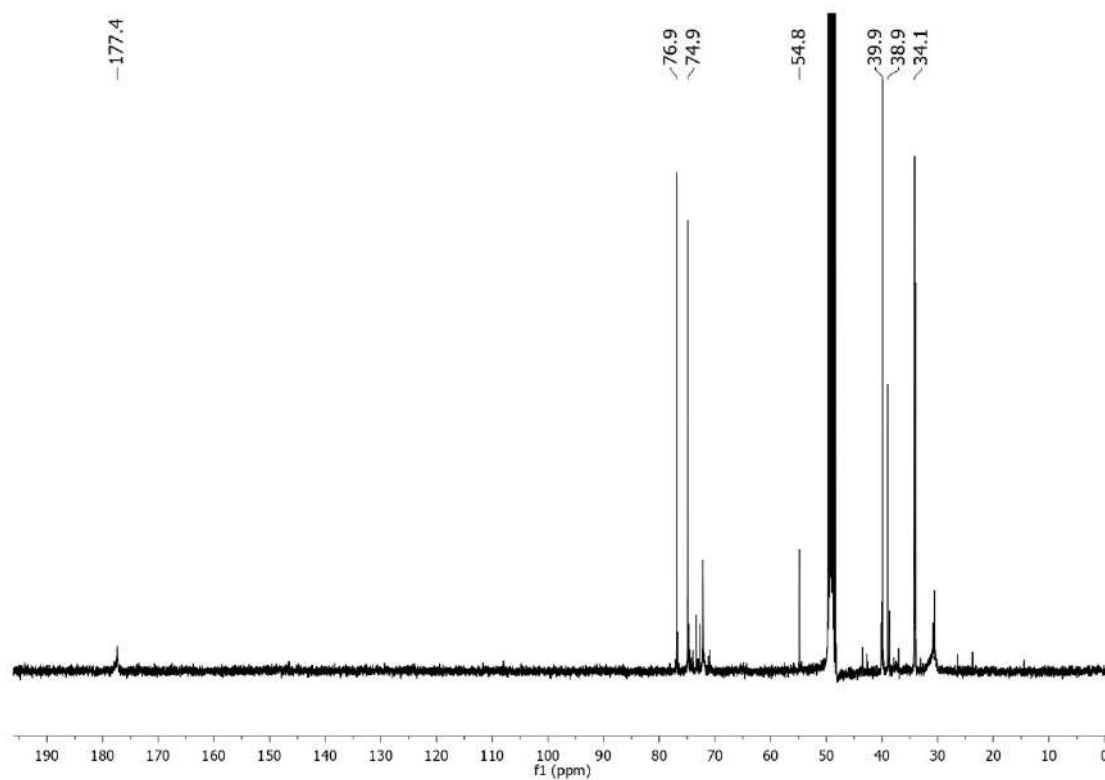
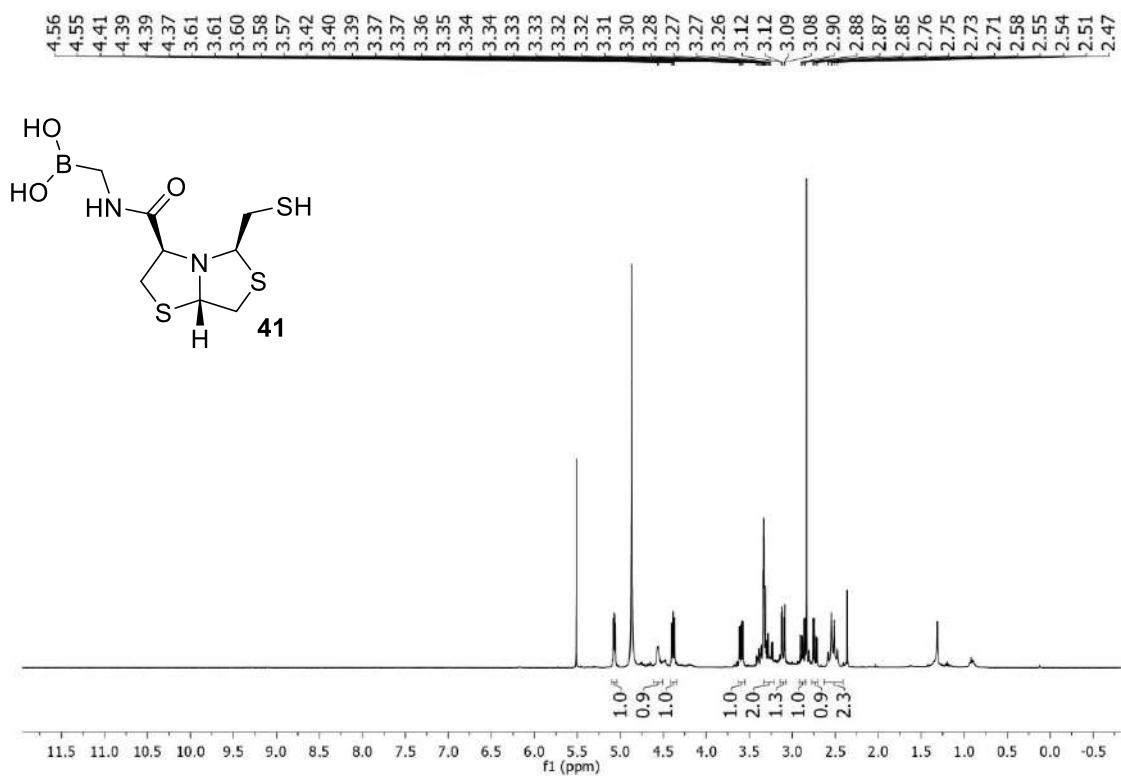
Compuesto **33b**:



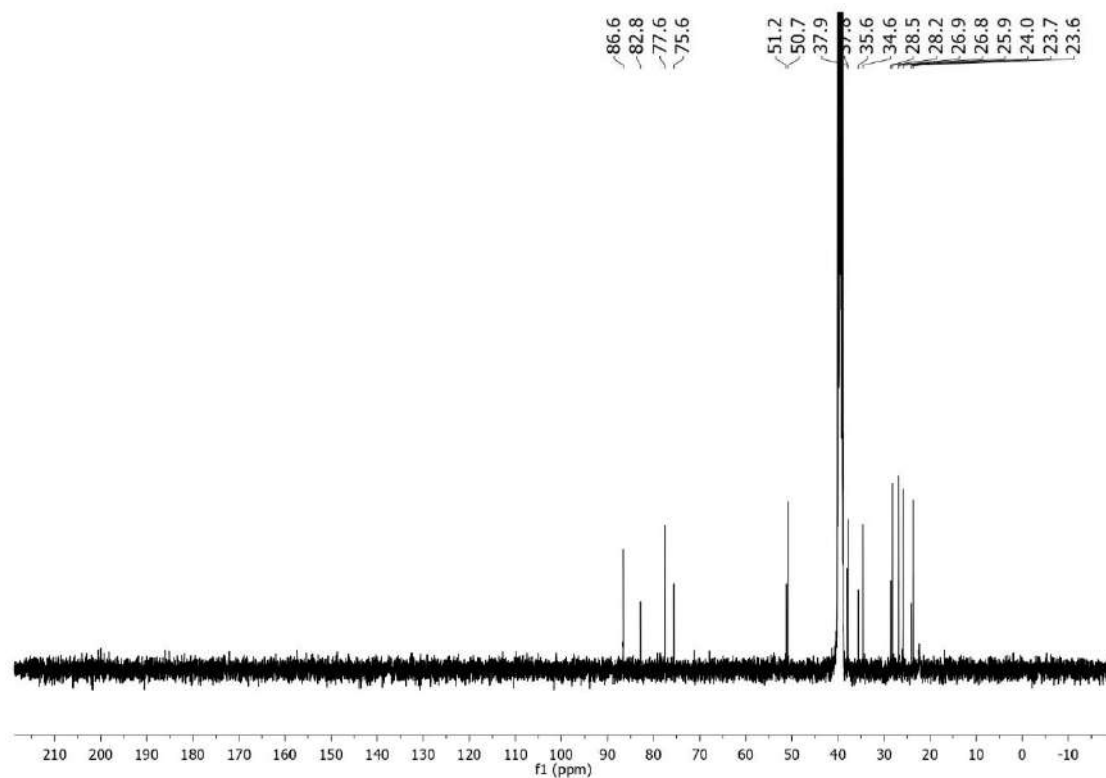
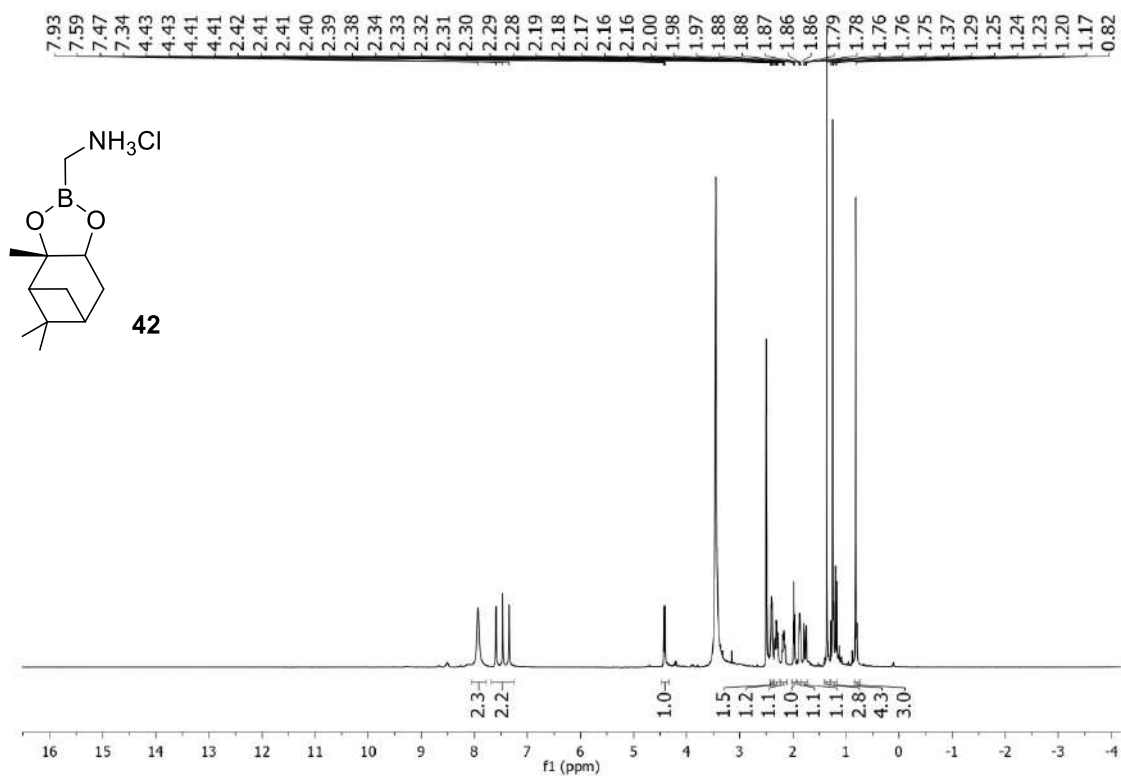
Compuesto **39**:

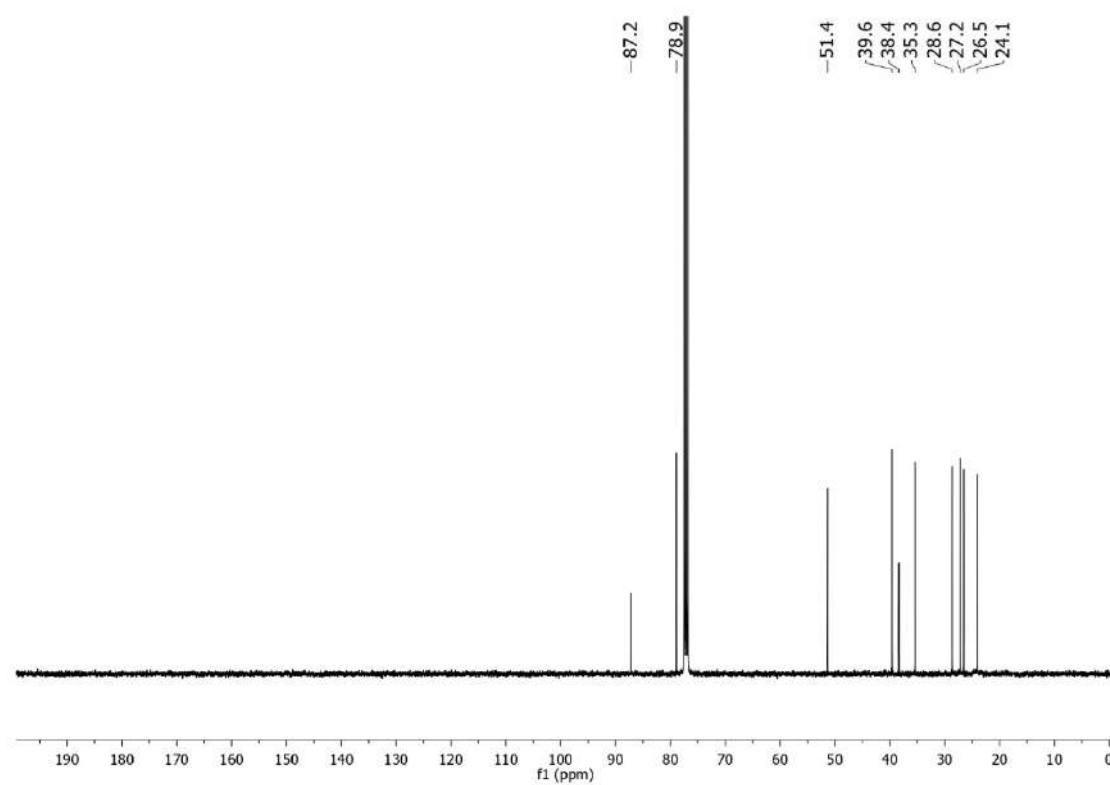
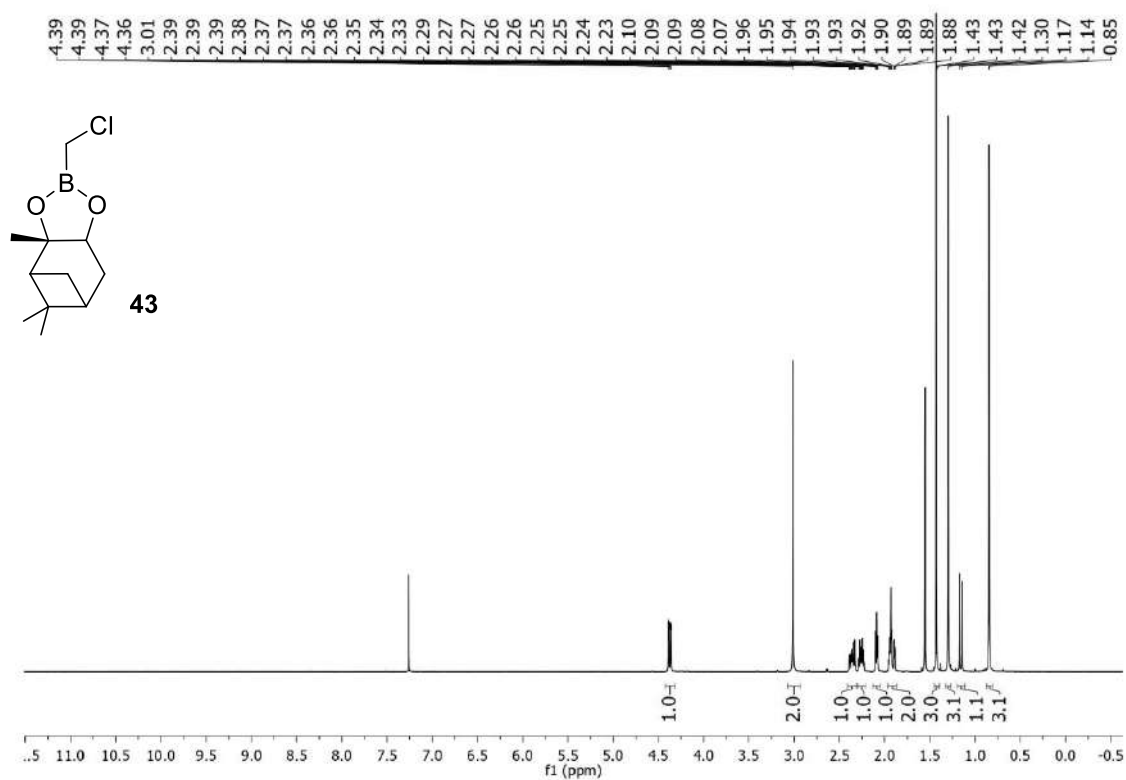
Compuesto **40**:



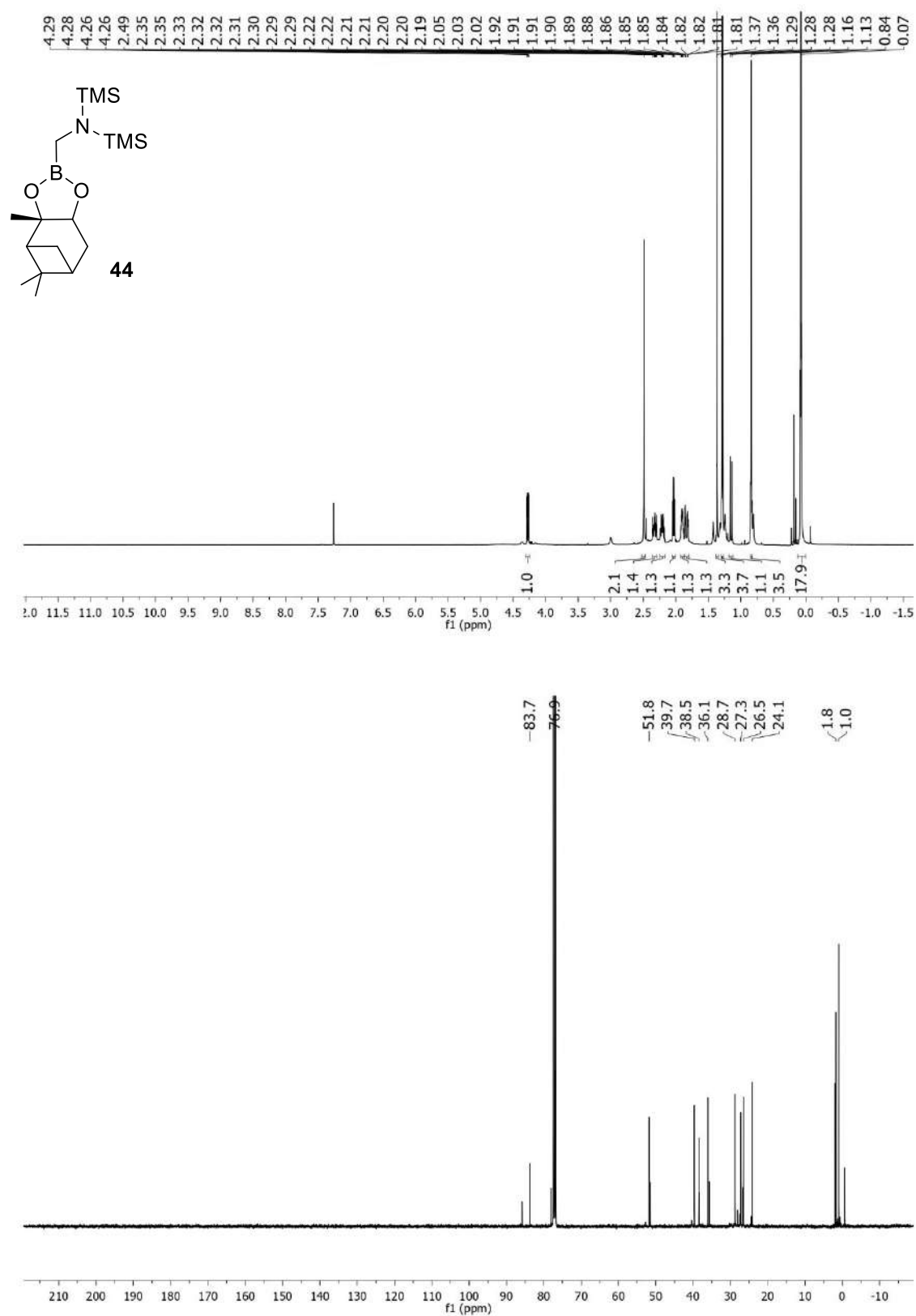
Compuesto **41**:

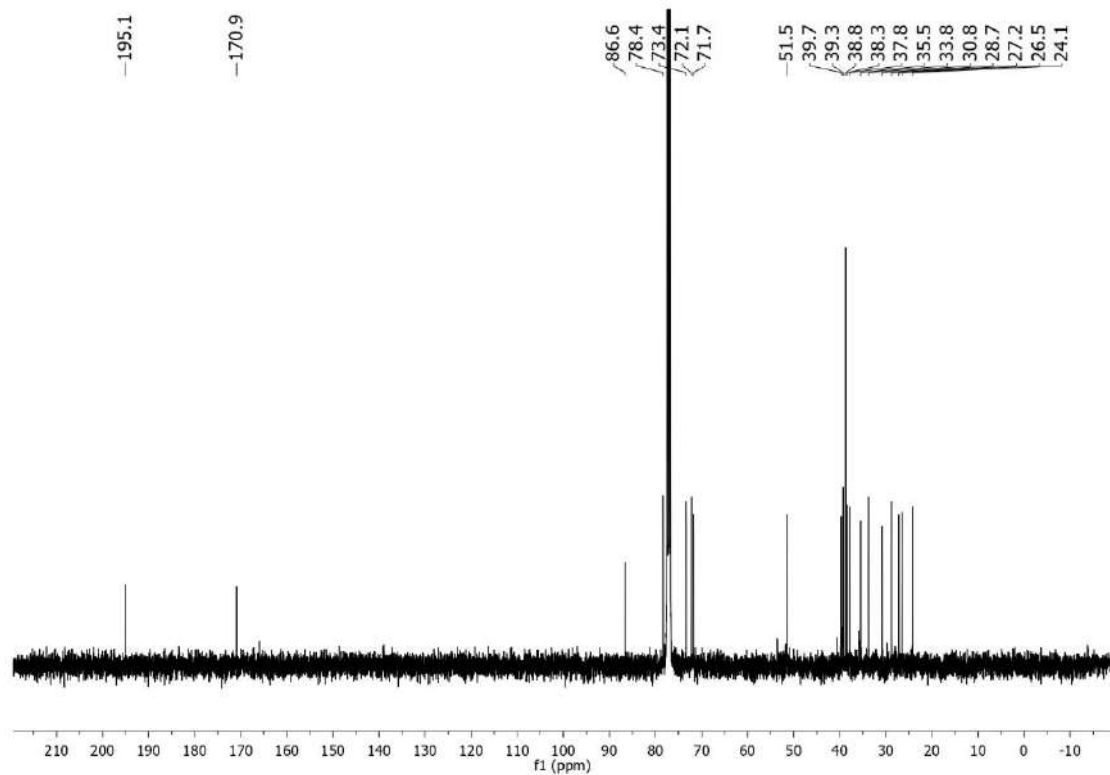
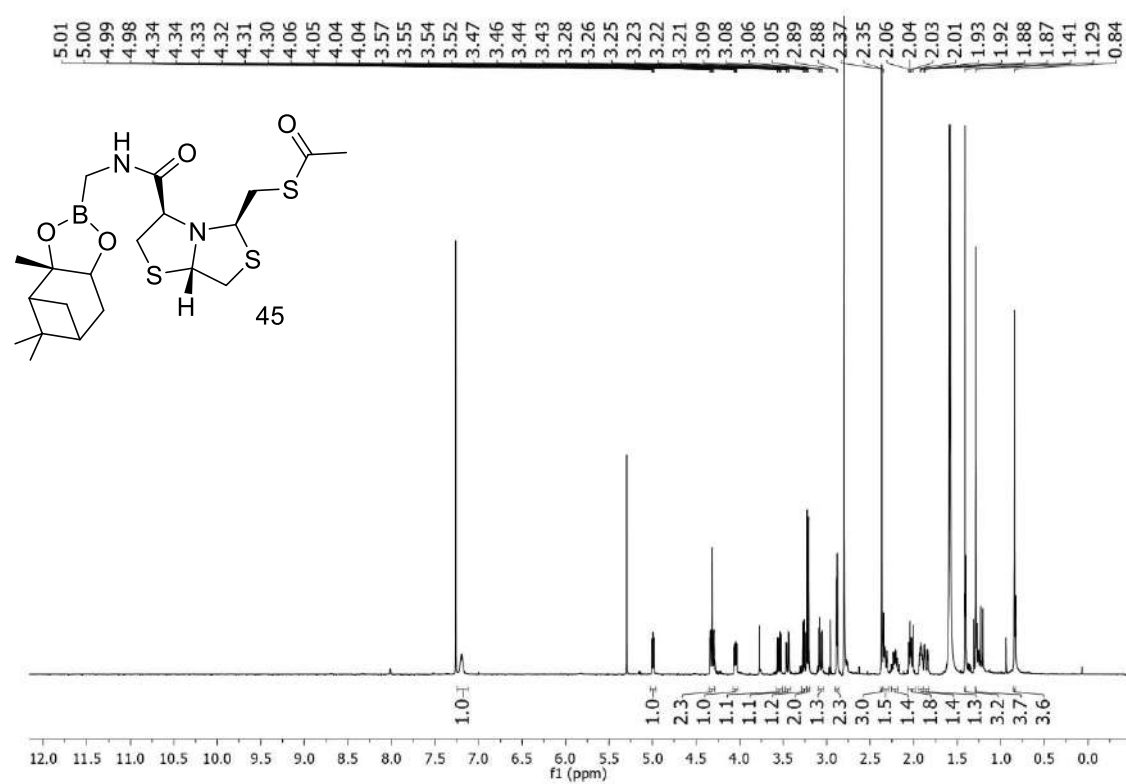
Compuesto **42**:



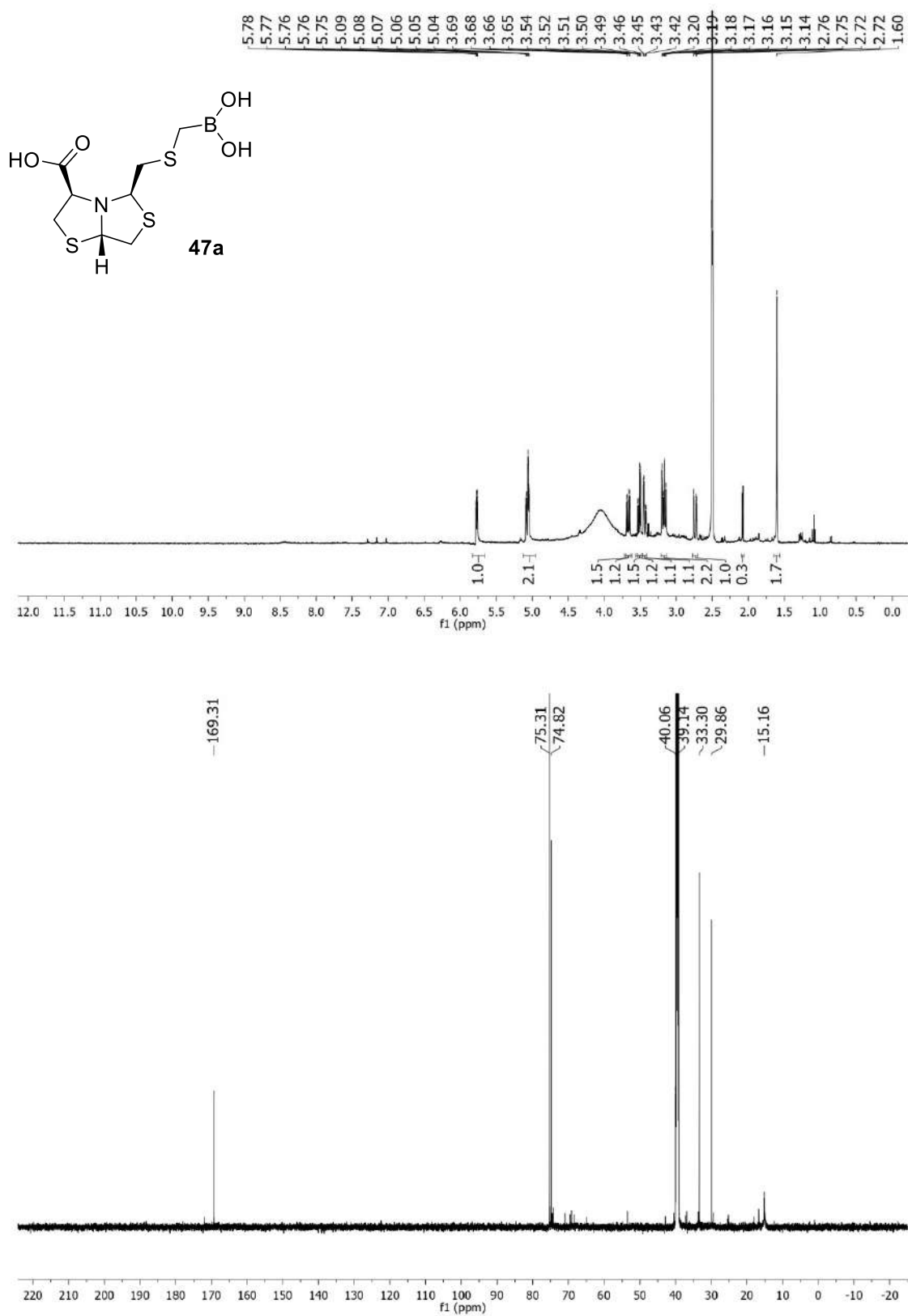
Compuesto **43**:

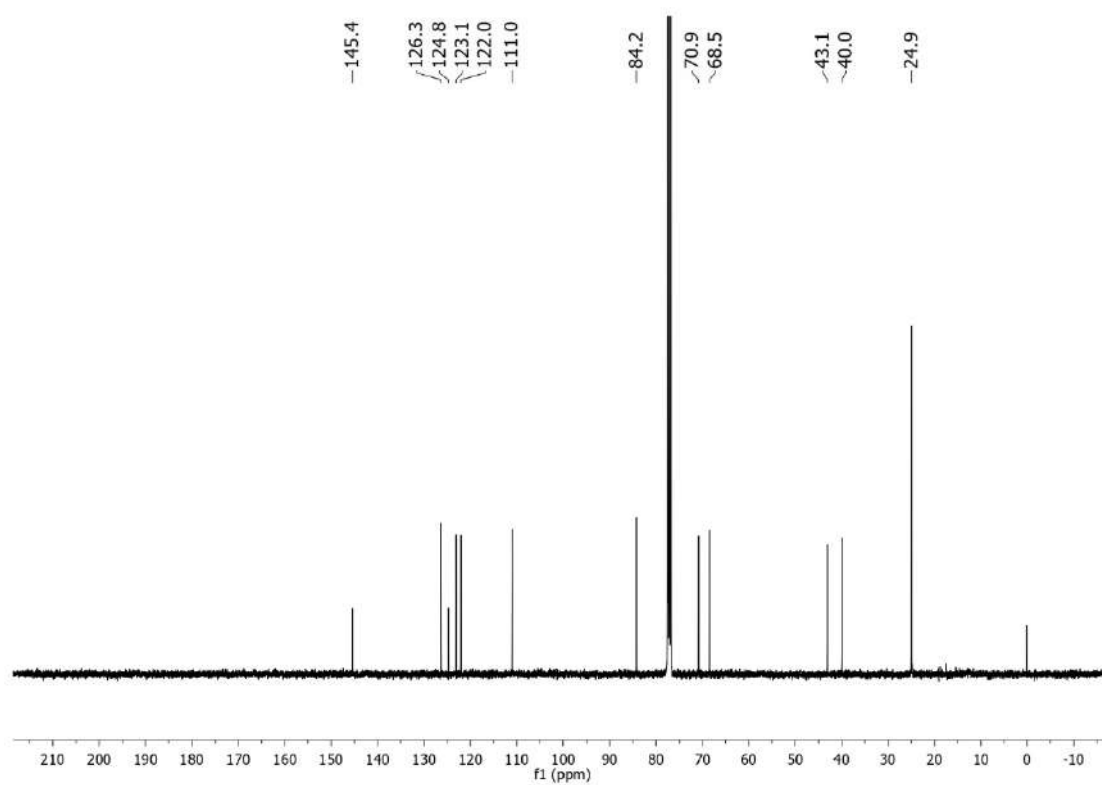
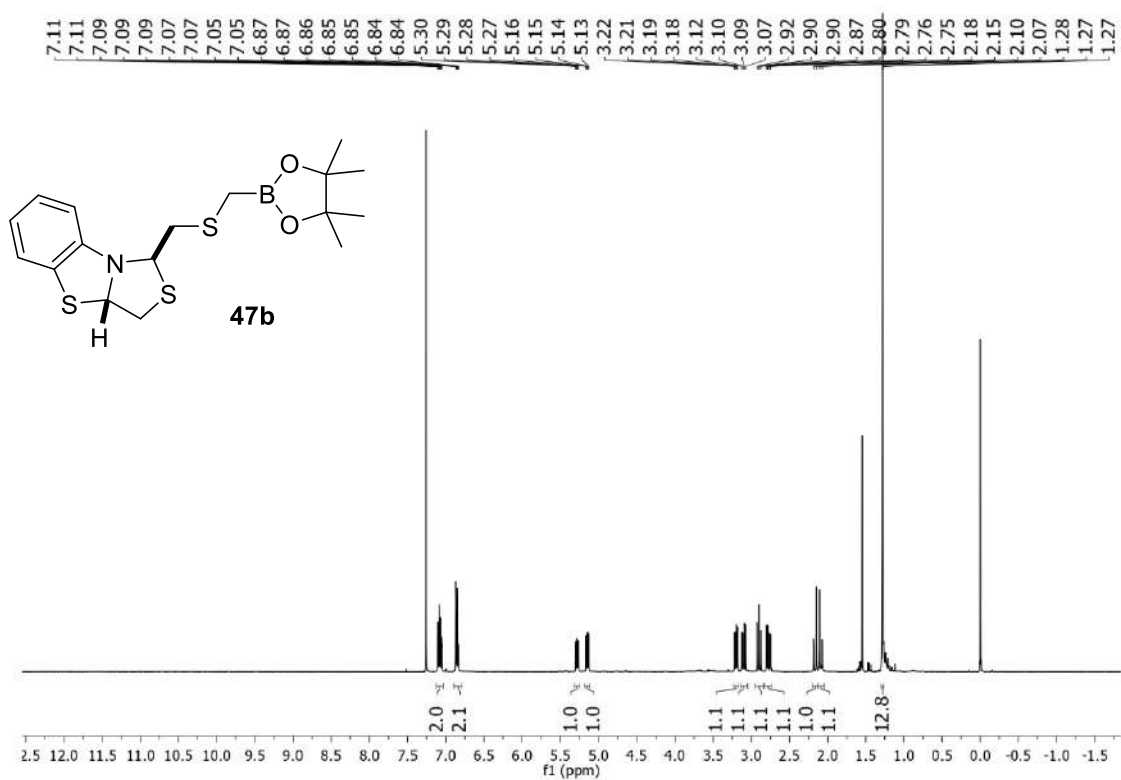
Compuesto **44**:



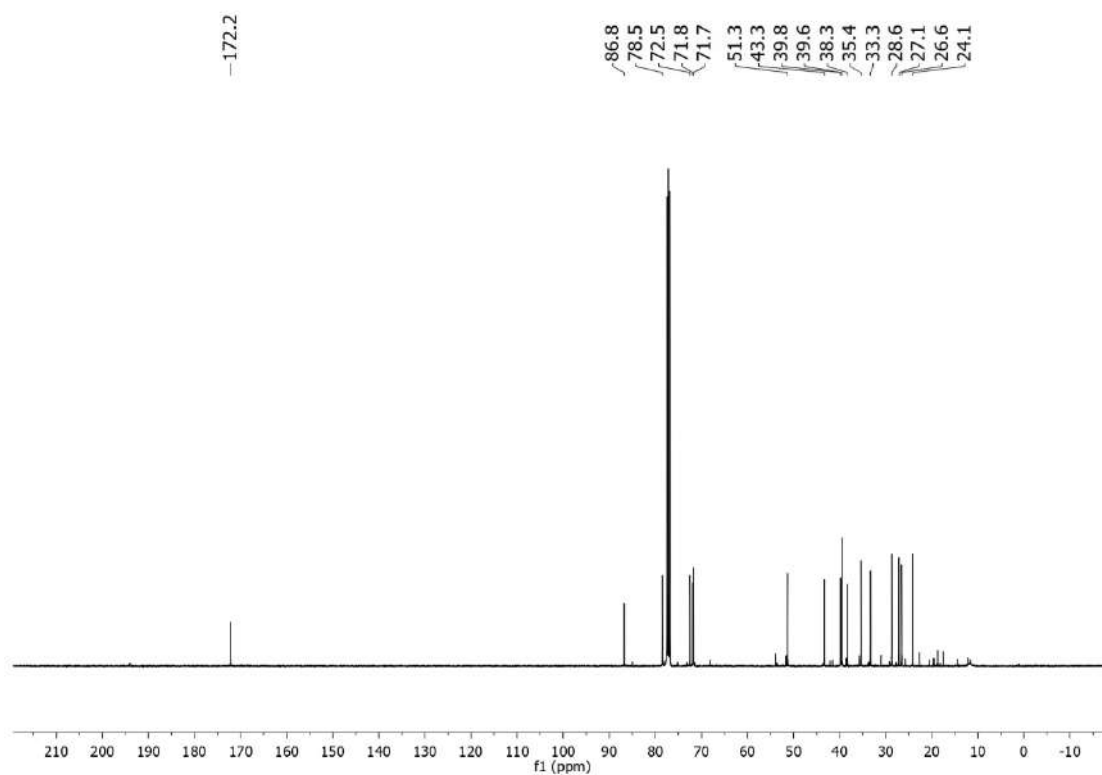
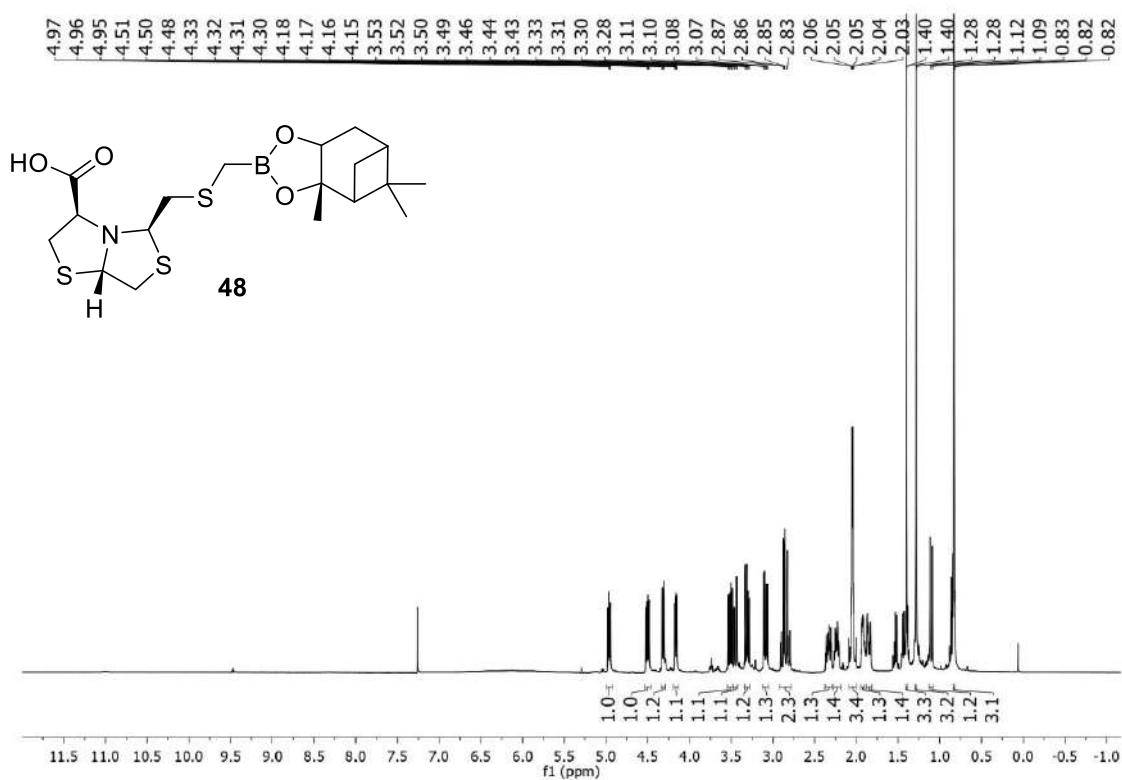
Compuesto **45**:

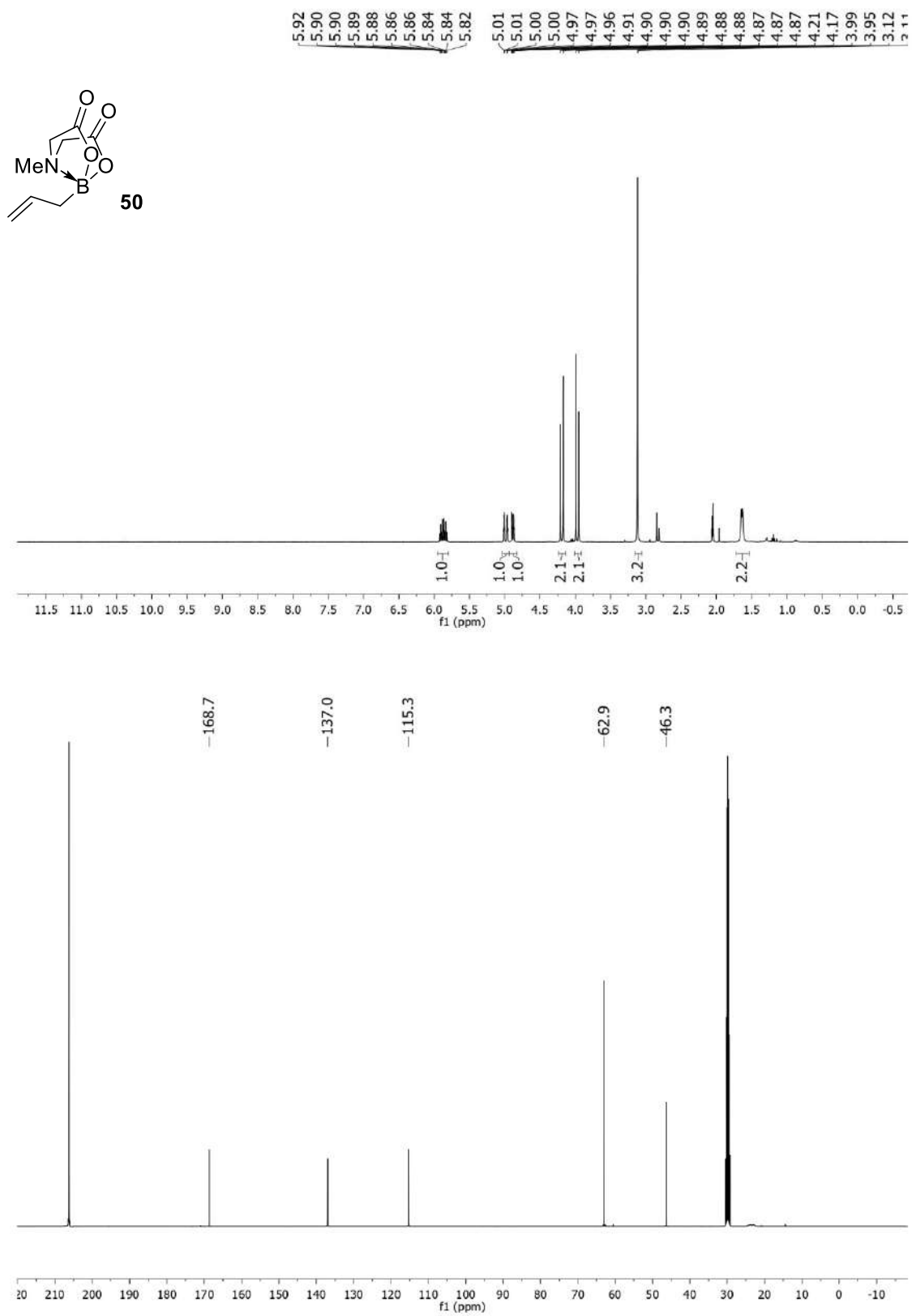
Compuesto **47a**:



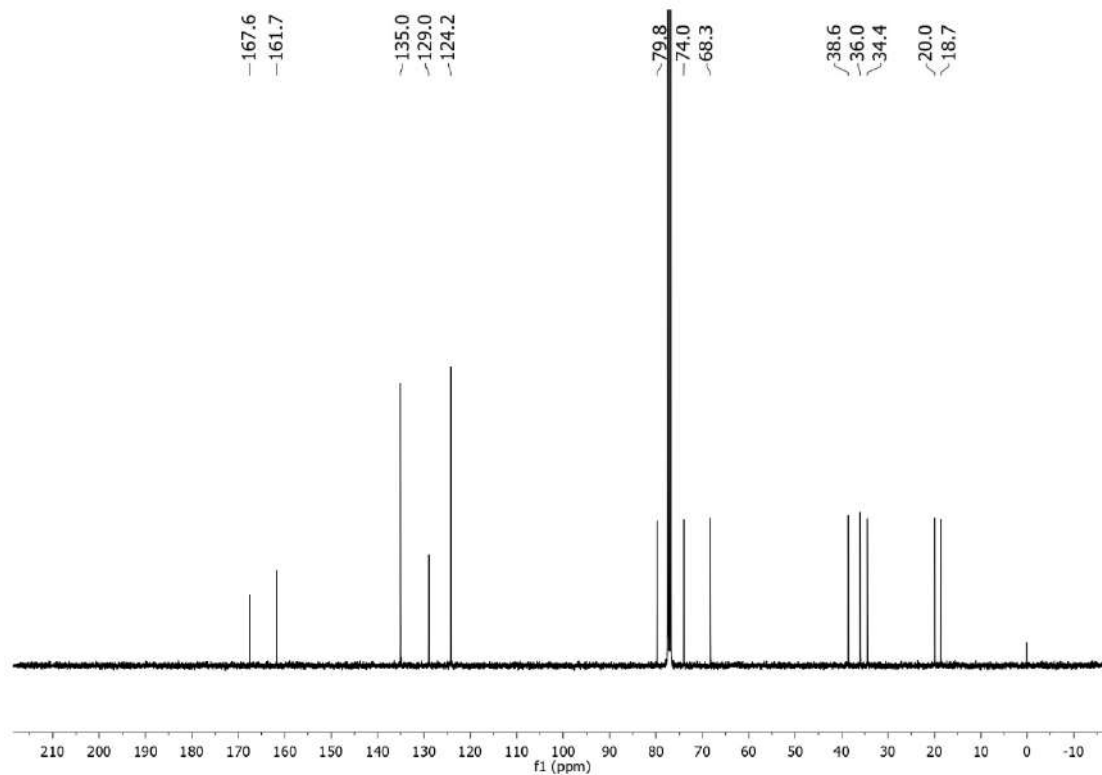
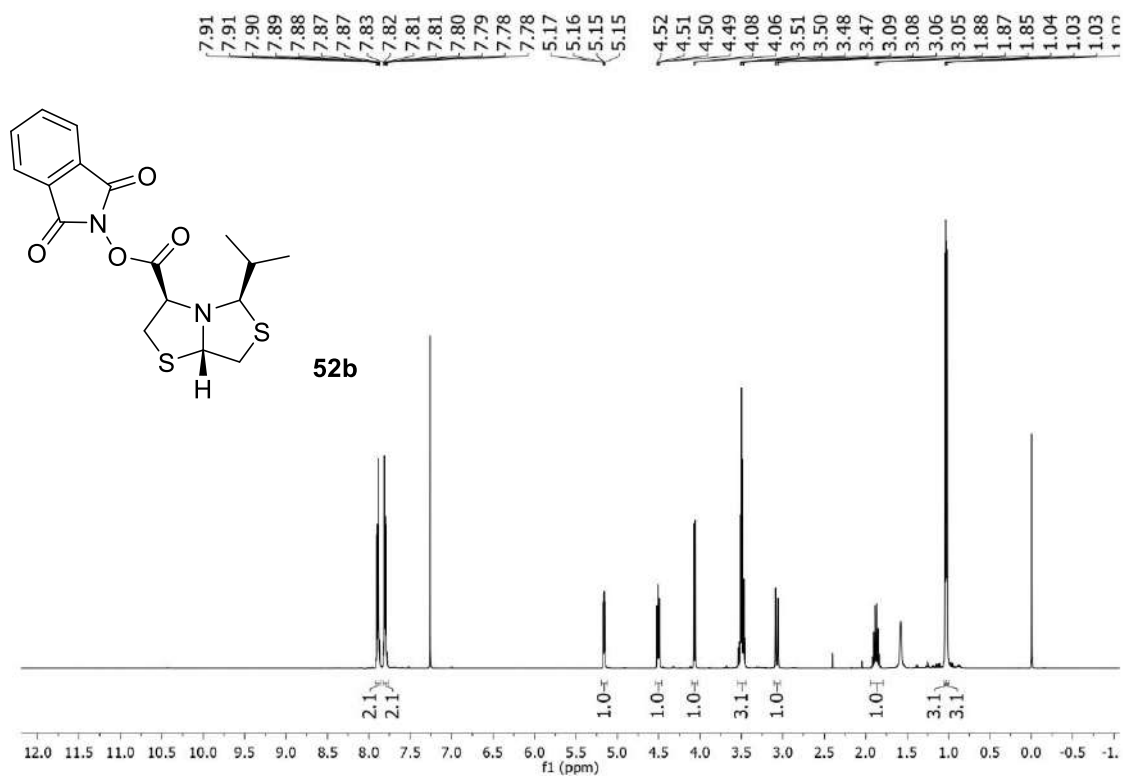
Compuesto **47b**:

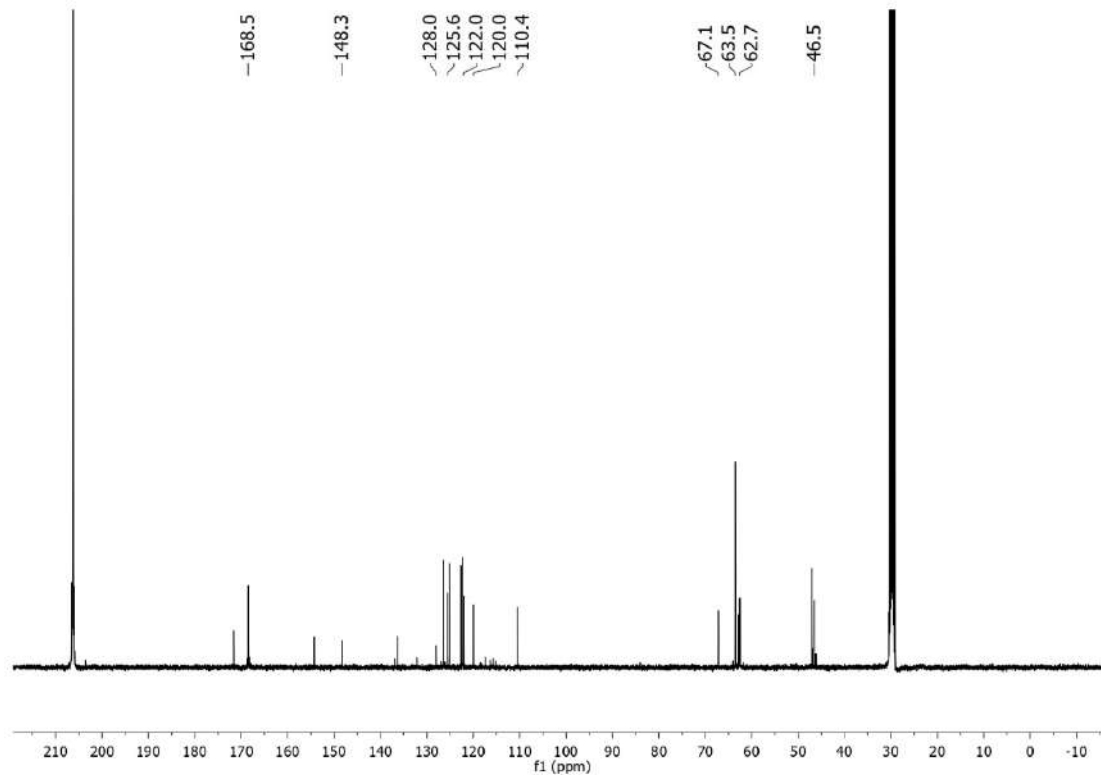
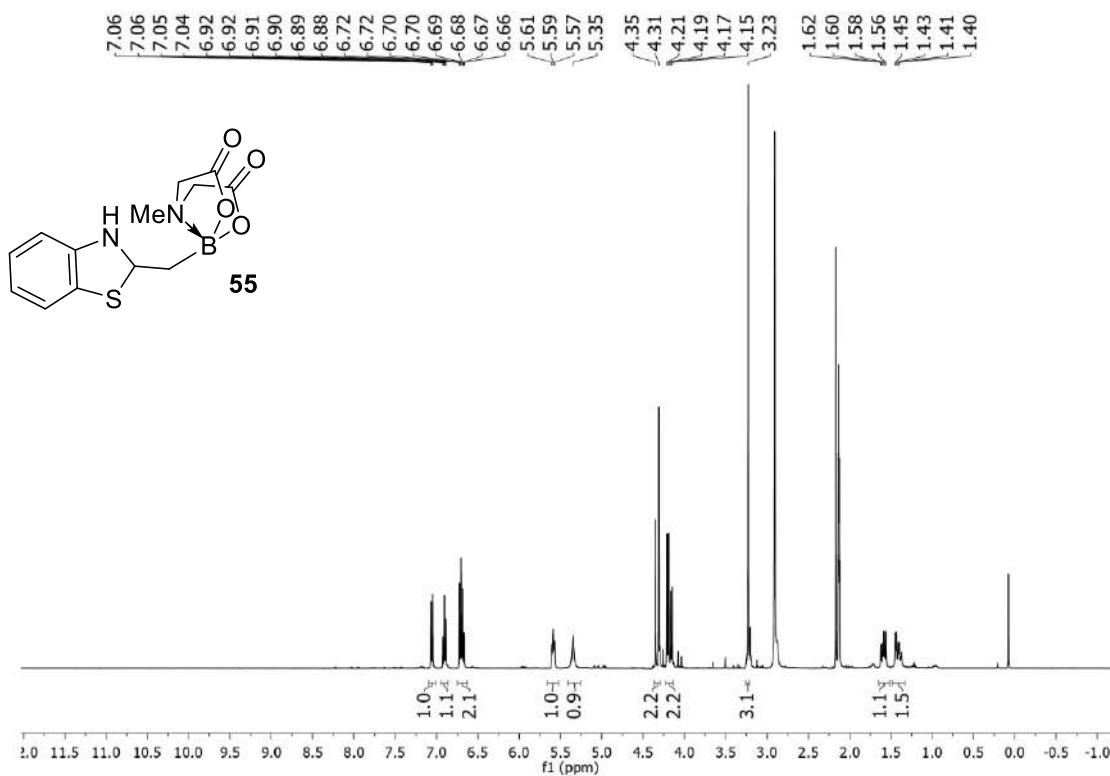
Compuesto **48**:



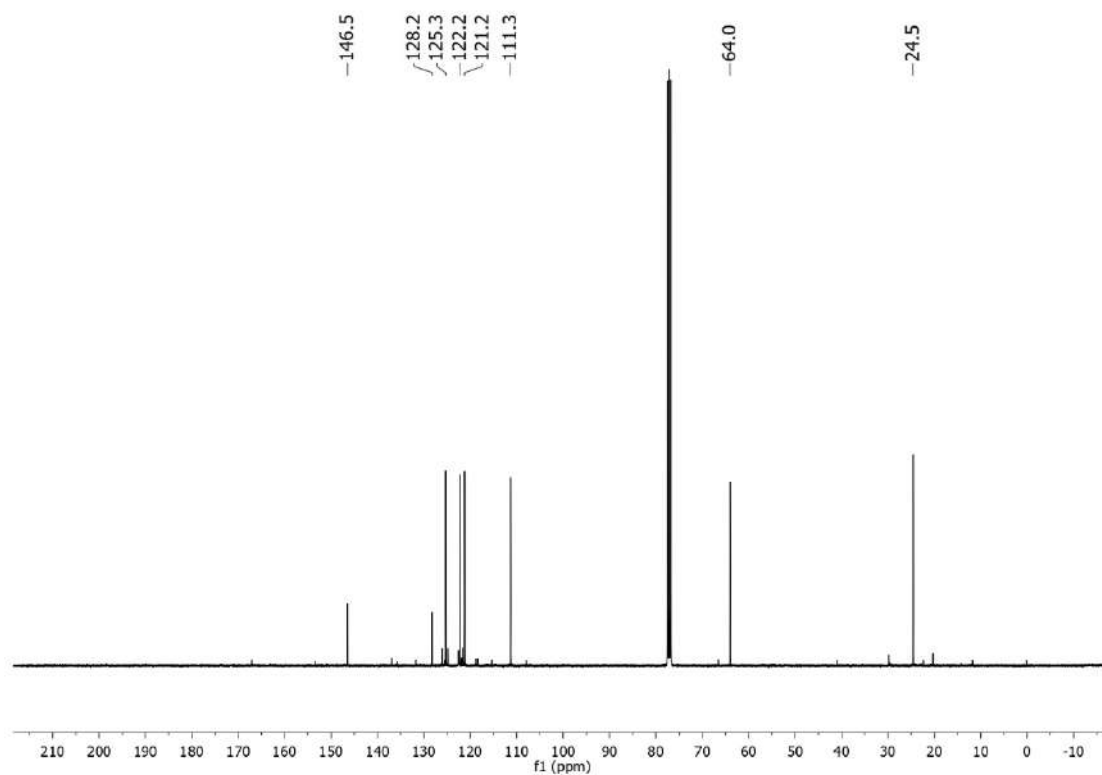
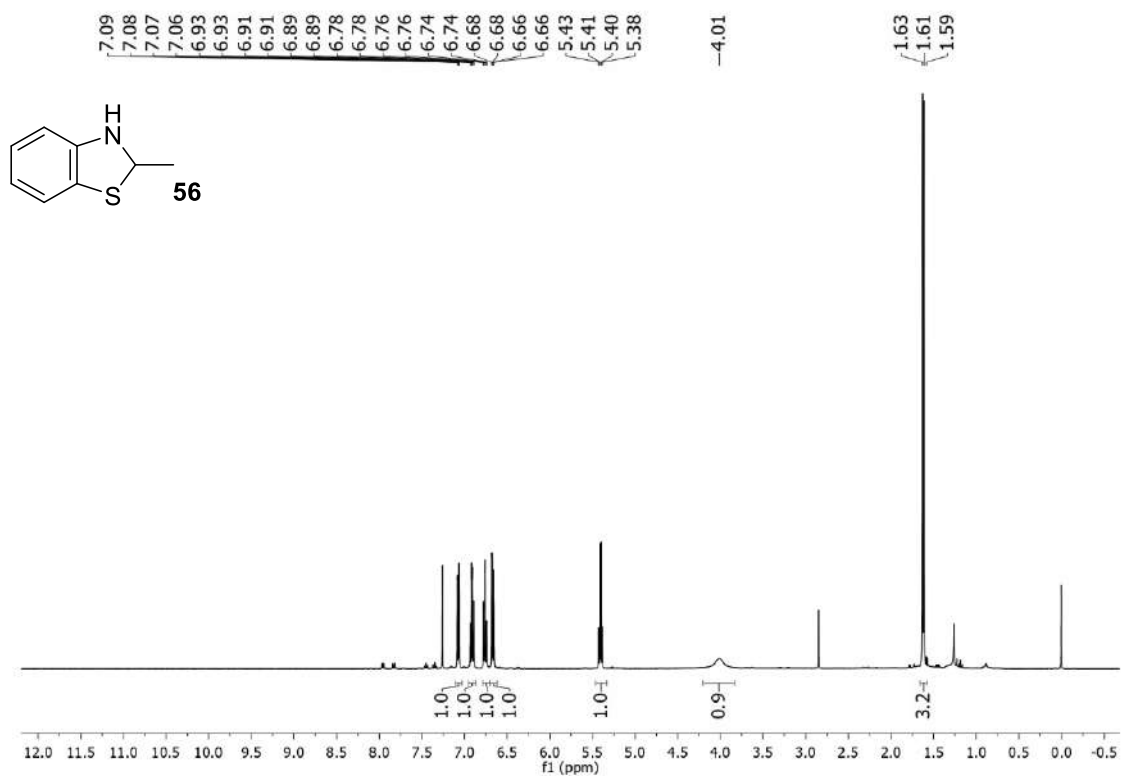
Compuesto **50**:

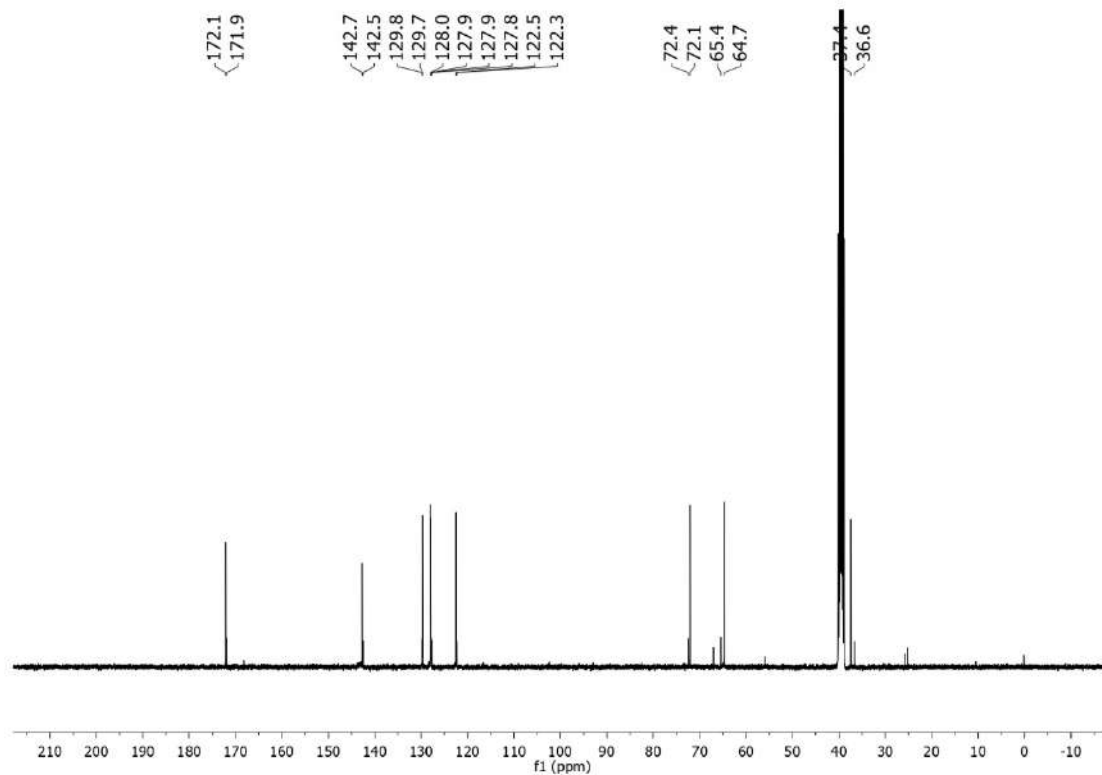
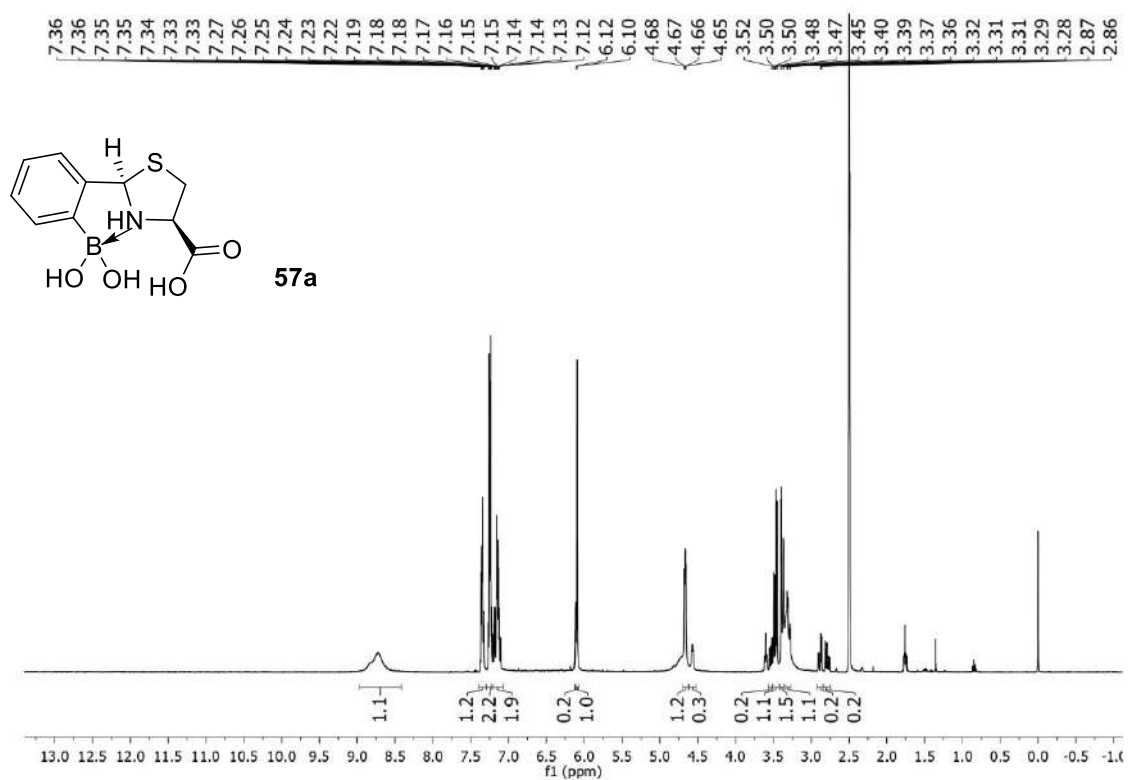
Compuesto **52b**:



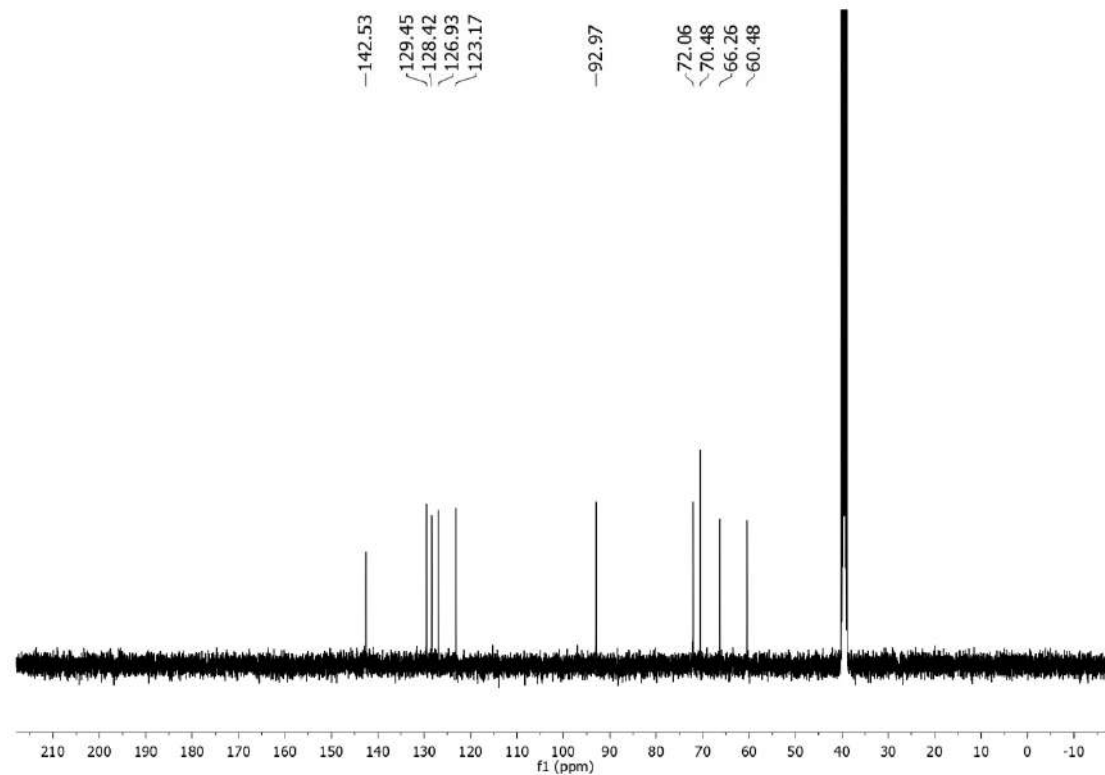
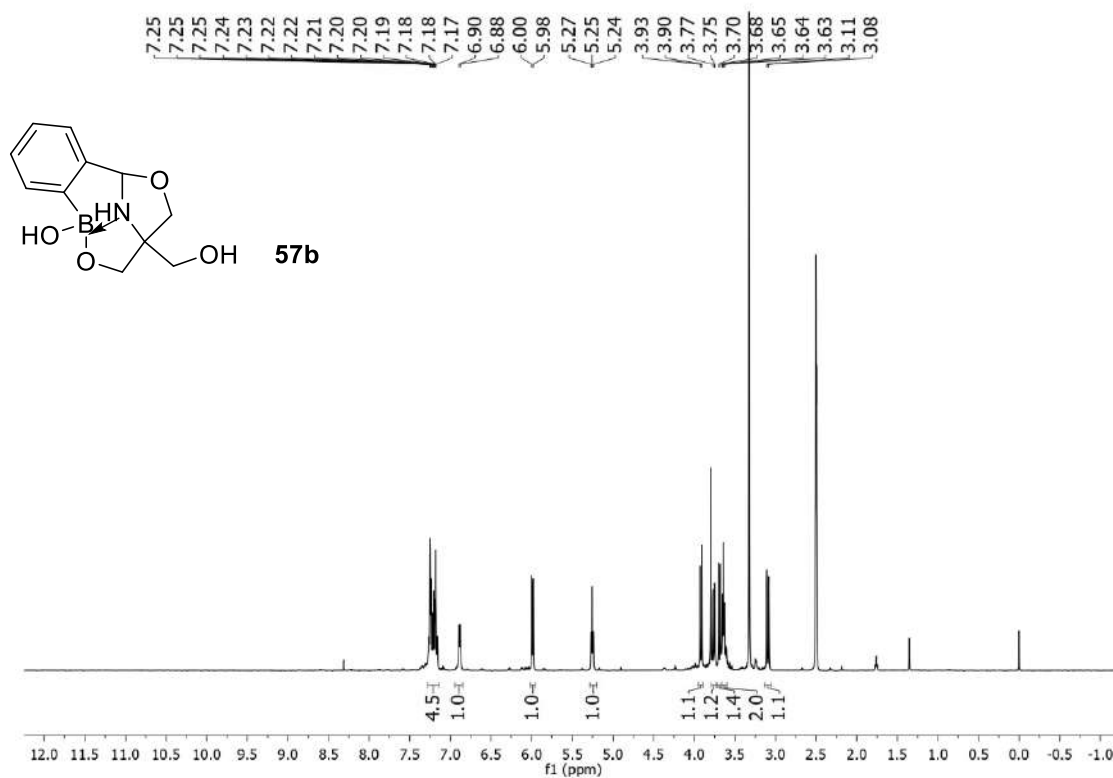
Compuesto **55**:

Compuesto **56**:



Compuesto **57a**:

Compuesto **57b**:



ANEXO II

Papers Publicados



OPEN ACCESS

EDITED BY

Thierry Brigaud,
CY Cergy Paris Université, France

REVIEWED BY

William Brittain,
Durham University, United Kingdom
Gosuke Hayashi,
Nagoya University, Japan

*CORRESPONDENCE

Graciela Mahler,
gmahler@fq.edu.uy

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to Organic Chemistry, a section of the journal Frontiers in Chemistry

RECEIVED 02 May 2022

ACCEPTED 06 July 2022

PUBLISHED 22 August 2022

CITATION

Villamil V, Saiz C and Mahler G (2022),
Thioester deprotection using a biomimetic NCL approach.
Front. Chem. 10:934376.
doi: 10.3389/fchem.2022.934376

COPYRIGHT

© 2022 Villamil, Saiz and Mahler. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Thioester deprotection using a biomimetic NCL approach

Valentina Villamil^{1,2}, Cecilia Saiz¹ and Graciela Mahler^{1*}

¹Laboratorio de Química Farmacéutica (DQO), Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ²Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay

The reversibility of the thiol-thioester linkage has been broadly employed in many fields of biochemistry (lipid synthesis) and chemistry (dynamic combinatorial chemistry and material science). When the transthioesterification is followed by a S-to-N acyl transfer to give an amide bond, it is called Native Chemical Ligation (NCL), a high-yield chemoselective process used for peptide synthesis. Recently, we described thioglycolic acid (TGA) as a useful reagent for thioester deprotection both in solution and anchored to a solid-support under mild conditions. Inspired by NCL, in this work, we extended this approach and explored the use of 2-aminothiols for the deprotection of thiols bearing an acyl group. The best results were obtained using cysteamine or L-cysteine in an aqueous buffer pH 8 at room temperature for 30 min. The described approach was useful for S-acetyl, S-butyryl, and S-benzoyl heterocycles deprotection with yields up to 84%. Employing this methodology, we prepared six new analogs **2** of mercaptomethyl bisthiazolidine **1**, a useful inhibitor of a wide-range of Metallo- β -Lactamases (MBLs). Compared with the previous methodologies (TGA polymer supported and TGA in solution), the biomimetic deprotection herein described presents better performance with higher yields, shorter reaction times, less time-consuming operations, easier setup, and lower costs.

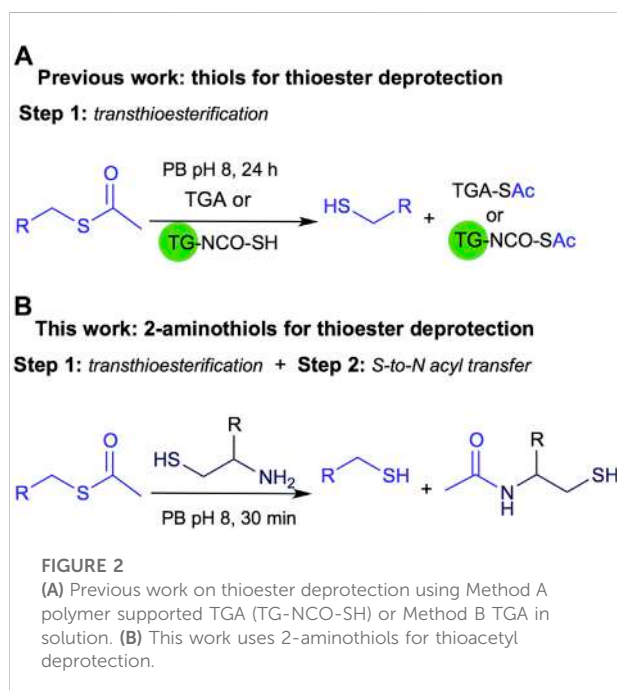
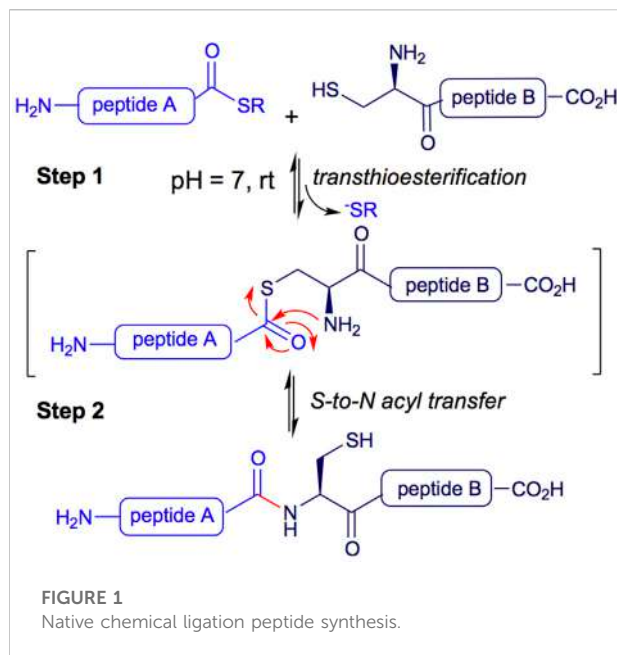
KEYWORDS

thioester deprotection, transthioesterification, native chemical ligation, bisthiazolidine, thiol

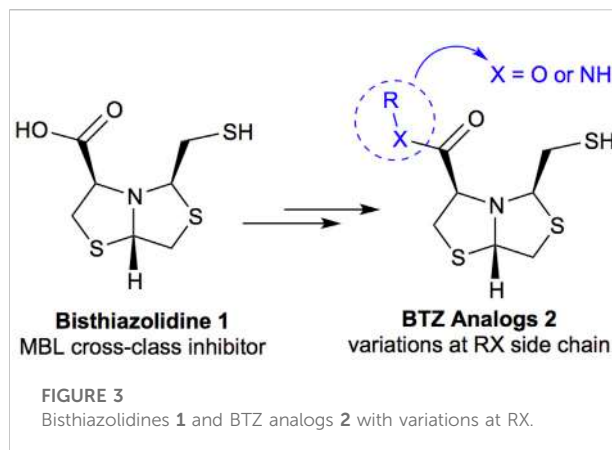
Introduction

The thiol-thioester exchange occurs smoothly in neutral aqueous media at room temperature and is a highly chemoselective process. Due to these ideal features, this exchange reaction is found in many natural processes, including energy metabolism, mitosis, and autophagy (Pietrocola et al., 2015). Moreover, the abundance of thioester-mediated processes in nature has led to speculation regarding the role of these derivatives in the origin of life (Chandru et al., 2016; Vallee et al., 2017).

Besides the importance of the thiol-thioester exchange in biochemical processes, the reversibility of this linkage has been broadly used in the field of dynamic combinatorial chemistry (Mondal and Hirsch, 2015) and, more recently, applied in material science (Worrell et al., 2018).



In particular, Native Chemical Ligation (NCL) is a methodology used for peptide synthesis. It is a high-yielding chemoselective process, successfully applied to peptide and protein synthesis, chemical modification of proteins, protein-protein ligation, and the development of probes and molecular machines (Dawson et al., 1994; Gui et al., 2016; Burke et al., 2017). The NCL process begins with a reversible transthioesterification between two peptides. The mercapto group of an N-terminal cysteine



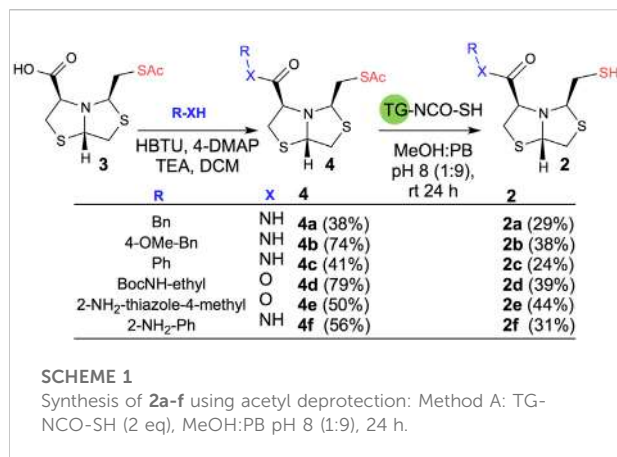
residue of a peptide B attacks the C-terminal thioester of a second unprotected peptide A in an aqueous buffer at pH 7.0 (see Figure 1, Step 1). A second step consists of an S-to-N acyl transfer, leading to the formation of an amide bond between both peptides A and B (Figure 1, Step 2) (Serra et al., 2020).

Recently, we described another application of this reversible process applied to thiol deprotection in solution under mild conditions. This methodology is a valuable tool, especially when the substrate does not support harsh conditions like strong basic media. The deprotection is carried out using thioglycolic acid anchored to a solid support like TentaGel® resin (TG-NCO-SH, Method A) or in solution (Method B), Figure 2A (Villamil et al., 2021). Both homogeneous and heterogeneous approaches were conveniently carried out at room temperature, in aqueous buffer at pH 8, and the methods were useful for thioacetyl deprotection of several substrates, affording the free thiol after 24 h of reaction.

Bisthiazolidines **1** (BTZ) are cross-class metallo- β -lactamases (MBLs) inhibitors active *in vitro* and against MBL-expressing bacterial pathogens, Figure 3. These compounds were designed as penicillin analogs and behaved as competitive inhibitors of MBLs from all subclasses, with K_i values in the micromolar range. BTZ were effective against NDM-1, VIM-2, L1, and IMP-1, all MBLs of clinical importance (Mojica et al., 2015; González et al., 2016; Hinchliffe et al., 2016).

Previous studies showed that the mercaptomethyl group present in **1** is essential for MBL inhibition (Hinchliffe et al., 2016). With this in mind, we aimed to prepare new bisthiazolidine analogs **2** with variations on the carboxylic acid (R) in order to improve the inhibition activity. The synthetic route proposed includes thiol deprotection as the key step, see Figure 3.

Inspired by the NCL approach, in this work we propose to use 2-aminothiols for the deprotection of the thioacetyl derivatives as shown in Figure 2B. Although NCL is widely used in several fields of organic chemistry, to the best of our knowledge, it has not been explored for thioester deprotection in solution.



Results and Discussion

In order to prepare new BTZ analogs **2**, first we synthesized S-acetylated bithiazolidine **3** as previously described (Villamil et al., 2021). Then, amides **4a–c**, **4f**, and esters **4d–e** were obtained starting from **3** and the corresponding amine or alcohol (R-XH), using HBTU as a coupling agent in DCM with yields ranging from 38 to 79%, see Scheme 1.

Based on our previous results, we performed the deprotection of thioacetylated compounds **4a–f** using TGA anchored to a TentaGel® resin (TG-NCO-SH), Method A. In this reaction, a transthioesterification process occurs between the thioester and the thiol. The mercaptomethyl derivatives **2a–f** were obtained after chromatographic column purification with yields ranging from 24 to 44%, as shown in Scheme 1.

Inspired by the Native Chemical Ligation (NCL) mechanism, where a transthioesterification reaction is followed by a 1-5 S,N-acyl transfer to form an amide and shift the equilibrium toward the product (Figure 1; Agouridas et al., 2019) and the report for the use of cysteamine (Cym) in acetonitrile under reflux for the conversion of simple and unfunctionalized thioesters into thiols (Endo et al., 1974), we envisioned that 2-aminothiols **5a–c** could be useful for the deprotection of acyl thioesters, as shown in Figure 2B.

In order to rapidly evaluate several sets of reaction conditions, we used reaction miniaturization, a concept developed by High Throughput Experimentation (HTE) to find the best reagents and conditions for a desired product. HTE is a tool that allows to perform a large number of experiments in parallel. The advantages of the reaction miniaturization studies is that they require a few milligrams of reagents (microscale) and shorter manipulation times compared to traditional experimentation (Wong and Cernak, 2018; Mennen et al., 2019).

Experimental and computational studies support the notion of the thiolate as the effective nucleophilic species in NCL (Wang

TABLE 1 Optimization of thioester deprotection using different 2-aminothiols **5a–c** for the deprotection of **3**.

Reaction scheme showing the deprotection of compound **3** to compound **1** using 5, BP.

HPLC **1** yield (%)^[a]

	pH	Time (h)	L-CysOEt 5a	L-Cys 5b	Cym 5c
1	7	0.5	nd	64	69
2		1	nd	80	79
3		2	76	90	84
4	8	0.25	nd	62	62
5		0.5	68	83	89
6		1	nd	78	73
7		2	90	nd	nd

^[a]Yields were determined using a validated HPLC technique in which BTZ **1** was used as external standard.

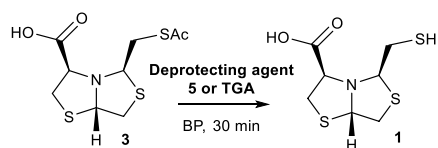
et al., 2011; Diemer et al., 2022). In this sense, the aminothiols **5a–c** to be screened were selected basically based on the pK_a value of the thiol, dismissing other possible ionic species (Maguire et al., 2020).

We reasoned that L-Cysteine ethyl ester (L-CysOEt, **5a**) bearing a thiol with a pK_a = 6.5 could be first explored since it is close to neutral pH (Friedman et al., 1965). According to the Henderson-Hasselbach equation, the ratio of the L-CysOEt species SH/S[−] is 1/2.5 in H₂O at pH 7.30 (Henderson, 1908). A different aspect to consider is that thiolates are susceptible to oxidation (leading to disulfide species), a process that is accelerated when the pH of the solution is close to or above the thiol pK_a.

Taking these considerations into account, the deprotection reaction of **3** was screened in aqueous buffers pH range from 5 to 8, aminothiol **5a** equivalents from 1 to 10 and the time from 0.5 to 6 h, see Supplementary Table S1. Aliquots were taken at different times and diluted for HPLC analysis. Overall, the best conditions for **3** deprotection were achieved using 2 eq L-CysOEt at pH 8, during 2 h to give **1** in 90% yield (see Supplementary Table S1). Since the thiol–thioester exchange is an equilibrium (Bongiardina et al., 2021), an excess of the deprotecting agent **5a** is required to shift the equilibrium toward the desired product. The reactions performed at pH 5 and 6 provided the less favorable yields, even when using more equivalents of 2-aminothiol or longer reaction times.

Based on these results, we extended the screening of 2-aminothiols including L-Cysteine (L-Cys, **5b**) and Cysteamine (Cym, **5c**) for the deprotection of thioacetyl bithiazolidine **3**. These 2-aminothiols bear a thiol pK_a value of 8.3 and

TABLE 2 Deprotection of thioester **3** under optimized conditions MeOH:BP (1:9), pH 8, rt, 30 min, aminothiols **5** (2 eq) or TGA (2 eq).



Entry	Deprotecting agent (2 eq)	1 Yield (%) ^[a]
1	L-CysOEt 5a	65
2	L-Cys 5b	75
3	Cym 5c	78
4	TGA ^[b]	56 ^[b]

^[a]Yields correspond to purified compounds by column chromatography on flash SiO₂.

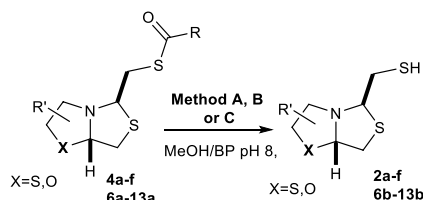
^[b] values were obtained from reference (Villamil et al., 2021).

8.2 respectively (Pitman and Morris, 1979). Thus, to ensure a significant amount of thiolate, the reaction was performed at pH 7 (Table 1 entry 1–3) and pH 8 (Table 1, entry 4–7), and the reaction time was screened from 0.25 to 2 h using 2 equivalents of **5b/c**.

Both 2-aminothiols, L-Cys **5b** and Cym **5c**, gave similar yields compared to L-Cys-OEt **5a**. Overall, Cym **5c** was the best deprotecting agent, using 2 equivalents at pH 8 after only 30 min, affording **1** in 89% HPLC yield, Table 1, entry 5.

The HTE allowed us to find the best reaction conditions by running several experiments simultaneously rather than carrying out single ones, reducing the cost and time of the experiments. Overall, we performed 23 reactions in aqueous media, using less than 30 mg of compound **3** to find the optimal conditions for the deprotection reaction. This example shows the potential of the

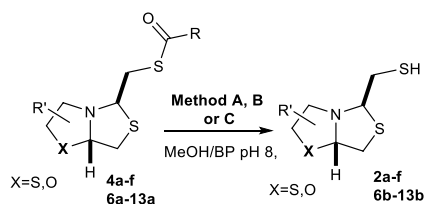
TABLE 3 Thiol deprotection yield (%) using Method A, B and C of different substituted BTZ. Method A: TG-NCO-SH (2 eq) MeOH:BP pH 8 (1:9), 24 h; Method B: TGA (2 eq), MeOH:BP pH 8 (1:9), 0.5 or 24 h; Method C: Cym (2 eq), MeOH:BP pH 8 (1:9) 0.5 h.

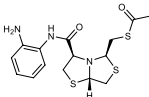
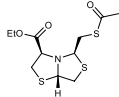
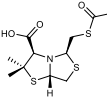
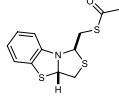
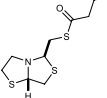
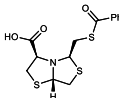
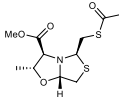


Entry	Starting Material		Method, Yield %, (time h)			
			Product	A, (24 h)	B, (0.5 or 24 h)	C, (0.5 h)
1		4a	2a	29	15 (0.5)	64
2		4b	2b	38	10 (0.5)	50
3		4c	2c	24	10 (0.5)	58
4		4d	2d	39	28 (0.5)	70
5		4e	2e	44	24 (0.5)	68

(Continued on following page)

TABLE 3 (Continued) Thiol deprotection yield (%) using Method A, B and C of different substituted BTZ. Method A: TG-NCO-SH (2 eq) MeOH:BP pH 8 (1:9), 24 h; Method B: TGA (2 eq), MeOH:PB pH 8 (1:9), 0.5 or 24 h; Method C: Cym (2 eq), MeOH:PB pH 8 (1:9) 0.5 h.



Entry	Starting Material	Method, Yield %, (time h)				
		Product	A, (24 h)	B, (0.5 or 24 h)	C, (0.5 h)	
6		4f	2f	31	20 (0.5)	78
7		6a	6b	6,610	56 (24)*	59
8		7a	7b	9,210	71 (24)*	84
9		8a	8b	7,910	77 (24)*	80
10		9a	9b	6,610	51 (24)*	59
11		10a	8b	6,110	58 (24)*	51
12		11a	1	7,610	75 (24)*	78
13		12a	12b	6,810	69 (24)*	80
14		13a	13b	6,510	53 (24)*	61

Yields correspond to purified compounds by column chromatography on flash SiO₂.

*: value extracted from (Villamil et al., 2021)..

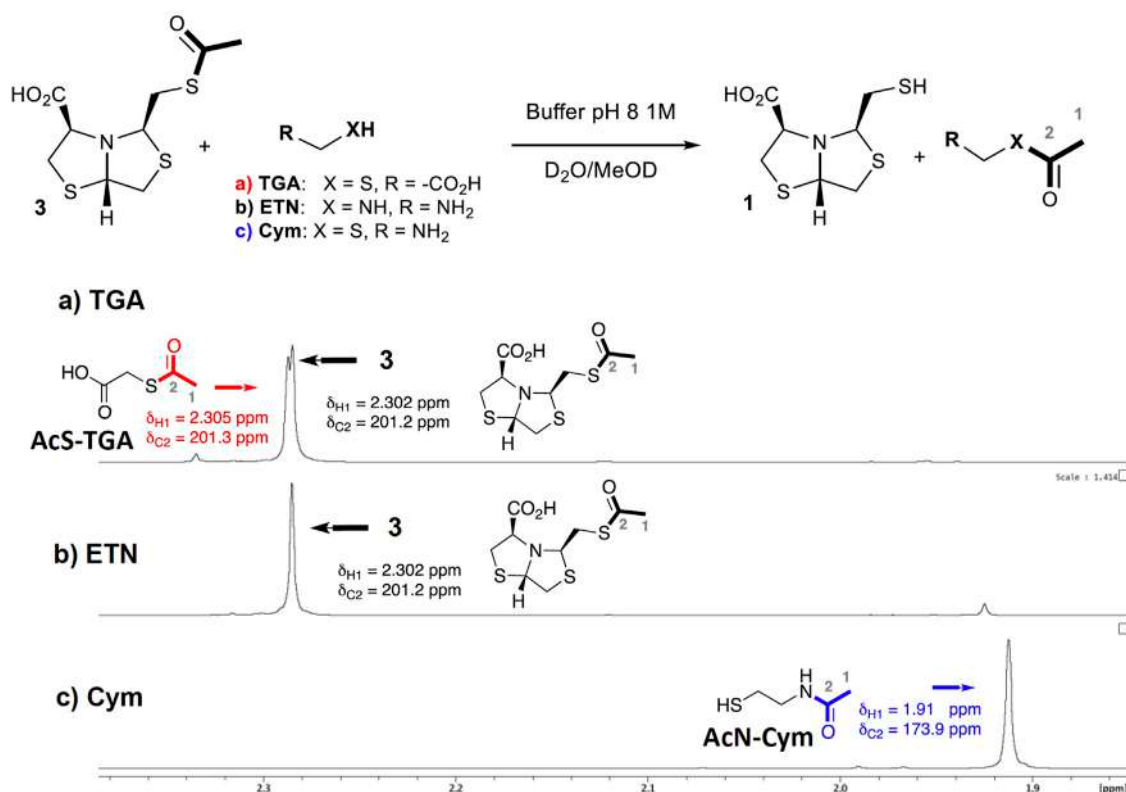


FIGURE 4

Comparison of ^1H -NMR spectra for the deprotection reaction of **3** using different additives. Reaction of **3** (0.04 mmol) in D_2O , PB [1 M] at pH 8, and MeOD- d_4 (10%) at 27°C after 40 min: (A) TGA (0.08 mmol); (B) ethylenediamine (0.08 mmol); (C) Cym **5c** (0.08 mmol). The ^{13}C chemical shift of C2 atoms was obtained from ^1H , ^{13}C -HMBC correlations to the respective acetyl protons.

reaction miniaturization tool, mainly due to waste reduction and shorter time-consuming operations.

Reaction scale-up for the deprotection of thioacetyl **3**

Once the best reaction conditions were established, the reaction was scaled-up for deprotection of **3** using 2-aminothiols L-CysOEt **5a**, L-Cys **5b**, and Cym **5c** at pH 8 for 30 min. The isolated yields of **1** were 65%, 75%, and 78%, respectively, see Table 2, entries 1, 2, and 3. These results correlate well with the yields determined by HPLC at 68%, 83%, and 89%, respectively (Table 1), validating the results obtained by HTE. The three 2-aminothiols employed afford the free thiols in better yields than previously described TGA in solution (56% yield after 30 min), Table 2. The yield values for TGA in solution was obtained in a previous work (Villamil et al., 2021).

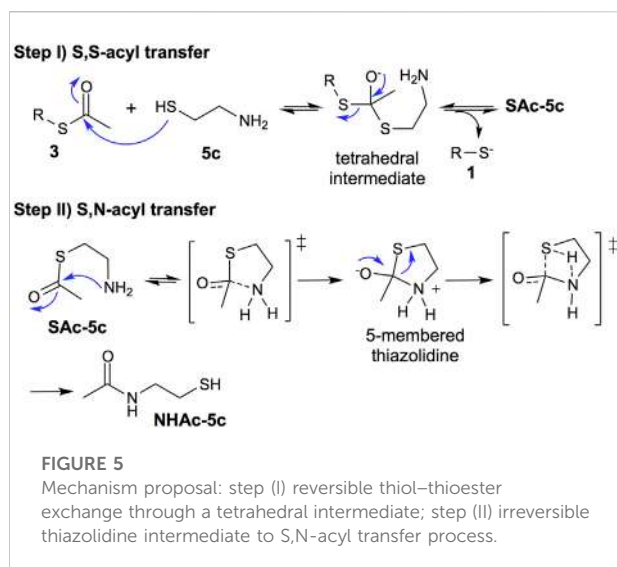
Deprotection of thioacetyl bicycles **4a-f** using the optimized conditions (Method C: Cym **5c** pH 8, 30 min at rt) led to analogs **2a-f** in yields ranging from 50 to 78%, Table 3. The average yield was 65%, remarkably higher than those obtained using the TGA

solid-supported approach (Method A, average yield of 34%). In addition, the reaction time decreased from 24 h to 30 min. This aspect is crucial since products **2a-f**, containing a free thiol, are easily oxidized in aqueous buffer. 2-aminothiols **5** allowed to set up reactions in shorter reaction times compared with TGA, affording better yields, probably by avoiding product oxidation.

In order to highlight the best performance of Cym regarding TGA in solution, we carried out the deprotection reaction of the new derivatives **4a-f** using method B (TGA in solution) after 30 min instead of 24 h, to compare the yields with method C (Cym in solution). The average yields were methods B and C, was 18% and 65%, respectively, significantly higher when using Cym, Table 3. The yield values for methods A and B (24 h) were obtained in a previous work (Villamil et al., 2021).

Reaction scope

To extend the methodology scope, different S-acyl bishiazolidines **6a-11a**, and S-acetyl oxazolidines **12a** and **13a** were assayed using Cym **5c** (Method C) and compared with our



previous results using TGA solid-supported and TGA in solution (Method A and B, respectively) (Villamil et al., 2021), see Table 3.

Method C smoothly deprotected S-acetyl bithiazolidines/oxazolidines **6a–9a**, **12a**, and **13a** with yields ranging from 59 to 84%, Table 3, entries 7–10, 13, and 14. In addition, different acyl side chains like propyl thioester **10a** and benzoyl thioester **11a** were deprotected in moderate to good yields, 51 and 78%, respectively, in Table 3, entries 11 and 12.

Altogether, the results obtained with our previous approaches (Methods A and B) led to slightly lower average yields compared to Method C (56, 64, and 67%, respectively) and shorter reaction times, 24 h vs 30 min. In addition, regarding method A, Cym is a common reagent in organic laboratories and is less expensive than Tentagel® resin.

Overall, Method C herein reported provides better yields in a shorter time with a lower-cost reagent and easier setup.

Mechanistic insights

As described in NCL, the presence of a 2-aminothiol enables an intramolecular S-to-N-acyl migration, releasing the thiol and displacing the equilibrium the products (Wang et al., 2011). This fact suggests that when using Cym for thioester deprotection, an analogous process is occurring. In order to confirm the deprotection mechanism, NMR experiments were performed. Three sets of conditions were assayed in PB pH 8 using different deprotecting agents: 1) thioglycolic acid (TGA, 2 eq); 2) ethylenediamine (ETN, 2 eq); and 3) Cysteamine **5c** (2 eq).

In the first experiment, when using TGA for thiol deprotection, after 40 min of reaction, 50% of the deprotection product was observed and thioacetylated TGA could be detected, Figure 4A.

Transthioesterification is the main deprotection mechanism in these conditions. A complete deprotection was observed after 9 h of incubation, Supplementary Figure S1.

On the other hand, when ethylenediamine (ETN) is used, the deprotection reaction is not observed by ¹H NMR after 40 min, Figure 4B. This result indicates that only an amine group is not able to deprotect the thiol.

Finally, when Cym **5c** is used as a deprotecting agent, a complete thiol deprotection is observed after 40 min of incubation. Only N-acetylated cysteamine and free-thiol **1** were found in the ¹H-NMR spectra, while S-acetylated cysteamine was not detected, see Figure 4C. The ¹H-NMR spectra at t = 40 min comparison of experiments 1) and c) shows that the reaction rate is faster for c), observing a complete deprotection of **3**.

Based on the obtained results and the numerous studies of the NCL mechanism (Barnett and Jencks, 1969; Wang et al., 2011), we propose, as a first step, a reversible S,S-acyl transfer involving an anionic concerted S_N2 displacement mechanism with the formation of a tetrahedral intermediate, Figure 5, Step I (Barnett and Jencks, 1969). This is a common intermediate for the deprotection of thioesters using 2-aminothiols or thiols lacking the amino group.

The second step involves the S,N-acyl transfer, which could proceed by an 5-*endo-trig* cyclization to form a thiazolidine intermediate, an irreversible step faster than the thiol–thioester exchange (Figure 5, step II).

In summary, the thiol–thioester exchange step is reversible, whereas the S,N-acyl transfer is irreversible, displacing the thiol–thioester exchange equilibrium toward the product **1** and N-acetylated cysteamine (NHAc-**5c**), increasing the deprotection reaction rate.

Conclusion

In summary, we found that 2-aminothiols are suitable deprotecting agents for acyl thioester groups under aqueous mild conditions, mimicking a NCL approach. The reversibility of thiol–thioester exchange and the high efficacy of the intramolecular S,N-acyl migration process are driving forces to increase the reaction rate, affording shorter reaction times. In addition to this, the mild experimental conditions, near neutral pH, disfavor oxidation processes or bithiazolidine-ring opening, increasing the deprotection reaction yields.

The new Cym deprotection methodology allowed us to prepare six new analogs of BTZ **1** with different substitutions at carboxylic acid (**2a–f**) to further be evaluated as MBL inhibitors.

The biomimetic deprotection herein described presents better performance than previous reported methodologies (TGA polymer supported and TGA in solution), with higher

yields, less time-consuming operation, shorter reaction times, easier setup, and lower costs. We envision that these conditions could provide a simple and practical method for labile thioester hydrolysis.

Experimental section

General Methods. All reactions were carried out in dry, freshly distilled solvents under anhydrous conditions unless otherwise stated. Reactions were monitored by analytical thin layer chromatography (TLC) on 0.25 mm silica gel coated plastic sheets (SIL G/UV 254). Flash chromatography on Silica gel 60 (40 μ m average particle diameter) was used to purify the crude reaction mixtures. Yields are reported for chromatographic and spectroscopically (^1H and ^{13}C NMR) pure compounds unless otherwise stated. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400 instrument at 400 and 100 MHz, respectively. Chemical shifts (δ) are expressed in ppm downfield from TMS as an internal standard unless otherwise stated. Multiplicities are indicated as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), b (broad). Assignments of ^1H and ^{13}C NMR peaks were made based on a combination of COSY, HSQC, and HMBC spectra. Electrospray ESI high-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a MicroTOF-Q spectrometer from Bruker Daltronics. Optical rotation was measured using a Jasco p-2000 polarimeter with a 2.0 ml cell, optical path length of 100 mm and sodium lamp ($\lambda = 589$ nm) at room temperature. The concentration c is given as g/100 ml.

HPLC Equipment and Method Validation. The liquid chromatography analysis was performed using Waters HPLC equipment, with binary pumps (Waters 1,525) and a photodiode array detector (Waters 2,996), with a loop injection of 20 μ L (Rheodyne 1727). A reverse phase C18 separation column was used (Kinetex NUCLEOSIL[®] C18, 150 mm $\times$ 4 mm, 5 μ m) with detection at $\lambda = 205$ nm for all compounds at 37°C. The eluent consisted of TFA 0.003 M (mobile phase A) and MeCN (mobile phase B) at a flow rate of 1.2 ml/min. The injection volume was 20 μ L. Initial conditions 70/30 (mobile phase A/mobile phase B) changed in 2 min–55/45, maintained for 3.5 min, and changed in 0.1 min–5/95, maintained for 2.4 min. Data and chromatograms were collected and analyzed using the Empower System program by Waters Corporation, 2002. System linearity was verified in the concentration range: 0.01, 0.041, 0.102, 0.163, 0.203, and 0.244 mg/ml, prepared from a stock solution of BTZ **1**, 1 mM in MeOH. Linearity was established from the calibration curve using least squares linear regression analysis and a correlation coefficient (R^2) value of 0.9991 was found. A standard of 0.203 mg/ml was injected five times to evaluate the precision system, and a % RSD value of 1.0% was found.

Synthetic procedures

Compounds **1**, (González et al., 2016; Hinchliffe et al., 2016), **3**, (Villamil et al., 2021), **6–13** (Saiz et al., 2014; Villamil et al., 2021) were prepared according to previous reports.

Method A: General method for deprotection using TG-NCO-SH

A solution of **4a** (0.0167 g, 0.0454 mmol) in MeOH (0.5 ml) and degassed BP pH 8 1M (1.0 ml) was added to the polymer-supported deprotecting agent (TG-NCO-SH, 0.222 g, 0.0908 mmol) prepared as previously described (Villamil et al., 2021) and stirred for 24 h at room temperature under a nitrogen atmosphere. Then, the polymer was filtered and washed with MeOH. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated. The mixture was poured into a NaCl saturated solution and extracted with EtOAc (3 $\times$ 30 ml). The combined organic layers were dried, filtered, and concentrated to dryness. The crude was purified by column chromatography on flash SiO_2 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{nHex}$ 3:1) to yield **2a** (0.0043 g, 29%) as a colorless oil.

Method B: As previously described (Villamil et al., 2021)

Method C: General method for deprotection using Cym

In a two-necked flask, **4a** (0.04 g, 0.11 mmol) was dissolved in MeOH (2 ml) and BP pH 8 1M (18 ml) and cysteamine hydrochloride **5c** (0.026 g, 0.22 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature, then poured into a NaCl saturated aqueous solution (30 ml) and extracted with EtOAc (3 $\times$ 30 ml). The combined organic layers were dried, filtered, and concentrated to dryness. The crude was purified by column chromatography on flash SiO_2 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{nHex}$ 3:1) to yield **2a** (0.023 g, 64%) as a colorless oil.

Optimization of the deprotection conditions of **3** using L-Cys-OEt **5a**

Compound **3** was incubated into separate 2 ml Eppendorf[®] tubes at different pH and L-Cys-OEt **5a** concentrations, as described: **3** (100 μ L of a solution of 42 mM in MeOH) was added to aqueous buffer 1M (pH 5, 6, 7 or 8, final volume 1 ml) and L-Cys-OEt **5a** (10, 20, 60 or 100 μ L of a solution 420 mM in MeOH, corresponding to 1, 2, 6 or 10 equivalents) was added. The reaction solution was kept at 25°C and at suitable time intervals, aliquots of 100 μ L were taken and acetonitrile (400 μ L) was added. Then, the solution was vortexed, filtered, and chromatographed (Supplementary Table S1).

Optimization of the deprotection conditions of **3** using L-Cys **5b** and Cym **5c** was carried out using the same methodology as described for L-Cys-OEt **5a** (Table 1).

Representative procedure for deprotection of **3** using L-Cys-OEt **5a** in preparative scale

(Table 2) In a two-necked flask, compound **3** was dissolved (0.05 g, 0.18 mmol) in MeOH (1 ml) and added BP at pH 8 1M (19 ml) and L-Cys-OEt **5a** hydrochloride (0.067 g, 0.36 mmol). The reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature. It was poured into HCl 5% and extracted with EtOAc (3 × 30 ml). The combined organic extracts were dried, filtered, and concentrated to dryness, and the crude was purified by column chromatography on flash SiO₂ (nHex/EtOAc/AcOH 7:3:0.01) to yield **1** (0.028 g, 65%).

Deprotection of **3** using thiols **5b**, **5c**, and TGA was carried out using the same methods as described for **5a** (Table 2).

Representative procedure for the synthesis of thioacetylated BTZ **4a-f**

S-(((3R,5R,7aS)-3-(benzylcarbamoyl)tetrahydro-2H-thiazolo [4,3-b]thiazol-5-yl)methyl) ethanethioate (**4a**)

Into a two-necked flask under nitrogen atmosphere, **3** (0.1, 0.36 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (8 ml) and cooled in an ice bath. To the mixture was added HBTU (0.163 g, 0.43 mmol), DIPEA (0.139 g, 1.08 mmol), 4-DMAP (0.005 g, 0.036 mmol) and benzylamine (0.043 g, 0.4 mmol) and warmed to room temperature with stirring for 2 h. Then it was poured into a NaCl saturated aqueous solution (30 ml) and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 30 ml). The combined organic layers were dried, filtered, and concentrated *in vacuo* to dryness. The crude product was purified by column chromatography on flash SiO₂ (nHex/EtOAc 3:1) to yield **4a** (0.051 g, 38%) as a white solid: MP = 61–65°C [α]_D²⁰ -54.9 (*c* = 0.91 in CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.51 (br, 1H, NH), 7.37–7.28 (m, 5H, ArH), 4.94 (dd, *J* = 5.8, 4.1 Hz, 1H, CH), 4.53 (dd, *J* = 14.9, 6.3 Hz, 1H, CH-H), 4.44 (dd, *J* = 14.9, 5.7 Hz, 1H, CH-H), 4.33 (dd, *J* = 8.1, 5.2 Hz, 1H, CH), 4.09 (dd, *J* = 7.1, 2.9 Hz, 1H, CH), 3.55 (dd, *J* = 11.9, 5.8 Hz, 1H, CH-H), 3.52 (dd, *J* = 11.5, 2.5 Hz, 1H, CH-H), 3.27 (dd, *J* = 11.1, 7.1 Hz, 1H, CH-H), 3.19 (dd, *J* = 14.0, 5.2 Hz, 1H, CH-H), 3.13 (dd, *J* = 14.0, 8.1 Hz, 1H, CH-H), 3.09 (dd, *J* = 11.9, 4.0 Hz, 1H, CH-H), 2.14 (s, 3H, CH₃); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.1, 170.3, 138.2, 128.9, 127.8, 127.7, 73.3, 72.8, 72.0, 43.6, 39.7, 37.8, 33.6, 30.6, HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ Calcd for C₁₆H₂₀N₂O₂NaS₃ 391.0585, found 391.0585.

S-(((3R,5R,7aS)-3-((4-methoxybenzyl)carbamoyl)tetrahydro-2H-thiazolo [4,3-b]thiazol-5-yl)methyl) ethanethioate (**4b**)

Prepared in an analogous route as described for **4a**, starting from **3** (0.12 g, 0.43 mmol) and 4-methoxybenzylamine

(0.065 g, 0.47 mmol), purified by column chromatography on flash silica gel (nHex/EtOAc 2:1) to yield **4b** (0.127 g, 74%) as a colorless oil [α]_D²⁰ -73.6 (*c* = 1.96 in CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, ArH), 7.22 (dt, *J* = 4.9, 2.9 Hz, 2H, ArH), 6.88 (dt, *J* = 5.0, 3.0 Hz, 2H, ArH), 4.92 (dd, *J* = 5.8, 4.1 Hz, 1H, CH), 4.46 (dd, *J* = 14.6, 6.3 Hz, 1H, CH-H), 4.36 (dd, *J* = 14.6, 5.6 Hz, 1H, CH-H), 4.31 (dd, *J* = 7.9, 5.4 Hz, 1H, CH), 4.07 (dd, *J* = 7.1, 2.9 Hz, 1H, CH), 3.80 (s, 3H, CH₃), 3.54 (dd, *J* = 11.9, 5.8 Hz, 1H, CH-H), 3.50 (dd, *J* = 11.1, 2.9 Hz, 1H, CH-H), 3.26 (dd, *J* = 11.1, 7.1 Hz, 1H, CH-H), 3.17 (dd, *J* = 13.6, 5.0 Hz, 1H, CH-H), 3.12 (dd, *J* = 13.7, 7.5 Hz, 1H, CH-H), 3.08 (dd, *J* = 11.9, 4.1 Hz, 1H CH-H), 2.17 (s, 3H, CH₃); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.1, 170.1, 159.2, 130.3, 129.2, 114.2, 73.3, 72.7, 71.9, 55.4, 43.1, 39.6, 37.8, 33.6, 30.6. HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ Calcd for C₁₇H₂₂N₂O₃NaS₃ 421.0690, found 421.0687.

S-(((3R,5R,7aS)-3-(phenylcarbamoyl)tetrahydro-2H-thiazolo [4,3-b]thiazol-5-yl) methyl) ethanethioate (**4c**)

Prepared in an analogous route as described for **4a**, starting from **3** (0.15 g, 0.54 mmol) and aniline (0.055 g, 0.59 mmol), purified by column chromatography on flash SiO₂ (nHex/EtOAc 5:2) to yield **4c** (0.077 g, 41%) as a colorless oil [α]_D²⁰ -177.5 (*c* = 1.84 in CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.03 (br, 1H, NH), 7.65 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, ArH), 7.35 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, ArH), 7.13 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, ArH), 5.03 (dd, *J* = 5.7, 4.6 Hz, 1H, CH), 4.42 (dd, *J* = 9.0, 4.2 Hz, 1H, CH), 4.12 (dd, *J* = 7.2, 3.1 Hz, 1H, CH), 3.63 (dd, *J* = 11.9, 5.9 Hz, 1H, CH-H), 3.54 (dd, *J* = 11.2, 3.0 Hz, 1H, CH-H), 3.33 (dd, *J* = 14.4, 3.9 Hz, 1H CH-H), 3.32 (dd, *J* = 11.7, 7.9 Hz, 1H, CH-H), 3.20 (dd, *J* = 14.1, 9.1 Hz, 1H, CH-H), 3.12 (dd, *J* = 11.9, 4.3 Hz, 1H, CH-H), 2.25 (s, 3H, CH₃); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.3, 168.3, 137.6, 129.2, 124.7, 119.7, 73.2, 73.1, 71.9, 39.8, 37.8, 33.5, 30.8; HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ Calcd for C₁₅H₁₈N₂O₂NaS₃ 377.0428, found 377.0428.

S-((acetylthio)methyl)tetra hydro-2H-thiazolo [4,3-b]thiazole-3-carboxylate (**4d**)

Prepared in an analogous route as described for **4a** starting from **3** (0.1 g, 0.36 mmol) and N-boc-ethanolamine (0.069 g, 0.43 mmol), purified by column chromatography on flash SiO₂ (nHex/EtOAc 7:3) to yield **4d** (0.12 g, 79%) as a white powder: MP = 65–71°C [α]_D²⁰ -74.0 (*c* = 3.25 in CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.15 (dd, *J* = 5.3, 3.4 Hz, 1H, CH), 5.05 (br, 1H, NH), 4.31 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH), 4.25–4.22 (m, 3H, CH, CH₂), 3.58, (dd, *J* = 11.9, 5.4 Hz, 1H, CH-H), 3.45–3.43 (m, 2H, CH₂), 3.34–3.26 (m, 3H, CH₂, CH-H), 3.10 (dd, *J* = 11.6, 3.7 Hz, 1H, CH-H), 3.08 (dd, *J* = 13.9, 7.4 Hz, 1H, CH-H), 2.36 (s, 3H, CH₃), 1.45 (s, 9H, (CH₃)₃); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.8, 170.5, 155.9, 79.7, 74.1, 71.6, 70.0, 64.9, 39.6, 38.4, 37.7, 34.3, 30.7, 28.5; HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ Calcd for C₁₆H₂₆N₂O₅NaS₃ 445.0902, found 445.0906.

(3R,5R,7aS)-(2-aminothiazol-5-yl)methyl 5-(acetylthio)methyltetrahydro-2H-thiazolo [4,3-b]thiazole-3-carboxylate (4e)

Prepared in an analogous route as described for **4a** starting from **3** (0.2 g, 0.7 mmol) and (2-aminothiazol-4-yl)methanol (0.1 g, 0.77 mmol), purified by column chromatography on flash silica gel (nHex/EtOAc 2:3) to yield **4e** (0.137 g, 50%) as a colorless oil $[\alpha]_D^{20} -33.8$ ($c = 2.3$ in CH_2Cl_2); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.51 (s, 1H, H (4)-thiazol), 5.64 (br, 2H, NH_2), 5.18 (dd, $J = 5.3, 3.3$ Hz, 1H, CH), 5.06 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, CH-H), 5.02 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, CH-H), 4.29 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, CH), 4.28 (dd, $J = 6.5, 5.0$ Hz, 1H, CH), 3.58 (dd, $J = 11.9, 5.4$ Hz, 1H, CH-H), 3.34–3.24 (m, 3H, CH-H, CH_2), 3.12–3.06 (m, 2H, CH_2), 2.34 (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 195.7, 170.3, 168.7, 146.1, 107.6, 74.1, 71.5, 69.9, 62.7, 38.5, 37.7, 34.5, 30.7; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{NaS}_4$ 414.0050, found 414.0041.

S-(((3R,5R,7aS)-3-((2-aminophenyl)carbamoyl)tetrahydro-2H-thiazolo[4,3-b]thiazol-5-yl)methyl) ethanethioate (4f)

Prepared in an analogous route as described for **4a** starting from **3** (0.15 g, 0.54 mmol) and *o*-phenylenediamine (0.203 g, 1.88 mmol), purified by column chromatography on flash SiO_2 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 9:1) to yield **4f** (0.111 g, 56%) as a colorless oil: $[\alpha]_D^{20} -100.7$ ($c = 4.5$ in CH_2Cl_2); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.87 (br, 1H, NH), 7.23 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.06 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, ArH), 6.80 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, ArH), 5.07 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, CH), 4.43 (dd, $J = 8.1, 5.1$ Hz, 1H, CH), 4.16 (dd, $J = 7.0, 2.4$ Hz, 1H, CH), 3.90 (br, 2H, NH_2), 3.57 (dd, $J = 11.9, 5.9$ Hz, 1H, CH-H), 3.51 (dd, $J = 11.3, 2.3$ Hz, 1H, CH-H), 3.30–3.18 (m, 3H, CH_2 , CH-H), 3.09 (dd, $J = 11.9, 4.1$ Hz, 1H, CH-H), 2.26 (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 195.4, 169.1, 140.8, 127.5, 125.4, 123.4, 119.4, 117.9, 73.2, 72.9, 72.0, 39.7, 37.7, 33.6, 30.7; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2\text{NaS}_3$ 392.0537, found 392.0540.

Synthesis of analogs 2a-g

(3R,5R,7aS)-N-benzyl-5-(mercaptomethyl)tetrahydro-2H-thiazolo [4,3-b]thiazole-3-carboxamide (2a)

Yield: Method A (29%); Method C (64%)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (br, 1H, NH), 7.36–7.28 (m, 5H, ArH), 4.88 (dd, $J = 5.8, 5.0$ Hz, 1H, CH), 4.49 (qd, $J = 14.8, 6.0$ Hz, 2H, CH_2), 4.31 (dd, $J = 8.1, 5.3$ Hz, 1H, CH), 4.07 (dd, $J = 7.3, 3.7$ Hz, 1H, CH), 3.49 (dd, $J = 11.0, 3.9$ Hz, 1H, CH-H), 3.46 (dd, $J = 11.6, 5.7$ Hz, 1H, CH-H), 3.34 (dd, $J = 11.2, 7.3$ Hz, 1H, CH-H), 3.06 (dd, $J = 11.8, 4.8$ Hz, 1H, CH-H), 2.77 (ddd, $J = 13.4, 8.1, 5.3$ Hz, 1H, CH-H), 2.69 (dd, $J = 13.9, 8.4$ Hz, 1H, CH-H), 1.55 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, SH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 170.3, 138.2, 128.9, 127.9, 127.7, 74.9, 72.9, 72.1, 43.6, 39.5, 33.8, 33.3; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{ONaS}_3$ 349.0479, found 349.0478; $[\alpha]_D^{20} -80.0$ ($c = 0.66$ in CH_2Cl_2).

(3R,5R,7aS)-5-(mercaptomethyl)-N-(4-methoxybenzyl) tetrahydro-2H-thiazolo [4,3-b]thiazole-3-carboxamide (2b)

Prepared in an analogous route as described for **2a** starting from **4b** (0.0181 g, 0.0454 mmol), purified by column chromatography on flash SiO_2 (nHex/EtOAc 3:1) to yield **2b** (Method A: 38%, Method C: 50%) as a colorless oil $[\alpha]_D^{20} -108.5$ ($c = 1.0$ in CH_2Cl_2); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (br, 1H, NH), 7.23–7.19 (m, 2H, ArH), 6.88–6.85 (m, 2H, ArH), 4.86 (dd, $J = 5.8, 4.9$ Hz, 1H, CH), 4.47–4.36 (m, 2H, CH_2), 4.29 (dd, $J = 8.1, 5.3$ Hz, 1H, CH), 4.05 (dd, $J = 7.3, 3.8$ Hz, 1H, CH), 3.80 (s, 3H, CH_3), 3.46 (dd, $J = 11.2, 3.8$ Hz, 1H, CH-H), 3.44 (dd, $J = 11.8, 6.0$ Hz, 1H, CH-H), 3.32 (dd, $J = 11.2, 7.3$ Hz, 1H, CH-H), 3.05 (dd, $J = 11.8, 4.8$ Hz, 1H, CH-H), 2.76 (ddd, $J = 13.6, 8.1, 5.3$ Hz, 1H, CH-H), 2.68 (dt, $J = 14.0, 8.4$ Hz, 1H, CH-H), 1.56 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, SH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 170.2, 159.2, 130.3, 129.2, 114.3, 74.9, 72.8, 72.1, 55.4, 43.0, 39.5, 33.8, 33.3; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{NaS}_3$ 379.0585, found 379.0591.

(3R,5R,7aS)-5-(mercaptomethyl)-N-phenyltetrahydro-2H-thiazolo [4,3-b]thiazole-3-carboxamide (2c)

Prepared in an analogous route as described for **2a** starting from **4c** (0.0161 g, 0.0454 mmol), purified by column chromatography on flash SiO_2 (nHex/EtOAc 3:1) to yield **2c** (Method A: 24%, Method C: 58%) as a colorless oil $[\alpha]_D^{20} -116.6$ ($c = 0.25$ in CH_2Cl_2); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.44 (br, 1H, NH), 7.65 (dd, $J = 8.5, 1.0$ Hz, 2H, ArH), 7.36–7.31 (m, 2H, ArH), 7.15–7.11 (m, 1H, ArH), 4.99 (dd, $J = 5.9, 5.2$ Hz, 1H, CH), 4.43 (dd, $J = 8.4, 4.7$ Hz, 1H, CH), 4.11 (dd, $J = 7.5, 3.5$ Hz, 1H, CH), 3.57 (dd, $J = 11.5, 3.7$ Hz, 1H, CH-H), 3.54 (dd, $J = 12.0, 5.9$ Hz, 1H, CH-H), 3.38 (dd, $J = 11.4, 7.5$ Hz, 1H, CH-H), 3.12 (dd, $J = 11.8, 5.0$ Hz, 1H, CH-H), 2.96 (ddd, $J = 14.0, 7.8, 4.7$ Hz, 1H, CH-H), 2.84 (dd, $J = 14.1, 8.5$ Hz, 1H, CH-H), 1.82 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, SH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 168.6, 137.7, 129.2, 124.7, 119.8, 74.6, 72.8, 72.4, 39.5, 33.6, 33.3. HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{ONaS}_3$ 335.0322, found 335.0321.

(3R,5R,7aS)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl 5-(mercaptomethyl)tetrahydro-2H-thiazolo [4,3-b]thiazole-3-carboxylate (2d)

Prepared in an analogous route as described for **2a** starting from **4d** (0.0192 g, 0.0454 mmol), purified by column chromatography on flash SiO_2 (nHex/EtOAc 8:2) to yield **2d** (Method A: 39%, Method C: 70%) as a colorless oil $[\alpha]_D^{20} -35.9$ ($c = 2.13$ in CH_2Cl_2); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.08 (dd, $J = 5.3, 3.8$ Hz, 1H, CH), 4.83 (br, 1H, NH), 4.31 (dd, $J = 7.8, 5.9$ Hz, 1H, CH), 4.25 (dd, $J = 6.6, 4.8$ Hz, 1H, CH), 4.24 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, CH_2), 3.54 (dd, $J = 12.0, 5.4$ Hz, 1H, CH-H), 3.43 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H, CH_2), 3.34 (dd, $J = 11.0, 4.9$ Hz, 1H, CH-H), 3.27 (dd, $J = 11.0, 6.6$ Hz, 1H, CH-H), 3.09 (dd, $J = 11.9, 3.8$ Hz, 1H, CH-H), 2.88 (dt, $J = 13.6, 7.5$ Hz, 1H, CH-H), 2.64 (ddd, $J = 13.6, 9.6,$

5.9 Hz, 1H, CH-H), 1.97 (dd, $J = 9.6, 7.2$ Hz, 1H, SH), 1.45 (s, 9H, (CH₃)₃); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.6, 155.9, 79.9, 75.0, 73.5, 70.6, 64.8, 39.7, 39.3, 34.3, 33.9, 28.5; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : [M + Na]⁺ Calcd for C₁₄H₂₄N₂O₄NaS₃ 403.0796, found 403.0796.

(3R,5R,7aS)-(2-aminothiazol-4-yl)methyl 5-(mercaptomethyl) tetrahydro-2H-thiazolo [4,3-b]thiazole-3-carboxylate (2e)

Prepared in an analogous route as described for **2a** starting from **4e** (0.0178 g, 0.0454 mmol), purified by column chromatography on flash SiO₂ (nHex/EtOAc 2:3) to yield **2e** (Method A: 44%, Method C: 68%) as a colorless oil [α]_D²⁰ -33.4 ($c = 1.63$ in CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.52 (s, 1H, H (4)-thiazole), 5.38 (br, 2H, NH₂), 5.09 (dd, $J = 5.2, 4.1$ Hz, 1H, CH), 5.06 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, CH-H), 5.03 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, CH-H), 4.32 (dd, $J = 7.2, 6.4$ Hz, 1H, CH), 4.26 (dd, $J = 6.6, 5.3$ Hz, 1H, CH), 3.52 (dd, $J = 11.9, 5.4$ Hz, 1H, CH-H), 3.35 (dd, $J = 11.0, 5.2$ Hz, 1H, CH-H), 3.28 (dd, $J = 11.0, 6.7$ Hz, 1H, CH-H), 3.07 (dd, $J = 11.9, 4.0$ Hz, 1H, CH-H), 2.87 (dt, $J = 13.7, 7.4$ Hz, 1H, CH-H), 2.62 (ddd, $J = 13.6, 9.4, 6.3$ Hz, 1H, CH-H), 1.97 (dd, $J = 9.4, 7.6$ Hz, 1H, SH); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.4, 168.5, 146.2, 108.0, 75.2, 73.5, 70.4, 62.8, 39.2, 34.3, 33.8; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : [M + Na]⁺ Calcd for C₁₁H₁₅N₃O₂NaS₄ 371.9945, found 371.9945.

(3R,5R,7aS)-N-(2-aminophenyl)-5-(mercaptomethyl) tetrahydro-2H-thiazolo [4,3-b]thiazole-3-carboxamide (2f)

Prepared in an analogous route as described for **2a** starting from **4f** (0.0168 g, 0.0454 mmol), purified by column chromatography on flash SiO₂ (CH₂Cl₂/EtOAc 9:1) to yield **2f** (Method A: 31%, Method C: 78%) as a colorless oil [α]_D²⁰ -68.3 ($c = 1.85$ in CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.19 (br, 1H, NH), 7.29 (dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H, ArH), 7.08 (td, $J = 7.8, 1.4$ Hz, 1H, ArH), 6.84–6.80 (m, 2H, ArH), 5.06 (dd, $J = 5.6, 4.7$ Hz, 1H, CH), 4.45 (dd, $J = 8.2, 5.0$ Hz, 1H, CH), 4.24 (dd, $J = 7.2, 2.7$ Hz, 1H, CH), 3.60 (dd, $J = 11.3, 2.7$ Hz, 1H, CH-H), 3.55 (dd, $J = 12.0, 5.9$ Hz, 1H, CH-H), 3.35 (dd, $J = 11.3, 7.2$ Hz, 1H, CH-H), 3.13 (dd, $J = 11.9, 4.5$ Hz, 1H, CH-H), 2.97–2.80 (m, 2H, CH₂), 1.84 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, SH); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.1, 140.4, 127.5, 125.1, 123.9, 119.8, 118.3, 75.0, 73.2, 73.1, 39.6, 33.7, 33.5, HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : [M + Na]⁺ Calcd for C₁₃H₁₇N₃ONaS₃ 350.0431, found 350.0430.

Deprotection of **6–13** was carried out using the same approach as described for **4a**, Method C).

Data availability statement

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: VV, CS, and GM. Performed the experiments: VV and CS. Analyzed the data: VV, CS, and GM. Contributed reagents/materials/analysis tools: CS and GM. Contributed to the writing of the manuscript: VV, CS, and GM.

Funding

This work was supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health (NIH) to GM under Award Number R01AI100560. This study was also supported in part by funds from the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC)-Grupos from Udelar. VV is the recipient of a fellowship from CSIC-Udelar.

Acknowledgments

We would like to thank Horacio Pezaroglo and Gonzalo Hernández for running the NMR spectra. The Chemistry Department of the Udelar is thankful to the CSIC for supporting acquisition of the HPLC-MS.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors, and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2022.934376/full#supplementary-material>

References

- Agouridas, V., Mahdi, O. E., Diemer, V., Cargoët, M., Monbaliu, J. C. M., Melnyk, O., et al. (2019). Native chemical ligation and extended methods: Mechanisms, catalysis, scope, and limitations. *Chem. Rev.* 119 (12), 7328–7443. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00712
- Barnett, R. E., and Jencks, W. P. (1969). Diffusion-controlled proton transfer in intramolecular thiol ester aminolysis and thiazoline hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* 91 (9), 2358–2369. doi:10.1021/ja01037a029
- Bongiardina, N. J., Long, K. F., Podgórski, M., and Bowman, C. N. (2021). Substituted thiols in dynamic thiol–thioester reactions. *Macromolecules* 54 (18), 8341–8351. doi:10.1021/acs.macromol.1c00649
- Burke, H. M., McSweeney, L., and Scanlan, E. M. (2017). Exploring chemoselective S-to-N acyl transfer reactions in synthesis and chemical biology. *Nat. Commun.* 8, 15655. doi:10.1038/ncomms15655
- Chandru, K., Gilbert, A., Butch, C., Aono, M., and Cleaves, H. J. (2016). The abiotic chemistry of thiolated acetate derivatives and the origin of life. *Sci. Rep.* 6, 1–11. doi:10.1038/srep29883
- Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., and Kent, S. B. (1994). Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* 266 (5186), 776–779. doi:10.1126/science.7973629
- Diemer, V., Firstova, O., Agouridas, V., and Melnyk, O. (2022). Pedal to the metal: The homogeneous catalysis of the native chemical ligation reaction. *Chemistry* 28 (16), e202104229. doi:10.1002/chem.202104229
- Endo, T., Oda, K., and Mukaiyama, T. (1974). Facile conversion of thioesters into thiols using cysteamine. *Chem. Lett.* 3, 443–444. doi:10.1246/cl.1974.443
- Friedman, M., Cavins, J. F., and Wall, J. S. (1965). Relative nucleophilic reactivities of amino groups and mercaptide ions in addition reactions with α , β -unsaturated Compounds^{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* 87 (16), 3672–3682. doi:10.1021/ja01094a025
- González, M. M., Kosmopoulou, M., Mojica, M. F., Castillo, V., Hinchliffe, P., PettinatiBrem, J., et al. (2016). Bisthiazolidines: A substrate-mimicking scaffold as an inhibitor of the NDM-1 carbapenemase. *ACS Infect. Dis.* 1, 544–554. doi:10.1021/acsinfecdis.5b00046
- Gui, Y., Qiu, L., Li, Y., Li, H., and Dong, S. (2016). Internal activation of peptidyl prolyl thioesters in native chemical ligation. *J. Am. Chem. Soc.* 138 (14), 4890–4899. doi:10.1021/jacs.6b01202
- Henderson, L. (1908). Concerning the relationship between the strength of acids and their capacity to preserve neutrality. *Am. J. Physiology-Legacy Content* 21 (4), 465. doi:10.1152/ajplegacy.1908.21.4.465-s
- Hinchliffe, P., González, M. M., Mojica, M. F., Gonzalez, J. M., Castillo, V., Saiz, C., et al. (2016). Cross-class metallo- β -lactamase inhibition by bisthiazolidines reveals multiple binding modes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E3745–E3754. doi:10.1073/pnas.1601368113
- Maguire, O. R., Zhu, J., Brittain, W. D., Hudson, A. S., Cobb, S. L., O'Donoghue, A. C., et al. (2020). N-Terminal speciation for native chemical ligation. *Chem. Commun.* 56 (45), 6114–6117. doi:10.1039/d0cc01604g
- Mennen, S. M., Alhambra, C., Allen, C. L., Barberis, M., Berritt, S., Brandt, T. A., et al. (2019). The evolution of high-throughput experimentation in pharmaceutical development and perspectives on the future. *Org. Process Res. Dev.* 23, 1213–1242. doi:10.1021/acs.oprd.9b00140
- Mojica, M. F., Mahler, G., Bethel, C. R., Taracila, M. A., Kosmopoulou, M., Papp-Wallace, K. M., et al. (2015). Exploring the role of residue 228 in substrate and inhibitor recognition by VIM metallo- β -lactamases. *Biochemistry* 54, 3183–3196. doi:10.1021/acs.biochem.5b00106
- Mondal, M., and Hirsch, A. K. (2015). Dynamic combinatorial chemistry: A tool to facilitate the identification of inhibitors for protein targets. *Chem. Soc. Rev.* 44 (8), 2455–2488. doi:10.1039/c4cs00493k
- Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San, J. M., Madeo, P. F., and Kroemer, G. (2015). Acetyl coenzyme A: A central metabolite and second messenger. *Cell Metab.* 21 (6), 805–821. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.014
- Pitman, I., and Morris, I. Aust. (1979). Covalent additions of glutathione, cysteine, homocysteine, cysteamine and thioglycolic acid to quinazoline cation. *Aust. J. Chem.* 32 (7), 1567. doi:10.1071/ch9791567
- Saiz, C., Castillo, V., Fontán, P., Bonilla, M., Salinas, G., Rodríguez-Haralambides, A., et al. (2014). Discovering Echinococcus granulosus thioredoxin glutathione reductase inhibitors through site-specific dynamic combinatorial chemistry. *Mol. Divers.* 18 (1), 1–12. doi:10.1007/s11030-013-9485-3
- Serra, G., Posada, L., and Hojo, H. (2020). On-resin synthesis of cyclic peptides via tandem N-to-S acyl migration and intramolecular thiol additive-free native chemical ligation. *Chem. Commun.* 56 (6), 956–959. doi:10.1039/c9cc07783a
- Vallee, Y., Shalayel, I., Ly, K. D., Rao, K. R., De Paëpe, G., Märker, K., et al. (2017). At the very beginning of life on earth: The thiol-rich peptide (TRP) world hypothesis. *Int. J. Dev. Biol.* 61, 471–478. doi:10.1387/ijdb.170028yv
- Villamil, V., Saiz, C., and Mahler, G. (2021). A new procedure for thioester deprotection using thioglycolic acid in both homogeneous and heterogeneous phase. *Tetrahedron* 94, 132335. doi:10.1016/j.tet.2021.132335
- Wang, C., Guo, Q. X., and Fu, Y. (2011). Theoretical analysis of the detailed mechanism of native chemical ligation reactions. *Chem. Asian J.* 6 (5), 1241–1251. doi:10.1002/asia.201000760
- Wong, H., and Cernak, T. (2018). Reaction miniaturization in eco-friendly solvents. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 11, 91–98. doi:10.1016/j.cogsc.2018.06.001
- Worrell, B. T., Mavila, S., Wang, C., Kontour, T. M., Lim, C. H., McBride, M. K., et al. (2018). A user's guide to the thiol–thioester exchange in organic media: Scope, limitations, and applications in material science. *Polym. Chem.* 9 (36), 4523–4534. doi:10.1039/c8py01031e



Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tet

A new procedure for thioester deprotection using thioglycolic acid in both homogeneous and heterogeneous phase

Valentina Villamil ^{a, b}, Cecilia Saiz ^{a, **}, Graciela Mahler ^{a, *}^a Laboratorio de Química Farmacéutica, (DQO), Facultad de Química, Universidad de la República, Gral.Flores 2124, Montevideo, CP 11800, Uruguay^b Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, 11800, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2021

Received in revised form

5 July 2021

Accepted 6 July 2021

Available online xxx

Keywords:

Bisthiazolidine

Oxazolidine

Transthioesterification

Thioester deprotection

Recycling resin

Polymer-supported thioglycolic acid

Thioglycolic acid

Polymer-supported reagent

ABSTRACT

Classic acetyl thioester protection/deprotection methodologies are widely used in organic synthesis, but deprotection step usually requires harsh conditions not suitable for labile substrates. In this work, a new method for thioester deprotection using a thiotransesterification approach is described. Firstly, thioglycolic acid (TGA) was identified as a good deprotecting reagent in solution. In order to develop a thiol polymer-supported reagent, TGA was anchored to a PEG-based resin through an amide bond (TG-NCO-SH). Both homogeneous and heterogeneous approaches were conveniently carried out at room temperature, in aqueous buffer at pH 8. The mild conditions were suitable for alkyl and phenyl thioesters. Moreover labile thioesters containing thiazolidine and oxazolidine scaffolds, bearing amine, ester and acetal functionalities were also deprotected. The polymer-supported TGA gave better deprotection yields compared to TGA in solution, yields ranging from 61 to 90%. The feasibility of the recovery and reuse of TG-NCO-SH reagent was explored, showing it can be reused at least five times without losing the activity.

© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Thiols are important functional groups present in many bioactive compounds, including drugs and natural flavors, see examples in Fig. 1. Captopril **1** and zofenopril **2** are drugs approved as ACE inhibitors for treatment of hypertension [1], and tiopronin **3** is a drug used for cystinuria [2]. Thiorphan **4**, the active metabolite of racecadotril, is an enkephalinase inhibitor and exhibits antidiarrheal effects in human [3]. Dimercaprol **5** is a copper chelating agent that has been approved by the FDA to treat Wilson's disease [4]. Volatile thiols are key aroma components present in many foods like meat (3-mercapto-2-butanone **6**), coffee (furfurylthiol **7**), and grapefruit (1-p-menthene-8-thiol **8**) among others [5,6].

Bisthiazolidines **9** have been described as bicyclic compounds containing a free thiol able to inhibit metallo- β -lactamases (MBL). Mechanistically, bisthiazolidines were designed as penicillin analogs. These compounds demonstrated competitive inhibition of all MBL subclasses, with K_i values in the micromolar range against

NDM-1, VIM-2, Sfh-I, L1, IMP-1, GOB-18 and BclI, MBL of clinical importance. [7–9].

Previous studies showed that the mercaptomethyl group present in **9** is essential for MBL inhibition. However, the importance of the carboxylic acid is unexplored. Aiming to prepare new bisthiazolidine analogs with variations at the carboxylic acid, we decided to explore a suitable strategy for thiol protection/deprotection. In particular, bisthiazolidines **9** require mild conditions for deprotection to avoid thiazolidine ring opening or dimerization.

Acyl groups have been widely used as synthetically useful thiol protecting groups due to its preparation under mild conditions in very good yields. Although there are numerous deprotection methods described, many involve harsh conditions and are accompanied by significant formation of disulfides when labile substrates are used. Reported conditions include strong bases like NaOH [10], NH_3 in MeOH [11], or MeONa [12]. These methods typically produce better results when aliphatic and unfunctionalized substrates are used [13].

In the last years, new milder and chemoselective methods have been developed for thioester hydrolysis. Among others, it was reported the use of tetrabutylammonium cyanide [14] and TiCl_4/Zn [15] for deprotection of acetyl thioesters.

We focused on the potential of the transthioesterification

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: csaiz@fq.edu.uy (C. Saiz), gmahler@fq.edu.uy (G. Mahler).

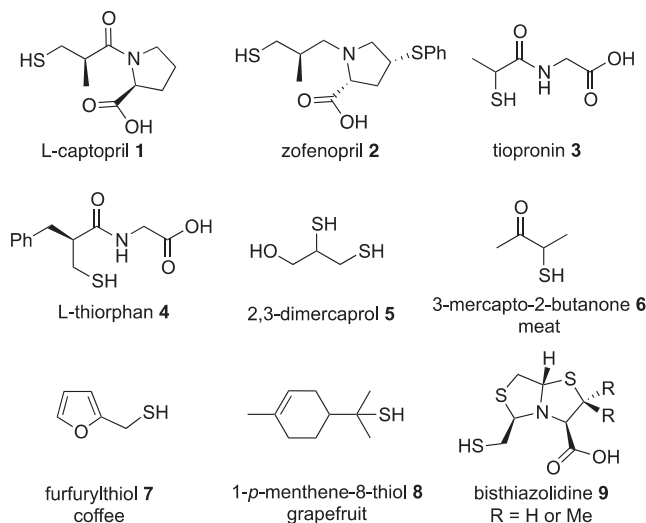


Fig. 1. Thiol-containing compounds known as drugs or flavors (1–8) and bithiazolidine 9.

process for thioester deprotection, a reversible reaction between a thioester and a thiol in the presence of a base or strongly activated thiolate leaving group [16]. Transthioesterification is also well described as the first step in Native Chemical Ligation, a widely used technique for amide bond formation in peptide and protein solid-phase synthesis [17]. To the best of our knowledge, there are no methodologies reported using thiols for thioester deprotection in solution.

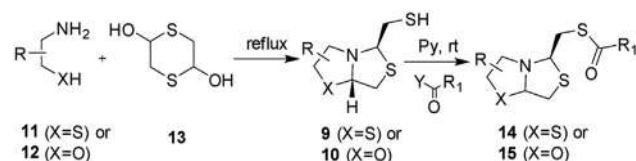
Since thiol-thioester exchange is an equilibrium, the thiol used for deprotection should be used in excess to drive the equilibrium toward the desired product. In this case, when the reaction is performed in homogeneous solution-phase, the purification step could be troublesome. Exploring an alternative approach that simplifies the purification step, we aimed to develop a polymer-supported reagent for heterogeneous solution-phase able to deprotect thioesters through thiol-thioester exchange.

In recent years, synthesis using polymer-supported reagents and scavengers has become a powerful tool. Unlike solid-phase synthesis, the polymer-supported reagent produces a chemical transformation on the substrate present in solution [18]. This approach has advantages over conventional solution-phase synthesis such as the easier separation of the supported species from the reaction mixture by filtration and the use of excess reagent to force the reaction to completion without causing work-up problems. In addition, it has the advantage of solution-phase synthesis since it allows monitoring the reaction progress easily by using conventional techniques, such as TLC or HPLC, avoiding the cleavage step of solid-phase chemistry [19].

In this context, we explored the use of thiols for thioester deprotection through thiol-thioester exchange in aqueous media, both in conventional homogeneous solution-phase and heterogeneous solution-phase through anchoring the thiol to a solid support.

2. Results and discussion

Bisthiazolidines **9a-e** and oxazolidinylthiazolidines **10a-b** were obtained by double cyclization of 2-aminothiols **11** or 2-aminoalcohols **12** with two molecules of mercaptoacetaldehyde, commercially available as dithiane **13**, as described in our previous work (Scheme 1) [20–22]. Then, S-acetyl bisthiazolidines **14a-e** and S-acetyl oxazolidinylthiazolidines **15a-b** were easily prepared



Scheme 1. Synthesis of thioesters **14a-g** and **15a-b**.

using Ac₂O and Py at room temperature with yields ranging from 62 to 89% (Table 1). The compounds S-butyl **14f** and S-benzoyl **14g** were obtained using the corresponding acyl chloride and TEA in CH₂Cl₂ in 69 and 72% yield, respectively.

2.1. Deprotection optimization

S-acetyl bisthiazolidine **14a** was selected as a model to study the optimal deprotection conditions. Firstly, general methods described in literature for thioacetyl deprotection were employed, see Table 2. When NaOH [10], NH₃ in MeOH [11] and NaSMe in CH₂Cl₂ [23] were used, decomposition of the starting material was observed (Table 2, entry 1, 3 and 4, respectively). Thiol **9a** was obtained when using NH₂OH·HCl and TEA in MeOH [24] but in low yield (33%), Table 2, entry 2.

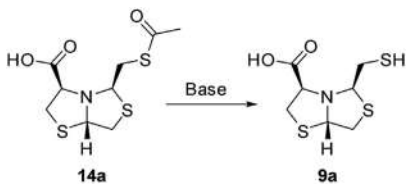
These results prompted us to investigate an alternative methodology for thioester deprotection. Thus, we explored the usefulness of different commercially available thiols with a broad range of

Table 1
Synthesis of thioesters **14a-g** and **15a-b**.

Entry	Starting material	Y	R ₁	Product, Yield (%) ^a	
1		11a	OAc	Me	14a , 89
2		11b	OAc	Me	14b , 71
3		11c	OAc	Me	14c , 62
4		11d	OAc	Me	14d , 65
5		11e	OAc	Me	14e , 79
6		11d	Cl	<i>n</i> -butyl	14f , 69
7		11a	Cl	Ph	14g , 72
8		12a	OAc	Me	15a , 62
9		12b	OAc	Me	15b , 79

^a Isolated yields after chromatographic column purification.

Table 2
Basic conditions used for deprotection of **14a**.



Entry	Conditions	Yield (%) ^a
1	NaOH 0.2 M, EtOH	dec ^b
2	NH ₂ OH·HCl, TEA, MeOH	33%
3	MeOH, NH ₃	dec ^b
4	NaSMe, CH ₂ Cl ₂	dec ^b

^a Isolated yields after chromatographic column purification.

^b dec = starting material decomposition.

pKa values, for deprotection of thioester **14a** through thiol-thioester exchange, see Scheme 2. The reaction was performed in aqueous buffer at pH 8 to ensure a high concentration of thiolate. Since thiol-thioester exchange is an equilibrium, deprotecting agents were used in excess (2 equivalents) to drive the equilibrium toward the desired product **9a**. In order to rapidly find the best thiol for deprotection, the reaction time was set at 30 min, see Scheme 2.

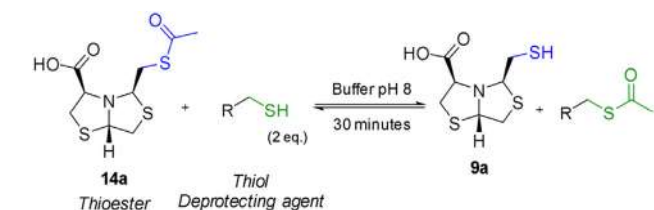
Different thiols were selected for the screening: alkyl thiols such as thioglycolic acid (TGA), *n*-propanethiol and β-mercaptoethanol (ME) and aromatic thiols like thiophenol and 2-NH₂-4-Cl-thiophenol. Redox reagents like reduced dithiothreitol (DTT) and reduced glutathione were also explored. With the aim to verify that deprotection does not occur in absence of the thiol, incubation of **14a** in PB pH 8 at rt for 6 h was performed, and detection of **9a** was not observed (Table 3, entry 8).

Thiol pKa value does not correlate directly with the deprotection compound potential as shown in Table 3. The best result was obtained for TGA (56%, Table 3, entry 1), while the free thiol **9a** was not observed using *n*-propanethiol, thiophenol or 2-NH₂-4-Cl-thiophenol, (Table 3, entries 2, 4 and 5). Reduced glutathione and DTT, bearing both a high negative redox potential and high aqueous solubility, were used and deprotection was only observed for the last one with 49% yield (Table 3, entries 6).

Based on the results obtained, thioglycolic acid was selected as the deprotecting agent and the reaction time was extended to 24 h. We found a complete conversion of **14a** to **9a** after 24 h at room temperature and 74% yield after chromatographic column purification (Table 6, entry 1).

Once we found that TGA was suitable for deprotection of acetylthioester **14a** in solution, we decided to apply a solid-supported approach, based on the advantages it presents such as simplification of product work-up, purification and catalyst recycling.

Several polymer-supported deprotecting agents were recently reported. Kobayashi and col. described a polystyrene-supported sulfonic acid reagent able to hydrolyze thioesters in refluxing water [30]. Nevertheless, these conditions result too harsh for the bithiazolidine heterocycle. Furthermore, Liguori and col prepared



Scheme 2. S-acetyl deprotection through thiol-thioester exchange.

Table 3
Screening of thiols for the deprotection reaction of **14a** in PB pH 8 in 30'.

Entry	Additive (2eq)	pKa	Yield 9a (%) ^a
1	Thioglycolic acid (TGA)	10.6 [25]	56
2	<i>n</i> -propanethiol	10.8 [26]	8
3	β-Mercaptoethanol (ME)	9.5 [25]	31
4	Thiophenol	6.4 [27]	7
5	2-NH ₂ -4-Cl-thiophenol	5.7 [28]	0
6	Dithiothreitol (DTT)	9.2 [25]	49
7	Glutathione	8.8 [29]	0
8	No additive	—	0

^a Isolated yields after column chromatography purification.

a polymer-supported TGA useful for the deprotection of N-nosyl-protected α-amino acids. The reaction is carried out in DCM, using a Wang resin as solid support [31].

Based on this background, we aimed to develop a different solid-supported reagent suitable for S-acetyl deprotection in mild conditions. In this sense, we selected PEG-based resins which have a broad solvent compatibility and are known to tolerate aqueous-organic solvent systems. In particular, polymers based on Tentagel® (TG) resin have gained considerable importance in recent years. They provide significant stability to mechanical, chemical, and thermal demands under diverse operating conditions and multiple rounds of synthetic transformations [32,33].

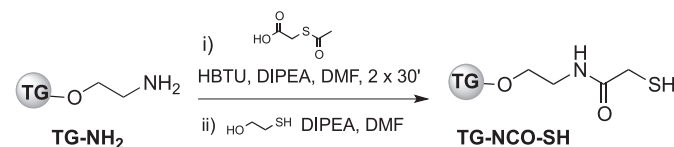
A variety of TentaGel® (TG) resins are commercially available for synthesis and screening. Firstly, we used TG thiol resin (TG-S-SH, 0.2–0.3 meq/g, 130 μm) which is terminally functionalized with a thiol. We envisioned that TG-S-SH resin could be useful for thioester deprotection through thiol/thioester exchange, in analogy with thioglycolic acid in solution. Thus, we performed the exchange reaction using 2 equivalents of TG-S-SH resin and S-acetyl bithiazolidine **14a** as starting material, in MeOH:phosphate buffer (PB) pH 8 (1:9) at rt, but **9a** was not detected after 24 h.

Since the distance between the thiol and the solid support could be critical for the deprotection reaction, we decided to explore the use of a resin-linker system. This allows the introduction of an active group that is separated from the insoluble polymer.

We envisioned that commercially available aminomethylated resin (TG-NH₂) could be rapidly functionalized with a linker containing thiol. Based on the results obtained in homogeneous solution-phase, we selected TGA as a thiol-containing linker and connected to the resin through an amide bond. The resin was readily converted to the corresponding amido-mercapto resin (TG-NCO-SH) in two steps, see Scheme 3.

First, thiol-protected thioglycolic acid was incorporated into the solid support following a standard coupling protocol using an excess of HBTU [34]. The acylation reaction was >99% complete after 2 × 30 min couplings as indicated by quantitative ninhydrin analysis [35], after which residual free amine groups were capped by treatment with acetic anhydride in DMF [36]. Secondly, the TG-NCO-SH resin was generated by thiolytic cleavage employing a described method for solid phase (2-mercaptoethanol/DIPEA/DMF 1:1:18) [37].

Thus, using this two-step solid-phase procedure, it was possible to convert the aminomethylated resin (TG-NH₂) into the



Scheme 3. Synthesis of polymer-supported TGA.

corresponding amido-mercapto resin (TG-NCO-SH) in about 3 h. The thiol loading was determined using the methodology reported by Badyal et al. based on Ellman's reagent [38]. We found that the resin load was 0.35 mmol/g after 3×20 min cycles.

The usefulness of the TG-NCO-SH resin as a deprotecting agent was studied. The exchange reaction was performed using 2 equivalents of TG-NCO-SH resin previously generated and S-acetyl bithiazolidine **14a** as starting material in MeOH:PB pH 8 (1:9), see Scheme 4. At suitable intervals aliquots were taken for HPLC analysis. After 24 h, the conversion of **14a** into **9a** was >99%, and the yield 93% (calculated by HPLC), see Table 4, entry 3.

Once the optimal time was set, the reaction was scaled up for the deprotection of **14a** using 2 equivalents of the TG-NCO-SH. After 24 h, the reaction was completed (verified by TLC), and the product was obtained after simple filtration and extraction. Thus, **9a** was obtained in 93% yield without any further purification.

2.2. Resin recycling

The successful recovery and reuse of catalysts is an essential aspect of green chemistry and it determines its potential value for large-scale operation. In recent years, the chemical recycling of waste polymers has received a great deal of attention [39]. Thus, the potential chemical recycling of TG-NCO-SH resin was explored.

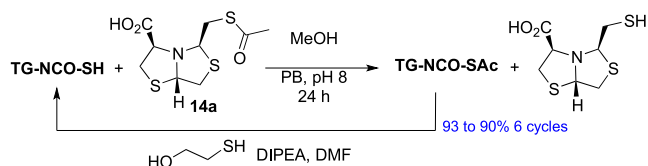
In order to evaluate the resin recovery, several cycles of regeneration-reuse were performed. At the end of the reaction the resin was washed completely with MeOH and completely regenerated by thiolytic cleavage, as indicated by thiol quantification based on Ellman's reagent. This method is useful to determine resin load since it is specific for free thiols in their reductive state [38]. Then, the resin was washed and reused for the subsequent cycles. Deprotection of the linked thiol must be done right before its use to prevent any oxidation processes.

Five additional cycles of **14a** deprotection were performed, and after 24 h we obtained **9a** in 93%, 90%, 89%, 90% and 87% yields for successive cycles, calculated by HPLC, Table 5, entries 2 to 6. The results demonstrated that TG-NCO-SH resin can be reused at least five times without significantly losing the activity.

2.3. Scope of the reaction in homogeneous and heterogeneous phase

In order to explore the scope of the reaction, twelve substrates were tested including aliphatic and aromatic thiols. The reaction was carried out in both homogeneous and heterogeneous phase and the yields were compared, see Table 6. Deprotection was performed using 2 equivalents of TGA or TG-NCO-SH respectively, in PB at pH 8 during 24 h at room temperature. The resin (TG-NCO-SH) was regenerated by thiolytic cleavage and employed for subsequent deprotections.

The results obtained show that deprotection of S-acyl bithiazolidines **14a-g** and oxazolidinylthiazolidines **15a-b** was successfully achieved using both methods. TGA in solution led to yields ranging from 51 to 80%, while TGA anchored to the polymer support afforded the desired thiols in yields ranging from 61 to 93%. Using polymer-supported TGA a notorious 20% yield increase was



Scheme 4. Deprotection reaction using polymer supported TGA as deprotecting agent.

Table 4

Time optimization for the deprotection reaction of **14a** using TG-NCO-SH reagent.

Entry	Time (h)	Yield of 9a (%) ^a
1	2	40
2	6	55
3	24	93

^a Calculated by HPLC.

Table 5

Recycling of polymer-supported TGA for the deprotection of **14a**.

Entry	Cycle	Resin loading (mmol/g resin)	Yield of 9a (%) ^a
1	1st	0.35	93
2	2nd	0.33	93
3	3rd	0.32	90
4	4th	0.33	89
5	5th	0.32	90
6	6th	0.30	87

^a Calculated by HPLC.

observed for thioesters **14a** and **14c**, see Table 6, entries 1 and 3 respectively; while similar yields were obtained for all others substrates.

In addition, different acyl side chains like butyryl (**14f**) and phenyl (**14g**) were assayed leading to the desired thiol in moderate to good yields (61 and 76% respectively for solid supported TGA and 58 and 75% respectively for solution TGA).

When TGA-SAc, S-acetyl *n*-propanethiol **16** and S-acetyl thio-phenol **17** were used as starting materials, the corresponding free thiols were obtained using both methodologies in good yields, Table 6, entries 10, 11 and 12 respectively. S-acetyl TGA only was assayed in the heterogeneous phase, since in solution is not possible to determine the yield.

These approaches allowed us the chemoselective deprotection of several substrates, keeping the integrity of thiazolidine and oxazolidine scaffolds. The ester hydrolysis was not observed when **14b** or **15b** were used as starting material. In addition, no epimerization of enantiomerically pure bithiazolidines or oxazolidines was observed.

The resin recycling shows the potential of this methodology regarding yield increasing, waste reduction and shorter time-consuming operation.

3. Conclusion

In summary, this work provides simple and practical methodologies for thiol deprotection in aqueous media. Thioglycolic acid is described as a useful deprotecting agent for thioesters in mild conditions, avoiding oxidation processes and thiazolidine/oxazolidine ring opening.

A solid-supported TGA was also prepared and successfully used for thioester deprotection, affording better yields compared to homogeneous synthesis. Chemical stability and resin recycling were studied, indicating the resin can be reused at least five times without loss of activity.

Overall, the new deprotection methodologies can be applied for the synthesis of labile substrates like analogs of **9a** and different aliphatic or aromatic thiols.

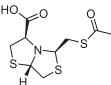
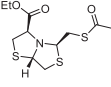
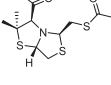
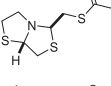
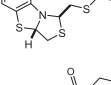
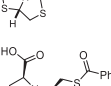
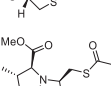
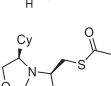
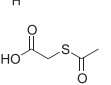
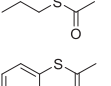
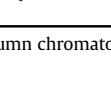
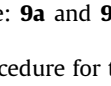
4. Experimental section

4.1. Synthetic procedures

Starting Materials

The following compounds were prepared according to methods

Table 6
Deprotection of thioesters **14a-g**, **15a-b**, TGA-SAc, **16** and **17**.

Entry	Starting Material	Product	Yield (%) ^a	
			TG-NCO-SH	TGA in solution
1		9a	93	74
2		9b	66	56
3		9c	92	71
4		9d	79	77
5		9e	66	51
6		9d	61	58
7		9a	76	75
8		10a	68	69
9		10b	65	53
10		TGA	87	nd ^b
11			85	66
12			53	80

^a Isolated yields after column chromatography purification.

^b nd = not determined.

described in literature: **9a** and **9c-d**, [36] **9b** and **9e**, [34] **10a-b**, [35].

Representative Procedure for the Synthesis of S-acetylated bis-thiazolidines **14a-e** and S-acetylated oxazolidinylthiazolidines **15a-b**.

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-((acetylthio)methyl)tetrahydro-2*H*-thiazolo[4,3-*b*]thiazole-3-carboxylic acid (**14a**). Into a two-necked flask under nitrogen atmosphere was transferred **9a** (0.5 g, 2.1 mmol) and added dropwise with stirring under ice bath a mixture 1:1 of Ac₂O:Py (2 mL). The mixture was heated to room temperature and stirred for 2 h. Ice frost was added and it was stirred for 1 h. This solution was then poured into Et₂O (30 mL) and extracted with NaHCO₃ aq. (2 × 30 mL). The aqueous layer was taken to pH = 2 and extracted with EtOAc (4 × 30 mL). The combined organic extracts were dried with MgSO₄, filtered and concentrated to dryness to yield **14a** (0.52 g, 89%) as a colorless oil: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.08 (dd, *J* = 6.0, 4.0 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 8.1, 5.4 Hz, 1H), 4.19 (dd, *J* = 7.1, 2.8 Hz, 1H), 3.61 (dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H), 3.42 (dd, *J* = 11.4, 2.8 Hz,

1H), 3.32 (dd, *J* = 11.5, 7.1 Hz, 1H), 3.24 (dd, *J* = 14.2, 5.5 Hz, 1H), 3.19 (dd, *J* = 14.2, 8.2 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 12.0, 4.0 Hz, 1H), 2.40 (s, 1H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.7, 172.3, 73.4, 72.1, 71.8, 39.4, 37.5, 33.6, 30.9; HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ Calcd for C₉H₁₃NO₃NaS₃, 301.9955, found 301.9957; [α]_D²⁰ = 43.0 (*c* 1.1, EtOAc).

(3*R*,5*R*,7*aS*)-ethyl-5-((acetylthio)methyl)tetrahydro-2*H*-thiazolo[4,3-*b*]thiazole-3-carboxylate (**14b**). Prepared in an analogous route as described for **14a** starting from **9b** (0.05 g, 0.19 mmol) and purified by column chromatography on flash silica gel (CH₂Cl₂:nHex 2:1) to yield **14b** (0.041 g, 71%) as a yellow oil: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.16 (dd, *J* = 5.4, 3.5 Hz, 1H), 4.29 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.23 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.20 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 3.58 (dd, *J* = 11.9, 5.4 Hz, 1H), 3.33–3.26 (m, 3H), 3.11–3.06 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.31 (t, *J* = 7.1, 3H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.5, 170.5, 74.0, 71.6, 69.9, 61.7, 38.5, 37.8, 34.5, 30.7, 14.3; HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ Calcd for C₁₁H₁₇NO₃NaS₃, 330.0268, found 330.0268; [α]_D²⁰ = 32.4 (*c* 1.59, CH₂Cl₂).

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-((acetylthio)methyl)-2,2-dimethyltetrahydro-2*H*-thiazolo[4,3-*b*]thiazole-3-carboxylic acid (**14c**). Prepared in an analogous route as described for **14a** starting from **9c** (0.15 g, 0.57 mmol) and purified by column chromatography on flash silica gel (nHex:EtOAc:AcOH 8:2:0.01) to yield **14c** (0.11 g, 62%) as a colorless oil: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.48 (br, 1H), 5.03 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.75 (s, 1H), 3.49 (dd, *J* = 11.7, 6.6 Hz, 1H), 3.24 (dd, *J* = 14.2, 6.6 Hz, 1H), 3.19 (dd, *J* = 14.1, 7.6 Hz, 1H), 3.04 (dd, *J* = 11.7, 5.4 Hz, 1H), 2.39 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.49 (s, 3H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.6, 172.0, 78.5, 72.4, 69.3, 55.1, 40.7, 36.7, 30.7, 28.1, 27.9; HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + 2Na - H]⁺ Calcd for C₁₁H₁₆NO₃Na₂S₃ 352.0088, found 352.0088; [α]_D²⁰ - 38.2 (c 1.1, CH₂Cl₂).

(±) ((tetrahydro-2*H*-thiazolo[4,3-*b*]thiazol-5-yl)methyl) ethanethioate (**14d**). Prepared in an analogous route as described for **14a** starting from **9d** (0.05 g, 0.26 mmol) and purified by column chromatography on flash silica gel (nHex:EtOAc 8:2) to yield **14d** (0.04 g, 65%) as a yellow oil: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.02 (dd, *J* = 5.1, 3.1 Hz, 1H), 4.21 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.60–3.48 (m, 2H), 3.25 (dd, *J* = 13.6, 6.2 Hz, 1H), 3.20–2.99 (m, 5H), 2.36 (s, 3H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.6, 75.4, 69.9, 56.9, 38.1, 38.0, 32.1, 30.8; HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ Calcd for C₈H₁₃NONaS₃ 258.0057, found 258.0061.

(±) (3*a*-dihydro-1*H*-benzo[d]thiazolo[4,3-*b*]thiazol-1-yl)methanethiol (**14e**). Prepared in an analogous route as described for **14a** starting from **9e** (0.5 g, 2.1 mmol) and purified by column chromatography on flash silica gel (nHex:CH₂Cl₂ 8:2) to yield **14e** (0.464 g, 79%) as a colorless oil: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.12–7.04 (m, 2H), 6.86 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.18 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 5.15 (dd, *J* = 5.4, 3.9 Hz, 1H), 3.32 (dd, *J* = 13.8, 8.6 Hz, 1H), 3.25 (dd, *J* = 10.6, 5.3 Hz, 1H), 3.22 (dd, *J* = 13.8, 5.8 Hz, 1H), 2.92 (t, *J* = 10.1 Hz, 1H), 2.39 (s, 3H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.5, 145.3, 126.4, 124.7, 123.1, 122.2, 110.9, 70.8, 67.3, 40.3, 37.8, 30.8; HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ Calcd for C₁₂H₁₃NONaS₃, 306.0057, found 306.0056.

(2*R*,3*S*,5*R*,7*aS*)-methyl 5-((acetylthio)methyl)-2-methyltetrahydro-2*H*-thiazolo[4,3-*b*]oxazole-3-carboxylate (**15a**). Prepared in an analogous route as described for **14a** starting from **10a** (0.1 g, 0.4 mmol) and purified by column chromatography on flash silica gel (nHex:EtOAc 9:1) to yield **15a** (0.93 g, 79%) as a colorless oil: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.22 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.29 (dd, *J* = 8.2, 6.7 Hz, 1H), 4.10 (dq, *J* = 8.5, 6.0 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.31 (dd, *J* = 12.9, 4.5 Hz, 1H), 3.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.18 (dd, *J* = 13.8, 8.3 Hz, 1H), 3.09 (dd, *J* = 12.9, 0.7 Hz, 1H), 3.05 (dd, *J* = 13.7, 6.6 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.40 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.2, 171.0, 99.2, 76.4, 74.7, 73.3, 52.3, 37.4, 36.4, 30.6, 18.0; HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ Calcd for C₁₁H₁₇NO₄NaS₂, 314.0497, found 314.0501; [α]_D²⁰ - 61.1 (c 0.96, CH₂Cl₂).

S-(((3*R*,5*R*,7*aS*)-3-cyclohexyltetrahydro-2*H*-thiazolo[4,3-*b*]oxazol-5-yl)methyl) ethanethioate (**15b**). Prepared in an analogous route as described for **14a** starting from **10b** (0.1 g, 0.39 mmol) and purified by column chromatography on flash silica gel (nHex:EtOAc 9:1) to yield **15b** (0.072 g, 62%) as a colorless oil: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.06 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 4.20 (dd, *J* = 7.4, 6.9 Hz, 1H), 3.98 (dd, *J* = 8.4, 6.8 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J* = 8.4, 7.3 Hz, 1H), 3.28 (dd, *J* = 12.5, 4.3 Hz, 1H), 3.26 (dd, *J* = 13.8, 6.8 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 12.6, 1.0 Hz, 1H), 2.98 (dd, *J* = 13.7, 7.7 Hz, 1H), 2.90 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.97–1.90 (m, 1H), 1.82–1.65 (m, 4H), 1.42–1.33 (m, 1H), 1.31–1.10 (m, 3H), 1.04–0.92 (m, 2H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.5, 99.5, 75.0, 71.2, 68.4, 41.7, 37.2, 37.0, 30.7, 30.6, 29.1, 26.6, 26.4, 26.3; (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ Calcd for C₁₄H₂₃NO₂NaS₂ 324.1068, found 324.1068. [α]_D²⁰ - 24.4 (c 0.96, CH₂Cl₂).

Synthesis of *S*-butyryl bisthiazolidine (**14f**)

(±)((tetrahydro-2*H*-thiazolo[4,3-*b*]thiazol-5-yl)methyl) butanethioate (**14f**). Into a two-necked flask under nitrogen atmosphere was dissolved **9d** (0.04 g, 0.21 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) and added dropwise with stirring under ice bath butyryl chloride (0.027 g, 0.25 mmol) and TEA (0.025 g, 0.25 mmol). The mixture was heated to room temperature and stirred for 2 h. Ice frost was added and stirred for 1 h. This mixture was poured into a saturated aqueous solution of NaCl (30 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 30 mL). The combined organic extracts were dried with MgSO₄, filtered and concentrated to dryness and the crude product was purified by column chromatography on flash silica gel (nHex:EtOAc 9:1) to yield **14f** (0.038 g, 69%) as a yellow oil: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.02 (dd, *J* = 5.1, 3.1 Hz, 1H), 4.20 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.58 (dd, *J* = 11.4, 4.9 Hz, 1H), 3.55–3.48 (m, 1H), 3.25 (dd, *J* = 13.6, 6.2 Hz, 1H), 3.20–2.98 (m, 5H), 2.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.70 (sext, *J* = 7.4, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 199.3, 75.5, 70.0, 57.0, 46.1, 38.0, 37.6, 32.1, 19.3, 13.6; HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ Calcd for C₁₀H₁₇NONaS₃ 286.0370, found 286.0370.

Synthesis of *S*-benzoyl bisthiazolidine **14g**

(3*R*,5*R*,7*aS*)-5-((benzoylthio)methyl)tetrahydro-2*H*-thiazolo[4,3-*b*]thiazole-3-carboxylic acid (**14f**). Prepared in an analogous route as described for **14f** starting from **9a** (0.35 g, 1.5 mmol) and benzoyl chloride (0.23 g, 1.6 mmol), purified by column chromatography on flash silica gel (CH₂Cl₂:EtOAc:AcOH 9:1:0.01) to yield **14g** (0.36 g, 71%) as a white powder: MP = 75 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99–7.96 (m, 2H), 7.64–7.59 (m, 1H), 7.50–7.45 (m, 2H), 5.12 (dd, *J* = 6.0, 3.9 Hz, 1H), 4.50 (dd, *J* = 8.3, 5.0 Hz, 1H), 4.23 (dd, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 1H), 3.67 (dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H), 3.46 (dd, *J* = 14.2, 5.0 Hz, 1H), 3.44 (dd, *J* = 11.6, 2.4 Hz, 1H), 3.37 (dd, *J* = 14.1, 8.3 Hz, 1H), 3.32 (dd, *J* = 11.4, 7.1 Hz, 1H), 3.14 (dd, *J* = 12.0, 3.9 Hz, 1H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 191.7, 171.7, 136.4, 134.3, 129.0, 127.7, 73.5, 72.3, 72.1, 39.5, 37.4, 33.5; HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + 2Na - H]⁺ Calcd for C₁₄H₁₄NO₃Na₂S₃ 385.9931, found 385.9931; [α]_D²⁰ - 27.8 (c 1.72, CH₂Cl₂).

5. *S*-acetyl bisthiazolidines deprotection

Deprotection of 14a using NH₂OH·HCl (Table 2, Entry 2): Into a two-necked flask, under nitrogen atmosphere, was dissolved **14a** (0.1 g, 0.36 mmol) in dry MeOH (4 mL) and added under ice bath NH₂OH·HCl (0.097 g, 1.4 mmol) and TEA (0.21 g, 2.1 mmol). The reaction mixture was heated to room temperature and stirred for 15 min. It was poured into HCl 5% and extracted with EtOAc (3 × 30 mL). The combined organic extracts were concentrated to dryness and the crude product was purified by column chromatography on flash silica gel (nHex/EtOAc/AcOH 7:3:0.01) to yield **9a** (0.027 g, 33%).

Deprotection of 14a using TGA (Table 3, entry 1): Into a two-necked flask was dissolved **14a** (0.05 g, 0.18 mmol) in MeOH (1 mL) and added BP at pH 8 (19 mL) and TGA (0.025 mL, 0.36 mmol). The reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature. It was poured into HCl 5% and extracted with EtOAc (3 × 30 mL). The combined organic extracts were concentrated to dryness and the crude product was purified by column chromatography on flash silica gel (nHex/EtOAc/AcOH 7:3:0.01) to yield **9a** (0.032 g, 75%).

Deprotection of 14a using *n*-propanethiol, β-Mercaptoethanol, Thiophenol, 2-NH₂-4-Cl-thiophenol, Dithiothreitol (DTT) and Glutathione was carried out using the same method as described for TGA.

5.1. Preparation of polymer-supported exchange thiol (TG-NCO-SH)

O-(2-Aminoethyl)polyethylene glycol resin (0.1 g, 0.4 mmol/g, 1% DVB cross-linked, 100–200 mesh) was added to a syringe vessel and swollen in DMF (2 mL, 30 min). It was added a solution of 2-(acetylthio)acetic acid (0.026 g, 0.19 mmol), HBTU (0.073 g, 0.19 mmol) and DIPEA (0.054 mL, 0.29 mmol) in DMF (0.5 mL). The resin was shaken for 2 h. Reaction completion was monitored by Kaiser test. When a negative Kaiser test is obtained (2 cycles) the resin is filtered and washed with DMF (0.5 min x3). Finally, unreacted sites are capped by treatment with a solution of Ac₂O (300 μ L), DIPEA (150 μ L) in DMF (2.5 mL) for 15 min. After filtering, resin was washed with DMF (5 $\times$ 0.5 min). The resin was treated with a mixture of 2-mercaptoethanol (0.1 mL) and DIPEA (0.1 mL) in DMF (1.8 mL) and shaken under nitrogen atmosphere (3 $\times$ 15 min). After filtering the resin was washed with DMF (7 $\times$ 0.5 min), and thiol loading was calculated by Ellman's method.

5.2. Ninhydrin test

Blank: Into a 10 $\times$ 75-mm test tube was weighed an aliquot corresponding to 3 mg of dry resin TG-HL-NH₂. It was added a solution of phenol in absolute ethanol (42.5 mM, 100 μ L) a solution of ninhydrin in absolute ethanol (280 mM, 100 μ L) and a solution of NaCN in water (2 mM, 100 μ L), mixed and placed in a heating block preadjusted to 100 °C. The color of this solution is dark blue.

Sample: Into a 10 $\times$ 75-mm test tube was weighed an aliquot corresponding to 3 mg of dry resin after coupling reaction. It was added a solution of phenol in absolute ethanol (42.5 mM, 100 μ L) a solution of ninhydrin in absolute ethanol (280 mM, 100 μ L) and a solution of NaCN in water (2 mM, 100 μ L), mixed and placed in a heating block preadjusted to 100 °C. Color did not develop after 10 min.

Thiol quantification: Ellman's method: Into a 5 mL volumetric flask was accurately weighed an aliquot corresponding to 3 mg of dry resin. It was added THF (1 mL), a solution of Ellman's reagent in MeOH (5.0 $\times$ 10⁻³ M in methanol, 1 mL), and DIPEA (5 μ L). The flask was shaken on an orbital shaker for 30 min and diluted to 5.0 mL with methanol. Then, the solution was diluted (1/10) and the absorbance at 412 nm (ϵ = 13600 M⁻¹cm⁻¹) was measured against a blank reference (A = 0.279, 0.354 meq/g resin).

Time optimization of deprotection reaction using 14a as starting material and TG-NCO-SH resin as deprotect agent (Table 4): A solution of 14a (0.004 g, 0.015 mmol) in MeOH (0.1 mL) and degassed BP pH 8 (0.4 mL) was added to the polymer-supported catalyst (TG-NCO-SH, 0.09 g, 0.03 mmol) and stirred under nitrogen atmosphere at room temperature. At suitable intervals (2, 6 and 24 h) the filtrate was collected, diluted and analyzed by analytical HPLC.

TG-NCO-SH-catalyzed deprotection of 14a (Scale up): A solution of 14a (0.0227 g, 0.081 mmol) in MeOH (0.5 mL) and degassed BP pH 8 (1.0 mL) was added to the polymer-supported catalyst (TG-NCO-SH, 0.3961 g, 0.162 mmol) and stirred for 24 h at room temperature under nitrogen atmosphere. Then, the polymer was filtered and washed with MeOH. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporated. The mixture was poured into HCl 5% and extracted with EtOAc (3 $\times$ 30 mL). The solvent was removed under reduced pressure to give compound 9a (0.0181 g, 94%).

Deprotection of 14b-g and 15a-b using TG-NCO-SH as deprotect agent was carried out using the same approach as described for 14a.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have

appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We would like to thank Horacio Pezaroglo and Gonzalo Hernández for running the NMR spectra. Dra. Laura Domínguez for making available the HPLC equipment.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tet.2021.132335>.

Funding

This work was supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health (NIH) to G.M. under Award Number R01AI100560. This study was also supported in part by funds from Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC)-Grupos from Udelar. V.V. is recipient of a fellowship from CSIC-Udelar.

References

- [1] A.B. Atkinson, J.I.S. Robertson, Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure, *Lancet* 314 (1979) 836–839, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(79\)92186-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(79)92186-X).
- [2] Å. Lindell, T. Denneberg, E. Hellgren, J.O. Jeppsson, H.G. Tiselius, Clinical course and cystine stone formation during tiopronin treatment, *Urol. Res.* 23 (1995) 111–117, <https://doi.org/10.1007/BF00307941>.
- [3] M.G. Spillantini, et al., Vivo 'enkephalinase' inhibition by acetorphan in human plasma and CSF, *Eur. J. Pharmacol.* 125 (1986) 147–150, [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(86\)90094-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(86)90094-4).
- [4] L. Leggio, G. Addolorato, L. Abenavoli, G. Gasbarrini, Review article Wilson's disease: clinical, genetic and pharmacological findings, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 18 (2005) 7–14, <https://doi.org/10.1177/039463200501800102>.
- [5] Y. Miyazawa, et al., Synthesis and odour evaluation of novel sulfur-containing cyclic acetals, *Flavour Fragrance J.* 34 (2019) 43–51, <https://doi.org/10.1002/ffj.3478>.
- [6] W. Grosch, *Aroma compounds, Handb. Food Anal. Second Ed. Phys. Character. Nutr. Anal.* 1 (2004) 717–746.
- [7] M.M. González, et al., Bisthiazolidines: a substrate-mimicking scaffold as an inhibitor of the NDM-1 carbapenemase, *ACS Infect. Dis.* 1 (2016) 544–554, <https://doi.org/10.1021/acsinfdis.5b00046>.
- [8] P. Hinchliffe, et al., Cross-class metallo- β -lactamase inhibition by bisthiazolidines reveals multiple binding modes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) E3745–E3754, <https://doi.org/10.1073/pnas.1601368113>.
- [9] M.F. Mojica, et al., Exploring the role of residue 228 in substrate and inhibitor recognition by VIM Metallo- β -lactamases, *Biochemistry* 54 (2015) 3183–3196, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00106>.
- [10] P.G.M. Wuts, T.W. Greene, Protection for the thiol group, *Greene's Prot. Groups Org. Synth.* (2006) 647–695, <https://doi.org/10.1002/9780470053485.ch6>.
- [11] C. Saiz, P. Wipf, G. Mahler, Synthesis and ring-chain-ring tautomerism of bisoxazolidines, thiazolidinylloxazolidines, and spiro-thiazolidines, *J. Org. Chem.* 76 (2011) 5738–5746, <https://doi.org/10.1021/jo2008498>.
- [12] L. Zervas, I. Photaki, N. Ghelis, On cysteine and cystine peptides. II S-acyl-cysteines in peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1963) 1337–1341, <https://doi.org/10.1021/ja00892a027>.
- [13] D. Witt, R. Klajn, P. Barski, B.A. Grzybowski, Applications, properties and synthesis of ω -functionalized n-alkanethiols and disulfides – the building blocks of self-assembled monolayers, *Curr. Org. Chem.* 8 (2004) 1763–1797, <https://doi.org/10.2174/1385272043369421>.
- [14] B.T. Holmes, A.W. Snow, Aliphatic thioacetate deprotection using catalytic tetrabutylammonium cyanide, *Tetrahedron* 61 (2005) 12339–12342, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.09.092>.
- [15] Chung Keun Jin, et al., The selective deprotection of thioesters using titanium(IV) chloride/zinc, *Synlett* 12 (2001) 1956–1958, <https://doi.org/10.1055/s-2001-18769>.
- [16] S. Tallon, A.C. Lawlor, S.J. Connon, Urea-catalyzed transthioesterification: towards a new kinetic resolution methodology, *ARKIVOC* (iv) (2011) 115–126, <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.410>.
- [17] P.E. Dawson, I. T.W. Muir, I. Clark-Lewis, S.B. Kent, Synthesis of proteins by native chemical ligation, *Science* 266 (5186) (1994) 776–779, <https://doi.org/10.1126/science.7973629>.
- [18] S.V. Ley, I.R. Baxendale, New tools and concepts for modern organic synthesis, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 573–586, <https://doi.org/10.1038/nrd871>.

- [19] A. Kirschning, H. Monenschein, R. Wittenberg, Functionalized polymers - emerging versatile tools for solution-phase chemistry and automated parallel synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 650–679, [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010216\)40:4<650::AID-ANIE6500>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010216)40:4<650::AID-ANIE6500>3.0.CO;2-C).
- [20] C. Saiz, et al., Discovering *Echinococcus granulosus* thioredoxin glutathione reductase inhibitors through site-specific dynamic combinatorial chemistry, *Mol. Divers.* 18 (2014) 1–12, <https://doi.org/10.1007/s11030-013-9485-3>.
- [21] C. Saiz, et al., Enantioselective synthesis of new oxazolidinyl-thiazolidines as enzyme inhibitors, *Tetrahedron Asymmetry* 28 (2017) 110–117, <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.11.002>.
- [22] V. Martínez, et al., Preparation and mechanistic studies of 2-substituted bis-thiazolidines by imine exchange, *Eur. J. Org. Chem.* 2020 (2020) 1084–1092, <https://doi.org/10.1002/ejoc.201901677>.
- [23] O.B. Wallace, D.M. Springer, Mild, selective deprotection of thioacetates using sodium thiomethoxide, *Tetrahedron Lett.* 39 (1998) 2693–2694, [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)00421-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)00421-3).
- [24] G.J. Van Der Heden Van Noort, R. Kooij, P.R. Elliott, D. Komander, H. Ovaa, Synthesis of poly-ubiquitin chains using a bifunctional ubiquitin monomer, *Org. Lett.* 19 (2017) 6490–6493, <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b03085>.
- [25] R.P. Szajewski, G.M. Whitesides, Rate constants and equilibrium constants for thiol-disulfide interchange reactions involving oxidized glutathione, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 2011–2026, <https://doi.org/10.1021/ja00526a042>.
- [26] C.D. Ritchie, J.E. VanVerth, P.O.I. Virtanen, Cation-anion combination reactions. 21. Reactions of thiolate ions, cyanide ion, and amines with cations and carbonyl compounds in Me₂SO solution, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 3491–3497, <https://doi.org/10.1021/ja00376a041>.
- [27] W.P. Jencks, K. Salvesen, Equilibrium deuterium isotope effects on the ionization of thiol acids, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 4433–4436, <https://doi.org/10.1021/ja00747a016>.
- [28] J.P. Danehy, C.J. Noel, The relative nucleophilic character of several mercaptans toward ethylene oxide, *J. Am. Chem. Soc.* 82 (1960) 2511–2515, <https://doi.org/10.1021/ja01495a028>.
- [29] I. Pitman, I. Morris, Covalent additions of glutathione, cysteine, homocysteine, cysteamine and thioglycolic acid to quinazoline cation, *Aust. J. Chem.* 32 (1979) 1567, <https://doi.org/10.1071/CH9791567>.
- [30] S. Iimura, K. Manabe, S. Kobayashi, Hydrophobic polymer-supported catalyst for organic reactions in water: acid-catalyzed hydrolysis of thioesters and transprotection of thiols, *Org. Lett.* 5 (2003) 101–103, <https://doi.org/10.1021/ol026906m>.
- [31] R. De Marco, M.L. Gioia, A. Di Leggio, A. Liguori, M.C. Viscomi, Deprotection of *N*-Nosyl- α -amino acids by using solid-supported mercaptoacetic acid, *Eur. J. Org. Chem.* 22 (2009) 3795–3800, <https://doi.org/10.1002/ejoc.200900271> (2009).
- [32] R. Quarrell, T.D.W. Claridge, G.W. Weaver, G. Lowe, Structure and properties of TentaGel resin beads: implications for combinatorial library chemistry, *Mol. Divers.* 1 (1996) 223–232, <https://doi.org/10.1007/BF01715526>.
- [33] J.K. Cho, B.D. Park, K.B. Park, Y.S. Lee, Preparation of core-shell-type poly(ethylene glycol)grafted polystyrene resins and their characteristics in solid-phase peptide synthesis, *Macromol. Chem. Phys.* 203 (2002) 2211–2217, [https://doi.org/10.1002/1521-3935\(200211\)203:15<2211::AID-MACP2211>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-3935(200211)203:15<2211::AID-MACP2211>3.0.CO;2-X).
- [34] L. Christensen, et al., Solid-Phase synthesis of peptide nucleic acids, *J. Pept. Sci.* 1 (1995) 175–183, <https://doi.org/10.1002/psc.310010304>.
- [35] F. Gaggini, A. Porcheddu, G. Reginato, M. Rodriguez, M. Taddei, Colorimetric tools for solid-phase organic synthesis, *J. Comb. Chem.* 6 (2004) 805–810, <https://doi.org/10.1021/cc049963a>.
- [36] M. Amblard, J.A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis, *Mol. Biotechnol.* 33 (2006) 239–254, <https://doi.org/10.1385/MB:33:3:239>.
- [37] J.A. Camarero, G.J. Cotton, A. Adeva, T.W. Muir, Chemical ligation of unprotected peptides directly from a solid support, *J. Pept. Res.* 51 (1998) 303–316, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1998.tb00428.x>.
- [38] J.P. Badyal, et al., A simple method for the quantitative analysis of resin bound thiol groups, *Tetrahedron Lett.* 42 (2001) 8531–8533, [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)01820-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)01820-2).
- [39] K. Troev, G. Grancharov, R. Tsevi, A. Tsekova, A novel approach to recycling of polyurethanes: chemical degradation of flexible polyurethane foams by triethyl phosphate, *Polymer* 41 (2000) 7017–7022, [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00054-9](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00054-9).



A Journal of



Accepted Article

Title: Preparation and mechanistic studies of 2-substituted Bisthiazolidines by imine exchange

Authors: Veronica Martínez, Valentina Villamil, Diego Duarte, Cecilia Saiz, Danilo Davyt, Carolina Fontana, Nicolás Veiga, and Graciela Mahler

This manuscript has been accepted after peer review and appears as an Accepted Article online prior to editing, proofing, and formal publication of the final Version of Record (VoR). This work is currently citable by using the Digital Object Identifier (DOI) given below. The VoR will be published online in Early View as soon as possible and may be different to this Accepted Article as a result of editing. Readers should obtain the VoR from the journal website shown below when it is published to ensure accuracy of information. The authors are responsible for the content of this Accepted Article.

To be cited as: *Eur. J. Org. Chem.* 10.1002/ejoc.201901677

Link to VoR: <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201901677>

Supported by



WILEY-VCH

FULL PAPER

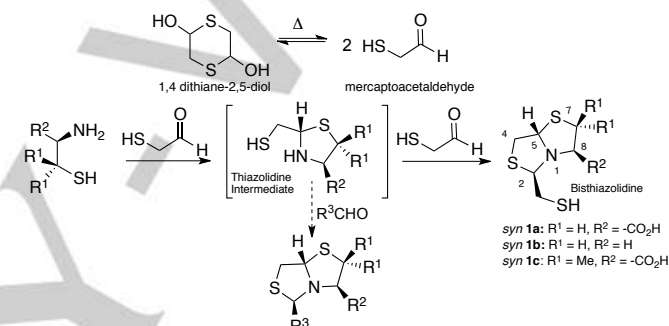
Preparation and mechanistic studies of 2-substituted Bisthiazolidines by imine exchange.

Verónica Martínez,^[a] Valentina Villamil,^[a] Diego Duarte,^[a] Cecilia Saiz,^[a] Danilo Davyt,^[a] Carolina Fontana,^[b] Nicolás Veiga,^[c] Graciela Mahler,^{*[a]}

Abstract: Bisthiazolidines (BTZ) are bicyclic compounds considered penicillin analogs that inhibit the full range of Metallo- β -Lactamases (MBLs) and potentiate β -lactam activity against resistant bacteria. Herein we present a new methodology to prepare 2-substituted bisthiazolidines by aldehyde exchange. Thirteen new bisthiazolidines were prepared using this methodology, with yields ranging from 31 to 75%. The reaction is based on *in situ* imines formation which are able to exchange side chains. The reaction intermediates were studied based on NMR experiments and a key imine **1b-II** could be detected in the reaction mixture. Furthermore, a DFT computational analysis was performed to gain insights into the reaction mechanism, allowing us to unveil the different pathways and their activation barriers within the synthetic route. The results suggest that the most favorable route involve the formation of the thiazolidine **1b-III** by i) a N-assisted N-C bond cleavage, and ii) a thiol-mediated 5 *endo*-trig cyclization followed by a C-N bond cleavage. In contrast with previously reported evidence, the imine metathesis was discarded as a plausible pathway. Finally, the reaction of **1b-III** with aldehyde **2a** leads to bicycle **4a** via the iminium ion **1b-V**.

Thiazolidines are imino-type compound, having the ability to exchange at the acetalic position with different aldehydes [8-11]. Imine exchange is a process triggered by acid catalysis [12], amine [13,14], or transition metal complexes containing a metal-imido group $M=NR$ ($M = Zr$ [15], Mo [16], Nb [17], Ti [18], Hf [19]). We envisioned the potentiality of this phenomenon in bisthiazolidines as well.

Scheme 1. Synthesis of mercaptomethyl bisthiazolidines **1**.



Introduction

Bisthiazolidines[1] (**1**) are enantiomerically pure bicycles previously prepared in high yields (Scheme 1) [2]. Interestingly, they display activity against Metallo- β -Lactamases (MBLs), a diverse set of enzymes that catalyze the hydrolysis of a broad range of β -lactam drugs including carbapenems [3,4]. These compounds have been recently characterized as crossclass inhibitors against seven different MBLs, some of clinical relevance like NDM-1, VIM-2, and L1 [2,5-7].

Bicycles **1** are obtained in a tandem reaction by double condensation of L-aminothiols with two molecules of mercaptoacetaldehyde. Attempts to isolate the thiazolidine intermediate failed and the bicyclic 2-mercaptomethyl bisthiazolidines products were always obtained in high yields (Scheme 1). Therefore, the possibility to introduce a different substituent in the position 2 of the heterocycle was limited, since it was not possible to isolate the thiazolidine intermediate that could react with a different aldehyde (R^3CHO).

The present work explores the synthesis of 2-substituted bisthiazolidines with alkyl or aryl chains by exchanging 2-mercaptomethyl bisthiazolidines with different aldehydes. The mechanistic details of the synthetic route were unraveled using a combined NMR spectroscopic and *in silico* techniques.

Results and Discussion

Bisthiazolidine **1a**, and isobutyraldehyde **2a** were selected as a model for the exchange reaction. We first assayed the reaction in MeOH, both in absence of catalyst or using additives as *p*-TsOH ac. [20], NH_4OAc [21] and L-Proline [22], (see Table 1). The results showed that a catalyst is needed for the reaction to proceed, and the best conversion was obtained when using NH_4OAc .

Table 1. Results of the exchange reactions using different catalysts.

Entry	Catalyst	1a to 3a conversion (%) ^[a]
1	-	0
2	<i>p</i> -TsOH (0.1 eq)	0
3	NH_4OAc (1.5 eq)	60

[a] Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Avda. General Flores 2124, CC1157, Universidad de la República (UdelAR), Montevideo, Uruguay
E-mail: gmahler@fq.edu.uy

[b] Laboratorio de Espectroscopía y Fisicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte (S.R.A. Facultad de Química), Ruta 3 km 363, UdelAR, Paysandú, Uruguay

[c] Química Inorgánica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, General Flores 2124, CC1157, UdelAR, Montevideo, Uruguay

FULL PAPER

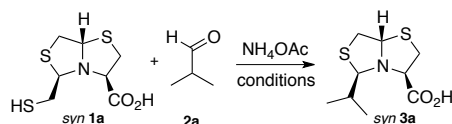
4

L-Pro (1.5 eq)

14

^[a] The conversion of **1a** to **3a** was determined by ¹H-NMR spectroscopy using the formula % = (I_{3a}/(I_{1a} + I_{3a}))100; where I is the integral value of the corresponding compounds.

Table 2. Solvent reaction screening for the conversion.



^a The conversion of **1a** to **3a** was determined by ¹H-NMR spectroscopy using the formula % = (I_{3a}/(I_{1a} + I_{3a}))100; where I is the integral value of the corresponding compound. ^b Isolated yield obtained after chromatographic purification. ^c nd = not determined. ^d BA = buffer acetate.

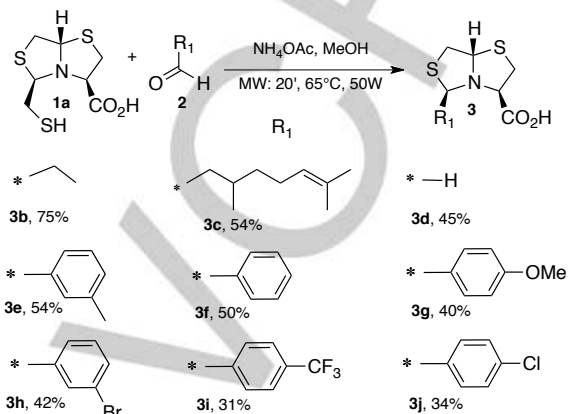
Entry	Conditions: temperature, time	solvent,	1a to 3a conversion (%) ^[a]	3a yield (%) ^[b]
1	MeOH, reflux, 3 h		60	60
2	MeOH, MW 65 °C, 20 min.		60	55
3	BA ^[d] pH 5, reflux, 3 h		0	nd ^[c]
4	DCE, MW 65 °C, 20 min.		0	nd ^[c]
5	DCM, MW 65 °C, 20 min.		0	nd ^[c]
6	<i>i</i> PrOH, MW 65 °C, 20 min.		28	20
7	TFE, MW 65 °C, 20 min.		45	45
8	BuOH, MW 65 °C, 20 min.		11	nd ^[c]
9	EtOH, MW 65 °C, 20 min.		65	60
10	MeCN, MW 65 °C, 20 min. min		0	nd ^[c]
11	DMF, MW 65 °C, 20 min.		34	23
12	Neat, MW 65 °C, 5 min.		100	33
10	MeCN, MW 65 °C, 20 min. min		0	nd ^[c]

Once the best catalyst was established, the use of microwave (MW) and conventional heating was explored to perform the exchange reaction. The results revealed that both heating methods gave similar yields but when using MW the reaction time was shorter (see entries 1 and 2 in Table 2). Consequently, we selected it as a source of heating to explore the optimal solvent for the exchange reaction.

Different organic solvents, including nonpolar, polar protic and aprotic, as well as aqueous buffer or neat conditions, were employed to study the effect over the reaction [23]. The results are compiled in Table 2. The reaction did not proceed in aqueous buffer at pH 5 or in MeCN (see entries 3 and 10, respectively), or in nonpolar solvents like DCM and DCE (see entries 5 and 4,

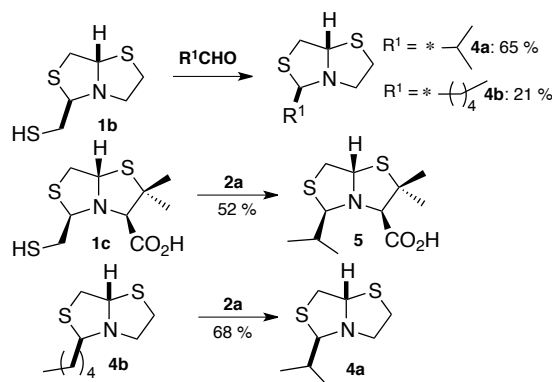
respectively). The results evidenced that among the different solvents tried, MeOH and EtOH (entries 2 and 9, respectively) gave the best results in terms of reaction time and yield (55 and 60 %, respectively). Solvent free conditions led to lower yield (33 %), probably due to decomposition of starting material.

Scheme 2. Preparation of 2-substituted bithiazolidines



The ability of **1a** to exchange with aliphatic and aromatic aldehydes was studied using general conditions previously assayed, aldehyde (2eq), NH₄OAc (1.5 eq), MeOH, MW, 20 min. (Scheme 2). The reaction was carried out with a diverse group of aldehydes, with yields ranging from 31% to 75%. Aliphatic aldehydes exchanged more efficiently than the aromatic ones, with yields ranging from 45% to 75%. Aromatic aldehydes were able to exchange only using MW heating, leading to the products in moderate yields (from 31 to 54%). Interestingly, conventional heating led to decomposition products, and the desired products could not be isolated. The electronic nature of the substituent in the aromatic ring did not present a clear influence in the exchange process and in this case, the best yield was obtained with *m*-tolualdehyde (54%).

Scheme 3. Compounds **1b**, **1c**, and **4b** were used for the exchange under standard conditions R¹CHO (2 eq), NH₄OAc (1.5 eq), MeOH, MW, 65 °C, 50 W, and 20 min.



FULL PAPER

Mercaptomethyl bisthiazolidines **1b** and **1c**, which bear different substituents at positions 7 and 8, were used to study the scope of the metathesis reaction (Scheme 3). The compounds were submitted to the exchange conditions with aldehyde **R¹CHO 2** (2 eq), and NH_4OAc (1.5 eq) in MW for 20 min. Both heterocycles **1b-c** were able to exchange, leading to products **4a**, **4b** and **5** (65%, 21% and 52% yield respectively). The need of mercaptomethyl group for the exchange process was evaluated using 2-pentyl bisthiazolidine **4b**, with aldehyde **2a** (see Scheme 3). The formation of the expected product **4a** was observed, indicating that 2-mercaptomethyl is not essential for the reaction.

Mechanistic studies

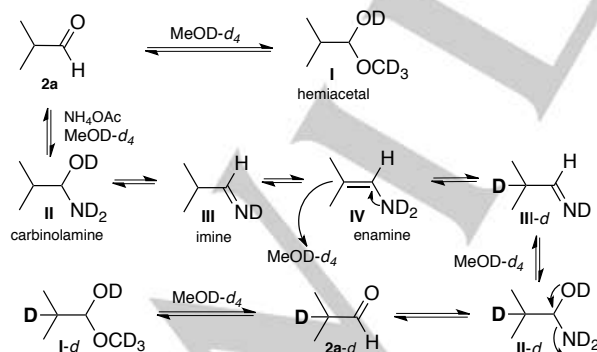
Bisthiazolidines are imino-type compounds, potentially able to reversible exchange a C=N linkage. Initially, the mechanism was thought to proceed through an imine exchange process involving imines formed *in situ*. Basically, imine equilibration process is described to occur by three main types of reactions, hydrolysis, amine-imine exchange (transimination), or imine-imine exchange (imine metathesis) [24]. We propose an exchange of species formed *in situ*.

To study the reaction, we performed time-course NMR experiments of the different reaction steps, aiming to identify key intermediate products. The reactions were performed in MeOD-d_4 , and monitored using 1D ^1H and 2D ^1H , ^{13}C -HSQC and ^1H , ^{15}N -HMBC NMR spectra.

Isobutylimine formation, (step A)

First, we studied the initial equilibration process of aldehyde **2a** (2 eq) with NH_4OAc (1.5 eq) in MeOD-d_4 , in an NMR tube at room temperature. During this reaction we observed the formation of a complex mixture of species. Progressive deuteration of the α -position of the starting aldehyde took place, as well as, formation of the imine **III** and of the intermediate product (carbinolamine **II**). Based on the NMR analyses we proposed the deuteration mechanism shown in Scheme 4.

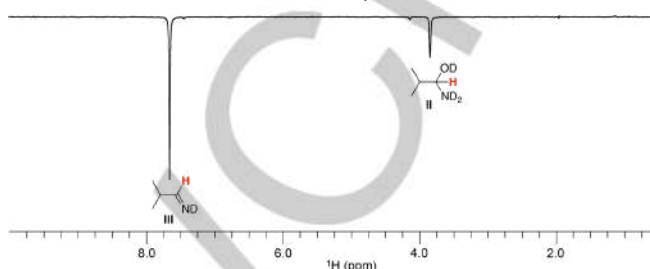
Scheme 4. Proposed deuteration mechanism of aldehyde **2a** and imine **III** at the α -position of the carbonyl and imine functions, respectively, in MeOD-d_4 .



When the aldehyde **2a** is dissolved in MeOD-d_4 , an equilibrium is established with the hemiacetal **I**. Upon addition of NH_4OAc , key proton resonances corresponding to the carbinolamine **II**, imine **III**, and enamine **IV** could be observed at 3.84, 7.64 and 6.39 ppm, respectively. The equilibrium between compounds **II** and **III** is

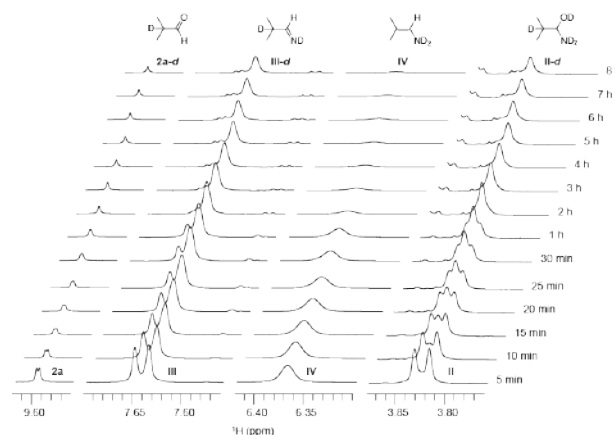
confirmed by the observation of an exchange peak in the 1D ^1H , ^1H -NOESY spectrum of the imine proton of compound **III** to the proton attached to the hemiaminal carbon in compound **II** (Figure 1).

Figure 1. 1D ^1H , ^1H -NOESY spectrum ($\tau_m = 500$ ms) recorded by selective irradiation of the imine protons of compounds **III** and **III-d**, 20 min. after the addition of NH_4OAc to the aldehyde **2a** in MeOD-d_4 . An exchange peak can be observed from the imine proton of compounds **III** and **III-d** to the protons attached to the hemiaminal carbon of compounds **II** and **II-d**.



The formation of the deuterated species started immediately after the addition of NH_4OAc , observed mainly as a change in the signal multiplicity from doublet to singlet due to the presence of a deuterium. The proton-deuterium couplings are typically much smaller than proton-proton couplings and therefore they are not observed herein. A gradual increase of the ratio of the aldehyde protons of **2a-d** (9.59 ppm, s, $\nu_{1/2} = 0.9$ Hz) and **2a** (9.59 ppm, d, $^3J_{\text{H,H}} = 1.1$ Hz) could be observed through time (Figure 2). The same process occurred for the imine protons of **III-d** (7.63 ppm, s, $\nu_{1/2} = 2.9$ Hz) and **III** (7.64 ppm, d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz), as well as the carbinolamine protons of **II-d** (3.82 ppm, s, $\nu_{1/2} = 2.9$ Hz) and **II** (3.82 ppm, d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz). The deuteration of the aforementioned species is almost complete after two hours of reaction. A gradual decrease in the intensity of the enamine proton resonance of compound **IV** (6.36 ppm, s) could also be observed, leading to a nearly complete disappearance of the signal after eight hours of reaction. An increase in the intensity of the hemiacetal proton resonance of the deuterated compound **I-d** (4.17 ppm, s) can also be observed in the ^1H NMR spectra (data not shown), with a concomitant drop of the respective signal of **I** (4.17 ppm, d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz).

Figure 2. Selected regions of the time-course ^1H NMR spectra of the reaction of aldehyde **2a** with NH_4OAc in MeOD-d_4 , showing selected resonances of compounds **2a** (aldehyde proton), **II** (hemiaminal proton), **III** (imine proton), and **IV** (enamine proton), and their respective deuterated counterparts **2a-d**, **II-d** and **III-d**.



FULL PAPER

Imine intermediate formation, (step B)

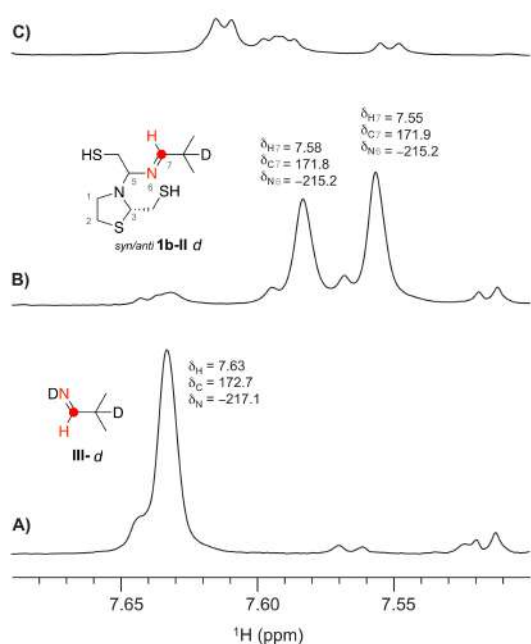
After a two-hour reaction of aldehyde **2a** with NH_4OAc in $\text{MeOD-}d_4$, the imine proton resonance of deuterated **III-d** was observed as a singlet at 7.63 ppm (Figure 3 B). The ^{13}C and ^{15}N resonances of the imine moiety of compound **III-d** were observed at 172.7 ppm and -217.1 ppm, respectively. These chemical shifts were obtained from the corresponding ^1H , ^{13}C -HSQC and ^1H , ^{15}N -HMBC spectra, and the nitrogen chemical shift is informed using MeNO_2 as external reference [25].

The resonance of the imine **III-d** disappeared immediately after the addition of bithiazolidine **1b** (1 eq), and two new resonances (both broad singlets) can be observed at 7.58 and 7.55 ppm (Figure 3 B), corresponding to two diastereomers of **1b-II**. In the ^1H , ^{13}C -HSQC spectrum these protons correlate to carbon resonances at 171.8 and 171.9 ppm, respectively, whereas the ^1H , ^{15}N -HMBC spectrum revealed two-bond correlations from the aforementioned protons to nitrogen resonances located at -215.2 ppm. The signals of the starting material **1b** were observed in the reaction mixture, (Figure S4).

Product formation, (step C)

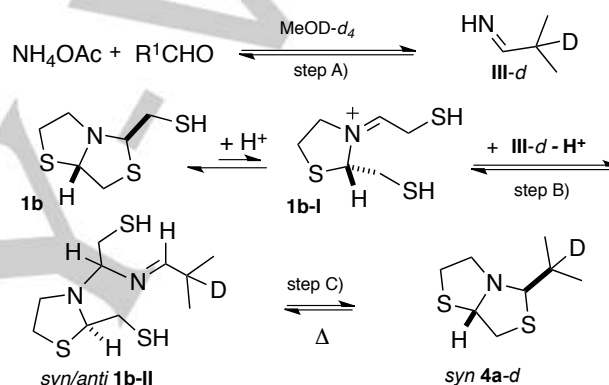
After heating the reaction in the NMR tube at 50°C for 120 min, the signals of the intermediate **1b-II** (7.58 and 7.55 ppm) completely disappeared and just a few minor signals were observed in the imine region between 7.62–7.44 ppm (Figure 3 C). The signals of the starting material **1b** also disappeared and the exchanged product **4a-d** could be observed, see Figure S9. Its presence was confirmed by independent preparative synthesis in $\text{MeOH-}d_4$.

Figure 3: ^1H -NMR spectra of the reaction mixtures: A) **2a** (0.21 mmol), NH_4OAc (0.15 mmol) in $\text{MeOH-}d_4$ (0.6 mL), rt, 2 h, step A; B) **2a** (0.21 mmol), NH_4OAc (0.15 mmol), Bithiazolidine **1b** (0.10 mmol), $\text{MeOH-}d_4$ (0.6 mL), rt, $t = 02$ min., step B; C) idem B) after 2h at 50°C , step C. The ^{13}C and ^{15}N chemical shift of the atoms highlighted in red color were obtained from ^1H , ^{13}C -HSQC and ^1H , ^{15}N -HMBC correlations to the respective imine protons.



Based on the above-mentioned ^1H -NMR analysis we proposed the mechanism depicted in Scheme 5. The imine **III-d** is formed in the reaction media, as observed by NMR, step A). The iminium specie **1b-I** could be formed by bithiazolidine **1b** opening, which was not observed in the ^1H -NMR spectrum. Imine nitrogen of **III-d** would attack the iminium carbon of compound **1b-I** to produce a new imine intermediate **1b-II**, observed in the NMR spectra as a diastereomeric mixture, step B). The structure of **1b-II** was proposed, based on spectroscopic analysis on chemical shifts of ^1H (7.58 bs and 7.55 bs), ^{13}C (171.8 and 171.9), and ^{15}N (-215.2), see Figure 3 B and Figures S4–S7 in the supporting information. When the reaction was heated at 50°C for 2h, the exchange took place. Intermediate **1b-II** then led to the product **4a-d** as the main reaction product.

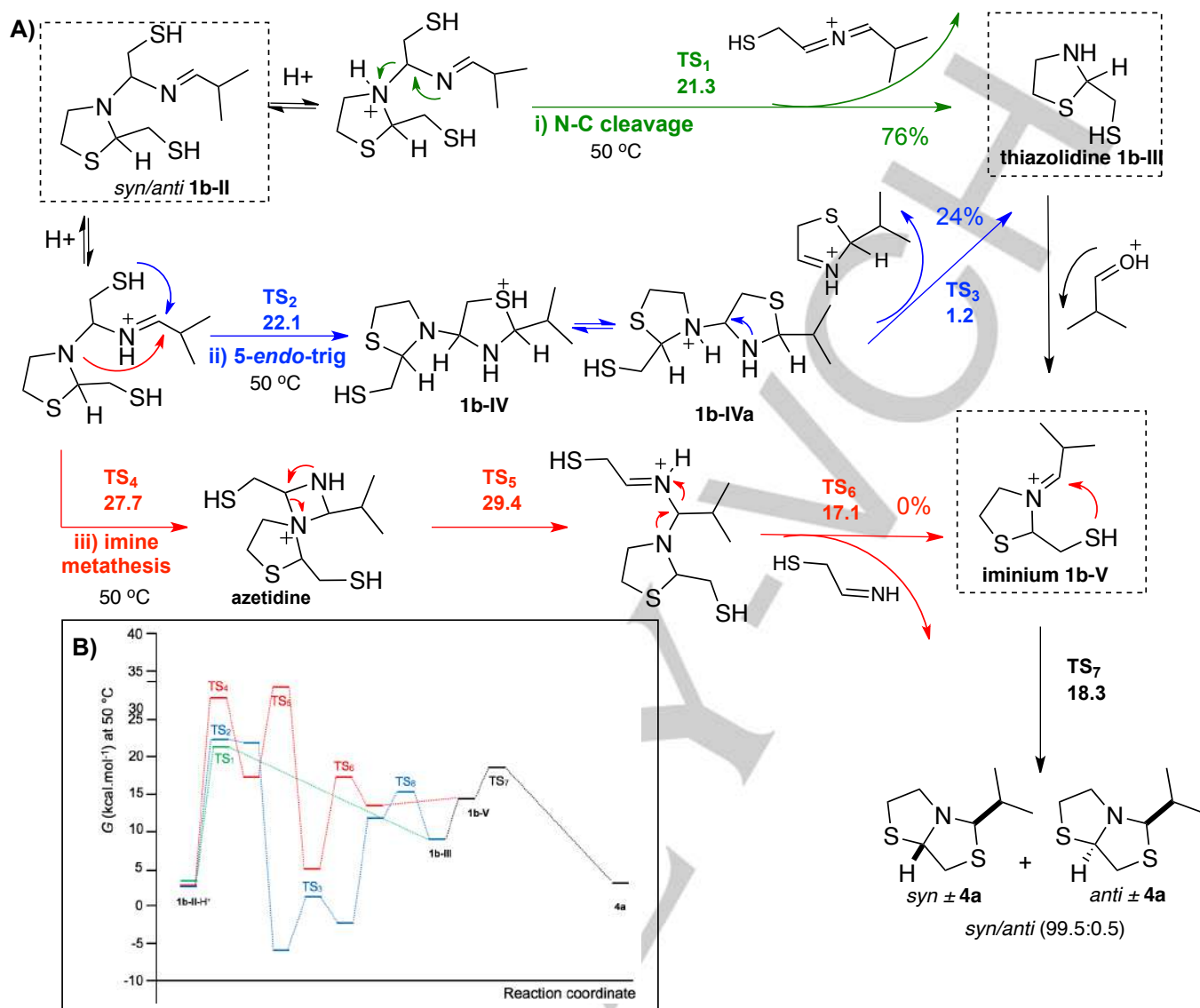
Scheme 5. Proposed exchange process mechanism.

*Theoretical calculations*

To gain insights into the mechanism of step C, we conducted DFT calculations to the exchange process on the intermediate **1b-II**. The level of theory used was M062x/6-31+G(d,p). All the stereochemical possibilities were taken into account (see Figure S11 and S12 for details). The summarized results are depicted in Scheme 6.

The mechanistic proposal begins with the protonation of **1b-II** at the a mine or imine N atoms, mediated by NH_4OAc catalyst. This triggers three different mechanistic pathways to form **4a**: i) thiazolidine **1b-III** formation by N-assisted N-C bond cleavage, ii) thiazolidine **1b-III** formation assisted by the thiol group of **1b-II** via a 5 *endo*-trig cyclization, followed by the C-N bond cleavage, and iii) imine metathesis via an azetidine intermediate, as proposed by Messmer *et al.* for aromatic imines [26], giving rise to the formation of iminium ion **1b-V**. The iminium ion **1b-V** is a common intermediate for all the routes, its intramolecular cyclization led to bithiazolidine **4a**.

FULL PAPER



Scheme 6. A) Mechanistic proposal. The activation barriers ($\Delta G^\ddagger$ at 50 °C) with respect to the reactant are included in kcal.mol⁻¹ for the lowest-activation-energy paths among the stereochemical variants. The distribution % under kinetic control (Curtin-Hammett principle) are also included for the different pathways. Diastereomer distribution for compound **4a** *syn/anti* (99.5:0.5) was determined at equilibrium. **B)** Predicted reaction profiles. The lowest-activation-energy process involves the green and black pathways (through TS1 and TS7). The DFT calculations were carried out at M062x/6-31+G(d,p) level of theory.

According to the computed activation barriers ($\Delta G^\ddagger$) at 50 °C (Scheme 6 B), the lowest-activation-energy process involves the formation of the thiazolidine **1b-III** by pathway i) (depicted in green in Scheme 9 A), followed by the reaction with aldehyde **2a** to form the iminium ion **1b-V**. Finally its intramolecular cyclization leads to **4a** (shown in black in Scheme 6 A). Considering all the stereochemical variants, the activation free energy barriers for the lowest-activation-energy paths are 21.3 and 18.3 kcal.mol⁻¹ (TS₁ and TS₇, respectively; see Scheme 6 B and S12). The 5 *endo*-trig cyclization followed by the C-N bond cleavage (pathway ii, shown

in blue in Scheme 6) also contribute to the formation of intermediate **1b-III** (24%), with a close activation barrier (22.1 kcal.mol⁻¹, see TS₂ structure in Scheme 6 B). Nevertheless, the imine metathesis (route iii, depicted in red in Scheme 6 A) was ruled out, since it exhibits higher energy transition states (TS₄ and TS₅, shown in Scheme 6 B and S11). Indeed, the free-energy difference between the global activation barriers of pathways i) and iii) is $\Delta_{TS5-TS1} = 8.1$ kcal.mol⁻¹.

Finally, the theoretical diastereomeric ratio predicted for **4a** under thermodynamic control is *syn/anti* (99.5:0.5), in accordance to the experimental value *syn/anti* (90:10). This validates the computational methods employed and gives evidence that the equilibrium was reached. The thermodynamic preference for the *syn* diastereomers can be accounted for by their structural features (Figure S13). The *syn* arrangement of the groups triggers a bending or “book-like” conformation of the bicycle, pulling apart the H and isopropyl substituents, and relieving the steric repulsion.

FULL PAPER

Conclusions

In summary, we have developed a new methodology to introduce alkyl and aryl substituents at position 2 of bithiazolidine ring with yields up to 75%. These findings could be useful to prepare new analogs of bithiazolidines as MBLs inhibitors. The reaction occurs by the *in situ* formation of imines followed by exchange, using NH_4OAc as promoter. The catalyst plays a dual role by forming the necessary imine for the exchange and giving the acidic media to promote it. A key imine intermediate (**1b-II**) was identified by NMR spectroscopy and chemical shifts of the different ^{15}N -imine were reported. DFT calculations allowed us to furnish a clear picture of the mechanism and activation barriers for the transformation of imine **1b-II** into **4a**. The most favorable routes involve the formation of thiazolidine **1b-III** by i) N-assisted N-C bond cleavage, and ii) a thiol-mediated 5 *endo*-trig cyclization followed by a C-N bond cleavage. Thiazolidine **1b-III** then reacts with aldehyde **2a** to give **4a**. Altogether these results contribute to a better understanding of the exchange process, adding new information to the scarce data available.

Experimental Section

1. General Methods

Reactions were monitored by analytical thin layer chromatography (TLC) on 0.25 mm silica gel coated plastic sheets (SIL G/UV 254). Flash chromatography on Silica gel 60 (40 μm average particle diameter) was used to purify the crude reaction mixtures. All NMR spectra were recorded in CDCl_3 -d at 300 K on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer equipped with a 5 mm QXI probe and on Avance III 400 MHz spectrometer equipped with a 5 mm BBOF plus probe. Chemical shifts (δ) are expressed in ppm using tetramethylsilane (TMS) as internal reference, and multiplicities are indicated as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), b (broad). The assignments of ^1H and ^{13}C NMR resonances were made based on a combination of ^1H , ^1H -COSY, ^1H , ^{13}C -HSQC, and ^1H , ^{13}C -HMBC spectra. The ^{15}N chemical shifts were determined using ^1H , ^{15}N -HMBC experiments, and referenced to MeNO_2 . Microwave reactions were performed using a single-mode from CEM Discover. All microwave reactions were performed in a sealed tube reaction condition. Reaction temperatures were monitored by an internal probe, and the temperature was maintained in each experiment. All reactions were carried out in dry, freshly distilled solvents under anhydrous conditions unless otherwise stated. Yields are reported for chromatographic and spectroscopic (^1H and ^{13}C NMR) pure compounds unless otherwise stated. HRMS spectra were recorded on Xevo G2S Q-TOF (Waters Corp) and MicroTOF-QTM (Bruker Daltonics) mass spectrometers. ESI(+)-LCMS spectra were recorded on LTQ XL Thermo. Optical rotation was measured using a Kruss Optronic GmbH P8000 polarimeter with a 0.5 mL cell (concentration c given as g/100mL). C, H, N and S analyses were carried out with a Thermo Scientific Flash 2000 elemental analyzer.

2. Synthetic procedures

(2*R*,5*S*,8*R*)-8-Carboxyl-2-mercaptopomethyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (**syn 1a**). To a stirred solution of L-cysteine (1 g, 8.3 mmol) in buffer acetate pH 5 (100 mL), was added 1,4-dithiane-2,5-dithiol (1.5 g, 9.9 mmol). The mixture was heated at reflux for 2 h. Then, it was cooled and poured into a saturated aqueous solution of NaCl (30 mL), extracted with EtOAc (5x30 mL), dried (Na_2SO_4) and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by chromatography on SiO_2 (nHex/EtOAc/AcOH 7:3:0.1) to give compound

1a (1.3 g, 65 %, *syn/anti* 92:08) as a white solid: ^1H NMR δ 5.05 (dd, J = 5.8, 4.2 Hz, 1H), 4.32 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.25 (dd, J = 7.1, 3.3 Hz, 1H), 3.55 (dd, J = 12.0, 5.8 Hz, 1H), 3.43 (dd, J = 11.4, 3.3 Hz, 1H), 3.33 (dd, J = 11.4, 7.1 Hz, 1H), 3.11 (dd, J = 12.0, 4.2 Hz, 1H), 2.81 (dd, J = 8.5, 6.9 Hz, 2H), 1.86 (t, J = 8.5 Hz, 1H_{SH}). The spectroscopic properties were identical as described in literature [5].

(2*R*,5*S*)-2-Mercaptomethyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane ($\pm$ *syn 1b*) Prepared in analogous route as described for **1a**, starting from cysteamine.HCl, to give **1b** (2.6 g, 74 %, *syn/anti* 92:08) as a yellow oil: ^1H NMR δ 4.97 (dd, J = 5.2, 3.7 Hz, 1H), 4.24 (dd, J = 7.0, 6.0 Hz, 1H), 3.54 (ddd, J = 11.6, 5.2, 0.5 Hz, 1H), 3.48 (ddd, J = 11.5, 5.7, 4.8 Hz, 1H), 3.21 (ddd, J = 11.5, 7.2, 6.6 Hz, 1H), 3.12 (m, 1H), 3.08 (m, 2H), 2.82 (ddd, 13.6, 7.6, 7.0 Hz, 1H), 2.65 (ddd, J = 13.6, 9.1, 6.0 Hz, 1H), 1.84 (dd, J = 9.1, 7.6 Hz, 1H); ^{13}C NMR δ 74.5, 73.2, 57.1, 38.4, 33.5, 31.8. The spectroscopic properties were identical as described in literature, erroneously reported as *anti* [1].

(2*R*,5*S*,8*R*)-8-Carboxyl-7-dimethyl-2-mercaptopomethyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (*syn 1c*). Prepared in analogous route as described for **1a**, starting from L-penicillamine to give **1c** as a white solid: ^1H NMR 4.98 (dd, J = 6.6, 5.4 Hz, 1H), 4.31 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.43 (dd, J = 11.7, 6.6 Hz, 1H), 3.06 (dd, J = 11.7, 5.4 Hz, 1H), 1.89 (t, J = 8.7 Hz, 1H_{SH}), 2.81 (m, 2H), 1.62 (s, 3H), 1.52 (s, 3H); mp 89-97°C. The spectroscopic properties were identical as described in literature [5].⁵

(2*R*,5*S*,8*R*)-8-Carboxyl-2-Isopropyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (*syn 3a*) To a solution of bithiazolidine **1a** (100 mg, 0.42 mmol) in dry MeOH (1 mL) was added isobutyraldehyde **2a** (0.077 mL, 0.84 mmol) and NH_4OAc (48.5 mg, 0.63 mmol). The reaction mixture was stirred at 65°C for 20 min. under microwave irradiation (50 W). The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on flash silica gel (*n* Hex/EtOAc 7:3 + 0.1% AcOH) to give **3a** (64 mg, 55%) as colorless oil: ^1H NMR δ 5.02 (t, J = 4.3 Hz, 1H), 4.12 (dd, J = 7.1, 3.0 Hz, 1H), 4.06 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 3.42 (m, 2H), 3.33 (dd, J = 11.3, 7.1 Hz, 1H), 3.02 (dd, J = 11.9, 4.3 Hz, 1H), 1.91 (dq, J = 13.3, 6.7 Hz, 1H), 1.04 (d, J = 6.6 Hz, 6H); ^{13}C NMR δ 173.6, 79.7, 73.9, 71.2, 38.2, 35.3, 33.3, 20.0, 18.5; IR (NaCl) ν 2851-3006 (br), 2958, 2931, 2870, 1718 (s), 1440, 1381, 1219, 1193, 1085 cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{21}$ -31.3° (c 3.2, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_2\text{S}_2$ 234.0617, Found 234.0607.

(2*R*,5*S*,8*R*)-8-Carboxyl-2-ethyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (*syn 3b*) Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and propionaldehyde **2b** to give **3b** (69 mg, 75%) as colorless oil: ^1H NMR δ 5.04 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.18 (dd, J = 5.4, 8.3 Hz, 1H), 4.09 (dd, J = 3.6, 7.1 Hz, 1H), 3.45 (m, 1H), 3.37 (m, 2H), 3.05 (dd, J = 5.1, 8.3 Hz, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.71 (tt, J = 7.3, 14.3 Hz, 1H), 1.02 (t, J = 7.3 Hz, 3H); ^{13}C NMR δ 172.6, 74.6, 73.2, 70.2, 37.9, 33.3, 31.6, 11.3; IR (NaCl) ν 2840-3076 (br), 2964, 2931, 2873, 1722 (s), 1625, 1438, 1377, 1267, 1212, 734, 702 cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{21}$ +96.1 (c 0.20, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M} - \text{H}]^-$ Calcd for $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{NO}_2\text{S}_2$ 218.0315, Found 218.0309.

Epimeric mixture (2*R*,5*S*,8*R*)-8-Carboxyl-2'-((*RS*)-2,6-dimethylhept-5-en-1-yl)-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (*syn 3c*) Prepared in an analogous route as described for **3a**, starting from **1a** and $\pm$ citronellal **2c** to give an epimeric mixture of *syn/anti* **3c** diastereomers (142 mg, 54%, epimeric mixture *syn/anti* 90:10) as colorless oil: (2'*RS*) **3c**: ^1H NMR δ 5.07 (m, 2H), 4.87* (m, 1H), 4.70* (m, 1H), 4.32 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.37 (m, 2H), 3.05 (m, 1H), 1.97 (m, 2H), 1.75 (m, 1H), 1.69 (s, 3H), 1.65 (m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.54 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 1.15 (m), 0.92 (q, J = 6.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR δ 174.1, 131.3, 124.3, 124.2, 73.1, 72.9, 71.1, 70.9*, 70.8*, 69.2, 69.1, 46.1, 45.4, 38.0, 37.6, 36.1, 37.4, 33.5, 30.6, 30.4, 25.6, 25.2, 25.1, 19.8, 19.7, 19.1*, 19.0*, 17.6, 17.5* (* denotes minor diastereomer); IR (NaCl) ν 2758-3154 (br), 2960, 2924, 2870, 2854, 1722

FULL PAPER

(s), 1624, 1444, 1379, 1211, 1145, 735 cm^{-1} ; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : [M + Na]⁺ Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_2\text{NaS}_2$ 352.1375, Found 352.1394.

(5*S*,8*R*)-Carboxyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (**syn 3d**) Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and formaldehyde **2d** to give **3d** (39 mg, 45%) as yellow oil: ¹H NMR δ 4.93 (dd, J = 6.4, 4.4 Hz, 1H), 4.29 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 4.11 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 4.08 (m, 1H), 3.41 (m, 3H), 3.06 (dd, J = 11.8, 4.3 Hz, 1H); ¹³C NMR δ 173.3, 72.8, 69.9, 58.2, 40.0, 34.2; [α]_D²¹ +83.6 (c 0.43, MeOH); IR (NaCl) ν 2798-3100 (br), 2931, 2864, 1720 (s), 1622, 1438, 1215, 732 cm^{-1} ; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : [M + H]⁺ Calcd for $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{S}_2$ 192.0147, Found 192.0141.

(2*R*,5*S*,8*R*)-8-Carboxyl-2-(*m*-tolyl)-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (**syn 3e**) Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and 3-methylbenzaldehyde **2e** to give **3e** (64 mg, 54%) as colorless oil: ¹H NMR δ 7.40 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.18 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 5.30 (dd, J = 6.1, 3.8 Hz, 1H), 5.16 (s, 1H), 4.10 (dd, J = 7.3, 3.0 Hz, 1H), 3.60 (dd, J = 11.7, 6.3 Hz, 1H), 3.47 (dd, J = 11.5, 3.0 Hz, 1H), 3.41 (dd, J = 11.4, 7.3 Hz, 1H), 3.23 (dd, J = 11.8, 3.7 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H); ¹³C NMR δ 174.4, 139.9, 134.9, 129.6(2C), 127.8(2C), 73.9, 72.6, 67.9, 36.6, 33.3, 21.1; IR (NaCl) ν 2846-3075 (br), 3024, 2937, 2922, 2860, 1718 (s), 1511, 1440, 1228, 1150, 1105, 912, 809, 732 cm^{-1} ; [α]_D²¹ +196.0° (c 3.2, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : [M + Na]⁺ Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}_2\text{Na}$ 304.0436, Found 304.0433.

(2*R*,5*S*,8*R*)-8-Carboxyl-2-phenyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (**syn 3f**) Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and benzaldehyde **2f** to give **3f** (56 mg, 50%) as yellow oil: ¹H NMR δ 7.52 (m, 2H), 7.35 (m, 3H), 5.30 (dd, J = 6.3, 4.1 Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.12 (dd, J = 7.4, 2.8 Hz, 1H), 3.60 (dd, J = 11.8, 6.3 Hz, 1H), 3.45 (m, 2H), 3.24 (dd, J = 11.8, 4.1 Hz, 1H); ¹³C NMR δ 173.2, 138.3, 129.0, 128.9, 127.8, 74.0, 72.9, 68.0, 36.9, 33.4; IR (NaCl) ν 2885-3075 (br), 3059, 3030, 2933, 1718 (s), 1490, 1448, 1400, 1207, 914, 734, 698 cm^{-1} ; [α]_D²¹ +199.7° (c 2.6, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : [M + H]⁺ Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{S}_2$ 268.0466, Found 268.0462.

(2*R*,5*S*,8*R*)-8-Carboxyl-2-(4-methoxyphenyl)-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (**syn 3g**) Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and 4-methoxybenzaldehyde **2g** to give **3g** (42 mg, 40%) as yellow oil: ¹H NMR δ 7.44 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.91 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.26 (dd, J = 6.4, 4.1 Hz, 1H), 5.15 (s, 1H), 4.08 (dd, J = 7.4, 2.7 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.60 (dd, J = 11.8, 6.4 Hz, 1H), 3.52 (dd, J = 11.5, 2.7 Hz, 1H), 3.39 (dd, J = 11.5, 7.5 Hz, 1H), 3.24 (dd, J = 11.8, 4.1 Hz, 1H); ¹³C NMR δ 171.7, 160.3, 132.0, 129.3, 114.5, 73.6, 72.5, 67.8, 55.4, 36.5, 33.1; IR (NaCl) ν 2886-3088 (br), 3001, 2933, 2837, 1737, 1722 (s), 1608, 1512, 1440, 1240, 1174, 1031, 833, 736 cm^{-1} ; [α]_D²¹ +127.4° (c 2.1, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : [M + H]⁺ Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{S}_2$ 298.0572, Found 298.0554.

(2*R*,5*S*,8*R*)-8-Carboxyl-2-(3-bromophenyl)-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (**syn 3h**) Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and 3-bromobenzaldehyde **2h** to give **3h** (62 mg, 42%) as colorless oil: ¹H NMR δ 7.68 (m, 1H), 7.47 (m, 2H), 7.24 (m, 1H), 5.27 (dd, J = 6.1, 3.3 Hz, 1H), 5.18 (s, 1H), 4.14 (dd, J = 6.8, 3.9 Hz, 1H), 3.59 (dd, J = 11.7, 6.2 Hz, 1H), 3.51 (dd, 11.4, 3.3 Hz, 1H), 3.42 (dd, J = 11.4, 7.3 Hz, 1H), 3.23 (dd, J = 11.7, 3.4 Hz, 1H); ¹³C NMR δ 173.3, 141.3, 131.9, 130.8, 130.4, 126.4, 122.8, 74.0, 72.4, 68.2, 37.2, 33.6; [α]_D²¹ +115.0° (c 3.0, MeOH); IR (NaCl) ν 2834-3095 (br), 3064, 2940, 2927, 2850, 1728 (s), 1701, 1431, 1330, 1282, 1213, 997, 860, 785 cm^{-1} ; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : [M + H]⁺ Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{BrNO}_2\text{S}_2$ 345.9571, Found 345.9563.

(2*R*,5*S*,8*R*)-8-Carboxyl-2-(4-(trifluoromethyl))-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (**syn 3i**) Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and 4-(trifluoromethyl)benzaldehyde **2i** to give **3i** (44 mg, 31%) as colorless oil: ¹H NMR δ 7.65 (q, J = 8.6 Hz, 4H),

5.29 (t, J = 4.0 Hz 2H), 4.13 (dd, J = 7.0, 3.9 Hz, 1H), 3.58 (dd, J = 11.8, 6.1 Hz, 1H), 3.46 (m, 2H), 3.25 (dd, J = 11.8, 3.2 Hz, 1H); ¹³C NMR δ 174.4, 143.6, 130.7 (q, J_{CF} = 32.4 Hz), 129.9, 129.4, 128.0, 125.7 (q, J_{CF} = 3.7 Hz), 123.9 (q, J_{CF} = 272.2 Hz), 74.0, 72.5, 68.2, 37.4, 33.8; IR (NaCl) ν 3135-3600 (br), 2929, 2857, 1720 (s), 1637, 1417, 1325, 1124, 1016, 847, 738 cm^{-1} ; [α]_D²¹ +265.0° (c 2.2, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : [M + H]⁺ Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{NO}_2\text{S}_2$ 336.0340, Found 336.0351.

(2*R*,5*S*,8*R*)-8-Carboxyl-2-(4-chlorophenyl)-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (**syn 3j**) Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1a** and 4-chlorobenzaldehyde **2j** to give **3j** (43 mg, 34%) as colorless oil: ¹H NMR δ 7.47 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 5.29 (dd, J = 6.2, 3.4 Hz, 1H), 5.19 (s, 1H), 4.11 (dd, J = 6.7, 4.0 Hz, 1H), 3.58 (dd, J = 11.7, 6.2 Hz, 1H), 3.43 (m, 2H), 3.23 (dd, J = 11.7, 3.4 Hz, 1H); ¹³C NMR δ 174.1, 137.4, 134.6, 129.1, 129.0, 74.0, 72.3, 67.9, 37.0, 33.6; IR (NaCl) ν 2831-2998 (br), 2922, 2850, 1718 (s), 1685, 1489, 1226, 1145, 829, 735 cm^{-1} ; [α]_D²¹ +173.0° (c 2.1, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : [M + H]⁺ Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2\text{S}_2$ 302.0076, Found 302.0071.

(2*RS*,5*SR*)-2-isopropyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane ($\pm$ **syn 4a**) Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1b** and isobutyraldehyde **2a**, microwave irradiation was 40 min, to give **4a** as inseparable diastereomeric mixture (61mg, 65%, *syn/anti* 90:10) as colorless oil: **syn-4a**: ¹H NMR δ 5.00 (dd, J = 4.9, 3.1 Hz, 1H), 3.91 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.44 (m, 2H), 3.13 (m, 2H), 3.06 (dd, J = 11.6, 3.1 Hz, 1H), 3.01 (dt, J = 7.4, 3.7 Hz, 1H), 1.82 (m, 1H), 0.97 (dd, J = 6.6, 4.9 Hz, 6H); ¹³C NMR δ 77.2, 75.8, 57.1, 37.7, 35.5, 31.8, 20.1, 17.8; **anti-4a**: ¹H NMR 4.56 (dd, J = 8.4, 7.3 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 3.25 (m, 2H), 1.94 (m, 1H), 1.14 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 1.03 (d, J = 6.6 Hz, 3H); ¹³C NMR δ 79.5, 72.0, 45.6, 40.3, 32.7, 31.6, 22.3, 21.0; IR (NaCl) ν 2956, 2931, 2868, 1606, 1465, 1307, 1203, 1157, 1066, 750 cm^{-1} ; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : [M + H]⁺ Calcd for $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NS}_2$ 190.0719, Found 190.0718.

(2*RS*,5*SR*)-2-(2-deuteriopropyl)-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane ($\pm$ **syn 4a-d**) To a solution of $\pm$ (2*RS*,5*SR*)-2-Mercaptomethyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane **1b** (20 mg, 0.10 mmol) in MeOD-*d*₄ (0.6 mL) was added isobutyraldehyde **2a** (0.018 mL, 0.21mmol) and NH₄OAc (12 mg, 0.15 mmol). The reaction mixture was stirred at 65°C for 10 min. under microwave irradiation (50 W). The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on flash silica gel (nHex/EtOAc 9:1) to give **4a-d** as a diastereomeric mixture (6 mg, 31 %, *syn/anti* 90:10) as yellow oil. **syn 4a-d**: ¹H-NMR δ 5.01 (dd, J = 4.7, 3.2 Hz, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.45 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 3.06 (dd, J = 11.5, 3.0 Hz, 1H), 3.01 (m, 1H); ¹³C NMR δ 77.2, 75.8, 57.1, 37.7, 35.0 (t, $J_{\text{C-D}}$ = 19.5 Hz), 31.8, 20.0, 17.7; IR (NaCl) ν 2916, 2852, 1684, 1566, 1312, 1261, 945. 745 cm^{-1} ; HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : [M + H]⁺ Calcd for $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{DNS}_2$ 191.0781, Found 191.0784.

(2*RS*,5*SR*)-2-pentyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane ($\pm$ **syn 4b**) Prepared in an analogous route as described for **3a** starting from **1b** and hexanal, microwave irradiation was 60 min., to give **4b** as a diastereomeric mixture (79mg, 21%, *syn/anti* 83:17) as yellow oil: ¹H NMR δ 5.02 (dd, J = 5.5, 3.3 Hz, 1H), 4.73* (dd, J = 8.4, 5.8 Hz, 1H), 4.53* (m, 1H), 4.09 (dd, J = 8.3, 5.0 Hz, 1H), 3.50 (dd, J = 11.4, 5.6 Hz, 1H), 3.41 (m, 1H), 3.17* (m, 4H), 3.02 (m, 1H), 2.82* (m, 1H), 1.99* (m, 1H), 1.79 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.33 (m, 8H), 0.89 (t, J = 6.9 Hz, 4H); ¹³C-NMR δ 75.2, 72.0*, 71.7*, 70.3, 55.5, 46.3*, 40.4*, 38.8, 36.7, 33.7*, 31.7*, 31.6(2C), 28.00*, 26.9, 22.6, 22.4*, 14.0, 13.9*(*minor *anti* diastereomer); IR (NaCl) ν 2929, 2854, 1458, 1442, 1301, 1246, 1122, 1072, 730 cm^{-1} ; ESI(+)-LCMS m/z : [M+H]⁺ Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NS}_2$ 218.10, found 218.10; elemental analysis calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NS}_2$: C 55.25, H 8.81, N 6.44, S, 29.50, found: C 55.41, H 8.63, N 6.48, S, 29.48.

(2*R*,5*S*,8*R*)-8-Carboxyl-2-isopropyl-7,7-dimethyl-1-aza-3,6-dithiobicyclo[3.3.0]octane (**syn 5**) Prepared in an analogous route as

FULL PAPER

described for **3a** starting from **1c** and isobutyraldehyde **2a**. The reaction mixture was stirred at 65°C for 60 min under microwave irradiation (50 W). The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on flash silica gel to give **5** (50 mg, 52%) as colorless oil: $^1\text{H-NMR}$ δ 4.87 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 4.03 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.32 (dd, J = 11.3, 6.7 Hz, 1H), 3.00 (dd, J = 11.3, 6.4 Hz, 1H), 1.81 (m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.05 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.6 Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ δ 174.0, 80.7, 77.6, 69.1, 55.1, 40.5, 35.9, 28.9, 28.1, 20.3, 19.6; IR (NaCl) ν 2838–3078 (br), 2964, 2929, 2868, 1720 (s), 1462, 1367, 1190, 1134, 741 cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ +173.0° (c 2.1, MeOH); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{S}_2$ 262.0930; Found 262.0933.

3. Sample preparation for Mechanistic studies

Step A)

A solution of isobutyraldehyde (15 mg, 0.20 mmol), NH_4OAc (12 mg, 0.15 mmol) in CD_3OD (0.6 ml) was prepared in an NMR tube. The reaction was monitored by ^1H , $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC-NMR, for 2 h at room temperature and the imine **III-d** was identified: $^1\text{H-NMR}$ δ 7.63 (s), 0.81 (s); $^{13}\text{C-NMR}$ δ 172.7, 33.5, 16.2.

Step B)

The bithiazolidine **1b** (20 mg, 0.10 mmol) was added to the NMR tube of step A). The reaction was monitored at room temperature by ^1H , ^{13}C , $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC-NMR, the Intermediate **1b-II** (dr 60:40) was identified: $^1\text{H-NMR}$ δ 7.58 (s), 7.56* (s) 4.32 (dd, J = 7.6, 5.7 Hz), 4.27* (m), 4.19 (bs), 4.14* (bs), 3.36 (m), 3.16* (m), 3.12 (m), 3.03* (m), 2.75 (m), 2.50 (m), 2.67 (m), 2.47 (m); $^{13}\text{C-NMR}$ δ 171.9, 171.8*, 80.5*, 80.3, 71.1, 70.4*, 56.4*, 56.3, 38.8, 38.3, 33.5 (t, J = 19.4 Hz), 30.9, 30.8*, 18.4 (*minor diastereomer)

Step C)

The NMR tube of step B) was warming to 50°C for 2 h. The reaction was monitored by ^1H , $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC-NMR.

4. Sample preparation for ^{15}N experiments

To perform the ^{15}N -HMBC experiments the procedure above described was followed using $^{15}\text{NH}_4\text{OAc}$ in step A).

5. Computational calculations

Initial geometries of all the stereoisomers were pre-optimized by molecular mechanics (MMFF94X forcefield; energy gradient = 0.01 kcal/mol/ $\text{\AA}^3$), as implemented in MOE [27]. The solvent (methanol) was modeled by means of the Generalized Born model (ϵ = 33.1). In order to explore the potential energy surface, a conformational search was performed using the LowModeMD search method [28], with the same forcefield and solvation method, without cut-offs, and with a RMS gradient = 0.005 kcal/mol/ $\text{\AA}^3$ (rejection limit = 100; RMSD limit = 0.25 $\text{\AA}$; energy window = 7 kcal/mol; iteration limit = 10000).

The most stable conformations were selected and fully optimized by means of the density functional theory method (DFT) [29], employing the M06-2x functional [30], which has been reported to have excellent across-the-board average performance in general thermochemistry and kinetics [30]. To represent the electronic wave function, the 6-31+G(d,p) basis set [31] was used, since 6-31+G(d) has showed satisfactory performance for similar systems [32]. The extra p polarization functions were added to hydrogen atoms to enhance the computational description of the hydrogen-mediated interactions [33]. The calculations were carried out

without symmetry constraints and with an ultrafine integration grid, employing the Gaussian 09 code [34]. All the stereochemical variants were considered during the calculations. The influence of the solvent (methanol) was simulated by an IEFPCM method (implicit solvation), with radii and non-electrostatic terms from Truhlar and coworkers' SMD solvation model [35]. To verify the nature of each stationary state, the Hessian matrix was analytically calculated. The optimized geometries of the intermediates were found to have only real vibrational frequencies, whereas the transition states exhibited a single negative eigenvalue. This negative normal mode was animated and examined in each case, confirming that it reflects the structural change in going from reactants to products. The computational results were rendered with Gaussview 5.0 [36].

Zero-point energies and thermal corrections were taken from unscaled analytical vibrational frequencies. The yield under kinetic control was estimated by means of the Transition State Theory [37], using the Curtin-Hammett principle [38].

Acknowledgments

This work was supported by funds from National Institutes of Health USA (AI100560) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación Uruguay (ANII) (FMV_1_2014_1_104234). VM and VV are grateful for a fellowship from CSIC -CAP-2019, and VM is grateful for a fellowship from ANII (POS_FMV_2015_5_1005275). We greatly appreciate the helpful NMR discussion of PhD Gonzalo Hernández and Horacio Pezzaroglo for performing special NMR experiments. The authors are grateful to Prof. Göran Widmalm and Carin Larsson (Stockholm University) for recording the HR-MS spectra of compounds **3a-e**, **3h-i**, **4a-b**, **4a-d** and **5**.

Keywords: bithiazolidines • imine exchange • metathesis microwave chemistry

Supporting information available: copies of ^1H and ^{13}C spectra this material is available

- [1] C. Saiz, V. Castillo, P. Fontán, M. Bonilla, G. Salinas, A. Rodríguez-Haralambides, G. Mahler, *Mol. Divers.* **2014**, 18, 1–12.
- [2] C. Saiz, V. Villamil, M. G. M., M. A. Rossi, L. Martínez, L. Suescun, A. J. Vila, G. Mahler, *Tetrahedron Asymmetry* **2017**, 28, 110–117.
- [3] K. Bush, P. A. Bradford, *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, 17, 295–306.
- [4] K. H. M. E. Tehrani, N. I. Martin, *Medchemcomm* **2018**, 9, 1439–1456.
- [5] M. M. González, M. Kosmopoulou, M. F. Mojica, V. Castillo, P. Hinchliffe, I. Pettinati, J. Brem, C. J. Schofield, G. Mahler, R. A. Bonomo, et al., *ACS Infect. Dis.* **2015**, 1, 544–554.
- [6] M. F. Mojica, S. G. Mahler, C. R. Bethel, M. A. Taracila, M. Kosmopoulou, K. M. Papp-Wallace, L. I. Larrull, B. M. Wilson, S. H. Marshall, C. J. Wallace, et al., *Biochemistry* **2015**, 54, 3183–3196.
- [7] P. Hinchliffe, M. M. González, M. F. Mojica, J. M. González, V. Castillo, C. Saiz, M. Kosmopoulou, C. L. Tooke, L. I. Larrull, G. Mahler, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, 113, E3745–E3754.
- [8] L. Szilagyi, Z. Gyorgydeak, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 427–432.
- [9] R. G. Kallen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 6236–6248.
- [10] Z. Song, G. Ma, H. Zhu, *RSC Advances* **2005**, 5, 32, 24824–24833.
- [11] C. Saiz, P. Wipf, E. Manta, G. Mahler, *Org. Lett.* **2009**, 11, 3170–3173.
- [12] G. Toth, I. Pinter, A. Messner, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 9, 735.
- [13] M. Ciaccia, R. Cacciapaglia, P. Mencarelli, L. Mandolini, S. Di Stefano, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 2253–2261.
- [14] M. Ciaccia, S. Pilati, R. Cacciapaglia, L. Mandolini, S. Di Stefano, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 3282–3287.

FULL PAPER

- [15] K. E. Meyer, P. J. Walsh, R. G. Bergman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2669–2670.
- [16] G. K. Cantrell, T. Y. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8035–8042.
- [17] J. N. Bruno, X. J. Li, *Organometallics* **2000**, 19, 4672–4674.
- [18] M. McInnes, A. J. Blake, and P. Mountford, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1998**, 21, 3623–3628.
- [19] M. A. Aljuhani, S. Barman, E. Abou-Hamad, A. Gurinov, S. Ould-Chikh, E. Guan, A. Jedidi, L. Cavallo, B. C. Gates, J. D. A. Pelletier, et al., *ACS Catal.* **2018**, 8, 9440–9446.
- [20] C. Saiz, V. Castillo, S. G. Mahler, *Synlett* **2012**, 23, 1090–1094.
- [21] K. Tanemura, T. Suzuki, Y. Nishida, K. Satsumabayashi, T. Horaguchi, *Chem. Commun.* **2004**, 470–471.
- [22] N. Wilhelms, S. Kulchat, J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **2012**, 95, 2635–2651.
- [23] M. Shevlin, *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, 86, 601–607.
- [24] M. Ciaccia, S. Di Stefano, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 646–654.
- [25] The nitrogen chemical shift is informed using MeNO₂ as external reference, see P. R. Srinivasan, R. L. Lichter, *J. Magn. Reson.* **1977**, 28, 227–234.
- [26] G. Toth, I. Pinter, A. Messner, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 9, 735.
- [27] P. Labute, 2014.09.01 ed., Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2014**.
- [28] P. Labute, *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50, 792–800.
- [29] E. G. Lewars, in *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*, Springer International Publishing, Cham, **2016**, pp. 101–191.
- [30] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **2008**, 120, 215–241.
- [31] M. M. Franci, W. J. Pietro, W. J. Hehre, J. S. Binkley, M. S. Gordon, D. J. DeFrees, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1982**, 77, 3654–3665.
- [32] Z.-C. Song, G.-Y. Ma, H.-L. Zhu, *RSC Adv.* **2015**, 5, 24824–24833.
- [33] a) J. I. García, J. A. Mayoral, L. Salvatella, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 658–664; b) H. Faustino, M. J. S. A. Silva, L. F. Veiros, G. J. L. Bernardes, P. M. P. Gois, *Chemical Science* **2016**, 7, 5052–5058.
- [34] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA, **2009**.
- [35] A. V. Marenich, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 6378–6396.
- [36] R. Dennington, T. Keith, J. Millam, 5.0 ed., Semichem Inc., Shawnee Mission KS, **2009**.
- [37] J. N. Harvey, in *Modeling of Molecular Properties*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2011**, pp. 17–28.
- [38] J. I. Seeman, *J. Chem. Educ.* **1986**, 63, 42.

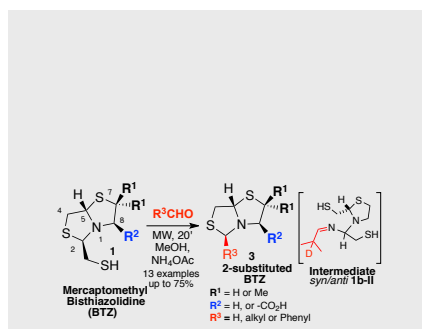
FULL PAPER

Entry for the Table of Contents

Layout 1:

FULL PAPER

A new methodology to prepare 2-substituted bisthiazolidines by aldehyde exchange is reported. The imine formation plays an important role in the exchange mechanism according to NMR studies. In addition, DFT computational analysis allowed us to propose different pathways and their activation barriers within the synthetic route.

**Key Topic* Metathesis, Bisthiazolidines**

Verónica Martínez,^[a] Valentina Villamil,^[a] Diego Duarte,^[a] Cecilia Saiz,^[a] Danilo Davyt,^[a] Carolina Fontana,^[b] Nicolás Veiga,^[c] Graciela Mahler*

Page No. – Page No.

Title: Preparation and mechanistic studies of 2-substituted Bisthiazolidines by imine exchange.

2-Mercaptomethyl Thiazolidines (MMTZs) Inhibit All Metallo- β -Lactamase Classes by Maintaining a Conserved Binding Mode

Philip Hinchliffe,[△] Diego M. Moreno,[△] Maria-Agustina Rossi,[△] Maria F. Mojica, Veronica Martinez, Valentina Villamil, Brad Spellberg, George L. Drusano, Claudia Banchio, Graciela Mahler, Robert A. Bonomo, Alejandro J. Vila, and James Spencer*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00194>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



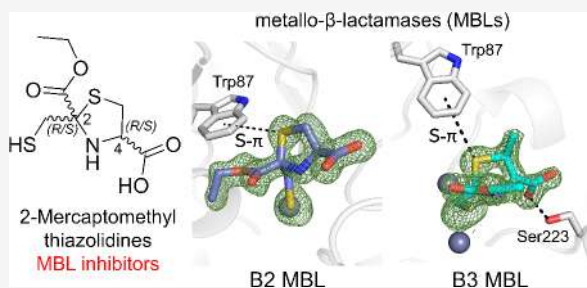
Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Metallo- β -lactamase (MBL) production in Gram-negative bacteria is an important contributor to β -lactam antibiotic resistance. Combining β -lactams with β -lactamase inhibitors (BLIs) is a validated route to overcoming resistance, but MBL inhibitors are not available in the clinic. On the basis of zinc utilization and sequence, MBLs are divided into three subclasses, B1, B2, and B3, whose differing active-site architectures hinder development of BLIs capable of “cross-class” MBL inhibition. We previously described 2-mercaptomethyl thiazolidines (MMTZs) as B1 MBL inhibitors (e.g., NDM-1) and here show that inhibition extends to the clinically relevant B2 (Sfh-I) and B3 (L1) enzymes. MMTZs inhibit purified MBLs *in vitro* (e.g., Sfh-I, K_i 0.16 μ M) and potentiate β -lactam activity against producer strains. X-ray crystallography reveals that inhibition involves direct interaction of the MMTZ thiol with the mono- or dizinc centers of Sfh-I/L1, respectively. This is further enhanced by sulfur- π interactions with a conserved active site tryptophan. Computational studies reveal that the stereochemistry at chiral centers is critical, showing less potent MMTZ stereoisomers (up to 800-fold) as unable to replicate sulfur- π interactions in Sfh-I, largely through steric constraints in a compact active site. Furthermore, *in silico* replacement of the thiazolidine sulfur with oxygen (forming an oxazolidine) resulted in less favorable aromatic interactions with B2 MBLs, though the effect is less than that previously observed for the subclass B1 enzyme NDM-1. In the B3 enzyme L1, these effects are offset by additional MMTZ interactions with the protein main chain. MMTZs can therefore inhibit all MBL classes by maintaining conserved binding modes through different routes.

KEYWORDS: antibiotic resistance, β -lactamases, inhibitors, carbapenemase



INTRODUCTION

β -Lactams are the most prescribed antibiotic class worldwide, but their efficacy is increasingly challenged by the growing problem of antibiotic resistance.¹ The production of β -lactamases in Gram-negative bacteria is the major resistance mechanism in the clinic, as members of this large enzyme family are capable of inactivating all β -lactam antibiotics.² β -Lactamases can be divided into two mechanistic groups: the serine- β -lactamases (Ambler classes A, C, and D,^{3,4} SBLs) and the zinc ion dependent metallo- β -lactamases (class B,⁴ MBLs). SBL-catalyzed hydrolysis involves the attack of a nucleophilic serine on the β -lactam ring and occurs with formation and resolution of a covalent acyl-enzyme intermediate via labile tetrahedral species.⁵ Conversely, MBLs utilize an active site water/hydroxide to hydrolyze the β -lactam ring without formation of a covalent intermediate (Figure 1A).⁵

MBLs can be further subdivided into the B1, B2, and B3 subclasses, based on active site architecture and zinc utilization.^{5,7} The B1 enzymes,⁸ such as NDM-1, VIM-2, and IMP-1, are plasmid mediated and widespread, produced in Gram-negative bacteria such as *Klebsiella pneumoniae*, *Escher-*

ichia coli, and *Pseudomonas aeruginosa*. B1 enzymes have a wide substrate specificity and can hydrolyze almost all β -lactam antibiotics, including the carbapenems, such as imipenem and meropenem, that were once considered antibiotics of last-resort. The active site of B1 enzymes is conserved, containing two Zn(II) ions, termed Zn1 and Zn2, that are coordinated by three amino acids each. Zn1 is coordinated by three histidine residues (His116, His118, and His196; standard MBL numbering throughout⁹) and Zn2 by Asp120, Cys221, and His263. The Zn(II) ions are bridged by a water/hydroxide that is thought to act as the nucleophile in β -lactam hydrolysis. B2 MBLs are monozinc enzymes, containing a zinc ion coordinated as in the Zn2 site of B1 MBLs. To date, they

Received: April 10, 2021

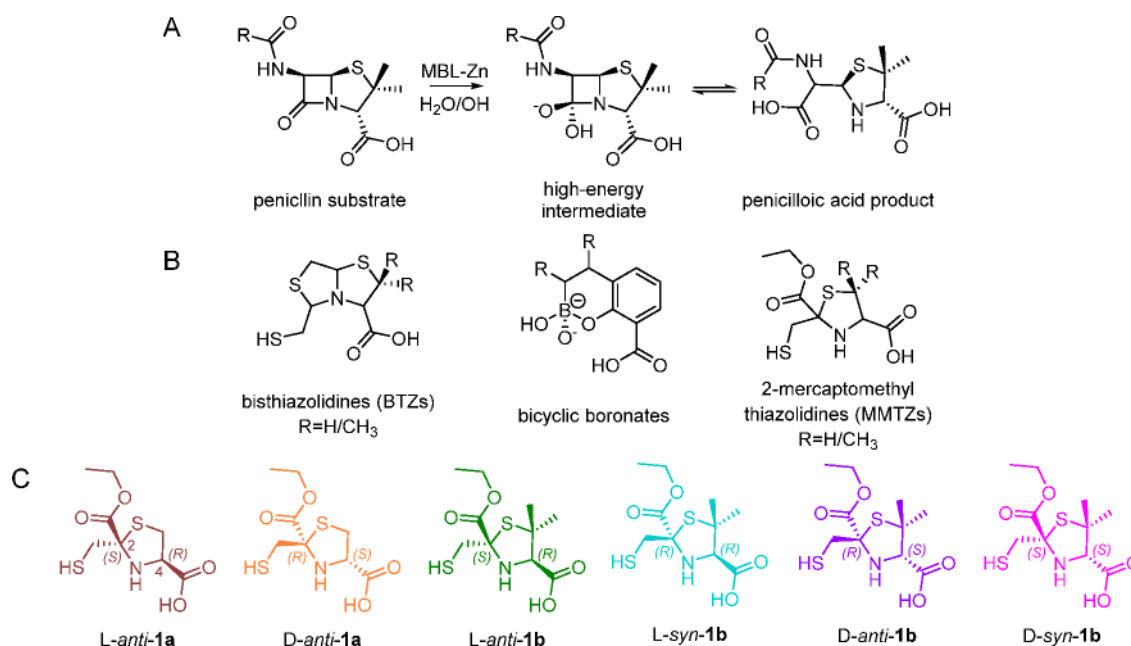


Figure 1. MBL-catalyzed β -lactam breakdown and MBL inhibitors. (A) Penicillin breakdown by MBLs, resulting in penicilloic acid product formation via a proposed high-energy tetrahedral intermediate. (B) Inhibitors based on proposed species in β -lactam hydrolysis. *Left*, bisthiazolidine (BTZ) scaffold, R = H/CH₃; *middle*, bicyclic boronates (e.g., taniborbactam, QPX7728); *right*, 2-mercaptomethyl thiazolidine (MMTZ) scaffold, R = H/CH₃. (C) 2-Mercaptomethyl thiazolidines studied here. The absolute R/S configurations of the chiral carbon centers (C-2 and C-4, labeled) are shown. L-anti-1a (brown), D-anti-1a (orange), L-anti-1b (green), L-syn-1b (cyan), D-anti-1b (purple) and D-syn-1b (pink). Part C is adapted from Rossi et al.⁶

have been identified on the chromosomes of the *Serratia fonticola* (Sfh-I¹⁰), *Aeromonas* sp. (CphA¹¹), and *Pseudomonas* sp. (PFM¹²), organisms capable of causing a range of opportunistic infections in the clinic. B2 MBLs are carbapenemases but have a narrower substrate profile than the B1 enzymes, as they are unable to hydrolyze most penicillins and cephalosporins.^{13–16} In contrast, in the dizinc B3 enzymes, Zn1 is coordinated as in B1 MBLs but Zn2 is coordinated by Asp120, His121, and His263, resulting in a different active site architecture to the B1 and B2 MBLs. They are found on the chromosomes of numerous environmental and pathogenic Gram-negative bacteria, including *Stenotrophomonas maltophilia* (L1^{17,18}), *Elizabethkingia meningoseptica* (GOB^{19,20}), and *Pseudomonas otitidis* (POM-1²¹). Some have now been shown to be incorporated into the chromosomes of pathogenic bacteria via a mobile genetic element,^{22,23} indicating the potential for wide dissemination. Taken together with their wide substrate spectrum that includes efficient carbapenem hydrolysis, B3 enzymes could pose an increasing clinical concern.

Inhibitors closely mimicking β -lactam molecules (e.g., clavulanic acid and tazobactam), diazabicyclooctanes (DBOs, e.g. avibactam) and vaborbactam (a cyclic boronate), are now used in the clinic to inactivate some SBLs through covalent attachment to the nucleophilic serine.^{24–26} However, the mechanistically distinct MBLs are not inhibited and can hydrolyze the β -lactam based inhibitors.²⁷ This has prompted extensive investigations into MBL inhibitor development, with bicyclic boronates currently representing the most promising compounds (Figure 1B).^{28,29} For example, taniborbactam (formerly VNRX-5133), currently in late-stage clinical development, is a potent inhibitor of most SBLs and B1 MBLs.^{28–31} In addition, QPX7728 is in phase 1 clinical trials and has an improved spectrum of activity compared to

taniborbactam, particularly against SBLs and the B1 MBL IMP-1.^{32,33} Despite these significant advances in MBL inhibitor development, there remains a need for further exploration of compounds active against all MBL subclasses that will increase our available armamentarium to combat antibiotic resistance and guard against the possible future dissemination of enzymes beyond subclass B1.

We considered that common features of species populated during antibiotic hydrolysis by diverse MBLs could be exploited for inhibitor development.^{34,35} To this end, we previously reported on the synthesis of a series of bithiazolidines (BTZs) that were designed as bicyclic substrate mimics, containing a carboxylate and additional free thiol as a zinc-binding moiety (Figure 1B).³⁶ We demonstrated that BTZ stereoisomers inhibited all MBL subclasses by adopting multiple binding modes in the structurally different active sites.³⁷

More recently, we described a series of 2-mercaptomethyl thiazolidines (MMTZs) that were designed to exploit common features of the binding of hydrolyzed β -lactam products to the MBL active site (Figure 1B).⁶ These compounds contain a thiazolidine ring and two chiral carbon centers with carboxylate and free thiol groups (Figure 1C). Some MMTZs also include a *gem*-dimethyl group that is also present in penicillins and some BTZs. They inhibit the clinically important B1 enzymes NDM-1, VIM-2, and IMP-1 by adopting consistent binding modes that exploit thiol-Zn coordination and an interaction of the thiazolidine sulfur with a conserved aromatic residue in the active site.

Here, we utilize enzyme kinetics, microbiology, X-ray crystallography, and computational chemistry techniques to demonstrate that MBL inhibition by MMTZs extends to the subclass B2 and B3 enzymes, Sfh-I and L1. These data further explore the roles of conserved interactions in the active site,

Table 1. MMTZ Inhibition Constants (K_i , μM) against Purified, Recombinant Metallo- β -Lactamases

Inhibitor	B2 MBL	B3 MBL	B1 MBLs ^{a,b}		
	Sfh-I	L1	NDM-1	VIM-2	IMP-1
L-anti-1a	0.16 $\pm$ 0.03	10.0 $\pm$ 0.8	5.2 $\pm$ 0.7	0.38 $\pm$ 0.05	1.0 $\pm$ 0.2
D-anti-1a	20 $\pm$ 2	4.0 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.5	0.39 $\pm$ 0.04	1.3 $\pm$ 0.1
L-anti-1b	1.3 $\pm$ 0.1	20 $\pm$ 2	0.44 $\pm$ 0.06	0.75 $\pm$ 0.09	0.46 $\pm$ 0.05
L-syn-1b	100 $\pm$ 10	28 $\pm$ 3	8 $\pm$ 1	3.6 $\pm$ 0.4	6.0 $\pm$ 0.6
D-anti-1b	130 $\pm$ 10	1.4 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.1	0.93 $\pm$ 0.08
D-syn-1b	1.0 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.05	1.9 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.2
L-BTZ-1 ^b	0.26 $\pm$ 0.03	12 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	2.9 $\pm$ 0.4	8 $\pm$ 2
D-BTZ-1 ^b	26 $\pm$ 3	10 $\pm$ 1	19 $\pm$ 3	3.2 $\pm$ 0.4	6 $\pm$ 1
L-BTZ-2 ^b	0.36 $\pm$ 0.04	11 $\pm$ 2	18 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1	15 $\pm$ 3
D-BTZ-2 ^b	29 $\pm$ 3	10 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	14 $\pm$ 3	10 $\pm$ 2

^aB1 MMTZ data are from Rossi et al.⁶ following the same protocol as used here. ^bAll BTZ data are from Hinchliffe et al., calculated following the same protocol as used here.³⁷ BTZs -1 and -2 are with and without a *gem*-dimethyl group, respectively. See Figure S3A for chemical structures of the L/D-BTZ stereoisomers.

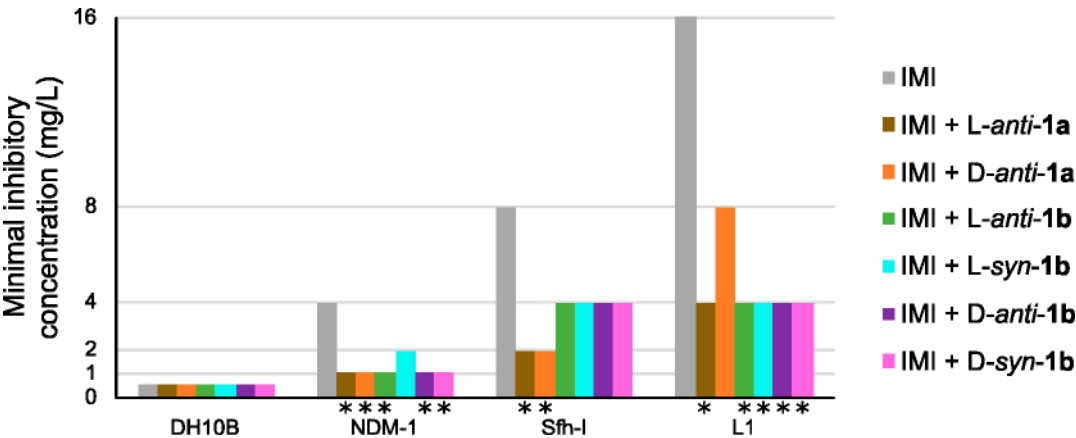


Figure 2. Effect of MMTZs on imipenem minimum inhibitory concentrations of MBL-expressing *E. coli*. The minimum inhibitory concentration of imipenem (IMI) $\pm$ 100 $\mu\text{g/mL}$ MMTZ was determined for the *E. coli* strain DH10B expressing NDM-1, Sfh-I or L1 (see Methods for details). At this concentration, in the absence of antibiotic, MMTZs do not have a detrimental effect on bacterial growth. An asterisk denotes the inhibitor had a 4-fold effect on MIC (i.e., two dilutions). A 2-fold effect (i.e., one dilution factor) is not considered significant. Results are the mode of three biological replicates.

including the sulfur- π interaction, in maintaining a conserved binding mode. The results highlight that exploiting common features of the MBL active site can represent a tractable route toward achieving cross-class inhibition and new drug development.

■ RESULTS AND DISCUSSION

MMTZs are Cross-Class MBL Inhibitors *In Vitro*. To determine the inhibition profile of MMTZs against MBLs, we first measured inhibitory constants (K_i values) against the clinically relevant B2 and B3 enzymes Sfh-I and L1 by monitoring imipenem hydrolysis in the presence of MMTZs (Figures S1 and S2). Inhibition profiles could then be compared with our previously collected K_i data for the B1 MBLs (Table 1).

Our results show that MMTZs potently inhibit all MBL subclasses, although there are clear differences between different enantiomers. This is most apparent with Sfh-I for which K_i values range from 0.16 μM to 130 μM , an $\sim$ 800-fold difference. In particular, there are $\sim$ 100-fold reductions in K_i between L/D-anti-1a, L/D-anti-1b, and L/D-syn-1b. Further, compounds in which C-2 of the thiazolidine ring is in the (R)-configuration have poor potency compared to the (S)-isomer, with K_i values of 20, 100, or 130 μM (D-anti-1a, L-syn-1b, and

D-anti-1b, respectively). We also found BTZs to be 100-fold less potent against Sfh-I when the chiral carbon center bearing the mercaptomethyl group is in the (S)-configuration, i.e., the D-enantiomer (Figure S3A). However, unlike the BTZs, the presence of a *gem*-dimethyl group in MMTZs also adversely affects their potency against Sfh-I, with a *c.* 10-fold reduction in K_i between L-anti-1a/1b and D-anti-1a/1b. Variation in the inhibitory activity of MMTZs against L1 is less apparent (as is also the case for BTZs), although a slight preference for the D-over the L-isomer is observed (2.5-/7-/14-fold K_i increases for anti-1a, anti-1b and syn-1b L/D stereoisomers, respectively). The two compounds most active against the range of MBLs tested here, and previously,⁶ are L-anti-1a and D-syn-1b. In contrast, D- and L-captopril, compounds with a free thiol and pyrrolidine ring (Figure S3B), display particularly poor potency against a B2 enzyme (K_i 's 72/950 μM against CphA), and are up to 20-fold less potent than MMTZs against B3 enzymes (K_i 's 20/8.8 μM against L1/SMB-1) (Table S1).

We next sought to determine whether MMTZs could potentiate antibiotic activity against recombinant *E. coli* expressing NDM-1, Sfh-I, and L1 by measuring their effect on the minimal inhibitory concentration (MIC) of imipenem (chosen as Sfh-I predominantly hydrolyzes carbapenems and

for consistency with our previous work⁶) in broth micro-dilution assays (Figure 2).

At a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$, MMTZs display variable effectiveness in lowering the imipenem MIC of MBL-expressing *E. coli* DH10B. Although some of the compounds only cause a 2-fold reduction in imipenem susceptibility, a number result in a more significant 4-fold reduction (i.e., a factor of 2 dilutions, see asterisks in Figure 2). Indeed, compound *L-anti-1a* was the most effective, causing a 4-fold MIC reduction against *E. coli* producing NDM-1, Sfh-I or L1. The compound that was most potent against purified, recombinant MBLs, *D-syn-1b*, surprisingly showed the least effect against these MBL-expressing bacteria. To test whether lower concentrations of inhibitor could potentiate activity, we tested the effect of 50 and 75 $\mu\text{g/mL}$ on the imipenem MIC against the L1-expressing *E. coli* DH10B (Table S2). These data indicate that 50 $\mu\text{g/mL}$ of *L-anti-1b*, *D-syn-1b*, and *L-syn-1b* all caused a 4-fold reduction in imipenem MIC, indicating lower concentrations of inhibitor can potentiate imipenem activity against a lab strain carrying an efficient carbapenemase. However, we note that concentrations of 100 $\mu\text{g/mL}$ were required for effective imipenem potentiation against a number of clinical strains expressing B1 MBLs.⁶

We have previously reported that MMTZs are relatively stable in solution (PBS), with 12% forming disulfides after 6 h and 88% remaining intact.⁶ It is possible that over the time course of an MIC assay this may have a small, but limited, effect on the MIC profiles, contributing to the discrepancy between K_i values and MICs, but we consider it unlikely that this is the sole explanation. We note that penetration into the bacterial periplasm may also be a contributing factor, as our previously determined in cell IC_{50} values against NDM-1 were also slightly elevated compared to *in vitro* K_i values.⁶

MMTZs therefore inhibit all MBL subclasses and can potentiate carbapenem activity against recombinant *E. coli* expressing enzymes from all three MBL classes. These *in vitro* data also highlight the importance of considering inhibitor stereochemistry for cross-class inhibition, with stereochemical preferences particularly marked in the case of the B2 enzymes which have a narrower substrate specificity. In contrast, inhibition of the B1 MBLs was less affected by stereochemistry, with the B3 enzymes displaying moderate selectivity toward the different stereoisomers.

X-ray Crystallography. Having previously established that MMTZs adopt a consistent binding mode to B1 MBLs,⁶ we next sought to determine how they interact with the active sites of both Sfh-I and L1 by X-ray crystallography. We therefore soaked preformed MBL crystals in MMTZs and obtained high-resolution structures of *L-anti-1a* bound to Sfh-I and *D-syn-1b* to L1 (Table S3). These represent the two compounds that can be considered the most potent over all three MBL subclasses tested (Table 1). Sfh-I crystallized in space group $P2_1$ with two molecules in the asymmetric unit (ASU) and L1 in space group $P6_422$ with one molecule in the ASU. In both cases, bound MMTZ could be modeled into clearly defined $F_o - F_c$ electron density (Figure S4) with real space correlation coefficients calculated by the PDB after refinement of 0.96/0.97 (Sfh-I, chains A and B) and 0.95 (L1).

MMTZ binding involves interaction of the thiol directly with the monozinc center of Sfh-I, or bridging the dizinc center of L1 and displacing the catalytic water/hydroxide (Figure 3). In Sfh-I, there is a weak hydrogen bond between the ethyl ester carbonyl of *L-anti-1a* and the side chain nitrogen of Asn233

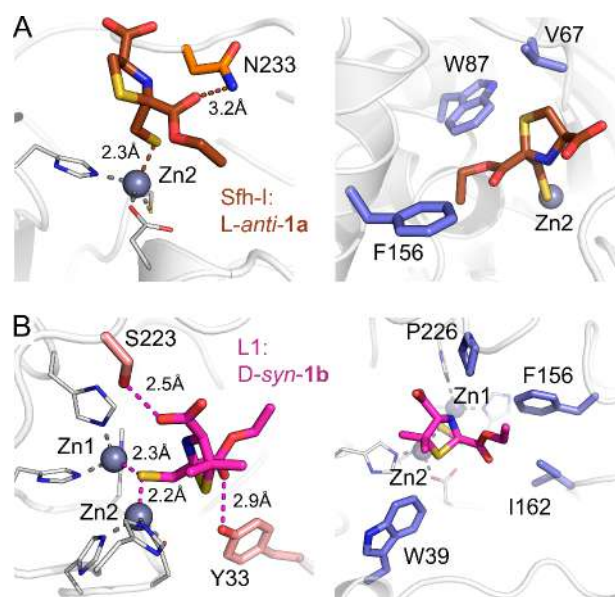


Figure 3. Interactions of MMTZs in the active site of L1 and Sfh-I. Left, thiol-Zn interactions and hydrogen bonds in MMTZ:MBL complexes (distance labeled). Right, interactions with hydrophobic residues lining the active site (blue sticks). (A) *L-anti-1a* (brown) binding to Sfh-I; (B) *D-syn-1b* (pink) binding to L1.

(3.2 Å). In contrast, *D-syn-1b* binding to L1 is stabilized by stronger hydrogen bonds with the side chain oxygens of Ser223 (2.5 Å) and Tyr33 (2.9 Å).

The binding mode of *D-syn-1b* to L1 has similarities with its binding to the dizinc B1 enzymes NDM-1 and VIM-2, particularly with respect to the positioning of the thiol and carboxylate groups (Figure S5). However, the C-2 ethyl ester side chain is rotated 180° and therefore points in the opposite direction in L1. Furthermore, in the B1 enzymes, there is only a single (c. 2.6–3 Å) interaction with the backbone nitrogen of Asn233 in comparison to the hydrogen bonds *D-syn-1b* makes with two amino acid residues in L1.

Structure–Activity Relationships and Conserved Sulfur- π Interactions. X-ray-crystallographic data, both presented here and previously,⁶ therefore indicate that MMTZs employ a consistent binding mode to the active sites of diverse MBLs, especially when compared with the diverse modes of binding previously observed for complexes of the bicyclic BTZs. This is highlighted by the identification that in B1 MBLs, MMTZ binding utilizes a conserved sulfur- π interaction between the thiazolidine sulfur atom and an active site aromatic residue (Trp87 in NDM-1/VIM-2 or Phe87 in IMP-1). We note that this interaction is conserved in the B2 and B3 enzymes Sfh-I and L1, with distances comparable to those observed in the B1 enzymes (Figure 4).

Notably, the sulfur- π interaction is not conserved for the bicyclic thiazolidine stereoisomers (bisthiazolidines, BTZs) for which diverse binding modes allowed cross-class inhibition.³⁷ Indeed, in comparison with their respective MMTZ analogues, *L/D*-BTZs bind very differently to both Sfh-I and L1 (Figure S6): the BTZ carboxylate, rather than the thiol, interacts with the Zn(II) ion in Sfh-I, and in L1, the BTZ thiazolidine ring is flipped in comparison to that of the MMTZ. These differences, that are also observed for the B1 enzymes,⁶ perhaps reflect the more constrained bicyclic ring scaffold of BTZs which does not

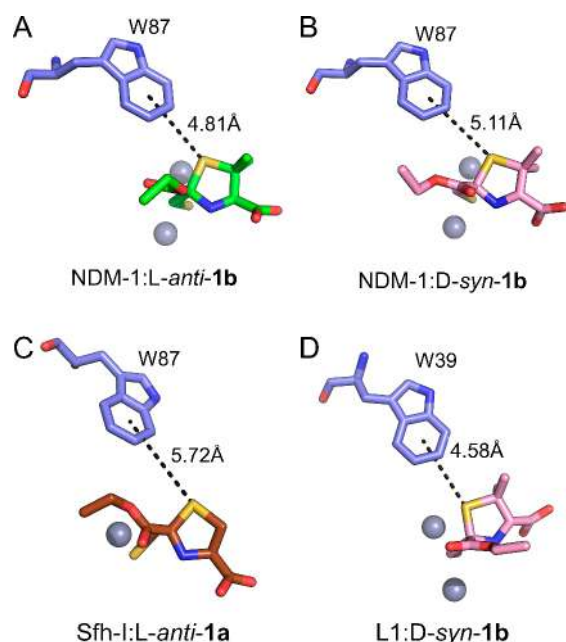


Figure 4. Sulfur- π interactions of MMTZs in MBL active sites. Views from the active sites of MBLs with dashes showing the interaction (distances labeled) of the MMTZ sulfur with an active site tryptophan (blue sticks) in (A) NDM-1:*L-anti-1b* (PDB 6zyp⁶), (B) NDM-1:*D-syn-1b* (PDB 6zyq⁶), (C) Sfh-I:*L-anti-1a* (PDB 7bj9) and (D) L1:*D-syn-1b* (PDB 7bj8).

afford these compounds the flexibility to adopt consistent binding modes that exploit the sulfur- π interaction.

Furthermore, based on comparisons with X-ray crystal structures of biapenem bound to the B2 enzyme CphA (PDB 1x8i³⁸) and hydrolyzed penicillin G bound to L1 (PDB 6u0z³⁹) (Figure S7), MMTZ binding does not closely reflect that of β -lactam-derived hydrolysis products. To date, there are no crystal structures available for B2 MBLs in complex with penicillin-derived products as penicillin is not hydrolyzed by these enzymes, so direct comparisons cannot be made between the orientations of the respective thiazolidine rings. However, the carboxylate of the biapenem-derived product in the CphA complex points in the opposite direction to the MMTZ carboxylate in Sfh-I, indicative of likely differing binding modes adopted by MMTZs and β -lactams (Figure S7A). The pyrroline ring of hydrolyzed biapenem lies in the same plane as the MMTZ thiazolidine, although interactions of the pyrroline N with Zn2 place the ring more deeply in the active site and closer to the Zn(II) ion than for the MMTZ. In the case of L1 (Figure S7B), both MMTZ and hydrolyzed penicillin G hydrogen bond with active site residues Tyr33 and Ser223. However, the thiazolidine rings lie at 90° to one another, resulting in a much weaker sulfur- π interaction for the hydrolyzed antibiotic, compared to that possible for the MMTZ. We previously observed the same relationship when comparing MMTZ/antibiotic binding in NDM-1.⁶

To understand the importance of these conserved interactions, and particularly the structure-activity relationships apparent for Sfh-I, we modeled *in silico* the MMTZs *D-anti-1a*, *L-syn-1b*, and *D-anti-1b* that are ~125–800-fold less potent against Sfh-I than *L-anti-1a*. We first generated structures of MMTZs docked in the active site as their anion (see Methods) and subsequently optimized these with quantum mechanical/molecular mechanics (QM/MM) simu-

lations. This procedure was validated by closely reproducing the *L-anti-1a* binding mode to Sfh-I determined crystallographically, particularly maintaining sulfur- π and thiol-Zn interactions (Figure S8). These optimized, crystallographically intractable complexes resulted in an increase of the sulfur- π interaction from 6.11 Å in the QM/MM optimized crystal structure (PDB 7bj9, *L-anti-1a*) to 7.50 Å (*D-anti-1a*) and 6.72 Å (*L-syn-1b*) (Figure S9A,B, respectively). These binding modes most likely arise due to limited space in the active site for the ligand to occupy, preventing conformations that maintain the sulfur- π interaction. This also results in a conformationally constrained *L-syn-1b* (625-fold less potent than *L-anti-1a*), in which its carbonyl oxygen is in an energetically unfavorable position, 1.7 Å from the thiol sulfur, further contributing to the poor potency of this MMTZ isomer. In contrast, *D-anti-1b* binds to the active site with the thiazolidine sulfur pointing away from Trp87 and in the opposite direction to the other docking modes (and the crystallographic structure of the *L-anti-1a* complex), further highlighting that the sulfur- π interaction cannot be maintained (Figure S9C). These constraints on the ligand geometry are consistent with the narrower substrate profile of Sfh-I compared with most B1 or B3 enzymes. These structural data rationalize the significant structure-activity relationships, particularly the impact of the stereochemistry on inhibitory potency, for MMTZs against Sfh-I, where K_i values for compounds with C-2 in the (*R*)-configuration were significantly poorer than those when C-2 is in the (*S*)-configuration. Furthermore, our crystallographic data support these observations by showing that the addition of a *gem*-dimethyl group to MMTZs can result in steric clashes with Val67 (Figure 3A, right), contributing to the ~10-fold reduction in potency of the **1b** compounds against Sfh-I (Table 1).

It has previously been shown that potency can be less for inhibitors which have an oxazolidine/triazole rather than thiazolidine/thiadiazole ring,⁴⁰ highlighting the potential importance of the sulfur atom for inhibition. Therefore, to further explore the role of the sulfur- π interaction in B2 and B3 MBLs, we selectively replaced the thiazolidine sulfur with an oxygen atom *in silico* and optimized the complexes with resultant isosteric 2-mercaptomethyl oxazolidines (MMOZs) with QM/MM. This *in silico* approach was necessary as the oxazolidine compounds were synthetically intractable due to instability issues. Our previous QM/MM simulations with NDM-1⁶ using the same methodology revealed that MMOZs caused an increase in the interaction distance between the O/S of the MMOZ/MMTZ and the conserved active site aromatic residue Trp87 (Figure 5A,B). Here, we note that the effect in Sfh-I and L1 is less prominent than that in the B1 NDM-1:*L-anti-1a* complex (Figure 5 and Table S4). In the case of NDM-1:*L-anti-1a*, the larger effect was caused by significant movement of the MMOZ in the NDM-1 active site, which is not observed in the Sfh-I and L1 simulations or in the NDM-1:*D-syn-1b* complex.

Although MMOZ movement in the NDM-1:*D-syn-1b* and Sfh-I:*L-anti-1a* complexes is limited, the distance of the heteroatom to Trp87 still increases compared to its equivalent in the MMTZ complexes. This can be partly explained by the shorter C–O, compared to C–S, bond distance, resulting in the oxygen atom being further from Trp87 than is the sulfur. In L1, however, the distance increase is minimal (0.13 Å), which can be explained by the increased number of hydrogen bonds formed by *D-syn-1b* in the active site, potentially outweighing

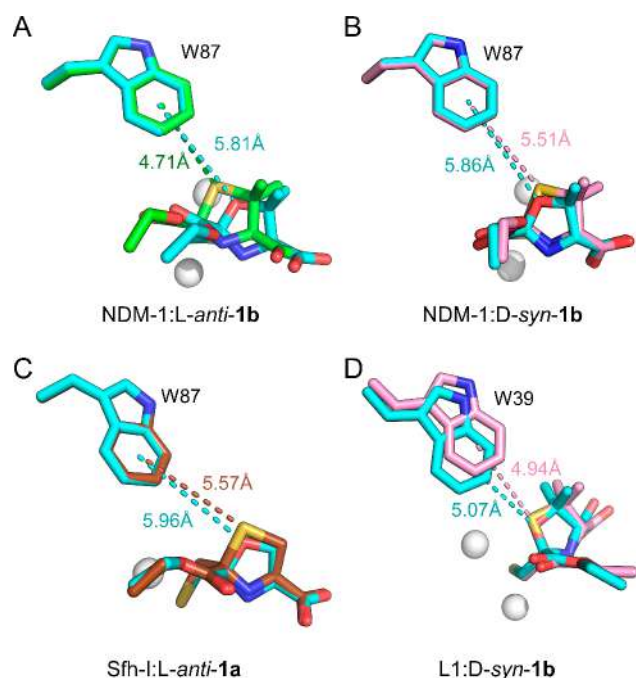


Figure 5. QM/MM optimized structures of MMTZs and their analogous oxazolidinones in MBLs. Views from the active show overlays of QM/MM optimized complex structures for MMTZs (colored as in Figure 3) and their MMOZ analogues (cyan) bound in MBLs. NDM-1 simulations were performed previously.⁶ (A) NDM-1:L-anti-1a; (B) NDM-1:D-syn-1b; (C) Sfh-I:L-anti-1a; (D) L1:D-syn-1b.

the effect of the O/S-aromatic interaction. Substitution of the sulfur with an oxygen therefore has variable effects *in silico*, but the data are suggestive that the sulfur- π interaction exerts greatest influence in the NDM-1:L-anti-1a complex. Indeed, the S to O substitution appears to only affect structures in which the hydrogen bonds in the active site are minimal (NDM-1 and Sfh-I) but has a less substantive contribution when inhibitor binding is stabilized by stronger hydrogen bonds (L1). Further, inhibitor binding in Sfh-I is more likely driven by constraints imposed by the narrow active site, with a reduced contribution from sulfur- π interactions.

CONCLUSIONS

In summary, our analysis demonstrates, and provides the basis for, cross-class inhibition of MBLs by MMTZs. Although sulfur- π interactions contribute to MMTZ:MBL interactions in all cases, our data suggest that different factors are responsible for establishing the broadly similar binding modes in the three structurally different active sites. In B1 MBLs such as NDM-1, sulfur- π interactions most likely dominate; B2 enzymes (e.g., Sfh-I) have a constrained active site that can sterically clash with MMTZs, particularly those with a *gem*-dimethyl group or C-2 in the (*S*)-configuration, whereas in B3 enzymes, the contribution of hydrogen bonds to binding appears to override the sulfur- π interaction. Differences in potency and the potential for steric clashes with the active site highlight the need to consider alternative inhibitor stereoisomers to achieve cross-class MBL inhibition and more generally in future inhibitor development. MMTZs therefore represent a promising MBL inhibitor scaffold that is synthetically accessible, allowing for the design of future iterations that improve potency in bacterial cells.

MATERIAL AND METHODS

Synthesis of 2-Mercaptomethyl Thiazolidines.

MMTZs were synthesized as previously described.⁶ Purity was determined by HPLC to be >95% as described in Rossi et al.⁶

Inhibition Constants. Inhibition constants were determined as previously described.⁶ In detail, K_i values were determined under steady-state conditions by following imipenem hydrolysis by Sfh-I and L1 at 30 °C. Imipenem breakdown was measured as a decrease in absorbance at 300 nm ($\Delta\epsilon_{300} = -9000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in a Jasco V-670 spectrophotometer. Reactions were setup in a 0.1 cm path length quartz cuvette with a final volume of 300 μL . Final enzyme concentration was 2 nM. Reaction buffer contained 10 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl and 50 mg/L BSA. Reaction buffer for L1 was supplemented with 20 μM ZnSO_4 . MMTZs were dissolved in DMSO at a final concentration of 100 mM and diluted in the reaction buffer to the desired concentration. The DMSO concentration (0.07%) does not affect the enzyme activity (data not shown). The reactions were started and monitored with the addition of the MBLs to a substrate and inhibitor mixture. Linear time courses were observed for all the conditions and less than 5% of the substrate was consumed after 300 s (Figure S1). Reaction rates were obtained from the slope of these time courses and fitted with the Competitive Inhibition model in GraphPad Prism 5.0, from which the inhibition constant (K_i) could be calculated (Figure S2).

The same protocol was followed for the previously published K_i determination of the MMTZ compounds with B1 enzymes⁶ and the BTZ compounds with B1,³⁶ B2, and B3 enzymes.³⁷

Microbiology. Minimal inhibitory concentrations (MICs) for imipenem were determined by the broth microdilution method in cation-adjusted Mueller Hinton broth according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.⁴¹ Imipenem was chosen as a representative carbapenem as Sfh-I is predominantly a carbapenemase. *E. coli* DH10B cells were transformed with pMBLe (containing *bla*_{NDM-1} or *bla*_{Sfh-I}) or pBC-SK (containing *bla*_{L1}). NDM-1 and Sfh-I expression was induced with 0.1 mM IPTG. MMTZs were dissolved to 250 mM in DMSO before dilution to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in serial doubling dilutions of imipenem (from 64 mg/L to 0.025 mg/L). Results presented are the mode of three biological replicates.

X-ray Crystallography. L1 and Sfh-I were produced, purified, and crystallized as previously described.^{37,42} L1 was crystallized by mixing 1 μL protein (23 mg/mL in 10 mM Tris pH 7, 5 mM ZnSO_4 , 100 mM NaCl) with 1 μL crystallization reagent [0.1 M HEPES pH 7.75, 1.5% PEG400, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$].³⁷ Sfh-I was crystallized by mixing, in a 3:2 ratio, protein (15 mg/mL, in 50 mM HEPES pH 7.5, 10% glycerol) with 0.2 M sodium acetate and 27 wt %/vol PEG 3350.⁴² MMTZs were dissolved in crystallization buffer at 5 mM and soaked into preformed crystals for 1 h 20 m (L1) or 1 h (Sfh-I). Diffraction data were collected at Diamond I03 (Sfh-I) or I04-1 (L1). Reflections were indexed and integrated in Mosflm (L1) or Dials⁴³ (Sfh-I) and scaled in Aimless.⁴⁴ Phases were calculated with molecular replacement in Phaser⁴⁵ using Sevd³⁷ or Sew0³⁷ as search models for L1 and Sfh-I, respectively. Structural models were completed with iterative rounds of refinement in Coot⁴⁶ and Phenix.⁴⁷ Ligand restraints were calculated in eLBOW^{47,48} and modeled into clearly

defined F_o-F_c electron density. Figures were created in PyMol.⁴⁹

Computational Calculations. *Starting structure preparation.* All ligands were prepared as thiolate anions, with the carboxylate also deprotonated. Oxazolidine complexes were built *in silico* by replacing the sulfur atom with an oxygen atom in the corresponding L1 and Sfh-I crystal structures, PDBs 7bj8 and 7bj9, respectively.

Sfh-I complexes with crystallographically intractable MMTZs were initially docked in Autodock 4.2.6⁵⁰ using the solvent sites biased Autodock4 docking method (SSBMD).⁵¹ Using information from the available crystal structures, we modified the Autodock4 scoring function by adding an energy term for the thiol sulfur atom to the original function. The Sfh-I crystal structure (PDB 7bj9) was used as the receptor protein with hydrogen atoms added by AutoDockTools4.⁵⁰ Structures of compounds *D-anti-1b*, *L-syn-1b*, *D-anti-1a* were optimized in vacuum at Hartree–Fock/6-31G* level using Gaussian 09⁵² and subsequently prepared in pdbqt format using AutoDockTools4.⁵⁰ The grid map was set to 40 × 40 × 40 points with a grid spacing of 0.375 Å centered on the catalytic site. For each calculation, 100 different docking runs were performed, and the resulting 100 poses were clustered according to a ligand RMSD cutoff of 2 Å. The predicted binding free energy score (ΔG) and population were the criteria used to choose the correct ligand pose, further considering the crystallographic information on similar compounds.

Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) optimizations. All starting structures were geometrically optimized at the Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) level. For hybrid QM/MM calculations, we used a semiempirical method PM6⁵³ to describe the QM region and the ff14SB force field⁵⁴ to describe the MM region as implemented in Amber16.^{55,56} Hydrogen atoms were added, and each protein was immersed in a truncated octahedral periodic box with a minimum solute-wall distance of 8 Å, filled with explicit TIP3P water molecules,⁵⁷ using the AMBER16 leap module.⁵⁵ The van der Waals radius, force constants, and equilibrium distances, angles, and dihedral of the studied inhibitors were taken from the gaff database, and partial charges were RESP charges computed using the Hartree–Fock method and 6-31G* basis set.^{55,58} To accommodate solvent molecules and possible clashes, an initial minimization at the molecular mechanic level of each complex structure was performed, followed by QM/MM geometry optimization. The QM region consisted of both Zn(II) ions plus the coordinated side chains of residues of the first coordination sphere and the inhibitor compound.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.1c00194>.

D-captopril inhibition constants, effect of MMTZs on imipenem, X-ray crystallographic data, reaction curves of imipenem hydrolysis, determination of MMTZ inhibition constants, chemical structures of selected thiol-containing inhibitors, binding images and comparisons (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

James Spencer — School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, U.K.; orcid.org/0000-0002-4602-0571; Email: jim.spencer@bristol.ac.uk

Authors

Philip Hinchliffe — School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, U.K.; orcid.org/0000-0001-8611-4743

Diego M. Moreno — Instituto de Química de Rosario (QUIR, CONICET-UNR), S2002LRK Rosario, Argentina; Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, S2002LRK Rosario, Argentina; orcid.org/0000-0001-5493-8537

Maria-Agustina Rossi — Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET-UNR), S2002LRK Rosario, Argentina

Maria F. Mojica — Infectious Diseases Department, School of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio 44106, United States; Research Service, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, Ohio 44106, United States; Grupo de Resistencia Antimicrobiana y Epidemiología Hospitalaria, Universidad El Bosque, Bogotá 11001 DC, Colombia

Veronica Martinez — Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo 11800, Uruguay

Valentina Villamil — Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo 11800, Uruguay

Brad Spellberg — Los Angeles County and University of Southern California (LAC + USC) Medical Center, Los Angeles, California 90033, United States

George L. Drusano — Center for Pharmacometrics and Systems Pharmacology, Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida, Orlando, Florida 32827-7400, United States

Claudia Banchio — Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, S2002LRK Rosario, Argentina; Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET-UNR), S2002LRK Rosario, Argentina

Graciela Mahler — Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo 11800, Uruguay; orcid.org/0000-0003-0612-0516

Robert A. Bonomo — Research Service, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, Ohio 44106, United States; Departments of Medicine, Pharmacology, Molecular Biology and Microbiology, Biochemistry, and Proteomics and Bioinformatics, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio 44106, United States; Medical Service, GRECC, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, Ohio 44106, United States; CWRU-Cleveland VAMC Center for Antimicrobial Resistance and Epidemiology (Case VA CARES), Cleveland, Ohio 44106, United States; orcid.org/0000-0002-3299-894X

Alejandro J. Vila — Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, S2002LRK

Rosario, Argentina; Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET-UNR), S2002LRK Rosario, Argentina

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acsinfecdis.1c00194>

Author Contributions

△These authors contributed equally to this work

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Diamond Light Source for beamtime (proposals mx12342 and mx17212), and the staff of beamlines I03 and I04-1 for assistance with crystal testing and data collection. This work was supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health (NIH) to R. A. B. under Award Numbers R01AI063517 and R01AI072219, to R. A. B., G. M., J. S. and A. J. V. under Award Number R01AI100560 and to B. S. under Award Numbers R01 AI130060 and AI117211. This study was also supported in part by funds and/or facilities provided by the Cleveland Department of Veterans Affairs, Award Number 1I01BX001974 to R. A. B. from the Biomedical Laboratory Research & Development Service of the VA Office of Research and Development, and the Geriatric Research Education and Clinical Center VISN 10. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NIH or the Department of Veterans Affairs. V. M. and V. V. are recipients of a fellowship from Comisión Académica de Posgrado (CAP-Udelar). This work was supported by grant S2021INIC2019 from Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) to V. M. and G. M. and grant PICT-2016-1657 from ANPCyT to A. J. V., C. B. and D. M. M. and A. J. V. are staff members from CONICET. M. A. R. is recipient of a fellowship from CONICET.

ABBREVIATIONS

ASU	asymmetric unit
BLI	β -lactamase inhibitor
BTZ	bisthiazolidine
DBO	diazabicyclooctane
MBL	metallo- β -lactamase
MIC	minimum inhibitory concentration
MMOZ	2-mercaptopomethyl oxazolidine
MMTZ	2-mercaptopomethyl thiazolidine
QM/MM	quantum mechanics/molecular mechanics
SBL	serine- β -lactamase

REFERENCES

- (1) Bush, K.; Bradford, P. A. beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **2016**, *6* (8), a025247.
- (2) Bush, K. Past and Present Perspectives on beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62* (10), 1076 DOI: [10.1128/AAC.01076-18](https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18).
- (3) Ambler, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans R Soc. Lond B Biol. Sci.* **1980**, *289* (1036), 321–31.
- (4) Bush, K.; Jacoby, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (3), 969–76.
- (5) Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E. C.; Colenso, C. K.; Hirvonen, V. H. A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J. beta-Lactamases and

beta-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431* (18), 3472–3500.

- (6) Rossi, M. A.; Martinez, V.; Hinchliffe, P.; Mojica, M. F.; Castillo, V.; Moreno, D. M.; Smith, R.; Spellberg, B.; Drusano, G. L.; Banchio, C.; Bonomo, R. A.; Spencer, J.; Vila, A. J.; Mahler, G. 2-Mercaptopomethyl-thiazolidines use conserved aromatic-S interactions to achieve broad-range inhibition of metallo- β -lactamases. *Chemical Science* **2021**, *12* (8), 2898–2908.
- (7) Palzkill, T. Metallo-beta-lactamase structure and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, *1277*, 91–104.
- (8) Mojica, M. F.; Bonomo, R. A.; Fast, W. B1-Metallo-beta-Lactamases: Where Do We Stand? *Curr. Drug Targets* **2016**, *17* (9), 1029–50.
- (9) Garau, G.; Garcia-Saez, I.; Bebrone, C.; Anne, C.; Mercuri, P.; Galleni, M.; Frere, J. M.; Dideberg, O. Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (7), 2347–9.
- (10) Saavedra, M. J.; Peixe, L.; Sousa, J. C.; Henriques, I.; Alves, A.; Correia, A. Sfh-I, a subclass B2 metallo-beta-lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47* (7), 2330–3.
- (11) Massidda, O.; Rossolini, G. M.; Satta, G. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. *J. Bacteriol.* **1991**, *173* (15), 4611–7.
- (12) Poirel, L.; Palmieri, M.; Brilhante, M.; Masseron, A.; Perreten, V.; Nordmann, P. PFM-Like Enzymes Are a Novel Family of Subclass B2Metallo-beta-Lactamases from *Pseudomonas synxantha* Belonging to the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64* (2), 1700 DOI: [10.1128/AAC.01700-19](https://doi.org/10.1128/AAC.01700-19).
- (13) Walsh, T. R.; Gamblin, S.; Emery, D. C.; MacGowan, A. P.; Bennett, P. M. Enzyme kinetics and biochemical analysis of ImiS, the metallo- β -lactamase from *Aeromonas sobria* 163a. *J. Antimicrob. Chemother.* **1996**, *37* (3), 423–431.
- (14) Gonzalez, L. J.; Stival, C.; Puzzolo, J. L.; Moreno, D. M.; Vila, A. J. Shaping Substrate Selectivity in a Broad-Spectrum Metallo-beta-Lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62* (4), 2079 DOI: [10.1128/AAC.02079-17](https://doi.org/10.1128/AAC.02079-17).
- (15) Rasmussen, B. A.; Bush, K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41* (2), 223–232.
- (16) Crowder, M. W.; Spencer, J.; Vila, A. J. Metallo-beta-lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39* (10), 721–8.
- (17) Mojica, M. F.; Rutter, J. D.; Taracila, M.; Abriata, L. A.; Fouts, D. E.; Papp-Wallace, K. M.; Walsh, T. J.; LiPuma, J. J.; Vila, A. J.; Bonomo, R. A. Population Structure, Molecular Epidemiology, and beta-Lactamase Diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates in the United States. *mBio* **2019**, *10* (4), 405 DOI: [10.1128/mBio.00405-19](https://doi.org/10.1128/mBio.00405-19).
- (18) Crossman, L. C.; Gould, V. C.; Dow, J. M.; Vernikos, G. S.; Okazaki, A.; Sebahia, M.; Saunders, D.; Arrowsmith, C.; Carver, T.; Peters, N.; Adlem, E.; Kerhornou, A.; Lord, A.; Murphy, L.; Seeger, K.; Squares, R.; Rutter, S.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Harris, D.; Churcher, C.; Bentley, S. D.; Parkhill, J.; Thomson, N. R.; Avison, M. B. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol.* **2008**, *9* (4), R74.
- (19) Bellais, S.; Aubert, D.; Naas, T.; Nordmann, P. Molecular and biochemical heterogeneity of class B carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in *Chryseobacterium meningosepticum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44* (7), 1878–86.
- (20) Moran-Barrio, J.; Lisa, M. N.; Larrieux, N.; Drusin, S. I.; Viale, A. M.; Moreno, D. M.; Buschiazio, A.; Vila, A. J. Crystal Structure of the Metallo-beta-Lactamase GOB in the Periplasmic Dizin Form Reveals an Unusual Metal Site. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (10), 6013–22.
- (21) Thaller, M. C.; Borgianni, L.; Di Lallo, G.; Chong, Y.; Lee, K.; Dajcs, J.; Stroman, D.; Rossolini, G. M. Metallo-beta-lactamase production by *Pseudomonas otitidis*: a species-related trait. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (1), 118–23.

- (22) Wachino, J.; Yoshida, H.; Yamane, K.; Suzuki, S.; Matsui, M.; Yamagishi, T.; Tsutsui, A.; Konda, T.; Shibayama, K.; Arakawa, Y. SMB-1, a novel subclass B3 metallo-beta-lactamase, associated with ISCR1 and a class I integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (11), 5143–9.
- (23) Yong, D.; Toleman, M. A.; Bell, J.; Ritchie, B.; Pratt, R.; Ryley, H.; Walsh, T. R. Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo-beta-lactamase gene, bla_{AIM-1}, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (12), 6154–9.
- (24) Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23* (1), 160–201.
- (25) Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. New β -Lactamase Inhibitors in the Clinic. *Infectious Disease Clinics of North America* **2016**, *30* (2), 441–464.
- (26) Bush, K.; Bradford, P. A. Interplay between beta-lactamases and new beta-lactamase inhibitors. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17* (5), 295–306.
- (27) Prosperi-Meys, C.; Llabres, G.; de Seny, D.; Soto, R. P.; Valladares, M. H.; Laraki, N.; Frere, J. M.; Galleni, M. Interaction between class B beta-lactamases and suicide substrates of active-site serine beta-lactamases. *FEBS Lett.* **1999**, *443* (2), 109–11.
- (28) Brem, J.; Cain, R.; Cahill, S.; McDonough, M. A.; Clifton, I. J.; Jimenez-Castellanos, J. C.; Avison, M. B.; Spencer, J.; Fishwick, C. W.; Schofield, C. J. Structural basis of metallo-beta-lactamase, serine-beta-lactamase and penicillin-binding protein inhibition by cyclic boronates. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12406.
- (29) Calvopina, K.; Hinchliffe, P.; Brem, J.; Heesom, K. J.; Johnson, S.; Cain, R.; Lohans, C. T.; Fishwick, C. W. G.; Schofield, C. J.; Spencer, J.; Avison, M. B. Structural/mechanistic insights into the efficacy of nonclassical beta-lactamase inhibitors against extensively drug resistant *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Mol. Microbiol.* **2017**, *106* (3), 492–504.
- (30) Krajnc, A.; Brem, J.; Hinchliffe, P.; Calvopina, K.; Panduwawala, T. D.; Lang, P. A.; Kamps, J.; Tyrrell, J. M.; Widlake, E.; Seward, B. G.; Walsh, T. R.; Spencer, J.; Schofield, C. J. Bicyclic Boronate VNRX-5133 Inhibits Metallo- and Serine-beta-Lactamases. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (18), 8544–8556.
- (31) Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Krajnc, A.; Mulholland, A. J.; Brem, J.; Schofield, C. J.; Spencer, J. Cyclic boronates as versatile scaffolds for KPC-2 β -lactamase inhibition. *RSC Medicinal Chemistry* **2020**, *11* (4), 491–496.
- (32) Hecker, S. J.; Reddy, K. R.; Lomovskaya, O.; Griffith, D. C.; Rubio-Aparicio, D.; Nelson, K.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Sabet, M.; Tarazi, Z.; Parkinson, J.; Totrov, M.; Boyer, S. H.; Glinka, T. W.; Pemberton, O. A.; Chen, Y.; Dudley, M. N. Discovery of Cyclic Boronic Acid QPX7728, an Ultrabroad-Spectrum Inhibitor of Serine and Metallo-beta-lactamases. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (14), 7491–7507.
- (33) Tsivkovski, R.; Totrov, M.; Lomovskaya, O. Biochemical Characterization of QPX7728, a New Ultrabroad-Spectrum Beta-Lactamase Inhibitor of Serine and Metallo-Beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64* (6), 130 DOI: 10.1128/AAC.00130-20.
- (34) Palacios, A. R.; Rossi, M. A.; Mahler, G. S.; Vila, A. J. Metallo-beta-Lactamase Inhibitors Inspired on Snapshots from the Catalytic Mechanism. *Biomolecules* **2020**, *10* (6), 854.
- (35) Lisa, M. N.; Palacios, A. R.; Aitha, M.; Gonzalez, M. M.; Moreno, D. M.; Crowder, M. W.; Bonomo, R. A.; Spencer, J.; Tierney, D. L.; Llarrull, L. I.; Vila, A. J. A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo-beta-lactamases. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 538.
- (36) Gonzalez, M. M.; Kosmopoulou, M.; Mojica, M. F.; Castillo, V.; Hinchliffe, P.; Pettinati, I.; Brem, J.; Schofield, C. J.; Mahler, G.; Bonomo, R. A.; Llarrull, L. I.; Spencer, J.; Vila, A. J. Bisthiazolidines: A Substrate-Mimicking Scaffold as an Inhibitor of the NDM-1 Carbapenemase. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1* (11), 544–54.
- (37) Hinchliffe, P.; Gonzalez, M. M.; Mojica, M. F.; Gonzalez, J. M.; Castillo, V.; Saiz, C.; Kosmopoulou, M.; Tooke, C. L.; Llarrull, L. I.; Mahler, G.; Bonomo, R. A.; Vila, A. J.; Spencer, J. Cross-class metallo-beta-lactamase inhibition by bisthiazolidines reveals multiple binding modes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (26), E3745–54.
- (38) Garau, G.; Bebrone, C.; Anne, C.; Galleni, M.; Frere, J. M.; Dideberg, O. A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J. Mol. Biol.* **2005**, *345* (4), 785–95.
- (39) Kim, Y.; Maltseva, N.; Wilamowski, M.; Tesar, C.; Endres, M.; Joachimiak, A. Structural and biochemical analysis of the metallo- β -lactamase L1 from emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* revealed the subtle but distinct di-metal scaffold for catalytic activity. *Protein Sci.* **2020**, *29* (3), 723–743.
- (40) Feng, L.; Yang, K. W.; Zhou, L. S.; Xiao, J. M.; Yang, X.; Zhai, L.; Zhang, Y. L.; Crowder, M. W. N-heterocyclic dicarboxylic acids: broad-spectrum inhibitors of metallo-beta-lactamases with co-antibacterial effect against antibiotic-resistant bacteria. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (16), 5185–9.
- (41) CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2019, Vol. 29th ed.
- (42) Fonseca, F.; Arthur, C. J.; Bromley, E. H.; Samyn, B.; Moerman, P.; Saavedra, M. J.; Correia, A.; Spencer, J. Biochemical characterization of Sfh-I, a subclass B2 metallo-beta-lactamase from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (11), 5392–5.
- (43) Winter, G.; Waterman, D. G.; Parkhurst, J. M.; Brewster, A. S.; Gildea, R. J.; Gerstel, M.; Fuentes-Montero, L.; Vollmar, M.; Michels-Clark, T.; Young, I. D.; Sauter, N. K.; Evans, G. DIALS: implementation and evaluation of a new integration package. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology* **2018**, *74* (2), 85–97.
- (44) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (4), 235–42.
- (45) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40* (4), 658–674.
- (46) Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (12), 2126–32.
- (47) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkoczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (2), 213–21.
- (48) Moriarty, N. W.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D. electronic Ligand Builder and Optimization Workbench (eLBOW): a tool for ligand coordinate and restraint generation. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2009**, *65* (10), 1074–80.
- (49) Schrödinger, L. PyMOL Molecular Graphics System. Vol. Version 1.8.
- (50) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–91.
- (51) Arcon, J. P.; Modenutti, C. P.; Avendano, D.; Lopez, E. D.; Defelipe, L. A.; Ambrosio, F. A.; Turjanski, A. G.; Forli, S.; Marti, M. A. AutoDock Bias: improving binding mode prediction and virtual screening using known protein-ligand interactions. *Bioinformatics* **2019**, *35* (19), 3836–3838.
- (52) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.,

Janesko, B. G., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H. P., Ortiz, J. V., Izmaylov, A. F., Sonnenberg, J. L., Williams, Ding, F., Lipparini, F., Egidi, F., Goings, J., Peng, B., Petrone, A., Henderson, T., Ranasinghe, D., Zakrzewski, V. G., Gao, J., Rega, N., Zheng, G., Liang, W., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Throssell, K., Montgomery, Jr., J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M. J., Heyd, J. J., Brothers, E. N., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Keith, T. A., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A. P., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Millam, J. M., Klene, M., Adamo, C., Cammi, R., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Farkas, O., Foresman, J. B., Fox, D. J. *Gaussian 16 Rev. C.01*, Wallingford, CT, 2016.

(53) Stewart, J. J. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* **2007**, *13* (12), 1173–213.

(54) Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (8), 3696–713.

(55) Case, D. A., Betz, R. M., Cerutti, D. S., Cheatham, III, T. E., Darden, T. A., Duke, R. E., Giese, T. J., Gohlke, H., Goetz, A. W., Homeyer, N., Izadi, S., Janowski, P., Kaus, J., Kovalenko, A., Lee, T. S., LeGrand, S., Li, P., Lin, C., Luchko, T., Luo, R., Madej, B., Mermelstein, D., Merz, K. M., Monard, G., Nguyen, H., Nguyen, H. T., Omelyan, I., Onufriev, A., Roe, D. R., Roitberg, A. E., Sagui, C., Simmerling, C. L., Botello-Smith, W. M., Swails, J., Walker, R. C., Wang, J., Wolf, R. M., Wu, X., Xiao, L., Kollman, P. A., 2016, *AMBER 2016*; University of California, San Francisco.

(56) de, M. S. G.; Walker, R. C.; Elstner, M.; Case, D. A.; Roitberg, A. E. Implementation of the SCC-DFTB method for hybrid QM/MM simulations within the amber molecular dynamics package. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111* (26), 5655–64.

(57) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.

(58) Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (40), 10269–10280.