



TESE DE DOUTORAMENTO

**NUEVOS INHIBIDORES IRREVERSIBLES  
DE LAS  $\beta$ -LACTAMASAS PARA  
RECUPERAR LA EFICACIA DE LOS  
ANTIBIÓTICOS CONTRA LAS SÚPER-  
BACTERIAS**

Diana Rodríguez Lema

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN CIENCIA E TECNOLOXÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANO 2020





## DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

**Nuevos Inhibidores Irreversibles de las b-Lactamasas para Recuperar la Eficacia de los Antibióticos contra las Súper-Bacterias**

*Para defensas telemáticas*

Dña. Diana Rodríguez Lema

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

Y me comprometo a presentar el ejemplar impreso de la tesis en el plazo de un mes desde que la EDIUS me lo requiera, así como el Compromiso Documental de Supervisión en el caso de que el original no esté depositado en la Escuela.

*En Santiago de Compostela, 11 de Julio de 2020.*

Fdo.: Diana Rodríguez Lema



## AUTORIZACIÓN DE LA DIRECTORA DE LA TESIS

**Nuevos Inhibidores Irreversibles de las b-Lactamasas para Recuperar la Eficacia de los Antibióticos contra las Súper-Bacterias**

Dña. Concepción González Bello

INFORMA:

*Que la presente tesis se corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Diana Rodríguez Lema**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directora de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 11 de Julio de 2020.*

Fdo.: Prof. Concepción González Bello

# ÍNDICE

## **Abreviaturas, Siglas, Acrónimos y Unidades**

### **Abstract**

<b>CAPÍTULO 1: Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Impacto en la Salud de la Resistencia a los Antibióticos.....	3
1.2 Bacterias de Prioridad Crítica: los Patógenos <i>ESKAPE</i> .....	8
1.3 Principales Mecanismos de Resistencia Bacteriana a los Antibióticos .....	11
1.4 Los Antibióticos $\beta$ -Lactámicos .....	14
1.5 Los Enzimas $\beta$ -Lactamasas.....	17
1.5.1 Las $\beta$ -Lactamasas de Clase A.....	20
1.5.2 Las $\beta$ -Lactamasas de Clase C.....	22
1.5.3 Las $\beta$ -Lactamasas de Clase D.....	23
1.6 Inhibidores de las $\beta$ -Lactamasas .....	28
1.6.1 Ácidos Borónicos y Boronatos Cíclicos .....	29
1.6.2 1,6-Diazabicyclo[3,2,1]octanos.....	33
1.6.3 Sulfonas Basadas en Penicilina .....	36
<b>CAPÍTULO 2. Objetivos</b> .....	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO 3: 6-Arilmetiliden Sulfonopenicilinas Conjugadas a Catecol</b> .....	<b>45</b>
3.1 Sulfonopenicilinas como Inhibidores de las $\beta$ -Lactamasas. Precedentes..	47
3.2 Diseño de 6-Arilmetiliden Sulfonopenicilinas Conjugadas a Catecol como Potenciales Inhibidores de las $\beta$ -Lactamasas.....	56
3.3 Síntesis de los Compuestos <b>33–37</b> .....	57
3.4 Estudios de Sensibilidad Antibiótica .....	63
3.5 Evaluación del Poder Inhibitorio de los Análogos <b>33–37</b> frente a la OXA- 24/40 .....	66
3.6 Mecanismo de Inhibición de los Compuestos <b>33–37</b> .....	68
3.7 Modo de Unión de los Compuestos <b>33–37</b> .....	70
<b>CAPÍTULO 4: 6-Piridimetiliden Sulfonopenicilinas Conjugadas a Grupos Sideróforos</b> .....	<b>75</b>
4.1 Estrategia “Caballo de Troya”. Precedentes .....	77
4.2 Nuevas 6-Piridimetiliden Sulfonopenicilinas Conjugadas a Sideróforos ..	79

4.3	Síntesis de los Compuestos <b>38–43</b> y <b>46</b> .....	83
4.4	Síntesis del Compuesto <b>44</b> .....	87
4.5	Síntesis del Compuesto <b>45</b> .....	90
<b>CAPÍTULO 5: Análogos del Sulbactam Conjugados a Grupos Sideróforos</b> .....		<b>95</b>
5.1	El Sulbactam .....	97
5.2	Análogos del Sulbactam Conjugados con Grupos Sideróforos. Planteamiento .....	103
5.3	Síntesis de los Compuesto <b>47–53</b> .....	104
<b>CHAPTER 6: Conclusions</b> .....		<b>107</b>
<b>CHAPTER 7: Experimental Section</b> .....		<b>113</b>
7.1	General Procedures .....	115
7.2	Compound <b>64</b> .....	117
7.3	Compound <b>65</b> .....	117
7.4	Compound <b>66</b> .....	118
7.5	Compound <b>69</b> .....	119
7.6	General procedure for the preparation of phosphonium salts <b>56–59</b> .....	119
7.6.1	Compound <b>56</b> .....	120
7.6.2	Compound <b>57</b> .....	120
7.6.3	Compound <b>58</b> .....	121
7.6.4	Compound <b>59</b> .....	121
7.7	Compound <b>75</b> .....	122
7.8	General Procedure for the Wittig Reaction .....	122
7.8.1	Compound <b>80</b> .....	123
7.8.2	Compound <b>81</b> .....	124
7.8.3	Compound <b>82</b> .....	125
7.8.4	Compound <b>83</b> .....	126
7.8.5	Compound <b>84</b> .....	127
7.9	General procedure for the oxidation of compounds <b>80–84</b> .....	127
7.9.1	Compound <b>85</b> .....	128
7.9.2	Compound <b>86</b> .....	129
7.9.3	Compound <b>87</b> .....	130

7.9.4	Compound <b>88</b> .....	130
7.9.5	Compound <b>89</b> .....	131
7.10	Compound <b>103</b> .....	132
7.11	General procedure for the synthesis of esters <b>90–94</b> .....	132
7.11.1	Compound <b>90</b> .....	133
7.11.2	Compound <b>91</b> .....	134
7.11.3	Compound <b>92</b> .....	135
7.11.4	Compound <b>93</b> .....	136
7.11.5	Compound <b>94</b> .....	137
7.12	General procedure for silyl ethers deprotection .....	138
7.12.1	Compound <b>95</b> .....	139
7.12.2	Compound <b>96</b> .....	140
7.12.3	Compound <b>97</b> .....	140
7.12.4	Compound <b>98</b> .....	141
7.12.5	Compound <b>99</b> .....	142
7.13	General procedure for the preparation of Compounds <b>33–37</b> .....	143
7.13.1	Compound <b>33</b> .....	143
7.13.2	Compound <b>34</b> .....	144
7.13.3	Compound <b>35</b> .....	145
7.13.4	Compound <b>36</b> .....	145
7.13.5	Compound <b>37</b> .....	146
7.14	General procedure for the protection of phenols as MEM ethers.....	147
7.14.1	Compound <b>121</b> .....	147
7.14.2	Compound <b>123</b> .....	147
7.14.3	Compound <b>125</b> .....	148
7.15	Compound <b>113</b> .....	148
7.16	Compound <b>114</b> .....	149
7.17	Compound <b>115</b> .....	149
7.18	Compound <b>117</b> .....	149
7.19	Compound <b>128</b> .....	151
7.20	Compound <b>129</b> .....	152

7.21	Compound <b>111</b> .....	152
7.22	Compound <b>46</b> .....	152
7.23	Compound <b>130</b> .....	153
7.24	Compound <b>131</b> .....	154
7.25	Compound <b>132</b> .....	155
7.26	Compound <b>133</b> .....	155
7.27	Compound <b>135</b> .....	156
7.28	General procedure for the deprotection of MEM ethers .....	157
7.28.1	Compound <b>136</b> .....	158
7.28.2	Compound <b>137</b> .....	158
7.28.3	Compound <b>138</b> .....	159
7.28.4	Compound <b>139</b> .....	159
7.29	Compound <b>141</b> .....	160
7.30	General procedure for the preparation of compounds <b>39–43</b> .....	161
7.30.1	Compound <b>39</b> .....	161
7.30.2	Compound <b>40</b> .....	162
7.30.3	Compound <b>41</b> .....	162
7.30.4	Compound <b>42</b> .....	163
7.30.5	Compound <b>43</b> .....	163
7.31	Compound <b>144</b> .....	164
7.32	Compound <b>145</b> .....	165
7.33	Compound <b>146</b> .....	165
7.34	Compound <b>142</b> .....	166
7.35	Compound <b>147</b> .....	167
7.36	Compound <b>148</b> .....	168
7.37	Compound <b>149</b> .....	169
7.38	Compound <b>150</b> .....	169
7.39	Compound <b>151</b> .....	170
7.40	Compound <b>44</b> .....	171
7.41	General procedure for the preparation of esters <b>164–170</b> .....	172
7.41.1	Compound <b>164</b> .....	172

7.41.2 Compound <b>165</b> .....	173
7.41.3 Compound <b>166</b> .....	174
7.41.4 Compound <b>167</b> .....	175
7.41.5 Compound <b>168</b> .....	175
7.41.6 Compound <b>169</b> .....	176
7.41.7 Compound <b>170</b> .....	177
7.42 Compound <b>171</b> .....	178
7.43 Compound <b>172</b> .....	179
7.44 Compound <b>173</b> .....	179
7.45 Compound <b>174</b> .....	180
7.46 Compound <b>175</b> .....	180
7.47 Compound <b>176</b> .....	181
7.48 Compound <b>177</b> .....	182
7.49 Compound <b>47</b> .....	182
7.50 Compound <b>48</b> .....	183
7.51 Compound <b>49</b> .....	183
7.52 Compound <b>50</b> .....	184
7.53 Compound <b>51</b> .....	185
7.54 Compound <b>52</b> .....	185
7.55 Compound <b>53</b> .....	186
<b>ANEXO I: Espectros de RMN</b> .....	<b>189</b>
<b>ANEXO II: Referencias</b> .....	<b>225</b>
<b>ANEXO III: Publicaciones</b> .....	<b>237</b>



A large, light blue watermark of the USC logo is centered on the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, bold, sans-serif font, with the full name 'UNIVERSIDADE DE SANTO TOMÁS DE COMPOSTELA' written in a smaller font below it.

## *Abreviaturas, Siglas, Acrónimos y Unidades*

---

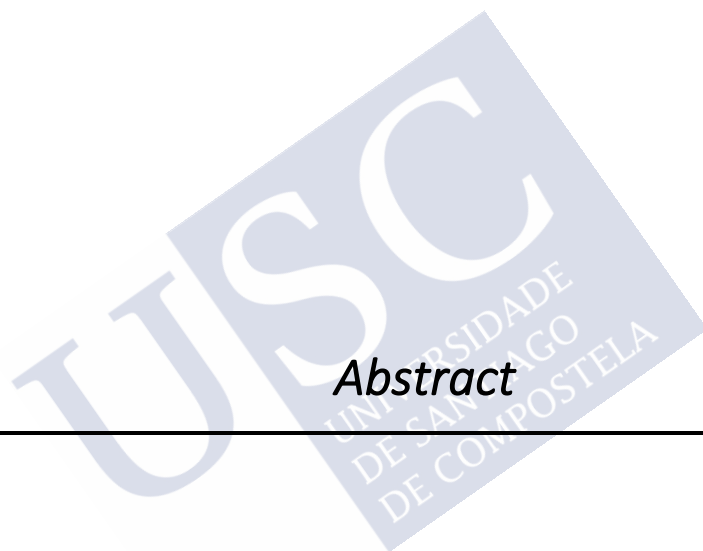


Å	Angstrom
ac.	Acuoso
Ac <sub>2</sub> O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgOAc	Acetato de plata
AIBN	Azobisisobutironitrilo
Ala	Alanina
AMP	Ampicilina
anh.	Anhidro
Ar	Aromático
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
ATR	Reflectancia total atenuada
B	Base
br	Ancho
Bu <sub>3</sub> SnH	Hidruro de tributilestaño
c	Concentración en mg mL <sup>-1</sup>
°C	Grados centígrados
cat.	Catalítico
CHDL	β-lactamasa de clase D capaz de hidrolizar carbapenems
CHUAC	Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CLSI	Instituto de estándares clínicos y de laboratorio
cm	Centímetros
<sup>13</sup> C-NMR	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
CTZ	Ceftazidima
cuant.	cuantitativo
d	Doblete
Dr.	Doctor
δ	Desplazamiento químico expresado en ppm relativo al TMS
Δ	Reflujo
DBOs	Diazabicyclooctanos
DCM	Diclorometano
dd	Doble doblete
deg	Grados
DEPT	Incremento no distorsionado por transferencia de polarización
DIAD	Azodicarboxilato de dietilo
DM	Dinámica Molecular
DMAP	<i>N,N</i> -dimetil-4-aminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida

DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido deuterado
dt	Doble triplete
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESBL	$\beta$ -lactamasa de espectro extendido
ESI	Electrospray
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacteriaceae</i>
EtOH	Etanol
EUCAST	Comité Europeo sobre Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina
FDA	Administración americana de Alimentos y Medicamentos
<sup>19</sup> F NMR	Resonancia Magnética Nuclear de flúor
g	Gramos
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
$\mu$ g	Microgramos
h	Hora(s)
HRMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
<sup>1</sup> H-NMR	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
Hz	Hercios
IT	Intermedio tetrahédrico
I+D	Investigación y Desarrollo
Ile	Isoleucina
Im	Imidazol
IM	Imipenem
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
<i>J</i>	Constante de acoplamiento expresada en Hz
Kg	Quilogramo
<i>k</i> <sub>cat</sub>	Velocidad de catálisis
<i>K</i> <sub>i</sub>	Constante de inhibición
<i>K</i> <sub>i</sub>	Constante de inhibición
<i>K</i> <sub>i app</sub>	Constante aparente de inhibición
<i>K</i> <sub>inact</sub>	Velocidad de inactivación
<i>K</i> <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
Leu	Leucina
Lys	Lisina
m	Multiplete
M	Molar
MALDI	desorción/ionización mediante láser asistida por matriz

<i>m</i> -CPBA	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico
MeCO <sub>3</sub> H	Ácido peracético
MEM	2-Metoxietoximetilo
MEMCl	Cloruro de 2-metoxietoximetilo
MDR	Resistente a múltiples fármacos
MeOH	Metanol
MeONa	Metóxido sódico
Met	Metionina
mg	Miligramos
MH <sup>+</sup>	Ión molecular
MHz	Megahercios
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
μm	Micrómetros
μM	Micromolar
mmol	Milimoles
Mp	Punto de fusión
ms	Milisegundos
MS	Espectrometría de masas
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
NA	No Aplicable
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
ns	Nanosegundos
OMS	Organización Mundial de la Salud
OXA	Oxacilinas
PBP	Proteína fijadora de penicilina
PDB	Banco de Datos de Proteínas
PDC	Cefalosporinasa procedente de <i>P. aeruginosa</i>
Phe	Fenilalanina
PhMe	Tolueno
Pi	Piridina
<sup>31</sup> P NMR	Resonancia Magnética Nuclear de fósforo
Ph <sub>3</sub> P	Trifenilfosfina
Pd(OAc) <sub>2</sub>	Acetato de paladio (II)
P( <i>o</i> -tol) <sub>3</sub>	Tri- <i>o</i> -tolilfosfina
ppm	Partes por millón
q	Cuartete
quant.	Cuantitativo

quint	Quintuplete
R&D	Research and Development
RT	Temperatura Ambiente
s	Singulete
sat.	Saturado
Ser	Serina
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutylamonio
TBAI	Ioduro de tetrabutylamonio
TBDPS	<i>Terc</i> -butildifenilsililo
TBDPSCI	Cloruro de <i>terc</i> -butildifenilsilano
<i>t</i> -BuOH	<i>terc</i> -butanol
<i>t</i> -BuOK	<i>terc</i> -butóxido potásico
td	Triple doblete
TFA	Ácido trifluoroacético
Tf <sub>2</sub> O	Anhídrido triflico
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
TLC	Cromatografía en capa fina
Tris·HCl	Hidrocloreuro de 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
Trp	Triptófano
tt	Triple triplete
Tyr	Tirosina
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-Visible
Val	Valina
W	Agua
WHO	World Health Organisation
XDR	Extremadamente resistente



*Abstract*

---



Bacterial resistance to antibiotics is reaching such disturbing levels that the World Health Organization (WHO) estimates that by 2050 10 million people could die every year due to infections caused by superbugs (multidrug-resistant bacteria). Of particular concern is the impact in clinical settings of healthcare associated infections caused by Gram-negative bacteria, such as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*. These pathogens are resistant to carbapenems, often considered as antibiotics of last resort, and have been classified by the WHO of critical priority for which R&D resources should be prioritized.

The most common mode of resistance to antibiotics in Gram-negative bacteria is the enzymatic inactivation of  $\beta$ -lactams, which are around 70% of commonly prescribed antibiotics, by  $\beta$ -lactamases. These enzymes hydrolyze  $\beta$ -lactams in an acylation-deacylation-based process. Among the four types of  $\beta$ -lactamases (A-D), the class D enzymes, which are also known as 'oxacillinases (OXA)', are one of the most relevant, because they hydrolyze penicillins and narrow-spectrum cephalosporins. Some class D  $\beta$ -lactamases have evolved to inactivate expanded-spectrum cephalosporins and even carbapenems [carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamases (CHDLs)]. These enzymes are frequently found in deadly pathogens such as multidrug-resistant *A. baumannii* (e.g. OXA-23, OXA-24/40), or *Enterobacteriaceae* (e.g. OXA-48). Also important are the chromosomal class C  $\beta$ -lactamases (AmpC) that possesses the WHO critical pathogen *P. aeruginosa*, which is named in this species as PDC (*Pseudomonas*-Derived Cephalosporinase). The AmpC enzyme, which is inducible in most clinical isolates by the  $\beta$ -lactam antibiotics themselves, makes this pathogen intrinsically resistant to most antibiotics. The dissemination of CHDL and AmpC enzymes is worrisome since is seriously compromising the use of carbapenems and last generation cephalosporins. It is therefore urgent to develop alternative therapies to face the challenge of the 21st century, the resistance of bacteria to antibiotics in clinical use.

In recent years, the most employed strategy to fight against multidrug-resistant bacteria is the use of the combination therapy ‘antibiotic +  $\beta$ -lactamase inhibitor’. The latter compounds are ‘*antibiotic adjuvants*’ that have little or no antibiotic activity, but in combination with the antibiotic allow for repurposing the excellent arsenal of antibiotics available in the clinic, which have proven to be safe and effective over years. The success achieved by this combination approach, and the lack of efficient therapies against certain type of  $\beta$ -lactamases, have encouraged us to search in this PhD thesis for the development of new irreversible inhibitors of CHDL enzymes, which are one of the most worrisome  $\beta$ -lactamases in deadly pathogens *A. baumannii* and *Enterobacteriae*, as well as the chromosomal cephalosporinase AmpC, which is the major cause of resistance to many antipseudomonal  $\beta$ -lactam therapies. To this end, three specific objectives were established.

The first objective is addressed in Chapter 3. It consisted in studying the effect on the inhibitory potency of the known penicillin-based sulfone inhibitor LN-1-255 (**55c**), against CHDL and AmpC enzymes by: (i) the incorporation of substituents in the pyridine ring that would change the electron density of this moiety, and (ii) the use of larger pyridine-based heterocycles. These studies were based on our previous knowledge about the activity and mechanism of action of the inhibitor LN-1-255 (**55c**). In order to improve and expand the activity of LN-1-255 (**55c**) against a wider spectrum of serine  $\beta$ -lactamases, compounds **33–37** were synthesized, and their ability to repurpose  $\beta$ -lactam antibiotics activity with bacterial species that carry carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamases (OXA-23, OXA-24/40 and OXA-48), as well as with class A (TEM-1, CTX-M-2) and class C (CMY-2, DHA-1) enzymes was analyzed. The results of these investigations showed that combinations of ampicillin or ceftazidime with inhibitors **33–36** restore completely the antibiotic efficacy against *E. coli* producing TEM-1, CMY-2 AND DHA-1. Most of the compounds proved to have better inhibitory potencies against *A. baumannii*

carrying OXA-23 and OXA-24/40, and *K. pneumoniae* producing OXA-48, than avibactam (**21**) and relebactam (**22**), which are the inhibitors of reference for these enzymes. Kinetic and inhibition studies with the OXA-24/40 enzyme showed that bromide **34** is the best inhibitor of the series, with an improved efficacy of approximately 1.6-fold and lower inhibition constant ( $K_i = 140$  nM) compared with the parent inhibitor LN-1-255 (**55c**). Docking studies revealed that the enhanced affinity of bromide **34** lie on the CH- $\pi$  interactions established between its poor electron density pyridine moiety and the side chains of the apolar residues of the tunnel-like entrance that surround it.

The studies discussed in Chapter 3 were reported in the article: “6-Arylmethylidene Penicillin-based Sulfone Inhibitors for Repurposing Antibiotic Efficiency in Priority Pathogens. Rodríguez, D.; Maneiro, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; Beceiro, A.; González-Bello, C. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 3737–3755 (doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00127)”, which was also highlighted in the cover of the journal.

The second objective, which is discussed in Chapter 4, involves the study of the potential enhanced effect in the inhibition efficiency of LN-1-255 (**55c**), of the introduction of diverse siderophore groups linked to the penicillin-based sulfone core through different positions and linkages. These studies were triggered by the results of computational studies carried out in our research group showing that the catechol group in LN-1-255 (**55c**) seems to have great flexibility and wide variability of arrangements when binding to CHDL and AmpC enzymes. In other words, this group does not seem to contribute significantly to the binding affinity of LN-1-255 (**55c**). Hence, in this chapter we explore the utility of other siderophores groups and linkages to the inhibitor core, specifically, through the synthesis and current microbiological evaluation of compounds **38–43**.

Finally, the third objective of this PhD thesis consisted in the development of analogs of sulbactam (**30**) of improved antibacterial activity, which is discussed in Chapter 5. Our interest in this inhibitor was due to two relevant features: (1) sulbactam has intrinsic antibacterial activity against *Acinetobacter* species; and (2) it has recently been demonstrated that the combination sulbactam/durlobactam is a promising tool to fight against infections caused by multidrug-resistant *A. baumannii* expressing class A, C and certain class D  $\beta$ -lactamases. This combination is now in phase III clinical trials. We attempted to achieve this goal through compounds **47–53**, which are functionalized with a siderophore moiety in the pro-*R* methyl group in position C3. These modifications were designed in order to: (1) improve the internalization of sulbactam through the bacterial iron-uptake channels; and (2) promote extra interactions with the residues of the enzyme active site that would increase the lifetime of the ligand adduct. More importantly, the relatively simple synthetic route developed for the preparation of **47–53**, in comparison with the majority of the inhibitors developed in this PhD thesis, could make them a “low cost” solution for the treatment of multi-drug resistant *A. baumannii* infections. The antibacterial activity of compounds **47–53** is currently under evaluation.

CAPÍTULO 1  
*Introducción*

---



## 1.1 Impacto en la Salud de la Resistencia a los Antibióticos

Los antibióticos son compuestos que interfieren con estructuras o procesos metabólicos que son esenciales para el crecimiento o supervivencia de la bacteria.<sup>1</sup> El uso de determinados compuestos químicos para aliviar las enfermedades infecciosas se remonta a las civilizaciones del antiguo Egipto, de Babilonia o los Incas.<sup>2</sup> Estos tratamientos milenarios consistían en la aplicación de hongos en heridas abiertas, así como en la ingesta de alimentos tales como el rábano, el puerro, el ajo o la cebolla, de los que, a día de hoy, son conocidas sus excelentes propiedades antibacterianas. Sin embargo, no es hasta 1928 con el descubrimiento fortuito de la penicilina G por Alexander Fleming cuando comienza la conocida como “Edad de Oro” de los antibióticos.<sup>3</sup> Este hito supuso un punto de inflexión en la historia de la medicina, ya que permitió el tratamiento de muchas infecciones bacterianas que hasta ese momento no tenían cura, lo que supuso el incremento exponencial de la esperanza de vida.<sup>4</sup> A pesar de la relevancia del descubrimiento de Fleming, no fue hasta 1941 cuando Florey, Chain, Abraham y un equipo de científicos británicos y americanos consiguieron optimizar el aislamiento, la identificación y la producción a gran escala de la bencilpenicilina para el tratamiento de las tropas aliadas en la Segunda Guerra Mundial. Este hecho prepararía el escenario para el lanzamiento de la clase más exitosa de antibióticos, los  $\beta$ -lactámicos.<sup>5</sup> Finalmente, en 1946, un año más tarde de que Fleming, Florey y Chain fueran galardonados con el Premio Nobel de Medicina, comenzó el uso clínico de la penicilina, convirtiéndose en la mayor contribución a la mejora de la salud humana de la historia.<sup>6,7</sup> Esto desencadenó una gran revolución en la industria farmacéutica

<sup>1</sup> Walsh, C. *Nature* **2000**, 406, 775–781.

<sup>2</sup> Böttcher, H. M. *Wonder drugs: a history of antibiotics*. Lippincott, Philadelphia, 1964.

<sup>3</sup> Fleming, A. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, 10, 226–236.

<sup>4</sup> Anderson, R. J.; Groundwater, P. W.; Todd, A.; Worsley, A. J. *Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance and clinical applications*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, 2012.

<sup>5</sup> Bush, K.; Bradford, P. A. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, 6, a025247.

<sup>6</sup> Kong, K.F.; Schnepfer, L.; Mathee, K. *APMIS* **2010**, 118, 1–36.

<sup>7</sup> Canzani, D.; Aldeek, F. J. *Nutr. Hum. Health* **2017**, 1, 28–40.

entre los años 1940 y 1960, que condujo al descubrimiento y comercialización de un gran número de antibióticos.<sup>8</sup>

La gran mayoría de los antibióticos en uso clínico son productos naturales elaborados por algunas bacterias y hongos, como armas químicas para matar otros microbios, y descubiertos mediante cribado de muestras de suelo.<sup>1</sup> Esta metodología, que permitió el descubrimiento de la estreptomina en 1943,<sup>9</sup> fue establecida por el microbiólogo Selman Waksman y adoptada por la industria farmacéutica en la identificación de las principales clases de antibióticos durante los siguientes veinte años.<sup>10</sup> Estos incluyen penicilinas y cefalosporinas procedentes de hongos, así como antibióticos obtenidos de diferentes cepas de la bacteria *Streptomyces*, tales como el aminoglucósido estreptomina, el macrólido eritromicina, la tetraciclina o la vancomicina, entre otros. También se desarrollaron antibióticos a partir de modificaciones sintéticas de compuestos naturales, como las  $\beta$ -lactamas de segunda y tercera generación, así como mediante síntesis total, como la claritromicina y la acitromicina de segunda generación.<sup>1,11</sup>

Los antibióticos son probablemente los medicamentos que más han transformado la medicina moderna. Estos fármacos: (a) han logrado curar enfermedades que en el pasado eran mortales, (b) han contribuido a aumentar la esperanza de vida, y (c) han permitido manejar las complicaciones infecciosas comunes, que en muchas ocasiones sufren los pacientes vulnerables sometidos a quimioterapia para el tratamiento del cáncer, el trasplante de órganos, diálisis, o cirugía general.<sup>12,13</sup> En todos estos casos, la capacidad de tratar las infecciones secundarias es crucial para la recuperación del paciente.

---

<sup>8</sup> Raviña, E. *The Evolution of Drug Discovery*; Wiley-VCH: Weinheim, 2011.

<sup>9</sup> Brown, E. D.; Wright, G. D. *Nature* **2016**, 529, 336–343.

<sup>10</sup> Lewis, K. *Nature* **2012**, 485, 439–440.

<sup>11</sup> Toth, M.; Antunes, N. T.; Stewart, N. K.; Frase, H.; Bhattacharya, M.; Smith, C. A.; Vakulenko, S. B. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, 12, 9–14.

<sup>12</sup> Pagalilauan, G. L.; Limaye, A. P. *Med. Clin. N. Am.* **2013**, 97, 581–600.

<sup>13</sup> Alós, J. I. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2015**, 33, 692–699.

No obstante, a partir de los años 90 la inversión en I+D en antibióticos por parte de la industria farmacéutica se redujo drásticamente debido a tres factores principales: (a) el gran coste económico que supone sacar un fármaco al mercado; (b) el bajo beneficio económico que se obtiene en el tratamiento de este tipo de enfermedades no crónicas, en comparación con otros más prolongados, como las terapias contra el cáncer o las enfermedades mentales; (c) la falsa creencia de que los antibióticos existentes eran suficientes; y (d) la falta de innovación en su mecanismo de acción.<sup>14,15</sup> Con excepción del Linezolid y la Daptomicina a principios de la década de los 2000, la mayoría de los fármacos que se desarrollaron a partir de entonces fueron modificaciones de los ya existentes, frente a los cuales muchas bacterias ya disponen de mecanismos de resistencia muy eficientes que inactivan su acción.<sup>16,17</sup> Asimismo, los antibióticos en uso clínico inciden sobre un número limitado de procesos esenciales en la bacteria, siendo los principales: (i) la biosíntesis de la pared celular; (ii) la estructura de la membrana celular; (iii) la biosíntesis de las proteínas; (iv) la reparación y replicación del ADN; y (v) la biosíntesis del ácido fólico.<sup>18</sup> Sin embargo, las bacterias cuentan con al menos 300 genes esenciales sobre los cuales dirigir la búsqueda de nuevos fármacos.<sup>19</sup> Todo esto, junto con el mal uso y abuso de los antibióticos durante décadas y la capacidad inherente de las bacterias para desarrollar mecanismos de defensa, desencadenó la aparición de los primeros fenómenos de resistencia bacteriana a los antibióticos al poco tiempo de que comenzaran a emplearse (Figura 1).<sup>20</sup>

<sup>14</sup> (a) O'Brien S. *J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *79*, 168–172. (b) Fernandes, P. *Curr. Opin. Pharm.* **2015**, *24*, 7–11.

<sup>15</sup> Ventola, C. L. *P&T Community* **2015**, *40*, 277–283.

<sup>16</sup> D'Costa, V. M.; King, C. E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W. W. L.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R.; Golding, G. B.; Poinar, H. N.; Wright, G. D. *Nature* **2011**, *477*, 457–461.

<sup>17</sup> Melander, R. J.; Melander, C. *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3*, 559–563.

<sup>18</sup> Lakemeyer, M.; Zhao, W.; Mandl, F. A.; Hammann, P.; Sieber, S. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2–39.

<sup>19</sup> Singh, S. B.; Young, K.; Miesel, L.; *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2011**, *9*, 589–613.

<sup>20</sup> Palumbi, S. R. *Science* **2001**, *293*, 1786–1790.



Figura 1. Cronología del descubrimiento de antibióticos y de la aparición de resistencia.<sup>21</sup>

<sup>21</sup> BIOMÉRIEUX. Commercialization and first detection of resistant bacteria for some classes of antibiotics. <https://amr.biomerieux.com/en/challenges/a-lack-of-antibiotics/>

La resistencia bacteriana a los antibióticos ha experimentado un aumento descomunal en los últimos años, siendo considerada a día de hoy como un problema de salud pública a nivel mundial por las principales agencias internacionales.<sup>22</sup> La creciente aparición y la expansión a nivel mundial de las superbacterias (bacterias resistentes a múltiples fármacos) está poniendo en riesgo la eficacia de los antibióticos actuales.<sup>23,24,25</sup> Así, por ejemplo, en 2017 se describió el primer caso de un paciente en Estados Unidos infectado con una *Enterobacteriaceae* resistente a todo el arsenal de antibióticos disponible.<sup>26</sup> Además, dos años antes, la Organización Mundial de la Salud (OMS) se refería a este problema en los siguientes términos: “un problema tan serio que retará los logros de la medicina moderna. Una era post-antibióticos—en la cual infecciones comunes y pequeñas heridas podrán matar—es una posibilidad muy real para el siglo XXI”.<sup>27</sup>

La resistencia a los antibióticos no solo es relevante para la salud humana, sino que también supone un importante impacto económico para la economía mundial. Un estudio reciente del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) estima que en Europa se producen unas 25.000 muertes al año atribuibles a infecciones causadas por patógenos multirresistentes, y que los gastos extra en costes sanitarios debido a este problema asciende a 1.500 millones de euros.<sup>28</sup> Desafortunadamente las previsiones de la OMS no son optimistas, pues estima que para el año 2050 las muertes a causa de las superbacterias alcanzarán los 10 millones al año, superando a las producidas por cáncer, y que el gasto

---

<sup>22</sup> The White House. National Strategy to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. 2014. <http://www.cdc.gov/drugresistance/federal-engagementin-ar/national-strategy/index.html>.

<sup>23</sup> Gilbert, N. *Nature* **2018**, *555*, S5–S7.

<sup>24</sup> Bengtsson-Palme, J.; Kristiansson, E.; Larsson, D. G. J. *FEMS Microbiol. Rev.* **2018**, *42*, fux053.

<sup>25</sup> Vikesland, P.; Garner, E.; Gupta, S.; Kang, S.; Maile-Moskowitz, A.; Zhu, N. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 4916–4924.

<sup>26</sup> Chen, L.; Todd, R.; Kiehlauch, J.; Walters, M.; Kallen, A. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2017**, *66*, 33.

<sup>27</sup> World Health Organization. Antimicrobial Resistance—Global Report on Surveillance. 2014. <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>

<sup>28</sup> European centre for disease prevention and control (ECDC). The bacterial challenge: time to react. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf).

económico global alcanzará los 100 billones de dólares.<sup>29</sup>

## 1.2 Bacterias de Prioridad Crítica: los Patógenos *ESKAPE*

El impacto de las superbacterias en el ámbito hospitalario es especialmente preocupante, ya que la capacidad para tratar infecciones secundarias derivadas de procedimientos como las cirugías comunes, los trasplantes de órganos, la quimioterapia o la diálisis en pacientes con insuficiencia renal es vital.<sup>30,31</sup> Dentro de estas, resultan particularmente alarmantes las infecciones causadas por los patógenos Gram-negativos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* (patógenos *ESKAPE*), los cuales han sido incluidos en la lista de patógenos prioritarios según la OMS (Tabla 1).<sup>32</sup> Esta lista se elaboró para guiar y promover la I+D de nuevos antibióticos, como parte de las actividades de la OMS para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los agentes antimicrobianos. Muchos de estos patógenos son resistentes a los carbapenems, los antibióticos de último recurso.<sup>33</sup>

---

<sup>29</sup> Thayer, A. M. *Chem. Eng. News*. **2016**, *94*, 36–43.

<sup>30</sup> González-Bello, C.; Rodríguez, D.; Pernas, M.; Rodríguez, A.; Colchón, E. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 1859–1881.

<sup>31</sup> Goff, D. A.; Kullar, R.; Goldstein, E. J.; Gilchrist, M.; Nathwani, D.; Cheng, A. C.; Cairns, K. A.; Escandon-Vargas, K.; Villegas, M. V.; Brink, A.; van den Bergh, D.; Mendelson, M. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 56–63.

<sup>32</sup> WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1).

<sup>33</sup> González-Bello, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4221–4228.

**Tabla 1.** Lista global de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo según la OMS

Prioridad	Patógeno
<b>Crítica</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i> , resistente a los carbapenems <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , resistente a los carbapenems <i>Enterobacteriaceae</i> , <sup>a</sup> resistente a los carbapenems, resistente a las cefalosporinas de 3ª generación
<b>Elevada</b>	<i>Enterococcus faecium</i> , resistente a la vancomicina <i>Staphylococcus aureus</i> , resistente a la meticilina, resistente a la vancomicina <i>Helicobacter pylori</i> , resistente a la claritromicina <i>Campylobacter</i> , resistente a las fluoroquinolonas <i>Salmonella</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , resistente a las cefalosporinas de 3ª generación, resistente a las fluoroquinolonas
<b>Media</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , no susceptible a la penicilina <i>Haemophilus influenzae</i> , resistente a la ampicilina <i>Shigella</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas

<sup>a</sup> Incluye *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. y *Morganella* spp.

El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en los hospitales, las residencias de la tercera edad y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. En concreto: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y varias enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.

*A. baumannii* es una bacteria Gram-negativa muy extendida en los quirófanos y unidades de cuidados intensivos de hospitales de todo el mundo. La gran capacidad con la que cuenta para adquirir resistencia ha hecho que pasara de tener escasa relevancia clínica a principios de siglo, a ser el patógeno oportunista más relevante. Así, en el año 2017 más del 70% de las cepas aisladas eran resistentes a múltiples fármacos.<sup>34</sup> Esto hace que *A. baumannii* esté relacionada con un incremento en las complicaciones por infecciones nosocomiales secundarias y por tanto, con un

<sup>34</sup> Moya, B.; Barcelo, I. M.; Bhagwat, M. P.; Bou, G.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01238–17.

aumento en los costes asociados.<sup>35</sup> Los primeros signos de resistencia al imipenem se descubrieron en *A. baumannii*, llegando a encontrarse cepas con resistencia a todos los antibióticos disponibles.<sup>36</sup> Además, al igual que la gran mayoría de los patógenos Gram-negativos, es muy resistente a las condiciones ambientales, llegando a sobrevivir más de cinco meses fuera de organismos vivos, lo que dificulta su erradicación de estas áreas.<sup>37</sup>

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria anaerobia capaz de sobrevivir, por ejemplo, en las condiciones microaeróbicas que se dan en la flema presente en los pulmones de pacientes con fibrosis quística. Se encuentra ampliamente dispersa en el ambiente hospitalario y es la principal causa de las infecciones nosocomiales del aparato respiratorio causadas por bacterias Gram-negativas en pacientes inmunodeprimidos. Es un organismo oportunista y está estrechamente ligada a pacientes con fibrosis quística, pacientes oncológicos o de las unidades de quemados.<sup>38</sup> Se han hallado cepas de *P. aeruginosa* resistentes a la gran mayoría de los antibióticos, incluyendo los carbapenems.<sup>39</sup> Las porinas de su membrana externa poseen un límite de exclusión de 500 Da, por lo que la mayor parte de los agentes antimicrobianos no pueden atravesarla, lo que la convierte en una bacteria con una resistencia inherente a un amplio rango de agentes antimicrobianos.<sup>40</sup>

*Klebsiella pneumoniae* es una enterobacteria oportunista habitual de la microbiota intestinal, en la que su función es beneficiosa, que sin embargo se vuelve patógena al entrar en contacto con el torrente sanguíneo o con el aparato respiratorio. La *Klebsiella pneumoniae* multirresistente es la causante de las infecciones nosocomiales del tracto urinario, del tracto respiratorio, pulmón y

---

<sup>35</sup> Vázquez-Ucha, C.; Martínez-Gutián, M.; Maneiro, M.; Conde-Pérez, K.; Álvarez-Fraga, L.; Torrens, G.; Oliver, A.; Buynak, J.; Bonomo, R. A.; Bou, G.; González-Bello, C.; Poza, M.; Beceiro, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01092-19.

<sup>36</sup> (a) Vila, J.; Martí, S.; Sánchez-Céspedes, J. J. *Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 1210–1215. (b) Peleg, A.Y.; Seifert, H.; Paterson, D. L. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 538–582.

<sup>37</sup> Kramer, A.; Schwebke, I.; Kampf, G. *BMC Infect. Dis.* **2006**, *6*:130.

<sup>38</sup> Pendleton, J. N.; Gorman, S. P.; Gilmore, B. F. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2013**, *11*, 297–308.

<sup>39</sup> Wolter, D. J.; Lister, P. D. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 209–222.

<sup>40</sup> Nikaido, H. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 593–656.

sistema circulatorio en pacientes neonatos y de edad avanzada con un sistema inmunitario deficiente.<sup>41</sup>

### 1.3 Principales Mecanismos de Resistencia Bacteriana a los Antibióticos

Los principales mecanismos de la resistencia bacteriana a los antibióticos son cuatro (Figura 2):<sup>33,42</sup>

- a) *Reducción de la permeabilidad de la membrana externa* mediante la regulación de las porinas, a través del reemplazo de estas por canales más selectivos o modificaciones moleculares de la misma. Es un proceso especialmente importante en el caso de las bacterias Gram-negativas, ya que el antibiótico debe penetrar la membrana externa para alcanzar la diana.<sup>43</sup> Es un mecanismo de resistencia a múltiples fármacos en *E. aerogenes* y otros patógenos de la familia *Enterobacteriaceae*.<sup>44</sup>
- b) *Activación de las bombas de expulsión* por medio de la movilización de las proteínas transportadoras de membrana que excretan los antibióticos al medio. Este mecanismo es relevante en organismos multirresistentes a las  $\beta$ -lactamas, los macrólidos, las fluoroquinolonas, las tetraciclinas y los aminoglicósidos.<sup>45</sup> Esta herramienta es particularmente relevante en *P. aeruginosa* puesto que cuenta con un sofisticado sistema regulatorio que la capacita para detectar cambios en el entorno, incluyendo la presencia de antibióticos, y responder incrementando la expresión de las bombas de expulsión.<sup>46</sup>

<sup>41</sup> Chung, P. Y. *FEMS Microbiol. Lett.* **2016**, *363*, fnw219.

<sup>42</sup> Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *3*, 42–51.

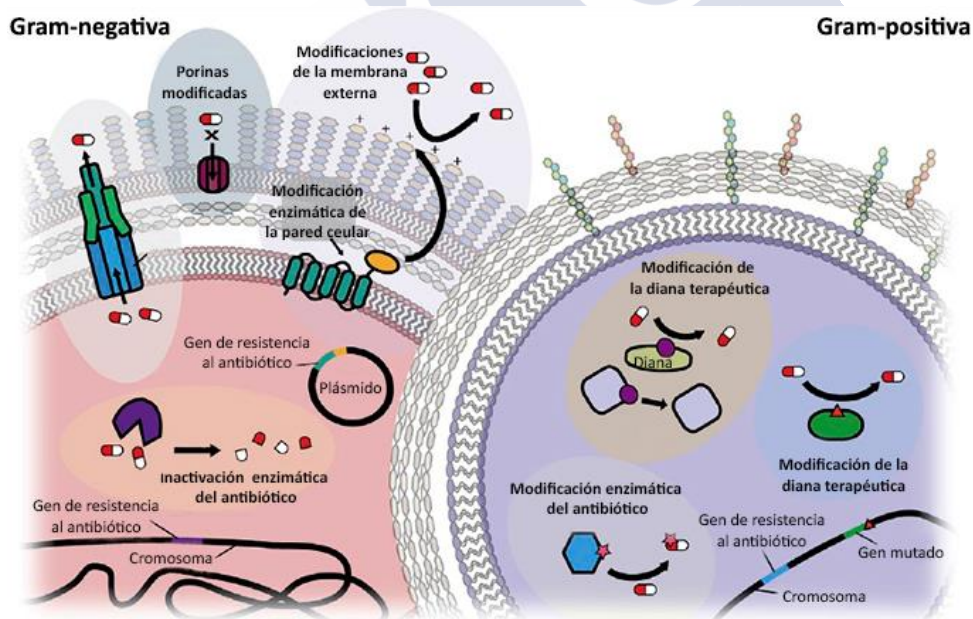
<sup>43</sup> James, C. E.; Mahendran, K. R.; Molitor, A.; Bolla, J. M.; Bessonov, A. N.; Winterhalter, M.; Pagès, J. M. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5453.

<sup>44</sup> Guitor, A. K.; Wright, G. D. *CHEST* **2018**, *154*, 1202–1212.

<sup>45</sup> Piddock, L. J. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 382–402.

<sup>46</sup> Clark, S. T.; Guttman, D. S.; Hwang, D. M. *FEMS Microbiol. Lett.* **2018**, *365*, fny026.

- c) *Inactivación enzimática del antibiótico* mediante su degradación, convirtiéndolo en una sustancia inocua para la bacteria. El ejemplo más significativo son las  $\beta$ -lactamasas, enzimas derivadas de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP del término en inglés Penicillin-Binding Protein) que hidrolizan el núcleo  $\beta$ -lactámico de las penicilinas, cefalosporinas y los carbapenems. Son la principal causa de resistencia a los antibióticos en las bacterias Gram-negativas.<sup>47</sup>
- d) *Modificación de la diana terapéutica*, lo que causa una pérdida de afinidad del fármaco por el objetivo biológico.<sup>48</sup> Ejemplos significativos son las reacciones de metilación de residuos o mutaciones en el ARN ribosómico 16S o 23S, implicadas en la resistencia a muchos antibióticos como los aminoglucósidos, los macrólidos y el linezolid.<sup>49</sup>



**Figura 2.** Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.<sup>44</sup>

<sup>47</sup> Bush K. J. *Infect. Chemother.* **2013**, *19*, 549–559.

<sup>48</sup> Walsh, C.; Wencewicz, T. *Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities*; ASM Press: Washington DC, 2016.

<sup>49</sup> Wilson, D. N. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 35–48.

Las bacterias no solo adquieren resistencia por transferencia vertical (división celular), sino que también la pueden transmitir de unas a otras por transferencia horizontal, a través de plásmidos que pueden ser propagados entre la población bacteriana, o incluso a través de los virus bacteriófagos (Figura 2).<sup>50</sup> Una vez una determinada población bacteriana ha adquirido resistencia a un antibiótico, un tratamiento posterior con ese antibiótico solamente eliminará a las bacterias susceptibles, lo cual conduce a que la población resistente prospere, dando lugar a infecciones recurrentes.<sup>44</sup> Por consiguiente, la continuidad de terapias antibióticas efectivas requerirá, además de importantes mejoras en la prescripción facultativa, el desarrollo de: (1) nuevos antibióticos que reemplacen los que se quedaron obsoletos; y/o (2) terapias destinadas a prolongar la vida útil de los antibióticos actuales.<sup>17</sup> En este último caso se trata de antibióticos adyuvantes, compuestos sin capacidad de matar a la bacteria pero que, coadministrados con el antibiótico, restauran su acción. El uso de antibióticos adyuvantes tiene dos grandes ventajas: (i) permite recuperar la eficacia del amplio arsenal de antibióticos disponibles, que han demostrado ser seguros y efectivos durante décadas; y (ii) evita tener que dedicar grandes esfuerzos al costoso y complejo reto de la identificación y validación de nuevas dianas terapéuticas.<sup>30</sup> *En relación a esta última opción se han desarrollado tres tipos de antibióticos adyuvantes:*<sup>51</sup>

- a) *Permeabilizadores de membrana:* se trata de compuestos que alteran la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas facilitando la internalización. Causan un efecto similar al de un detergente, gracias a que atrapan los cationes divalentes que neutralizan y/o alteran la carga negativa de la membrana asociándose a ella (en el caso de permeabilizadores con una carga catiónica neta). Además de facilitar la entrada de antibióticos, las alteraciones producidas en algunos casos pueden

<sup>50</sup> Thomas, C. M.; Nielsen, K. M. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 711–721.

<sup>51</sup> Laws, M.; Shaaban, A.; Rahman, K. M. *FEMS Microbiol. Rev.* **2019**, *43*, 490–516.

ser suficientes para causar la lisis de la bacteria y tener, por tanto, actividad antibacteriana.<sup>52</sup>

- b) *Inhibidores de las bombas de expulsión*: consiste en la obstrucción física de las bombas de expulsión por competición con el antibiótico, tanto mediante productos naturales<sup>53</sup> como sintéticos.<sup>54</sup> Los compuestos desarrollados hasta la fecha no son muy eficientes, y en algunos casos son incluso tóxicos, por lo que a día de hoy aún no ha sido aprobado ninguno para su uso en clínica.<sup>51</sup>
- c) *Inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas*: son los antibióticos adyuvantes más utilizados en clínica para combatir la resistencia bacteriana a los antibióticos más utilizados, los  $\beta$ -lactámicos.<sup>55</sup> Se trata de sustratos suicidas que se unen irreversiblemente a los enzimas que hidrolizan este tipo de fármacos, las  $\beta$ -lactamasas. Hoy en día, esta terapia combinada es la más efectiva para hacer frente a las infecciones causadas por los patógenos prioritarios identificados por la OMS, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*.<sup>33</sup>

#### 1.4 Los Antibióticos $\beta$ -Lactámicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos suponen casi el 70% del total de agentes antibacterianos en uso clínico (Figura 3).<sup>11</sup> Esto se debe a que se trata de fármacos seguros y muy eficaces, bien tolerados por la mayoría de los pacientes, siendo por lo general mínimos los casos de reacciones alérgicas.<sup>5</sup>

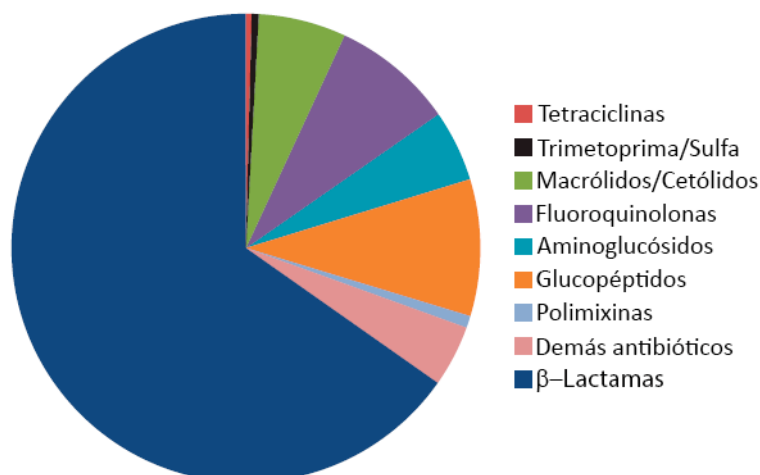
---

<sup>52</sup> Zabawa, T. P.; Pucci, M. J.; Parr, T. R. Jr.; Lister, T. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *33*, 7–12.

<sup>53</sup> Stavri, M.; Piddock, L. J.; Gibbons, S. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 1247–1260.

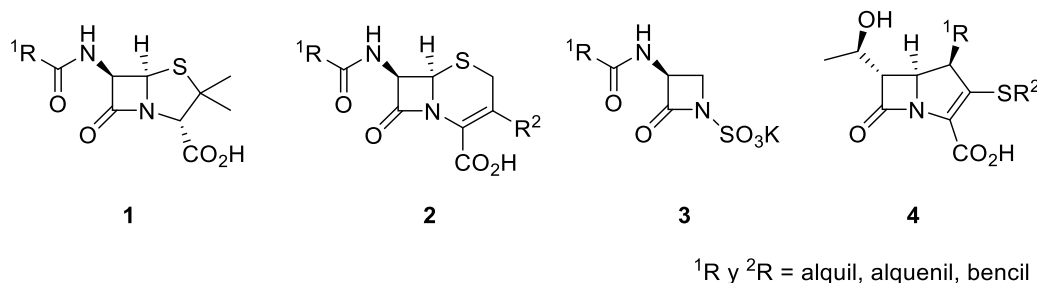
<sup>54</sup> Mahmood, H. Y.; Jamshidi, S.; Sutton, J. M.; Rahman, K. M. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 1062–1081.

<sup>55</sup> Drawz, S. M.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 1835–1846.



**Figura 3.** Proporción de prescripciones de antibióticos inyectables en Estados Unidos en el periodo 2004–2014. El porcentaje de unidades estándar para cada antibiótico inyectable es: β-lactamas, 65.24%; glucopéptidos, 9%; fluoroquinolonas, 8%; macrólidos/cetólidos, 6%; aminoglucósidos, 5%; polimixinas, 1%; trimetoprima/sulfametoxazol, 0.5%; tetraciclinas (excepto tigeciclina), 0.4%; resto de antibióticos (incluyendo daptomicina, linezolid y tigeciclina), 4.21%. Datos extraídos de IMS MDART Quarterly Database, AstraZeneca.

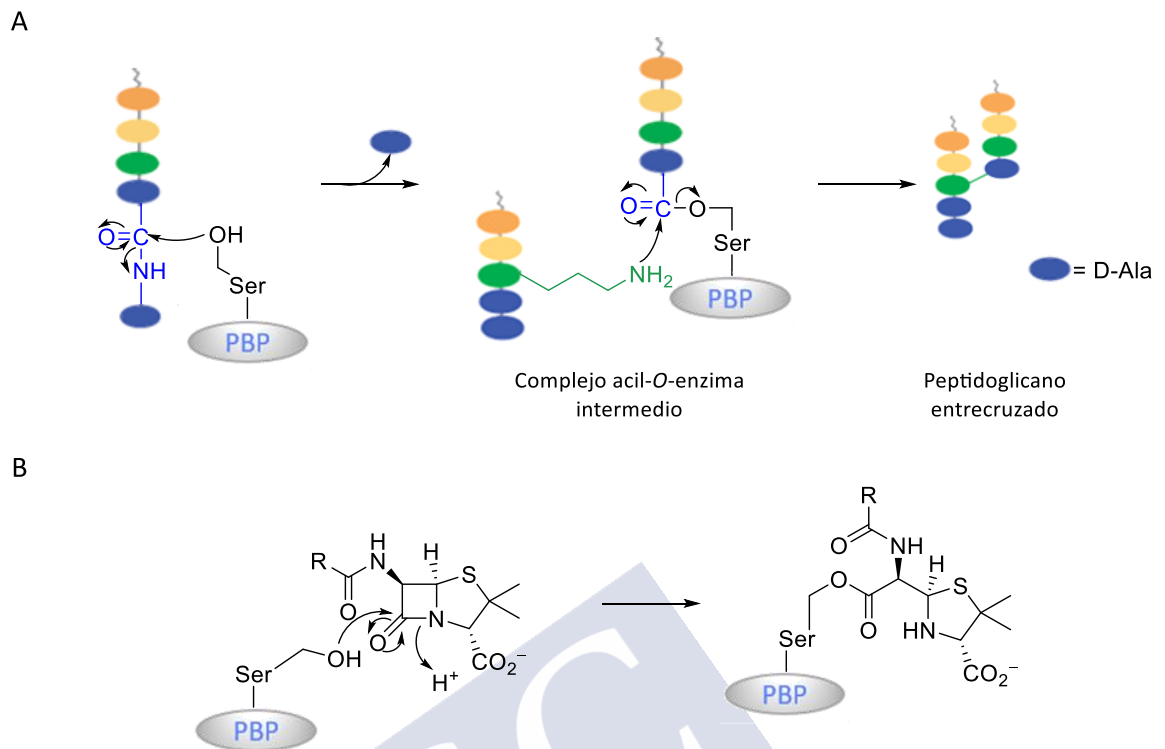
Los antibióticos β-lactámicos descubiertos y desarrollados hasta la fecha se clasifican en penicilinas (Fleming, 1928), cefalosporinas (Brotzu, 1945), carbapenems (Kahan y colaboradores, 1979) y monobactamas (Sykes y colaboradores, 1981) (Figura 4). La actividad antibiótica de las β-lactamas reside en la labilidad del anillo β-lactámico, que se debe principalmente a tres factores: (i) la tensión angular del grupo carbonílico; (ii) la tensión torsional de los sustituyentes eclipsados del anillo; y (iii) la falta de estabilización por resonancia del par electrónico libre del átomo de nitrógeno presente en las amidas lineales.<sup>56</sup>



**Figura 4.** Estructura general de las penicilinas **1**, las cefalosporinas **2**, las monobactamas **3** y los carbapenems **4**.

<sup>56</sup> Corey, E. J.; Czakó, B.; Kürti, L. *Molecules and medicine*; Wiley: New Jersey, 2008.

El modo de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos consiste en la inhibición del crecimiento de la pared bacteriana, esencial para la supervivencia tanto de las bacterias Gram-positivas como de las Gram-negativas, pero de la que carecen las eucariotas. La pared bacteriana consiste en copolímeros péptido-azúcar (peptidoglicano) entrecruzado. Las penicilinas actúan en la etapa de entrecruzamiento que sufre el peptidoglicano en el proceso de síntesis de la pared celular que le confiere rigidez a dicha estructura, y cuyo proceso lo cataliza una transpeptidasa. La penicilina se une covalentemente al centro activo de la transpeptidasa, impidiendo así que realice su función. En concreto, el grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo de serina reacciona con el residuo de D-Ala de la cadena lateral del pentapéptido unido a una cadena de polisacárido, para dar un acil-enzima intermedio. A continuación, dicho intermedio es atacado por la cadena lateral de la pentaglicina unida a otro polisacárido. El resultado de este proceso es una red de peptidoglicano formado por polisacáridos constituidos por unidades de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico alternadas, unidos mediante cadenas peptídicas.<sup>1</sup> La similitud estructural entre la D-Ala-D-Ala de la unidad de dipéptido en el extremo carboxi terminal del pentapéptido y las  $\beta$ -lactamas, una vez unidas covalentemente al residuo de serina, hace que sean buenos inhibidores suicidas de las PBPs. Con ello se bloquea la primera etapa del entrecruzamiento y, en consecuencia, se inhibe el proceso de transpeptidación (Esquema 1).



**Esquema 1.** A) Mecanismo de entrecruzamiento del peptidoglicano catalizado por PBPs.<sup>1</sup> B) Mecanismo de la unión covalente de las penicilinas a las PBPs.<sup>4</sup>

Es importante destacar que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son agentes bactericidas, ya que no solo inhiben la formación de la pared celular bacteriana, sino que afectan también a la de las células maduras. Esto es así porque la pared celular es una estructura que se regenera en la bacteria, siendo necesario un equilibrio entre la síntesis del peptidoglicano, catalizada por las PBPs, y su hidrólisis, catalizada por las hidrolasas de mureína. De ahí que la inhibición de la síntesis de peptidoglicano por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, mientras que las hidrolasas de mureína siguen su actividad normal, altera ese balance natural, y el resultado neto es que la pared celular se vuelve frágil por degradación de la capa de peptidoglicano, lo que desencadena la muerte de la bacteria.<sup>57</sup>

## 1.5 Los Enzimas $\beta$ -Lactamasas

Las  $\beta$ -lactamasas (EC 3.5.2.6) son los enzimas responsables del principal

<sup>57</sup> Pankey, G. A.; Sabath, L. D. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *38*, 864–870.

mecanismo de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en patógenos Gram-negativos, mediante la hidrólisis de su anillo  $\beta$ -lactámico en un proceso de acilación-desacilación.<sup>58,59</sup> Las  $\beta$ -lactamasas se clasifican en cuatro clases, tres de ellas son serina-hidrolasas (clases A, C y D), mientras que las de clase B son metalo-enzimas dependientes de cinc.<sup>60,30</sup>

Las serina- $\beta$ -lactamasas hidrolizan las  $\beta$ -lactamas mediante un mecanismo de catálisis covalente en varias etapas (Esquema 2A). El proceso se inicia con la desprotonación de la serina catalítica por un residuo que actúa como base general (normalmente una lisina carboxilada o un glutamato), desencadenado el ataque al grupo carbonilo de la lactama. Esto da lugar al intermedio tetraédrico **IT1**, que es estabilizado por varios enlaces de hidrógeno con los grupos NH de residuos de la base del centro activo (hueco oxianiónico), que a continuación sufre una apertura del anillo  $\beta$ -lactámico con eliminación del grupo saliente. El aducto generado **I** es hidrolizado finalmente por una molécula de agua con la asistencia de un residuo del centro activo actuando como base general. Este proceso conduce a la inactivación del antibiótico y la  $\beta$ -lactamasa libre, la cual puede seguir hidrolizando más antibiótico.<sup>30</sup>

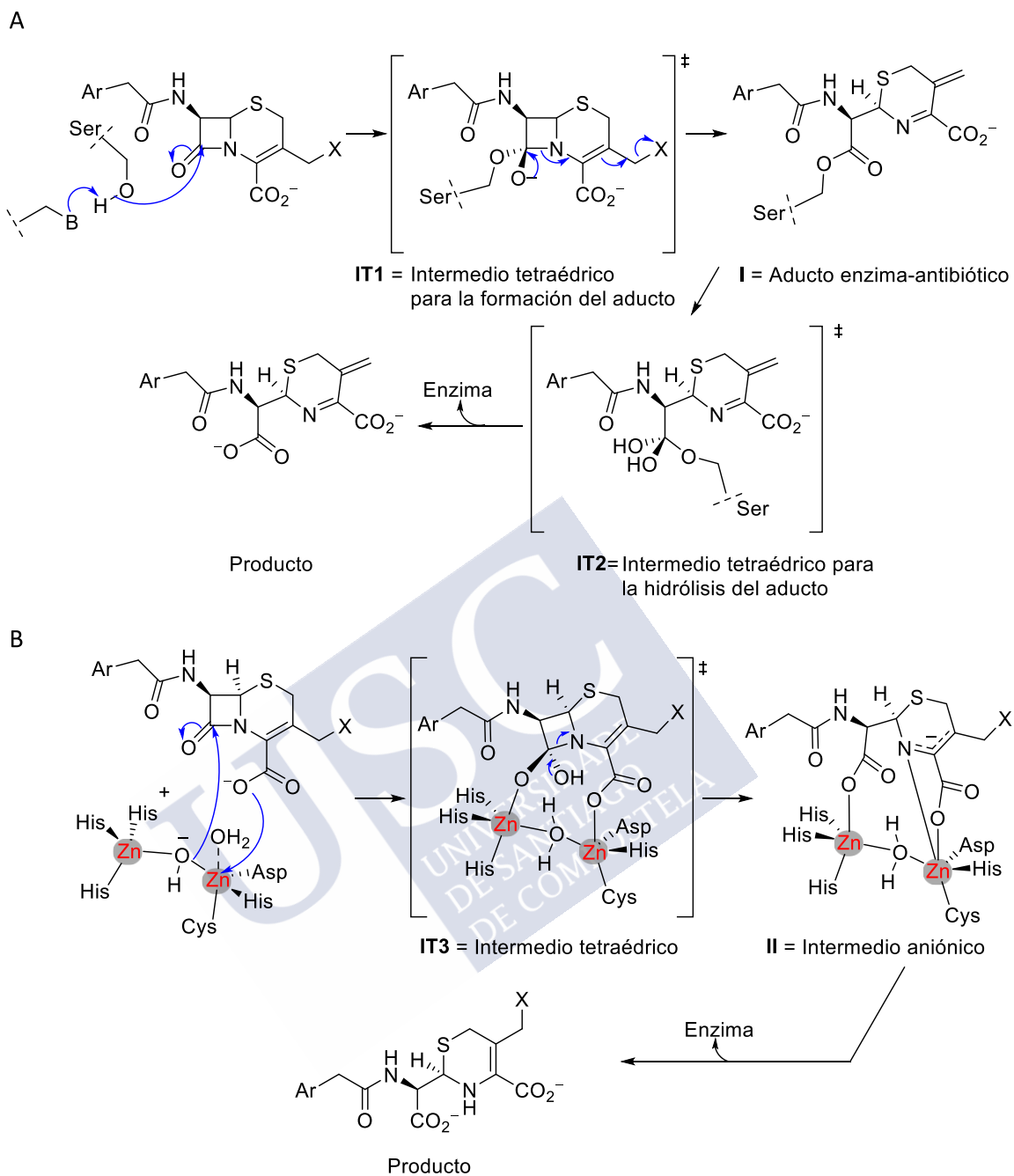
Por otra parte, a diferencia de las serina- $\beta$ -lactamasas, en la inactivación de antibióticos catalizada por las  $\beta$ -lactamasas de clase B no se produce la formación de un aducto enzima-antibiótico, sino que tiene lugar una reacción de hidrólisis mediante un grupo hidroxilo estabilizado por uno o dos iones  $Zn^{2+}$  (Esquema 2B).

---

<sup>58</sup> Vázquez-Ucha, J. C.; Maneiro, M.; Martínez-Gutián, M.; Buynak, J.; Bethel, R. C.; Bonomo, R. A.; Bou, G.; Poza, M.; González-Bello, C.; Beceiro, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01172–17.

<sup>59</sup> Bush, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01076–18.

<sup>60</sup> Massova, I.; Mobashery, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1–17.



**Esquema 2.** Mecanismo general de inactivación de las cefalosporinas catalizada por las serina- $\beta$ -lactamasas (A) y las metalo- $\beta$ -lactamasas (B). Es de destacar que la gran similitud estructural de los intermedios tetraédricos IT1 e IT3. X = grupo saliente.<sup>30</sup>

La gran capacidad de las bacterias para desarrollar mecanismos de resistencia ha dotado a estos patógenos de un inmenso arsenal de  $\beta$ -lactamasas muy diversas y

sofisticadas (4940 identificadas hasta abril de 2020),<sup>61</sup> cada una de ellas especialista en hidrolizar uno o varios tipos de antibióticos (Tabla 2). Además, tal y como veremos a continuación, no todas están presentes en todas las bacterias, ya que cada especie ha evolucionado para expresar unas determinadas  $\beta$ -lactamasas. De ahí que resulte fundamental conocer qué enzima expresa cada uno de los patógenos prioritarios para la elección del tratamiento más apropiado.

**Tabla 2.** Clasificación de los enzimas  $\beta$ -lactamasas.<sup>30</sup>

Clase	Sustratos	Ejemplos más relevantes
A (serina- $\beta$ -lactamasas de actividad diversa)	Penicilinas	Penicilinasas procedentes de bacterias Gram positivas
	Penicilinas y cefalosporinas de espectro reducido	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	Penicilinas, cefalosporinas de reducido y amplio espectro	SHV-2, TEM-10, CTX-M, GES-1
	Penicilinas	TEM-30, SHV-72
	Penicilinas y carbenicilina	PSE
	Penicilinas, cefalosporinas y carbapenems	KPC, SME, NMC-A, GES-2
B (metalo- $\beta$ -lactamasas)	$\beta$ -lactamas, incluyendo carbapenems, con excepción de las monobactamas	IMP, VIM, NDM
C (serina-cefalosporinasas)	Cefalosporinas	AmpC, CMY, ACT-1, DHA
D (serina-oxacilinasas)	Penicilinas y cloxacilina. Muchas hidrolizan cefalosporinas, también de amplio espectro, y/o carbapenems	OXA-1/30, OXA-10, OXA-23, OXA-24/40, OXA-48

### 1.5.1 Las $\beta$ -Lactamasas de Clase A

Dentro de las serina- $\beta$ -lactamasas, las de clase A son el grupo más numeroso (1575 del total en abril de 2020) y representan un grupo bastante diverso respecto al tipo de sustrato que son capaces de hidrolizar.<sup>30,61</sup> La mayor parte de las  $\beta$ -

<sup>61</sup> Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R. A.; Dabos, M. L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P.; Iorga, B. I., Beta-Lactamase DataBase (BLDB) – Structure and Function. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 917–919 <http://www.bldb.eu/>.

lactamasas de clase A son muy eficientes hidrolizando bencilpenicilina y ampicilina, por lo que en un primer momento estos enzimas eran conocidos como penicilinasas. Pero además, todas las hidrolasas de este grupo son capaces de inactivar penicilinas y cefalosporinas de espectro reducido.<sup>62</sup> Dos enzimas de clase A típicamente expresados por las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* son TEM-1 y SHV-1,  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBLs del término en inglés *Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases*) codificadas por plásmidos. Antes de la aparición de las ESBLs, TEM-1 era la principal causa de resistencia a la ampicilina en *E. coli* y continúa siendo el mayor foco de resistencia a la penicilina en *N. gonorrhoeae*. Por su parte, SHV-1 es la causante de la resistencia a la ampicilina en *K. pneumoniae* y su sobreexpresión se asocia a la resistencia a cefalosporinas y a combinaciones antibiótico-inhibidor.<sup>63</sup> Desgraciadamente, un simple cambio del residuo Gly238 por serina, alanina o aspártico pronto dio lugar a la aparición de las primeras  $\beta$ -lactamasas tipo TEM y SHV de espectro extendido.<sup>63</sup> De entre las  $\beta$ -lactamasas de clase A, las EBLs son capaces de hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro (como la cefotaxima, la ceftazidima o la cefepima) y monobactamas (aztreonam).<sup>64,65</sup> En la última década el número de variantes de ESBLs tipo TEM y SHV detectadas se ha visto superado por las CTX-M de espectro extendido. Estas últimas contribuyen de forma muy destacada al perfil resistente a múltiples fármacos de los patógenos *E. coli* y *K. pneumoniae*, además de en otros patógenos de la misma familia, tales como *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Citrobacter fremundii*, *Enterobacter pp.* y *Serratia marcescens*.<sup>59,63</sup>

Dentro de las  $\beta$ -lactamasas de clase A también se han identificado carbapenemasas que son la mayor causa de resistencia a los carbapenems en los

<sup>62</sup> Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 1211–1233.

<sup>63</sup> Bush, K.; Bradford, P. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 295–306.

<sup>64</sup> Cantón, R.; González-Alba, J. M.; Galán, J. C. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 1–19.

<sup>65</sup> Piccirilli, A.; Perilli, M.; Amicosante, G.; Conte, V.; Tascini, C.; Rossolini, G. M.; Giani, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e00688-18.

patógenos *Enterobacteriaceae* (como por ejemplo *E. coli* y *K. pneumoniae*).<sup>66</sup> Pertenecen a este tipo las KPC (del término en inglés *K. pneumoniae carbapenemase*), SME (del término en inglés *Serratia marcescens enzyme*), NMC-A e IMI (enzimas cromosómicas de *E. cloacae*) y algunas variantes de GES (del término en inglés *Guiana extended-spectrum beta-lactamase*).<sup>30,67</sup> Los enzimas KPC se detectaron también en *Acinetobacter spp* y en *P. aeruginosa*, siendo las variantes KPC-2 y KPC-3 las serina-carbapenemasas más dispersas en todo el mundo.<sup>63</sup>

### 1.5.2 Las $\beta$ -Lactamasas de Clase C

Unos de los enzimas más representativos de este grupo son las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas AmpC, capaces de hidrolizar cefalosporinas, incluidas las de amplio espectro (ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona), y cefamicinas (cefexitina).<sup>30</sup> Se encuentran ampliamente distribuidas a nivel cromosómico en los patógenos *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*, siendo responsables de su resistencia innata a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.<sup>59</sup> Los patógenos prioritarios poseen genes cromosómicos que codifican para las AmpC, que en condiciones normales se expresan en muy bajos niveles, pero que se pueden sobreexpresar, y en consecuencia disparar la producción de AmpC, como resultado de una mutación o por inducción tras una exposición a los antibióticos.<sup>68</sup> En el caso de *P. aeruginosa*, la AmpC cromosómica característica de esta especie es la PDC (del término en inglés *Pseudomonas-derived cephalosporinase*).<sup>69,70</sup> Este enzima contribuye a la resistencia natural del microorganismo a las aminopenicilinas y cefalosporinas de 1ª y 2ª generación. En cepas donde este enzima está sobreexpresado debido a las mutaciones que alteran el proceso de reciclaje del peptidoglicano, las PDCs se

---

<sup>66</sup> Walther-Rasmussen, J.; Hoiby, N. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 470–482.

<sup>67</sup> Piccirilli, A.; Mercuri, P. S.; Galleni, M.; Aschi, M.; Matagne, A.; Amicosante, G.; Perilli, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01851-17.

<sup>68</sup> Juan, C.; Torrens, G.; González-Nicolau, M.; Oliver, A. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 781–815.

<sup>69</sup> Tian, G. B.; Adams-Haduch, J. M.; Bogdanovich, T.; Wang, H. N.; Doi, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 2710–2713.

<sup>70</sup> Cho, H. H.; Kwon, G. C.; Kim, S.; Koo, S. H. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *25*, 1154–1162.

convierten en la mayor causa de resistencia a los fármacos antipseudomónicos, es decir, penicilinas (ticarcilina y piperacilina), monobactamas (aztreonam) o cefalosporinas de 3ª y 4ª generación (ceftazidima y cefepima).<sup>71</sup> En el año 2018 ya se describieron cepas de *P. aeruginosa* resistentes al ceftolozano, la cefalosporina de 5ª generación aprobada en 2014 en combinación con tazobactam, una combinación activa hasta el momento frente a *P. aeruginosa* resistente a las combinaciones ceftazidima, carbapenems y piperacilina-tazobactam.<sup>72</sup>

Otras  $\beta$ -lactamasas de clase C de gran relevancia clínica muy habituales en *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*, que a diferencia de las anteriores se han adquirido a través de un plásmido, son CMY, FOX y DHA.<sup>73</sup> Estas enzimas también son capaces de hidrolizar cefalosporinas, incluidas las de amplio espectro, y se caracterizan además por inactivar muy rápidamente a las cefamicinas. Desafortunadamente, ya se han detectado los primeros casos de resistencia a carbapenems en aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *Salmonella enterica* por combinación de la sobreexpresión de  $\beta$ -lactamasas de clase C codificadas por plásmidos, con la reducción de la permeabilidad de membrana a través del déficit de porinas.<sup>59,63,74</sup>

### 1.5.3 Las $\beta$ -Lactamasas de Clase D

Estos enzimas, también llamados oxacilinasas (OXAs) por la mayor capacidad para hidrolizar la oxacilina en comparación con otras penicilinas, son las  $\beta$ -lactamasas de crecimiento más rápido (más de 900 descritos en 2019) y las más diversas en cuanto a secuencia.<sup>61</sup> Se dividen en tres categorías basándose en el

<sup>71</sup> Berrazeg, M.; Jeannot, K.; Ntsogo, V. Y.; Broutin, I.; Loeffert, S.; Fournier, D.; Plésiat, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 6248–6255.

<sup>72</sup> Barnes, M. D.; Taracila, M. A.; Rutter, J. D.; Bethel, C. R.; Galdadas, I.; Hujer, A. M.; Caselli, E.; Prati, F.; Dekker, J. P.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. *mBio* **2018**, *9*, e02085-18.

<sup>73</sup> Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E. C.; Colenso, C. K.; Hirvonen, V. H. A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J. J. *Mol. Biol.* **2019**, *431*, 3472–3500.

<sup>74</sup> Cao, V. T.; Arlet, G.; Ericsson, B. M.; Tammelin, A.; Courvalin, P.; Lambert, T. J. *Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 895–900.

sustrato al que son capaces de hidrolizar: (i) enzimas de espectro reducido como la OXA-1 o la OXA-10; (ii)  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBLs) como la OXA-13 o la OXA-17; y (iii) las carbapenemasas de tipo D (CHDLs) como la OXA-23, la OXA-24/40 y la OXA-48. Las CHDLs se clasifican a su vez seis familias en base a su secuencia de aminoácidos: OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143, OXA-235 y OXA-51.<sup>54</sup> Hasta hace una década las  $\beta$ -lactamasas que más inconvenientes ocasionaban en clínica eran las ESBLs y las AmpC, carentes de capacidad para hidrolizar los carbapenems. Pero lamentablemente, desde la identificación de la OXA-23 procedente de *A. baumannii* (Escocia, 1995), la primera carbapenemasa tipo OXA descrita, este grupo no ha parado de crecer.<sup>75</sup> En los últimos años la rápida expansión de las CHDLs en patógenos Gram-negativos del ámbito hospitalario, tales como *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* y sobre todo *A. baumannii*, se ha convertido en uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial.<sup>54,76</sup> A día de hoy las CHDLs más problemáticas en clínica son:

- i) OXA-23 y OXA-24/40: son las fuentes principales de resistencia a los carbapenems en los patógenos Gram-negativos prioritarios, especialmente en *A. baumannii*, siendo la OXA-23 la más frecuente.<sup>77,78,79</sup>
- ii) OXA 48: se encuentra ampliamente extendida en las *Enterobacteriaceae*, especialmente en *K. pneumoniae* y *E. coli*. Es probablemente a día de hoy la carbapenemasa responsable de la mayor parte de las infecciones nosocomiales multirresistentes, siendo la más detectada en Francia, Bélgica y Malta.<sup>80,81</sup>

---

<sup>75</sup> Scaife, W.; Young, H. K.; Paton, R. H.; Amyes, G. B. J. *Antimicrob. Chemother.* **1995**, *36*, 585–587.

<sup>76</sup> Schneider, K. D.; Ortega, C. J.; Renck, N. A.; Bonomo, R. A.; Powers, R. A.; Leonard, D. A. *J. Mol. Biol.* **2011**, *406*, 583–594.

<sup>77</sup> Perilli, M.; Sabatini, A.; Pontieri, E.; Celenza, G.; Segatore, B.; Bottoni, C.; Bellio, P.; Mancini, A.; Marcocchia, F.; Brisdelli, F.; Amicosante, G. *Microb. Drug Resist.* **2015**, *21*, 97–101.

<sup>78</sup> Mugnier, P.D.; Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 35–40.

<sup>79</sup> Staude, M. W.; Leonard, D. A.; Peng, J. W. *Biochemistry* **2016**, *55*, 6535–6544.

<sup>80</sup> Dortet, L.; Cuzon, G.; Nordmann, P. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 623–627.

<sup>81</sup> Glasner, C.; Albiger, B.; Buist G et al. *Euro Surveill.* **2013**, *18*, pii:20525.

iii) OXA-51: son las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas responsables de la resistencia intrínseca de *A. baumannii*.<sup>82</sup>

A pesar de la gran diversidad en su secuencia de aminoácidos, las CHDLs presentan una gran similitud estructural, observándose para todas ellas un bucle  $\Omega$  próximo a un centro activo altamente conservado y compuesto por dos dominios separados entre sí por una hendidura (Figura 5A).<sup>35</sup> Este último se caracteriza por su marcado carácter hidrofóbico en comparación con el de otras  $\beta$ -lactamasas. Es notable, por ejemplo, la sustitución de una casi generalizada asparagina iniciadora de la catálisis en las  $\beta$ -lactamasas de clase A y C (Asn132 en TEM-1 y Asn152 en AmpC), por una valina (Val120), isoleucina o algunas veces una leucina en las hidrolasas de tipo D, el cual permite la reducción del pKa de un residuo de lisina próximo, favoreciendo la formación del carbamato clave en su mecanismo (Figura 6).<sup>83,84</sup> Este mayor carácter hidrofóbico de su centro activo es el responsable de la capacidad de las CHDLs para hidrolizar a los carbapenems. Así, en CHDLs como la OXA-23 y la OXA-24/40, la existencia de un puente hidrofóbico formado por las cadenas laterales de una tirosina o fenilalanina y una metionina, que no experimenta cambios conformacionales significativos durante la catálisis, aumenta su afinidad por el sustrato, estableciendo interacciones apolares con la cadena lateral en posición C3 de los carbapenems, y manteniéndolos en conformación productiva al impedir su tautomerización (Figuras 5B y 5C).<sup>30,76,85</sup> De forma análoga, la hidrofobicidad también juega un papel importante en el caso de la OXA-48, que carece de este puente, pero cuya eficacia en la inactivación de los carbapenems se basa en la existencia de una amplia región hidrofóbica cerca de su centro activo que

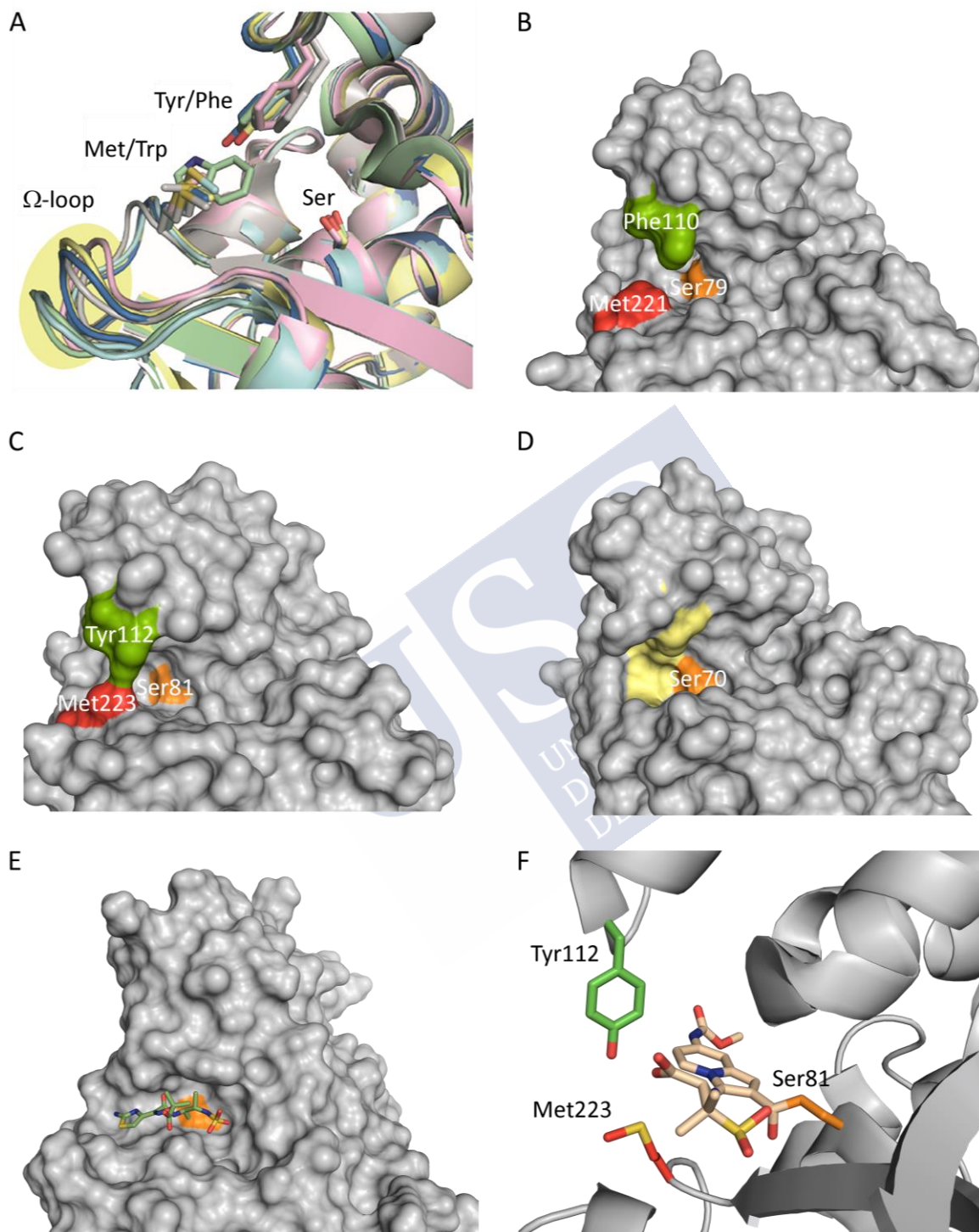
<sup>82</sup> Lukic-Grlic, A.; Kos, M.; Zizek, M.; Luxner, J.; Grisold, A.; Zarfel, G.; Bedenic, B. *Chemotherapy* **2019**, *64*, 167–172.

<sup>83</sup> Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 24–38.

<sup>84</sup> Golemi, D.; Maveyraud, L.; Vakulenko, S.; Samama, J. P.; Mobashery, S. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2001**, *98*, 14280–14285.

<sup>85</sup> Santillana, E.; Beceiro, A.; Bou, G.; Romero, A. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2007**, *104*, 5354–5359.

los conserva en una conformación apropiada para la hidrólisis (Figura 5D).<sup>86,87</sup>

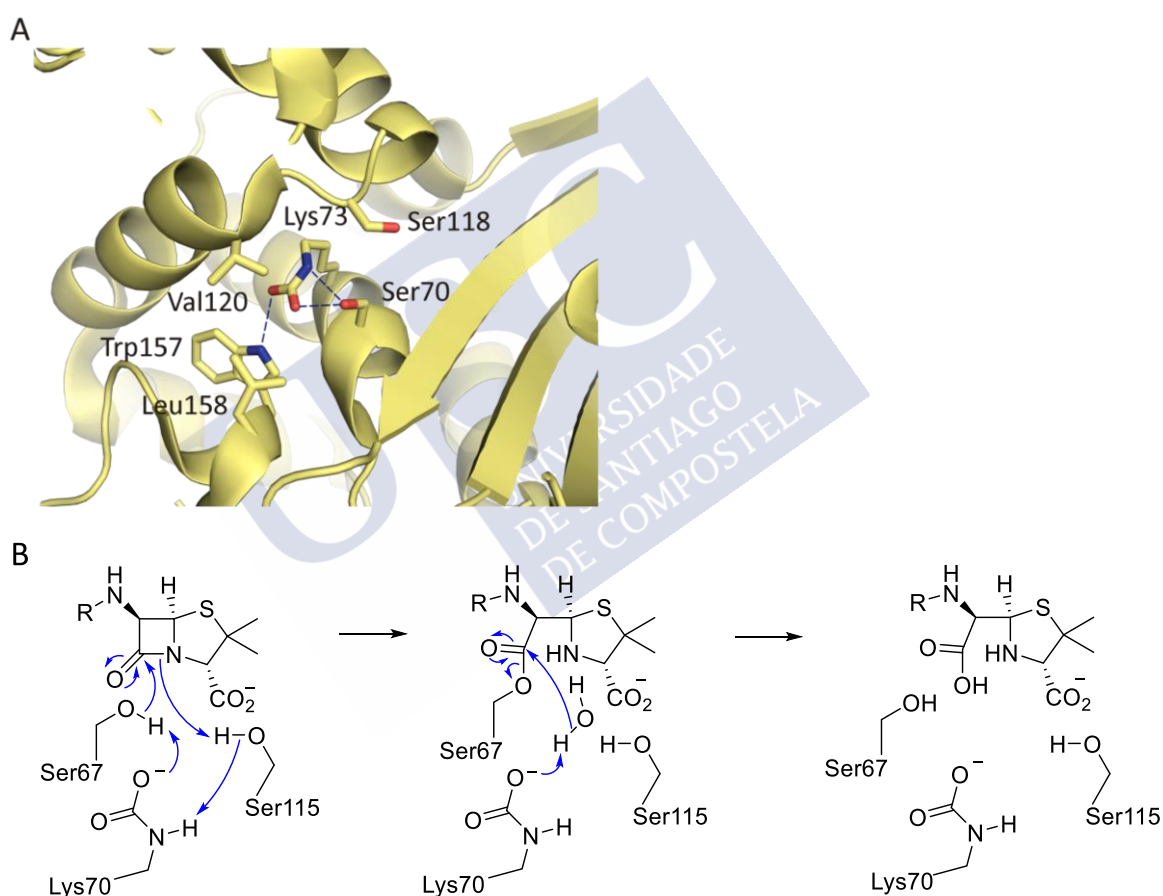


**Figura 5.** Vista global de las estructuras cristalográficas de las  $\beta$ -lactamasas de clase A y D. A. Comparación de las estructuras de las carbapenemasas tipo OXA más representativas, OXA-23

<sup>86</sup> Docquier, J. D.; Calderone, V.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Giuliani, F.; Bellucci, L.; Tafi, A.; Nordmann, P.; Botta, M.; Rossolini, G. M.; Mangani, S. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 540–547.

<sup>87</sup> Lahiri, S. D.; Mangani, S.; Jahic, H.; Benvenuti, M.; Durand-Reville, T. F.; De Luca, F.; Ehmann, D. E.; Rossolini, G. M.; Alm, R. A.; Docquier, J. D. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 591–600.

(gris), OXA-24/40 (amarillo), OXA-51 (verde), OXA-58 (rosa), OXA-143 (azul) y OXA-235 (cian), se resaltan las cadenas laterales de los residuos responsables de las principales diferencias estructurales.<sup>35</sup> B-D. Vistas seleccionadas de CHDLs relevantes: OXA-23 (código PDB 4K0X,<sup>88</sup> 1.61 Å) (B), OXA-24/40 (código PDB 3G4P,<sup>89</sup> 2.14 Å) (C) de *A. baumannii*, y OXA-48 de *K. pneumoniae* (código PDB 3HBR,<sup>73</sup> 1.9 Å) (D). Se resalta la posición de los residuos de Tyr/Phe y Met que forman la entrada tipo túnel al centro activo de OXA-23 y OXA-24/40 en verde y rojo, respectivamente. Notar como el centro activo de OXA-24, que contiene una Tyr es más cerrado que el de OXA-23 que contiene una Phe. La región hidrofóbica de OXA-48 se muestra en amarillo. E-F. Comparación de la estructura cristalográfica de los aductos formados por  $\beta$ -lactamasas de clase A y de clase D. E. Estructura cristalográfica del aducto CTX-M-97/aztreonam procedente de *E. coli* (código PDB 5G18,<sup>90</sup> 1.1 Å) como muestra del centro activo más abierto de una  $\beta$ -lactamasa de clase A. F. OXA-24/40 de *A. baumannii* inactivada por un inhibidor basado en sulfonopenicilina (código PDB 3FV7,<sup>91</sup> 2 Å). Se resalta la posición de la serina catalítica en naranja en todas las estructuras.



**Figura 6.** (A) Estructura cristalográfica del centro activo de OXA-48 procedente de *K. pneumoniae*

<sup>88</sup> Kaitany, K. C.; Klinger, N. V.; June, C. M.; Ramey, M. E.; Bonomo, R. A.; Powers, R. A.; Leonard, D. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 4848–4855.

<sup>89</sup> Pattanaik, P.; Bethel, C. R.; Hujer, A. M.; Hujer, K. M.; Distler, A. M.; Taracila, M.; Anderson, V. E.; Fritsche, T. R.; Jones, R. N.; Pagadala, S. R. R.; Van Den Akker, F.; Buynak, J. D.; Bonomo, R. A. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 945–953.

<sup>90</sup> Vandavasi, V. G.; Weiss, K. L.; Parks, J. M.; Cooper, J. B.; Ginell, S. L.; Coates, L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01636-16.

<sup>91</sup> Bou, G.; Santillana, E.; Sheri, A.; Beceiro, A.; Sampson, J. M.; Kalp, M.; Bethel, C. R.; Distler, A. M.; Drawz, S. M.; Pagadala, S. R. R.; van der Akker, F.; Bonomo, R. A.; Romero, A.; Buynak, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13320–13331.

(código PDB 3HBR,<sup>73</sup> 1.9 Å). (B) Mecanismo propuesto para las  $\beta$ -lactamasas tipo D. La etapa inicial de acilación se inicia con la desprotonación de la Ser67 por parte de la Lys70 carboxilada. El carbamato también activa la molécula de agua para la segunda etapa.<sup>92</sup>

Desde el punto de vista del diseño de fármacos, la presencia del puente hidrofóbico en la mayoría de las carbapenemasas tipo OXA supone un hándicap adicional debido a dos factores principales. El primero de ellos es que les confiere una estructura muy cerrada de su centro activo, lo que supone mayores limitaciones de tipo geométrico con respecto a otras  $\beta$ -lactamasas que carecen de él. Dichas limitaciones son especialmente acentuadas en el caso de la OXA-24/40 a causa de las interacciones intramoleculares más fuertes entre los residuos que forman el túnel en comparación con otras CHDLs como la OXA-23 (Tyr/Met frente a Phe/Met). Por otra parte, este puente hidrofóbico genera una entrada tipo túnel al centro activo que actúa como una barrera hidrofóbica que permite la entrada a solo unos pocos sustratos (Figura 5).<sup>30</sup>

## 1.6 Inhibidores de las $\beta$ -Lactamasas

Actualmente, la estrategia más empleada para el tratamiento de las infecciones bacterianas multirresistentes es la terapia combinada “antibiótico + inhibidor de resistencia”. Este tipo de terapia supone la administración de un antibiótico en combinación con un inhibidor del mecanismo de resistencia desarrollado por la bacteria para inactivar al antibiótico, lo que permite recuperar el poder antibacteriano de este último.<sup>30</sup> Lamentablemente, los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas que se emplean actualmente en clínica demostraron ser muy poco efectivos frente a las  $\beta$ -lactamasas de tipo C y D que hidrolizan a los carbapenems, y que son las responsables de la resistencia a múltiples fármacos en las especies más desafiantes a nivel clínico, incluyendo *A. baumannii* y *P. aeruginosa*. Es por esto que existe un enorme interés en el desarrollo de nuevos inhibidores que permitan hacer frente a este nuevo reto del siglo XXI, especialmente a las  $\beta$ -lactamasas de

---

<sup>92</sup> Leonard, D. A.; Bonomo, R. A.; Powers, R. A. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2407–2415.

tipo D.<sup>20</sup> A continuación, se describen los principales tipos de inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas de clases A, C y D (serina  $\beta$ -lactamasas) que han sido desarrollados hasta el momento.

### 1.6.1 Ácidos Borónicos y Boronatos Cíclicos

Este tipo de inhibidores surgieron del descubrimiento del poder inhibitorio de los ácidos borónicos frente a las serina proteasas.<sup>93</sup> Después de que Dobozy y colaboradores<sup>94</sup> demostraran que los ácidos borónicos inactivaban la penicilinasas procedente de *Bacillus cereus*, Kiener y Waley<sup>95</sup> desarrollaron los primeros inhibidores reversibles, en concreto el ácido fenilborónico y el ácido 3-aminofenilborónico, que poseían una actividad moderada frente a la  $\beta$ -lactamasa presente en ese patógeno.<sup>96</sup> Sin lugar a dudas, la obtención de la estructura cristalográfica del intermedio acil-enzima penicilina G/TEM-1 procedente de *E. coli* (código PDB 1FQG,<sup>97</sup> 1.7 Å) supuso un pilar fundamental de conocimiento a partir del cual se desarrollaron inhibidores análogos del estado de transición, permitieron alcanzar actividades en el rango del nanomolar (Figura 7A). El primer inhibidor basado en esta estrategia fue el compuesto **5**, descubierto por Martin y Jones en 1995.<sup>98</sup> Con el compuesto **5**, además de mejorar considerablemente la actividad conseguida hasta el momento frente a TEM-1 procedente de *E. coli*, se confirmó, mediante difracción de rayos-X (código PDB 1ERM,<sup>99</sup> 1.7 Å), la formación del aducto tetraédrico con la serina catalítica, que es estructuralmente similar al intermedio **IT2** (Esquema 2A). Modificaciones posteriores con el fin de aumentar las interacciones favorables con el centro activo llevaron a la identificación de los

<sup>93</sup> Snoum, R.; Rubinstein, A.; Dembitsky, V. M.; Srebnik, M. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4156–4220.

<sup>94</sup> Dobozy, O.; Mile, I.; Ferencz, I.; Csanyi, V. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1971**, *6*, 97–105.

<sup>95</sup> Kiener, P. A.; Waley, S. G. *Biochem. J.* **1978**, *169*, 197–204.

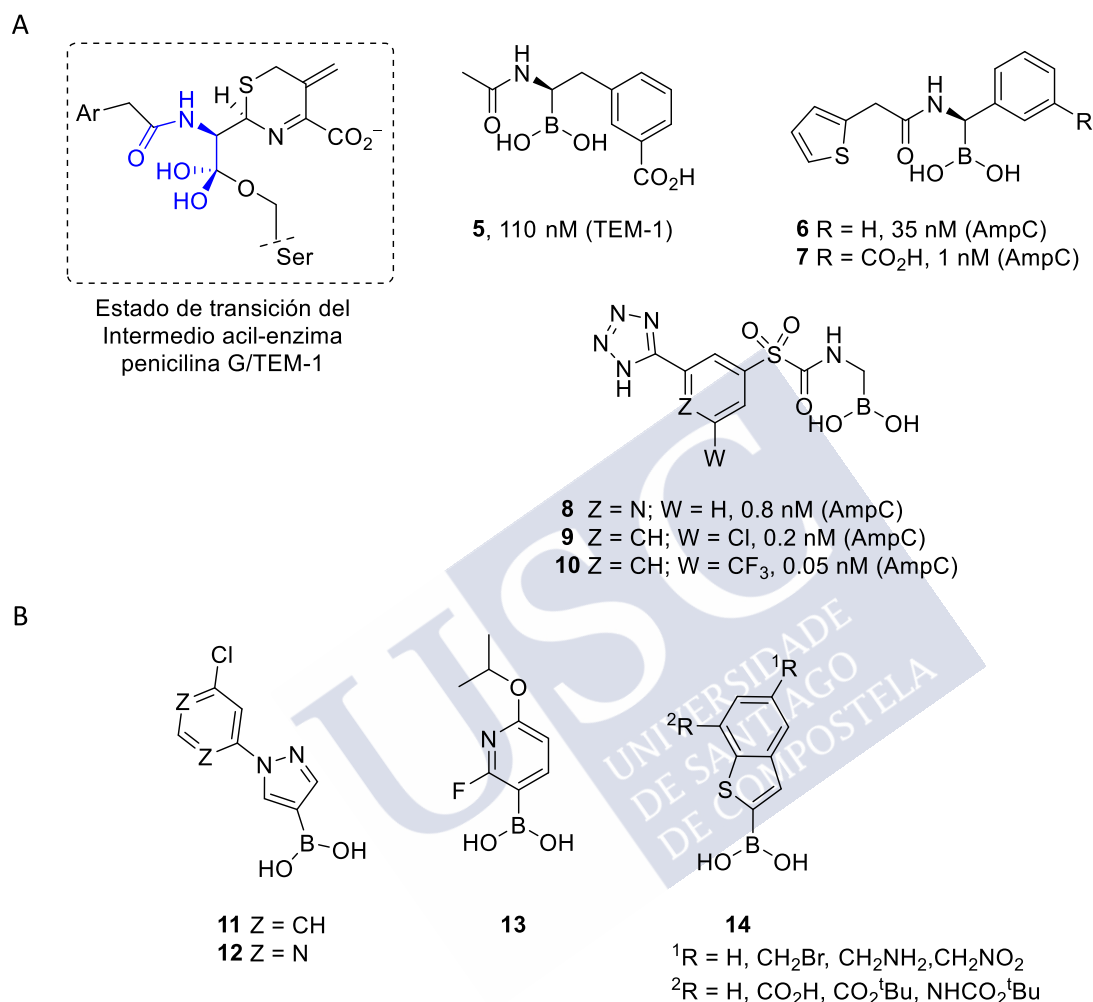
<sup>96</sup> Beesley, T.; Gascoyne, N.; Knott-Hunziker, V.; Petrusson, S.; Waley, S. G.; Jaurin, B.; Grundström, T. *Biochem. J.* **1983**, *209*, 229–233.

<sup>97</sup> Strynadka, N. C.; Adachi, H.; Jensen, S. E.; Johns, K.; Sielecki, A.; Betzel, C.; Sutoh, K.; James, M. N. *Nature* **1992**, *359*, 700–705.

<sup>98</sup> Martin, R.; Jones, J. B. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8394–8402.

<sup>99</sup> Ness, S.; Martin, R.; Kindler, A. M.; Paetzel, M.; Gold, M.; Jensen, S. E.; Jones, J. B.; Strynadka, N. C. *Biochemistry* **2000**, *39*, 5312–5321.

compuestos **6–7**, logrando actividades en el rango del bajo nanomolar. A partir de ahí, Eidam y colaboradores desarrollaron los tetrazoles **8–10** mediante aproximaciones basadas en fragmentos (Figura 7A).<sup>100</sup>



**Figura 7.** (A) Ejemplos de ácidos borónicos inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como miméticos del estado de transición en la desacilación del intermedio acil-enzima. Se muestran las constantes de inhibición ( $K_i$ ) con los enzimas aislados. (B) Inhibidores identificados mediante cribado virtual, compuestos **11–13**, y docking covalente, compuestos **14**.

Otros inhibidores son los ácidos borónicos **11–13** descritos por London y colaboradores<sup>101</sup> e identificados mediante cribado virtual y, así como los ácidos benzo[*b*]tiofen-2-ilborónicos **14** obtenidos mediante estudios de docking covalente

<sup>100</sup> Eidam, O.; Romagnoli, C.; Dalmasso, G.; Barelier, S.; Caselli, E.; Bonnet, R.; Shoichet, B. K.; Prati, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2012**, *109*, 17448–17453.

<sup>101</sup> London, N.; Miller, R. M.; Krishnan, S.; Uchida, K.; Irwin, J. J.; Eidam, O.; Gibold, L.; Cimermančič, P.; Bonnet, R.; Shoichet, B. K.; Tauton, J. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1066–1072.

(Figura 7B).<sup>102</sup> Estos últimos poseen actividad frente a  $\beta$ -lactamasas tan importantes en clínica como las KPC-2, GES-5, AmpC, OXA-24/40 y NDM-1.<sup>103</sup>

La principal limitación en el uso de ácidos borónicos como inhibidores, siempre ha sido sus potenciales efectos secundarios debido a su capacidad de inhibición de las serina-proteasas en mamíferos. Para mejorar su selectividad, se exploró el uso de boronatos cíclicos, y que condujo al descubrimiento del varbobactam (**15**, RPX7009, Figura 8).<sup>104,105</sup> Este compuesto, que en combinación con merepenem (vabomere®) fue aprobado en 2017 por la FDA para el tratamiento de las infecciones complicadas del tracto urinario, no inhibe las serina-proteasas y es un potente inhibidor de las carbapenemasas KPC, así como también de otras  $\beta$ -lactamasas de las clases A (CTX-M, SHV, TEM) y C (P99, MIR, FOX), pero no es eficaz frente a  $\beta$ -lactamasas de las clases B y D. Por otra parte, mediante un cribado microbiológico con diversos boronatos cíclicos se identificaron los inhibidores de amplio espectro, los compuestos **16–17**, que son capaces de inhibir los cuatro tipos de  $\beta$ -lactamasas, incluyendo CTX-M-15 (clase A), VIM-2 (clase B), NDM-1 (clase B), AmpC (clase C) y las CHDLs OXA-23 y OXA-48, pero ninguno de ellos ha llegado hasta el momento a estudios clínicos (Figura 8).<sup>106,107</sup>

<sup>102</sup> Santucci, M.; Spyraakis, F.; Cross, S.; Quotadamo, A.; Farina, D.; Tondi, D.; De Luca, F.; Docquier, J.-D.; Prieto, A. I.; Ibacache, C.; Blázquez, J.; Venturelli, A.; Cruciani, G.; Costi, M. P. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 17716.

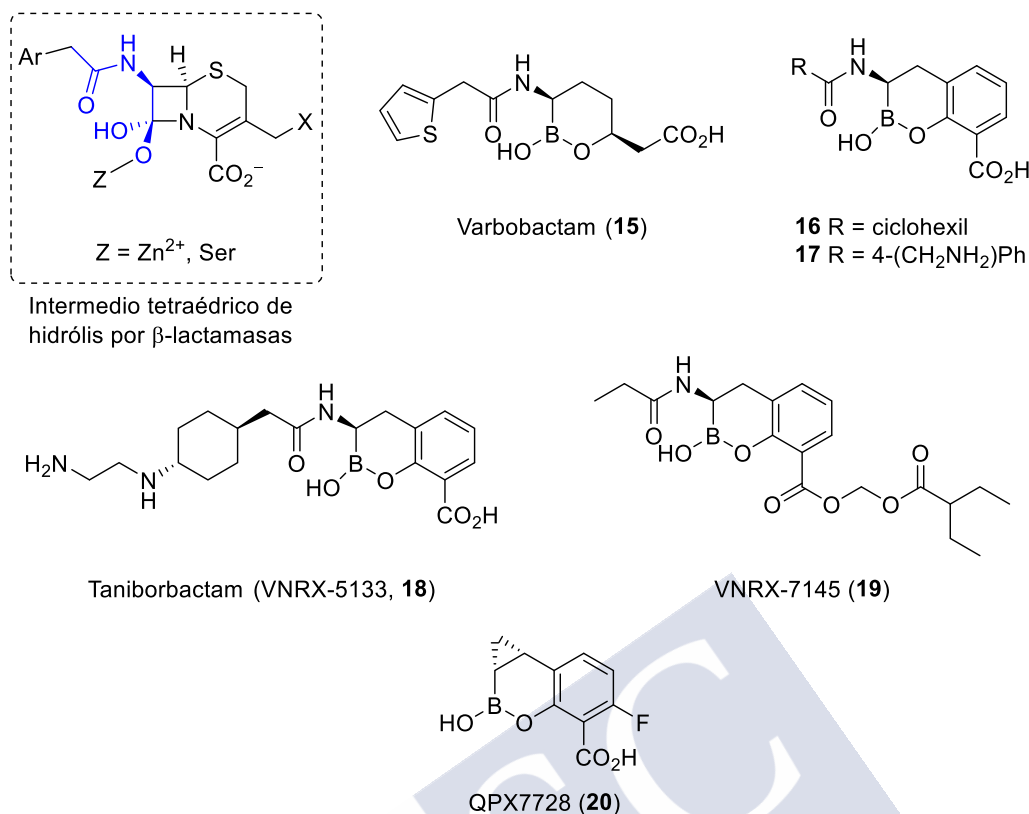
<sup>103</sup> Cendron, L.; Quotadamo, A.; Maso, L.; Bellio, P.; Montanari, M.; Celenza, G.; Venturelli, A.; Costi, M. P.; Tondi, D. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 650–655.

<sup>104</sup> Lomovskaya, O.; Sun, D.; Rubio-Aparicio, D.; Nelson, K.; Tsivkovski, R.; Griffith, D. C.; Dudley, M. N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01443-17.

<sup>105</sup> Dhillon, S. *Drugs* **2018**, *78*, 1259–1270.

<sup>106</sup> Brem, J.; Cain, R.; Cahill, S.; McDonough, M. A.; Clifton, I. J.; Jiménez-Castellanos, J. C.; Avison, M. B.; Spencer, J.; Fishwick, C. W. G.; Schofield, C. J. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12406.

<sup>107</sup> Cahill, S. T.; Cain, R.; Wang, D. Y.; Lohans, C. T.; Wareham, D. W.; Oswin, H. P.; Mohammed, J.; Spencer, J.; Fishwick, C. W.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J.; Brem, J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02260-16.



**Figura 8.** Boronatos cíclicos inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.

Modificaciones posteriores en el grupo amida de los compuestos **16–17** llevaron al descubrimiento del taniborbactam (VNRX-5133, **18**) (Figura 8). Este inhibidor se encuentra actualmente en estudios clínicos en combinación con la cefalosporina de cuarta generación cefepima, para el tratamiento de infecciones complicadas del tracto urinario, infecciones hospitalarias y para la neumonía bacteriana asociada al uso de ventiladores producidas por bacterias de las especies *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* resistentes.<sup>108</sup> Presenta buena actividad tanto frente a serina carbapenemasas relevantes de las clases A, C y algunas D, como la KPC, la PDC y la OXA-48, respectivamente; así como frente a metalo- $\beta$ -lactamasas de importancia como la NDM-1 y la VIM-1/2, lo que supuso una mejora más que considerable

<sup>108</sup> Hamrick, J. C.; Docquier, J. D.; Uehara, T.; Myers, C. L.; Six, D. A.; Chatwin, C. L.; John, K. J.; Vernacchio, S. F.; Cusick, S. M.; Trout, R. E. L.; Pozzi, C.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Mangani, S.; Liu, B.; Jackson, R. W.; Moeck, G.; Xerri, L.; Burns, C. J.; Pevear, D. C.; Daigle, D. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e01963–19.

respecto a la actividad del varbobactam (**15**).<sup>108,109,110</sup> Otro boronato cíclico de actividad prometedora es VNRX-7145 (**19**), que combinado con ceftibuteno revela mejor actividad frente a las carbapenemasas KPC y OXA-48 que la combinación meropenem/varbobactam (Figura 8).<sup>111</sup> QPX7728 (**20**) es el inhibidor más reciente, se encuentra en la fase I de los estudios clínicos y es un potente inhibidor de espectro ultra-amplio que es capaz de inhibir la mayor parte de las  $\beta$ -lactamasas, incluidas las carbapenemasas más peligrosas como la KPC, la PDC, la OXA-48 y la OXA-24/40, además de numerosas metalo- $\beta$ -lactamasas.<sup>112</sup> Ha demostrado ser capaz de reestablecer por completo la actividad de varios antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tanto inyectables como orales, en *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*. Además, presenta una buena biodisponibilidad oral, por lo que se evita la necesidad de administrar una proforma.<sup>113,114</sup>

### 1.6.2 1,6-Diazabicyclo[3,2,1]octanos

Los 1,6-diazabicyclo[3,2,1]octanos (DBOs) fueron inicialmente desarrollados en la década de 1990 por químicos de la compañía Hoechst Marion Roussel como potenciales antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Sin embargo, se encontró que poseían propiedades inhibitorias frente a las  $\beta$ -lactamasas de clase A y C más interesantes, lo que desencadenó durante el periodo 2001–2004 numerosas investigaciones en este campo que llevaron a la identificación del avibactam (**21**) (Figura 9A).<sup>115</sup> Se

<sup>109</sup> Daigle, D.; Hamrick, J.; Chatwin, C.; Kurepina, N.; Kreiswirth, B. N.; Shields, R. K.; Oliver, A.; Clancy, C. J.; Nguyen, M. H.; Pevear, D.; Xerri, L. *Open Forum Infect. Dis.* **2018**, *5*, S419–S420.

<sup>110</sup> 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. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8544–8556.

<sup>111</sup> Hamrick, J.; Chatwin, C.; John, K.; Burns, C.; Xerri, L.; Moeck, G.; Pevear, D. *Abstracts of Papers, 29<sup>th</sup> ECCMIC, Amsterdam, Netherlands, April 13–16, 2019.*

<sup>112</sup> Lomovskaya, O.; Tsivkovski, R.; Nelson, K.; Rubio-Aparicio, D.; Sun, D.; Trovov, M.; Dudley, M. N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e00212-20.

<sup>113</sup> 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.; Trovov, M.; Boyer, S. H.; Glinka, T. W.; Pemberton, O. A.; Chen, Y.; Dudley, M. N. *J. Med. Chem.* **2020**. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01976>.

<sup>114</sup> Tsivkovski, R.; Trovov, M.; Lomovskaya, O. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e00130-20.

<sup>115</sup> Bonnefoy, A.; Dupuis-Hamelin, C.; Steier, V.; Delachaux, C.; Seys, C.; Stachyra, T.; Fairley, M.; Guitton, M.; Lampilas, M. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 410–417.

trata de un compuesto con actividad dual, ya que además de sus propiedades como inhibidor de  $\beta$ -lactamasas, posee también actividad antibiótica frente a las PBP2 (CIM  $\leq 2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), la cual es su diana celular primaria.<sup>116</sup> El avibactam (**21**) en combinación con ceftazidima (Avycaz®) se aprobó en 2015 para su uso en el tratamiento de infecciones abdominales y urinarias complicadas,<sup>117</sup> ampliándose en el año 2019 al tratamiento de la neumonía bacteriana adquirida en hospitales a causa de técnicas de respiración artificial.<sup>118</sup> Es un inhibidor covalente reversible activo frente a  $\beta$ -lactamasas de clase A, C y algunas de clase D, pero su eficacia frente a las OXA-23 y OXA-24/40 es muy baja, debido a que el proceso de formación del aducto con estas enzimas es tremendamente lento en comparación con otras como la OXA-48, para la cual el avibactam (**21**) es más efectivo.<sup>54,119</sup> Esto condujo a que posteriormente se desarrollaran una serie de análogos, de los cuales los de mayor relevancia son el relebactam (**22**, MK 7655), el nacubactam (**23**, OP0595, RO7079901 o RG6080) y el zidebactam (**24**, WCK 5107). Estos compuestos incorporan sustituyentes en la amida primaria presente en el avibactam (**21**) con el fin de incrementar su afinidad por el enzima, así como mejorar sus propiedades farmacológicas. La combinación imipenem-cilastatin/relebactam, que mostró ser eficiente en estudios *in vivo* con ratones frente a infecciones pulmonares causadas por cepas de *P. aeruginosa* y *K pneumoniae* resistentes a imipenem, fue aprobada por la FDA en julio de 2019 (Recarbrio®) para el tratamiento de las infecciones complicadas del tracto urinario y abdominales.<sup>120,121</sup>

<sup>116</sup> King, A. M.; King, D. T.; French, S.; Brouillette, E.; Asli, A. J.; Alexander, A. N.; Vuckovic, M.; Maiti, S. N.; Parr, Jr. T. R.; Brown, E. D.; Malouin, F.; Strynadka, N. C. J.; Wright, G. D. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 864–868.

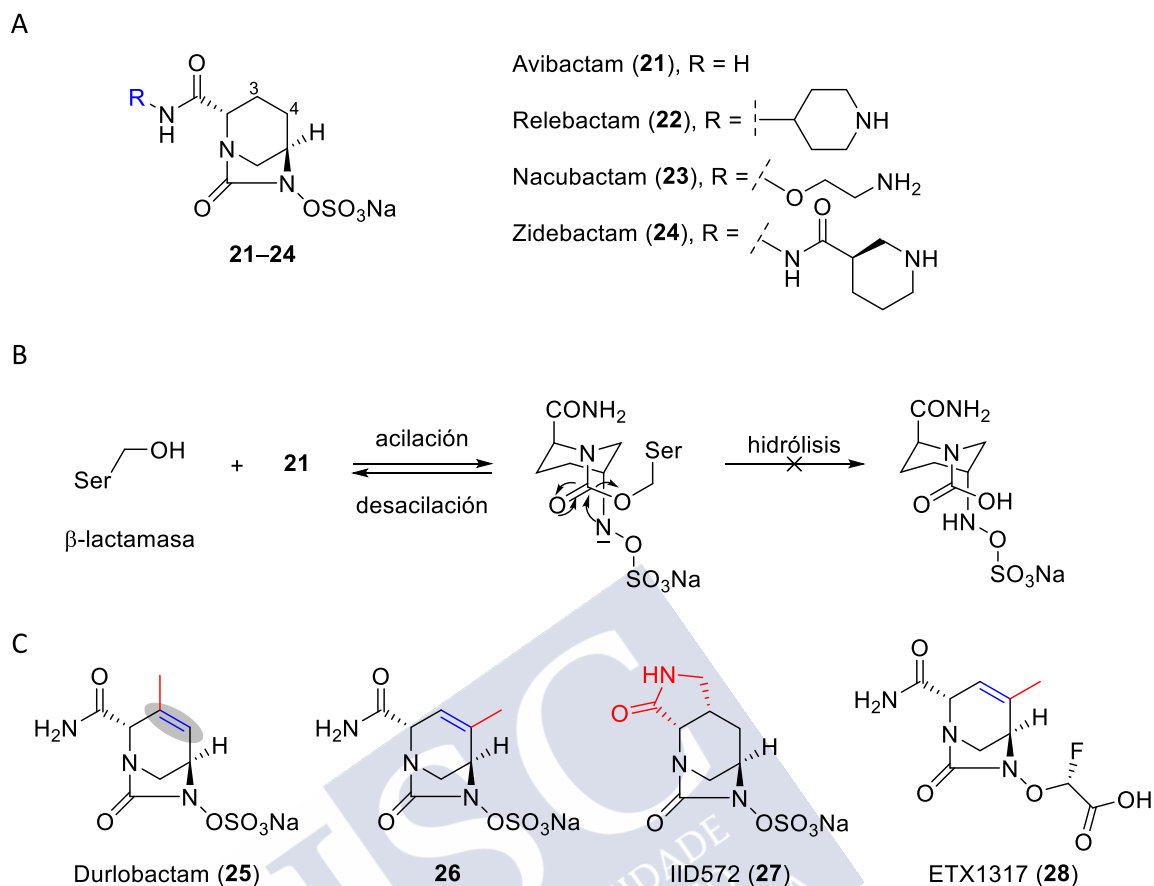
<sup>117</sup> Ehmann, D. E.; Jahic, H.; Ross, P. L.; Gu, R. F.; Hu, J.; Durand-Réville, T. F.; Lahiri, S.; Thresher, J.; Livchak, S.; Gao, N.; Palmer, T.; Walkup, G. K.; Fisher, S. L. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 27960–27971.

<sup>118</sup> <https://www.drugbank.ca/drugs/DB09060>.

<sup>119</sup> Smith, C. A.; Antunes, N. T.; Stewart, N. K.; Toth, M.; Kumarasiri, M.; Chang, M.; Mobashery, S.; Vakulenko, S. B. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 1107–1115.

<sup>120</sup> Powles, M. A.; Galgoci, A.; Misura, A.; Colwell, L.; Dingley, K. H.; Tang, W.; Wu, J.; Blizzard, T.; Motyl, M.; Young, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02577-17.

<sup>121</sup> Wu, J.; Racine, F.; Wismer, M. K.; Young, K.; Carr, D. M.; Xiao, J. C.; Katwaru, R.; Si, Q.; Harradine, P.; Motyl, M.; Bhagunde, P. R.; Rizk, M. L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02323-17.



**Figura 9.** (A) Análogos del avibactam de primera generación. (B) Mecanismo de acción de los 1,6-Diazabicyclo[3,2,1]octanos. (C) Derivados del avibactam de segunda generación.

Con el fin de ampliar el espectro de acción del avibactam frente a las CHDLs, especialmente las OXA-23 y las OXA-24/40, Durand-Reveille y colaboradores<sup>122</sup> demostraron con el análogo de segunda generación durlobactam (**25**, ETX2514), que la introducción de un doble enlace entre las posiciones C3 y C4 y la funcionalización de la posición C3 con un grupo metilo, mejora, no solo la eficacia frente a las  $\beta$ -lactamasas de clase A y C, sino que aumenta su capacidad inhibitoria frente a las de clase D como la OXA-24/40 (Figura 9C). Aunque la combinación piperacilina/durlobactam resultó efectiva frente a *Entereobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenems (CIM = 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en

<sup>122</sup> Durand-Réville, T. F.; Gluler, S.; Comita-Prevoir, J.; Chen, B.; Bifulco, N.; Huynh, H.; Lahiri, S.; Shapiro, A. B.; McLeod, S. M.; Carter, N. M.; Moussa, S. H.; Velez-Vega, C.; Olivier, N. B.; McLaughlin, R.; Gao, N.; Thresher, J.; Palmer, T.; Andrews, B.; Giacobbe, R. A.; Newman, J. V.; Ehmann, D. E.; de Jonge, B.; O'Donnell, J.; Mueller, J. P.; Tommasi, R. A.; Miller, A. A. *Nat. Microb.* **2017**, *2*, 17104–17114.

comparación con piperacilina/avibactam (CIM = 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), su eficiencia frente a la OXA-24/40 se encuentra todavía lejos de la obtenida para bacterias que contienen  $\beta$ -lactamasas de tipo A y C (entre 100–1000 veces mayor). Desde entonces, diversas modificaciones del anillo de seis miembros del avibactam (**21**), tanto en el doble enlace como en el grupo amida, llevaron a la identificación de un amplio número de inhibidores. De estos merece una mención especial el regioisómero del durlobactam (**25**), el compuesto **26**, ya que causa una reducción en los valores de CIM de la piperacilina de entre 2 y 4 veces frente a cepas de *P. aeruginosa* que portan las  $\beta$ -lactamasas KPC-2 y OXA-24/40, respectivamente.<sup>30</sup> Otro derivado del avibactam (**21**) es también IID572 (**27**) (Figura 9C).<sup>123</sup> Por último, más recientemente, el inhibidor ETX1317 (**28**) ha demostrado ser capaz de restaurar la actividad de varias clases de  $\beta$ -lactamas, incluyendo cefalosporinas de tercera generación, como por ejemplo la cefpodoxima, frente a infecciones causadas por patógenos de la especie *Enterobacteriaceae* que expresan ESBLs (Figura 9C). A raíz de sus buenos resultados, actualmente se está desarrollando la combinación de un pro-fármaco, el compuesto ETX0282, con el antibiótico cefpodoxima prorectil, la cual ya ha mostrado buena eficacia por vía oral en modelos de ratones.<sup>124</sup>

### 1.6.3 Sulfonas Basadas en Penicilina

El diseño de este grupo de inhibidores estuvo inspirado por el conocimiento del mecanismo de acción del primer inhibidor de las  $\beta$ -lactamasas conocido, el ácido clavulánico (**29**), un compuesto natural descubierto en 1976 que es muy usado en combinación con penicilinas, en especial la amoxicilina (Figura 10).<sup>125,126</sup> Las

<sup>123</sup> Reck, F.; Bermingham, A.; Blais, J.; Casarez, A.; Colvin, R.; Dean, C. R.; Furegati, M.; Gamboa, L.; Growcott, E.; Li, C.; Lopez, S.; Metzger, L.; Nocito, S.; Ossola, F.; Phizackerley, K.; Rasper, D.; Shaul, J.; Shen, X.; Simmons, R. L.; Tang, D.; Tashiro, K.; Yue, Q. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 1045–1051.

<sup>124</sup> O'Donnell, J.; Tanudra, A.; Chen, A.; Hines, D.; Tommasi, R.; Mueller, J. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 1378–1388.

<sup>125</sup> Reading, C.; Cole, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 852–857.

<sup>126</sup> Brown, A. G. *Drug Des. Deliv.* **1986**, *1*, 1–21.

primeras sulfonas descritas fueron el sulbactam (**30**) y el tazobactam (**31**), ambos en uso clínico administrados junto con antibióticos como la ampicilina o la piperacilina, respectivamente.<sup>127,128</sup> La eficacia de estos dos inhibidores irreversibles se basa en, por una parte, la generación de un buen grupo saliente (sulfinato), ausente en las penicilinas, una vez se ha producido la apertura del anillo  $\beta$ -lactámico tras el ataque de la serina catalítica, y, por otra, en las interacciones electrostáticas que dicho grupo establece con residuos del centro activo. Desafortunadamente estos dos inhibidores son inefectivos frente a las carbapenemasas de clase D. Recientemente, se ha desarrollado un nuevo derivado del tazobactam, el enmetazobactam (**32**), que se encuentra en fase III de desarrollo clínico en combinación con cefepima para el tratamiento de las infecciones urinarias complicadas. Esta combinación mejora la eficacia de la combinación piperacilina/tazobactam frente a algunas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* que expresan EBSLs, tal vez ayudado por la mejor entrada en la célula gracias a la neutralidad aportada por el grupo metilo la posición terminal del triazol.<sup>129</sup>

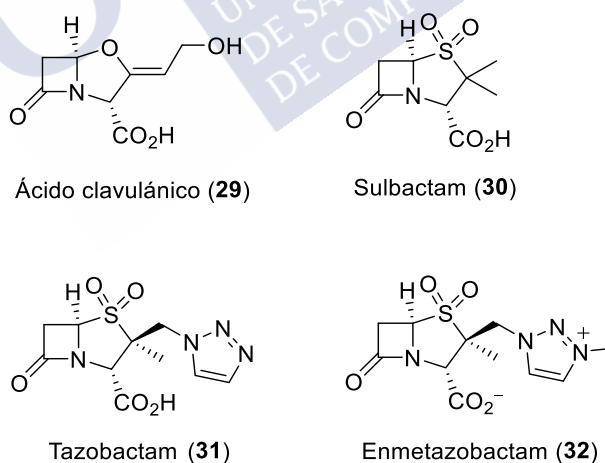


Figura 10. Sulfonas inspiradas en el ácido clavulánico (**29**).

<sup>127</sup> Shapiro, A. B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01612-17.

<sup>128</sup> Aronoff, S. C.; Jacobs, M. R.; Johanning, S.; Yamabe, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1984**, *26*, 580–582.

<sup>129</sup> Papp-Wallace, K. M.; Bethel, C. R.; Caillon, J.; Barnes, M. D.; Potel, G.; Bajaksouzian, S.; Rutter, J. D.; Reghal, A.; Shapiro, S.; Taracila, M. A.; Jacobs, M. R.; Bonomo, R. A.; Jacqueline, C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00105-19.



## CAPÍTULO 2

### *Objetivos*

---



En esta tesis doctoral se plantea como objetivo general el desarrollo de inhibidores irreversibles de las  $\beta$ -lactamasas que hidrolizan a los carbapenems y las cefalosporinas de última generación, y que son las responsables de las infecciones nosocomiales multirresistentes. Esto se pretende llevar a cabo mediante los siguientes objetivos concretos:

**Objetivo 1:** Explorar el efecto sobre la potencia inhibitoria de la sulfona basada en penicilina LN-1-255 (**55c**) previamente descrita de: (i) la incorporación de sustituyentes en el anillo de piridina que modificaran la densidad electrónica del anillo; y (ii) el uso de heterociclos basados en piridina más voluminosos. Con este fin, se abordará la síntesis de los compuestos **33–37**, que contienen anillos de piridina sustituidos con un grupo metilpirazoilo, un grupo halógeno (Br, F), un tieno[2,3-c]piridina o una isoquinolina (Figura 11). Se evaluará la capacidad de los compuestos **33–37** para restaurar la eficacia antibiótica en cepas bacterianas multirresistentes de: (a) *Acinetobacter baumannii* que albergan las  $\beta$ -lactamasas de tipo D, OXA-23 u OXA-24/40; (b) *Klebsiella pneumoniae* que expresan la  $\beta$ -lactamasa de tipo D, OXA-48; (c) *Escherichia coli* que producen  $\beta$ -lactamasas de las clases A (TEM-1, CTX-M-2) y C (CMY-2, DHA-1); y (d) *Pseudomonas aeruginosa*, que poseen resistencia innata a las cefalosporinas de última generación al producir y regular la hiperexpresión de la cefalosporinasa cromosómica AmpC.

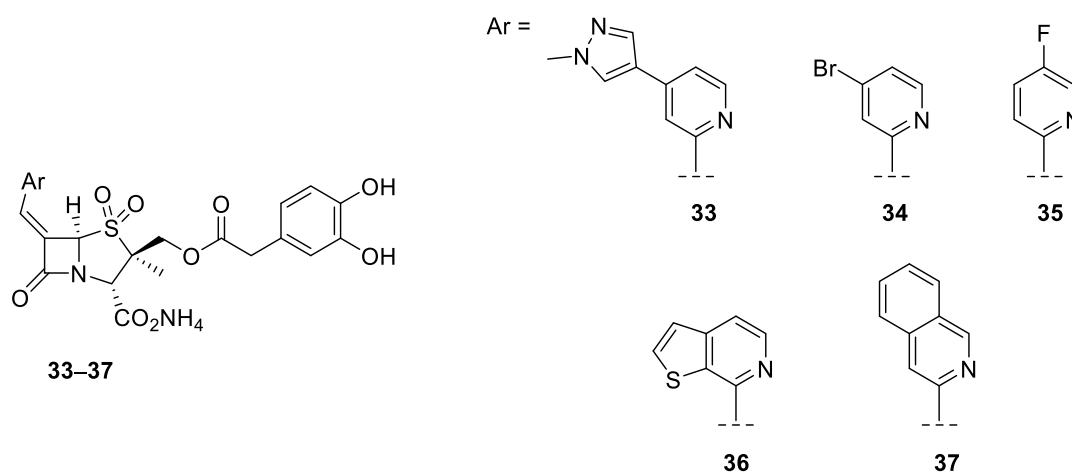


Figura 11

**Objetivo 2:** Explorar el uso de otros sideróforos, que son clave para su internalización en la bacteria, en la estructura básica del inhibidor LN-1-255 (**55c**) capaces de potenciar la interacción del inhibidor con los residuos del centro activo y así mejorar su eficacia. Asimismo, se abordará la incorporación del grupo sideróforo presente en el inhibidor original LN-1-255 (**55c**) en otras posiciones del núcleo básico de la 6-piridilmetilén sulfona, en concreto en el anillo de piridina, así como el de un grupo amino que confiera neutralidad al ligando, que permitan reducir y/o simplificar la estrategia sintética para su preparación. Este estudio se abordará mediante la síntesis y evaluación microbiológica de los compuestos **38–45** (Figura 12). El compuesto **46** se utilizará como control para valorar la importancia en el reconocimiento de la funcionalización del grupo metilo pro-*R* en posición C3.

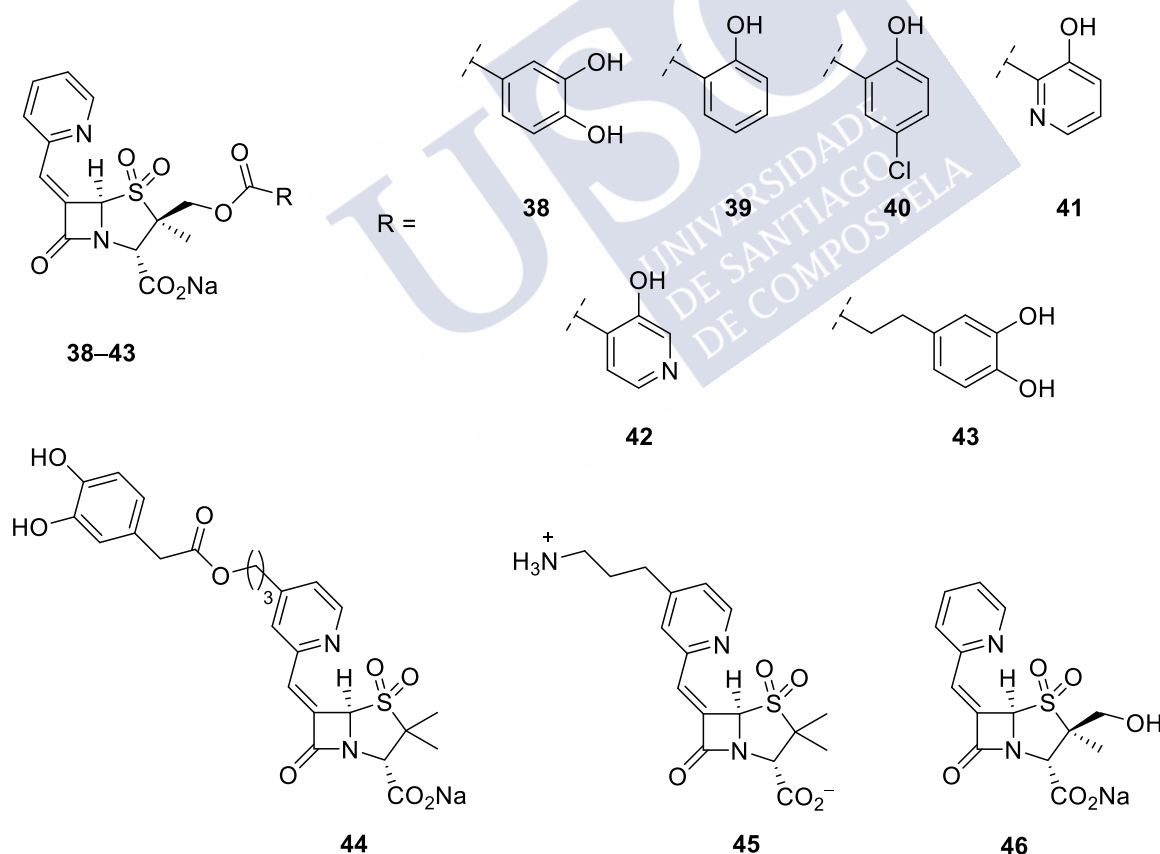


Figura 12

**Objetivo 3:** Explorar la mejora de la eficacia inhibitoria del sulbactam (**30**) mediante la introducción en el grupo metilo pro-*R* en posición C3 de los grupos sideróforos analizados en el objetivo 2 de esta tesis doctoral. En concreto, se abordará la síntesis y evaluación microbiológica de los compuestos **47–53** (Figura 13).

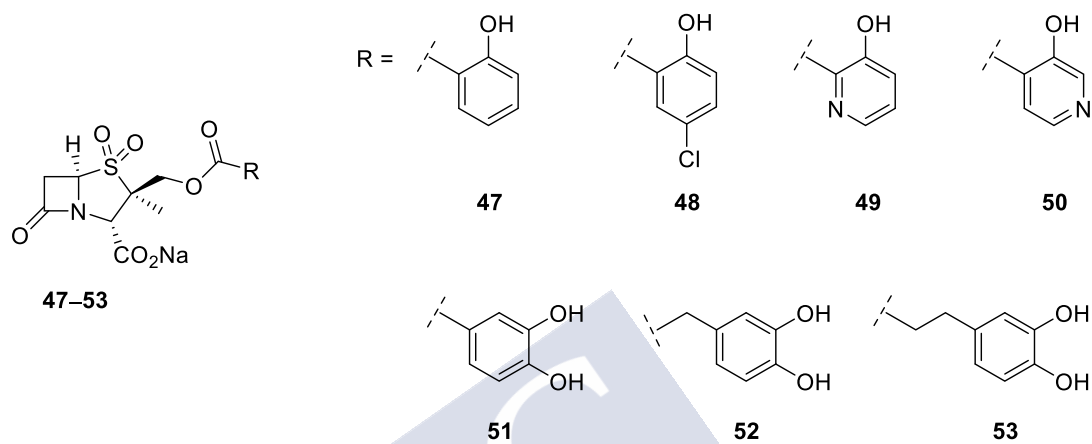
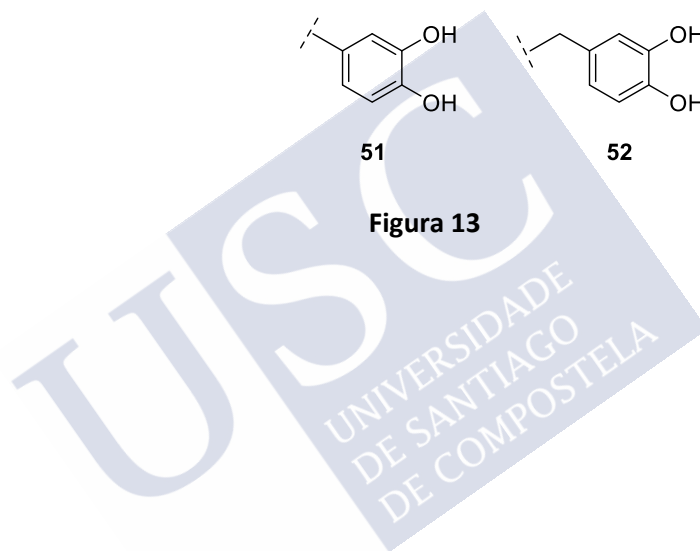


Figura 13





UCC  
UNIVERSIDAD  
DE CANTABRIA  
DE COMPOSTELA

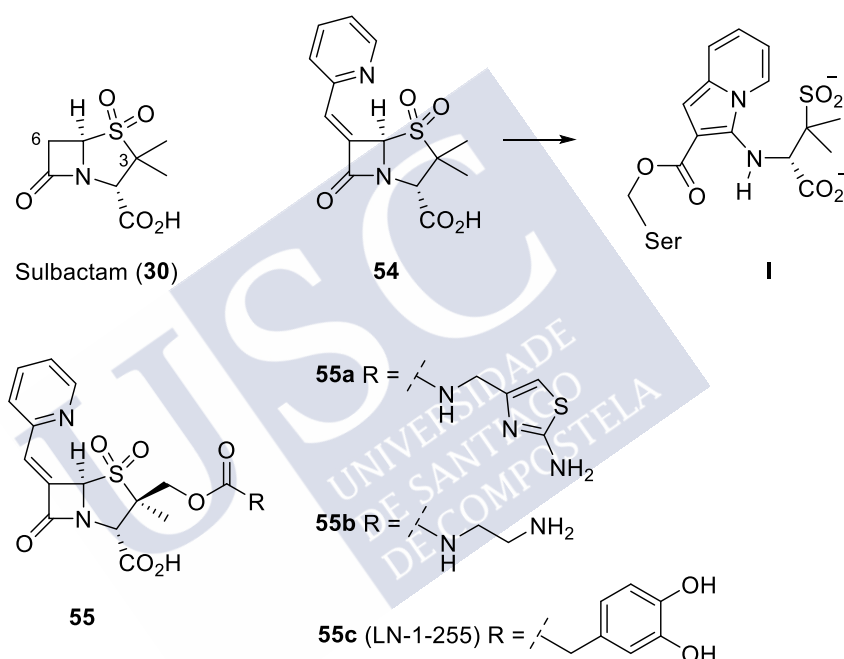
CAPÍTULO 3  
*6-Arilmetiliden Sulfonopenicilinas Conjugadas a  
Catecol*

---



### 3.1 Sulfonopenicilinas como Inhibidores de las $\beta$ -Lactamasas. Precedentes

En 1986, investigadores de Pfizer descubrieron que la incorporación de un grupo (2-piridinil)metilideno en la posición C6 del sulbactam (**30**), el compuesto **54**, mejora la eficacia de los antibióticos frente a cepas de *S. aureus* y *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas, debido a la formación de un aducto de indolizina **I** que es resistente a la hidrólisis (desacilación) (Figura 14).<sup>130</sup>



**Figura 14.** 6-(2-Piridil)metiliden sulfonopenicilinas como inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas.

Posteriormente, se demostró que la eficacia inhibitoria del compuesto **54** frente a las  $\beta$ -lactamasas aumenta drásticamente con la incorporación de un grupo catecol en el grupo metileno pro-*R* de **54**, el compuesto LN-1-255 (**55c**), ya que este facilita su internalización en los patógenos Gram-negativos, utilizando los canales bacterianos de captación de hierro.<sup>89</sup> Los primeros estudios microbiológicos realizados por Pattanaik y colaboradores demostraron su efectividad frente a las  $\beta$ -lactamasas de clase A (SHV-1 y SHV-2), mejorando claramente la eficacia del

<sup>130</sup> Chen, Y. L.; Chang, C. W.; Hedberg, K. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 3449–3452.

tazobactam (**31**). Se probó que el LN-1-255 (**55c**) incrementa la susceptibilidad a la piperacilina frente a cepas de *E. coli* productoras de los enzimas SHV-1 y SHV-2, de forma más significativa que el tazobactam (**31**). Además, se demostró que restaura la actividad de la ceftazidima y la cefpiroma, cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, respectivamente, frente a aislados clínicos de *E. coli* que expresan TEM-1, TEM-10, TEM-12 y TEM-26, así como frente a aislados clínicos de *K. pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas SHV de espectro extendido, CTX-M de espectro extendido, CMY-6, CMY-7 y OXA-2.

Lo más destacable de la actividad del inhibidor LN-1-255 (**55c**) es, sin lugar a dudas, su eficacia frente a las carbapenemasas de clase D, ampliamente extendidas en los patógenos nosocomiales y cuello de botella en la terapia de este tipo de infecciones por la falta de terapias eficientes. Bou y colaboradores demostraron que este inhibidor es capaz de restaurar totalmente la actividad de los carbapenems meropenem e imipenem frente a la cepa JC7/04 de *A. baumannii* que expresan la OXA-24/40 (Tabla 3).<sup>91</sup>

**Tabla 3.** Valores de CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) del meropenem y el imipenem frente a cepas JC7/04 de *A. baumannii*, con y sin expresión de OXA-24/40, en ausencia y en presencia de inhibidor ( $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Combinación (antibiótico/inhibidor)	sin OXA-24/40	con OXA-24/40
meropenem/--	1	32
meropenem/LN-1-255	1	1
meropenem/tazobactam	0.5	32
imipenem/--	1	32
imipenem/LN-1-255	0.25	1
imipenem/tazobactam	0.25	16

Asimismo, los estudios cinéticos realizados con los inhibidores **55** y LN-1-255 (**55c**) frente a la OXA-24/40 procedente de *A. baumannii* mostraron constantes de

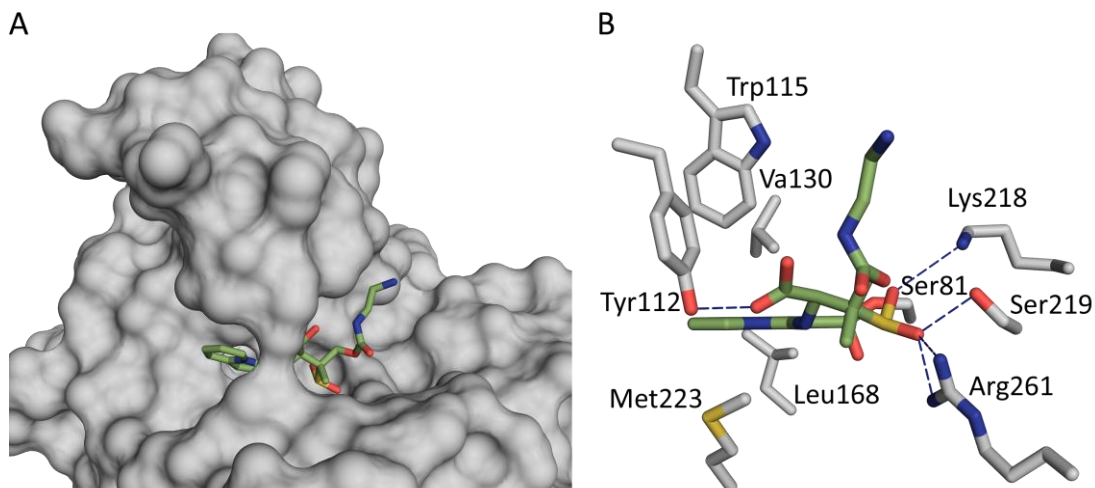
inhibición ( $K_i$ ) en el rango del bajo micromolar, siendo estas más de 380 veces inferiores a la del tazobactam (**31**) (Tabla 4).<sup>91</sup> Pese a que la afinidad del tiazolil derivado **55a** por la OXA-24/40 es superior a la de LN-1-255 (**55c**), tanto la eficacia catalítica como los resultados *in vitro* de este último demostraron ser superiores, por lo que se seleccionó como cabeza de serie en posteriores estudios.

**Tabla 4.** Parámetros cinéticos para la inhibición de OXA-24/40 de *A. baumannii* por los inhibidores **55a**, **55b** y LN-1-255 (**55c**).

Inhibidor	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	$k_{\text{inact}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{inact}}/K_i$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
<b>55a</b>	$0.50 \pm 0.08$	$0.09 \pm 0.01$	$(18 \pm 3) \times 10^4$
<b>55b</b>	$4.1 \pm 0.6$	$0.08 \pm 0.01$	$(2 \pm 0.3) \times 10^4$
LN-1-255 ( <b>55c</b> )	$0.70 \pm 0.05$	$0.15 \pm 0.01$	$(21 \pm 2) \times 10^4$

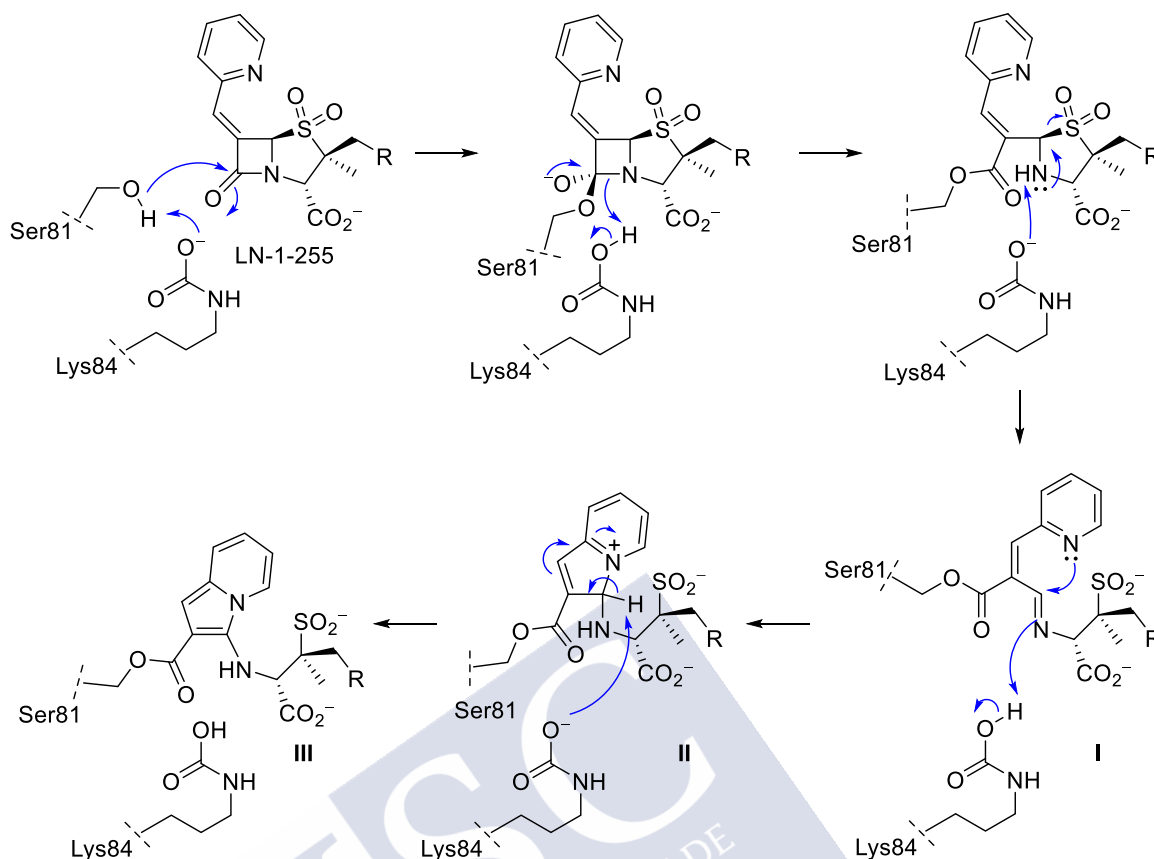
<sup>a</sup>tazobactam  $K_i = 271 \pm 37 \mu\text{M}$ .

La resolución de la estructura cristalográfica del enzima OXA-24/40 procedente de *A. baumannii* covalentemente modificado por el compuesto **55b** (código PDB 3FZC,<sup>91</sup> 2.0 Å), puso de manifiesto la relevancia de las numerosas interacciones lipofílicas entre el aducto de indolizina formado por este tipo de 6-(2-piridil)metiliden sulfonopenicilinas, y los residuos situados en el túnel de entrada al centro activo (Figura 15). El aducto de indolizina provocaría un incremento de la hidrofobicidad de esta parte del centro activo, dificultando aún más la aproximación de la molécula de agua necesaria para la hidrólisis final del aducto y la regeneración del enzima.



**Figura 15.** Estructura cristalográfica de la OXA-24/40 procedente de *A. baumannii* modificada covalentemente por el inhibidor **55b** (código PDB 3FZC,<sup>91</sup> 2.0 Å). Destaca como el anillo de indolizina ocupa la entrada tipo túnel.

El mecanismo de inactivación del enzima OXA-24/40 por el inhibidor LN-1-255 (**55c**) se iniciaría con el ataque nucleófilo del residuo de serina catalítico al carbonilo  $\beta$ -lactámico, lo que desencadenaría la apertura del anillo de dioxotiazolidina y la generación de la imina intermedia **I** (Esquema 3).<sup>91</sup> A continuación, esta última sufriría un ataque nucleófilo por parte del par electrónico libre del átomo de nitrógeno del anillo de piridina dando lugar al intermedio **II**. Por último, la aromatización del intermedio **II** generaría el aducto de indolizina **III**.



**Esquema 3.** Mecanismo propuesto de la inactivación del enzima OXA-24/40 por el inhibidor LN-1-255 (**55c**).

Los excelentes resultados logrados en la inhibición del enzima OXA-24/40 procedente de *A. baumannii*, posicionaron al compuesto LN-1-255 (**55c**) como un prometedor inhibidor de las CHDLs que más problemas causan en clínica. De ahí que en nuestro grupo de investigación, en colaboración con el grupo de microbiología del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC) dirigido por el Dr. Germán Bou, nos centramos en evaluar su potencial frente a este tipo de enzimas, tanto *in vitro* como *in vivo*, mecanismo de resistencia para las que la mayoría de los inhibidores descritos en bibliografía presentan escasa eficacia, y que permitiría recuperar el uso de los carbapenems, que en muchos casos es la única opción disponible actualmente.

Los primeros estudios microbiológicos realizados se dirigieron a conocer la capacidad del LN-1-255 (**55c**) para inhibir la carbapenemasa OXA-48 procedente de

*K. pneumoniae*, ampliamente extendida en Europa.<sup>131</sup> Los resultados de los ensayos cinéticos mostraron una excelente afinidad por el enzima en el rango nanomolar ( $K_i = 170$  nM). Por otro lado, el compuesto demostró incrementar significativamente la susceptibilidad del meropenem e imipenem en cepas portadoras de la OXA-48 entre 4 a 16 veces, respectivamente, lo que es muy superior a la proporcionada por la misma dosis de tazobactam (**31**) (Tabla 5). Pero lo más relevante es que, cuando además de expresar la OXA-48, la bacteria presentaba déficit de dos tipos de porinas, el LN-1-255 (**55c**) mostró reducir 8 veces la CIM de estos antibióticos, al contrario que en el caso de tazobactam (**31**), que tuvo muy poca o ninguna eficacia. Estos análisis evidenciaron que el inhibidor LN-1-255 (**55c**) es capaz de aumentar la actividad *in vitro* de antibióticos incluso en bacterias que presenten una reducción de la permeabilidad de la membrana externa como mecanismo de resistencia añadido.

**Tabla 5.** Valores de CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) del meropenem y el imipenem frente a cepas de aislados clínicos y de *K. pneumoniae*, con y sin expresión de la OXA-48 y con y sin déficit de porinas, en ausencia y en presencia de inhibidor ( $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Combinación (antibiótico/inhibidor)	sin OXA-48 $\Delta\text{ompK35/36}^a$	con OXA-48	con OXA-48 $\Delta\text{ompK35/36}^a$
meropenem/--	0.25	16	64
meropenem/tazobactam	0.25	8	32
meropenem/LN-1-255	0.25	4	8
imipenem/--	0.5	64	128
imipenem/tazobactam	0.25	32	128
imipenem/LN-1-255	0.25	4	16

<sup>a</sup>Cepa carente de las porinas  $\Delta\text{ompK35}$  y  $\Delta\text{ompK36}$ .

La actividad *in vitro* del LN-1-255 (**55c**) también fue evaluada frente a las principales cepas de la bacteria prioritaria *A. baumannii* productoras de las carbapenemasas de clase D más relevantes de este patógeno. En la Tabla 6 se

<sup>131</sup> Vallejo, J. A.; Martínez-Gutián, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; González-Bello, C.; Poza, M.; Buynak, J. D.; Bethel, C. R.; Bonomo, R. A.; Bou, G.; Beceiro, A. J. *Antimicrob. Chemother.* **2016**, *7*, 2171–2180.

muestran algunas de ellas.<sup>58</sup> El inhibidor LN-1-255 (**55c**) demostró tener una excelente capacidad para restaurar la eficacia del meropenem e imipenem frente a todas las cepas que contienen  $\beta$ -lactamasas de clase D que hidrolizan carbapenems del patógeno *Acinetobacter baumannii*, incluyendo OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143, OXA-235, y la cromosómica OXA-51, con una actividad significativamente mayor que el tazobactam (**31**) y el avibactam (**21**).

**Tabla 6.** Valores de CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) del meropenem e imipenem frente a cepas de *A. baumannii*, con y sin expresión de OXAs, en ausencia y en presencia de inhibidor ( $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Combinación (antibiótico/ inhibidor)	sin OXA	con OXA-23	con OXA-23 <sup>a</sup>	con OXA-24/40	con OXA-24/40 <sup>a</sup>	con OXA-143 <sup>a</sup>
meropenem/ --	0.5	8	16	64	256	128
meropenem/ avibactam	0.5	4	8	16	128	32
meropenem/ tazobactam	0.5	8	8	64	256	128
meropenem/ LN-1-255	0.5	0.5	1	0.25	8	4
imipenem/ --	0.5	16	32	64	256	32
imipenem/ avibactam	0.5	8	8	32	128	4
imipenem/ tazobactam)	0.5	8	16	64	256	16
imipenem/ LN-1-255	0.5	0.5	1	0.5	8	2

<sup>a</sup>Cepa aislada en clínica.

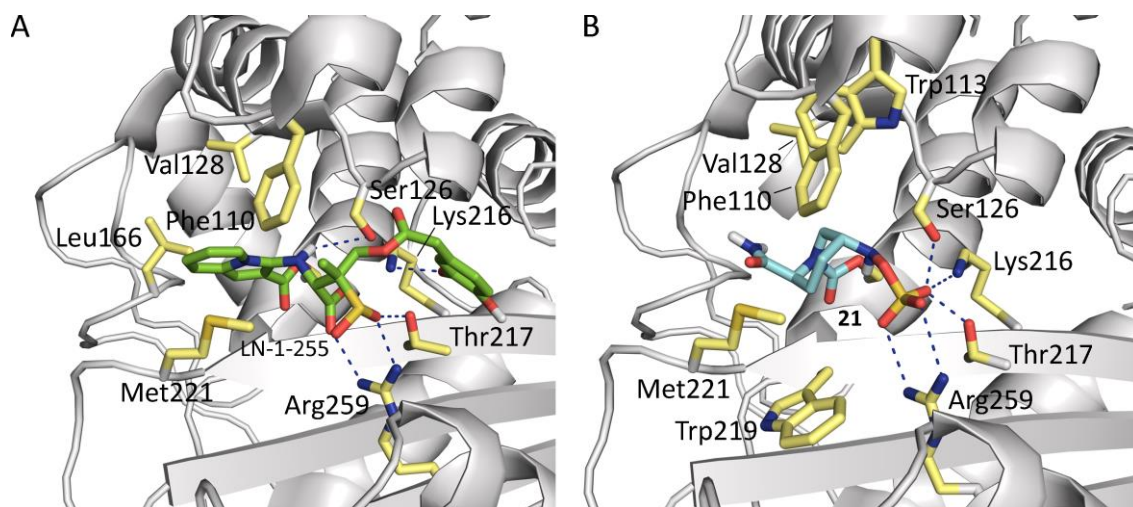
De igual forma, los estudios cinéticos realizados mostraron que, a excepción de la OXA-51, las  $K_i$  del LN-1-255 (**55c**) están en el rango del nanomolar (54–350 nM) frente a afinidades en el rango micromolar (9–172  $\mu\text{M}$ ) para el tazobactam (**31**) y el avibactam (**21**) (Tabla 7).<sup>58</sup>

**Tabla 7.** Parámetros cinéticos más representativos de los inhibidores LN-1-255 (**55c**), avibactam (**21**) y tazobactam (**31**) frente a las CHDLs procedentes de *A. baumannii*.

Inhibidor	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{\text{inact}}$ ( $\text{ms}^{-1}$ )	$k_{\text{inact}}/K_i$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
OXA-23			
Avibactam ( <b>21</b> )	$203.93 \pm 22.6$	$57 \pm 9$	$(0.29 \pm 0.06) \times 10^9$
Tazobactam ( <b>31</b> )	$19.73 \pm 4.71$	$23 \pm 4$	$(1.18 \pm 0.078) \times 10^9$
LN-1-255 ( <b>55c</b> )	$0.30 \pm 0.08$	$41 \pm 5$	$(1.39 \pm 0.29) \times 10^{11}$
OXA-24			
Avibactam ( <b>21</b> )	$113.93 \pm 35.93$	$18 \pm 7$	$(0.16 \pm 0.04) \times 10^9$
Tazobactam ( <b>31</b> )	$12.38 \pm 3.14$	$7 \pm 2$	$(0.72 \pm 0.36) \times 10^9$
LN-1-255 ( <b>55c</b> )	$0.24 \pm 0.05$	$22 \pm 2$	$(9.82 \pm 3.21) \times 10^{10}$
OXA-51			
Avibactam ( <b>21</b> )	$430.94 \pm 122.43$	$4 \pm 0.8$	$(9.28 \pm 0.93) \times 10^6$
Tazobactam ( <b>31</b> )	>5000	ND	ND
LN-1-255 ( <b>55c</b> )	$29.82 \pm 7.81$	$2.2 \pm 0.5$	$(74.9 \pm 3.8) \times 10^6$
OXA-235			
Avibactam ( <b>21</b> )	$5.73 \pm 1.01$	$16 \pm 6$	$(2.81 \pm 0.58) \times 10^9$
Tazobactam ( <b>31</b> )	$266.22 \pm 50.05$	$50 \pm 17$	$(0.20 \pm 0.08) \times 10^9$
LN-1-255 ( <b>55c</b> )	$0.044 \pm 0.025$	$24 \pm 7$	$(7.58 \pm 5.17) \times 10^{11}$

Estudios de modelado molecular realizados con el inhibidor LNN-1-255 (**55c**) y la OXA-23 revelaron que el aducto de indolizina establecería interacciones polares fuertes con los residuos de Arg259, Lys216, Ser126 y Thr217 (Figura 16). Además, el grupo indolizina se encontraría inmerso en el bolsillo apolar situado cerca de la entrada tipo túnel, formado por las cadenas laterales de los residuos de Val128 y Leu166. Por su parte, la unidad de catecol se situaría en el otro bolsillo de mayor tamaño situado cerca del centro activo, adoptando muy diversas disposiciones ya que es muy flexible. Comparando el modo de unión del LN-1-255 (**55c**) y el avibactam (**21**) se observa que, aunque ambos establecen interacciones polares muy similares con los mismos residuos del centro activo, pero el avibactam (**21**)

carece de las interacciones proporcionadas por los grupos indolizina y catecol con los residuos de Val128, Leu166 y Lys216.



**Figura 16.** Interacciones más relevantes de la inactivación de la OXA-23 de *A. baumannii* por los inhibidores LN-1-255 (**55c**) (A) y avibactam (**21**) (B) obtenidas mediante estudios de modelado molecular. Se muestran los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas entre los ligandos y el enzima mediante líneas discontinuas (azul). Se muestran y etiquetan las cadenas laterales de los residuos más relevantes.

Por último, la evaluación *in vivo* de la eficacia terapéutica de LN-1-255 (**55c**) en combinación con imipenem, en un modelo experimental de neumonía murina causada por transformantes de *A. baumannii* resistentes a carbapenem y aislados clínicos productores de  $\beta$ -lactamasas de clase D que hidrolizan carbapenems, reveló que esta combinación proporciona una mayor protección contra la neumonía que el tratamiento con solo imipenem.<sup>35</sup> LN-1-255 (**55c**) provoca una disminución en los valores de CIM del imipenem de entre 32 y 128 veces. El tratamiento intramuscular con imipenem/LN-1-255 (30/50 mg/kg) redujo la carga bacteriana en la infección causada por las cepas ATCC 17978-OXA-23, aislados clínicos que expresan OXA-23, ATCC 17978-OXA24/40, y aislados clínicos productoras de OXA-24/40 de 4, 1.7, 2.5 y 4.5 log<sub>10</sub> UFC/g de pulmón, respectivamente. Además, no se observó toxicidad en los ratones tratados.

### 3.2 Diseño de 6-Arilmetiliden Sulfonopenicilinas Conjugadas a Catecol como Potenciales Inhibidores de las $\beta$ -Lactamasas

Teniendo en cuenta: (i) los excelentes resultados preclínicos obtenidos con el inhibidor LN-1-255 (**55c**) mencionados en el anterior apartado; (ii) la falta de tratamientos eficientes en clínica, para el tratamiento de infecciones causadas por las  $\beta$ -lactamasas que más han evolucionado para inactivar cefalosporinas de espectro expandido e incluso carbapenems, las CDHLs, que se encuentran con frecuencia en agentes patógenos mortales como *A. baumannii* multirresistente (OXA-23, OXA-24/40) o *Enterobacteriaceae* (OXA-48); y (iii) la creciente diseminación a nivel mundial de este tipo de carbapenemasas; en esta tesis doctoral abordamos el diseño y desarrollo de nuevos análogos del inhibidor LN-1-255 (**55c**) dirigidos a mejorar y expandir su actividad frente a diversas serina- $\beta$ -lactamasas. Esto se pretendió llevar a cabo potenciando las interacciones lipofílicas del ligando con la estructura inusual de este tipo de enzimas, en concreto, el túnel de entrada al centro activo en los enzimas OXA-23 y OXA-24/40, así como la zona apolar característica de las OXA-48, también clave en su extraordinaria eficacia en la hidrólisis de los carbapenems. De esta forma se incrementaría la estabilidad del aducto de indolizina, al dificultar más aún su hidrólisis final que conduciría a la regeneración catalítica. Con este fin, se estudió el efecto de: (i) la incorporación de sustituyentes en el anillo de piridina del inhibidor original que modificasen la densidad electrónica del mismo; y (ii) el uso de heterociclos basados en piridina de mayor tamaño. Así mismo se evaluó la capacidad inhibitoria de este tipo de sulfonopenincilinas conjugadas a catecol frente a  $\beta$ -lactamasas de tipo A y C. Esto se llevó a cabo con los compuestos **33–37** (Figura 17).

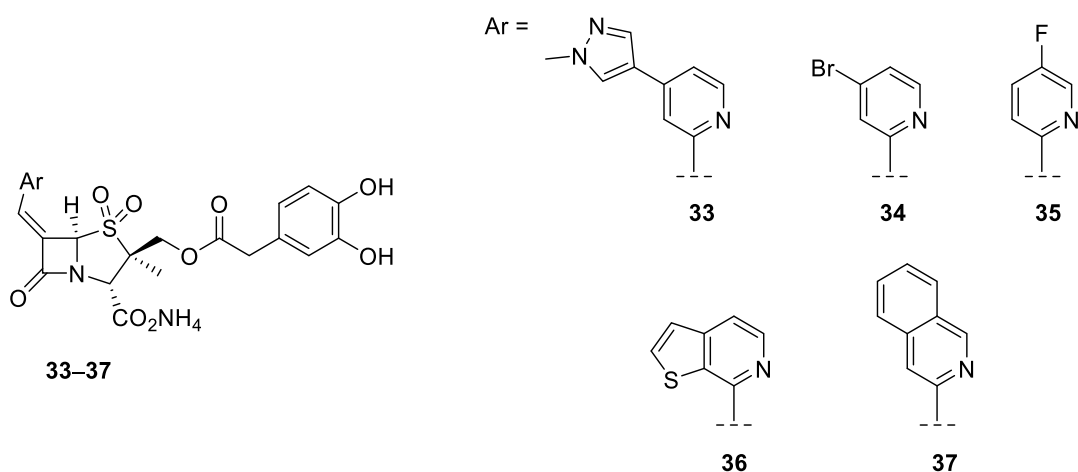


Figura 17. Compuestos objetivo 33–37.

### 3.3 Síntesis de los Compuestos 33–37

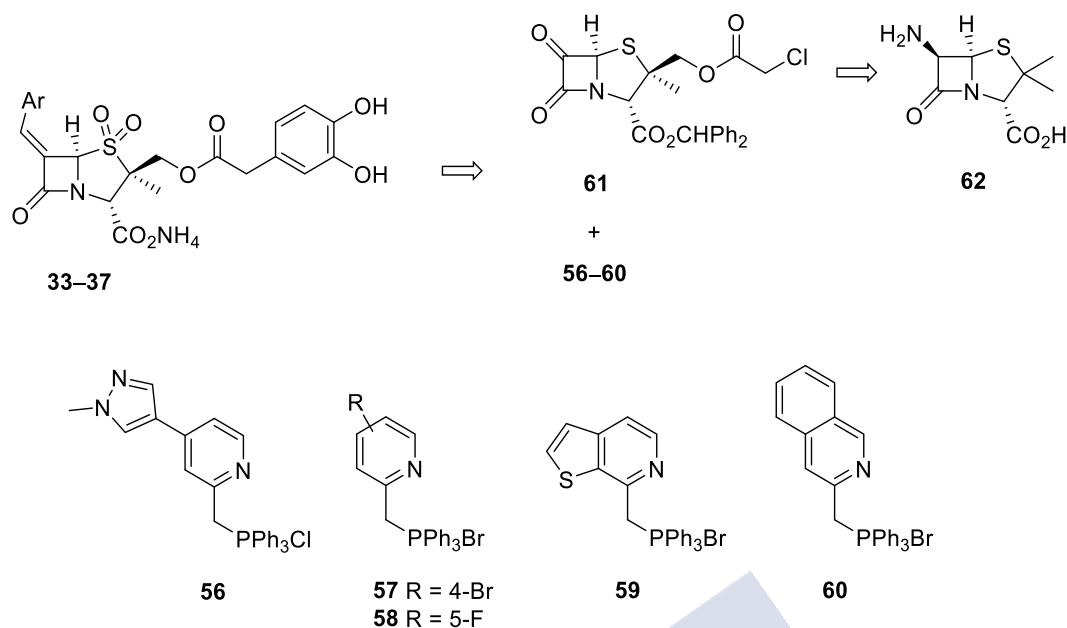
La síntesis de los compuestos **33–37** implicó como etapa clave una reacción de Wittig entre las sales de fosonio **56–59** y el bromuro de 3-isoquinolilmetiltrifenilfosonio (**60**)<sup>132</sup> previamente descrito, y la cetona **61**, que se sintetizó en seis etapas a partir del ácido (+)-6-aminopenicilánico (**62**) disponible comercialmente siguiendo protocolos modificados (Esquema 4).<sup>133,134,135</sup>

<sup>132</sup> Balsamini, C.; Bedini, A.; Diamantini, G.; Spadoni, G.; Tarzia, G.; Tontini, A.; Di Fabio, R.; Donati, D. // *Farmaco* **1999**, *54*, 101–111.

<sup>133</sup> Buynak, J. D.; Sheri, A.; Pagadala, S. R. R. Preparation and antibacterial activity of  $\beta$ -lactamase inhibitory compounds. US 20100009954, January, 14, 2010.

<sup>134</sup> Kalp, M.; Sheri, A.; Buynak, J. D.; Bethel, C. R.; Bonomo, R. A.; Carey, P. R. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21588–21591.

<sup>135</sup> Micetich, R. G.; Singh, R. A. *Synthesis* **1985**, *1985*, 693–695.

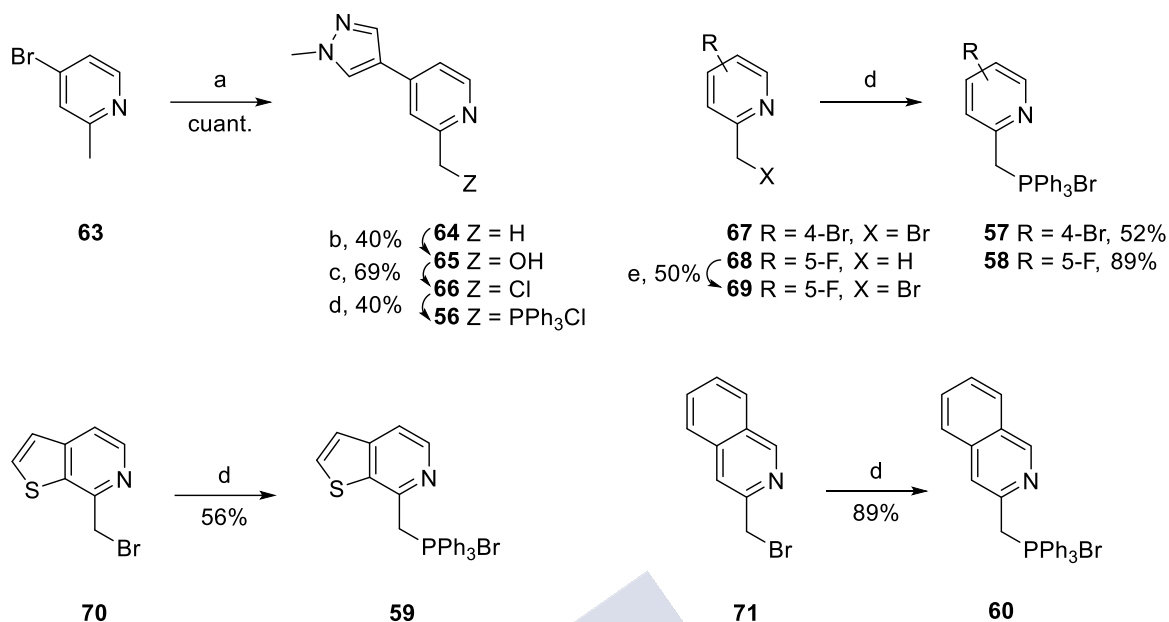


**Esquema 4.** Planteamiento retrosintético para los compuestos **33–37**.

La síntesis de las sales de fosfonio **56–59** se llevó a cabo a partir de las piridinas **63** y **68** disponibles comercialmente y de los bromuros **67**<sup>136</sup> y **70**<sup>137</sup> previamente descritos, tal y como se muestra en el Esquema 5. La sal de fosfonio **56** se preparó en cuatro etapas a partir de la 2-metil-4-bromopiridina (**63**). En primer lugar, la reacción de acoplamiento cruzado carbono-carbono tipo Suzuki empleando el ácido 1-metilpirazol-4-borónico pinacol éster y Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> como catalizador condujo al compuesto **64** con excelente rendimiento. A continuación, la oxidación del grupo metilo bencílico en **64** por tratamiento con ácido *m*-cloroperbenzoico y posterior reacción con anhídrido acético e hidrólisis proporcionó el alcohol **65** con un rendimiento del 40%. Este último se transformó en el cloruro **66** por reacción con cloruro de tionilo. Finalmente, el tratamiento del cloruro **66** con trifenilfosfina condujo a la sal de fosfonio deseada **56**.

<sup>136</sup> Lavoie, E. J.; Parhi, A.; Pilch, D. S.; Zhang, Y.; Kaul, M. Preparation of biphenyl guanidines and related compounds as antimicrobial agents. WO2013106761, July, 18, 2013.

<sup>137</sup> Hirai, K.; Mizushima, Y.; Doteuchi, M. Preparation of [thienopyridinylmethylthio]benzimidazoles as antiulcer agents. EP292051, November 23, 1988.



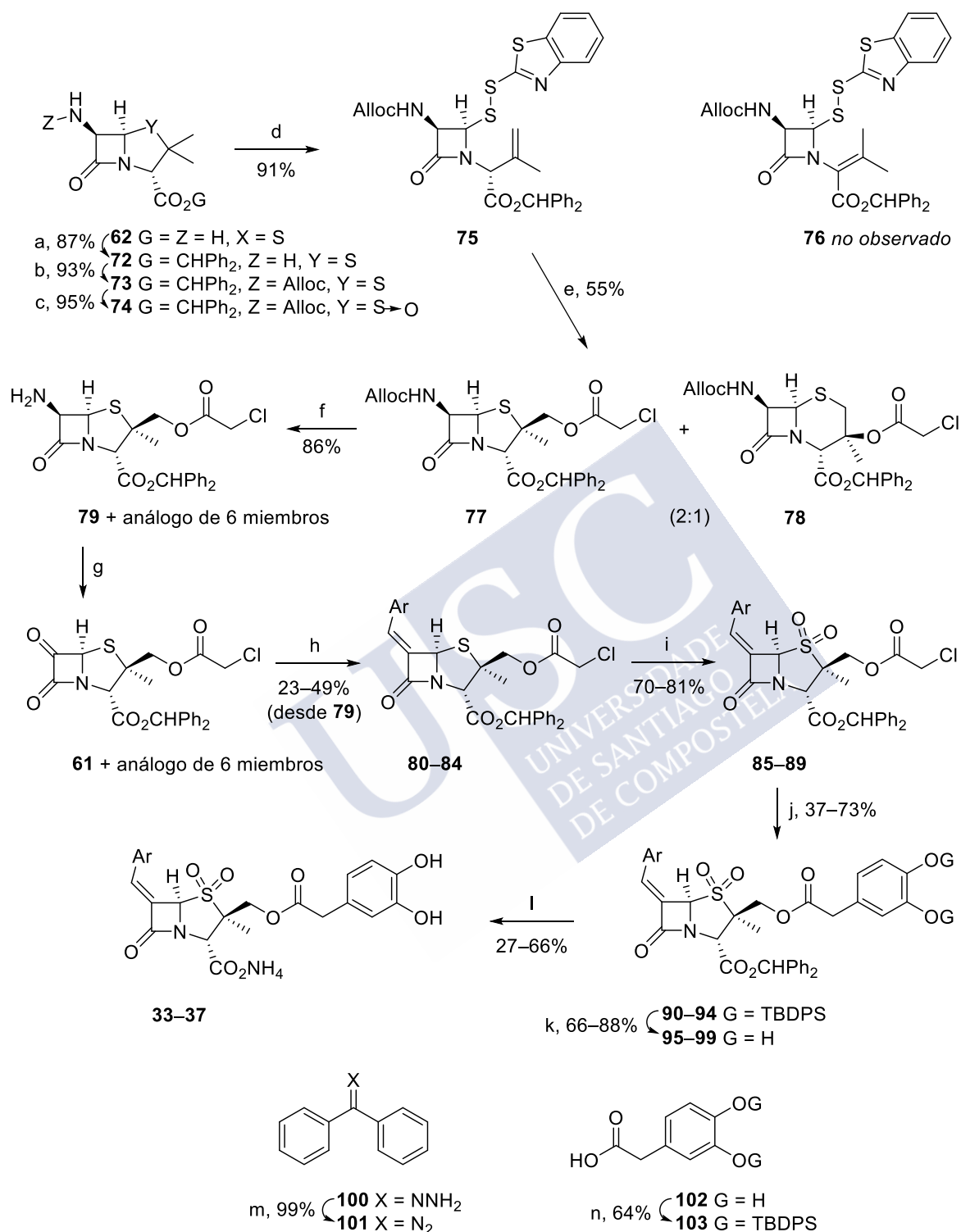
**Esquema 5.** *Reactivos y condiciones:* (a)  $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ , ácido 1-metilpirazol-4-borónico pinacol éster, dioxano,  $\text{K}_3\text{PO}_4(\text{ac.})$ , 85 °C. (b) 1. *m*-CPBA,  $\text{CHCl}_3$ , t.a. 2.  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 90 °C. 3. KOH, MeOH, 0 °C  $\rightarrow$  t.a. (c)  $\text{SOCl}_2$ , DCM, 0 °C  $\rightarrow$  t.a. (d)  $\text{Ph}_3\text{P}$ , PhMe,  $\Delta$ . (e) NBS, AIBN (cat.),  $\text{CCl}_4$ ,  $\Delta$ .

La sal de fosfonio **57** se obtuvo por reacción de sustitución nucleófila bimolecular entre el bromuro **67**<sup>136</sup> y trifenilfosfina. La bromación bencílica de la 2-metil-5-fluoropiridina (**68**) por tratamiento con *N*-bromosuccinimida en presencia de cantidades catalíticas de AIBN condujo al bromuro **69**, que se transformó en la sal de fosfonio **58** mediante un procedimiento similar a la conversión del compuesto **67** en el **57**. Finalmente, la sal de fosfonio **59** se sintetizó a partir del bromuro **70**<sup>137</sup> previamente descrito por tratamiento con trifenilfosfina.

Por otra parte, la síntesis de la dicetona **61** se realizó a partir del sulfóxido **74** previamente descrito, que se obtuvo en tres etapas a partir del ácido (+)-6-aminopenicilánico (**62**) disponible comercialmente (Esquema 6). Las tres etapas de reacción consistieron en: (1) la esterificación del ácido carboxílico en **62** por tratamiento con difenildiazometano (**101**), obtenido por oxidación de la benzofenona hidrazona comercial (**100**);<sup>138</sup> (2) la protección del grupo amino con cloroformiato de alilo en piridina; y finalmente (3) la oxidación del sulfuro con ácido

<sup>138</sup> Thoraval, J. Y.; Nagai, W.; Yeung Lam Ko, Y. Y. C.; Carrie, R. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 3859–3868.

peracético.<sup>133</sup>



**Esquema 6.** *Reactivos y condiciones:* (a) **101**, DCM/MeOH, t.a. (b) Cloroformiato de alilo, Pi, DCM, -10 °C. (c) MeCO<sub>3</sub>H, DCM, -5 °C. (d) 2-mercaptobenzotiazol, MgSO<sub>4</sub>, dioxano, Δ. (e) ClCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, AgOAc, AcOEt, t.a. (f) Bu<sub>3</sub>SnH, Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> (cat.), AcOH, DCM, t.a. (g) 1. Tf<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DCM, -78 °C → 0 °C. 2. Et<sub>3</sub>N, -78 °C. 3. HCl (0.5 M), -78 °C → t.a. (h) 1. **56-59** o **60**,<sup>132</sup> *t*-BuOK, THF, t.a. 2. **61**, DCM,

-78 °C o t.a. (i) *m*-CPBA, DCM, t.a. (j) 1. tiourea, Pi, DMF, 0 °C → t.a. 2. **103**,<sup>139</sup> EDC, DMAP, DCM, -15 °C → t.a. (k) TBAF, AcOH, THF, 0 °C → t.a. (l) 1. *m*-cresol, 50 °C. 2. NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (ac.). (m) MnO<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, DCM, 0 °C. (n) 1. TBDPSCI, Im, DMF, t.a. 2. LiOH (ac.), THF, t.a. 3. HCl (ac.).

El sulfóxido **74** se transformó en el disulfuro **75** siguiendo la estrategia descrita por primera vez por Kamiya y colaboradores, que implica un reordenamiento sigmatrópico térmico del sulfóxido **74** y el subsiguiente atrapado del ácido sulfénico intermedio con 2-mercaptobenzotiazol.<sup>140,141</sup> Sin embargo, se observó que cuando la reacción se llevaba a cabo empleando tolueno como disolvente y empleando un Dean Stark para la eliminación azeotrópica del agua formada, tal y como estaba descrito, se obtenía además del alqueno cinético **75** deseado, el alqueno termodinámico **76** indeseado, cromatográficamente inseparable del anterior. Afortunadamente, se encontró que realizando la reacción en dioxano a reflujo y en presencia de MgSO<sub>4</sub>, se obtiene únicamente el disulfuro **75** deseado con un rendimiento del 91%, gracias a la temperatura más baja de reacción, que se puede utilizar en la siguiente etapa sin necesidad de purificación. La ciclación de **75** por tratamiento con acetato de plata y ácido cloroacético siguiendo procedimientos previamente descritos, condujo a la funcionalización del grupo metilo pro-*R* con un grupo éster. Esta reacción proporcionó una mezcla cromatográficamente inseparable de los dos posibles compuestos, el cinético **77** y el termodinámico **78**, en proporción 2:1.<sup>133,134</sup> Es importante destacar que para lograr esta proporción es necesario realizar un control minucioso del tiempo de reacción, ya que tiempos más prolongados conducen a una reducción drástica del porcentaje del compuesto cinético. Por otra parte, la mezcla de isómeros **77/78** ha de utilizarse rápidamente ya que, incluso en ausencia de disolvente, se observa la conversión del compuesto cinético en el termodinámico.

<sup>139</sup> Alisop, A.; Brooks, G.; Edwards, P. D.; Kaura, A. C.; Southgate, R. J. *Antibiot.* **1996**, *49*, 921–928.

<sup>140</sup> Kamiya, T.; Teraji, T.; Saito, Y.; Hashimoto, M.; Nakaguchi, O.; Oku, T. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 3001–3004.

<sup>141</sup> Buynak, J. D.; Rao, S. A.; Doppalapudi, V. R.; Adam, G.; Petersen, P. J.; Nidamarthy, S. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1997–2002.

A continuación, la desprotección del grupo alilcarbamato en la mezcla de compuestos **77** y **78** condujo a la amina deseada **79** y su análogo de seis miembros en proporción 2:1, de nuevo inseparables mediante cromatografía.<sup>133,134</sup> Chen y colaboradores<sup>130,134</sup> describieron la transformación de la amina **79** (y su isómero de 6 miembros) en la dicetona **61** (y el análogo de 6 miembros) en dos pasos: (1) formación de la correspondiente sal de diazonio por tratamiento con nitrito de isopropilo y cantidades catalíticas de ácido trifluoroacético; y (2) posterior oxidación del crudo de reacción con óxido de propileno en presencia de cantidades catalíticas de octanoato de rodio. No obstante, este método resultó ser poco reproducible, causando la pérdida en muchas ocasiones de gran cantidad de producto. Afortunadamente, se encontró que el tratamiento de la mezcla de las aminas **79** y su análogo con anhídrido tríflico y trietilamina, seguido de tratamiento con ácido clorhídrico diluido proporciona de forma reproducible la dicetona **61** deseada, junto con el análogo de 6 miembros. Además, a diferencia de lo descrito anteriormente fue posible aislar en etapas más tempranas de la síntesis, en concreto después de la reacción de Wittig que se discutirá a continuación, los compuestos objetivo de 5 miembros de sus isómeros no deseados de 6.

La siguiente etapa consistió en la reacción de Wittig entre la dicetona **61** y su análogo de 6 miembros, y los correspondientes iluros de las sales de fosfonio **56–60** obtenidos por tratamiento con *tert*-butóxido potásico (Esquema 6). De esta forma se obtuvieron los compuestos **80–84** con un rendimiento global del 23–49%, calculado a partir de la mezcla de aminas **79** y su isómero de 6 miembros. Los compuestos **80–84** se transformaron satisfactoriamente en las sulfonas **85–89** por oxidación con ácido *m*-cloroperbenzoico. A continuación el grupo catecol se introdujo en dos etapas: (i) la eliminación del grupo cloroacetoxi en **85–89** por tratamiento con tiourea y piridina; y (ii) la esterificación de los alcoholes resultantes con el ácido **103**,<sup>139</sup> que se obtuvo a partir del ácido 3,4-dihidroxifenilacético (**102**) siguiendo procedimientos descritos. Para la esterificación se empleó *N*-(3-(dimetilamino)propil)-*N'*-etilcarbodiimida como agente acoplante y 4-*N,N*-

dimetilaminopiridina en cantidades estequiométricas. Finalmente, la desprotección de los grupos TBDPS en los ésteres **90–94** resultantes por reacción con fluoruro de tetrabutilamonio en presencia de ácido acético, seguido de la eliminación del grupo bencidrilo por tratamiento de los catecoles **95–99** resultantes por tratamiento con *m*-cresol, y subsiguiente neutralización con bicarbonato amónico proporcionó los compuestos objetivo **33–37**.

### 3.4 Estudios de Sensibilidad Antibiótica

En colaboración con el grupo del Dr. Alejandro Beceiro del CHUAC, se evaluó la capacidad de los compuestos **33–37** en restaurar el poder antibiótico de la ampicilina, la ceftazidima y el imipenem frente a cepas resistentes de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *E. coli*. Para ello se determinó la CIM de cada antibiótico, en presencia y en ausencia de los compuestos **33–37**. Los resultados se compararon con los obtenidos con el inhibidor original LN-1-255 (**55c**), cuya síntesis se realizó en nuestro grupo de investigación siguiendo el procedimiento antes discutido, así como otros dos inhibidores de  $\beta$ -lactamasas de referencia en uso clínico, el avibactam (**21**) y el relebactam (**22**). Para el estudio se seleccionaron cepas que no tienen un mecanismo de resistencia que no sea el causado por la hidrólisis enzimática del antibiótico  $\beta$ -lactámico y están ampliamente distribuidas en los patógenos prioritarios. En concreto, se emplearon tres cepas bacterianas productoras de enzimas CHDL (OXA-23, OXA-24/40 y OXA-48), dos cepas que expresan enzimas de clase A (TEM-1 y CTX-M-2) y dos cepas que albergan  $\beta$ -lactamasas de clase C (CMY-2 y DHA-1).<sup>142</sup> El análisis se efectuó empleando el método de microdilución y cada valor de CIM es el resultado de la media de tres

<sup>142</sup> Rodríguez, D.; Maneiro, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; Beceiro, A.; González-Bello, C. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 3737–3755.

réplicas independientes siguiendo el criterio CLSI.<sup>143</sup> Los resultados de los estudios microbiológicos se recogen en la Tabla 8.

Los resultados obtenidos revelaron que la combinación ceftazidima/**33–36** permite recuperar completamente la eficacia del antibiótico a niveles similares que los obtenidos con LN-1-255 (**55c**) y con el relebactam (**22**), proporcionando valores de CIM para la ceftazidima de  $\leq 0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  en cepas de *E. coli* que expresan CMY-2 y DHA-1. En condiciones similares, la combinación ceftazidima/**37** resultó ser mucho menos eficiente, con un valor de CIM de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Una tendencia similar se observó con la combinación ampicilina/**33–36** en la cepa de *E. coli* que expresa TEM-1, recuperándose la eficacia de la ampicilina por completo (CIM =  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y al mismo nivel que con LN-1-255 (**55c**), mientras que en el caso de la combinación ampicilina/**37** la actividad *in vitro* observada resultó ser la mitad (CIM =  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los estudios realizados con la cepa de *E. coli* productora de la  $\beta$ -lactamasa de clase A CTX-M-2 revelaron que las mejores combinaciones para este caso son ampicilina/**33** y ampicilina/**34**, las cuales lograron una reducción de la CIM del antibiótico de 64 veces, de modo similar al relebactam (**22**) y al LN-1-255 (**55c**).

---

<sup>143</sup> *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI supplement M100, 27<sup>th</sup> ed.*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2017. [https://clsi.org/media/1469/m100s27\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1469/m100s27_sample.pdf)

**Tabla 8.** Valores de CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para el imipenem, la ampicilina y la ceftazidima con las cepas *A. baumannii* ATCC 17978, *K. pneumoniae*  $\Delta\text{ompK 35/36}$  y *E. coli* TG1 pBGS18 productoras de las  $\beta$ -lactamasas más representativas de clases D (OXA-23, OXA-24/40 y OXA-48), A (TEM-1 y CTX-M-2), y C (CMY-2 y DHA-1), en presencia o ausencia de inhibidores de  $\beta$ -lactamasas LN-1-255 (55c), 34-38, avibactam (21) y relebactam (22).<sup>a,b</sup>

Cepas bacterianas	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>E. coli</i> TG1 +		<i>E. coli</i> TG1 +		
	ATCC17978 + pET-RA-KmR	IMP	ATCC17978 + $\Delta\text{ompK 35/36}$ + pET-RA-KmR	IMP	pBGS18/TEM-1	AMP	pBGS18/CTX-M-2	AMP	pBGS18/CMY2
Antibiótico	IMP	IMP	IMP	IMP	AMP	AMP	CTZ	CTZ	CTZ
Sin inhibidor	8	64	64	64	>1024	>1024	32	32	32
Avibactam (21) <sup>c</sup>	4	16	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Relebactam (22) <sup>c</sup>	8	64	8	8	4	16	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$
LN-1-255 (55c) <sup>c</sup>	0.5	0.5	4	4	2	16	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$
33 <sup>c</sup>	1	1	8	8	2	16	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$
34 <sup>c</sup>	1	1	4	4	2	16	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$
35 <sup>c</sup>	1	1	4	4	2	32	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$
36 <sup>c</sup>	2	8	64	64	2	256	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$
37 <sup>c</sup>	2	2	8	8	4	256	2	2	2
Cepas <i>wild type</i> sin $\beta$ -lactamasa	0.5	0.5	0.5	0.5	2	2	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$

<sup>a</sup>Los datos representan la media de tres experimentos independientes. <sup>b</sup>IM, imipenem; AMP, ampicilina; CTZ, ceftazidima. <sup>c</sup>La concentración de los inhibidores =  $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ . NA, no aplicable (avibactam tiene actividad antibiótica frente a *Enterobacteriaceae*).

Los resultados de los estudios de susceptibilidad frente a cepas bacterianas que expresan las carbapenemasas de clase D (OXA-23, OXA-24/40 y OXA-48)

evidenciaron que las combinaciones de imipenem con los compuestos **33–37** son, en su mayor parte, más eficientes que aquellas con avibactam (**21**) y relebactam (**22**), las cuales no mostraron en general un aumento significativo de la eficacia del antibiótico. Los resultados frente a cepas de *A. baumannii* productoras de las  $\beta$ -lactamasas OXA-23 y OXA-24/40 indicaron que las combinaciones de imipenem con los compuestos **33–35** logran recuperar casi completamente la actividad del antibiótico, con valores de CIM de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  en todos los casos. Este efecto potenciador de los análogos **33–37** tan significativo con las cepas resistentes de *A. baumannii*, resultó ser menos acusado con la cepa de *K. pneumoniae* portadora de OXA-48. Para esta cepa, los mejores resultados *in vitro* se obtuvieron con las combinaciones del antibiótico imipenem y los inhibidores **34** y **35**.

Con el objeto de demostrar que: (i) los resultados de susceptibilidad obtenidos se deben a la inhibición de las  $\beta$ -lactamasas producidas por las cepas analizadas; y (2) analizar las interacciones responsables que explicarían los resultados obtenidos; se estudió a continuación el poder inhibitorio de los compuestos **33–37** frente a los enzimas aislados. Para este análisis se seleccionó el enzima OXA-24/40 por ser para el que apenas se disponen de inhibidores eficientes.

### **3.5 Evaluación del Poder Inhibitorio de los Análogos 33–37 frente a la OXA-24/40**

En colaboración con el grupo del Dr. Alejandro Beceiro del CHUAC, se evaluó la capacidad de los ligandos **33–37** de inhibir irreversiblemente la  $\beta$ -lactamasa OXA-24/40 procedente de *A. baumannii*, mediante un ensayo competitivo empleando nitrocefina como sustrato de referencia ( $K_m = 29.1 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 27.0 \text{ s}^{-1}$ ) y la determinación de las  $K_I$  y  $k_{\text{inact}}$ .<sup>58</sup> Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 9.<sup>142</sup>

El mejor inhibidor de la serie fue el bromuro **34**, con una eficacia catalítica ( $k_{\text{inact}}/K_I$ )  $\sim 1.6$  veces superior al inhibidor original LN-1-255, principalmente debida

a la mejora significativa en su afinidad por el enzima ( $K_i = 140$  nM), con un descenso de casi el 50% en comparación con LN-1-255 (**55c**) ( $K_i = 234$  nM), y el mismo valor de  $k_{inact}$  ( $22$  ms<sup>-1</sup>). El derivado de metilpirazol **33** mostró una eficacia catalítica un poco mejor que LN-1-255, debido principalmente a su mayor velocidad de inactivación ( $k_{inact} = 24$  ms<sup>-1</sup>). El fluoruro **35** demostró ser el inhibidor que más rápidamente inactiva el enzima ( $k_{inact} = 25$  ms<sup>-1</sup>), pero pierde afinidad por el mismo ( $K_i = 495$  nM). Los ligandos que poseen heterociclos basados en piridinas de mayor tamaño, los análogos **33** y **37**, mostraron un comportamiento bastante diferente entre ellos. Así, mientras que el compuesto **36** tiene una buena afinidad por el enzima ( $K_i = 247$  nM), su velocidad de inactivación es mucho más baja, aproximadamente la mitad de los restantes análogos. Por último, la velocidad de inactivación del enzima por la isoquinolina **37** demostró ser muy lenta, lo que impidió su determinación.

**Tabla 9.** Parámetros cinéticos de la inhibición de la *A. baumannii* OXA-24/40 por los compuestos **33–37** y LN-1-255 (**55c**).<sup>a</sup>

Inhibidor	$K_i$ (nM)	$k_{inact}$ (ms <sup>-1</sup> )	$k_{inact}/K_i$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
LN-1-255 ( <b>55c</b> )	234 ± 48	22 ± 2	9.82 ± 3.22 10 <sup>4</sup>
<b>33</b>	217 ± 19	24 ± 6	10.97 ± 2.74 10 <sup>4</sup>
<b>34</b>	140 ± 26	22 ± 4	15.90 ± 0.01 10 <sup>4</sup>
<b>35</b>	495 ± 95	25 ± 11	4.89 ± 1.36 10 <sup>4</sup>
<b>36</b>	247 ± 167	11 ± 5	4.76 ± 1.50 10 <sup>4</sup>
<b>37</b>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>

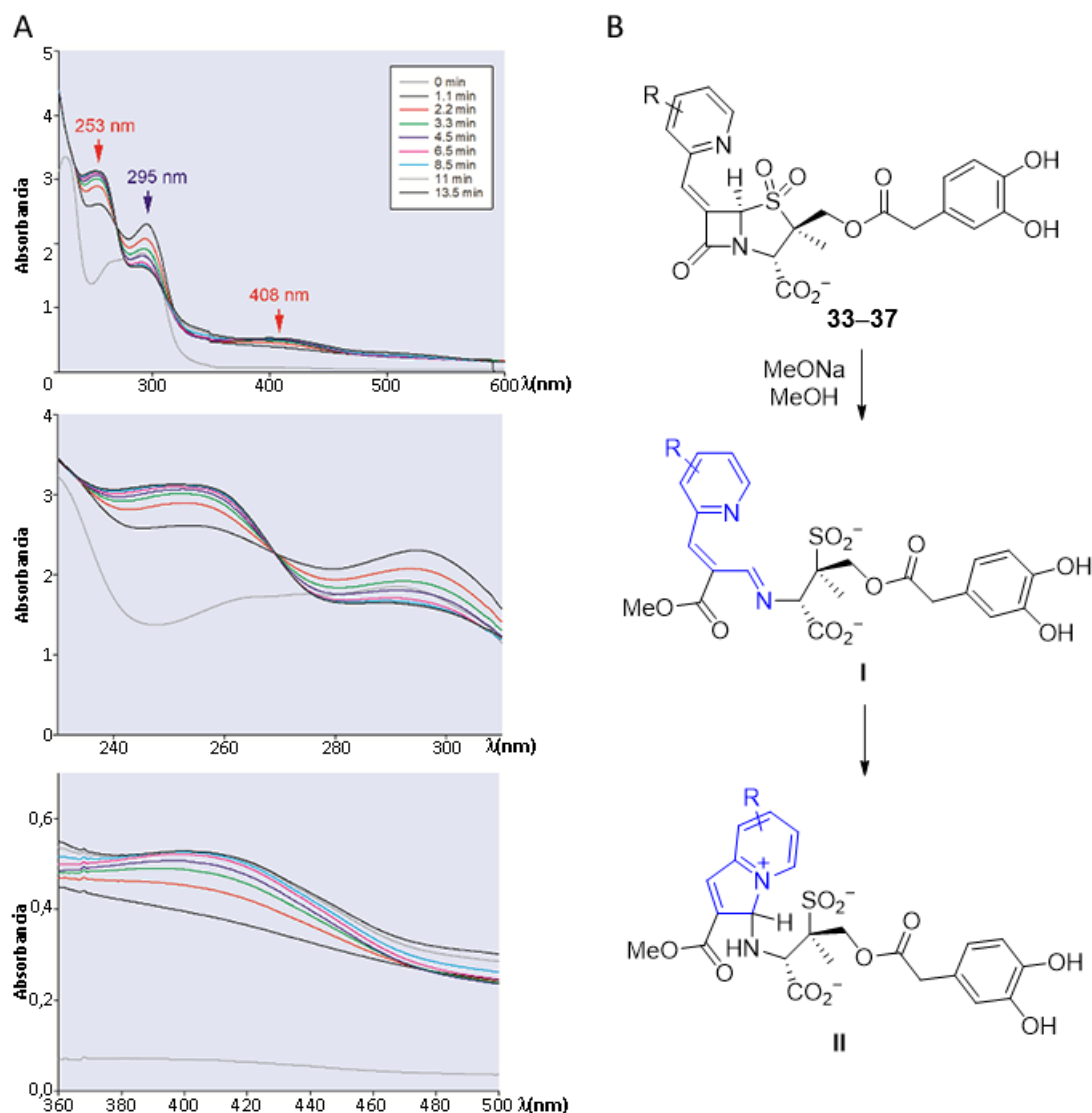
<sup>a</sup>Los datos representan la media de tres experimentos independientes. <sup>b</sup>ND, no determinado.

Globalmente, los resultados obtenidos revelan que no parece existir correlación entre la nucleofilia del átomo de nitrógeno del anillo de piridina y la velocidad de inactivación del enzima, ya que tanto la introducción de sustituyentes aceptores de electrones (F, Br), como dadores de electrones en las posiciones *para*- o *meta*-, o anillos ricos en electrones (pirazolpiridina) proporcionan  $k_{inact}$  mayores o iguales

que las del inhibidor original. Por el contrario, la introducción de sustituyentes en el anillo de piridina parece jugar un papel más importante en: (i) la afinidad del ligando por el enzima; (ii) la formación del aducto enzima/inhibidor; y/o (iii) la estabilidad del aducto de indolizina generado. Además, la comparación de los resultados de la potencia inhibitoria de los compuestos **33–35** frente al enzima OXA-24/40 procedente de *A. baumannii* con los resultados *in vitro* (CIM = 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), sugiere que la permeabilidad a través de la membrana bacteriana del metilpirazol **33** y el bromuro **34** es menor que la del fluoruro **35**.

### 3.6 Mecanismo de Inhibición de los Compuestos 33–37

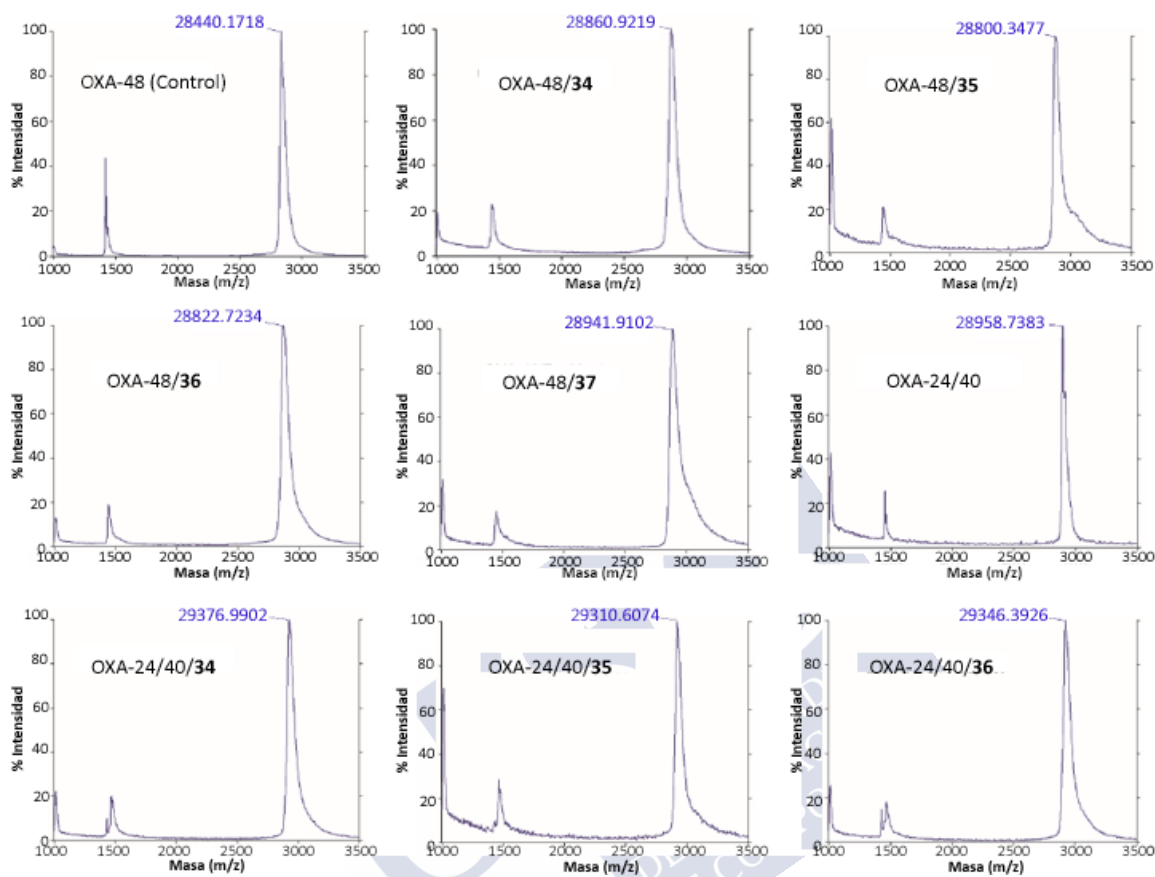
De cara a conocer más en detalle el mecanismo de acción de los ligandos, se estudió la formación de los aductos de indolizina derivados de **33–37** por mediante espectroscopía UV-vis. Para ello se monitorizó (200–600 nm) la metanólisis de los compuestos **33–37** por tratamiento con MeONa (1 M en MeOH) a 25 °C durante 15 min (Figura 18). Los espectros mostraron inicialmente la presencia de una banda a 295 nm (datos para el bromuro **34**) correspondiente a la formación de la imina intermedia I. Esta banda decrece rápidamente, al mismo tiempo que se detecta la formación de otras dos bandas nuevas a 253 y 408 nm (para el bromuro **34**) correspondientes a la formación de la indolizina final II, tal y como se confirmó mediante análisis por espectrometría de masas de la mezcla de reacción.<sup>142</sup>



**Figura 18.** Monitorización de la formación del derivado de indolizina del bromuro **34** mediante espectroscopía UV-vis tras su tratamiento con 1 equivalente de MeONa (1 M en MeOH) a 25 °C durante 15 min. (A) Cromatogramas de la monitorización. (B) Mecanismo de acción propuesto para los compuestos **33–37**.

Por otra parte, la modificación irreversible de las  $\beta$ -lactamasas OXA-48 y OXA-24/40 se demostró mediante espectrometría de masas (MALDI), utilizando muestras de los enzimas incubados con los inhibidores **33–37** en una proporción 1:100 enzima/ligando durante 30 min, una vez filtradas, lavadas y concentradas utilizando filtros Amicon-10<sup>®</sup>. Los espectros obtenidos demostraron la formación de aductos de inactivación estables, observándose en cada espectro un pico para el enzima covalente modificado con un incremento de masa entre 360 y 502, lo cual

se corresponde con la pérdida del grupo catecol o del grupo SO<sub>2</sub> en el aducto de indolizina dependiendo del caso (Figura 19).



**Figura 19.** Ejemplos de los espectros de MALDI de muestras OXA-48 y OXA-24/40 tras su incubación con los ligandos **33–37**. Se muestran los espectros de masas de los enzimas libres como control. Las condiciones de incubación fueron Tris.HCl (50 mM, pH 7.0), 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 25 °C y concentración (1:100) proteína/ligando, 30 min. Tras la incubación las muestras se lavaron sucesivamente con NaHCO<sub>3</sub> (5 mM) por centrifugación a 4 °C usando filtros Amicon-10<sup>®</sup> y se concentraron. Se usó ácido sinapínico como matriz para los experimentos MALDI.

### 3.7 Modo de Unión de los Compuestos **33–37**

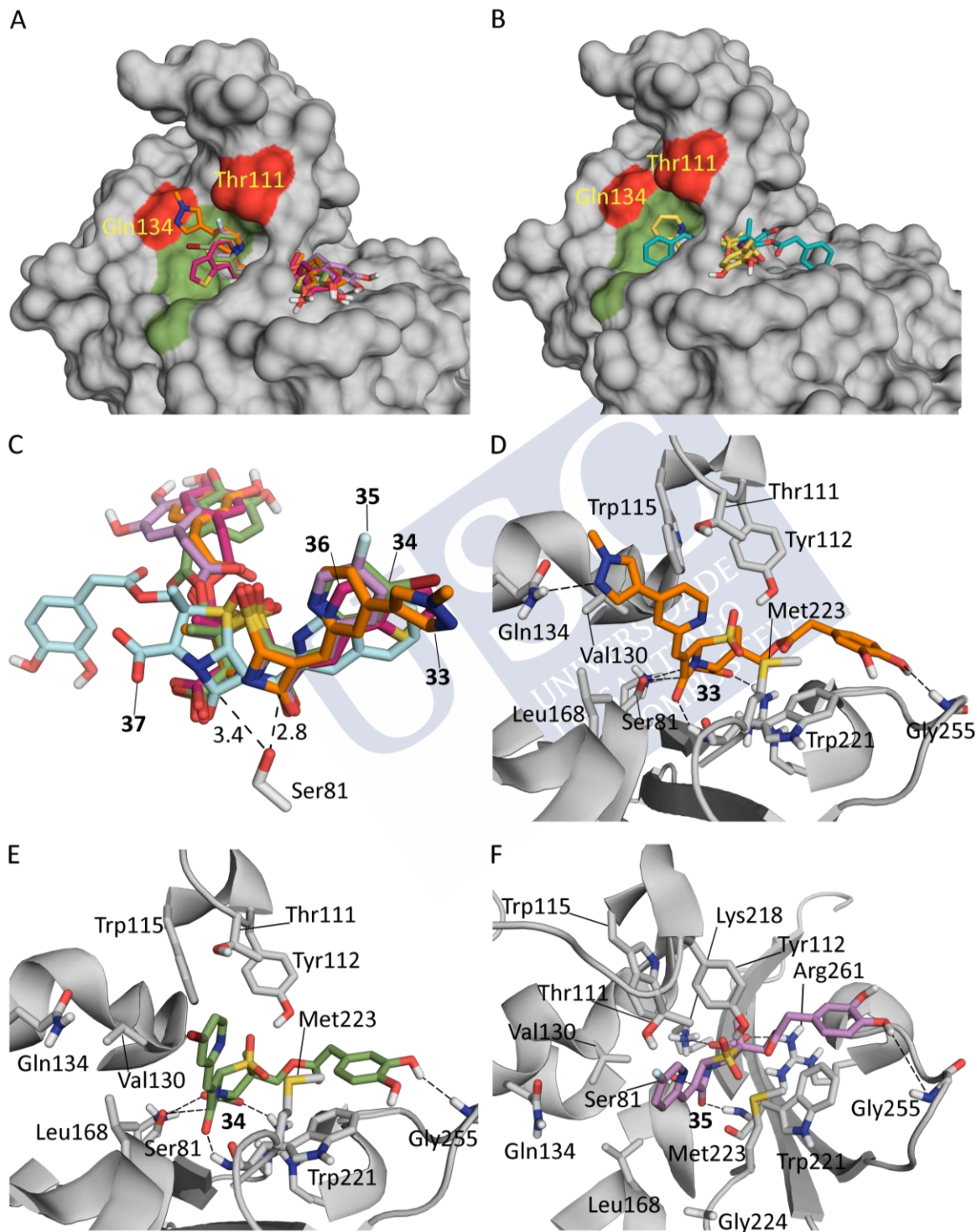
En el grupo de investigación se estudió el modo de unión de los inhibidores **33–37** en el centro activo de la  $\beta$ -lactamasa OXA-24/40 procedente de *A. baumannii* mediante modelado molecular (docking) empleando el programa GOLD versión 5.2.2<sup>144</sup> y las coordenadas cristalográficas del enzima disponible en el PDB con código de acceso 3FV7<sup>91</sup> (2.0 Å).<sup>142</sup>

<sup>144</sup> <https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>

Los estudios realizados demuestran que, a excepción de la isoquinolina **37**, todos los compuestos se anclarían en el centro activo en una disposición similar y apropiada para el ataque nucleófilo de la serina catalítica (Figura 20). Esto se lograría mediante fuertes interacciones electrostáticas y polares que serían similares a las establecidas por el inhibidor original LN-1-255 (**55c**). En todos los casos el grupo catecol tendría una gran flexibilidad, observándose una amplia variedad de disposiciones que indicarían una escasa contribución a la afinidad de los ligandos por el enzima. Para los ligandos **33–36**, el grupo carbonílico del anillo  $\beta$ -lactámico se situaría muy próximo a la serina catalítica, Ser81, y en una disposición apropiada para el ataque nucleófilo que desencadena la reacción enzimática (Figuras 20A y 20C). En estos casos, la distancia estimada entre átomos pesados (átomo de carbono del grupo carbonilo del anillo de  $\beta$ -lactama y átomo de oxígeno de la cadena lateral de la Ser81) sería de  $\sim 2.8$  Å. Por el contrario, el grupo carbonílico de la  $\beta$ -lactama en la isoquinolina **37** se emplazaría más alejado de la serina catalítica ( $\sim 3.4$  Å), al estar el anillo de isoquinolina altamente embebido en la entrada tipo túnel del centro activo, hecho podría explicar su baja  $k_{inact}$  (Figuras 20B y 20C).

El bolsillo que forma la entrada al centro activo en el cual se sitúan los anillos aromáticos de los ligandos **33–37**, es principalmente apolar y contiene los residuos de Val130, Leu168, Gly224 y Trp115 (verde, Figuras 20A y 20B). Este bolsillo se encuentra flanqueado por dos residuos polares, Gln134 y Thr111, capaces de establecer interacciones de enlace hidrógeno (rojo, Figuras 20A y 20B). La interacción de enlace de hidrógeno entre el grupo 1-metilpirazol de **33** y la amida de la cadena lateral del residuo de Gln134, ausente en LN-1-255 (**55c**), parece ser la responsable de su mayor afinidad por el enzima, así como la de fijar la disposición del anillo de piridina en el bolsillo (Figura 20D). Todo ello podría explicar su menor  $K_i$  y mayor  $k_{inact}$  en comparación con LN-1-255 (**55c**). Por otra parte, la proximidad del sustituyente flúor en el compuesto **35** al grupo hidroxilo de la cadena lateral de

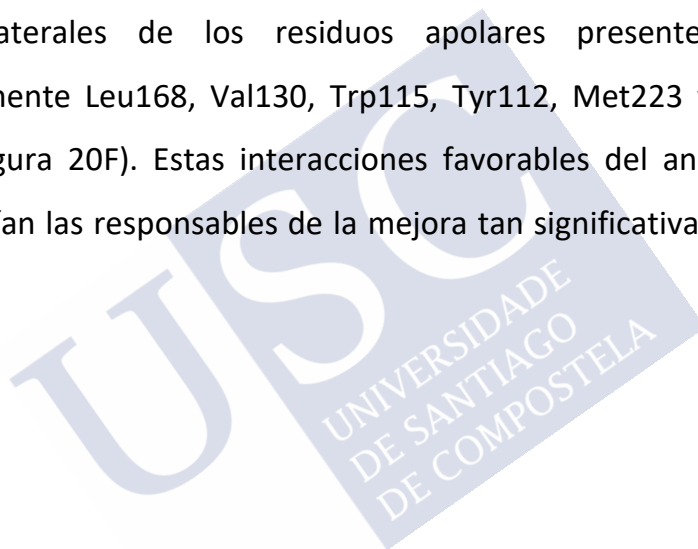
la Thr111 podría explicar la pérdida de afinidad observada experimentalmente (Figura 20E).



**Figura 20.** Modo de unión plausible de los ligandos 33–37 en el centro activo de la OXA-24/40 procedente de *A. baumannii* obtenidos mediante modelado molecular. (A) Comparación del modo de unión del LN-1-255 (amarillo), el metilpirazol 33 (naranja), el bromuro 34 (verde), el fluoruro 35 (violeta), el biciclo 36 (rosa). Se observa que los anillos de piridina estarían situados en la entrada

del centro activo, formado principalmente por residuos apolares (verde, Val130, Leu168, Gly224 y Trp115), y flanqueado por dos residuos polares (rojo, Gln134 y Thr11). (B) Superposición de la conformación de unión de los ligandos LN-1-255 (amarillo) y la isoquinolina **37** (cian). (C) Comparación de la posición relativa de los ligandos **343–37** a la serina catalítica (Ser81). (D–F) Vista detallada de las interacciones de los inhibidores **33**, **34** y **35** con el enzima. Se muestran y etiquetan las cadenas laterales de los residuos más relevantes.

Finalmente, el modo de unión del bromuro **34** propuesto indicaría que el sustituyente (Br) del anillo de piridina no interaccionaría con el enzima, al estar situado en posición *para* con relación al átomo de nitrógeno. Pero lo que es más importante, este sustituyente atractor de electrones reduciría la densidad electrónica del anillo, potenciando así las interacciones CH- $\pi$  del mismo con las cadenas laterales de los residuos apolares presentes a su alrededor, específicamente Leu168, Val130, Trp115, Tyr112, Met223 y el grupo metilo de Thr111 (Figura 20F). Estas interacciones favorables del anillo aromático con el bolsillo serían las responsables de la mejora tan significativa en su afinidad por el enzima.





UJCC  
UNIVERSIDAD  
DE CANTABRIA  
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 4  
*6-Piridilmetiliden Sulfonopenicilinas Conjugadas a  
Grupos Sideróforos*

---



#### 4.1 Estrategia “Caballo de Troya”. Precedentes

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos, ya que actúa como cofactor en enzimas involucrados en procesos redox que están presentes en muchos de los procesos celulares, tales como la transferencia de electrones, la biosíntesis de ARN y los procesos de fosforilación oxidativa.<sup>145</sup> A pH fisiológico, solamente la forma ferrosa de este elemento ( $\text{Fe}^{2+}$ ) es soluble y suele encontrarse en concentraciones entre 0.0001–0.001  $\mu\text{M}$ , mientras que el nivel requerido por las bacterias es aproximadamente entre 1000–10000 veces superior (0.1–10  $\mu\text{M}$ ). Esta baja concentración de hierro constituye una de las primeras barreras de defensa del huésped frente a las infecciones bacterianas. Por este motivo, las bacterias han tenido que desarrollar estrategias eficientes para la captación de  $\text{Fe}^{3+}$  insoluble del medio extracelular.<sup>146</sup> Estos métodos consisten en la producción y excreción de moléculas orgánicas de bajo peso molecular quelantes de  $\text{Fe}^{3+}$  (sideróforos), y su posterior transporte y liberación en el citosol, donde dicho complejo es reducido a la forma  $\text{Fe}^{2+}$  mediante la acción de la ferri-sideróforo ferrireductasa, lo que desencadena la liberación de  $\text{Fe}^{2+}$ , la forma soluble y accesible para el microorganismo.<sup>147</sup>

La mayoría de los sideróforos producidos por las bacterias son catecolatos, aunque también contienen otros grupos quelantes como carboxilatos, hidroxamatos y, en ciertos casos, un mismo compuesto está constituido por los distintos grupos mencionados (Figura 21).<sup>148,149,150</sup>

<sup>145</sup> Schalk, I. J. J. *Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1159–1169.

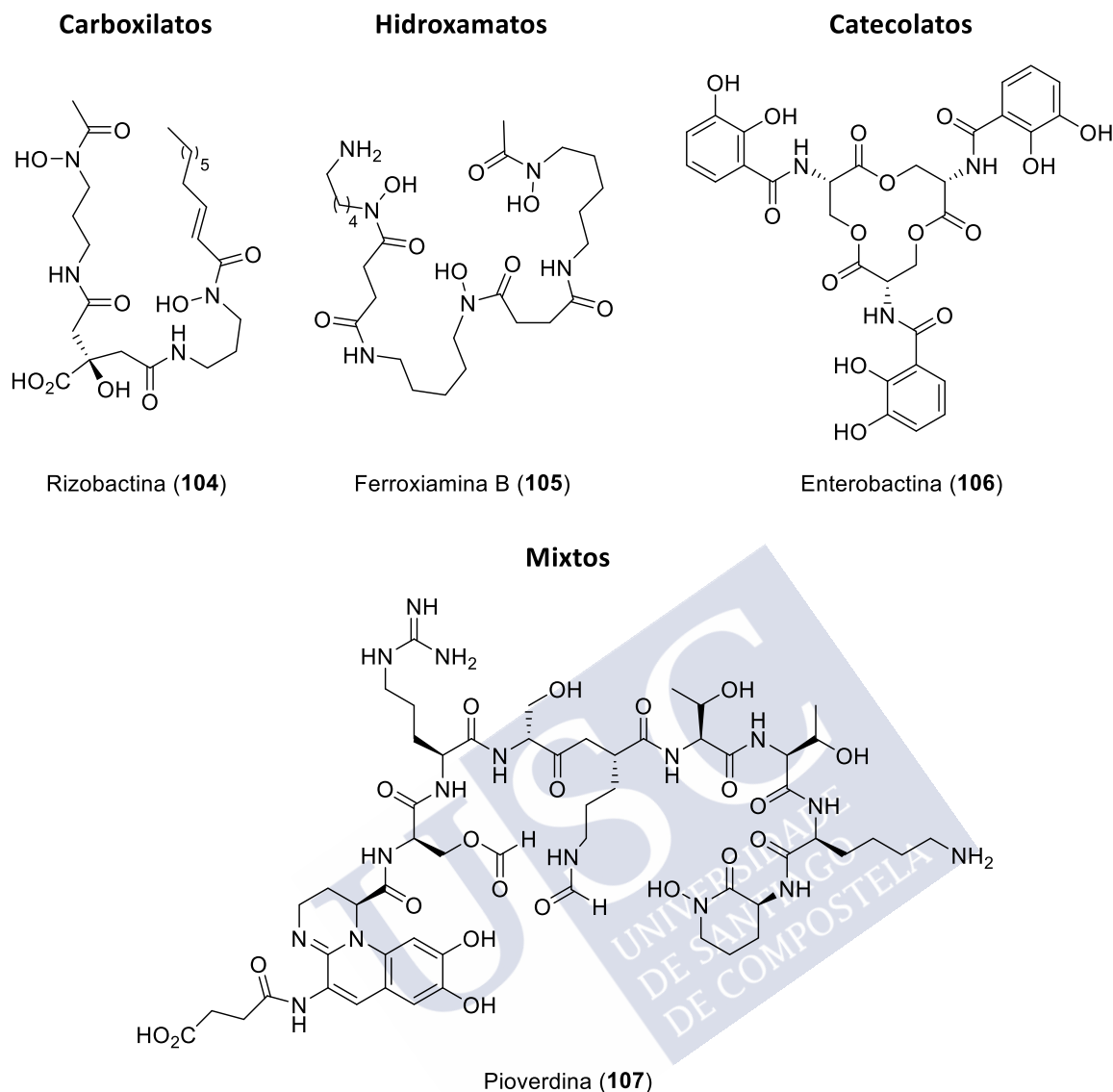
<sup>146</sup> Saha, M.; Sarkar, S.; Sarkar, B.; Sharma, B. K.; Bhattacharjee, S.; Tribedi, P. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 3984–3999.

<sup>147</sup> Ratledge, C.; Dover, L. G. *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, *54*, 881–941.

<sup>148</sup> Ahmed, E.; Holmström, S. J. M. *Microb. Biotechnol.* **2014**, *7*, 196–208.

<sup>149</sup> Raymond, K. N.; Allred, B. E.; Sia, A. K. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2496–2505.

<sup>150</sup> Raymond, K. N.; Carrano, C. J. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 183–190.



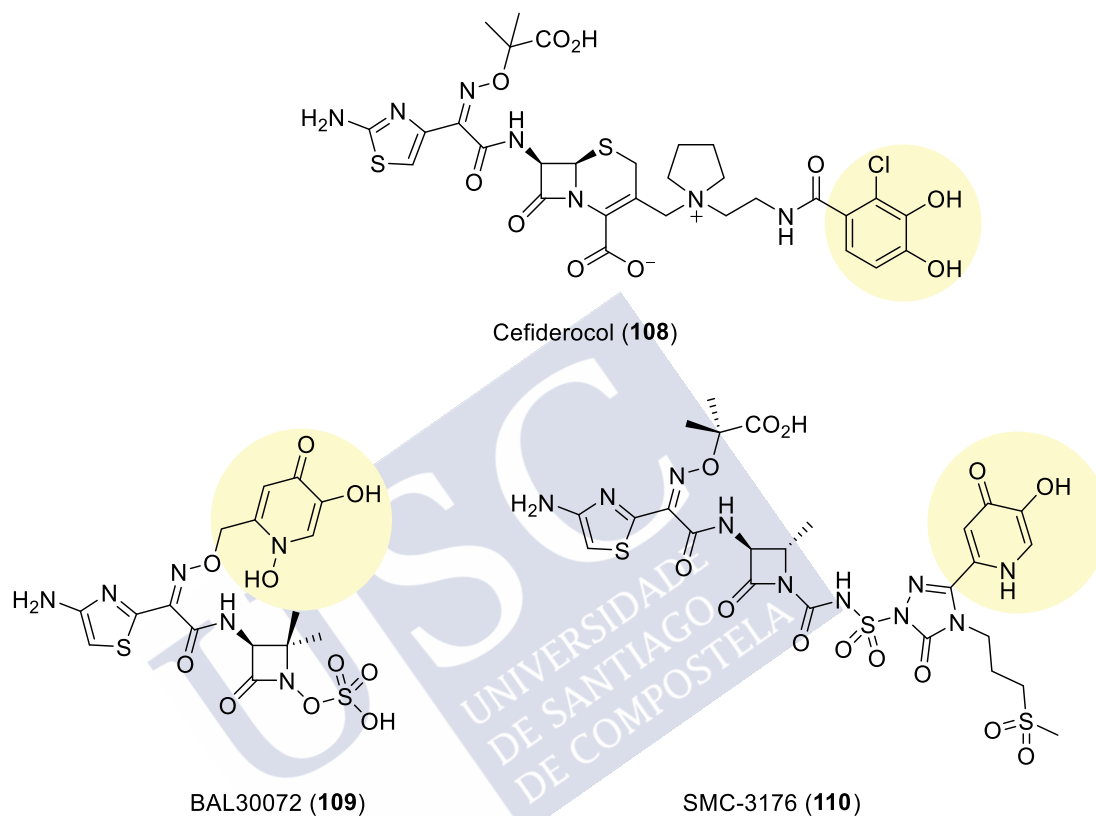
**Figura 21.** Ejemplos representativos de sideróforos naturales producidos por las bacterias.

El descubrimiento en los años 60 de las sideromicinas, tales como la Albomicina o la Ferrimicina, compuestos naturales que están constituidos por antibióticos unidos de forma covalente a sideróforos, ha incentivado la incorporación de grupos sideróforos en el diseño de nuevos fármacos antimicrobianos.<sup>151,152</sup> Esta estrategia de conjugación “antibiótico + sideróforo” se conoce como “caballo de Troya” (del término en inglés *Trojan Horse*), y continúa siendo ampliamente empleada en la actualidad en la I+D de antibióticos. Un buen ejemplo de ello son el Cefiderocol

<sup>151</sup> Miller, M. J.; McKee, J. A.; Minnick, A. A.; Dolence, E. K. *Biol. Met.* **1991**, *4*, 62–69.

<sup>152</sup> McKee, J. A.; Sharma, S. K.; Miller, M. J. *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2*, 281–291.

(108), aprobado por la FDA en noviembre de 2019 para el tratamiento de las infecciones urinarias complicadas,<sup>153</sup> o las monobactamas BAL30072 (109) y SMC-3176 (110) que se encuentran en fase clínica I y estudios preclínicos, respectivamente (Figura 22).<sup>154</sup>



**Figura 22.** Ejemplos de antibióticos recientemente aprobados o en estudio clínico que utilizan la estrategia “caballo de troya”. En todos los casos se resalta el sideróforo con un fondo amarillo.

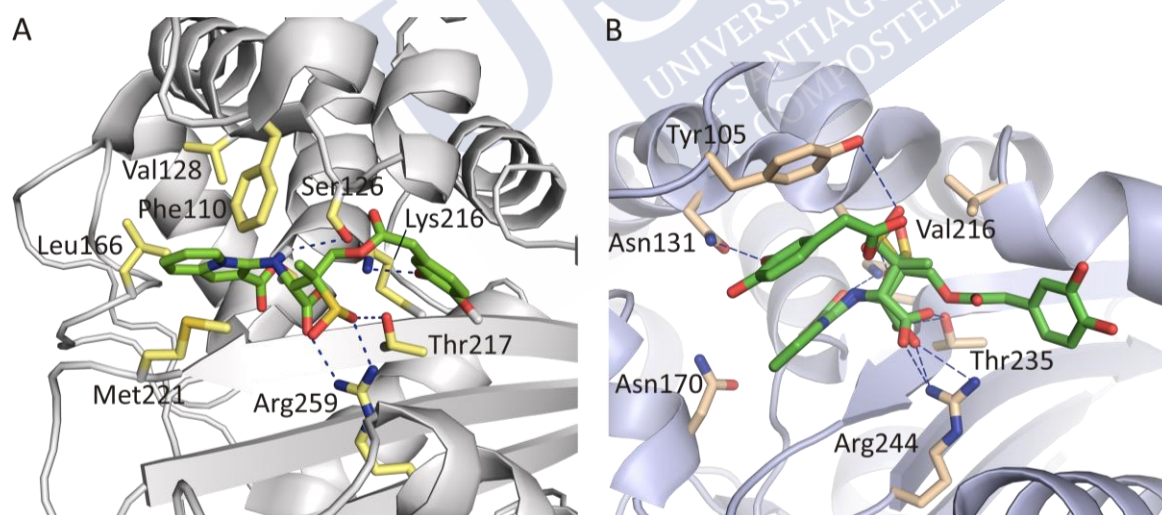
## 4.2 Nuevas 6-Piridilmetiliden Sulfonopenicilinas Conjugadas a Sideróforos

El inhibidor LN-1-255 (55c) cuenta con una unidad de catecol unido al grupo metileno pro-*R* en posición C3, que actúa como sideróforo y que contribuye muy significativamente a su eficacia *in vitro* contra los patógenos Gram-negativos que expresan las CHDIs. Sin embargo, tal y como se comentó en el Capítulo 3 de esta

<sup>153</sup> <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-antibacterial-drug-treat-complicated-urinary-tract-infections-part-ongoing-efforts>

<sup>154</sup> Page, M. G. P. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *69*, S529–S537.

memoria, los estudios de modelado molecular del LN-1-255 (**55c**) dirigidos a entender su modo de unión en el centro activo de la OXA-23 (código PDB 4K0X,<sup>88</sup> 1,61 Å), la OXA-58 (código PDB 5BOH,<sup>155</sup> 1.8 Å), la OXA-143 y la OXA-235, llevados a cabo en el grupo de investigación, mostraron que este grupo catecol presenta una gran libertad conformacional al no presentar interacciones preferentes que lo fijen al centro activo, en otras palabras, que contribuyan de forma significativa a su afinidad por el mismo.<sup>58</sup> Por ejemplo, en el caso de la OXA-23 procedente de *A. baumannii*, únicamente se establecería, ocasionalmente, una interacción de enlace de hidrógeno entre uno de los grupos fenol y el grupo amino terminal de la cadena lateral del residuo de Lys 216 (Figura 23A). Igualmente, en la estructura cristalográfica del enzima SHV-1 procedente de *K. pneumoniae* modificada covalentemente con el inhibidor LN-1-255 (**55c**) (código PDB 3D4F,<sup>89</sup> 1.55 Å) se observa que la cadena de catecol del aducto se encuentra desordenada y muestra dos conformaciones principales que divergen 180° (Figura 23B).

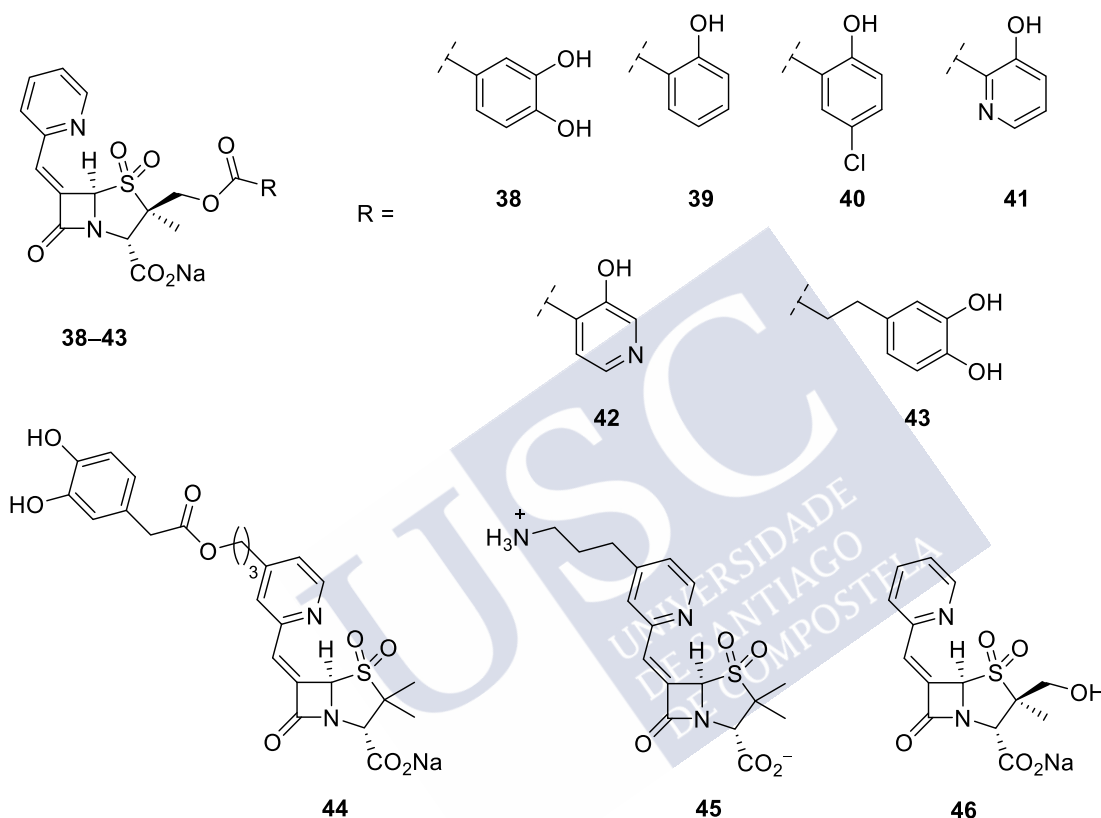


**Figura 23.** Vistas detalladas de la inactivación causada por el inhibidor LN-1-255 (**55c**) del centro activo de los enzimas: (A) OXA-23 procedente de *A. baumannii*;<sup>58</sup> (B) la SHV1 procedente de *K. pneumoniae* (código PDB 3D4F,<sup>89</sup> 1.55 Å); obtenidas mediante estudios de modelado molecular y difracción de rayos-X, respectivamente. Se muestran y etiquetan los residuos más relevantes. Las interacciones electrostáticas y de enlace de hidrógeno se muestran como líneas azules discontinuas.

<sup>155</sup> Saino, H.; Sugiyabu, T.; Ueno, G.; Yamamoto, M.; Ishii, Y.; Miyano, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *19*, 3593–3597.

Teniendo en cuenta las evidencias antes mencionadas que apuntan a una escasa contribución del grupo sideróforo, y/o el tipo de unión al núcleo de la sulfonopenicilina, del inhibidor LN-1-255 (**55c**) en su afinidad por las  $\beta$ -lactamasas nos pareció interesante explorar la incorporación de otros sideróforos a la estructura básica del LN-1-255 (**55c**) que pudieran incrementar sus interacciones con los residuos del centro activo y, en consecuencia, aumentar su potencia inhibitoria de las CHDLs. En este estudio, no solamente se pretendió explorar grupos alternativos al catecol, sino también analizar la estabilidad del tipo de unión del sideróforo al grupo metilo pro-*R* de la posición C3 del núcleo sulfonopenicilínico. Es decir, en el inhibidor LN-1-255 (**55c**) el grupo catecol se incorpora a través de un grupo éster alifático, más susceptible a procesos de hidrólisis que los correspondientes aromáticos. De hecho, los análisis de espectrometría de masas de los aductos covalentes de los enzimas OXA-24/40/**33-37** y OXA-48/**33-37** realizados (véase página 70), revelaron la pérdida de dicho grupo. Si bien esto pudiera tener lugar en el proceso de ionización, también cabría la posibilidad de que se produjese durante la formación del aducto, por lo que explorar otro tipo de uniones más estables nos pareció relevante. Con este fin se llevó a cabo la síntesis y evaluación microbiológica de los compuestos **38-46** (Figura 24). Mediante el análogo **38** se analizará la unión del grupo catecol presente en el inhibidor LN-1-255 (**55c**) al núcleo sulfonopenicilínico a través de un grupo éster aromático, que como se discutirá más adelante proporcionó los mejores resultados. Con los análogos **39-42** se analizará el efecto de la incorporación de otros grupos sideróforos alternativos al grupo catecol manteniendo una unión tipo éster aromático. Por otra parte, con el compuesto **43** se analizará la separación entre el éster alifático presente en LN-1-255 (**55c**) y el grupo catecol con un número par de átomo de carbono, con el fin de modificar la disposición final del mismo. El efecto de las modificaciones realizadas se comparará con el compuesto **46** que carece del grupo sideróforo, pero que mantiene la funcionalización con un grupo hidroxilo ausente en el inhibidor original **54**<sup>130</sup> identificado por Chen y colaboradores (véase

capítulo 3 página 47). Finalmente, con los compuestos **44** y **45** se explorará la utilidad de la incorporación del grupo catecol, y de un grupo amino que conferiría neutralidad al derivado, en el anillo de piridina, lo que permitiría acortar y facilitar sustancialmente la síntesis de este tipo de compuestos haciéndolos comercialmente más asequibles.



**Figura 24.** Compuestos objetivo **38–46**.

El diseño del compuesto **45** se inspiró en los estudios publicados por Richter y colaboradores sobre la relación estructura/actividad de miles de antibióticos descritos.<sup>156,157</sup> En ellos se recogen tres condiciones comunes a muchos de los antibióticos de amplio espectro, y que favorecen su entrada a las bacterias Gram-negativas a través de las porinas de la membrana externa: (i) contener un átomo de nitrógeno ionizable (preferentemente amina primaria); (ii) no ser este un grupo

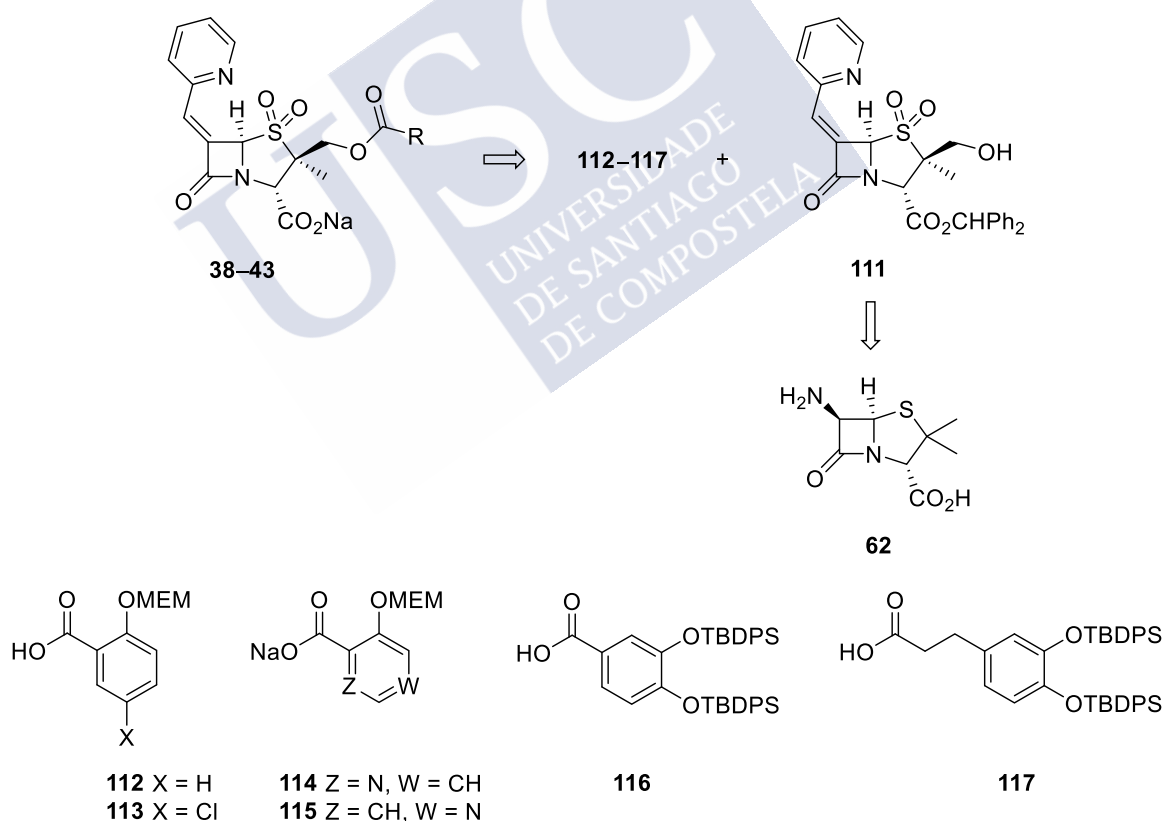
<sup>156</sup> Richter, M. F.; Hergenrother, P. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1435*, 18–38.

<sup>157</sup> Richter, M. F.; Drown, B. S.; Riley, A. P.; García, A.; Shirai, T.; Riley, L. S.; Hergenrother, P. J. *Nature* **2017**, *545*, 299–304.

muy voluminoso; y (iii) presentar menos de 5 enlaces con capacidad de rotación. Asimismo, los compuestos zwitteriónicos podrían mejorar aún más la entrada a través de las porinas debido a la contraposición de zonas cargadas negativa y positivamente en el interior de estas.<sup>158</sup>

### 4.3 Síntesis de los Compuestos 38–43 y 46

La síntesis de los compuestos **38–43** se planteó llevar a cabo mediante la esterificación del alcohol **111**,<sup>133,134</sup> previamente preparado a partir del ácido 6-aminopenicilánico (**62**) siguiendo una estrategia similar a la descrita en el capítulo 3 para los compuestos **33–37**, con los ácidos **112**,<sup>159</sup> **113**, **116**,<sup>139</sup> y **117** o los carboxilatos sódicos **114** y **115** (Esquema 7).



**Esquema 7.** Planteamiento retrosintético para la síntesis de los compuestos objetivo **38–43**.

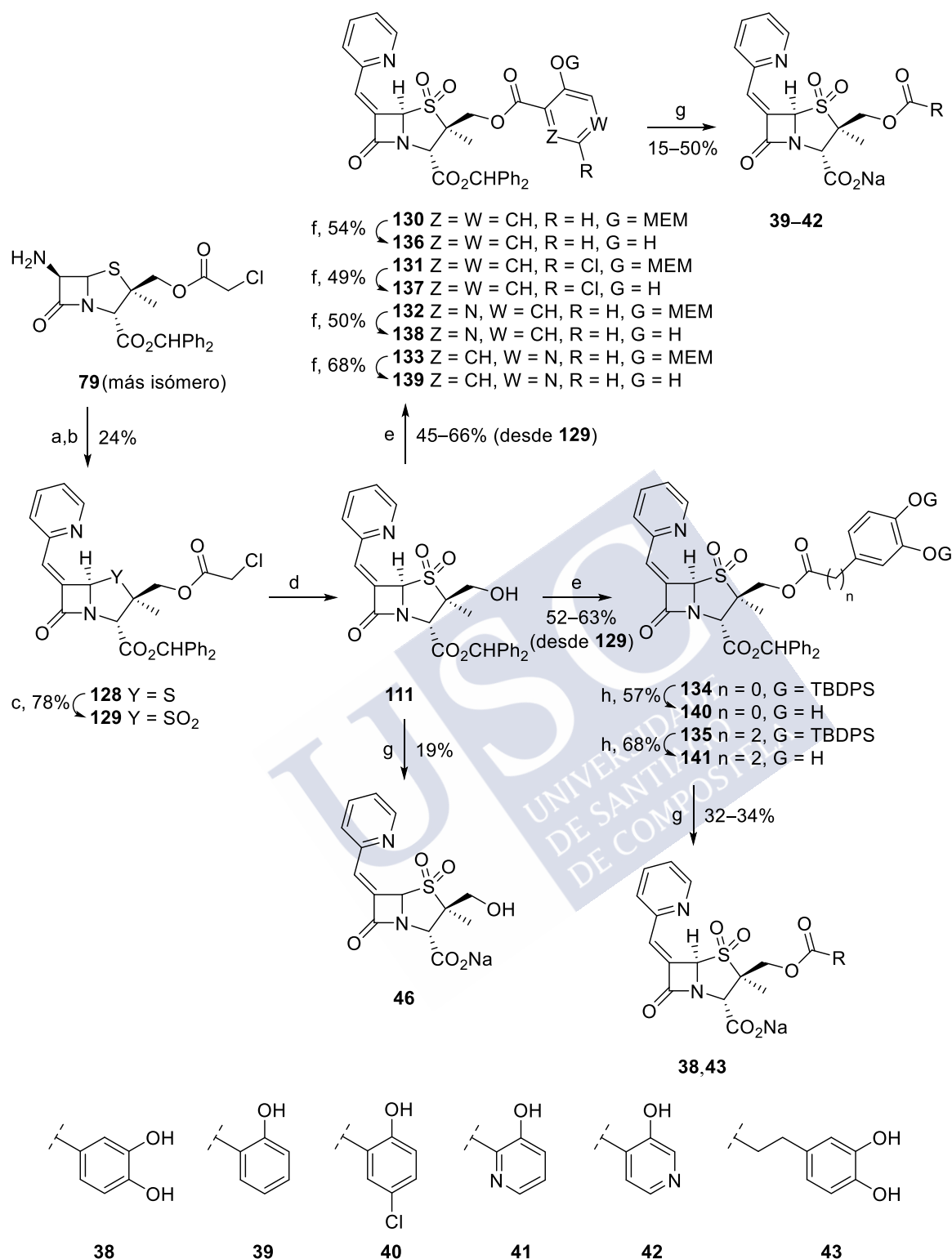
<sup>158</sup> Nestorovich, E. M.; Danelon, C.; Winterhalter, M.; Bezrukov, S. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 9789–9794.

<sup>159</sup> Liénard, B. M. R.; Horsfall, L. E.; Galleni, M.; Frère, J.-M.; Schofield, C. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 964–968.



A continuación, el alcohol **111** se preparó en cuatro etapas a partir de la mezcla de la amina **79** y su isómero de 6 miembros, siguiendo una estrategia similar a la descrita para el alcohol intermedio en la síntesis de los compuestos **33–37** en el capítulo 3 (Esquema 9).<sup>142</sup> Así, el tratamiento de la amina **79** (y su isómero de 6 miembros) con anhídrido tríflico, seguida de hidrólisis por tratamiento con ácido clorhídrico diluido proporcionó la dicetona **61** y su isómero de 6 miembros, que se emplearon sin purificar en la siguiente etapa. La reacción de Wittig entre la dicetona **61** y el iluro obtenido por reacción del hidrocloreuro de 2-piridilmetiltrifenilfosonio, disponible comercialmente, con *tert*-butóxido potásico dio lugar a la olefina **128** en un rendimiento global para las dos etapas del 24%. A continuación, la oxidación con ácido *m*-cloroperbenzoico del sulfuro **128** y desprotección del grupo cloroacetoxi en la sulfona **129** resultante proporcionó el alcohol deseado **111**.

La esterificación del alcohol **111** por tratamiento con *N*-(3-(dimetilamino)propil)-*N'*-etilcarbodiimida, 4-*N,N*-dimetilaminopiridina y los ácidos **112**,<sup>159</sup> **113**, **116**<sup>139</sup> y **117**, y las sales sódicas **114** y **115**, dio lugar a los ésteres **130–135** en rendimientos del 45–66% (Esquema 9). La desprotección de los grupos MEM en los éteres **130–133** por calentamiento en *tert*-butanol y en presencia de *p*-toluensulfonato de piridinio proporcionó los fenoles **136–139** satisfactoriamente. Por su parte, la eliminación de los grupos TBDPS en **134–135** por tratamiento con fluoruro de tetrabutilamonio y ácido acético, condujo a los catecoles **140–141**. Finalmente, la hidrólisis de los ésteres de bencidrilo **136–141** por calentamiento con *m*-cresol y posterior neutralización con bicarbonato sódico proporcionó los compuestos deseados **38–43** con rendimientos entre 15–50%.

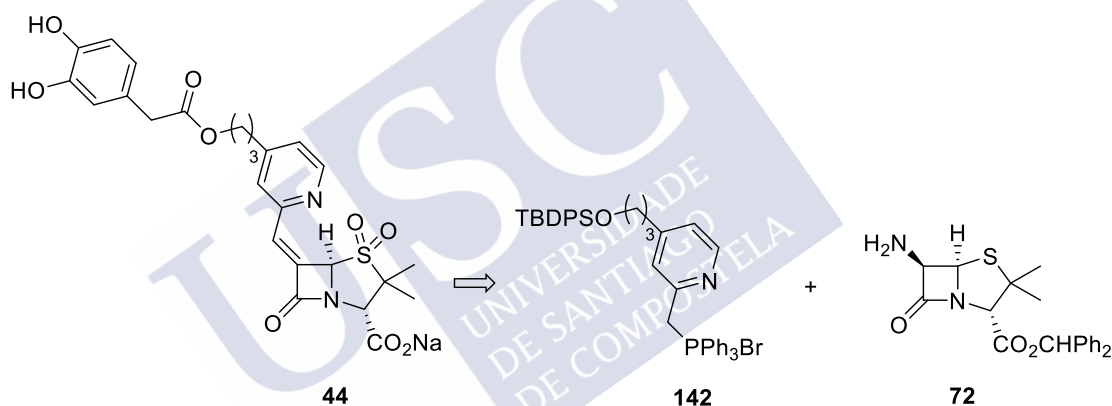


**Esquema 9.** *Reactivos y condiciones:* (a) 1. Tf<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DCM, -78 °C → 0 °C. 2. Et<sub>3</sub>N, -78 °C. 3. HCl (0.5 M), -78 °C → t.a. (b) 1. Hidrocloruro de 2-piridilmetiltrifenilfosfonio, *t*-BuOK, THF, t.a. 2. **79**, DCM, -78 °C. (c) *m*-CPBA, DCM, t.a. (d) Tiourea, Pi, DMF, 0 °C → t.a. (e) ácido (2-metoxietoxi)metoxibenzoico (**112**)<sup>159</sup>, **113-115**, ácido 3,4-di(*tert*-butildifenilsililoxibenzoico (**116**)<sup>139</sup> y **117**, EDC, DMAP, DCM, -15 °C → t.a. (f) *p*-toluensulfonato de piridinio, *t*-BuOH, Δ. (g) 1. *m*-cresol, 50 °C. 2. NaHCO<sub>3</sub> (ac.). (h) TBAF, AcOH, THF, 0 °C → t.a.

El compuesto **46** se obtuvo directamente por desprotección del éster **111**<sup>133,134</sup> con *m*-cresol y posterior elaboración en medio básico con bicarbonato sódico (Esquema 9).

#### 4.4 Síntesis del Compuesto 44

La síntesis del compuesto **44** se planteó llevar a cabo siguiendo una estrategia similar a las anteriores, que implicó la incorporación del grupo piridilmetiliden mediante reacción de Wittig, entre la dicetona obtenida por oxidación del 6-aminopenicilato de bencilrilo (**72**)<sup>160</sup> previamente descrito y la sal de fosfonio **142** de forma análoga al compuesto **128**<sup>133,134</sup> (Esquema 10).



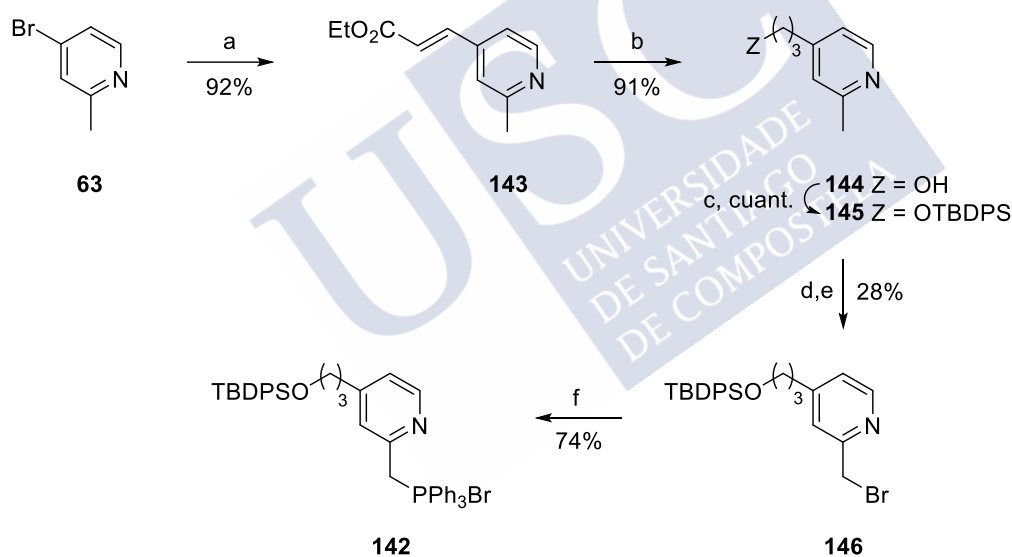
Esquema 10. Planteamiento retrosintético para la síntesis del compuesto **44**.

La sal de fosfonio **142** se preparó en seis etapas a partir de la 4-bromo-2-metilpiridina (**63**) disponible comercialmente (Esquema 11). En primer lugar, siguiendo procedimientos previamente descritos, la reacción de acoplamiento cruzado tipo Heck entre el bromuro **63** y acrilato de etilo, empleando acetato de paladio(II) como catalizador y en presencia de tri-*o*-tolilfosfina proporcionó acrilato de (*E*)-4-[3-etil-(2-metilpiridina)] (**143**) con un rendimiento del 92%.<sup>161</sup> A continuación, la reducción completa del éster  $\alpha,\beta$ -insaturado **143** con borohidruro sódico en presencia de metanol proporcionó el alcohol primario **144** con un

<sup>160</sup> Matlin, S. A.; Chan, L.; Catherwood, F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1990**, 89–96.

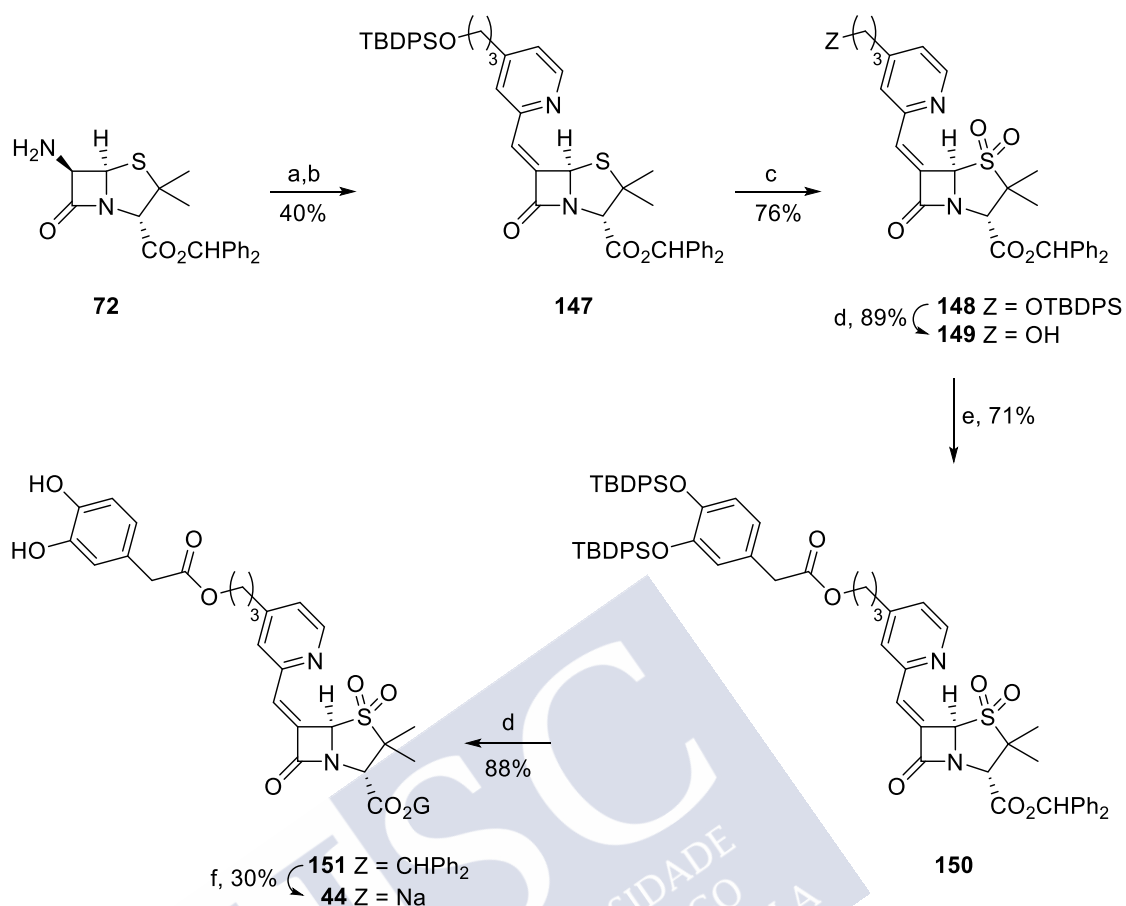
<sup>161</sup> Miwatashi, S.; Suzuki, H.; Okawa, T.; Miyamoto, Y.; Yamasaki, K.; Hitomi, Y.; Shibuya, A. Aromatic ring compound. WO2013/12208 A1, February, 13, 2012.

rendimiento del 91%, el cual se protegió como éter de silicio por tratamiento con cloruro de *tert*-butildifenilsilano e imidazol, para dar lugar al compuesto **145** de forma cuantitativa. A continuación, la oxidación bencílica del grupo metilo en **145** mediante la formación del correspondiente *N*-óxido por tratamiento con ácido *m*-cloroperbenzoico, seguido de acetalización y posterior hidrólisis básica, resultó ser poco selectiva, obteniéndose una mezcla de alcoholes, que no fue posible separar por cromatografía en columna, resultado de la oxidación en las dos posibles posiciones bencílicas de la piridina. Posterior reacción de Appel por tratamiento con trifenilfosfina y tetrabromuro de carbono proporcionó el bromuro **146** en un rendimiento del 28% desde **145**. Finalmente, el bromuro **146** se transformó en la sal de fosfonio **142** por calentamiento con trifenilfosfina.



**Esquema 11.** *Reactivos y condiciones:* (a) acrilato de etilo,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{P}(o\text{-tol})_3$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMF. (b)  $\text{NaBH}_4$ , MeOH,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 80\text{ }^\circ\text{C}$ . (c) TBDPSCl, Im, DMF, t.a. (d) 1. *m*-CPBA,  $\text{CHCl}_3$ , t.a. 2.  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $90\text{ }^\circ\text{C}$ . 3. KOH, MeOH,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$  (e)  $\text{CBr}_4$ ,  $\text{Ph}_3\text{P}$ , DCM,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ . (f)  $\text{Ph}_3\text{P}$ , PhMe,  $\Delta$ .

Una vez obtenida la sal de fosfonio **142**, se abordó la síntesis del compuesto deseado **44** en un proceso de 6 etapas a partir del 6-aminopenicilato de bencidrilo (**72**)<sup>160</sup> previamente descrito (Esquema 12).



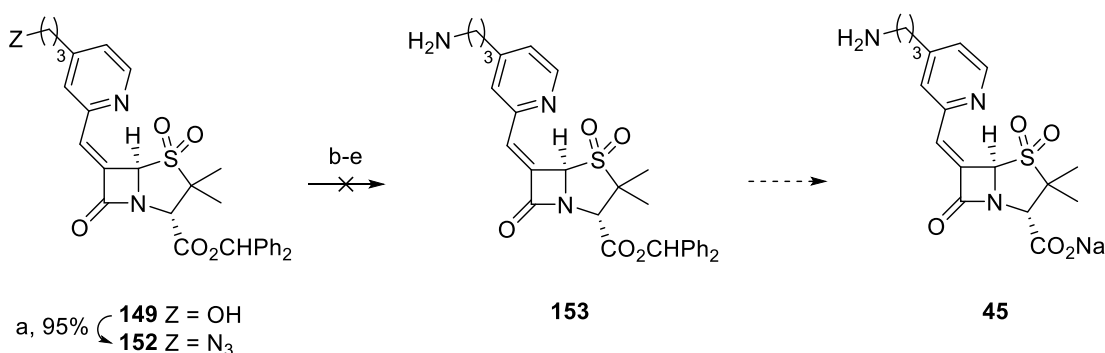
**Esquema 12.** *Reactivos y condiciones:* (a) 1. Tf<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DCM, -78 °C → 0 °C. 2. Et<sub>3</sub>N, -78 °C. 3. HCl (0.5 M), -78 °C → t.a. (b) 1. **142**, *t*-BuOK, THF, t.a. 2. Diketona derivada de **72**, DCM, -78 °C. (c) *m*-CPBA, DCM, t.a. (d) TBAF, AcOH, THF, 0 °C. (e) **103**,<sup>139</sup> EDC, DMAP, DCM, -15 °C → t.a. (f) 1. *m*-cresol, 50 °C. 2. NaHCO<sub>3</sub> (ac.).

En primer lugar, el tratamiento de la amina **72** con anhídrido triflúrico y trietilamina y la hidrólisis posterior mediante tratamiento con HCl diluido proporcionó la cetona derivada de **72**, que por tratamiento con el iluro derivado de la sal de fosfonio **142**, condujo al compuesto **147** con un rendimiento del 40% para las dos etapas. La oxidación del sulfuro **147** con ácido *m*-cloroperbenzoico proporcionó la sulfona **148** con un rendimiento del 76%, cuya desprotección por tratamiento con fluoruro de tetrabutilamonio en ácido acético proporcionó el alcohol primario **149** con un rendimiento del 89%. La esterificación del alcohol **149** con el ácido **103**,<sup>139</sup> usando *N*-(3-(dimetilamino)propil)-*N'*-etilcarbodiimida como agente acoplante y en presencia de 4-*N,N*-dimetilaminopiridina, condujo al éster **150** con un rendimiento del 71%. Por último, la desprotección de los grupos TBDPS en **150** por tratamiento

con fluoruro de tetrabutilamonio y ácido acético, seguido de la eliminación del grupo bencilidrido por calentamiento del catecol resultante **151** con *m*-cresol y subsiguiente neutralización con bicarbonato sódico proporcionó el compuesto objetivo **44** con un rendimiento del 30%.

#### 4.5 Síntesis del Compuesto 45

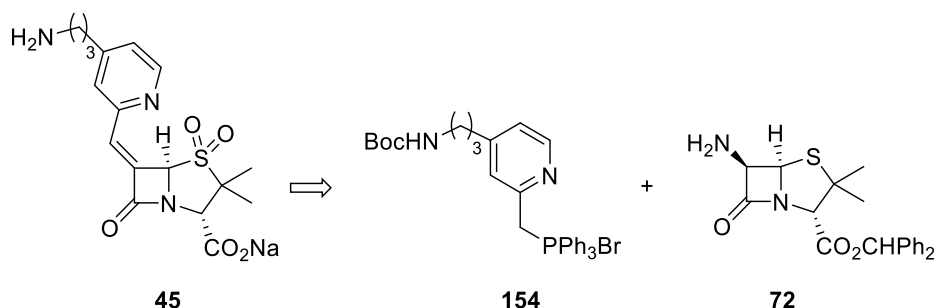
La primera aproximación a la síntesis del amino derivado **45** se planteó llevar a cabo a partir del alcohol **149**, previamente desarrollado en esta tesis doctoral, mediante su transformación en la correspondiente azida a través de una reacción de Mitsunobu y posterior reducción y desprotección (Esquema 13). Así el tratamiento del alcohol **149** con trifetilfosfina y ácido hidrazoico, seguido de la adición gota a gota de diisopropilazodicarboxilato (DIAD), proporcionó la azida **152** con un rendimiento del 95%. Desafortunadamente, todos los intentos de reducción del grupo azida en **152**, tanto utilizando: (i) las condiciones de Staudinger, tanto a reflujo como a temperatura ambiente; (ii) como por tratamiento con cloruro de cobalto y borohidruro sódico en presencia de yoduro de tetrabutilamonio (TBAI) produjo la reducción indeseada de la olefina; o (iii) hidrogenación catalítica, tanto utilizando Pd/C como el catalizador de Lindlar; no condujeron a la amina deseada **153**.



**Esquema 13.** *Reactivos y condiciones:* (a)  $\text{HN}_3$ ,  $\text{Ph}_3\text{P}$ , DIAD, THF,  $0^\circ\text{C}$ . (b)  $\text{Ph}_3\text{P}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , THF,  $\Delta$  o t.a. (c)  $\text{CoCl}_2$ , TBAI (ac.),  $\text{NaBH}_4$ , MeOH, DCM, t.a. (d)  $\text{H}_2(\text{g})$ , Pd/C, AcOEt, t.a. (e)  $\text{H}_2(\text{g})$ , Lindlar, EtOH, t.a.

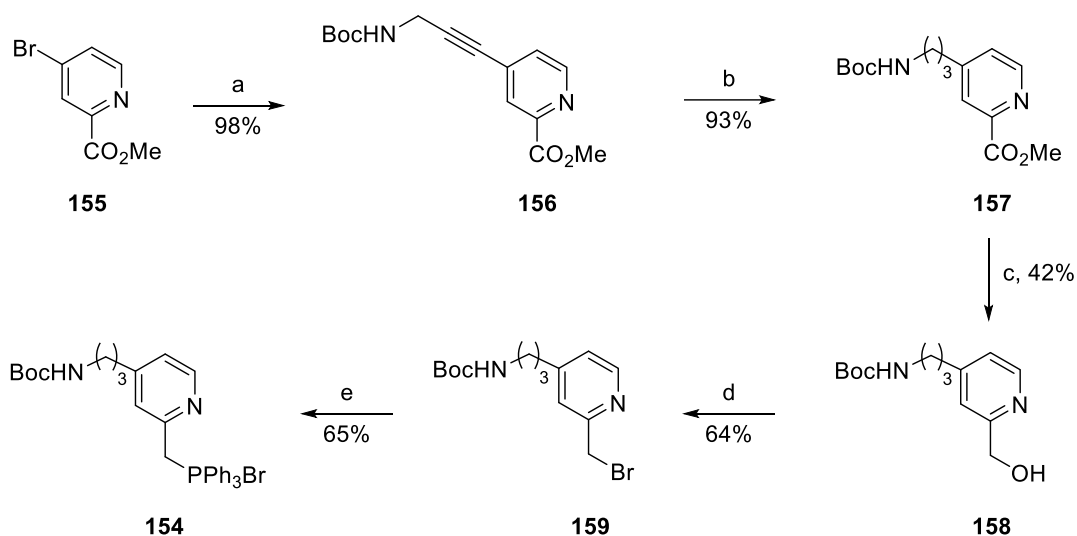
Los resultados negativos obtenidos con la primera aproximación, nos llevó a abordar la síntesis del compuesto **45** siguiendo una estrategia similar a la

desarrollada para los compuestos **33–37** (Capítulo 3), es decir, mediante una reacción de Wittig utilizando una sal de fosfonio que ya incorporase el grupo amino terminal adecuadamente protegido, en concreto, el compuesto **154** (Esquema 14).



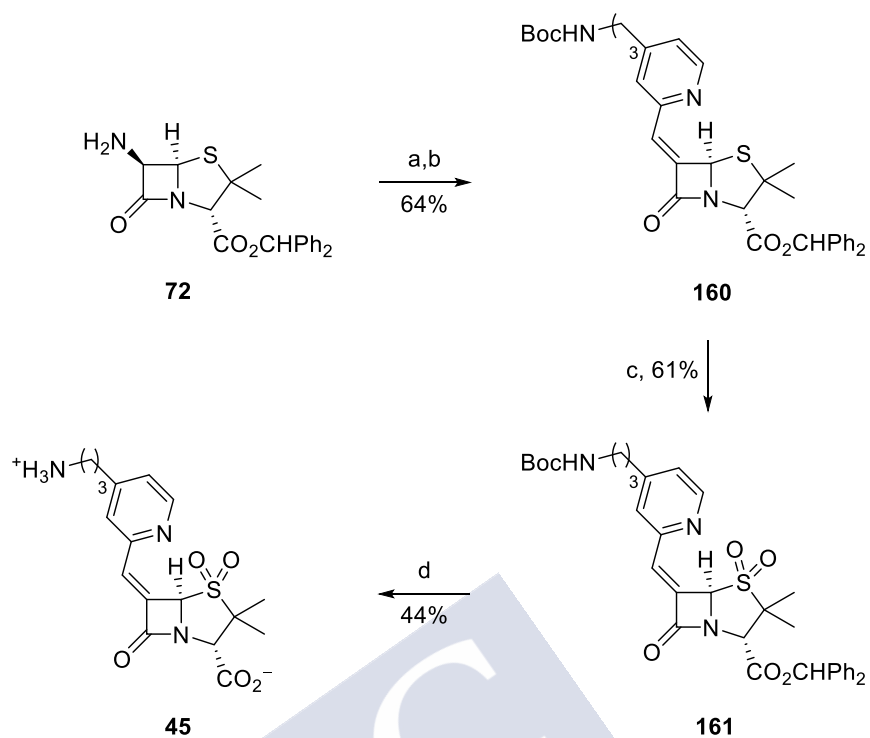
**Esquema 14.** Planteamiento retrosintético para la síntesis del compuesto objetivo **45**.

La sal de fosfonio **154** se preparó en cinco etapas a partir del 4-bromopicolinato (**155**) disponible comercialmente (Esquema 15). En primer lugar, la reacción de acoplamiento cruzado tipo Sonogashira entre el bromuro **155** y *N*-Boc-propargilamina empleando diclorobis(trifenilfosfina)paladio(II) como catalizador y en presencia de CuI y trietilamina, condujo al alquino **156** con un rendimiento excelente. Hidrogenación catalítica del alquino **156** y posterior reducción del éster metílico resultante **157** con hidruro de litio y aluminio proporcionó el alcohol bencílico **158**. Finalmente, siguiendo un procedimiento similar a los casos anteriores, el alcohol **158** se transformó en la sal de fosfonio deseada **154** en dos etapas: (i) formación del bromuro **159** mediante una reacción de Appel (64%); y (ii) sustitución nucleófila bimolecular por calentamiento con trifenilfosfina (65%).



**Esquema 15.** *Reactivos y condiciones:* (a) *N*-Boc-propargilamina, PdCl<sub>2</sub>(Ph<sub>3</sub>P)<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N, THF, 60 °C. (b) H<sub>2</sub>(g), Pd/C, MeOH. (c) LiAlH<sub>4</sub>, THF, -78 °C→t.a. (d) CBr<sub>4</sub>, Ph<sub>3</sub>P, DCM, 0 °C. (e) Ph<sub>3</sub>P, PhMe, Δ.

Por último, la oxidación de la amina **72** con anhídrido trifílico en presencia de trietilamina e hidrólisis posterior con ácido clorhídrico diluido generó la cetona intermedia, que se empleó sin purificar en la siguiente reacción. Así, el crudo de reacción obtenido se hizo reaccionar con el iluro generado por tratamiento de la sal de fosonio **154** con *tert*-butóxido potásico, dando lugar al compuesto **160** en un rendimiento del 64%. Por último, la oxidación del grupo sulfuro de **160** con ácido *m*-cloroperbenzoico permitió la obtención de la sulfona **161**, que tras la desprotección conjunta del grupo amino y del grupo ácido con ácido trifluoroacético y subsiguiente tratamiento con bicarbonato sódico proporcionó el compuesto objetivo **45** (Esquema 16).



**Esquema 16.** *Reactivos y condiciones:* (a) 1.  $\text{Tf}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DCM,  $-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 0\text{ }^\circ\text{C}$ . 2.  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ . 3. HCl (0.5 M),  $-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$  (b) 1. **154**,  $t\text{-BuOK}$ , THF, t.a. 2. Diketona derivada de **72**, DCM, t. a. (c) *m*-CPBA, DCM, t.a. (d) 1. TFA, DCM,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$  2.  $\text{NaHCO}_3(\text{ac.})$ .



UJCC  
UNIVERSIDAD  
DE COLOMBIA

**CAPÍTULO 5**  
*Análogos del Sulbactam Conjugados a Grupos*  
*Sideróforos*

---



## 5.1 El Sulbactam

El sulbactam (**30**) es un inhibidor de las  $\beta$ -lactamasas basado en penicilina descubierto por científicos de la farmacéutica Pfizer en 1978, que se coadministra junto con la ampicilina, la cefoperazona y la ceftriaxona para restaurar su actividad antibiótica.<sup>30,162,163</sup> Así por ejemplo, la ampicilina es un antibiótico eficaz frente a la mayoría de patógenos no resistentes pertenecientes al género *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, y a cepas de *S. aureus*, *H. influenzae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella* y *Shigella*. En combinación con sulbactam (**30**), la ampicilina amplía su espectro de acción a cepas resistentes de *S. aureus*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *E. coli*, *Proteus* y *Klebsiella* y a patógenos anaeróbicos. De ahí que la comercialización de la combinación ampicilina/sulbactam en 1987 permitió hacer frente a las infecciones quirúrgicas, abdominales, ginecológicas, odontológicas o neumonías, entre otras, debidas a múltiples patógenos.<sup>164</sup>

El mecanismo de inhibición de las serina  $\beta$ -lactamasas de clase A por acción del sulbactam (**30**) ha sido bien estudiado, siendo semejante al del ácido clavulánico (**29**) y el tazobactam (**31**) (Esquema 17).<sup>165</sup> Este se inicia con el ataque nucleófilo del grupo hidroxilo de la cadena lateral del residuo de serina catalítico al carbono carbonílico de la  $\beta$ -lactama, para dar lugar a un aducto intermedio acil-enzima que posteriormente sufre una apertura en el anillo de tiazolidina, favorecida por la salida del grupo sulfinato. Dicha apertura, genera una imina intermedia **I** que puede dar lugar a tres tipos de procesos: (i) inhibición irreversible; (ii) inhibición transitoria; o (iii) regeneración del enzima activo. La inhibición irreversible es muy infrecuente y ocurre como resultado del ataque nucleófilo de la cadena lateral de un residuo de serina al grupo imina de **I**, dando lugar al aducto de acrilato **IV**. Por

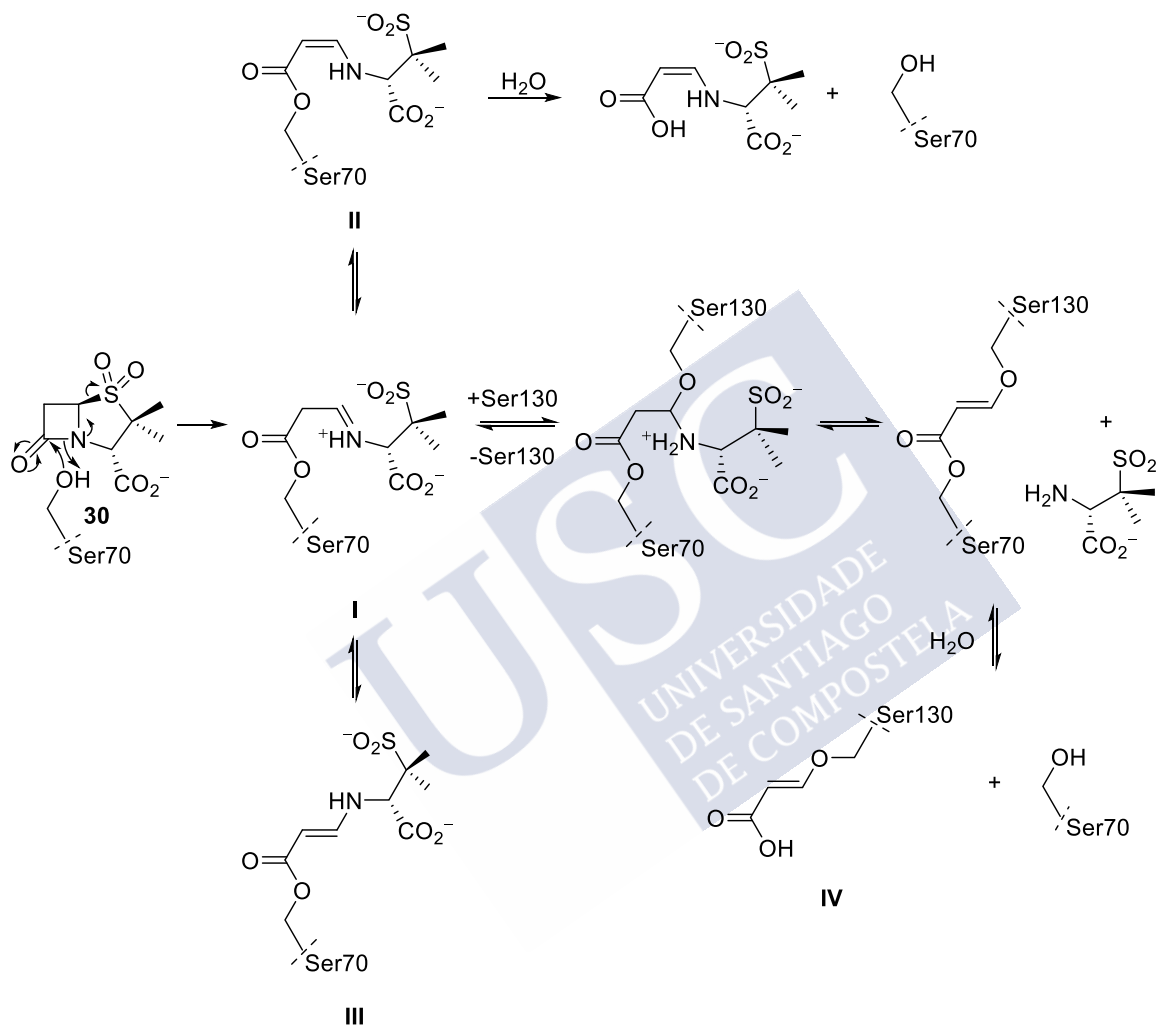
<sup>162</sup> English, A. R.; Restsema, J. A.; Girard, A. E.; Lynch, J. E.; Barth, W. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1978**, *14*, 414–419.

<sup>163</sup> Viehman, J. A.; Nguyen, M. H.; Doi, Y. *Drugs* **2014**, *74*, 1315–1333.

<sup>164</sup> Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 160–201.

<sup>165</sup> Totir, M. A.; Helfand, M. S.; Carey, M. P.; Sheri, A.; Buynak, J. D.; Bonomo, R. A.; Carey, P. R. *Biochemistry* **2007**, *46*, 8980–8987.

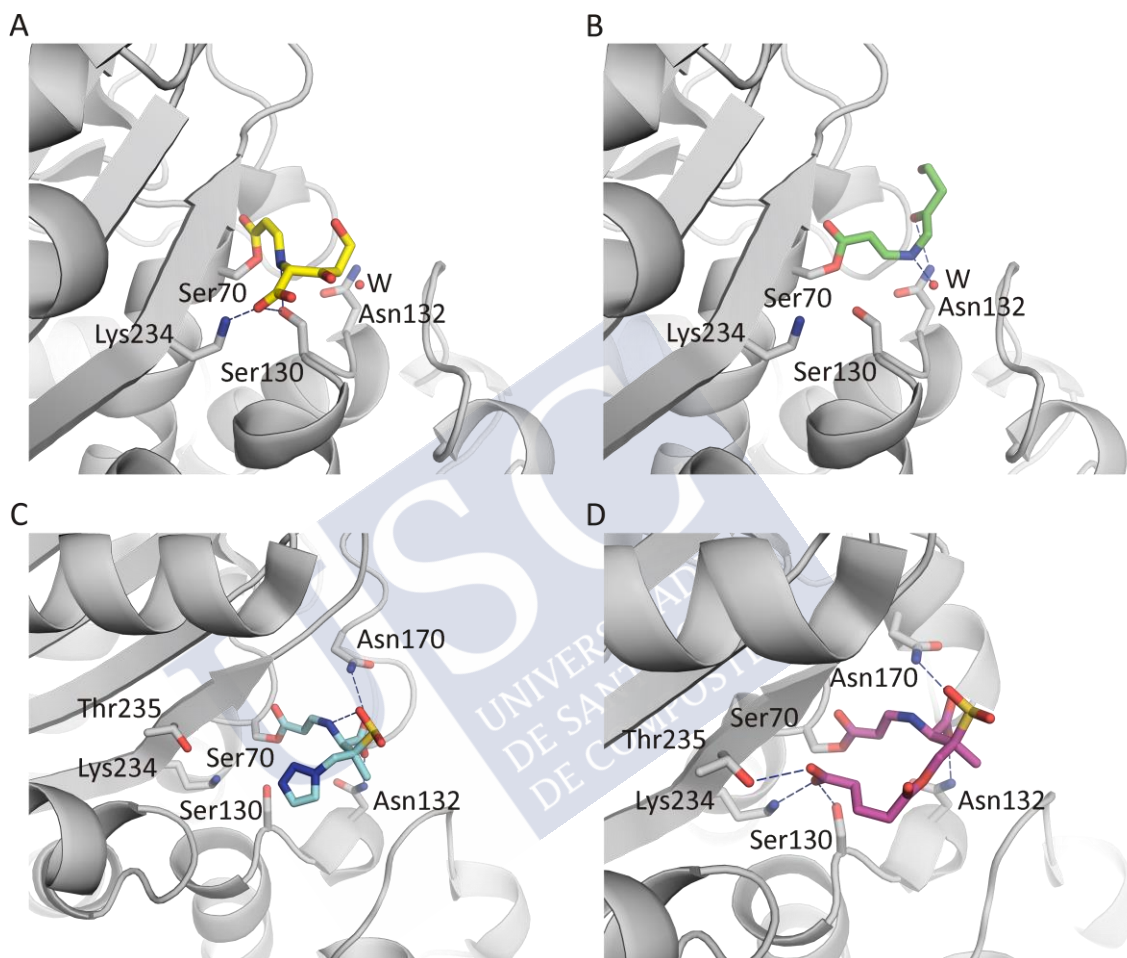
otra parte, la inhibición transitoria se produce con la tautomerización de la imina I a los aductos *cis* y *trans*-enamina. La *cis*-enamina (II) es susceptible a la desacilación que regenera la  $\beta$ -lactamasa libre y nuevamente activa, mientras que el isómero *trans* (III) es energéticamente favorable.



**Esquema 17.** Mecanismo propuesto para la inactivación de las  $\beta$ -lactamasas de clase A por el sulbactam (30).

Estudios cristalográficos y de espectroscopía Ramman realizados con los aductos de los tres inhibidores demostraron, que la superioridad inhibitoria del tazobactam (31) frente al enzima SHV-1 con respecto a los inhibidores estructuralmente relacionados, sulbactam (30) y ácido clavulánico (29), se debe principalmente a que el tazobactam (31) proporciona mayoritariamente el aducto *trans*-enamina III, que es más resistente a la hidrólisis y, en consecuencia, mantiene al enzima inactivo

durante más tiempo. Por el contrario, los aductos SHV-1/sulbactam y SHV-1/ ácido clavulánico conducen mayoritariamente a la formación del aducto *cis*-enamina II, que se hidroliza más fácilmente regenerando más rápidamente el enzima activo (Figura 25).<sup>165,166,167,168,169</sup>



**Figura 25.** A–B. Estructuras cristalográfica del aducto SHV-1/ácido clavulánico (código PDB 1BLC,<sup>166</sup> 2.2 Å). Se muestran en imágenes separadas los dos tipos de aductos observados en la estructura cristalográfica, concretamente la *cis*-enamina (A) y la *trans*-enamina (B). C–D Estructuras cristalográficas de los aductos SHV-1/tazobactam (código PDB 1RCJ,<sup>169</sup> 1.63 Å) (C) y SHV-1/SA2-13 (código PDB 2H5S,<sup>170</sup> 1.28 Å) (D). Se muestran y etiquetan las cadenas laterales de los residuos más relevantes. Se indican las interacciones polares como líneas discontinuas azules.

<sup>166</sup> Chen, C. C.; Herzberg, O. *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 1103–1113.

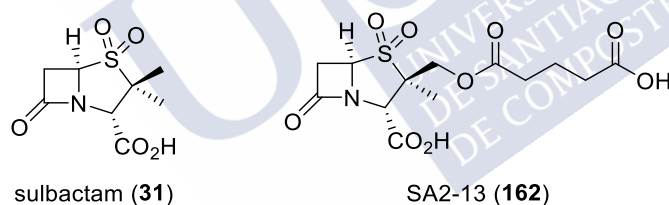
<sup>167</sup> Padayatti, P. S.; Helfand, M. S.; Totir, M. A.; Carey, M. P.; Carey, P. R.; Bonomo, R. A.; van den Akker, F. J. *Biol. Chem.* **2005**, *280*, 34900–34907.

<sup>168</sup> Kalp, M.; Totir, M. A.; Buynak, J. D.; Carey, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2338–2347.

<sup>169</sup> Padayatti, P. S.; Helfand, M. S.; Totir, M. A.; Carey, M. P.; Hujer, A. M.; Carey, P. R.; Bonomo, R. A.; van den Akker, R. A. *Biochemistry* **2004**, *43*, 843–848.

<sup>170</sup> Padayatti, P. S.; Sheri, A.; Totir, M. A.; Helfand, M. S.; Carey, M. P.; Anderson, V. E.; Carey, P. R.; Bethel, C. R.; Bonomo, R. A.; Buynak, J. D.; van den Akker, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13235–13242.

A partir de este conocimiento, Padayatti y colaboradores diseñaron una nueva sulfona derivada del sulbactam (**30**) que incorpora una cadena polar en el metilo pro-*R* en posición C3 del inhibidor original, el compuesto SA2-13 (**162**) (Figura 26).<sup>170</sup> La resolución de la estructura cristalográfica del aducto SHV-1/SA2-13 (código PDB 2H5S,<sup>170</sup> 1.28 Å) mostró que el inhibidor se encuentra unido covalentemente al centro activo del enzima de forma similar a la del tazobactam (**31**), pero que además forma interacciones adicionales entre la cadena carboxilada en posición C3 y los residuos polares próximos del centro activo. Concretamente, establece una interacción electrostática con el grupo amonio de la cadena lateral de la Lys234, así como interacciones de enlace de hidrógeno con las cadenas laterales de los residuos Ser130 y Thr235 (Figura 25D). Estas interacciones polares extra favorecen la estabilización del intermedio *trans*-enamino, y hacen que la velocidad de hidrólisis del aducto SHV-1/SA2-13 sea 10 veces menor a la del aducto correspondiente al tazobactam (**31**) (Figura 25C).



**Figura 26.** Estructura del sulbactam (**31**) y del análogo SA2-13 (**162**) desarrollado por Padayatti y colaboradores.

El sulbactam (**30**) es un compuesto de características únicas, ya que además de actuar como inhibidor de las  $\beta$ -lactamasas, tiene actividad antibacteriana intrínseca frente a los patógenos de la especie *Acinetobacter* gracias a su afinidad por las PBPs de tipo 1 y 2.<sup>36,163</sup> No sorprende por tanto que, durante bastante tiempo, fuese el tratamiento de elección para las infecciones causadas por *A. baumannii*.<sup>171,172,173</sup>

<sup>171</sup> Corbella, X.; Ariza, J.; Ardanuy, C.; Vuelta, M.; Tubau, F.; Sora, M.; Pujol, M.; Gudiol, F. *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *42*, 793–802.

<sup>172</sup> Wood, G. C.; Hanes, S. D.; Croce, M. A.; Fabian, T. C.; Boucher, B. A. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *34*, 1425–1430.

<sup>173</sup> Cisneros, J. M.; Reyes, M. J.; Pachon, J.; Becerril, B.; Caballero, F. J.; García-Garmendía, J. L.; Ortiz, C.; Cobacho, A. R. *Clin. Infect. Dis.* **1996**, *22*, 1026–1032.

Desafortunadamente, la resistencia al sulbactam (**30**) en las especies pertenecientes a *Acinetobacter* empezó a ser muy notable ya en la pasada década. Así por ejemplo, los datos registrados en Estados Unidos indican un descenso muy acusado de la susceptibilidad a la combinación ampicilina/sulbactam frente a cepas de *A. baumannii*, pasando del 89% en el año 2003 al 40% en tan solo 5 años (2008).<sup>174,175</sup> Esta pérdida de eficacia se asocia a la enorme dispersión de las carbapenemasas OXA-23 en los últimos años, y en ocasiones a la reducción en la expresión de PBP2.<sup>34,163</sup> En la actualidad la eficacia del sulbactam (**30**) como inhibidor de las  $\beta$ -lactamasas, al igual que la de los inhibidores estructuralmente próximos, el ácido clavulánico (**29**) y el tazobactam (**31**), se ha visto muy mermada. Es efectivo generalmente frente a  $\beta$ -lactamasas de clase A, como la CTX-M-15 y los enzimas de espectro extendido TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Pero desafortunadamente, en general no es eficaz frente a las  $\beta$ -lactamasas de clase B, C y D, además de las carbapenemasas de clase A tipo KPC.<sup>176</sup>

Sin embargo, recientemente Durand-Réville<sup>122</sup> y colaboradores demostraron que la combinación sulbactam/durlobactam restaura eficazmente la susceptibilidad a sulbactam en *A. baumannii*. Este descubrimiento abre la posibilidad de recuperar la capacidad antibiótica del sulbactam (**30**) en infecciones causadas por patógenos que expresan  $\beta$ -lactamasas de tipo A, C y varias de tipo D como la OXA 23 y la OXA-24/40 frente a las que el durlobactam (**25**) ha demostrado poseer buena capacidad inhibitoria. Los autores demostraron que la administración de 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de durlobactam (**25**) permite recuperar la actividad del sulbactam (**30**) frente a 1131 aislados clínicos de *A. baumannii*, reduciendo 8 veces la CIM<sub>90</sub> de este último, que pasa de 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Además, los ensayos microbiológicos llevados a cabo con esta combinación frente a aislados clínicos de *A. baumannii* resistentes a

<sup>174</sup> Swenson, J. M.; Killgore, G. E.; Tenover, F. C. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 5102–5108.

<sup>175</sup> Reddy, T.; Chopra, T.; Marchaim, D.; Pogue, J. M.; Alangaden, G.; Salimnia, H.; Boikov, D.; Navon-Venezia, S.; Akins, R.; Selman, P.; Dhar, S.; Kaye, S. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2235–2238.

<sup>176</sup> Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 160–201.

carbapenems, que portan las  $\beta$ -lactamasas adquiridas OXA-23, OXA-24/40, y OXA-58, entre otras, o sobreexpresan la  $\beta$ -lactamasa cromosómica OXA-51 fueron muy esperanzadores, pues el durlobactam (**25**) logró reducir la CIM del sulbactam (**30**) hasta 64 veces en algunos casos.<sup>177,178</sup>

Asimismo, estudios *in vivo* realizados en modelos preclínicos de infección murina causada por una cepa de *A. baumannii* que expresa TEM-1, ADC-82, OXA-23 y OXA-66 (del tipo OXA-51), y que no presenta susceptibilidad *in vitro* por el sulbactam (**30**), mostraron también excelentes resultados. Así, la administración subcutánea de 50 mg/Kg de sulbactam (**30**) junto con 200 mg/Kg de durlobactam (**25**) cada 3 h durante un periodo de 24 h logró una reducción de 1.5 log<sub>10</sub> UFC/g, superior a la de 1.3 log<sub>10</sub> UFC/g conseguida con la colistina, antibiótico que en muchas ocasiones es el único en presentar actividad frente a cepas de *A. baumannii* resistente a carbapenems pero cuyo uso terapéutico se limita por su alta toxicidad.<sup>177</sup>

Los buenos resultados conseguidos por la combinación sulbactam/durlobactam en infecciones causadas por patógenos multirresistentes portadores de CHDLs, además de  $\beta$ -lactamasas de clase A y C, la sitúan como una estrategia prometedora para el tratamiento de las infecciones causadas por *Acinetobacter*. De hecho, esta combinación se encuentra en fase clínica III en pacientes afectados con infecciones nosocomiales complicadas causadas por *A. baumannii*, como la neumonía y la bacteriemia asociada al uso de ventiladores, así como también infecciones multirresistentes en las que el tratamiento con colistina es ineficaz.<sup>178</sup>

---

<sup>177</sup> Barnes, M. D.; Kumar, V.; Bethel, C. R.; Moussa, S. H.; O'Donnell, J.; Rutter, J. D.; Good, C. E.; Hujer, K. M.; Hujer, A. M.; Marshall, S. H.; Kreiswirth, B. N.; Richter, S. S.; Rather, P. N.; Jacobs, M. R.; Papp-Wallace, K. M.; van den Akker, F.; Bonomo, R. A. *mBio* **2019**, *10*, e00159-19.

<sup>178</sup> Seifert, H.; Müller, C.; Stefanik, D.; Higgins, P. G.; Miller, A.; Kresken, M. J. *Antimicrob. Chemother.* **2020**. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa208>

## 5.2 Análogos del Sulbactam Conjugados con Grupos Sideróforos. Planteamiento

La posibilidad de poder utilizar el sulbactam (**30**) como antibiótico en el tratamiento de infecciones causadas por patógenos resistentes, en particular *A. baumannii*, resulta muy atractiva por tres razones principales: (1) se trata de un antibiótico seguro para el que no se han descrito efectos adversos significativos desde su comercialización a finales de los años 80; (2) la gran diseminación e incidencia a nivel mundial del patógeno prioritario *A. baumannii*; y (3) la estrategia sintética para su preparación, a diferencia de muchos de los compuestos discutidos en esta tesis doctoral, es relativamente sencilla y económica, lo que resulta muy atractivo desde el punto de vista de su implementación en el mercado.

Todo ello nos llevó a explorar en esta tesis doctoral la posible mejora de la eficacia del sulbactam (**30**) en el tratamiento de las infecciones causadas por el patógeno *A. baumannii* multirresistente mediante los compuestos **47–53**, que incorporan diferentes grupos sideróforos en el grupo metilo pro-*R* en posición C3 (Figura 27). Con esta modificación se busca por una parte, mejorar su internalización en la bacteria utilizando las vías de absorción de hierro, y por otra, potenciar las interacciones del ligando con su diana. Con este fin se exploró el efecto de la introducción en el grupo metilo de los grupos sideróforos utilizados previamente en los compuestos **38–43** (véase capítulo 4).

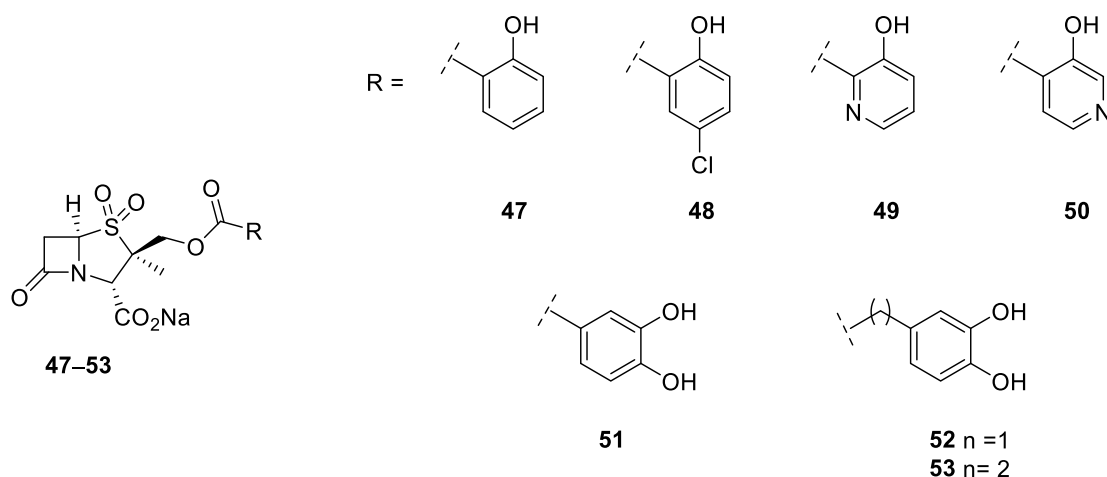


Figura 27. Compuestos objetivo 47–53.

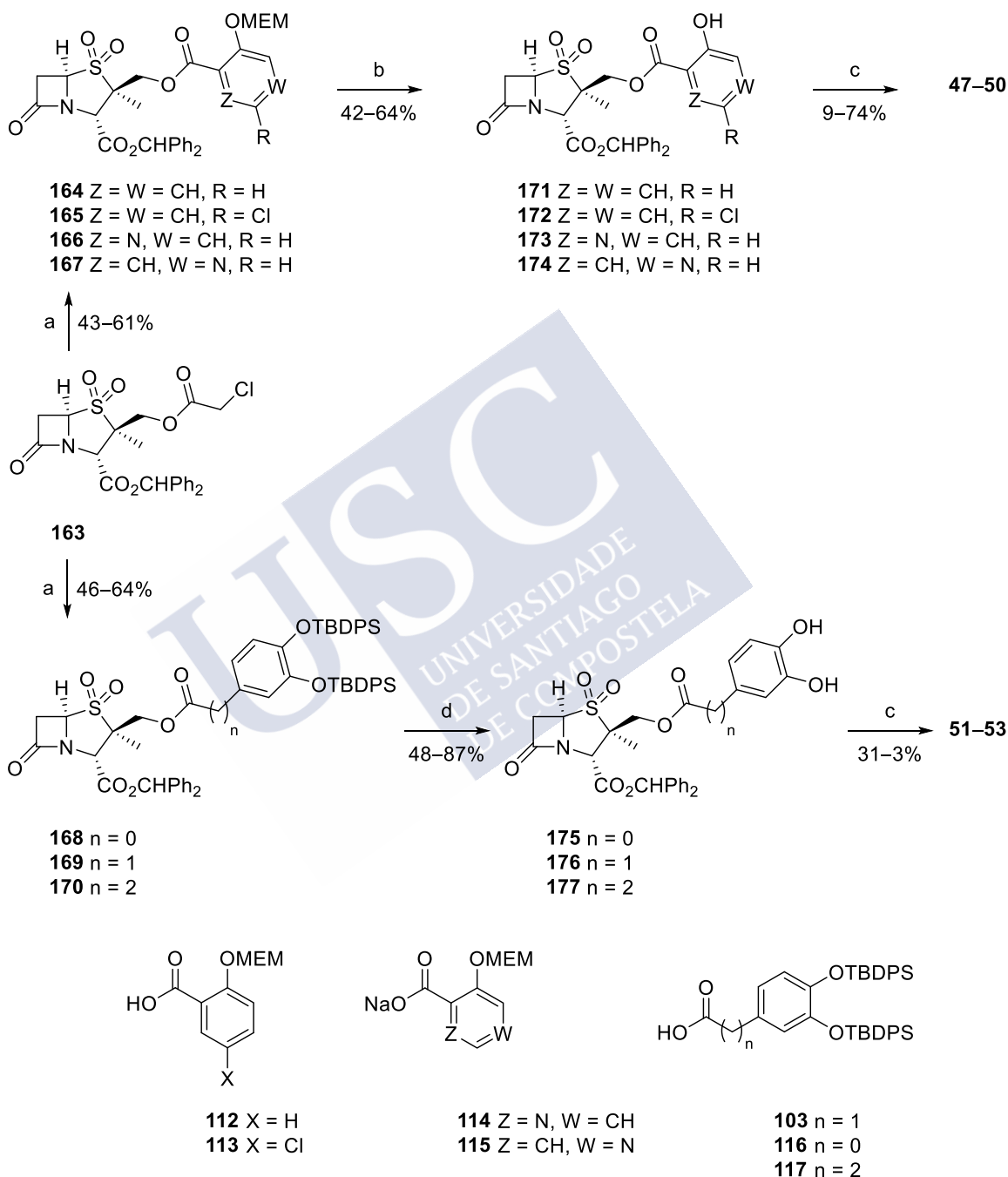
### 5.3 Síntesis de los Compuesto 47–53

La síntesis de los análogos objetivo 47–53 se llevó a cabo a partir del éster **163**<sup>179</sup> previamente descrito, mediante la secuencia de reacciones indicadas en el Esquema 18. En primer lugar, el tratamiento del éster **163** con tiourea y piridina, y posterior esterificación del alcohol resultante con el correspondiente ácido, en presencia de *N*-(3-(dimetilamino)propil)-*N'*-etilcarbodiimida y 4-*N,N*-dimetilaminopiridina, proporcionó los ésteres **164–170** con rendimientos del 43–64%. Los ácidos (o sus correspondientes sales) utilizados fueron: el ácido (2-metoxietoxi)metoxibenzoico el ácido **103**,<sup>139</sup> (**112**),<sup>159</sup> el ácido 3,4-di(*tert*-butildifenilsililoxi)benzoico (**116**),<sup>139</sup> y los desarrollados en esta tesis doctoral, los ácidos **113** y **117** y las sales sódicas **114** y **115**, cuya preparación se discutió en los capítulos 3 y 4.

A continuación, la desprotección del grupo MEM en los éteres **164–167** por calentamiento en presencia de *p*-toluensulfonato de piridinio proporcionó los fenoles **171–174** de forma satisfactoria. Los grupos TBDPS en los éteres **168–170** se eliminaron por tratamiento con fluoruro de tetrabutilamonio en presencia de ácido acético, obteniéndose los catecoles **175–177** con rendimientos en el rango del 48–

<sup>179</sup> Philips, O. A.; Reddy, A.V. V.; Setti, E. L.; Spevak, P.; Czajkowski, D. P.; Atwal, H.; Salama, S.; Micetich, R. G.; Maiti, S. N. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2847–2858.

87%. Por último, la hidrólisis de los ésteres de bencidrilo **171–177** por calentamiento con *m*-cresol y posterior neutralización con bicarbonato sódico proporcionó los compuestos deseados **47–53**.



**Esquema 18.** Reactivos y condiciones: (a) 1. tiourea, Pi, EtOH,  $\Delta$ . 2. **112**,<sup>159</sup> **113**, **114**, **115**, **103**,<sup>139</sup> **116**<sup>139</sup> y **117**, EDC, DMAP, DCM,  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$  t.a. (b) *p*-toluensulfonato de piridinio, *t*-BuOH,  $\Delta$ . (c) 1. *m*-cresol,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 2. NaHCO<sub>3</sub> (ac.). (d) TBAF, AcOH, THF,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Actualmente, en colaboración con el grupo de microbiología del CHUAC se está evaluando la actividad bactericida de los análogos del sulbactam **47–53**.



CHAPTER 6  
*Conclusions*

---



1. The ability of 6-arylmethylidene penicillin-based sulfones **33–37** to repurpose  $\beta$ -lactam antibiotics activity with bacterial species that carry carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamases (OXA-23, OXA-24/40 and OXA-48), as well as  $\beta$ -lactamases of classes A and C, was studied. These compounds were designed to explore the potential enhanced effect on the inhibitory potency of previously reported inhibitor LN-1-255 (**55c**) of: (i) the incorporation of substituents in the pyridine ring that would change the electron density of this moiety, and (ii) the use of larger pyridine-based heterocycles. Compounds **33–37** were synthesized in thirteen steps from commercially available (+)-6-aminopenicillanic acid (**62**), by a Wittig reaction between the ketone **61** and arylphosphonium salts **56–60** as a key step.
2. The results of the susceptibility studies of ampicillin against *E. coli* strains producing class A  $\beta$ -lactamases (TEM-1, CTX-M-2), ceftazidime against *E. coli* strains producing class C enzymes (CMY-2, DHA-1), imipenem against *A. baumannii* strains harboring CHDL enzymes (OXA-23, OXA-24/40) and *K. pneumoniae* strains expressing OXA-48, in the absence and in the presence of compounds **33–37** along with LN-1-255 and two inhibitors in clinical use, specifically, avibactam and relebactam, revealed that: (i) the combinations ceftazidime/**33–36** and ampicillin/**33–36** restored completely the antibiotic efficacy in strains harboring classes C (CMY-2, DHA-1) and A (TEM-1) enzymes to give similar results as the parent compound LN-1-255; (ii) lower efficacy was obtained with the combination ampicillin/**33–36** in strains producing CTX-M-2, in particular, a 64-fold improvement in the antibiotic MIC value was achieved with inhibitors **33** and **34**, as found for relebactam and compound LN-1-255; (iii) the combination of imipenem and compounds **33–37** for bacterial strains carrying the studied CHDL enzymes proved to be, in most cases, more efficient than when using avibactam and relebactam, which in most cases did not show a significant antibiotic enhancing effect. The best results against *A. baumannii*

strains carrying enzymes OXA-23 and OXA-24/40 were obtained using combinations of imipenem with compounds **33–35** that were able to restore almost completely the activity of the antibiotic, with MIC values in all cases of  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . For OXA-48-producing *K. pneumoniae* strains the best inhibitors were bromide **34** and fluoride **35** (MIC =  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). UV-Vis spectroscopy experiments and MALDI studies revealed that compounds **33–37** form stable inactivation adducts (indolizine) with these  $\beta$ -lactamase enzymes.

3. Inhibition data of **33–37** with the *A. baumannii* OXA-24/40 enzyme revealed that bromide **34** is the best inhibitor of the series, with an improved efficacy of approximately 1.6-fold compared with the parent compound LN-1-255, mainly due to its lower inhibition constant ( $K_i = 140 \text{ nM}$ ). Docking studies on the OXA-24/40/**33–37** binary complexes suggested that the substitution seem to play a more important role in the ligand affinity, as well as in the stability of the indolizine adduct. Thus, the improved affinity of bromide **34** would be due to the reduced electron density of its pyridine ring, which would enhance CH- $\pi$  interactions with the side chains of the apolar residues of the tunnel-like entrance that surround it.
4. With the purpose of improving the affinity of inhibitor LN-1-255 (**55**) for CHDLs by increasing the favourable interactions of its siderophore moiety with the active site of the enzymes, 6-pyridylmethyliden penicillin-based sulfones **38–43** were prepared. These compounds incorporate different siderophore groups, as well as new types of linkages to the core of LN-1-255 (**55c**). Their synthesis had as a key step a coupling reaction between alcohol **111**, prepared from (+)-6-aminopenicillanic acid (**62**) following reported protocols, and acids **112–113**, **116–117** or benzoates **114–115**. Moreover, analogues **44** and **45** were designed in order to reduce the complexity of the synthetic strategy. And finally, alcohol **46** would allow us to know the effect of the functionalization of the pro-*R* methyl group in C3 position on the enzyme recognition. The potential efficacy

of compounds **38–45** to act as antibiotic adjuvants of carbapenems is being evaluated.

5. The functionalization of the *pro*-R methyl group in C3 position of sulbactam (**31**) with the different siderophore groups attached to LN-1-255 (**55c**) derivatives mentioned before afforded the penam sulfones **47–53**. The synthesis of these analogues was carried out in three steps from the previously reported chloroacetyl ester **163**. The antibacterial activity of compounds **47–53** is now being evaluated.





CHAPTER 7  
*Experimental Section*

---



## 7.1 General Procedures

All commercially available starting materials and reagents were used without further purification. In general, commercially available dry solvents (tetrahydrofuran, *N,N*-dimethylformamide, methanol, dichloromethane, toluene, dioxane, carbon tetrachloride and chloroform) were used and, in some cases, they were dried according to the procedures described by Armarego and Perrin<sup>180</sup> by distillation from a suitable desiccant agent, under inert atmosphere, immediately before use. CaH<sub>2</sub> was employed for drying dichloromethane, pyridine and triethylamine.

The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using Merck 0.25 mm silica gel pre-coated aluminium plates (20 x 20 cm) with fluorescent indicator. For visualization, UV light at  $\lambda = 254$  nm and staining by immersion in Ce/Mo or Ninhydrin solution and mild heating was used.

Purification by normal phase flash column chromatography was carried out using silica gel Geduran<sup>®</sup> Si 60 (0.040–0.063) from Merck.

Lyophilization was carried out using a Termo Savant MODULYOD-230 freeze dryer coupled to a high vacuum Edwards RV pump.

NMR spectra were recorded on either Bruker DPX-250, Varian Mercury 300 or Inova 500 spectrometers at 250, 300 and 500 MHz for <sup>1</sup>H; 63, 75 and 125 MHz for <sup>13</sup>C; 202 MHz for <sup>31</sup>P, and 282 MHz for <sup>19</sup>F, respectively, in deuterated solvents. Chemical shifts ( $\delta$ ) are expressed as parts per million (ppm) using solvent as internal standard and coupling constants (*J*) are given in Hertz. NMR assignments were carried out by a combination of 1 D and DEPT-135 experiments.

<sup>180</sup> Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*; Butterworth Heinemann: Oxford, 1996.

High-resolution mass spectrometry (HRMS) data was recorded using electrospray ionization in positive (ESI<sup>+</sup>) and negative (ESI<sup>-</sup>) mode on a Bruker Microtof spectrometer. HRMS data are expressed in units of m/z.

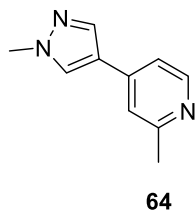
FTIR spectra were recorded on a Perkin Elmer Two FT/IR spectrometer with attenuated total reflectance (ATR).

Optical rotation measurements were registered on an automatic Jasco P-2000 polarimeter using a 10 mm path length cell.  $[\alpha]_D^{20}$  values are expressed in  $10^{-1}$  deg  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ .

Melting points were measured in a Buchi M-560 apparatus.

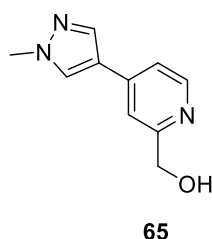
The purity of targeted compounds was determined by HPLC on a Thermo Dionex UltiMate 3000 apparatus having a Bruker amazon SL mass spectrometry detector. For compounds **33–44** and **47–48**, a Phenomenex kinetex XB-C18 column (particle size = 1.7  $\mu\text{m}$ ; dimensions: 50 mm  $\times$  2.1 mm, pore size = 100  $\text{\AA}$ ) was employed, eluting at a flow rate of 0.35  $\text{mL min}^{-1}$  with a gradient of 5–75% B in 10 min [A = Milli-Q water + 0.1% TFA; B = acetonitrile + 0.1% TFA]. For compounds **45–46** and **49–53**, an ACE Excel 2 C18 column (particle size = 2  $\mu\text{m}$ ; dimensions 10 cm  $\times$  2.1 mm, pore size = 100  $\text{\AA}$ ) was employed, and the following eluting conditions: (i) for compounds **49** and **52**: flow rate of 0.35  $\text{mL min}^{-1}$  with a gradient of 5–75 % B in 10 min; (ii) for compounds **51**, **53** and **46**: flow rate of 0.5  $\text{mL min}^{-1}$  with a gradient of 5–75 % B in 10 min; and (iii) for compounds **45** and **50**: flow rate of 0.5  $\text{mL min}^{-1}$  with a gradient of 5% B for 1 min and a gradient of 5–75 % B for 9 min. All tested compounds have a purity  $\geq$  95%.

## 7.2 Compound 64



A solution of 2-methyl-4-bromopyridine (**63**) (1 g, 5.81 mmol) in dioxane (29 mL) under inert atmosphere, was treated with tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (134.2 mg, 0.12 mmol), aqueous solution of potassium phosphate (10.3 mL, 0.8 M), and 1-methylpyrazole-4-boronic acid pinacol ester (1.45 g, 7 mmol). The resulting mixture was heated at 85 °C for 12 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with a (1:1) dichloromethane/water mixture, the organic layer was separated, dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography, eluting with a gradient of methanol/ethyl acetate [1] (0:100); (10:90)], to give the compound **64** (1.12 g, quant.) as a white foam. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.35 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, ArH), 7.76 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H, ArH), 7.65 (s, 1H, ArH), 7.14 (br s, 1H, ArH), 7.07 (dd, *J* = 1.8 and 5.3 Hz, 1H, ArH), 3.87 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>) and 2.48 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 158.7 (C), 149.5 (CH), 140.3 (C), 137.0 (CH), 127.9 (CH), 120.6 (C), 119.2 (CH), 117.0 (CH), 39.2 (CH<sub>3</sub>), and 24.4 (CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI) *m/z* = 174 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub> (MH<sup>+</sup>): 174.1026; found, 174.1025.

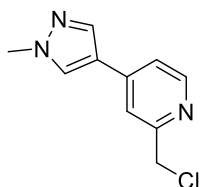
## 7.3 Compound 65



To a solution of 2-Methyl-4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)pyridine (**64**) (563 mg, 3.25 mmol) in CHCl<sub>3</sub> (13 mL) was added previously recrystallized *m*-chloroperbenzoic acid (947 mg, 4.23 mmol). After stirring for 6 h, the reaction was quenched by adding saturated NaHCO<sub>3</sub>, the organic layer was separated, and the aqueous layer extracted with dichloromethane. The combined organic extracts were dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure to give the corresponding pyridine *N*-oxide (655 mg), which was used without further purification. A solution of this compound (655 mg, 3.46 mmol) in acetic anhydride (6.6 mL) was heated at 90 °C

for 12 h. After cooling to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was dissolved in methanol (4.3 mL). The solution was cooled to 0 °C, treated with KOH (291 mg, 5.2 mmol) and stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate and saturated NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was separated, dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with a gradient of methanol/ethyl acetate/hexane [1) (0:90:10); 2) (10:90:0)], to give the alcohol **65** (257 mg, 40%) as a white foam. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.34 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, ArH), 7.76 (s, 1H, ArH), 7.67 (s, 1H, ArH), 7.37 (s, 1H, ArH), 7.14 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, ArH), 5.12 (br s, 1H, OH), 4.71 (s, 2H, CH<sub>2</sub>) and 3.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 160.6 (C), 148.9 (CH), 141.0 (C), 137.1 (CH), 128.2 (CH), 120.4 (C), 118.4 (CH), 116.6 (CH), 64.4 (CH<sub>2</sub>), and 39.2 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR) ν: 3154 (OH) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 190 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O (MH<sup>+</sup>): 190.0975; found, 190.0974.

#### 7.4 Compound 66

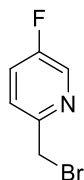


**66**

A solution of the alcohol **65** (394 mg, 2.08 mmol) in dry dichloromethane (10.4 mL), under inert atmosphere and at 0 °C, was treated with a solution of freshly distilled thionyl chloride in dry dichloromethane (4.7 mL, 1.4 M). The ice bath was removed, the reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h and then treated with saturated Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The organic layer was separated, dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with (5:95) methanol/ethyl acetate, to afford the chloride **66** (297 mg, 69%) as a pink oil. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.42 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, ArH), 7.79 (s, 1H, ArH), 7.70 (s, 1H, ArH), 7.44 (s, 1H, ArH), 7.21 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, ArH), 4.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>) and 3.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 156.9 (C), 149.8 (CH), 141.3 (C), 137.1 (CH), 128.1 (CH), 120.1 (C), 119.0

(CH), 118.7 (CH), 46.8 (CH<sub>2</sub>) and 39.3 (CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI)  $m/z$  = 208 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>3</sub> (MH<sup>+</sup>): 208.0636; found, 208.0635.

## 7.5 Compound 69

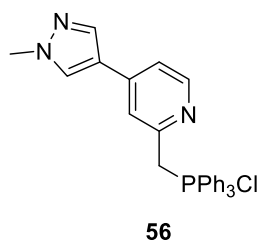


A solution of 5-fluoro-2-methylpyridine (**68**) (150 mg, 1.35 mmol) in dry carbon tetrachloride (3.1 mL), under inert atmosphere, was treated with *N*-bromosuccinimide (385 mg, 2.16 mmol) and AIBN (22 mg, 0.14 mmol). The resulting mixture was heated under reflux for 2 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography, eluting with (10:90) diethyl ether/hexane, to give the bromide **69** (129 mg, 50%) as a pink oil. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.39 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H, ArH), 7.45–7.34 (m, 2H, 2×ArH) and 4.52 (s, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 158.9 (d,  $J$  = 265 Hz, C), 152.9 (d,  $J$  = 4 Hz, C), 138.0 (d,  $J$  = 24 Hz, CH), 124.6 (d,  $J$  = 5 Hz, CH), 123.8 (d,  $J$  = 19 Hz, CH) and 32.7 (CH<sub>2</sub>) ppm. MS (CI)  $m/z$  = 190 and 192 (M<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>6</sub>H<sub>5</sub><sup>79</sup>BrNF (M<sup>+</sup>): 189.9662; found, 189.9663.

## 7.6 General procedure for the preparation of phosphonium salts 56–59

A solution of the chloride **66** or the bromides **67**, **69** and **70** (1 equivalent) in dry toluene (0.2 M), under argon and at room temperature, was treated with triphenylphosphine (1.2 equivalents). The reaction mixture was then heated under reflux for 12 h. After cooling to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure, diethyl ether was added, and the resulting precipitate was filtered to provide the phosphonium salts **56–59**.

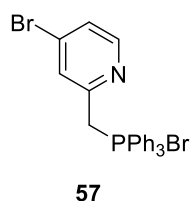
## 7.6.1 Compound 56



It was prepared following the general procedure for the synthesis of phosphonium salts using: chloride **66** (296 mg, 1.43 mmol), toluene (6.5 mL) and triphenylphosphine (449 mg, 1.71 mmol). Yield = 245 mg (40%). Pink solid. Mp: 297–298 °C. <sup>1</sup>H

NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.27 (s, 1H, ArH), 8.24 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, ArH), 7.87–7.82 (m, 10H, 10×ArH), 7.73–7.69 (m, 6H, 6×ArH), 7.60 (s, 1H, ArH), 7.40 (td, *J* = 1.4 and 5.3 Hz, 1H, ArH), 5.54 (d, *J* = 15.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) and 3.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 150.9 (d, *J* = 8 Hz, C), 149.4 (CH), 141.0 (C), 136.7 (CH), 134.6 (d, *J* = 2 Hz, 3×CH), 133.9 (d, *J* = 10 Hz, 6×CH), 129.8 (d, *J* = 13 Hz, 6×CH), 129.5 (CH), 121.1 (d, *J* = 8 Hz, CH), 119.6 (C), 119.0 (C), 118.7 (CH), 118.4 (C), 39.4 (CH<sub>3</sub>) and 31.1 (d, *J* = 51 Hz, CH<sub>2</sub>) ppm. <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 27.09 (s, 1P) ppm. MS (ESI) *m/z* = 434 (MH-Cl). HRMS calcd for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>P (MH-Cl): 434.1781; found, 434.1781.

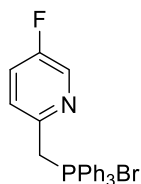
## 7.6.2 Compound 57



It was prepared following the general procedure for the synthesis of phosphonium salts using: bromide **67**<sup>136</sup> (505 mg, 2.02 mmol), toluene (9.2 mL) and triphenylphosphine (636 mg, 2.42 mmol). Yield = 534 mg (52%). Pink solid. Mp: 245–247 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,

DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.24 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, ArH), 7.87–7.80 (m, 9H, 9×ArH), 7.74–7.70 (m, 6H, 6×ArH), 7.62 (br s, 1H, ArH), 7.54 (td, *J* = 1.7 and 5.4 Hz, 1H, ArH) and 5.55 (d, *J* = 15.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 152.2 (d, *J* = 8 Hz, C), 150.3 (C), 134.8 (3×CH), 133.9 (d, *J* = 10 Hz, 6×CH), 132.8 (CH), 129.9 (d, *J* = 13 Hz, 6×CH), 128.6 (d, *J* = 8 Hz, CH), 126.0 (CH), 118.9 (d, *J* = 87 Hz, 3×C) and 30.6 (d, *J* = 51 Hz, CH<sub>2</sub>) ppm. <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 25.20 (s, 1P) ppm. MS (ESI) *m/z* = 432 and 434 (M-Br). HRMS calcd for C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>NP<sup>79</sup>Br (M-Br): 432.0511; found, 432.0511.

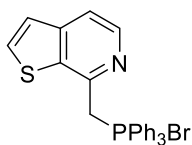
## 7.6.3 Compound 58



58

It was prepared following the general procedure for the synthesis of phosphonium salts using: bromide **69** (30 mg, 0.16 mmol), toluene (0.7 mL) and triphenylphosphine (50 mg, 0.2 mmol). Yield = 64 mg (89%). White solid. Mp: 236–238 °C.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ : 8.38 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H, ArH), 7.87–7.66 (m, 16H, 16 $\times$ ArH), 7.40 (dd,  $J = 4.2$  and 8.5 Hz, 1H, ArH) and 5.51 (d,  $J = 15.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ : 158.4 (dd,  $J = 3$  and 253 Hz, C), 146.7 (dd,  $J = 4$  and 9 Hz, C), 137.4 (dd,  $J = 2$  and 24 Hz, CH), 134.8 (d,  $J = 3$  Hz, 3 $\times$ CH), 133.9 (d,  $J = 10$  Hz, 6 $\times$ CH), 129.9 (d,  $J = 13$  Hz, 6 $\times$ CH), 127.2 (dd,  $J = 5$  and 8 Hz, CH), 124.5 (d,  $J = 19$  Hz, CH), 118.9 (d,  $J = 87$  Hz, 3 $\times$ C) and 30.0 (d,  $J = 51$  Hz, CH<sub>2</sub>) ppm.  $^{19}\text{F}$  NMR (282 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ : -128.0 (t,  $J = 3.9$  Hz, 1F) ppm.  $^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ : 27.0 (s, 1P) ppm. MS (ESI)  $m/z = 372$  (M–Br). HRMS calcd for C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>NPF (M–Br): 372.1312; found, 372.1313.

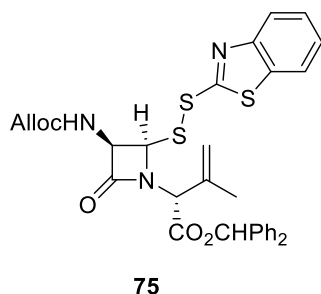
## 7.6.4 Compound 59



59

It was prepared following the general procedure for the synthesis of phosphonium salts using: bromide **70**<sup>137</sup> (272 mg, 1.2 mmol), toluene (5.6 mL) and triphenylphosphine (378 mg, 1.4 mmol). Yield = 327 mg (56%). White solid. Mp: 277–278 °C.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ : 8.21 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H, ArH), 8.09 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H, ArH), 7.92 (dd,  $J = 7.1$  and 14.6 Hz, 6H, 6 $\times$ ArH), 7.81 (t,  $J = 6.6$  Hz, 3H, 3 $\times$ ArH), 7.75 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H, ArH), 7.69 (m, 6H, 6 $\times$ ArH), 7.59 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, ArH), and 5.99 (d,  $J = 14.8$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ : 145.6 (C), 145.5 (d,  $J = 7$  Hz, C), 141.5 (CH), 135.4 (d,  $J = 9$  Hz, C), 134.3 (d,  $J = 2$  Hz, 2 $\times$ CH), 134.0 (CH), 133.8 (d,  $J = 10$  Hz, 6 $\times$ CH), 129.7 (d,  $J = 13$  Hz, 6 $\times$ CH), 123.7 (CH), 120.0 (d,  $J = 88$  Hz, 3 $\times$ C), 117.5 (CH) and 30.3 (d,  $J = 58$  Hz, CH<sub>2</sub>) ppm.  $^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ : 26.56 (s, 1P) ppm. MS (ESI)  $m/z = 410$  (M–Br). HRMS calcd for C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>NPS (M–Br): 410.1115; found, 410.1127.

## 7.7 Compound 75



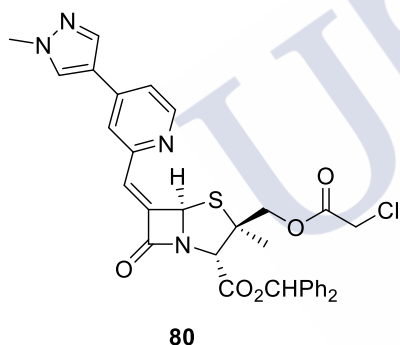
A solution of sulfoxide **74**<sup>133</sup> (1g, 2.07 mmol) in dry dioxane (8.3 mL) was treated with anhydrous MgSO<sub>4</sub> (1 g, 8.31 mmol) and 2-mercaptobenzothiazole (378 mg, 2.26 mmol). The resultant yellow suspension was heated at 110 °C for 14 h. After cooling to room temperature, the solid was removed by filtration over Celita®. The filtrate and the washings were concentrated under reduced pressure. The resultant residue was dissolved in diethyl ether and treated with activated charcoal and stirred for 30 min. The suspension was filtered through a plug of Celita®. The filtrate and the washings (diethyl ether) were concentrated under reduced pressure to give disulfide **75**<sup>140</sup> (1.2 g, 91%), as a pale yellow foam. Compound **75** was converted without further purification into amine **79** following previously reported protocol.<sup>133,134</sup>

## 7.8 General Procedure for the Wittig Reaction

A solution of the amine **79**<sup>133,134</sup> (and its six-membered analog) (1 equivalent) in dry dichloromethane (0.2 M), under inert atmosphere and at -78 °C, was treated dropwise with dry triethylamine (3 equivalents). After 5 min stirring, trifluoromethanesulfonic anhydride (3 equivalents) was added dropwise during 5 min. The reaction mixture was warmed up to 0 °C during a 1 h period, and then it was cooled again to -78 °C. Dry triethylamine (3 equivalents) was added dropwise during 10 min. The resulting mixture was stirred for 30 min and then treated with cold HCl (8 equivalents, 0.5 M) and allowed to reach room temperature for 10 min. The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (×3). The combined organic extracts were washed with cold HCl (3×4 equivalents, 0.5 M), dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure to give the diketone **61**, which was used for the subsequent Wittig reaction without further purification. A suspension of compounds **56–60** (1

equivalent) in dry THF (0.25 M), under argon atmosphere and at room temperature, was treated with KO<sup>t</sup>Bu (1 equivalent) and then stirred for 2 h. The resultant solution was added *via cannula*, at room temperature or at  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  and under inert atmosphere, to a solution of the previously obtained diketone (1 equivalent) in dry dichloromethane (0.13 M), under argon and at room temperature or at  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After 30–45 min stirring, saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl was added and the resultant suspension was allowed to reach room temperature for 10 min. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (×3). The combined organic extracts were successively washed with water and brine, dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography to yield compounds **80–84**.

### 7.8.1 Compound 80

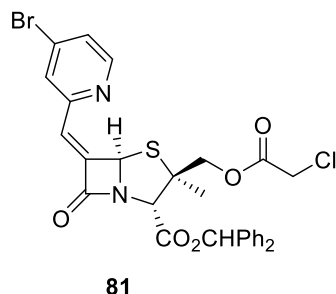


It was prepared according to the general Wittig reaction procedure using: (i) for the preparation of the diketone: amine **79**<sup>133,134</sup> and its six-membered analog (621 mg, 1.31 mmol), dry dichloromethane (6.6 mL), dry triethylamine (0.6 mL, 3.93 mmol), trifluoromethanesulfonic anhydride (0.7 mL, 3.93

mmol), dry triethylamine (0.6 mL, 3.93 mmol), cold HCl (20 mL, 0.5 M) and cold HCl (3×10 mL, 0.5 M); (ii) for the Wittig reaction: **56** (673 mg, 1.31 mmol), dry THF (5.2 mL), KO<sup>t</sup>Bu (146 mg, 1.31 mmol), diketone **61** (620 mg, 1.31 mmol) and dry dichloromethane (10 mL). Reaction conditions: 35 min RT. Eluent for chromatography: gradient of ethyl acetate/hexane [1) (55:45); 2) (70:30)]. Yield = 244 mg (30%). Yellow foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +285.1$  (*c*1.2, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.56 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, ArH), 7.85 (s, 1H, ArH), 7.76 (s, 1H, ArH), 7.44–7.28 (m, 12H, 12×ArH), 6.98 (s, 1 H, CH=), 6.94 (s, 1H CHPh<sub>2</sub>), 6.32 (s, 1H, H5), 4.99 (s, 1H, H2), 4.22 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, OCHH), 4.16 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, CHHCl), 4.09 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, CHHCl), 3.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.93 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, OCHH), and 1.23 (s, 3H,

CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 168.2 (C), 166.9 (C), 166.7 (C), 152.8 (C), 150.8 (CH), 145.4 (C), 141.2 (C), 139.2 (C), 139.2 (C), 137.2 (CH), 128.7 (4×CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 127.5 (2×CH), 127.2 (2×CH), 124.5 (CH), 122.8 (CH), 120.0 (C), 119.6 (CH), 78.5 (CH), 72.0 (OCH<sub>2</sub>), 70.6 (CH), 65.7 (CH), 64.1 (C), 40.8 (CH<sub>2</sub>), 39.4 (CH<sub>3</sub>) and 20.5 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR) ν: 1756 (CO) and 1742 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 629 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>33</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>ClO<sub>5</sub>S (MH<sup>+</sup>): 629.1620; found, 629.1619.

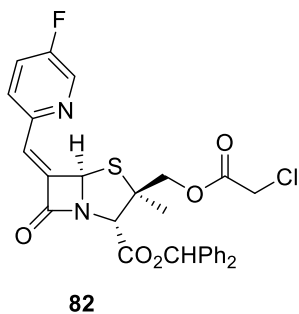
### 7.8.2 Compound 81



It was prepared according to the general Wittig reaction procedure using: (i) for the preparation of the diketone: amine **79**<sup>133,134</sup> and its six-membered analog (220 mg, 0.46 mmol), dry dichloromethane (2.3 mL), dry triethylamine (0.19 mL, 1.38 mmol), trifluoromethanesulfonic anhydride (0.23 mL, 1.38 mmol), dry triethylamine (0.19 mL, 1.38 mmol), cold HCl (9 mL, 0.5 M) and cold HCl (3×5 mL, 0.5M); (ii) for the Wittig reaction: **57** (236 mg, 0.46 mmol), dry THF (1.8 mL), KO<sup>t</sup>Bu (52 mg, 0.46 mmol), diketone **61** (220 mg, 0.46 mmol) and dry dichloromethane (3.5 mL). Reaction conditions: 30 min RT. Eluent for the first chromatography: (1:99) ethyl acetate/dichloromethane. Eluent for the second chromatography (40:60) diethyl ether/hexane. Yield = 125 mg (43%). White solid.  $[\alpha]_D^{20} = +318.2$  (c0.9, CHCl<sub>3</sub>). Mp: 67–68 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.43 (s, 1H, ArH), 7.53 (s, 1H, ArH), 7.41–7.36 (m, 11H, 11×ArH), 6.98 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.86 (s, 1H, CH=), 6.28 (s, 1H, H5), 4.99 (s, 1H, H2), 4.21 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, OCHH), 4.09 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.91 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H OCHH) and 1.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 167.6 (C), 166.8 (C), 166.7 (C), 153.6 (C), 150.9 (CH), 147.1 (C), 139.2 (C), 139.2 (C), 133.5 (C), 129.5 (CH), 128.7 (4×CH), 128.5 (CH), 128.3 (CH), 127.6 (2×CH), 127.2 (2×CH), 126.8 (CH), 122.9 (CH), 78.6 (CH), 72.0 (OCH<sub>2</sub>), 70.5 (CH), 65.8 (CH), 64.3 (C), 40.8 (CH<sub>2</sub>) and 20.5 (CH<sub>3</sub>)

ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 1766 (CO) and 1742 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z$  = 627 ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{BrClO}_5\text{S}$  ( $\text{MH}^+$ ): 627.0351; found, 627.0353.

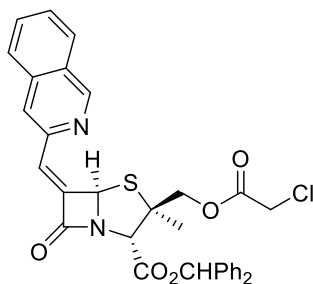
### 7.8.3 Compound 82



It was prepared according to the general Wittig reaction procedure using: (i) for the preparation of the diketone: amine **79**<sup>133,134</sup> and its six-membered analog (720 mg, 1.53 mmol), dry dichloromethane (7.8 mL), dry triethylamine (0.63 mL, 4.56 mmol), trifluoromethanesulfonic anhydride (0.78 mL, 4.56 mmol), dry triethylamine (0.63 mL, 4.56 mmol), cold HCl (27 mL, 0.5 M) and cold HCl (3×15 mL, 0.5 M); (ii) for the Wittig reaction: **58** (693 mg, 1.53 mmol), dry THF (6.0 mL),  $\text{KO}^t\text{Bu}$  (171 mg, 1.53 mmol), diketone **61** (720 mg, 1.53 mmol) and dry dichloromethane (11.7 mL). Reaction conditions: 40 min RT. Eluent for the first chromatography (1:99) ethyl acetate/dichloromethane. Eluent for the second chromatography (50:50) diethyl ether/hexane. Yield = 200 mg (23%). Yellow foam.  $[\alpha]_D^{20} = +317.3$  ( $c$ 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.50 (s, 1H, ArH), 7.53–7.32 (m, 12H, 12×ArH), 6.98 (s, 1H,  $\text{CHPh}_2$ ), 6.92 (s, 1H, CH=), 6.27 (s, 1H, H5), 4.99 (s, 1H, H2), 4.21 (d,  $J$  = 11.6 Hz, 1H, OCHH), 4.15 (d,  $J$  = 15.0 Hz, 1H, CHHCl), 4.08 (d,  $J$  = 15.0 Hz, 1H, CHHCl), 3.92 (d,  $J$  = 11.6 Hz, 1H OCHH) and 1.24 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 168.1 (C), 167.0 (C), 166.7 (C), 159.2 (d,  $J_{\text{CF}}$  = 256 Hz, C), 148.6 (d,  $J_{\text{CF}}$  = 4 Hz, C), 145.3 (d,  $J_{\text{CF}}$  = 2 Hz, C), 139.5 (C), 139.4 (d,  $J_{\text{CF}}$  = 24 Hz, CH), 139.2 (C), 128.7 (3×CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 127.6 (2×CH), 127.5 (CH), 127.3 (2×CH), 123.3 (d,  $J_{\text{CF}}$  = 19 Hz, CH), 123.0 (CH), 78.6 (CH), 72.0 ( $\text{OCH}_2$ ), 70.5 (CH), 65.7 (CH), 64.4 (C), 40.8 ( $\text{CH}_2$ ) and 20.6 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{19}\text{F}$  NMR (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -124.2 (s, 1F) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 1765 (CO) and 1742 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z$  = 589 ( $\text{MNa}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{ClFO}_5\text{SNa}$  ( $\text{MNa}^+$ ): 589.0971; found, 589.0969.



### 7.8.5 Compound 84



84

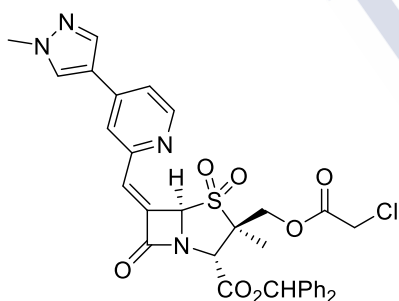
It was prepared according to the general Wittig reaction procedure using: (i) for the preparation of the diketone: amine **79**<sup>133,134</sup> and its six-membered analog (150 mg, 0.32 mmol), dry dichloromethane (1.6 mL), dry triethylamine (0.13 mL, 0.96 mmol), trifluoromethanesulfonic anhydride (0.16 mL, 0.96 mmol), dry triethylamine (0.13 mL, 0.96 mmol), cold HCl (7 mL, 0.5 M) and cold HCl (3×4 mL, 0.5 M); (ii) for the Wittig reaction: (3-isoquinolyl)methyltriphenylfosfosonium bromide (**60**)<sup>132</sup> (139 mg, 0.32 mmol), dry THF (1.3 mL), KO<sup>t</sup>Bu (36 mg, 0.32 mmol), diketone **61** (150 mg, 0.32 mmol) and dry dichloromethane (2.5 mL). Reaction conditions: 30 min RT. Eluent for chromatography: (50:50) diethyl ether/hexane. Yield = 51 mg (27%). Yellow foam.  $[\alpha]_D^{20} = +383.2$  (c1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 9.22 (s, 1H, ArH), 7.98 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, ArH), 7.85 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 7.75–7.64 (m, 3H, 3×ArH), 7.46–7.30 (m, 10 H, 10×ArH), 7.09 (s, 1H CHPh<sub>2</sub>), 7.00 (br s, 1H, CH=), 6.43 (s, 1H, H5), 5.02 (s, 1H, H2), 4.23 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1H, OCHH), 4.16 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H, CHHCl), 4.09 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H, CHHCl), 3.95 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1H OCHH) and 1.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 168.6 (C), 167.1 (C), 166.7 (C), 153.1 (C), 146.4 (C), 144.1 (C), 139.3 (C), 139.3 (C), 135.8 (C), 131.1 (CH), 128.7 (CH), 128.7 (4×CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 127.8 (CH), 127.5 (2×CH), 127.3 (2×CH), 127.1 (CH), 125.2 (CH), 124.4 (CH), 78.5 (CH), 72.1 (OCH<sub>2</sub>), 70.9 (CH), 65.8 (CH), 64.4 (C), 40.8 (CH<sub>2</sub>) and 20.6 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 1759 (CO) and 1742 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 599$  (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>33</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>ClO<sub>5</sub>S (MH<sup>+</sup>): 599.1402; found, 599.1399.

### 7.9 General procedure for the oxidation of compounds 80–84

A solution of the compounds **80–84** (1 equivalent) in dry dichloromethane (0.15 M), under inert atmosphere and at room temperature, was treated with *m*-chloroperbenzoic acid (2 equivalents, ca 77%) and stirred for 30 or 40 min.

Saturated aqueous solution of  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  was then added and the reaction mixture was stirred for 5 min. The aqueous layer was separated, and the organic layer was successively washed with saturated  $\text{NaHCO}_3$ , water and brine. The organic extract was dried (anh.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, to afford the sulfones **85–89** and the corresponding sulfoxides of compounds **80–84**. A solution of the latter compounds in dry dichloromethane (0.15 M), under argon and at room temperature, was oxidized to **85–89** by treatment with *m*-chloroperbenzoic acid (1.2 equivalents, ca 77%). After 12 h stirring, saturated  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  was added and, after 5 min stirring, the aqueous layer was separated and the organic layer was successively washed with saturated  $\text{NaHCO}_3$ , water and brine. The organic extract was dried (anh.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography to give compounds **85–89**.

### 7.9.1 Compound 85



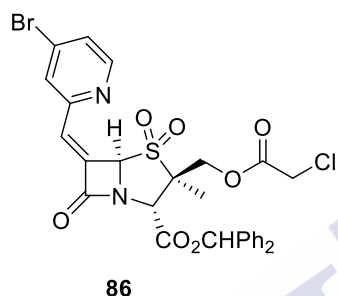
**85**

It was prepared following the general oxidation procedure using: (i) for the first oxidation: **80** (154 mg, 0.24 mmol), *m*-chloroperbenzoic acid (85 mg, 0.49 mmol) and dry dichloromethane (1.6 mL), reaction time = 40 min, eluent for chromatography: gradient of ethyl acetate/hexane [1] (65:35); 2)

(75:25)]; (ii) for the oxidation of the corresponding sulfoxide to sulfone **85**, sulfoxide derivative of **80** (45 mg, 0.07 mmol), *m*-chloroperbenzoic acid (14 mg, 0.08 mmol) in dry dichloromethane (0.5 mL), eluent for chromatography: (65:35) ethyl acetate/hexane. Overall yield = 115 mg (72%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +219.4$  (c1.1,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.52 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, ArH), 7.81 (s, 1H, ArH), 7.74 (s, 1H, ArH), 7.38–7.31 (m, 12H, 12×ArH), 7.24 (s, 1 H, CH=), 7.00 (s, 1H  $\text{CHPh}_2$ ), 5.78 (s, 1H, H5), 4.79 (s, 1H, H2), 4.71 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.52 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.11 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H, CHHCl), 4.05 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H, CHHCl), 3.93

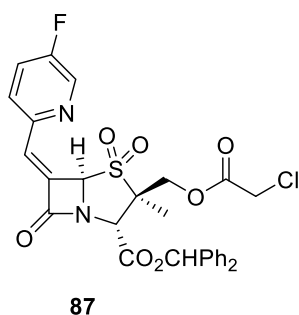
(s, 3H, CH<sub>3</sub>) and 1.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 167.6 (C), 166.5 (C), 166.1 (C), 151.3 (C), 150.9 (CH), 141.5 (C), 138.7 (C), 138.6 (C), 137.2 (CH), 133.4 (C), 130.4 (CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (3×CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 127.6 (2×CH), 127.1 (2×CH), 122.7 (CH), 120.7 (CH), 119.8 (C), 79.5 (CH), 73.8 (CH), 66.0 (C), 64.9 (OCH<sub>2</sub>), 59.7 (CH), 40.6 (CH<sub>2</sub>), 39.4 (CH<sub>3</sub>) and 15.8 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR) v: 1778 (CO) and 1752 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 661 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>33</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>ClO<sub>7</sub>S (MH<sup>+</sup>): 661.1518; found, 661.1516.

### 7.9.2 Compound 86



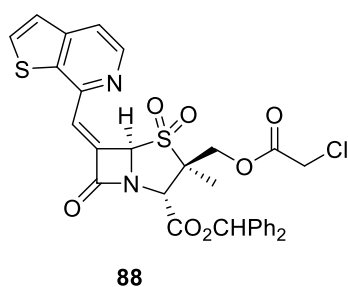
It was prepared following the general oxidation procedure using: (i) for the first oxidation: **81** (328 mg, 0.52 mmol), *m*-chloroperbenzoic acid (234 mg, 1.05 mmol) and dry dichloromethane (3.5 mL), reaction time = 30 min, eluent for chromatography: (50:50) diethyl ether/hexane; (ii) for the oxidation of the corresponding sulfoxide to sulfone **86**, sulfoxide derivative of **81** (116 mg, 0.18 mmol), *m*-chloroperbenzoic acid (49 mg, 0.22 mmol) in dry dichloromethane (1.2 mL), eluent for chromatography: (50:50) diethyl ether/hexane. Overall yield = 242 mg (70%). Yellow foam.  $[\alpha]_D^{20} = +231.9$  (c1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.49 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, ArH), 7.56 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.49 (d, *J* = 1.8 and 5.2 Hz, 1H, ArH), 7.38–7.30 (m, 10H, 10×ArH), 7.20 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, CH=), 7.00 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 5.74 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 4.79 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.69 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, OCHH), 4.50 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, OCHH), 4.11 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, CHHCl), 4.04 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, CHHCl) and 1.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 167.0 (C), 166.5 (C), 166.0 (C), 152.0 (C), 151.1 (CH), 138.7 (C), 138.6 (C), 135.2 (C), 133.8 (C), 129.4 (CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (3×CH), 128.6 (2×CH), 128.2 (2×CH), 127.6 (2×CH), 127.1 (2×CH), 79.5 (CH), 73.8 (CH), 66.0 (C), 65.0 (OCH<sub>2</sub>), 59.9 (CH), 40.6 (CH<sub>2</sub>) and 15.8 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR) v: 1783 (CO), 1755 (CO) and 1748 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 659 and 661 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub><sup>79</sup>BrClO<sub>7</sub>S (MH<sup>+</sup>): 659.0249; found, 659.0250.

## 7.9.3 Compound 87



It was prepared following the general oxidation procedure using: (i) for the first oxidation: **82** (170 mg, 0.30 mmol), *m*-chloroperbenzoic acid (134 mg, 0.60 mmol) and dry dichloromethane (2.0 mL), reaction time = 30 min, eluent for chromatography: (60:40) diethyl ether/hexane; (ii) for the oxidation of the corresponding sulfoxide to sulfone **87**, sulfoxide derivative of **82** (71 mg, 0.12 mmol), *m*-chloroperbenzoic acid (32 mg, 0.14 mmol) in dry dichloromethane (0.8 mL), eluent for chromatography: (60:40) diethyl ether/hexane. Overall yield = 146 mg (81%). Yellow foam.  $[\alpha]_D^{20} = +289.8$  (c0.9, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.54 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.43–7.32 (m, 12H, 12×ArH), 7.26 (s, 1H, CH=), 7.00 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 5.72 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H5), 4.79 (s, 1H, H2), 4.69 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, OCHH), 4.51 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, OCHH), 4.11 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, CHHCl), 4.05 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, CHHCl) and 1.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 167.4 (C), 166.5 (C), 166.1 (C), 160.0 (d, *J*<sub>CF</sub> = 261 Hz, C), 147.1 (d, *J*<sub>CF</sub> = 4 Hz, C), 140.0 (d, *J*<sub>CF</sub> = 25 Hz, CH), 138.7 (C), 138.6 (C), 133.4 (d, *J*<sub>CF</sub> = 3 Hz, C), 128.9 (2×CH), 128.8 (3×CH), 128.6 (2×CH), 127.7 (2×CH), 127.6 (CH), 127.1 (2×CH), 123.6 (d, *J* = 19 Hz, CH), 79.5 (CH), 73.7 (CH), 66.0 (C), 64.9 (OCH<sub>2</sub>), 59.8 (CH), 40.6 (CH<sub>2</sub>Cl) and 15.8 (CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>19</sup>F NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : -121.9 (t, *J* = 5.6 Hz, 1F) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 1781 (CO) and 1750 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 599 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>ClFO<sub>7</sub>S (MH<sup>+</sup>): 599.1050; found, 599.1046.

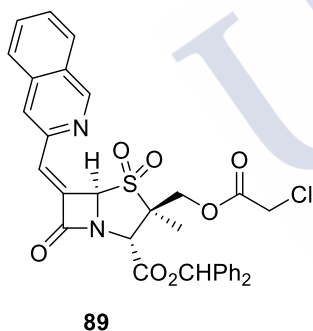
## 7.9.4 Compound 88



It was prepared following the general oxidation procedure using **83** (80 mg, 0.13 mmol), *m*-chloroperbenzoic acid (58 mg, 0.26 mmol) and dry dichloromethane (0.9 mL). Reaction time = 30 min. Eluent for chromatography: (5:95) ethyl

acetate/dichloromethane. Yield = 65 mg (78%). Yellow foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +47.5$  (c1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.58 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, ArH), 7.71 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H, ArH), 7.68 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, ArH), 7.59 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, CH=), 7.43–7.30 (m, 11H, 11×ArH), 7.02 (s, 1H,  $\text{CHPh}_2$ ), 5.85 (d,  $J = 1.3$  Hz, H5), 4.83 (s, 1H, H2), 4.74 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.54 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.12 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H, CHHCl), 4.06 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H, CHHCl) and 1.28 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 167.3 (C), 166.5 (C), 166.1 (C), 146.4 (C), 145.4 (C), 144.0 (C), 138.7 (C), 138.6 (C), 134.4 (C), 131.9 (CH), 128.9 (3×CH), 128.8 (3×CH), 128.5 (CH), 127.6 (2×CH), 127.1 (2×CH), 127.0 (CH), 123.7 (CH), 119.3 (CH), 79.5 (CH), 73.9 (CH), 66.0 (C), 64.9 (OCH<sub>2</sub>), 59.8 (CH), 40.6 (CH<sub>2</sub>Cl) and 15.8 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 1777 (CO) and 1746 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 637$  ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{ClO}_7\text{S}_2$  ( $\text{MH}^+$ ): 637.0864; found, 637.0866.

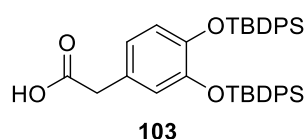
### 7.9.5 Compound 89



It was prepared following the general oxidation procedure using: (i) for the first oxidation: **84** (157 mg, 0.26 mmol), *m*-chloroperbenzoic acid (117 mg, 0.52 mmol) and dry dichloromethane (1.7 mL), reaction time = 30 min, eluent for chromatography: (60:40) diethyl ether/hexane; (ii) for the oxidation of the corresponding sulfoxide to sulfone **89**, sulfoxide derivative of **84** (62 mg, 0.1 mmol), *m*-chloroperbenzoic acid (27 mg, 0.12 mmol) in dry dichloromethane (0.7 mL), eluent for chromatography: (60:40) diethyl ether/hexane. Overall yield = 128 mg (78%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +364.1$  (c0.7,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.26 (s, 1H, ArH), 7.98 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 7.85 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 7.77 (s, 1H, ArH), 7.75–7.65 (m, 2H, 2×ArH), 7.43–7.33 (m, 11H, 10×ArH + CH=), 7.02 (s, 1H,  $\text{CHPh}_2$ ), 5.89 (s, 1H, H5), 4.80 (s, 1H, H2), 4.71 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 4.52 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 4.12 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H, CHHCl), 4.06 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H, CHHCl) and 1.28 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 168.0 (C), 166.5 (C), 166.2 (C), 153.5 (C), 144.9 (C), 138.8 (C),

138.7 (C), 135.8 (C), 132.2 (C), 131.4 (CH), 130.9 (CH), 129.2 (CH), 129.0 (CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (2×CH), 128.8 (CH), 128.6 (CH), 128.1 (CH), 127.7 (2×CH), 127.4 (CH), 127.2 (2×CH), 124.8 (CH), 79.5 (CH), 74.2 (CH), 66.0 (C), 65.1 (OCH<sub>2</sub>), 59.7 (CH), 40.6 (CH<sub>2</sub>Cl) and 15.9 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 1779 (CO) and 1748 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z$  = 631 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>33</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>ClO<sub>7</sub>S (MH<sup>+</sup>): 631.1300; found, 631.1299.

### 7.10 Compound 103



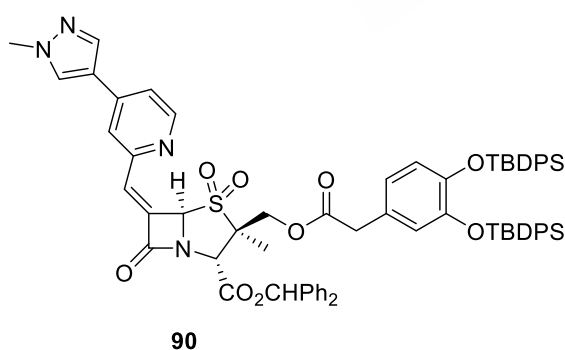
A solution of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (**102**) (2 g, 11.9 mmol), imidazole (3.2 g, 47.6 mmol) and *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (12.4 mL, 47.6 mmol) in dry DMF (24 mL), under inert atmosphere and at room temperature, was stirred for 96 h. The reaction mixture was diluted with a (1:4) mixture of ethyl acetate/water, the organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (×3). The combined organic extracts were washed with HCl (10%), dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with (30:70) diethyl ether/hexane, to afford a pink foam (10.4 g), which was diluted in THF (119 mL) and treated with aqueous lithium hydroxide (60 mL, 0.5 M). The resultant solution was stirred at room temperature for 30 min, diluted with Milli-Q water and the THF was removed under reduced pressure. The resultant aqueous solution was acidified with HCl (10%) until pH = 4 and then extracted with ethyl acetate (×3). The combined organic extracts were dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with (50:50) diethyl ether/hexane, to give the acid **103**<sup>139</sup> (4.9 g, 64%) as a white foam.

### 7.11 General procedure for the synthesis of esters 90–94

A solution of the esters **85–89** (1 equivalent) in dry DMF (0.8 M), under inert atmosphere and at 0 °C, was treated with dry pyridine (5.5 equivalents) and thiourea (3 equivalents). The reaction mixture was stirred for 12 h allowing to reach

room temperature. The reaction mixture was diluted with a (1:4) mixture of ethyl acetate/water, the organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate ( $\times 5$ ). The combined organic extracts were successively washed with water and brine, dried (anh.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure to afford the corresponding alcohols, which was used in the next step without further purification. A solution of the acid **103**<sup>139</sup> (1 equivalent), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (1 equivalent) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (4 equivalents) in dry dichloromethane, under argon and at  $-15\text{ }^\circ\text{C}$ , was treated with a solution of the previously obtained alcohols (1 equivalent) in dry dichloromethane (final molarity = 0.2 M). The reaction mixture was stirred at this temperature for 30 min, at  $0\text{ }^\circ\text{C}$  for 20 min–1 h and then was allowed to reach room temperature for 10–30 min. Ethyl acetate and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.5 M) were added, the aqueous layer was separated and the organic layer was successively washed with water and saturated  $\text{NaHCO}_3$ . The organic extract was dried (anh.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography to afford the compounds **90–94**.

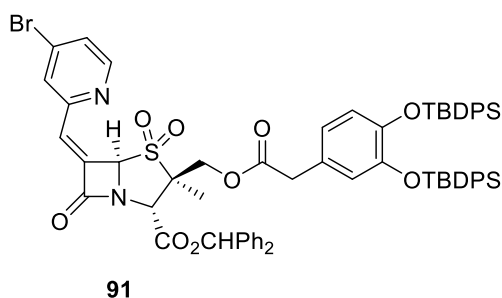
### 7.11.1 Compound 90



It was prepared according to the general procedure for the synthesis of esters **90–94** using: (i) for the ester hydrolysis: **85** (74 mg, 0.11 mmol), dry pyridine (0.06 mL, 0.62 mmol) and thiourea (26 mg, 0.34 mmol) in dry DMF (0.14 mL); (ii) for the esterification: 3,4-di(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)phenylacetic acid (**103**)<sup>139</sup> (72 mg, 0.11 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (14 mg, 0.11 mmol), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (86 mg, 0.45 mmol) in dry dichloromethane (0.2 mL), and obtained alcohol from **85** (64 mg,

0.11 mmol) in dry dichloromethane (0.4 mL). Reaction conditions: 30 min  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 1 h  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 30 min RT. Eluent for chromatography: gradient of ethyl acetate/hexane [1) (50:50); 2) (70:30)]. Yield = 66 mg (49%). Pink foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +133.3$  ( $c$ 1.1,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.58 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H, ArH), 7.85–7.76 (m, 10H,  $10\times\text{ArH}$ ), 7.40–7.30 (m, 25H,  $24\times\text{ArH}+\text{CH}=\text{}$ ), 6.98 (s, 1H,  $\text{CHPh}_2$ ), 6.39 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, ArH), 6.36 (s, 1H, ArH), 6.26 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 5.73 (s, 1H, H5), 4.63 (s, 1H, H2), 4.48 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 4.25 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 3.96 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.09 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 1.18 (s, 9H,  $3\times\text{CH}_3$ ), 1.15 (s, 9H,  $3\times\text{CH}_3$ ) and 1.05 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.4 (C), 167.7 (C), 166.2 (C), 151.4 (C), 151.0 (C), 146.0 (C), 145.4 (C), 141.5 (C), 138.8 (C), 138.8 (C), 137.3 (C), 135.8 ( $4\times\text{CH}$ ), 135.7 ( $4\times\text{CH}$ ), 133.6 (C), 133.2 (C), 133.2 (C), 130.2 (CH), 130.0 ( $2\times\text{CH}$ ), 129.9 ( $2\times\text{CH}$ ), 128.9 ( $2\times\text{CH}$ ), 128.8 ( $2\times\text{CH}$ ), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 128.3 (CH), 127.9 ( $10\times\text{CH}$ ), 127.7 ( $2\times\text{CH}$ ), 127.1 ( $2\times\text{CH}$ ), 125.6 (C), 122.6 (CH), 121.6 ( $2\times\text{CH}$ ), 120.8 (CH), 120.4 (CH), 119.9 (C), 79.4 (CH), 73.6 (CH), 66.3 (C), 63.3 ( $\text{OCH}_2$ ), 60.0 (CH), 39.7 ( $\text{CH}_2$ ), 39.5 ( $\text{CH}_3$ ), 27.0 ( $3\times\text{CH}_3$ ), 26.8 ( $3\times\text{CH}_3$ ), 19.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) and 15.6 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 1784 (CO) and 1748 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 1211$  ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{71}\text{H}_{71}\text{N}_4\text{O}_9\text{SSi}_2$  ( $\text{MH}^+$ ): 1211.4475; found, 1211.4473.

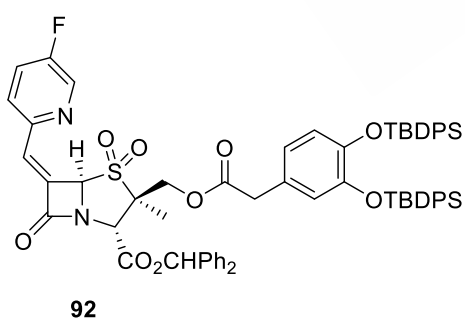
### 7.11.2 Compound 91



It was prepared according to the general procedure for the synthesis of esters **90–94** using: (i) for the ester hydrolysis: **86** (242 mg, 0.37 mmol), dry pyridine (0.2 mL, 2.03 mmol), and thiourea (79 mg, 1.1 mmol) in dry DMF (0.5 mL); (ii) for the esterification: 3,4-di(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)phenylacetic acid (**103**)<sup>139</sup> (236 mg, 0.37 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (45 mg, 0.37 mmol), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (281 mg, 1.5 mmol) in dry dichloromethane (0.6 mL), and obtained alcohol from **86** (216 mg, 0.37 mmol) in dry dichloromethane (1.2 mL). Reaction conditions: 30 min  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;

30 min 0 °C; 15 min RT. Eluent for chromatography: (40:60) diethyl ether/hexane. Yield = 267 mg (60%). Yellow foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +131.6$  (c1.0, CHCl<sub>3</sub>).  $\delta$ : 8.48 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, ArH), 7.83–7.78 (m, 8H, 8×ArH), 7.54 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H, ArH), 7.47–7.17 (m, 23H, 23×ArH), 7.17 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H, CH=), 6.97 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.38 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, ArH), 6.35 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, ArH), 6.25 (dd,  $J = 2.1$  and 8.3 Hz, 1H, ArH), 5.68 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, H5), 4.64 (s, 1H, H2), 4.45 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 4.22 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 3.01 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 1.18 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>), 1.15 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>) and 1.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.4 (C), 167.0 (C), 166.0 (C), 152.2 (C), 151.1 (C), 146.0 (C), 145.4 (C), 138.8 (C), 138.7 (C), 135.8 (4×CH), 135.7 (4×CH), 135.4 (C), 133.8 (C), 133.3 (2×C), 133.2 (C), 130.0 (2×CH), 129.9 (2×CH), 129.4 (CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (2×CH), 128.8 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (9×CH), 127.7 (2×CH), 127.1 (2×CH), 125.6 (C), 121.6 (2×CH), 120.4 (CH), 79.5 (CH), 73.6 (CH), 66.3 (C), 63.4 (OCH<sub>2</sub>), 60.1 (CH), 39.7 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (3×CH<sub>3</sub>), 26.8 (3×CH<sub>3</sub>), 19.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) and 15.6 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 1788 (CO) and 1747 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 1209$  and 1211 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>67</sub>H<sub>66</sub>N<sub>2</sub><sup>79</sup>BrO<sub>9</sub>Si<sub>2</sub>S (MH<sup>+</sup>): 1209.2844; found, 1209.3209.

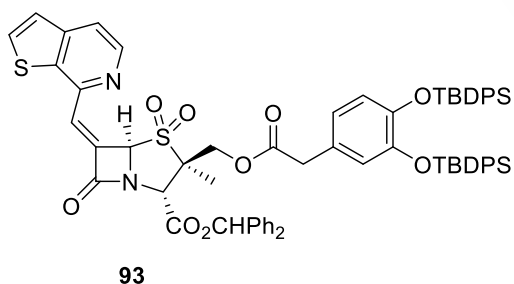
### 7.11.3 Compound 92



It was prepared according to the general procedure for the synthesis of esters **90–94** using: (i) for the ester hydrolysis: **87** (130 mg, 0.22 mmol), dry pyridine (0.1 mL, 1.2 mmol), and thiourea (50 mg, 0.66 mmol) in dry DMF (0.3 mL); (ii) for the esterification: 3,4-di(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)phenylacetic acid (**103**)<sup>139</sup> (140 mg, 0.22 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (27 mg, 0.22 mmol), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (166 mg, 0.87 mmol) in dry dichloromethane (0.5 mL), and obtained alcohol from **87** (114 mg, 0.22 mmol) in dry dichloromethane (0.6 mL). Reaction conditions: 30 min -15 °C; 20 min 0 °C; 10 min RT. Eluent for

chromatography: (60:40) diethyl ether/hexane. Yield = 165 mg (66%). Yellow foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +142.2$  (c1.3,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.56 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, ArH), 7.84 (t,  $J = 6.1$  Hz, 8H,  $8 \times \text{ArH}$ ), 7.47–7.28 (m, 24H,  $24 \times \text{ArH}$ ), 7.24 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H, CH=), 7.00 (s, 1H,  $\text{CHPh}_2$ ), 6.43–6.39 (m, 2H,  $2 \times \text{ArH}$ ), 6.29 (dd,  $J = 2.0$  and 8.3 Hz, 1H, ArH), 5.69 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H, H5), 4.67 (s, 1H, H2), 4.50 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 4.26 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 3.12 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 1.21 (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3$ ), 1.18 (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3$ ) and 1.07 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.3 (C), 167.4 (C), 166.1 (C), 160.1 (d,  $J_{\text{CF}} = 260$  Hz, C), 147.2 (d,  $J = 4$  Hz, C), 146.0 ( $2 \times \text{C}$ ), 145.4 ( $2 \times \text{C}$ ), 139.7 (d,  $J_{\text{CF}} = 25$  Hz, CH), 138.8 (C), 138.7 (C), 135.7 ( $4 \times \text{CH}$ ), 135.6 ( $4 \times \text{CH}$ ), 133.6 (d,  $J_{\text{CF}} = 3$  Hz, C), 133.2 (C), 133.1 (C), 130.0 ( $2 \times \text{CH}$ ), 129.9 ( $2 \times \text{CH}$ ), 128.9 ( $2 \times \text{CH}$ ), 128.8 ( $2 \times \text{CH}$ ), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 127.9 ( $8 \times \text{CH}$ ), 127.6 ( $2 \times \text{CH}$ ), 127.5 (d,  $J_{\text{CF}} = 5$  Hz, CH), 127.1 ( $2 \times \text{CH}$ ), 125.6 (C), 123.6 (d,  $J = 19$  Hz, CH), 121.6 ( $2 \times \text{CH}$ ), 120.4 (CH), 79.4 (CH), 73.5 (CH), 66.3 (C), 63.4 ( $\text{OCH}_2$ ), 60.1 (CH), 39.7 ( $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 27.0 ( $3 \times \text{CH}_3$ ), 26.8 ( $3 \times \text{CH}_3$ ), 19.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) and 15.5 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{19}\text{F NMR}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -122.1 (s, 1F) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 1786 (CO) and 1744 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 1149$  ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{67}\text{H}_{66}\text{N}_2\text{FO}_9\text{SSi}_2$  ( $\text{MH}^+$ ): 1149.4006; found, 1149.4006.

#### 7.11.4 Compound 93

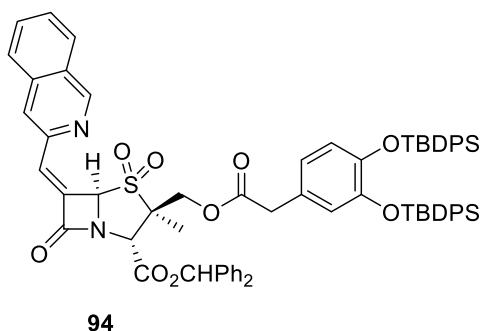


It was prepared according to the general procedure for the synthesis of esters **90–94** using: (i) for the ester hydrolysis: **88** (572 mg, 0.9 mmol), dry pyridine (0.5 mL, 5.0 mmol) and thiourea (205.2 mg, 2.7 mmol) in dry

DMF (1.1 mL); (ii) for the esterification: 3,4-di(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)phenylacetic acid (**103**)<sup>139</sup> (580 mg, 0.9 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (110 mg, 0.90 mmol), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (690 mg, 3.60 mmol) in dry dichloromethane (2.3 mL), and obtained alcohol from **88** (504 mg, 0.9 mmol) in dry dichloromethane (2.2

mL). Reaction conditions: 30 min  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 20 min  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 10 min RT. Eluent for chromatography: gradient of diethyl ether/hexane [1] (25:75); 2) (50:50)]. Yield = 400 mg (37%). White solid.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +130.7$  (c1.1,  $\text{CHCl}_3$ ). Mp:  $108\text{--}110\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.59 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, ArH), 7.79 (m, 8H,  $8\times\text{ArH}$ ), 7.72 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H, ArH), 7.69 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, ArH), 7.59 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, CH=), 7.42–7.24 (m, 23H,  $23\times\text{ArH}$ ), 6.97 (s, 1H,  $\text{CHPh}_2$ ), 6.37 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, ArH), 6.34 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, ArH), 6.24 (dd,  $J = 2.1$  and  $8.3$  Hz, 1H, ArH), 5.79 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, H5), 4.64 (s, 1H, H2), 4.48 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 4.24 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 3.08 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 1.16 (s, 9H,  $3\times\text{CH}_3$ ), 1.13 (s, 9H,  $3\times\text{CH}_3$ ) and 1.05 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.4 (C), 167.4 (C), 166.2 (C), 146.5 (C), 146.1 (C), 145.6 (C), 145.4 (C), 144.1 (C), 138.8 (C), 138.7 (C), 137.9 (C), 135.8 ( $6\times\text{CH}$ ), 135.7 ( $6\times\text{CH}$ ), 134.7 (C), 133.3 (C), 133.2 (C), 131.9 (C), 130.0 ( $2\times\text{CH}$ ), 129.9 ( $2\times\text{CH}$ ), 128.9 ( $2\times\text{CH}$ ), 128.8 ( $2\times\text{CH}$ ), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 127.9 ( $10\times\text{CH}$ ), 127.7 ( $2\times\text{CH}$ ), 127.1 ( $2\times\text{CH}$ ), 126.9 (CH), 125.6 (C), 123.8 (CH), 121.6 ( $2\times\text{CH}$ ), 120.4 (CH), 119.3 (CH), 79.5 (CH), 73.7 (CH), 66.4 (C), 63.3 ( $\text{CH}_2$ ), 60.1 (CH), 39.8 ( $\text{CH}_2$ ), 27.0 ( $3\times\text{CH}_3$ ), 26.8 ( $3\times\text{CH}_3$ ), 19.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) and 15.6 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 1784 (CO) and 1747 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 1187$  ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{69}\text{H}_{67}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_2\text{Si}_2$  ( $\text{MH}^+$ ): 1187.3821; found, 1187.3816.

### 7.11.5 Compound 94



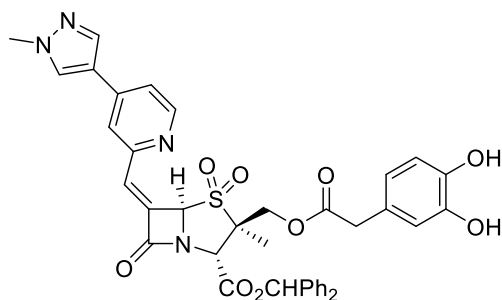
It was prepared according to the general procedure for the synthesis of esters **90–94** using: (i) for the ester hydrolysis: **89** (157 mg, 0.25 mmol), dry pyridine (0.14 mL, 1.4 mmol), and thiourea (57 mg, 0.75 mmol) in dry DMF (0.3 mL); (ii) for the esterification: **3,4-di(tert-butylidiphenylsilyloxy)phenylacetic acid (103)**<sup>139</sup> (161 mg, 0.25 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (31 mg, 0.25 mmol), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (191 mg, 1.0 mmol) in dry dichloromethane (0.6

mL), and obtained alcohol from **89** (138 mg, 0.25 mmol) in dry dichloromethane (0.7 mL). Reaction conditions: 30 min  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 30 min  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 15 min RT. Eluent for chromatography: (60:40) diethyl ether/hexane. Yield = 216 mg (73%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +176.6$  ( $c$ 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.26 (s, 1H, ArH), 7.96 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, ArH), 7.86–7.64 (m, 12H,  $12 \times \text{ArH}$ ), 7.44–7.28 (m, 22H,  $22 \times \text{ArH}$ ), 7.26 (s, 1H, CH=), 6.99 (s, 1H,  $\text{CHPh}_2$ ), 6.40–6.36 (m, 2H,  $2 \times \text{ArH}$ ), 6.27 (dd,  $J = 1.8$  and  $8.3$  Hz, 1H, ArH), 5.84 (s, 1H, H5), 4.65 (s, 1H, H2), 4.28 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 4.25 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 3.10 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 1.18 (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3$ ), 1.15 (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3$ ) and 1.08 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.4 (C), 168.1 (C), 166.3 (C), 153.5 (C), 146.0 (C), 145.3 (C), 145.0 (C), 138.9 (C), 138.8 (C), 135.8 (C), 135.8 (4 $\times$ CH), 135.7 (4 $\times$ CH), 133.2 (2 $\times$ C), 133.2 (2 $\times$ C), 132.4 (C), 131.3 (CH), 130.7 (CH), 130.0 (2 $\times$ CH), 130.0 (2 $\times$ CH), 129.1 (CH), 129.0 (CH), 128.9 (2 $\times$ CH), 128.8 (2 $\times$ CH), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (8 $\times$ CH), 127.7 (2 $\times$ CH), 127.4 (CH), 127.1 (2 $\times$ CH), 125.7 (C), 124.6 (CH), 121.6 (2 $\times$ CH), 120.4 (CH), 79.4 (CH), 74.0 (CH), 66.2 (C), 63.5 (OCH<sub>2</sub>), 60.0 (CH), 39.7 ( $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 27.0 ( $3 \times \text{CH}_3$ ), 26.8 ( $3 \times \text{CH}_3$ ), 19.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) and 15.6 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 1783 (CO) and 1747 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 1181$  ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{71}\text{H}_{69}\text{N}_2\text{O}_9\text{SSi}_2$  ( $\text{MH}^+$ ): 1181.4257; found, 1181.4260.

## 7.12 General procedure for silyl ethers deprotection

A solution of the silyl ethers **90–94** (1 equivalent) and glacial acetic acid (8 or 24 equivalents) in dry THF (0.1 M), under argon and at  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , was treated with tetrabutylammonium fluoride (8 equivalents,  $ca$  1 M in THF). The resultant mixture was stirred at  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 min and allowed to reach room temperature in some cases. Ethyl acetate and water were added, and the aqueous layer was separated. The organic layer was successively washed with saturated  $\text{NaHCO}_3$ , water and brine, dried (anh.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography to provide catechols **95–99**.

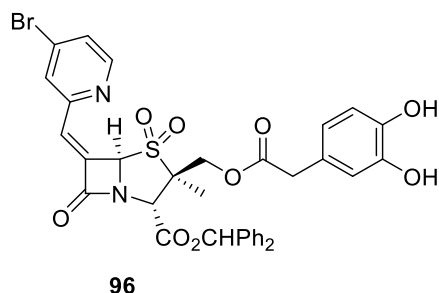
## 7.12.1 Compound 95



95

It was prepared following the general procedure for the deprotection of silyl ethers using: **90** (218 mg, 0.18 mmol) in dry THF (1.8 mL), acetic acid (0.24 mL, 4.25 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1.42 mL, 1.42 mmol). Reaction conditions: 30 min, 0 °C; 1 h RT. Eluent for chromatography: gradient of ethyl acetate/hexane [1) (80:20); 2) (90:10)]. Yield = 99 mg (75%). Yellow foam.  $[\alpha]_D^{20} = +202.1$  (c0.9, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.47 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, ArH), 7.94 (s, 1H, ArH), 7.75 (s, 1H, ArH), 7.39 (s, 1H, ArH), 7.36–7.24 (m, 11H, 10×ArH+CH=), 7.20 (dd, *J* = 1.2 and 5.0 Hz, 1H, ArH), 7.07 (br s, 1H, OH), 6.94 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.86 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, ArH), 6.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 6.68 (dd, *J* = 1.7 and 8.1 Hz, 1H, ArH), 5.97 (br s, 1H, OH), 5.70 (s, 1H, H5), 4.83 (s, 1H, H2), 4.72 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, OCHH), 4.30 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, OCHH), 3.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.57 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, CHHAr), 3.51 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, CHHAr) and 1.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 170.8 (C), 168.1 (C), 166.1 (C), 151.2 (C), 150.6 (CH), 144.2 (C), 143.9 (C), 141.1 (C), 138.7 (C), 138.6 (C), 137.4 (CH), 132.6 (CH), 130.9 (C), 128.9 (3×CH), 128.8 (3×CH), 128.5 (CH), 127.7 (2×CH), 126.9 (2×CH), 125.4 (C), 122.7 (CH), 121.5 (CH), 120.5 (CH), 119.7 (C), 116.6 (CH), 115.3 (CH), 79.5 (CH), 73.4 (CH), 66.6 (C), 63.0 (OCH<sub>2</sub>), 59.3 (CH), 40.6 (CH<sub>2</sub>), 39.2 (CH<sub>3</sub>) and 15.7 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR) ν: 3434 (OH), 1780 (CO) and 1744 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 735 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>39</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S (MH<sup>+</sup>): 735.2119; found, 735.2116.

## 7.12.2 Compound 96

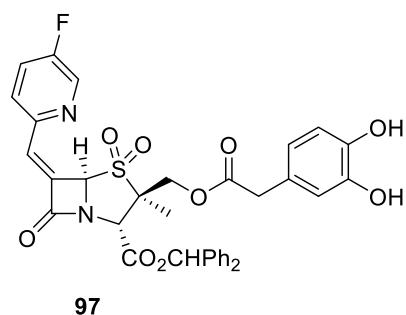


It was prepared following the general procedure for the deprotection of silyl ethers using: **91** (154 mg, 0.13 mmol) in dry THF (1.3 mL), acetic acid (0.17 mL, 3.1 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1.0 mL, 1.02

mmol). Reaction conditions: 30 min, 0 °C. Eluent for chromatography: gradient of diethyl ether/hexane [1) (75:25); 2) (90:10)]. Yield = 78 mg (84%). Yellow foam.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +184.5$  (c1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.45 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, ArH), 7.51 (s, 1H, ArH), 7.44 (dd,  $J = 1.5$  and 5.1 Hz, 1H, ArH), 7.32–7.26 (m, 10H, 10×ArH), 7.18 (s, 1H, CH=), 6.94 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.78 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, ArH), 6.75 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, ArH), 6.64 (dd,  $J = 1.3$  and 8.0 Hz, 1H, ArH), 6.39 (br s, 1H, OH), 5.81 (br s, 1H, OH), 5.73 (s, 1H, H5), 4.87 (s, 1H, H2), 4.63 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H, OCHH), 4.28 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H, OCHH), 3.55 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H, CHHAr), 3.49 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H, CHHAr) and 1.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.8 (C), 167.8 (C), 166.1 (C), 152.0 (C), 151.1 (CH), 143.7 (C), 143.6 (C), 138.7 (C), 138.5 (C), 134.6 (C), 133.8 (C), 129.6 (CH), 129.1 (CH), 129.0 (2×CH), 128.8 (3×CH), 128.5 (CH), 128.3 (CH), 127.7 (2×CH), 126.9 (2×CH), 125.5 (C), 122.0 (CH), 116.7 (CH), 115.4 (CH), 79.6 (CH), 73.6 (CH), 66.4 (C), 63.2 (OCH<sub>2</sub>), 59.2 (CH), 40.5 (CH<sub>2</sub>), and 16.0 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 3427 (OH), 1782 (CO) and 1742 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 733$  and  $735$  (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>35</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub><sup>79</sup>BrO<sub>9</sub>S (MH<sup>+</sup>): 733.0850; found, 733.0852.

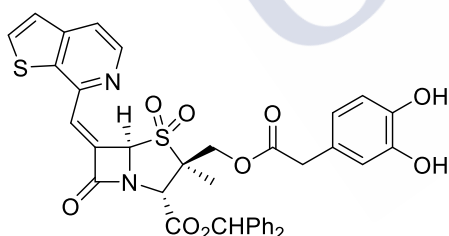
## 7.12.3 Compound 97



It was prepared following the general procedure for the deprotection of silyl ethers using: **92** (188 mg, 0.16 mmol) in dry THF (1.6 mL), acetic acid (70  $\mu$ L, 1.3 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1.4 mL, 1.4 mmol). Reaction conditions: 30 min, 0 °C.

Eluent for chromatography: gradient of diethyl ether/hexane [1] (75:25); 2) (100:0)]. Yield = 75 mg (66%). Yellow foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +153.4$  ( $c$ 1.2,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.53 (s, 1H, ArH), 7.38–7.26 (m, 13H,  $12 \times \text{ArH} + \text{CH} =$ ), 6.94 (s, 1H,  $\text{CHPh}_2$ ), 6.80–6.75 (m, 2H,  $2 \times \text{ArH}$ ), 6.66 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 6.32 (br s, 1H, OH), 5.70 (s, 2H,  $\text{H}_5 + \text{OH}$ ), 4.88 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4.63 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H, OCHH), 4.27 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H, OCHH), 3.56 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H, CHHAr), 3.50 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H, CHHAr) and 1.13 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.7 (C), 168.3 (C), 166.1 (C), 159.8 (d,  $J = 247$  Hz, C), 147.1 (d,  $J_{\text{CF}} = 4$  Hz, C), 143.8 (C), 143.6 (C), 139.8 (d,  $J_{\text{CF}} = 25$  Hz, CH), 138.8 (C), 138.6 (C), 132.8 (C), 129.1 (CH), 129.0 ( $2 \times \text{CH}$ ), 128.9 ( $4 \times \text{CH}$ ), 128.5 (CH), 127.7 ( $2 \times \text{CH}$ ), 126.8 ( $2 \times \text{CH}$ ), 125.6 (C), 123.7 (d,  $J_{\text{CF}} = 19$  Hz, CH), 122.1 (CH), 116.7 (CH), 115.4 (CH), 79.5 (CH), 73.5 (CH), 66.5 (C), 63.1 ( $\text{OCH}_2$ ), 59.1 (CH), 40.6 ( $\text{CH}_2\text{Ar}$ ) and 16.1 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{19}\text{F}$  NMR (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -121.6 (s, 1F) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 3432 (OH), 1782 (CO) and 1744 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 673$  ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{35}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{FO}_9\text{S}$  ( $\text{MH}^+$ ): 673.1651; found, 673.1654.

#### 7.12.4 Compound 98

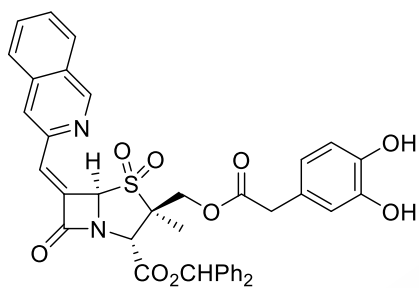


98

It was prepared following the general procedure for the deprotection of silyl ethers using: **93** (50 mg, 0.04 mmol) in dry THF (0.4 mL), acetic acid (17  $\mu\text{L}$ , 0.3 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (0.32 mL, 0.32 mmol). Reaction conditions: 30 min 0  $^\circ\text{C}$ . Eluent for chromatography: diethyl ether. Yield = 25 mg (88%). Yellow foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +204.8$  ( $c$ 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.55 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, ArH), 7.68 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1H, ArH), 7.64 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, ArH), 7.59 (s, 1H,  $\text{CH} =$ ), 7.37–7.26 (m, 11H,  $11 \times \text{ArH}$ ), 6.96 (s, 1H,  $\text{CHPh}_2$ ), 6.79 (s, 1H, ArH), 6.73 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, ArH), 6.62 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, ArH), 6.37 (br s, 1H, OH), 5.89 (br s, 1H, OH), 5.84 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 4.89 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4.67 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H, OCHH), 4.33 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H, OCHH), 3.53 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H, CHHAr), 3.47 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H, CHHAr) and 1.17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.9

(C), 168.1 (C), 166.2 (C), 146.4 (C), 145.3 (C), 144.0 (C), 143.6 (C), 138.7 (C), 138.6 (C), 137.9 (C), 133.9 (C), 132.0 (CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (4×CH), 128.5 (CH), 127.7 (2×CH), 127.5 (CH), 126.9 (2×CH), 125.5 (C), 123.7 (CH), 121.9 (CH), 119.4 (CH), 116.7 (CH), 115.4 (CH), 79.5 (CH), 73.7 (CH), 66.5 (C), 63.2 (CH<sub>2</sub>), 59.3 (CH), 40.5 (CH<sub>2</sub>), and 16.0 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 3432 (OH), 1778 (CO) and 1742 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z$  = 711 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>37</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub> (MH<sup>+</sup>): 711.1465; found, 711.1462.

### 7.12.5 Compound 99



99

It was prepared following the general procedure for the deprotection of silyl ethers using: **94** (216 mg, 0.18 mmol) in dry THF (1.8 mL), acetic acid (78  $\mu$ L, 1.4 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1.47 mL, 1.47 mmol). Reaction conditions: 30 min 0 °C. Eluent for chromatography: gradient of diethyl ether/hexane [1] (75:25); 2] (100:0)]. Yield = 93 mg (70%). White foam.  $[\alpha]_D^{20}$  =

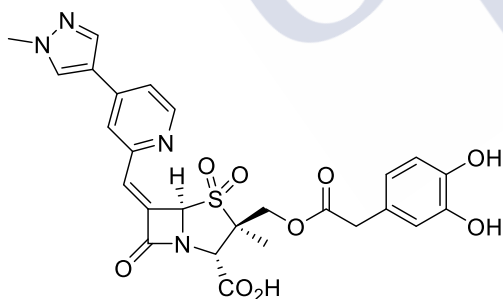
+262.9 (c1.2, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 9.20 (s, 1H, ArH), 7.91 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.81 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.71–7.61 (m, 3H, 3×ArH), 7.40–7.26 (m, 11H, 10×ArH+CH=), 6.95 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.80 (s, 1H, ArH), 6.75 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, ArH), 6.63 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.43 (br s, 1H, OH), 5.86 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 5.78 (br s, 1H, OH), 4.90 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.65 (d,  $J$  = 12.5 Hz, 1H, OCHH), 4.28 (d,  $J$  = 12.5 Hz, 1H, OCHH), 3.54 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H, CHHAr), 3.47 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H, CHHAr) and 1.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.7 (C), 169.0 (C), 166.3 (C), 153.5 (C), 144.8 (C), 143.8 (C), 143.6 (C), 138.9 (C), 138.7 (C), 135.7 (C), 131.5 (C), 131.5 (CH), 131.4 (CH), 129.3 (CH), 129.0 (CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (3×CH), 128.4 (CH), 128.1 (CH), 127.7 (2×CH), 127.5 (CH), 126.8 (2×CH), 125.5 (C), 125.0 (CH), 122.0 (CH), 116.7 (CH), 115.4 (CH), 79.5 (CH), 73.9 (CH), 66.4 (C), 63.2 (OCH<sub>2</sub>), 58.9 (CH), 40.6 (CH<sub>2</sub>Ar) and 16.1 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 3426 (OH), 1777 (CO) and 1740 (CO) cm<sup>-1</sup>.

MS (ESI)  $m/z$  = 705 ( $MH^+$ ). HRMS calcd for  $C_{39}H_{33}N_2O_9S$  ( $MH^+$ ): 705.1901; found, 705.1900.

### 7.13 General procedure for the preparation of Compounds 33–37

A solution of the esters **95–99** (1 equivalent) in *m*-cresol (0.16 M) under inert atmosphere was heated at 50 °C for 7–13 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with diethyl ether and treated with aqueous  $NH_4HCO_3$  (1.2 equivalents). The organic layer was separated and the aqueous layer was washed with diethyl ether ( $\times 2$ ), acidified with HCl (0.1 M) until pH = 4 and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with Milli-Q water, dried (anh.  $Na_2SO_4$ ) and concentrated under reduced pressure to give the corresponding free acids. Treatment with aqueous  $NH_4HCO_3$  (0.9 equivalent, 30 mM) gave the corresponding sodium salts for microbiological evaluation. The spectroscopic data provided correspond to the free acid forms of compounds **33–37**.

#### 7.13.1 Compound 33

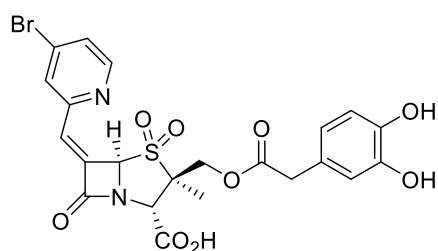


**33**

It was prepared following the general procedure for the synthesis of penicillanic acids **33–37** using: **95** (99 mg, 0.14 mmol) and *m*-cresol (0.9 mL). Extraction with  $NH_4HCO_3$  (7 mL, 23 mM). Reaction time = 12 h. Yield = 24 mg (30%). Orange oil.  $[\alpha]_D^{20} = +257.5$  ( $c$ 0.9, acetone).  $^1H$  NMR (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 8.57 (d,  $J$  = 5.0 Hz, 1H, ArH), 8.24 (s, 1H, ArH), 8.00 (d,  $J$  = 0.6 Hz, 1H, ArH), 7.85 (d,  $J$  = 1.0 Hz, 1H, ArH), 7.58 (dd,  $J$  = 1.7 and 5.0 Hz, 1H, ArH), 7.41 (d,  $J$  = 1.3 Hz, 1H, CH=), 6.82 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.75 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, ArH), 6.65 (dd,  $J$  = 2.0 and 8.0 Hz, 1H, ArH), 6.96 (d,  $J$  = 1.3 Hz, 1H, H5), 4.71 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H, OCHH), 4.70 (s, 1H, H2), 4.52 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H, OCHH), 3.96 (s, 3H,  $CH_3$ ), 3.54 (s, 2H,  $CH_2Ar$ ) and 1.58 (s, 3H,  $CH_3$ ) ppm.  $^{13}C$  NMR (75 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 171.5 (C), 168.6 (C), 168.5 (C), 152.8 (C), 151.6 (CH), 145.8 (C), 145.0

(C), 142.8 (C), 137.8 (CH), 134.6 (C), 130.6 (CH), 129.9 (CH), 126.4 (C), 123.3 (CH), 121.7 (CH), 121.2 (CH), 120.4 (C), 117.4 (CH), 116.0 (CH), 74.1 (CH), 66.7 (C), 64.3 (OCH<sub>2</sub>), 60.5 (CH), 40.6 (CH<sub>2</sub>), 39.4 (CH<sub>3</sub>) and 16.2 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 3410 (OH), 1782 (CO) and 1740 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z$  = 569 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S (MH<sup>+</sup>): 569.1337; found, 569.1335.

### 7.13.2 Compound 34

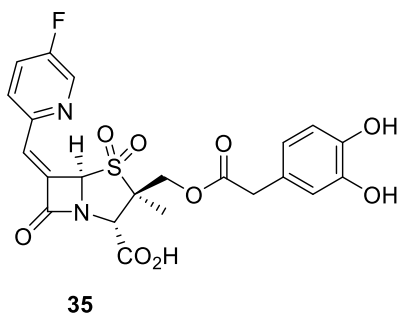


34

It was prepared following the general procedure for the synthesis of penicillanic acids **33–37** using: **96** (46 mg, 0.06 mmol) and *m*-cresol (0.4 mL). Extraction with NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (3.33 mL, 24 mM). Reaction time = 12 h. Yield = 16 mg (44%).

Green foam.  $[\alpha]_D^{20} = +229.1$  (c1.0, acetone). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.55 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, ArH), 7.94 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H, ArH), 7.71 (dd,  $J = 1.8$  and 5.2 Hz, 1H, ArH), 7.47 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H, CH=), 6.81 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, ArH), 6.75 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, ArH), 6.65 (dd,  $J = 1.9$  and 8.1 Hz, 1H, ArH), 5.95 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H, H5), 4.74 (s, 1H, H2), 4.69 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.51 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 3.54 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ar) and 1.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 171.5 (C), 168.4 (C), 168.1 (C), 153.8 (C), 152.1 (CH), 145.8 (C), 145.1 (C), 136.5 (C), 134.2 (C), 130.3 (CH), 129.0 (CH), 128.8 (CH), 126.5 (C), 121.8 (CH), 117.4 (CH), 116.1 (CH), 74.1 (CH), 66.8 (C), 64.4 (OCH<sub>2</sub>), 60.7 (CH), 40.6 (CH<sub>2</sub>), and 16.3 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 3434 (OH), 1779 (CO) and 1742 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z$  = 567 and 569 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub><sup>79</sup>BrO<sub>9</sub>S (MH<sup>+</sup>): 567.0067; found, 567.0066.

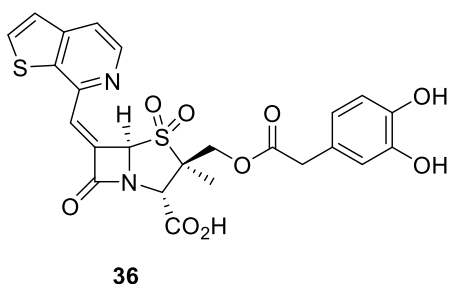
## 7.13.3 Compound 35



It was prepared following the general procedure for the synthesis of penicillanic acids **33–37** using: **97** (75 mg, 0.11 mmol) and *m*-cresol (0.7 mL). Extraction with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (5.42 mL, 24 mM). Reaction time = 13 h. Yield = 37 mg (66%). Green foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +269.8$  (c1.2, acetone).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ :

8.57 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H, ArH), 7.81–7.72 (m, 2H, 2×ArH), 7.50 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H, CH=), 6.81 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, ArH), 6.75 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, ArH), 6.65 (dd,  $J = 1.9$  and 8.0 Hz, 1H, ArH), 5.92 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H, H5), 4.70 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 4.71 (s, 1H, H2), 4.52 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 3.54 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ) and 1.58 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 171.3 (C), 168.2 (2×C), 160.5 (d,  $J_{\text{CF}} = 258$  Hz, C), 148.5 (d,  $J_{\text{CF}} = 4$  Hz, C), 145.5 (C), 144.8 (C), 139.5 (d,  $J = 25$  Hz, CH), 134.2 (d,  $J_{\text{CF}} = 2$  Hz, C), 128.8 (2×CH), 126.1 (C), 124.5 (d,  $J_{\text{CF}} = 19$  Hz, CH), 121.5 (CH), 117.1 (CH), 115.8 (CH), 73.7 (CH), 66.5 (C), 64.0 ( $\text{CH}_2$ ), 60.3 (CH), 40.3 ( $\text{CH}_2$ ), and 16.0 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{19}\text{F}$  NMR (282 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : -119.7 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1F) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 3427 (OH), 1772 (CO), 1740 (CO) and 1699 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 507$  ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{FN}_2\text{O}_9\text{S}$  ( $\text{MH}^+$ ): 507.0868; found, 507.0871.

## 7.13.4 Compound 36

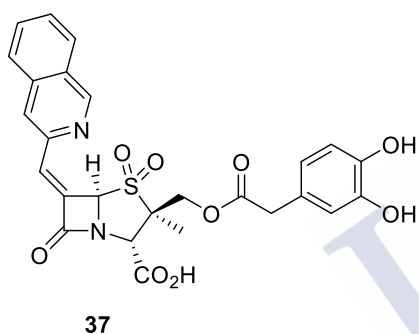


It was prepared following the general procedure for the synthesis of penicillanic acids **33–37** using: **98** (113 mg, 0.16 mmol) and *m*-cresol (1 mL). Extraction with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (7.9 mL, 24 mM). Reaction time = 7 h. Yield = 40 mg (46%).

Brown solid.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +166.1$  (c1.1, acetone).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 8.61 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, ArH), 8.12 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H, ArH), 7.94 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, ArH), 7.71 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, CH=), 7.64 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H, ArH), 6.82 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, ArH),

6.75 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 6.66 (dd,  $J = 1.9$  and  $8.2$  Hz, 1H, ArH), 6.04 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, H5), 4.76 (s, 1H, H2), 4.72 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.53 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 3.55 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ar) and 1.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 171.5 (C), 168.4 (C), 168.1 (C), 147.7 (C), 146.9 (C), 145.7 (C), 145.0 (C), 144.7 (CH), 138.4 (C), 136.5 (C), 133.7 (CH), 126.8 (CH), 126.4 (C), 124.8 (CH), 121.8 (CH), 121.6 (C), 120.1 (CH), 117.4 (CH), 116.0 (CH), 74.3 (CH<sub>2</sub>), 66.7 (CH), 64.2 (CH), 60.6 (CH), 40.6 (CH<sub>2</sub>), and 16.3 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 3438 (OH) and 1739 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 545$  (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub> (MH<sup>+</sup>): 545.0683; found, 545.0680.

### 7.13.5 Compound 37



It was prepared following the general procedure for the synthesis of penicillanic acids **33–37** using: **99** (93 mg, 0.13 mmol) and *m*-cresol (0.8 mL). Extraction with NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (6.67 mL, 24 mM). Reaction time = 13 h. Yield = 19 mg (27%). Yellow oil.  $[\alpha]_D^{20} = +328.8$  (c1.0, acetone). <sup>1</sup>H NMR (300

MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.33 (s, 1H, ArH), 8.21 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 8.11 (s, 1H, ArH), 8.04 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 7.88–7.79 (m, 2H, 2×ArH), 7.60 (s, 1H, CH=), 6.81 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H, ArH), 6.75 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 6.66 (dd,  $J = 1.7$  and  $8.0$  Hz, 1H, ArH), 6.04 (s, 1H, H5), 4.72 (s, 1H, H2), 4.71 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 4.52 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 3.54 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ar) and 1.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 171.5 (C), 168.8 (C), 168.6 (C), 154.0 (CH), 146.2 (C), 145.7 (C), 145.0 (C), 136.7 (C), 133.5 (C), 132.2 (CH), 131.0 (CH), 130.0 (CH), 129.7 (C), 128.9 (CH), 128.3 (CH), 126.3 (C), 125.3 (CH), 121.7 (CH), 117.3 (CH), 115.9 (CH), 74.3 (CH), 66.5 (C), 64.3 (CH<sub>2</sub>), 60.4 (CH), 40.5 (CH<sub>2</sub>), and 16.2 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 3448 (OH) and 1742 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 539$  (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S (MH<sup>+</sup>): 539.1119; found, 539.1116.

## 7.14 General procedure for the protection of phenols as MEM ethers

A solution of the phenols **119**, **122** and **124** (1 equivalent) in dry tetrahydrofuran (0.16 M), under argon and at 0 °C, was treated with NaH (2 equivalents, *ca* 60% w/w in mineral oil) followed by 1-(chloromethoxy)-2-methoxyethane (2 equivalents). The ice bath was removed, and the resulting suspension was stirred for 1.5 h. A mixture of (2:1) diethyl ether/NaHCO<sub>3</sub> (sat.) was added and the aqueous layer was separated. The organic layer was successively washed with NaHCO<sub>3</sub> (sat.), water and brine, dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The reaction crude was purified by flash chromatography to yield ethers **121**, **123** and **125**

### 7.14.1 Compound 121

It was prepared following the general procedure for the synthesis of methoxyethoxymethyl ethers using: phenol **119** (1 g, 5.36 mmol), THF (34 mL), NaH (429 mg, 10.7 mmol) and 1-(chloromethoxy)-2-methoxyethane (1.22 mL, 10.7 mmol). Eluent for chromatography: (40:60) ethyl acetate/hexane. Yield = 1.32 g (90%). Colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.68 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, ArH), 7.32 (dd, *J* = 2.7 and 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.15 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 5.26 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 3.82–3.79 (m, 5H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>+CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), and 3.30 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 165.2 (C), 155.2 (C), 133.0 (CH), 131.0 (CH), 126.6 (C), 122.5 (C), 117.9 (CH), 94.1 (CH<sub>2</sub>), 71.4 (CH<sub>2</sub>), 68.0 (CH<sub>2</sub>), 58.9 (CH<sub>3</sub>) and 52.2 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 1733 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 297 (MNa<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>ClO<sub>5</sub>Na (MNa<sup>+</sup>): 297.050; found, 297.0499.

### 7.14.2 Compound 123

It was prepared following the general procedure for the synthesis of methoxyethoxymethyl ethers using: phenol **122** (500 mg, 3.26 mmol), THF (20 mL), NaH (261 mg, 6.52 mmol) and 1-(chloromethoxy)-2-methoxyethane (0.74 mL, 6.52

mmol). Eluent for chromatography: ethyl acetate. Yield = 716 mg (91%). Colorless oil.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.20 (dd,  $J = 1.2$  and  $4.4$  Hz, 1H, ArH), 7.55 (dd,  $J = 1.2$  and  $8.6$  Hz, 1H, ArH), 7.28 (dd,  $J = 4.5$  and  $8.6$  Hz, 1H, ArH), 5.26 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 3.84 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.76 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.42 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), and 3.22 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 165.0 (C), 152.9 (C), 142.2 (CH), 139.5 (C), 126.8 (CH), 124.1 (CH), 93.7 ( $\text{CH}_2$ ), 71.2 ( $\text{CH}_2$ ), 68.0 ( $\text{CH}_2$ ), 58.8 ( $\text{CH}_3$ ) and 52.4 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. FTIR (ATR): 1732 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 242$  ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_5$  ( $\text{MH}^+$ ): 242.1023; found, 242.1022.

### 7.14.3 Compound 125

It was prepared following the general procedure for the synthesis of methoxyethoxymethyl ethers using: phenol **124** (100 mg, 0.65 mmol), THF (4 mL), NaH (52 mg, 1.31 mmol) and 1-(chloromethoxy)-2-methoxyethane (0.15 mL, 1.31 mmol). Eluent for chromatography: gradient of methanol/ethyl acetate/hexane [1] (0:80:20); 2] (5:95:0)]. Yield = 57 mg (36%). Yellow oil.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.63 (s, 1H, ArH), 8.33 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H, ArH), 7.53 (dd,  $J = 0.5$  and  $4.9$  Hz, 1H, ArH), 5.35 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 3.88 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.85 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.52 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), and 3.53 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 165.1 (C), 151.4 (C), 143.5 (CH), 140.1 (CH), 128.2 (C), 123.7 (CH), 94.7 ( $\text{CH}_2$ ), 71.4 ( $\text{CH}_2$ ), 68.4 ( $\text{CH}_2$ ), 59.1 ( $\text{CH}_3$ ) and 52.6 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. FTIR (ATR): 1734 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 242$  ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_5$  ( $\text{MH}^+$ ): 242.1023; found, 242.1023.

### 7.15 Compound 113

A solution of the ester **121** (1.32 g, 4.81 mmol) in methanol (13 mL) at room temperature was treated with NaOH (14.4 mL, 1 M) and the resulting mixture was heated under reflux for 1 h. The methanol was removed under reduced pressure, the resulting suspension was then acidified with HCl (1 M) until pH = 2 and extracted with ethyl acetate ( $\times 2$ ). The combined organic extracts were dried (anh.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ),

filtered and concentrated under reduced pressure to give the acid **113**<sup>181</sup> (1.11 g, 88%), as a white solid.

### 7.16 Compound 114

A solution of the ester **123** (50 mg, 0.21 mmol) in methanol (0.5 mL) at room temperature was treated with NaOH (0.2 mL, 1 M) and the resulting mixture was stirred for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure to give the sodium salt **114** (49 mg, quant.), as a white foam. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.97 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, ArH), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.08–7.04 (m, 1H, ArH), 5.19 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 3.73 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.45 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), and 3.22 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ppm.

### 7.17 Compound 115

It was prepared according to the procedure described for compound **114** using: ester **125** (1.64 g, 6.80 mmol), methanol (18 mL) and NaOH (6.80 mL). Yield = 1.73 g (quant.). Yellow solid. Mp: 171–172 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.28 (s, 1H, ArH), 8.13 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, ArH), 7.20 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, ArH), 5.24 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 3.77 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.46 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), and 3.23 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 169.5 (C), 149.5 (C), 143.5 (CH), 140.8 (C), 140.3 (CH), 122.8 (CH), 94.9 (CH<sub>2</sub>), 71.2 (CH<sub>2</sub>) 67.6 (CH<sub>2</sub>) and 58.2 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 1592 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 228 (M–Na+2H<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub> (M–Na+2H<sup>+</sup>): 228.0866; found, 228.0869.

### 7.18 Compound 117

A solution of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid (**127**) (1 g, 5.49 mmol), imidazole (1.5 g, 21.96 mmol) and *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (5.71 mL, 21.96

<sup>181</sup> Tokuyama, R.; Wakamatsu, T.; Ichige, T.; Muto, S.; Itai, A. Preparation of *N*-(3,4-disubstituted phenyl)salicylamide derivatives as inhibitors of STAT6 and NF-κB activation. US7671058B2. June 19, 2007.

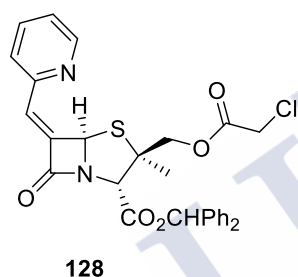
mmol) in dry DMF (11 mL), under inert atmosphere and at room temperature, was stirred for 96 h. The reaction mixture was diluted with a (1:4) mixture of ethyl acetate/water, the organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate ( $\times 3$ ). The combined organic extracts were washed with HCl (10%), dried (anh.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with a gradient of diethyl ether/hexane [1] (0:100); 2] (100:0)], to give the TBDPS ester of **117** (4.2 g, 86%) and the acid **117** (518 mg, 14%), both as white foams.

A solution of the TBDPS ester of **117** (1.4 g, 1.56 mmol) in THF (15.6 mL) was treated with an aqueous solution of LiOH (7.8 mL, 0.5 M) and stirred for 1.5 h. The reaction mixture was diluted with water, the organic solvent was removed under reduced pressure and the resulting aqueous solution was acidified with HCl (10%) until pH = 4. The aqueous solution was extracted with ethyl acetate ( $\times 2$ ). The combined organic extracts were dried (anh.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with a gradient of diethyl ether/hexane [1] (30:70); 2] (50:50)], to give the acid **117** (330 mg, 32%) as a white foam.

**Data for TBDPS ester of 117:**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.88 (dd,  $J = 1.4$  and 7.7 Hz, 8H, 8 $\times$ ArH), 7.63 (dd,  $J = 1.4$  and 7.9 Hz, 4H, 4 $\times$ ArH), 7.49–7.35 (m, 18H, 18 $\times$ ArH), 6.41 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, ArH), 6.30 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, ArH), 6.26 (dd,  $J = 2.0$  and 8.2 Hz, 1H, ArH), 2.49 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.23 (t,  $J = 8.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.25 (s, 9H, 3 $\times$  $\text{CH}_3$ ), 1.22 (s, 9H, 3 $\times$  $\text{CH}_3$ ) and 1.10 (s, 9H, 3 $\times$  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.2 (C), 146.0 (C), 144.5 (C), 135.8 (3 $\times$ CH), 135.7 (3 $\times$ CH), 135.4 (2 $\times$ CH), 133.4 (2 $\times$ C), 133.4 (2 $\times$ C), 132.8 (C), 132.0 (2 $\times$ C), 130.1 (CH), 130.0 (CH), 129.9 (CH), 127.9 (8 $\times$ CH), 127.9 (8 $\times$ CH), 127.8 (3 $\times$ CH), 120.5 (CH), 120.5 (CH), 120.2 (CH), 37.3 ( $\text{CH}_2$ ), 30.1 ( $\text{CH}_2$ ), 27.0 (3 $\times$  $\text{CH}_3$ ), 26.9 (3 $\times$  $\text{CH}_3$ ), 26.9 (3 $\times$  $\text{CH}_3$ ), 19.7 (C), 19.6 (C) and 19.2 (C) ppm. FTIR (ATR): 1727 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 919$  ( $\text{MNa}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{57}\text{H}_{64}\text{O}_4\text{Si}_3\text{Na}$  ( $\text{MNa}^+$ ): 919.4005; found, 919.4002.

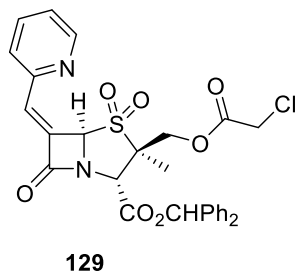
**Data for acid 117:**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.85 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 8H, 8 $\times$ ArH), 7.50–7.39 (m, 12H, 12 $\times$ ArH), 6.39 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, ArH), 6.23 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 2H, 2 $\times$ ArH), 2.41 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.08 (t,  $J$  = 8.3 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.21 (s, 9H, 3 $\times$  $\text{CH}_3$ ) and 1.19 (s, 9H, 3 $\times$  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 179.1 (C), 146.0 (C), 144.6 (C), 135.8 (4 $\times$ CH), 135.7 (4 $\times$ CH), 133.4 (2 $\times$ C), 133.3 (2 $\times$ C), 132.4 (C), 130.0 (2 $\times$ CH), 129.9 (2 $\times$ CH), 127.9 (4 $\times$ CH), 127.9 (4 $\times$ CH), 120.5 (CH), 120.4 (CH), 120.3 (CH), 35.2 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 26.9 (3 $\times$  $\text{CH}_3$ ), 26.9 (3 $\times$  $\text{CH}_3$ ), 19.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) and 19.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm. FTIR (ATR): 3048 (OH) and 1707 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z$  = 657 (M–H). HRMS calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{45}\text{O}_4\text{Si}_2$  (M–H): 657.2862; found, 657.2863.

### 7.19 Compound 128



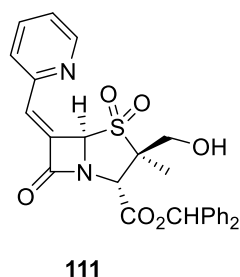
It was prepared following the Wittig reaction procedure described on page 122 using: (i) for the preparation of the diketone: amines **79** and its six membered isomer<sup>133,134</sup> (2:1 molar ratio, respectively) (1.04 g, 2.19 mmol), dry dichloromethane (11 mL), dry triethylamine (0.92 mL, 6.57 mmol), trifluoromethanesulfonic anhydride (1.1 mL, 6.57 mmol) and dry triethylamine (0.92 mL, 6.57 mmol); (ii) for the Wittig reaction: triphenyl(2-pyridylmethyl)phosphonium chloride hydrochloride (934 mg, 2.19 mmol), dry THF (8.8 mL),  $\text{KO}^t\text{Bu}$  (491 mg, 4.38 mmol), diketones from **79** (2:1 molar ratio, respectively) (1.04 g, 2.19 mmol) and dry dichloromethane (16.8 mL). Reaction conditions: 30 min,  $-78$   $^\circ\text{C}$ . Eluent for the first chromatography: (1:99) ethyl acetate/dichloromethane. Eluent for the second chromatography: (75:25) diethyl ether/hexane. Yield = 286 mg (24%). Yellow foam.

## 7.20 Compound 129



It was prepared following the general oxidation procedure using: (i) for the first oxidation: **128**<sup>133,134</sup> (136 mg, 0.25 mmol), *m*-chloroperbenzoic acid (111 mg, 0.5 mmol) and dry dichloromethane (1.7 mL), reaction time = 30 min, eluent for chromatography: gradient of diethyl ether/hexane [1] (60:40); 2) (100:0)]; (ii) for the oxidation of the corresponding sulfoxide to sulfone **129**, sulfoxide derivative of **128** (50 mg, 0.09 mmol), *m*-chloroperbenzoic acid (25 mg, 0.11 mmol) in dry dichloromethane (0.6 mL), eluent for chromatography: gradient of diethyl ether/hexane [1](60:40); 2) (100:0)]. Overall yield = 112 mg (78%). White foam.

## 7.21 Compound 111



A solution of compound **129**<sup>133,134</sup> (45 mg, 0.08 mmol) in dry DMF (0.1 mL), under inert atmosphere and at 0 °C, was treated with dry pyridine (0.04 mL, 0.43 mmol) and thiourea (18 mg, 0.23 mmol). The reaction mixture was stirred for 12 h, during which time room temperature was raised. The reaction mixture was diluted with a (1:4) mixture of ethyl acetate/water, the organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (×5). The combined organic extracts were successively washed with water and brine, dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure to afford the alcohol **111**<sup>133,134</sup> (35 mg, 90%), which was used in the next step without further purification.

## 7.22 Compound 46

It was prepared following the general procedure for the synthesis of sodium salts described on page 143 using ester **111**<sup>133,134</sup> (66 mg, 0.13 mmol), *m*-cresol (0.8 mL)

and NaHCO<sub>3</sub> (2 mL, 70 mM). Reaction time = 6.5 h. Eluent for chromatography: gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (0:100); 2) (30:70)]. Yield = 9 mg (19%). Brown solid.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +308.7$  (c0.9, H<sub>2</sub>O). Mp: 190–191 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 8.63 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H, ArH), 7.87 (dt,  $J = 1.7$  and 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.57 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, ArH), 7.47 (d,  $J = 0.6$  Hz, 1H, CH=), 7.43 (m, 1H, ArH), 5.99 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H, H5), 4.35 (s, 1H, H2), 4.16 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H, CHHO), 4.02 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H, CHHO) and 1.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 172.8 (C), 170.5 (C), 150.3 (C), 150.3 (CH), 137.9 (CH), 131.1 (CH), 130.7 (C), 126.7 (CH), 125.5 (CH), 72.7 (CH), 69.3 (C), 62.5 (CH<sub>2</sub>), 62.1 (CH) and 15.0 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3372 (OH), 1760 (CO) and 1612 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 339$  (M–Na+2×H<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S (M–Na+2×H<sup>+</sup>): 339.0645; found, 339.0643.

### 7.23 Compound 130

It was prepared according to the procedure for the synthesis of esters **90–94** described on page 132 using: (i) for the ester hydrolysis: **129**<sup>133,134</sup> (150 mg, 0.26 mmol), dry pyridine (0.14 mL, 1.43 mmol) and thiourea (59 mg, 0.78 mmol) in dry DMF (0.3 mL); (ii) for the esterification: 2-[(2-methoxyethoxy)methoxy]benzoic acid (**112**)<sup>159</sup> (73 mg, 0.28 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (34 mg, 0.28 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (213 mg, 1.11 mmol) in dry dichloromethane (0.7 mL) and alcohol **111**<sup>133,134</sup> (135 mg, 0.28 mmol) in dry dichloromethane (0.7 mL). Reaction conditions: 30 min at –15 °C; 30 min at room temperature. Eluent for chromatography: (50:50) ethyl acetate/hexane. Yield = 136 mg (66%). Yellow foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +236.8$  (c1.0, CHCl<sub>3</sub>).  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +235.2$  (c1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.71 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H, ArH), 7.92 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, ArH), 7.75 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, ArH), 7.51–7.28 (m, 15H, 15×ArH), 7.07–7.03 (m, 2H, CH=+CHPh<sub>2</sub>), 5.80 (s, 1H, H5), 5.37 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.89 (s, 1H, H2), 4.86 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H, OCHH), 4.68 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H, OCHH), 3.86 (t,  $J = 3.8$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.53 (t,  $J = 4.1$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.35 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) and 1.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 168.0 (C), 166.2 (C), 164.9 (C), 157.4 (C), 150.8 (C), 150.6

(CH), 138.8 (C), 138.7 (C), 137.1 (CH), 134.2 (CH), 133.3 (C), 132.3 (CH), 130.2 (CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (2×CH), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 127.7 (2×CH), 127.0 (2×CH), 126.4 (CH), 125.0 (CH), 121.5 (CH), 119.4 (C), 116.0 (CH), 93.6 (CH<sub>2</sub>), 79.3 (CH), 73.5 (CH), 71.5 (CH<sub>2</sub>), 67.9 (CH<sub>2</sub>), 66.5 (C), 63.4 (CH<sub>2</sub>) 59.7 (CH), 59.0 (CH<sub>3</sub>) and 16.0 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 1779 (CO) and 1732 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 735 (MNa<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>38</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>SNa (MNa<sup>+</sup>): 735.1983; found, 735.1980.

## 7.24 Compound 131

It was prepared according to the procedure for the synthesis of esters **90–94** described on page 132 using: (i) for the ester hydrolysis: **129**<sup>133,134</sup> (161 mg, 0.28 mmol), dry pyridine (0.16 mL, 1.54 mmol) and thiourea (64 mg, 0.84 mmol) in dry DMF (0.35 mL); (ii) for the esterification: benzoic acid **113** (73 mg, 0.28 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (34 mg, 0.28 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (213 mg, 1.11 mmol) in dry dichloromethane (0.7 mL) and alcohol **111**<sup>133,134</sup> (135 mg, 0.28 mmol) in dry dichloromethane (0.7 mL). Reaction conditions: 30 min at -15 °C; 30 min at room temperature. Eluent for chromatography: (50:50) ethyl acetate/hexane. Yield = 136 mg (66%). Yellow foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +236.8$  (c1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.69 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, ArH), 7.83 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.73 (dt, *J* = 1.6 and 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.43–7.23 (m, 15H, 14×ArH+CH=), 7.01 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 5.78 (s, 1H, H5), 5.32 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.87 (s, 1H, H2), 4.81 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, OCHH), 4.66 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, OCHH), 3.82 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.49 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.33 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) and 1.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 167.9 (C), 166.2 (C), 164.1 (C), 155.9 (C), 150.8 (C), 150.6 (CH), 138.8 (C), 138.6 (C), 137.1 (CH), 133.8 (CH), 133.3 (C), 131.7 (CH), 130.2 (CH), 128.9 (2×CH), 128.7 (3×CH), 128.4 (CH), 127.7 (2×CH), 127.0 (2×CH), 126.5 (C), 126.4 (CH), 125.1 (CH), 120.8 (C), 117.5 (CH), 93.8 (CH<sub>2</sub>), 79.4 (CH), 73.6 (CH), 71.5 (CH<sub>2</sub>), 68.0 (CH<sub>2</sub>), 66.4 (C), 63.8 (CH<sub>2</sub>) 59.6 (CH), 59.0 (CH<sub>3</sub>) and 16.0 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 1781 (CO) and 1739 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 769 (MNa<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>38</sub>H<sub>35</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>10</sub>SNa (MNa<sup>+</sup>): 769.1593; found, 769.1590.

## 7.25 Compound 132

It was prepared according to the procedure for the synthesis of esters **90–94** described on page 132 using: (i) for the ester hydrolysis: **129**<sup>133,134</sup> (180 mg, 0.31 mmol), dry pyridine (0.17 mL, 1.71 mmol) and thiourea (71 mg, 0.93 mmol) in dry DMF (0.4 mL); (ii) for the esterification: sodium benzoate **114** (77 mg, 0.31 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (38 mg, 0.31 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (238 mg, 1.24 mmol) in dry dichloromethane (0.8 mL) and alcohol **111**<sup>133,134</sup> (150 mg, 0.31 mmol) in dry dichloromethane (0.7 mL). Reaction conditions: 30 min at  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 30 min at room temperature. Eluent for chromatography: a gradient of diethyl ether/ethyl acetate/hexane [1] (100:0:0); 2] (0:75:25)]. Yield = 141 mg (64%). Yellow foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +249.0$  ( $c$ 0.9,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.64 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H, ArH), 8.33 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, ArH), 7.72–7.65 (m, 2H, 2 $\times$ ArH), 7.43–7.23 (m, 14H, 13 $\times$ ArH + CH=), 7.99 (s, 1H,  $\text{CHPh}_2$ ), 5.76 (s, 1H, H5), 5.32 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.93 (s, 1H, H2), 4.91 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H,  $\text{OCHH}$ ), 4.72 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H,  $\text{OCHH}$ ), 3.78 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.44 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.28 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ) and 1.34 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 167.9 (C), 166.2 (C), 164.5 (C), 153.4 (C), 150.8 (C), 150.5 (CH), 142.6 (CH), 138.8 (C), 138.7 (C), 138.6 (C), 137.1 (CH), 133.4 (C), 130.0 (CH), 128.9 (2 $\times$ CH), 128.7 (2 $\times$ CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 127.6 (2 $\times$ CH), 127.2 (CH), 127.0 (2 $\times$ CH), 126.4 (CH), 125.0 (CH), 123.9 (CH), 93.4 ( $\text{CH}_2$ ), 79.4 (CH), 73.6 (CH), 71.4 ( $\text{CH}_2$ ), 68.1 ( $\text{CH}_2$ ), 66.5 (C), 63.9 ( $\text{CH}_2$ ) 59.6 (CH), 58.9 ( $\text{CH}_3$ ) and 16.0 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. FTIR (ATR): 1781 (CO) and 1739 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 714$  ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{37}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}$  ( $\text{MH}^+$ ): 714.2116; found, 714.2114.

## 7.26 Compound 133

It was prepared according to the procedure for the synthesis of esters **90–94** described on page 132 using: (i) for the ester hydrolysis: **129**<sup>133,134</sup> (190 mg, 0.33 mmol), dry pyridine (0.18 mL, 1.80 mmol) and thiourea (75 mg, 0.98 mmol) in dry

DMF (0.4 mL); (ii) for the esterification: sodium salt **115** (81 mg, 0.33 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (40 mg, 0.33 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (251 mg, 1.31 mmol) in dry dichloromethane (0.8 mL) and alcohol **111**<sup>133,134</sup> (165 mg, 0.33 mmol) in dry dichloromethane (0.8 mL). Reaction conditions: 30 min at  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 20 min at room temperature. Eluent for chromatography: (75:25) ethyl acetate/hexane. Yield = 105 mg (45%). Yellow foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +248.9$  (c0.8,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.72 (s, 1H, ArH), 8.67 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, ArH), 8.36 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H, ArH), 7.72 (dd,  $J = 1.5$  and 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.67 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H, ArH), 7.42–7.28 (m, 15H, 14 $\times$ ArH+CH=), 7.01 (s, 1H,  $\text{CHPh}_2$ ), 5.79 (s, 1H, H5), 5.39 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.87 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H,  $\text{OCHH}$ ), 4.85 (s, 1H, H2), 4.69 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H,  $\text{OCHH}$ ), 3.85 (t,  $J = 4.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.50 (t,  $J = 4.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.33 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ) and 1.33 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 167.9 (C), 166.1 (C), 163.6 (C), 151.8 (C), 150.8 (C), 150.5 (CH), 143.4 (CH), 139.8 (CH), 138.7 (C), 138.6 (C), 137.1 (CH), 133.1 (C), 130.3 (CH), 128.9 (2 $\times$ CH), 128.7 (3 $\times$ CH), 128.4 (CH), 127.6 (2 $\times$ CH), 127.0 (2 $\times$ CH), 126.4 (CH), 126.2 (C), 125.1 (CH), 124.2 (CH), 94.2 ( $\text{CH}_2$ ), 79.4 (CH), 73.5 (CH), 71.4 ( $\text{CH}_2$ ), 68.3 ( $\text{CH}_2$ ), 66.3 (C), 63.9 ( $\text{CH}_2$ ), 59.5 ( $\text{CH}_3$ ), 59.0 (CH) and 15.9 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. FTIR (ATR): 1781 (CO) and 1741 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 714$  ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{37}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}$  ( $\text{MH}^+$ ): 714.2116; found, 714.2115.

## 7.27 Compound 135

It was prepared according to the procedure for the synthesis of esters **90–94** described on page 132 using: (i) for the ester hydrolysis: **129**<sup>133,134</sup> (200 mg, 0.34 mmol), dry pyridine (0.19 mL, 1.89 mmol) and thiourea (78 mg, 1.03 mmol) in dry DMF (0.43 mL); (ii) for the esterification: carboxylic acid **117** (224 mg, 0.34 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (42 mg, 0.34 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (261 mg, 1.36 mmol) in dry dichloromethane (0.8 mL) and alcohol **111**<sup>133,134</sup> (170 mg, 0.34 mmol) in dry dichloromethane (0.8 mL). Reaction conditions: 30 min at  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 20 min at room temperature. Eluent for

chromatography: (55:45) diethyl ether/hexane. Yield = 245 mg (63%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +156.2$  (c1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.68 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H, ArH), 7.81–7.78 (m, 8H, 8×ArH), 7.71 (dt,  $J = 1.7$  and 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.46–7.24 (m, 28H, 28×ArH), 6.97 (s, 1H,  $\text{CHPh}_2$ ), 6.31 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 6.16–6.12 (m, 2H, 2×ArH), 5.73 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, H5), 4.66 (s, 1H, H2), 4.52 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.30 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 2.35 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.02 (t,  $J = 8.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.17 (s, 9H, 3× $\text{CH}_3$ ), 1.14 (s, 9H, 3× $\text{CH}_3$ ) and 1.13 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 171.8 (C), 167.8 (C), 166.2 (C), 150.9 (C), 150.6 (CH), 145.9 (C), 144.5 (C), 138.8 (C), 138.7 (C), 137.1 (CH), 135.7 (4×CH), 135.7 (4×CH), 133.5 (2×C), 133.3 (C), 133.3 (C), 132.4 (2×C), 130.1 (2×CH), 130.0 (CH), 129.9 (2×CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (2×CH), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 128.0 (4×CH), 127.9 (4×CH), 127.7 (2×CH), 127.1 (2×CH), 126.4 (CH), 125.1 (CH), 120.4 (2×CH), 120.2 (CH), 79.4 (CH), 73.6 (CH), 66.2 (C), 63.2 ( $\text{CH}_2$ ), 59.9 (CH), 34.9 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 26.9 (3× $\text{CH}_3$ ), 26.8 (3× $\text{CH}_3$ ), 19.6 (C), 19.6 (C) and 15.7 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. FTIR (ATR): 1785 (CO) and 1747 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 1145$  ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{68}\text{H}_{69}\text{N}_2\text{O}_9\text{SSi}_2$  ( $\text{MH}^+$ ): 1145.4257; found, 1145.4259.

## 7.28 General procedure for the deprotection of MEM ethers

A solution of the ethers **130–133** (1 equivalent) in *tert*-butanol (0.1 M), under inert atmosphere and at room temperature, was treated with pyridinium *p*-toluenesulfonate (10–39 equivalents) and the resulting reaction mixture was heated at 83 °C for 1.5–5.5 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with a (1:4) mixture of ethyl acetate/water. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (×3). The combined organic extracts were washed with water, dried (anh.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography to provide phenols **136–139**.

### 7.28.1 Compound 136

It was prepared following the general procedure for the deprotection of MEM ethers using: ether **130** (175 mg, 0.25 mmol), *tert*-butanol (2.5 mL) and pyridinium *p*-toluenesulfonate (1.5 g, 6.14 mmol). Reaction time = 4 h. Eluent for chromatography: (30:70) ethyl acetate/hexane. Yield = 82 mg (54%). Yellow foam.  $[\alpha]_D^{20} = +196.9$  (c0.7, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 10.40 (s, 1H, OH), 8.71 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, ArH), 7.89 (dd,  $J = 1.7$  and 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.73 (dt,  $J = 1.8$  and 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.50–7.26 (m, 14H, 13×ArH+CH=), 7.03 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.98 (br d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, ArH), 6.89 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H, ArH), 5.81 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 4.95 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, OCHH), 4.75 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.74 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, OCHH) and 1.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 169.0 (C), 168.0 (C), 166.1 (C), 161.9 (C), 150.9 (C), 150.7 (CH), 138.8 (C), 138.7 (C), 137.2 (CH), 136.4 (CH), 133.0 (C), 130.5 (2×CH), 129.0 (2×CH), 128.9 (3×CH), 128.6 (CH), 127.8 (2×CH), 127.1 (2×CH), 126.5 (CH), 125.2 (CH), 119.8 (CH), 117.7 (CH), 111.6 (C), 79.6 (CH), 73.5 (CH), 66.4 (C), 63.7 (CH<sub>2</sub>) 59.6 (CH) and 15.9 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3229 (OH), 1785 (CO) and 1685 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 625$  (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>34</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S (MH<sup>+</sup>): 625.1639; found, 625.1640.

### 7.28.2 Compound 137

It was prepared following the general procedure for the deprotection of MEM ethers using: ether **131** (104 mg, 0.14 mmol), *tert*-butanol (1.4 mL) and pyridinium *p*-toluenesulfonate (700 mg, 2.78 mmol). Reaction time = 4.5 h. Eluent for chromatography: (30:70) ethyl acetate/hexane. Yield = 45 mg (49%). Yellow foam.  $[\alpha]_D^{20} = +204.2$  (c0.8, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 10.33 (s, 1H, OH), 8.71 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H, ArH), 7.84 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, ArH), 7.73 (dt,  $J = 1.8$  and 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.43–7.28 (m, 14H, 13×ArH+CH=), 7.04 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.94 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, ArH), 5.82 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 4.89 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, OCHH), 4.79 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, OCHH), 4.74 (s, 1H, H<sub>2</sub>) and 1.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$ : 168.1 (C), 167.9 (C), 166.1 (C), 160.4 (C), 150.8 (C), 150.8 (CH), 138.7 (C), 138.6 (C), 137.2 (CH), 136.5 (CH), 133.0 (C), 130.5 (CH), 129.5 (CH), 129.0 (2 $\times$ CH), 128.9 (3 $\times$ CH), 128.6 (CH), 127.7 (2 $\times$ CH), 127.1 (2 $\times$ CH), 126.5 (CH), 125.2 (CH), 124.5 (C), 119.4 (CH), 112.6 (C), 79.6 (CH), 73.6 (CH), 66.2 (C), 64.2 (CH<sub>2</sub>) 59.7 (CH) and 15.9 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3228 (OH), 1782 (CO) and 1686 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z$  = 659 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>34</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S (MH<sup>+</sup>): 659.1249; found, 659.1248.

### 7.28.3 Compound 138

It was prepared following the general procedure for the deprotection of MEM ethers using: ether **132** (91 mg, 0.13 mmol), *tert*-butanol (1.3 mL) and pyridinium *p*-toluenesulfonate (961 mg, 3.82 mmol). After 3.5 h at 83 °C, additional pyridinium *p*-toluenesulfonate (320 mg, 1.27 mmol) was added and the resulting mixture was heated for 2 h. Eluent for the first chromatography: gradient of ethyl acetate/hexane [1) (40:60); 2) (50:50)]. Eluent for the second chromatography: (90:10) diethyl ether/hexane. Yield = 40 mg (50%). White foam.  $[\alpha]_D^{20} = +257.9$  (c1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 10.14 (s, 1H, OH), 8.67 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H, ArH), 8.29 (dd,  $J = 1.4$  and 4.1 Hz, 1H, ArH), 7.70 (dt,  $J = 1.7$  and 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.43–7.27 (m, 15H, 14 $\times$ ArH+CH=), 7.00 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 5.81 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H, H5), 4.98 (s, 1H, H2), 4.91 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>) and 1.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 168.2 (C), 167.7 (C), 166.2 (C), 158.9 (C), 150.9 (C), 150.7 (CH), 142.0 (CH), 138.9 (C), 138.8 (C), 137.1 (CH), 133.5 (C), 130.2 (CH), 129.8 (CH), 129.7 (C), 128.9 (2 $\times$ CH), 128.8 (2 $\times$ CH), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 127.6 (2 $\times$ CH), 127.1 (2 $\times$ CH), 126.4 (CH), 126.2 (CH), 125.1 (CH), 79.4 (CH), 73.8 (CH), 66.5 (C), 64.1 (CH<sub>2</sub>) 59.9 (CH) and 16.2 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3214 (OH), 1780 (CO), 1753 (CO) and 1681 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z$  = 626 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>33</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S (MH<sup>+</sup>): 626.1592; found, 626.1591.

### 7.28.4 Compound 139

It was prepared following the general procedure for the deprotection of MEM ethers using: ether **133** (115 mg, 0.16 mmol), *tert*-butanol (1.6 mL) and pyridinium

*p*-toluenesulfonate (405 mg, 1.6 mmol). Reaction time = 1.5 h. Eluent for chromatography: gradient of ethyl acetate/hexane [1] (60:40); 2) (75:25)]. Yield = 68 mg (68%). Green foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +227.6$  (c0.9, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 9.86 (br s, 1H, OH), 8.69 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, ArH), 8.49 (s, 1H, ArH), 8.21 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, ArH), 7.72 (dt, *J* = 1.4 and 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.66 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, ArH), 7.42–7.28 (m, 13H, 12×ArH+CH=), 7.03 (s, 1H CHPh<sub>2</sub>), 5.82 (s, 1H, H5), 4.94 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, OCHH), 4.80 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, OCHH), 4.74 (s, 1H, H2) and 1.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 167.9 (C), 167.6 (C), 166.0 (C), 155.4 (C), 150.7 (CH + C), 142.0 (CH), 140.9 (CH), 138.6 (C), 138.5 (C), 137.2 (CH), 132.6 (C), 130.7 (CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (CH), 128.8 (2×CH), 128.6 (CH), 127.6 (2×CH), 127.0 (2×CH), 126.5 (CH), 125.2 (CH), 121.9 (CH), 117.3 (C), 79.5 (CH), 73.5 (CH), 66.1 (C), 64.4 (CH<sub>2</sub>), 59.4 (CH) and 15.9 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3263 (OH), 1780 (CO) and 1697 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 626 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>33</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S (MH<sup>+</sup>): 626.1592; found, 626.1596.

## 7.29 Compound 141

It was prepared following the general procedure for the silyl ethers deprotection described on page 138 using: ether **135** (245 mg, 0.21 mmol) in dry THF (2.1 mL), acetic acid (0.3 mL, 5.04 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1.68 mL, 1.68 mmol). Reaction conditions: 30 min at 0 °C; 15 min at room temperature. Eluent for chromatography: gradient of diethyl ether/hexane [1] (75:25): 2) (100:0)]. Yield = 95 mg (68%). Yellow foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +232.8$  (c0.9, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.68 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, ArH), 7.70 (dt, *J* = 1.5 and 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.43–7.26 (m, 13H, 12×ArH+CH=), 7.01 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.72 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 6.67 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 6.55 (dd, *J* = 1.6 and 8.1 Hz, 1H, ArH), 6.22 (br s, 1H, OH), 5.90 (br s, 1H, OH), 5.81 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H, H5), 4.84 (s, 1H, H2), 4.63 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, OCHH), 4.44 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, OCHH), 2.81 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.62 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) and 1.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172.3 (C), 167.9 (C), 166.2 (C), 150.6 (C), 150.5 (CH), 143.6 (C), 142.4 (C), 138.7 (C), 138.6 (C), 137.2

(CH), 133.1 (C), 132.6 (C), 130.3 (CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (3×CH), 128.5 (CH), 127.6 (2×CH), 127.1 (2×CH), 126.6 (CH), 125.2 (CH), 120.6 (CH), 115.4 (CH), 115.2 (CH), 79.6 (CH), 73.9 (CH), 66.4 (C), 63.9 (CH<sub>2</sub>), 59.9 (CH), 35.4 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH<sub>2</sub>) and 15.8 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3440 (OH), 1780 (CO) and 1742 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 669 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>36</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S (MH<sup>+</sup>): 669.1901; found, 669.1905.

### 7.30 General procedure for the preparation of compounds 39–43

A solution of the esters **136–139** and **141** (1 equivalent) in *m*-cresol (0.16 M) under inert atmosphere was heated at 50 °C for 12h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with diethyl ether and treated with aqueous NaHCO<sub>3</sub> (1.1 equivalent). The organic layer was separated and the aqueous layer was washed with diethyl ether (×2) and freeze-dried. The reaction crude was purified by a MCI GEL<sup>®</sup> CHP<sub>2</sub>OP column (Mitsubishi chemical corporation), to give compounds **39–43** as sodium salts.

#### 7.30.1 Compound 39

It was prepared according to the general procedure for the synthesis of sodium salts using: ester **136** (82 mg, 0.13 mmol), *m*-cresol (0.8 mL) and NaHCO<sub>3</sub> (2 mL, 70 mM). Eluent for chromatography: gradient of ethanol/Milli-Q water [1) (5:95); 2) (40:60)]. Yield = 21 mg (34%). Beige solid.  $[\alpha]_D^{20} = +351.3$  (c1.1, H<sub>2</sub>O). Mp: 190–192 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 8.36 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, ArH), 7.66 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, ArH), 7.50 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, ArH), 7.25 (s, 1H, CH=), 7.24 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, ArH), 7.08 (dt, *J* = 2.3 and 7.2 Hz, 1H, ArH), 6.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, ArH), 6.71 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, ArH), 5.91 (s, 1H, H5), 4.85 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, OCHH), 4.76 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, OCHH), 4.47 (s, 1H, H2) and 1.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 172.3 (C), 170.4 (C), 168.5 (C), 159.5 (C), 150.0 (CH+C), 137.4 (CH), 136.3 (CH), 131.1 (CH), 130.4 (C), 130.3 (CH), 126.4 (CH), 125.2 (CH), 120.0 (CH), 117.0 (CH), 111.7 (C), 72.6 (CH), 67.2 (C), 64.4 (CH<sub>2</sub>), 61.9 (CH) and 15.6 (CH<sub>3</sub>) ppm.

FTIR (ATR): 3419 (OH), 1763 (CO), 1683 (CO) and 1612 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z$  = 459 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S (MH<sup>+</sup>): 459.0857; found, 459.0859.

### 7.30.2 Compound 40

It was prepared following the general procedure for the synthesis of sodium salts using: ester **137** (102 mg, 0.16 mmol), *m*-cresol (1 mL) and NaHCO<sub>3</sub> (2.5 mL, 67 mM). Eluent for chromatography: gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (5:95); 2) (30:70)]. Yield = 40 mg (50%). White solid.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +260.7$  (c1.0, H<sub>2</sub>O). Mp: 188–190 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 8.56 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 1H, ArH), 7.77 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.48 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.41 (s, 1H, CH=), 7.39 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.33 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, ArH), 6.87 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H, ArH), 6.02 (s, 1H, H5), 4.90 (d,  $J$  = 13.1 Hz, 1H, OCHH), 4.85 (d,  $J$  = 13.1 Hz, 1H, OCHH), 4.53 (s, 1H, H2) and 1.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 172.3 (C), 170.5 (C), 167.3 (C), 158.3 (C), 150.0 (CH+C), 137.2 (CH), 135.8 (CH), 130.8 (C), 130.6 (CH), 129.3 (CH), 126.2 (CH), 125.1 (CH), 124.0 (C), 118.8 (CH), 112.5 (C), 72.6 (CH), 66.8 (C), 65.2 (CH<sub>2</sub>), 62.1 (CH) and 15.6 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3389 (OH), 1768 (CO), 1683 (CO) and 1614 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z$  = 493 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S (MH<sup>+</sup>): 493.0467; found, 493.0469.

### 7.30.3 Compound 41

It was prepared following the general procedure for the synthesis of sodium salts using: ester **138** (69 mg, 0.11 mmol), *m*-cresol (0.7 mL) and NaHCO<sub>3</sub> (1.7 mL, 70 mM). Eluent for chromatography: gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (5:95); 2) (30:70)]. Yield = 9.4 mg (19%). White solid.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +262.3$  (c0.6, H<sub>2</sub>O). Mp: 193–194 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 8.63 (d,  $J$  = 4.3 Hz, 1H, ArH), 8.19 (dd,  $J$  = 1.0 and 4.3 Hz, 1H, ArH), 7.87 (dt,  $J$  = 1.6 and 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.59 (m, 2H, 2×ArH), 7.53–7.49 (m, 2H, ArH+CH=), 7.43 (m, 1H, ArH), 6.10 (s, 1H, H5), 5.09 (d,  $J$  = 12.6 Hz, 1H, OCHH), 4.98 (d,  $J$  = 12.5 Hz, 1H, OCHH), 4.63 (s, 1H, H2) and 1.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 172.3 (C), 170.3 (C), 166.7 (C), 150.3 (2×CH), 141.2

(C), 137.8 (2×CH), 131.4 (CH), 130.5 (2×C), 130.4 (CH), 127.7 (C), 126.7 (CH), 125.6 (CH), 72.9 (CH), 67.5 (C), 63.9 (CH<sub>2</sub>), 61.6 (CH) and 15.6 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3424 (OH), 1765 (CO), 1686 (CO) and 1619 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 460 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S (MH<sup>+</sup>): 460.0809; found, 460.0808.

#### 7.30.4 Compound 42

It was prepared following the general procedure for the synthesis of sodium salts using: ester **139** (103 mg, 0.17 mmol), *m*-cresol (1.0 mL) and NaHCO<sub>3</sub> (2.6 mL, 70 mM). Eluent for chromatography: gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (0:100); 2] (30:70)]. Yield = 12 mg (15%). Beige solid.  $[\alpha]_D^{20} = +324.6$  (c0.8, H<sub>2</sub>O). Mp: 198–199 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 8.51 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, ArH), 8.16 (s, 1H, ArH), 7.94 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, ArH), 7.73 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, ArH), 7.64 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.36 (s, 1H, CH=), 7.30 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, ArH), 5.98 (s, 1H, H5), 4.90 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, OCHH), 4.79 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, OCHH), 4.49 (s, 1H, H2) and 1.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 172.2 (C), 170.3 (C), 166.0 (C), 155.8 (C), 150.2 (CH), 150.1 (C), 140.2 (CH), 138.7 (C), 137.7 (CH), 137.5 (CH), 131.2 (CH), 130.4 (C), 126.6 (CH), 125.5 (CH), 123.7 (CH), 72.8 (CH), 67.2 (C), 64.6 (CH<sub>2</sub>), 61.7 (CH) and 15.5 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 3401 (OH), 1766 (CO), 1698 (CO) and 1615 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 460 (M–Na+2×H<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S (M–Na+2×H<sup>+</sup>): 460.0811; found, 460.0809.

#### 7.30.5 Compound 43

It was prepared following the general procedure for the synthesis of sodium salts using: ester **141** (95 mg, 0.14 mmol), *m*-cresol (0.9 mL) and NaHCO<sub>3</sub> (2.2 mL, 70 mM). Eluent for chromatography: gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (5:95); 2] (40:60)]. Yield = 24 mg (32%). Green solid.  $[\alpha]_D^{20} = +295.0$  (c1.0, H<sub>2</sub>O). Mp: 195–196 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 8.48 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, ArH), 7.64 (dt, *J* = 1.0 and 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.33 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.27 (s, 1H, CH=), 7.22 (dd, *J* = 5.0 and 7.4 Hz, 1H, ArH), 6.67 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 6.62 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 6.48

(dd,  $J = 1.6$  and  $8.1$  Hz, 1H, ArH), 5.86 (s, 1H, H5), 4.60 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.43 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.42 (s, 1H, H2), 2.65 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.52 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ) and 1.45 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 174.3 (C), 172.3 (C), 170.1 (C), 150.1 (CH+C), 143.7 (C), 142.1 (C), 137.6 (CH), 132.9 (C), 130.8 (CH), 130.8 (C), 126.5 (CH), 125.4 (CH), 120.2 (CH), 116.1 (CH), 115.9 (CH), 73.1 (CH), 67.1 (C), 64.3 ( $\text{CH}_2$ ), 62.1 (CH), 35.3 ( $\text{CH}_2$ ), 29.3 ( $\text{CH}_2$ ) and 15.2 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 3411 (OH), 1764 (CO) and 1618 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 503$  ( $\text{M}-\text{Na}+2\times\text{H}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$  ( $\text{M}-\text{Na}+2\times\text{H}^+$ ): 503.1119; found, 503.1116.

### 7.31 Compound 144

A suspension of sodium borohydride (5.32 g, 140.56 mmol) in methanol (15 mL), under inert atmosphere and at  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , was treated *via cannula* with a solution of (*E*)-ethyl-3-(2-methylpyridin-4-yl)acrylate (**143**)<sup>161</sup> (2.24 g, 11.71 mmol) in methanol (22.6 mL). The resulting mixture was heated at  $80\text{ }^\circ\text{C}$  for 2 h. After cooling to room temperature, methanol (60 mL) was added and the solution was heated for another 2 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with water (23 mL) and methanol was concentrated under reduced pressure. The resulting aqueous solution was extracted with dichloromethane ( $\times 2$ ). The combined organic extracts were dried (anh.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography, eluting with (10:90) methanol/ethyl acetate, to give the alcohol **144** (1.61 g, 91%) as a colorless oil.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.32 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, ArH), 6.98 (s, 1H, ArH), 6.92 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H, ArH), 3.65 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.71 (br s, 1H, OH), 2.66 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 2.49 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) and 1.87 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 158.3 (C), 151.6 (C), 148.9 (CH), 123.7 (CH), 121.2 (CH), 61.6 ( $\text{CH}_2$ ), 33.2 ( $\text{CH}_2$ ), 31.5 ( $\text{CH}_2$ ) and 24.3 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. FTIR (ATR)  $\nu$ : 3250 (OH)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 152$  ( $\text{MH}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NO}$  ( $\text{MH}^+$ ): 152.1070; found, 152.1069.

### 7.32 Compound 145

A solution of the alcohol **144** (1.24 g, 8.20 mmol) in dry *N,N*-dimethylformamide (16.4 mL) under inert atmosphere, was treated with imidazole (1.1 g, 16.40 mmol) and *tert*-butyldiphenylchlorosilane (4.3 mL, 16.40 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h and then diluted with a (1:4) mixture of ethyl acetate/water. The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (×3). The combined organic extracts were successively washed with water and brine (×2), dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with (75:25) ethyl acetate/hexane, to afford the silyl ether **145** (3.18 g, quant.) as a colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.35 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, ArH), 7.66 (dd, *J* = 1.5 and 7.6 Hz, 4H, 4×ArH), 7.46–7.35 (m, 6H, 6×ArH), 6.97 (s, 1H, ArH), 6.90 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, ArH), 3.67 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 2.69 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 2.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.85 (quint, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) and 1.07 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 158.2 (C), 151.5 (C), 149.0 (CH), 135.6 (4×CH), 133.9 (2×C), 129.7 (2×CH), 127.8 (4×CH), 123.6 (CH), 121.2 (CH), 62.8 (CH<sub>2</sub>), 33.1 (CH<sub>2</sub>), 31.5 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (3×CH<sub>3</sub>), 24.4 (CH<sub>3</sub>) and 19.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI) *m/z* = 390 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>NOSi (MH<sup>+</sup>): 390.2248; found, 390.2250.

### 7.33 Compound 146

A solution of the pyridine **145** (692 mg, 1.78 mmol) in CHCl<sub>3</sub> (7.1 mL) at room temperature was treated with *m*-chloroperbenzoic acid (517 mg, 2.31 mmol, *ca* 77%). After stirring for 50 min, saturated NaHCO<sub>3</sub> was added, the organic layer was separated, and the aqueous layer extracted with dichloromethane (×2). The combined organic extracts were successively washed with NaHCO<sub>3</sub> (sat.), water and brine, dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The mixture was dissolved in acetic anhydride (3.4 mL) and heated at 90 °C for 12 h.

After cooling to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was dissolved in methanol (2.2 mL). The solution was cooled to 0 °C, treated with KOH (150 mg, 2.67 mmol) and then stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was then diluted with (1:1) ethyl acetate/saturated NaHCO<sub>3</sub>, the organic layer was separated, dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with (80:10:10) diethyl ether/acetone/dichloromethane, to give a mixture of alcohols resulting from the oxidation in the two benzylic positions of **145** (456 mg). A solution of this mixture (456 mg, 1.13 mmol) in dry dichloromethane (2.8 mL), under inert atmosphere and at 0 °C, was treated with tetrabromomethane (595 mg, 1.79 mmol) and triphenylphosphine (345 mg, 1.32 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1.5 h. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with a gradient of diethyl ether/hexane [1) (30:70); 2) (50:50)], to give the bromide **146** (236 mg, 28%) as a pink oil. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.44 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, ArH), 7.68–7.64 (m, 4H, 4×ArH), 7.47–7.36 (m, 6H, 6×ArH), 7.24 (s, 1H, ArH), 7.01 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, ArH), 4.51 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 3.68 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 2.75 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 1.87 (quint, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) and 1.07 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 156.6 (C), 152.9 (C), 149.4 (CH), 135.7 (4×CH), 133.8 (2×C), 129.8 (2×CH), 127.8 (4×CH), 123.8 (CH), 123.5 (CH), 62.7 (CH<sub>2</sub>), 33.9 (CH<sub>2</sub>), 32.9 (CH<sub>2</sub>), 31.5 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (3×CH<sub>3</sub>) and 19.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI) *m/z* = 468 and 470 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>NOSi<sup>79</sup>Br (MH<sup>+</sup>): 468.1353; found, 468.1349.

### 7.34 Compound 142

It was prepared following the general procedure for the synthesis of phosphonium salts described on page 119 using: bromide **146** (924 mg, 1.97 mmol), toluene (9.0 mL) and triphenylphosphine (621 mg, 2.37 mmol). Yield = 1.04 g (74%). Beige solid. Mp: 75–76 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.22 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H,

ArH), 7.84–7.65 (m, 15H, 15×ArH), 7.59–7.57 (m, 4H, 4×ArH), 7.49–7.40 (m, 6H, 6×ArH), 7.05 (m, 2H, 2×ArH), 5.37 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>P), 3.55 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 1.67 (quint,  $J = 6.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) and 0.99 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 151.9 (C), 150.1 (d,  $J = 8$  Hz, C), 149.0 (CH), 135.0 (4×CH), 134.6 (2×CH), 133.9 (d,  $J = 10$  Hz, 6×CH), 133.1 (2×C), 129.9 (2×CH), 129.8 (d,  $J = 13$  Hz, 6×CH), 127.9 (4×CH), 127.5 (CH), 125.5 (d,  $J = 8$  Hz, CH), 123.1 (CH), 119.1 (d,  $J = 87$  Hz, 3×C), 62.4 (CH<sub>2</sub>), 32.2 (CH<sub>2</sub>), 30.8 (d,  $J = 50$  Hz, CH<sub>2</sub>), 30.4 (CH<sub>2</sub>), 26.6 (3×CH<sub>3</sub>) and 18.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 24.89 (s, 1P) ppm. MS (ESI)  $m/z = 650$  (M–Br). HRMS calcd for C<sub>43</sub>H<sub>45</sub>NOPSi (M–Br): 650.3003; found, 650.3005.

### 7.35 Compound 147

It was prepared according to the general Wittig reaction procedure described on page 122 using: (i) for the preparation of the diketone: benzhydryl aminopenicillanate (**72**)<sup>160</sup> (550 mg, 1.44 mmol), dry dichloromethane (7.2 mL), dry triethylamine (0.6 mL, 4.31 mmol), trifluoromethanesulfonic anhydride (0.7 mL, 4.31 mmol), dry triethylamine (0.6 mL, 4.31 mmol), cold HCl (20 mL, 0.5 M) and cold HCl (3×10 mL, 0.5 M); (ii) for the Wittig reaction: **142** (1.04 g, 1.44 mmol), dry THF (5.8 mL), KO<sup>t</sup>Bu (158 mg, 1.44 mmol), diketone obtained from **72** (548 mg, 1.44 mmol) and dry dichloromethane (11.1 mL). Reaction conditions: 40 min –78 °C. Eluent for chromatography: gradient of diethyl ether/hexane [1] (30:70); 2] (50:50)]. Yield = 444 mg (40%). White foam.  $[\alpha]_D^{20} = +269.5$  (c0.9, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.50 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H, ArH), 7.69–7.66 (m, 4H, 4×ArH), 7.46–7.31 (m, 17H, 16×ArH+CH=), 7.15 (s, 1H, ArH), 7.02 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H, ArH), 7.01 (s, 1H, ArH), 6.93 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.29 (s, 1H, H5), 4.72 (s, 1H, H2), 3.69 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2.75 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 1.87 (quint,  $J = 6.7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) and 1.10 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 169.5 (C), 167.5 (C), 152.4 (C), 152.1 (C), 150.2 (CH), 145.0 (C), 139.5 (C), 139.4 (C), 135.6 (4×CH), 133.7 (2×C), 129.8 (2×CH), 128.7 (2×CH), 128.6 (2×CH), 128.4

(CH), 128.2 (CH), 127.8 (4×CH), 127.7 (2×CH), 127.2 (2×CH), 126.8 (CH), 124.7 (CH), 124.0 (CH), 78.2 (CH), 70.8 (CH), 70.5 (CH), 63.2 (C), 62.5 (CH<sub>2</sub>), 33.6 (CH<sub>3</sub>), 32.9 (CH<sub>2</sub>), 31.4 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (3×CH<sub>3</sub>), 25.8 (CH<sub>3</sub>) and 19.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 1767 (CO) and 1749 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 753 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>46</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>SSi (MH<sup>+</sup>): 753.3177; found, 753.3173.

### 7.36 Compound 148

It was prepared following the general oxidation procedure described on page 127 using: (i) for the first oxidation: **147** (444 mg, 0.59 mmol) and *m*-chloroperbenzoic acid (198 mg, 0.88 mmol) in dry dichloromethane (4.0 mL), reaction time = 40 min, eluent for chromatography: (50:50) diethyl ether/hexane; (ii) for the oxidation of the corresponding sulfoxide to sulfone **148**, sulfoxide derivative of **147** (188 mg, 0.24 mmol) and *m*-chloroperbenzoic acid (71 mg, 0.32 mmol) in dry dichloromethane (1.6 mL), eluent for chromatography: (50:50) diethyl ether/hexane. Overall yield = 350 mg (76%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +219.3$  (c0.9, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.54 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, ArH), 7.68–7.65 (m, 4H, 4×ArH), 7.48–7.34 (m, 16H, 16×ArH), 7.23 (s, 1H, CH=), 7.16 (s, 1H, ArH), 7.08 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, ArH), 7.04 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 5.74 (s, 1H, H5), 4.57 (s, 1H, H2), 3.69 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2.75 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 1.86 (quint, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) and 1.09 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 168.7 (C), 166.8 (C), 152.5 (2×C), 150.9 (C), 150.5 (CH), 139.2 (C), 138.9 (C), 135.6 (4×CH), 133.7 (C), 132.7 (C), 130.4 (CH), 129.8 (2×CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (2×CH), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 127.8 (4×CH), 127.8 (2×CH), 127.0 (2×CH), 126.9 (CH), 125.2 (CH), 79.0 (CH), 72.2 (CH), 64.6 (C), 63.2 (CH), 62.5 (CH<sub>2</sub>), 32.9 (CH<sub>2</sub>), 31.3 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (3×CH<sub>3</sub>), 20.1 (CH<sub>3</sub>), 19.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) and 18.5 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 1782 (CO) and 1759 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 785 (M<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>46</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>SSi (M<sup>+</sup>): 785.3075; found, 785.3072.

### 7.37 Compound 149

It was prepared following the general procedure for the deprotection of silyl ethers described on page 138 using: **148** (92 mg, 0.12 mmol) in dry THF (1.2 mL), acetic acid (0.16 mL, 2.81 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (0.94 mL, 0.94 mmol). Reaction conditions: 24 h 0 °C. Eluent for chromatography: (75:25) ethyl acetate/hexane. Yield = 56 mg (89%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +315.4$  (c0.8, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.55 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, ArH), 7.41–7.31 (m, 10H, 10×ArH), 7.25 (s, 1H, CH=), 7.21 (s, 1H, ArH), 7.12 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, ArH), 7.01 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 5.73 (s, 1H, H5), 4.55 (s, 1H, H2), 3.64 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2.71 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 1.85 (quint, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.75 (br s, 1H, OH), 1.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) and 1.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 168.7 (C), 166.7 (C), 152.3 (C), 151.0 (C), 150.6 (CH), 139.1 (C), 138.9 (C), 132.8 (C), 130.4 (CH), 128.9 (2×CH), 128.7 (2×CH), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 127.7 (2×CH), 126.9 (2×CH), 126.8 (CH), 125.2 (CH), 79.0 (CH), 72.2 (CH), 64.6 (C), 63.2 (CH), 61.6 (CH<sub>2</sub>), 33.0 (CH<sub>2</sub>), 31.3 (CH<sub>2</sub>), 20.1 (CH<sub>3</sub>) and 18.5 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3547 (OH), 1779 (CO) and 1759 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 547 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S (MH<sup>+</sup>): 547.1897; found, 547.1895.

### 7.38 Compound 150

A solution of 3,4-di(tert-butylphenylsilyloxy)phenylacetic acid (**103**)<sup>139</sup> (68 mg, 0.11 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (13 mg, 0.11 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (81 mg, 0.42 mmol) in dry dichloromethane (0.2 mL), under argon and at -15 °C, was treated with a solution of the alcohol **149** (58 mg, 0.11 mmol) in dry dichloromethane (0.3 mL). The reaction mixture was stirred at this temperature for 30 min and then was allowed to reach room temperature for 20 min. Ethyl acetate and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 M) were added, the aqueous layer was separated and the organic layer was successively washed with water and NaHCO<sub>3</sub> (sat.). The organic extract was dried

(anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with (75:25) diethyl ether/hexane, to afford the compound **150** (88 mg, 71%) as a white foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +159.0$  (c1.2, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.55 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H, ArH), 7.82 (t,  $J = 7.0$  Hz, 10H, 10×ArH), 7.46–7.35 (m, 20H, 20×ArH), 7.23 (s, 1H, CH=), 7.08 (s, 1H, ArH), 7.05 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.97 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H, ArH), 6.43–6.41 (m, 2H, 2×ArH), 6.32 (dd,  $J = 1.3$  and 8.3 Hz, 1H, ArH), 5.75 (s, 1H, H5), 4.58 (s, 1H, H2), 3.84 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.43 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 1.73 (quint,  $J = 6.4$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.18 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>) and 1.15 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 171.3 (C), 168.6 (C), 166.8 (C), 151.5 (C), 151.1 (C), 150.6 (CH), 146.1 (C), 145.3 (C), 139.2 (C), 138.9 (C), 135.7 (4×CH), 135.6 (4×CH), 133.3 (2×C), 133.1 (4×C), 130.2 (CH), 129.9 (3×CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (2×CH), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 127.9 (4×CH), 127.9 (4×CH), 127.8 (2×CH), 127.0 (2×CH), 126.6 (CH), 126.2 (CH), 125.0 (CH), 121.5 (CH), 121.4 (CH), 120.4 (CH), 79.0 (CH), 72.2 (CH), 64.6 (C), 63.3 (CH), 63.1 (CH<sub>2</sub>), 40.6 (CH<sub>2</sub>), 31.2 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 26.9 (3×CH<sub>3</sub>), 26.8 (3×CH<sub>3</sub>), 20.1 (CH<sub>3</sub>), 19.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) and 18.6 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 1781 (CO) and 1735 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 1173$  (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>70</sub>H<sub>73</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>SSi<sub>2</sub> (MH<sup>+</sup>): 1173.4570; found, 1173.4578.

### 7.39 Compound 151

It was prepared following the general procedure for the deprotection of silyl ethers described on page 138 using **150** (88 mg, 0.08 mmol) in dry THF (0.8 mL), acetic acid (0.1 mL, 1.80 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (0.6 mL, 0.60 mmol). Reaction conditions: 40 min 0 °C; 15 min RT. Eluent for chromatography: gradient of ethyl acetate/hexane [1] (50:20); 2) (75:25)]. Yield = 46 mg (88%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +234.8$  (c1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.49 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, ArH), 7.41–7.28 (m, 10H, 10×ArH), 7.16 (s, 1H, CH=), 7.01 (s, 1H, ArH), 6.98 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, ArH), 6.97 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.75 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 6.74 (s, 1H, ArH),

6.63 (dd,  $J = 1.2$  and  $8.0$  Hz, 1H, ArH), 6.43 (br s, 2H, 2×OH), 5.71 (s, 1H, H5), 4.56 (s, 1H, H2), 4.05 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.43 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.57 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 1.90 (quint,  $J = 6.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) and 1.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172.4 (C), 169.1 (C), 166.7 (C), 151.5 (C), 150.8 (C), 150.5 (CH), 144.1 (C), 143.2 (C), 139.0 (C), 138.8 (C), 132.1 (C), 130.9 (CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (3×CH), 128.4 (CH), 127.8 (2×CH), 126.9 (3×CH), 126.3 (C), 125.1 (CH), 121.5 (CH), 116.3 (CH), 115.6 (CH), 79.1 (CH), 72.1 (CH), 64.8 (C), 63.7 (CH<sub>2</sub>), 63.2 (CH), 40.9 (CH<sub>2</sub>), 31.3 (CH<sub>2</sub>), 28.8 (CH<sub>2</sub>), 20.0 (CH<sub>3</sub>) and 18.5 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3413 (OH), 1780 (CO), 1754 (CO) and 1733 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 697$  (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>38</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S (MH<sup>+</sup>): 697.2214; found, 697.2215.

#### 7.40 Compound 44

It was prepared following the general procedure for the synthesis of sodium salts described on page 161 using: ester **151** (47 mg, 0.07 mmol), *m*-cresol (0.4 mL) and NaHCO<sub>3</sub> (2 mL, 37 mM). Eluent for chromatography: gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (0:100); 2) (30:70)]. Yield = 11 mg (30%). Brown solid.  $[\alpha]_D^{20} = +217.7$  (c0.7, H<sub>2</sub>O). Mp: 189–190 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 8.39 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H, ArH), 7.29 (s, 1H, ArH), 7.13 (s, 1H, CH=), 7.05 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H, ArH), 6.79 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 6.73 (s, 1H, ArH), 6.59 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, ArH), 5.89 (s, 1H, H5), 4.23 (s, 1H, H2), 4.00 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.37 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.53 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 1.85 (quint.,  $J = 6.4$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) and 1.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 174.6 (C), 172.9 (C), 170.8 (C), 152.6 (C), 150.2 (C), 150.0 (CH), 143.9 (C), 143.0 (C), 131.2 (CH), 130.3 (C), 126.5 (CH), 126.3 (C), 125.5 (CH), 121.5 (CH), 116.8 (CH), 116.1 (CH), 71.3 (CH), 65.6 (CH), 65.3 (CH<sub>2</sub>), 64.5 (C), 39.9 (CH<sub>2</sub>), 30.7 (CH<sub>2</sub>), 27.8 (CH<sub>2</sub>), 19.5 (CH<sub>3</sub>) and 17.5 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3380 (OH), 1762 (CO), 1728 (CO) and 1597 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 531$  (M–Na+2×H<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S (M–Na+2×H<sup>+</sup>): 531.1432; found, 531.1432.

## 7.41 General procedure for the preparation of esters 164–170

A solution of the ester **163**<sup>179</sup> (1 equivalent) in absolute ethanol (0.04 M), under inert atmosphere and at room temperature, was treated with thiourea (5 equivalents). The reaction mixture was heated at 60 °C for 2 h. After cooling to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and the reaction crude was dissolved in a mixture of ethyl acetate/water. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (×3). The combined organic extracts were successively washed with water and brine, dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure to afford the corresponding primary alcohol of **163**,<sup>179</sup> which was used in the next step without further purification. A solution of the acids **112**,<sup>159</sup> **113**, **103**,<sup>139</sup> **116**, **117** or the sodium benzoates **114** and **115** (1 equivalent), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (1 equivalent) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (4 equivalents) in dry dichloromethane, under argon and at -15 °C, was treated with a solution of the obtained alcohol derivative from **163**<sup>179</sup> (1 equivalent) in dry dichloromethane (0.2 M). The reaction mixture was stirred at this temperature for 30–60 min and it was allowed to reach room temperature for 0.5–12 h. Ethyl acetate and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 M) were added, the aqueous layer was separated and the organic layer was successively washed with water and saturated NaHCO<sub>3</sub>. The organic extract was dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography to afford the esters **164–170**.

### 7.41.1 Compound 164

It was prepared according to the procedure described for the synthesis of esters **90–94** using: (i) for the ester hydrolysis: **163**<sup>179</sup> (350 mg, 0.71 mmol), ethanol (17.6 mL) and thiourea (271 mg, 3.57 mmol); (ii) for the esterification: 2-[(2-methoxyethoxy)methoxy]benzoic acid (**112**)<sup>159</sup> (161 mg, 0.71 mmol), *N,N*-4-

dimethylaminopyridine (88 mg, 0.71 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (546 mg, 2.85 mmol) in dry dichloromethane (1.5 mL) and the alcohol derivative of **163**<sup>179</sup> (300 mg, 0.71 mmol) in dry dichloromethane (2.1 mL). Reaction conditions: 30 min at -15 °C; 1 h at room temperature. Eluent for chromatography: (75:25) diethyl ether/hexane. Yield = 268 mg (60%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +43.8$  (c0.9, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.89 (dd,  $J = 1.7$  and 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.48 (dt,  $J = 1.7$  and 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.41–7.28 (m, 10H, 10×ArH), 7.04 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, ArH), 6.98 (s, 1H CHPh<sub>2</sub>), 5.36 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.86 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.75 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.66 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.61 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 3.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.57–3.44 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-6+CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.35 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) and 1.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.2 (C), 165.7 (C), 164.9 (C), 157.4 (C), 138.6 (C), 138.4 (C), 134.4 (CH), 132.3 (CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (CH), 128.8 (2×CH), 128.5 (CH), 127.8 (2×CH), 126.9 (2×CH), 121.6 (CH), 119.2 (C), 116.0 (CH), 93.6 (CH<sub>2</sub>), 79.5 (CH), 71.5 (CH<sub>2</sub>), 67.9 (CH<sub>2</sub>), 65.1 (C), 63.2 (CH<sub>2</sub>), 62.4 (CH), 59.6 (CH), 59.0 (CH<sub>3</sub>), 39.1 (CH<sub>2</sub>) and 15.7 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 1796 (CO) and 1732 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 646$  (MNa<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>10</sub>SNa (MNa<sup>+</sup>): 646.1717; found, 646.1718.

#### 7.41.2 Compound 165

It was prepared according to the procedure described for the synthesis of esters **90–94** using: (i) for the ester hydrolysis: **163**<sup>179</sup> (234 mg, 0.48 mmol), ethanol (12 mL) and thiourea (181 mg, 2.38 mmol); (ii) for the esterification: benzoic acid **113** (124 mg, 0.48 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (58 mg, 0.48 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (365 mg, 1.90 mmol) in dry dichloromethane (1.0 mL) and the alcohol derivative of **163**<sup>179</sup> (204 mg, 0.48 mmol) in dry dichloromethane (1.4 mL). Reaction conditions: 30 min at -15 °C; 30 min at room temperature. Eluent for chromatography: (75:25) diethyl ether/hexane. Yield = 191 mg (61%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +37.1$  (c1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.87 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, ArH), 7.44 (dd,  $J = 2.8$  and 9.0 Hz,

1H, ArH), 7.40–7.33 (m, 10H, 10×ArH), 7.29 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, ArH), 7.00 (s, 1H *CHPh*<sub>2</sub>), 5.34 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.87 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.75 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.68 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.64 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 3.84 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.60–3.46 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-H<sub>6</sub>+CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.36 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) and 1.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.2 (C), 165.7 (C), 164.0 (C), 155.9 (C), 138.5 (C), 138.4 (C), 134.0 (CH), 131.8 (CH), 128.9 (2×CH), 128.9 (CH), 128.8 (2×CH), 128.5 (CH), 127.8 (2×CH), 126.9 (2×CH), 126.6 (C), 120.5 (C), 117.6 (CH), 93.8 (CH<sub>2</sub>), 79.6 (CH), 71.5 (CH<sub>2</sub>), 68.1 (CH<sub>2</sub>), 64.9 (C), 63.5 (CH<sub>2</sub>), 62.4 (CH), 59.5 (CH), 59.0 (CH<sub>3</sub>), 39.1 (CH<sub>2</sub>) and 15.7 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 1796 (CO) and 1738 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 680$  (MNa<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>32</sub>H<sub>32</sub>ClNO<sub>10</sub>SNa (MNa<sup>+</sup>): 680.1328; found, 680.1330.

### 7.41.3 Compound 166

It was prepared following the procedure described for the synthesis of esters **90**–**94** using: (i) for the ester hydrolysis: **163**<sup>179</sup> (600 mg, 1.22 mmol), ethanol (31 mL) and thiourea (463 mg, 6.1 mmol); (ii) for the esterification: sodium benzoate **114** (282 mg, 1.08 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (132 mg, 1.08 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (828 mg, 4.32 mmol) in dry dichloromethane (2.0 mL), and the alcohol derivative of **163**<sup>179</sup> (519 mg, 1.22 mmol) in dry dichloromethane (4.1 mL). Reaction conditions: 1 h at –15 °C; 12 h at room temperature. Eluent for chromatography: (60:40) ethyl acetate/hexane. Yield = 359 mg (53%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +47.4$  (c1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.35 (dd,  $J = 1.1$  and 4.5 Hz, 1H, ArH), 7.69 (dd,  $J = 1.1$  and 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.41–7.29 (m, 11H, 11×ArH), 6.97 (s, 1H *CHPh*<sub>2</sub>), 5.34 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.96 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.78 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.72 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.61 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 3.81 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.57–3.44 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-6+CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.33 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) and 1.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.1 (C), 165.7 (C), 164.5 (C), 153.5 (C), 142.6 (CH), 138.5 (C), 138.4 (C), 138.3 (C), 128.9 (2×CH), 128.8 (CH), 128.7 (2×CH), 128.5 (CH), 127.7 (2×CH), 127.4 (CH), 126.9 (2×CH), 123.9 (CH), 93.5 (CH<sub>2</sub>), 79.6 (CH), 71.4 (CH<sub>2</sub>), 68.1 (CH<sub>2</sub>), 65.0 (C), 63.7 (CH<sub>2</sub>), 62.6 (CH), 59.5 (CH), 59.0 (CH<sub>3</sub>), 39.3

(CH<sub>2</sub>) and 15.6 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 1796 (CO) and 1735 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 625 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S (MH<sup>+</sup>): 625.1850; found, 625.1853.

#### 7.41.4 Compound 167

It was prepared following the procedure described for the synthesis of esters **90–94** using: (i) for the ester hydrolysis: **163**<sup>179</sup> (500 mg, 1.02 mmol), ethanol (26 mL) and thiourea (386 mg, 5.08 mmol); (ii) for the esterification: sodium benzoate **115** (254 mg, 1.02 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (125 mg, 1.02 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (782 mg, 4.08 mmol) in dry dichloromethane (2.5 mL), and the alcohol derivative of **163**<sup>179</sup> (423 mg, 1.02 mmol) in dry dichloromethane (2.6 mL). Reaction conditions: 40 min at -15 °C; 30 min at room temperature. Eluent for chromatography: (60:40) ethyl acetate/hexane. Yield = 272 mg (43%). White foam.  $[\alpha]_D^{20} = +41.5$  (c1.3, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.74 (s, 1H, ArH), 8.39 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, ArH), 7.67 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H ArH), 7.37–7.33 (m, 10H, 10×ArH), 6.99 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 5.41 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, OCHHO), 5.38 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, OCHHO), 4.87 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, OCHH), 4.72 (s, 1H, H2), 4.69 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, OCHH), 4.62 (dd, *J* = 2.0 and 4.0 Hz, 1H, H5), 3.86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.59–3.45 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>+CH<sub>2</sub>-6), 3.35 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) and 1.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 170.1 (C), 165.6 (C), 163.6 (C), 151.8 (C), 143.4 (CH), 139.8 (CH), 138.5 (C), 138.4 (C), 128.9 (2×CH), 128.9 (CH), 128.8 (2×CH), 128.6 (CH), 127.7 (2×CH), 127.0 (2×CH), 125.9 (C), 124.2 (CH), 94.3 (OCH<sub>2</sub>O), 79.6 (CH), 71.5 (CH<sub>2</sub>), 68.4 (CH<sub>2</sub>), 64.8 (C), 63.8 (CH<sub>2</sub>), 62.5 (CH), 59.5 (CH<sub>3</sub>), 59.1 (CH), 39.1 (CH<sub>2</sub>) and 15.7 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 1796 (CO) and 1742 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 625 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S (MH<sup>+</sup>): 625.1850; found, 625.1850.

#### 7.41.5 Compound 168

It was prepared following the procedure described for the synthesis of esters **90–94** using: (i) for the ester hydrolysis: **163**<sup>179</sup> (394 mg, 0.80 mmol), ethanol (20 mL) and thiourea (304 mg, 4.0 mmol); (ii) for the esterification: 3,4-di(*tert*-

butyldiphenylsilyloxy)benzoic acid (**116**)<sup>139</sup> (505 mg, 0.80 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (98 mg, 0.80 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (614 mg, 3.20 mmol) in dry dichloromethane (2.0 mL), and the alcohol derivative of **163**<sup>179</sup> (330 mg, 0.80 mmol) in dry dichloromethane (2.0 mL). Reaction conditions: 40 min at -15 °C; 30 min at room temperature. Eluent for chromatography: (55:45) diethyl ether/hexane. Yield = 377 mg (46%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +14.5$  (c1.1, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.83–7.74 (m, 8H, 8×ArH), 7.48–7.24 (m, 23H, 23×ArH), 7.10 (dd, *J* = 2.1 and 8.5 Hz, 1H ArH), 6.92 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.43 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 4.59 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, OCHH), 4.51 (m, 1H, H5), 4.48 (s, 1H, H2), 4.45 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H, OCHH), 3.51–3.38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6), 1.19 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>), 1.13 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>) and 0.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.0 (C), 165.6 (C), 164.6 (C), 151.4 (C), 146.2 (C), 138.5 (C), 138.4 (C), 135.7 (4×CH), 135.5 (4×CH), 132.7 (2×C), 132.3 (C), 132.3 (C), 130.2 (2×CH), 130.1 (2×CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (3×CH), 128.5 (CH), 128.1 (4×CH), 128.0 (4×CH), 127.8 (2×CH), 127.0 (2×CH), 123.5 (CH), 121.9 (CH), 121.2 (C), 120.2 (CH), 79.5 (CH), 65.0 (C), 63.1 (OCH<sub>2</sub>), 62.4 (CH), 59.7 (CH), 39.1 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (3×CH<sub>3</sub>), 26.6 (3×CH<sub>3</sub>), 19.7 (C), 19.6 (C) and 15.4 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 1800 (CO), 1755 (CO) and 1723 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 1050 (MNa<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>60</sub>H<sub>61</sub>NO<sub>9</sub>SSi<sub>2</sub>Na (MNa<sup>+</sup>): 1050.3498; found, 1050.3499.

#### 7.41.6 Compound 169

It was prepared following the procedure described for the synthesis of esters **90**–**94** using: (i) for the ester hydrolysis: **163**<sup>179</sup> (350 mg, 0.71 mmol), ethanol (17.6 mL) and thiourea (271 mg, 3.57 mmol); (ii) for the esterification: 3,4-di(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)phenylacetic acid (**103**)<sup>139</sup> (459 mg, 0.71 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (88 mg, 0.71 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (546 mg, 2.85 mmol) in dry dichloromethane (2.0 mL) and the alcohol derivative of **163**<sup>179</sup> (295 mg, 0.71 mmol) in dry dichloromethane (1.6 mL). Reaction conditions: 30 min at -15 °C; 1 h at room

temperature. Eluent for chromatography: gradient of ethyl acetate/hexane [1) (30:70); 2) (50:50)]. Yield = 368 mg (50%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +39.0$  (c0.8,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.79 (tt,  $J = 1.4$  and  $7.5$  Hz, 8H,  $8\times\text{ArH}$ ), 7.44–7.23 (m, 22H,  $22\times\text{ArH}$ ), 6.92 (s, 1H  $\text{CHPh}_2$ ), 6.37 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, ArH), 6.33 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, ArH), 6.24 (d,  $J = 2.1$  and  $8.3$  Hz, 1H, ArH), 4.52–4.51 (m, 2H,  $\text{H}_5+\text{H}_2$ ), 4.45 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H,  $\text{OCHH}$ ), 4.20 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H,  $\text{OCHH}$ ), 3.46 (dd,  $J = 4.2$  and  $16.2$  Hz, 1H,  $\text{CHH-6}$ ), 3.37 (dd,  $J = 2.1$  and  $16.2$  Hz, 1H,  $\text{CHH-6}$ ), 3.07 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 1.16 (s, 9H,  $3\times\text{CH}_3$ ), 1.13 (s, 9H,  $3\times\text{CH}_3$ ) and 0.93 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.3 (C), 169.8 (C), 165.7 (C), 146.0 (C), 145.4 (C), 138.5 (C), 138.4 (C), 135.7 (4 $\times\text{CH}$ ), 135.6 (4 $\times\text{CH}$ ), 133.2 (C), 133.2 (C), 133.1 (2 $\times\text{C}$ ), 130.0 (2 $\times\text{CH}$ ), 129.9 (2 $\times\text{CH}$ ), 128.9 (2 $\times\text{CH}$ ), 128.8 (3 $\times\text{CH}$ ), 128.6 (CH), 127.9 (8 $\times\text{CH}$ ), 127.7 (2 $\times\text{CH}$ ), 127.0 (2 $\times\text{CH}$ ), 125.4 (C), 79.6 (CH), 64.8 (C), 63.1 ( $\text{OCH}_2$ ), 62.6 (CH), 59.8 (CH), 39.7 ( $\text{CH}_2$ ), 39.4 ( $\text{CH}_2$ ), 26.9 (3 $\times\text{CH}_3$ ), 26.8 (3 $\times\text{CH}_3$ ), 19.7 (C), 19.6 (C) and 15.3 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. FTIR (ATR): 1799 (CO) and 1749 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 1064$  ( $\text{MNa}^+$ ). HRMS calcd for  $\text{C}_{61}\text{H}_{63}\text{NO}_9\text{SSi}_2\text{Na}$  ( $\text{MNa}^+$ ): 1064.3654; found, 1064.3663.

#### 7.41.7 Compound 170

It was prepared following the procedure described for the synthesis of esters **90–94** using: (i) for the ester hydrolysis: **163**<sup>179</sup> (200 mg, 0.40 mmol), ethanol (10.2 mL) and thiourea (154 mg, 2.03 mmol); (ii) for the esterification: carboxylic acid **117** (263 mg, 0.40 mmol), *N,N*-4-dimethylaminopyridine (49 mg, 0.40 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (306 mg, 1.60 mmol) in dry dichloromethane (1 mL) and the alcohol derivative of **163**<sup>179</sup> (166 mg, 0.40 mmol) in dry dichloromethane (1.1 mL). Reaction conditions: 40 min at  $-15$  °C; 30 min at room temperature. Eluent for chromatography: (55:45) ethyl acetate/hexane. Yield = 269 mg (64%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +37.6$  (c1.1,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.84 (d,  $J = 7.3$  Hz, 8H,  $8\times\text{ArH}$ ), 7.49–7.27 (m, 22H,  $22\times\text{ArH}$ ), 6.97 (s, 1H  $\text{CHPh}_2$ ), 6.35 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, ArH), 6.21 (s, 1H, ArH), 6.18 (dd,  $J = 1.7$  and  $8.3$  Hz, 1H, ArH), 4.59 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4.56 (m, 2H,  $\text{OCHH}+\text{H}_5$ ), 4.32 (d,  $J =$

12.2 Hz, 1H, OCHH), 3.50 (dd,  $J = 3.4$  and  $16.2$  Hz, 1H, CHH-6), 3.44 (dd,  $J = 2.3$  and  $16.2$  Hz, 1H, CHH-6), 2.40 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 2.07 (t,  $J = 8.8$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 1.21 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>), 1.18 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>) and 1.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 171.7 (C), 169.9 (C), 165.7 (C), 146.0 (C), 144.6 (C), 138.5 (C), 138.5 (C), 135.8 (4×CH), 135.7 (4×CH), 133.3 (4×C), 132.3 (C), 130.0 (2×CH), 129.9 (2×CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (3×CH), 128.6 (CH), 128.0 (4×CH), 127.9 (4×CH), 127.8 (2×CH), 127.0 (2×CH), 120.4 (2×CH), 120.2 (CH), 79.6 (CH), 64.8 (C), 62.9 (OCH<sub>2</sub>), 62.6 (CH), 59.8 (CH), 39.4 (CH<sub>2</sub>), 34.9 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 26.9 (3×CH<sub>3</sub>), 26.8 (3×CH<sub>3</sub>), 19.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) and 15.5 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 1801 (CO) and 1749 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 1078$  (MNa<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>62</sub>H<sub>65</sub>NO<sub>9</sub>SSi<sub>2</sub>Na (MNa<sup>+</sup>): 1078.3811; found, 1078.3805.

#### 7.42 Compound 171

It was prepared following the general procedure for the deprotection of methoxyethoxymethyl ethers described in compounds **130–133** using: **164** (228 mg, 0.37 mmol), *tert*-butanol (3.7 mL) and pyridinium *p*-toluenesulfonate (1.84 g, 7.32 mmol). Reaction time = 2 h. Eluent for chromatography: (75:25) diethyl ether/hexane. Yield = 110 mg (56%). White foam.  $[\alpha]_D^{20} = +31.3$  (c0.9, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 10.38 (s, 1H, OH), 7.86 (dd,  $J = 1.6$  and  $8.0$  Hz, 1H, ArH), 7.49 (dt,  $J = 1.7$  and  $8.6$  Hz, 1H, ArH), 7.41–7.32 (m, 10H, 10×ArH), 7.00 (m, 2H, ArH+CHPh<sub>2</sub>), 6.90 (dt,  $J = 0.8$  and  $8.0$  Hz, 1H, ArH), 4.94 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, OCHH), 4.72 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, OCHH), 4.66 (s, 1H, H2), 4.64 (m, 1H, H5), 3.61–3.47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6) and 1.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 170.2 (C), 168.8 (C), 165.6 (C), 161.8 (C), 138.5 (C), 138.4 (C), 136.6 (CH), 130.3 (CH), 129.0 (3×CH), 128.8 (2×CH), 128.6 (CH), 127.8 (2×CH), 126.9 (2×CH), 119.8 (CH), 117.7 (CH), 111.4 (C), 79.6 (CH), 64.8 (C), 63.6 (CH<sub>2</sub>), 62.4 (CH), 59.5 (CH), 39.0 (CH<sub>2</sub>) and 15.6 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3230 (OH), 1798 (CO), 1756 (CO) and 1682 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 558$  (MNa<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>8</sub>SNa (MNa<sup>+</sup>): 558.1193; found, 558.1190.

### 7.43 Compound 172

It was prepared following the general procedure for the deprotection of methoxyethoxymethyl ethers described in compounds **130–133** using: **165** (221 mg, 0.34 mmol), *tert*-butanol (3.4 mL) and pyridinium *p*-toluenesulfonate (1.70 g, 6.72 mmol). Reaction time = 3 h. Eluent for chromatography: (60:40) diethyl ether/hexane. Yield = 81 mg (42%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +24.6$  (c0.9, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 10.30 (s, 1H, OH), 7.81 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, ArH), 7.45–7.26 (m, 11H, 11×ArH), 7.01 (s, 1H *CHPh*<sub>2</sub>), 6.95 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, ArH), 4.90 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, *OCHH*), 4.76 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, *OCHH*), 4.68 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.65 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 3.59–3.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6) and 1.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.2 (C), 167.9 (C), 165.5 (C), 160.4 (C), 138.5 (C), 138.3 (C), 136.6 (CH), 129.5 (CH), 129.0 (3×CH), 128.9 (2×CH), 128.6 (CH), 127.8 (2×CH), 127.0 (2×CH), 124.5 (C), 119.4 (CH), 112.3 (C), 79.7 (CH), 64.7 (C), 64.1 (CH<sub>2</sub>), 62.5 (CH), 59.6 (CH), 39.1 (CH<sub>2</sub>) and 15.6 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3231 (OH), 1797 (CO), 1754 (CO) and 1686 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 592$  (MNa<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>ClNNaO<sub>8</sub>S (MNa<sup>+</sup>): 592.0803; found, 592.0807.

### 7.44 Compound 173

It was prepared following the general procedure for the deprotection of methoxyethoxymethyl ethers described in compounds **130–133** using: **166** (364 mg, 0.58 mmol), *tert*-butanol (5.8 mL) and pyridinium *p*-toluenesulfonate (2.9 g, 11.65 mmol). Reaction time = 3 h. Eluent for chromatography: (60:40) ethyl acetate/hexane. Yield = 162 mg (53%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +42.5$  (c1.4, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 10.17 (s, 1H, OH), 8.29 (dd,  $J = 1.5$  and 4.1 Hz, 1H, ArH), 7.44–7.30 (m, 12H, 12×ArH), 6.97 (s, 1H *CHPh*<sub>2</sub>), 4.87 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.86 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.65 (t,  $J = 3.1$  Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 3.54 (d,  $J = 3.1$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6) and 1.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 169.9 (C), 168.2 (C), 165.7 (C), 158.8 (C), 141.9 (CH), 138.5 (C), 138.5 (C), 129.9 (CH), 129.3 (C), 128.8 (2×CH), 128.7 (CH), 128.7 (2×CH),

128.4 (CH), 127.6 (2×CH), 126.9 (2×CH), 126.1 (CH), 79.5 (CH), 65.0 (C), 63.9 (CH<sub>2</sub>), 62.8 (CH), 59.7 (CH), 39.6 (CH<sub>2</sub>) and 15.8 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3213 (OH), 1794 (CO), 1753 (CO) and 1680 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z$  = 537 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S (MH<sup>+</sup>): 537.1326; found, 537.1326.

#### 7.45 Compound 174

It was prepared following the general procedure for the deprotection of methoxyethoxymethyl ethers described in compounds **130–133** using: **167** (313 mg, 0.50 mmol), *tert*-butanol (5.4 mL) and pyridinium *p*-toluenesulfonate (2.5 g, 20.02 mmol). Reaction time = 1 h. Eluent for chromatography: gradient of ethyl acetate/hexane from (50:50) to (60:40)]. Yield = 172 mg (64%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = +33.1 (c0.9, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 9.83 (br s, 1H, OH), 8.49 (s, 1H, ArH), 8.20 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, ArH), 7.60 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, ArH), 7.36–7.28 (m, 10H, 10×ArH), 7.00 (s, 1H CHPh<sub>2</sub>), 4.91 (d,  $J$  = 12.0 Hz, 1H, OCHH), 4.78 (d,  $J$  = 12.0 Hz, 1H, OCHH), 4.71 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.65 (dd,  $J$  = 2.0 and 3.7 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 3.56–3.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6) and 1.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.1 (C), 167.4 (C), 165.4 (C), 155.3 (C), 142.1 (CH), 140.9 (CH), 138.4 (C), 138.2 (C), 128.9 (3×CH), 128.7 (2×CH), 128.5 (CH), 127.7 (2×CH), 126.9 (2×CH), 121.6 (CH), 117.0 (C), 79.6 (CH), 64.5 (CH<sub>2</sub>), 64.3 (C), 62.4 (CH), 59.3 (CH), 38.9 (CH<sub>2</sub>) and 15.5 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3259 (OH), 1796 (CO), 1755 (CO) and 1699 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z$  = 537 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S (MH<sup>+</sup>): 537.1326; found, 537.1328.

#### 7.46 Compound 175

It was prepared following the general procedure for the deprotection of silyl ethers described on page 138 using: **168** (402 mg, 0.39 mmol) in dry THF (3.9 mL), acetic acid (0.5 mL, 9.36 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (3.1 mL, 3.12 mmol). Reaction conditions: 30 min at 0 °C. Eluent for chromatography: gradient of diethyl ether/hexane [1) (75:25); 2) (100:0)]. Yield = 147 mg (68%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = +32.8 (c0.8, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.53 (s, 1H, ArH), 7.50 (s,

1H, ArH), 7.37–7.26 (m, 9H, 9×ArH), 6.99 (br s, 1H, OH), 6.96 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 6.76 (br s, 1H, OH), 4.84 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, OCHH), 4.75 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.66 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, OCHH), 4.61 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 3.42 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-6) and 1.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 171.0 (C), 165.9 (C), 165.5 (C), 149.6 (C), 143.3 (C), 138.4 (C), 138.3 (C), 129.0 (3×CH), 128.8 (2×CH), 128.6 (CH), 127.8 (2×CH), 126.9 (2×CH), 124.4 (CH), 120.9 (C), 116.8 (CH), 115.2 (CH), 79.9 (CH), 65.3 (C), 63.6 (CH<sub>2</sub>), 62.5 (CH), 59.6 (CH), 38.9 (CH<sub>2</sub>) and 15.7 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3423 (OH), 1794 (CO), 1753 (CO) and 1718 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 574 (MNa<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>9</sub>SNa (MNa<sup>+</sup>): 574.1142; found, 574.1141.

#### 7.47 Compound 176

It was prepared following the general procedure for the deprotection of silyl ethers described on page 138 using: ether **169** (368 mg, 0.36 mmol) in dry THF (3.5 mL), acetic acid (0.5 mL, 8.47 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (2.8 mL, 2.82 mmol). Reaction conditions: 80 min at 0 °C. Eluent for chromatography: gradient of ethyl acetate/hexane [1] (50:50); (75:25)]. Yield = 174 mg (87%). White foam.  $[\alpha]_D^{20} = +68.7$  (c0.8, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.38–7.27 (m, 8H, 8×ArH), 7.19 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.17 (s, 1H, ArH), 6.90 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.84 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 6.70 (dd, *J* = 1.9 and 8.1 Hz, 1H, ArH), 6.12 (s, 1H, OH), 5.44 (s, 1H, OH), 4.79 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.63 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H, OCHH), 4.58 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 4.25 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H, OCHH), 3.63–3.43 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-6+CH<sub>2</sub>Ar) and 1.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 171.0 (2×C), 165.8 (C), 143.7 (C), 143.6 (C), 138.5 (C), 138.3 (C), 128.9 (3×CH), 128.8 (2×CH), 128.5 (CH), 127.7 (2×CH), 126.7 (2×CH), 125.4 (C), 122.0 (CH), 116.7 (CH), 115.5 (CH), 79.7 (CH), 65.0 (C), 63.0 (CH<sub>2</sub>), 62.6 (CH), 59.0 (CH), 40.4 (CH<sub>2</sub>), 39.1 (CH<sub>2</sub>) and 15.6 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3433 (OH), 1794 (CO) and 1741 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z* = 588 (MNa<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>29</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>9</sub>SNa (MNa<sup>+</sup>): 588.1299; found, 588.1297.

### 7.48 Compound 177

It was prepared following the general procedure for the deprotection of silyl ethers described on page 138 using: ether **170** (330 mg, 0.31 mmol) in dry THF (3.1 mL), acetic acid (0.4 mL, 7.51 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (2.5 mL, 2.46 mmol). Reaction conditions: 80 min at 0 °C. Eluent for chromatography: gradient of ethyl acetate/hexane [1] (50:50); 2) (75:25)]. Yield = 86 mg (48%). White foam.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +64.0$  (c0.7, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.34–7.32 (m, 10H, 10×ArH), 6.95 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 6.72 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 6.67 (s, 1H, ArH), 6.56 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, ArH), 6.11 (br s, 1H, OH), 5.87 (br s, 1H, OH), 4.68 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.62–4.56 (m, 2H, OCHH + H<sub>5</sub>), 4.42 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 3.41 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6), 2.81 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.68–2.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), and 1.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172.2 (C), 170.4 (C), 165.9 (C), 143.6 (C), 142.4 (C), 138.5 (C), 138.4 (C), 132.7 (C), 129.0 (2×CH), 128.9 (CH), 128.8 (2×CH), 128.6 (CH), 127.7 (2×CH), 127.0 (2×CH), 120.7 (CH), 115.6 (CH), 115.4 (CH), 79.8 (CH), 65.0 (C), 63.4 (CH<sub>2</sub>), 62.8 (CH), 59.7 (CH), 39.4 (CH<sub>2</sub>), 35.5 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH<sub>2</sub>) and 15.5 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3433 (OH), 1794 (CO) and 1735 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 580$  (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>9</sub>S (MH<sup>+</sup>): 580.1636; found, 580.1630.

### 7.49 Compound 47

It was prepared following the general procedure for the synthesis of sodium salts described on page 161 using: ester **171** (97 mg, 0.18 mmol), *m*-cresol (1.2 mL) and NaHCO<sub>3</sub> (2.8 mL, 70 mM). Eluent for chromatography: gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (0:100); 2) (10:90)]. Yield = 52 mg (74%). White solid.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +38.6$  (c1.0, H<sub>2</sub>O). Mp: 182–184 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 7.73 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, ArH), 7.45 (dt,  $J = 1.2$  and 8.4 Hz, 1H, ArH), 6.90 (s, 1H, ArH), 6.85 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, ArH), 5.03 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 4.86 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, OCHH), 4.77 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, OCHH), 4.44 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 3.70 (dd,  $J = 4.3$  and 16.7 Hz, 1H, CHH-6), 3.44 (d,  $J = 16.6$  Hz, 1H, CHH-6) and 1.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 174.3 (C), 172.1

(C), 168.6 (C), 159.5 (C), 136.4 (CH), 130.4 (CH), 120.1 (CH), 117.0 (CH), 111.7 (C), 65.5 (C), 64.4 (CH<sub>2</sub>), 62.3 (CH), 61.8 (CH), 37.4 (CH<sub>2</sub>) and 15.4 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3307 (OH), 1772 (CO), 1680 (CO) and 1613 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z$  = 370 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>8</sub>S (MH<sup>+</sup>): 370.0591; found, 370.0590.

### 7.50 Compound 48

It was prepared following the general procedure for the synthesis of sodium salts described on page 161 using: ester **172** (85 mg, 0.15 mmol), *m*-cresol (0.9 mL) and NaHCO<sub>3</sub> (2.3 mL, 70 mM). Eluent for chromatography: gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (0:100); 2) (30:70)]. Yield = 32 mg (51%). White solid.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +31.5$  (c1.0, H<sub>2</sub>O). Mp: 179–181 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 7.61 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H, ArH), 7.36 (dd,  $J$  = 2.6 and 9.0 Hz, 1H, ArH), 6.82 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H, ArH), 5.05 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H, H5), 4.90 (d,  $J$  = 12.0 Hz, 1H, OCHH), 4.80 (d,  $J$  = 12.0 Hz, 1H, OCHH), 4.44 (s, 1H, H2), 3.71 (dd,  $J$  = 4.3 and 16.6 Hz, 1H, CHH-6), 3.46 (d,  $J$  = 16.6 Hz, 1H, CHH-6) and 1.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 174.3 (C), 172.0 (C), 167.3 (C), 158.4 (C), 135.9 (CH), 129.3 (CH), 124.0 (C), 118.9 (CH), 112.7 (C), 65.5 (C), 64.8 (CH<sub>2</sub>), 62.4 (CH), 61.7 (CH), 37.4 (CH<sub>2</sub>) and 15.4 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3386 (OH), 1771 (CO), 1682 (CO) and 1611 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z$  = 404 (MH<sup>+</sup>-Na). HRMS calcd para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>ClNO<sub>8</sub>S (MH<sup>+</sup>-Na): 404.0201; found, 404.0202.

### 7.51 Compound 49

It was prepared following the general procedure for the synthesis of sodium salts described on page 161 using: ester **173** (162 mg, 0.30 mmol), *m*-cresol (1.9 mL) and NaHCO<sub>3</sub> (4.6 mL, 70 mM). Eluent for chromatography: gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (0:100); 2) (5:95)]. Further purifications were required that were performed with the free acid. Thus, the resulting sodium salt was dissolved in Milli-Q water and acidified with HCl (0.01 M) until pH = 4 and then purified by a MCI GEL<sup>®</sup> CHP<sub>2</sub>OP column (Mitsubishi chemical corporation), eluting with a gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (0:100); 2) (30:70)], to afford **49** (10.4 mg, 9%) as a free

acid and as a white solid.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +48.7$  ( $c$ 1.0,  $\text{H}_2\text{O}$ ). Mp: 184–185 °C (dec.).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 8.14 (d,  $J = 4.3$  Hz, 1H, ArH), 7.57 (dd,  $J = 4.4$  and 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.48 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, ArH), 5.04 (m, 2H, H5+OCHH), 4.94 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H, OCHH), 4.48 (s, 1H, H2), 3.65 (dd,  $J = 4.3$  and 16.7 Hz, 1H, CHH-6), 3.40 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H, CHH-6) and 1.63 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 174.2 (C), 172.1 (C), 166.7 (C), 157.6 (C), 141.0 (CH), 130.4 (CH), 129.2 (C), 127.8 (CH), 65.7 (C), 63.9 ( $\text{CH}_2$ ), 62.4 (CH), 61.5 (CH), 37.5 ( $\text{CH}_2$ ) and 15.3 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. FTIR (ATR): 3393 (OH), 1779 (CO) and 1619 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z = 369$  (M–H). HRMS calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$  (M–H): 369.0398; found, 369.0401. For the biological studies, the sodium salt was obtained by treatment of an aqueous solution of the free acid in Milli-Q water with  $\text{NaHCO}_3$  (2.3 mg, 0.028 mmol) followed by purification by a MCI GEL® CHP<sub>2</sub>OP column, eluting with a gradient of ethanol/Milli-Q water from (0:100) to (10:90), to afford **49** (5.5 mg, 50%) as sodium salt and as a white solid.

## 7.52 Compound 50

It was prepared following the general procedure for the synthesis of sodium salts described on page 161 using: ester **174** (172 mg, 0.32 mmol), *m*-cresol (2.0 mL) and  $\text{NaHCO}_3$  (1.7 mL, 70 mM). The resulting sodium salt was dissolved in Milli-Q water and acidified with HCl (0.1 M) until pH = 4 and then purified by a MCI GEL® CHP<sub>2</sub>OP column, eluting with a gradient of ethanol/Milli-Q water from (0:100) to (50:50), to afford **50** (30 mg, 25%) as a free acid and as a yellow solid. The resulting acid (30 mg, 0.081 mmol) was treated with  $\text{NaHCO}_3$  (1.5 mL, 49 mM) and purified by a MCI GEL® CHP<sub>2</sub>OP column, eluting with a gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (0:100); (10:90)], to afford **50** (10 mg, 23%) as a sodium salt and as a yellow solid.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +42.3$  ( $c$ 0.7,  $\text{H}_2\text{O}$ ). Mp: 191–193 °C (dec.).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 8.21 (s, 1H, ArH), 7.99 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, ArH), 5.01 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H, H5), 4.91 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H OCHH), 4.81 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, OCHH), 4.43 (s, 1H, H2), 3.64 (dd,  $J = 4.3$  and 16.7 Hz, 1H, CHH-6), 3.39 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H, CHH-6) and 1.61 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 174.2 (C), 172.0 (C), 166.1 (C),

140.1 (CH), 137.4 (CH), 123.8 (CH), 121.0 (C), 65.4 (C), 64.6 (CH<sub>2</sub>), 62.3 (CH), 61.5 (CH), 37.4 (CH<sub>2</sub>) and 15.3 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3302 (OH), 1777 (CO) and 1620 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z$  = 371 (M-Na+2H). HRMS calcd for C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S (M-Na+2×H<sup>+</sup>): 371.0544; found, 371.0543.

### 7.53 Compound 51

It was prepared following the general procedure for the synthesis of sodium salts described on page 161 using: ester **175** (143 mg, 0.26 mmol), *m*-cresol (1.6 mL) and NaHCO<sub>3</sub> (4.7 mL, 60 mM). Eluent for chromatography: Milli-Q water. Yield = 33 mg (31%). Beige solid.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = +20.7 (c0.8, H<sub>2</sub>O). Mp: 187–188 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 7.36 (dd,  $J$  = 1.5 and 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.32 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, ArH), 6.80 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 4.95 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 1H, H5), 4.77 (d,  $J$  = 12.1 Hz, 1H OCHH), 4.65 (d,  $J$  = 12.1 Hz, 1H, OCHH), 4.38 (s, 1H, H2), 3.60 (dd,  $J$  = 4.2 and 16.7 Hz, 1H, CHH-6), 3.36 (d,  $J$  = 16.7 Hz, 1H, CHH-6) and 1.56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 174.3 (C), 172.1 (C), 166.6 (C), 149.8 (C), 143.6 (C), 123.7 (CH), 120.2 (C), 116.8 (CH), 115.4 (CH), 65.7 (C), 64.0 (CH<sub>2</sub>), 62.2 (CH), 61.7 (CH), 37.3 (CH<sub>2</sub>) and 15.3 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3202 (OH), 1779 (CO), 1702 (CO) and 1602 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z$  = 408 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>9</sub>SNa (MH<sup>+</sup>): 408.0360; found, 408.0363.

### 7.54 Compound 52

It was prepared following the general procedure for the synthesis of sodium salts described on page 161 using: ester **176** (198 mg, 0.35 mmol), *m*-cresol (2.2 mL) and NaHCO<sub>3</sub> (5.4 mL, 70 mM). The resulting residue was dissolved in Milli-Q water and acidified with HCl (0.1 M) until pH = 4 and then purified by a MCI GEL® CHP<sub>2</sub>OP column, eluting with Milli-Q water, to afford **52** (46 mg, 33%) as the free acid and as a white solid.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = +75.9 (c0.7, acetone). Mp: 218–219 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 6.85 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, ArH), 6.83 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.71 (dd,  $J$  = 2.0 and 8.1 Hz, 1H, ArH), 4.94 (dd,  $J$  = 1.5 and 4.2 Hz, 1H, H5), 4.69 (d,  $J$  =

12.3 Hz, 1H, OCHH), 4.53 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H, OCHH), 4.34 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 3.61 (dd,  $J = 4.4$  and  $16.7$  Hz, 1H, CHH-6), 3.61 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 3.35 (dd,  $J = 1.4$  and  $16.7$  Hz, 1H, CHH-6) and 1.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 174.0 (C), 173.5 (C), 172.1 (C), 143.9 (C), 143.1 (C), 126.0 (C), 121.8 (CH), 117.2 (CH), 116.1 (CH), 65.5 (C), 63.9 (CH<sub>2</sub>), 62.5 (CH), 61.5 (CH), 39.5 (CH<sub>2</sub>), 37.6 (CH<sub>2</sub>) and 15.1 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3399 (OH), 1775 (CO) and 1735 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z = 398$  (M-H). HRMS calcd for C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>9</sub>S (M-H): 398.0551; found, 398.0547. For the biological studies, the sodium salt was obtained by treatment of an aqueous solution of the free acid in Milli-Q water with NaHCO<sub>3</sub> (8.7 mg, 0.10 mmol) followed by purification by a MCI GEL<sup>®</sup> CHP<sub>2</sub>OP column, eluting with a gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (0:100); 2) (20:80)], to afford **52** (8.7 mg, 18%) as a sodium salt and a white solid.

### 7.55 Compound 53

It was prepared following the general procedure for the synthesis of sodium salts described on page 161 using: ester **177** (86 mg, 0.15 mmol), *m*-cresol (0.9 mL) and NaHCO<sub>3</sub> (2.3 mL, 70 mM). The resulting residue was dissolved in Milli-Q water and acidified with HCl (0.1 M) until pH = 4 and then purified by a MCI GEL<sup>®</sup> CHP<sub>2</sub>OP column, eluting with a gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (0:100); 2) (50:50)], to afford the acid **53** (20 mg, 33%) as a yellow solid. A solution of the acid **53** (20 mg, 0.049 mmol) in Milli-Q water was treated with a solution of NaHCO<sub>3</sub> (1.2 mL, 37 mM) and then purified by a MCI GEL<sup>®</sup> CHP<sub>2</sub>OP column, eluting with a gradient of ethanol/Milli-Q water [1] (0:100); 2) (10:90)], to give **53** (20 mg, 31%) as a sodium salt and a white solid.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +73.8$  (c1.0, H<sub>2</sub>O). Mp: 176–177 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 6.79 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 6.74 (s, 1H, ArH), 6.63 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 4.91 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 4.58 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H OCHH), 4.43 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H, OCHH), 4.29 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 3.59 (dd,  $J = 3.5$  and  $16.7$  Hz, 1H, CHH-6), 3.33 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H, CHH-6), 2.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) and 1.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 174.5 (C), 174.0 (C), 172.0 (C), 143.8 (C), 142.1 (C), 133.0 (C), 120.4 (CH), 116.1 (CH), 116.0 (CH), 65.4 (C), 63.9 (CH<sub>2</sub>), 62.4 (CH), 61.7

(CH), 37.5 (CH<sub>2</sub>), 35.3 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>) and 14.8 (CH<sub>3</sub>) ppm. FTIR (ATR): 3340 (OH), 1774 (CO), 1732 (CO) and 1615 (CO) cm<sup>-1</sup>. MS (ESI)  $m/z$  = 436 (MH<sup>+</sup>). HRMS calcd for C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>Na (MH<sup>+</sup>): 436.0673; found, 436.0673.

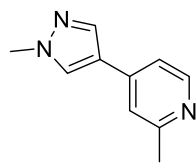




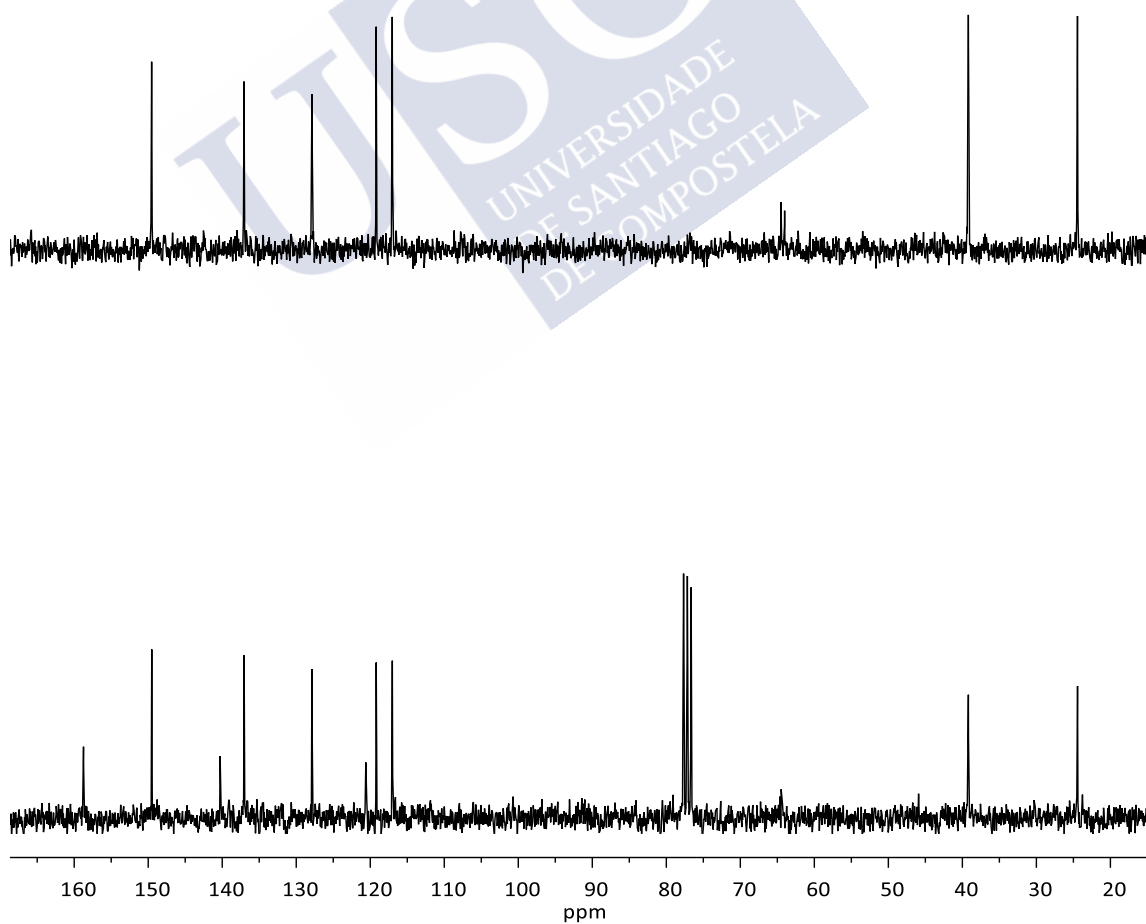
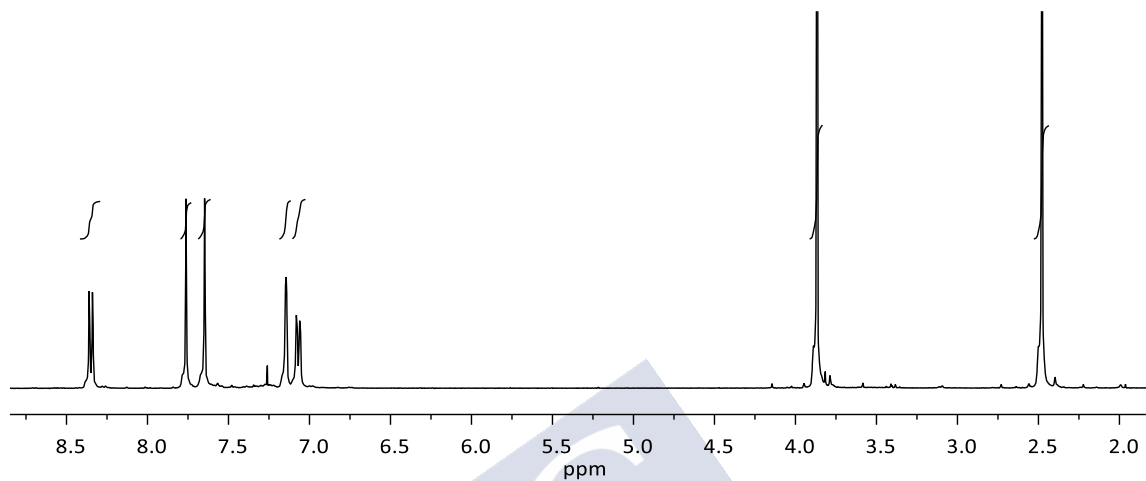
ANEXO I  
*Espectros de RMN*

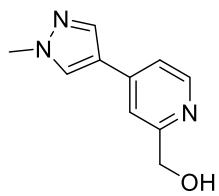
---



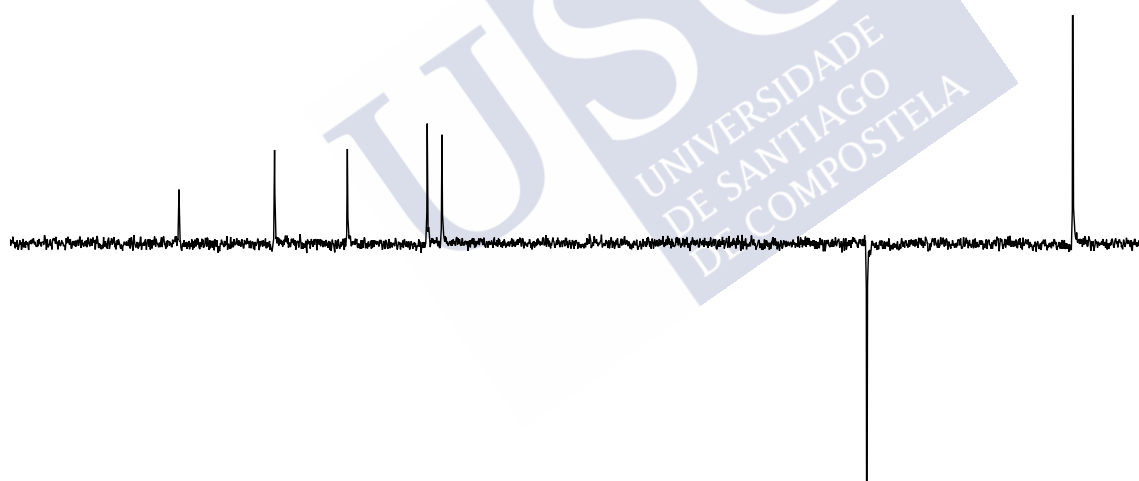
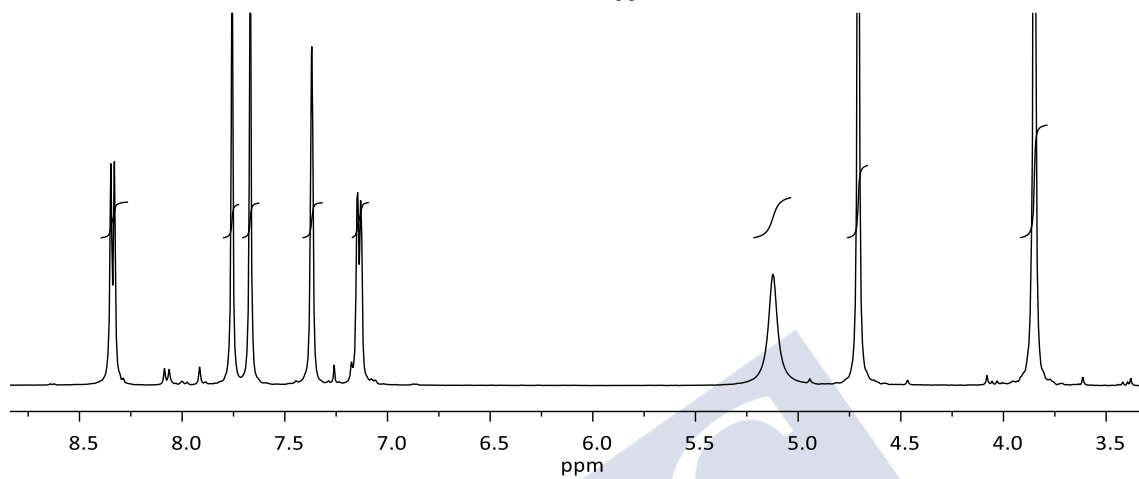


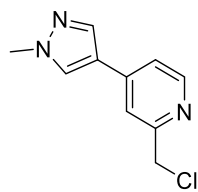
64



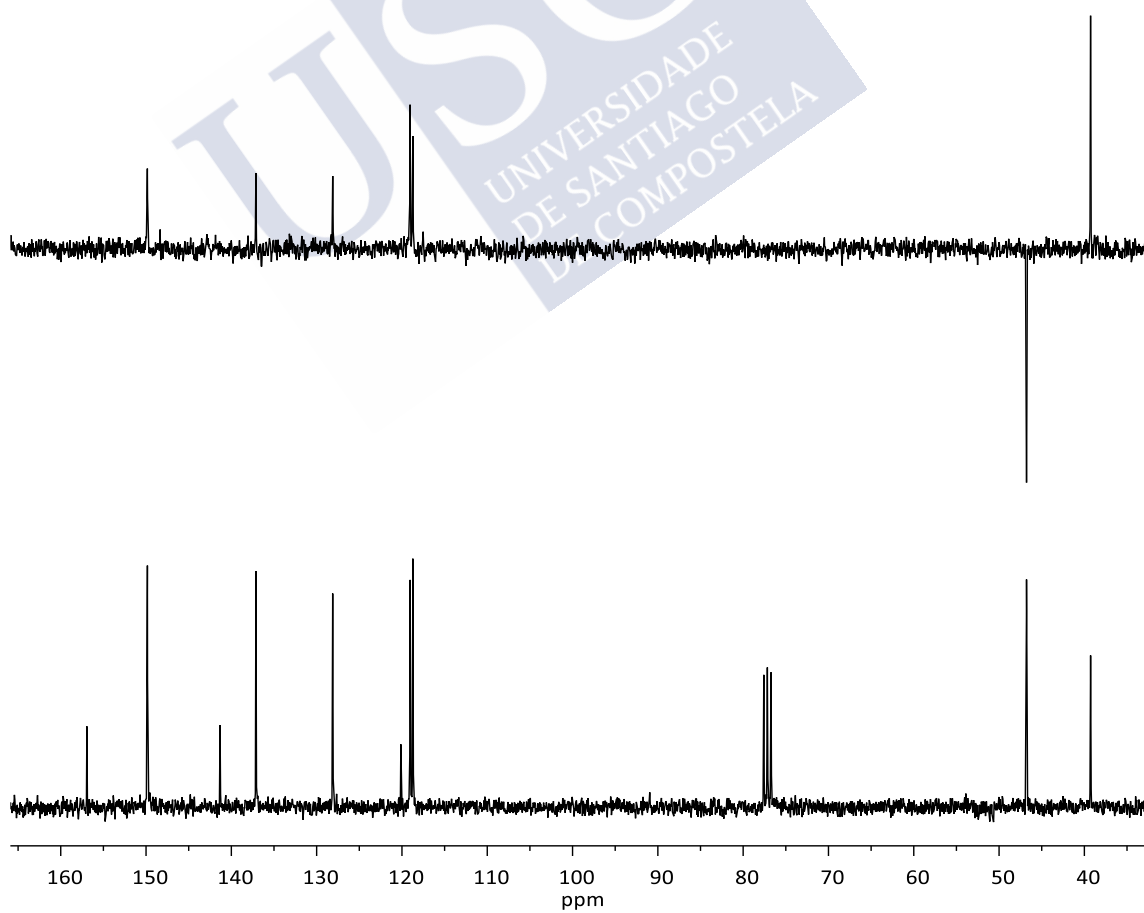
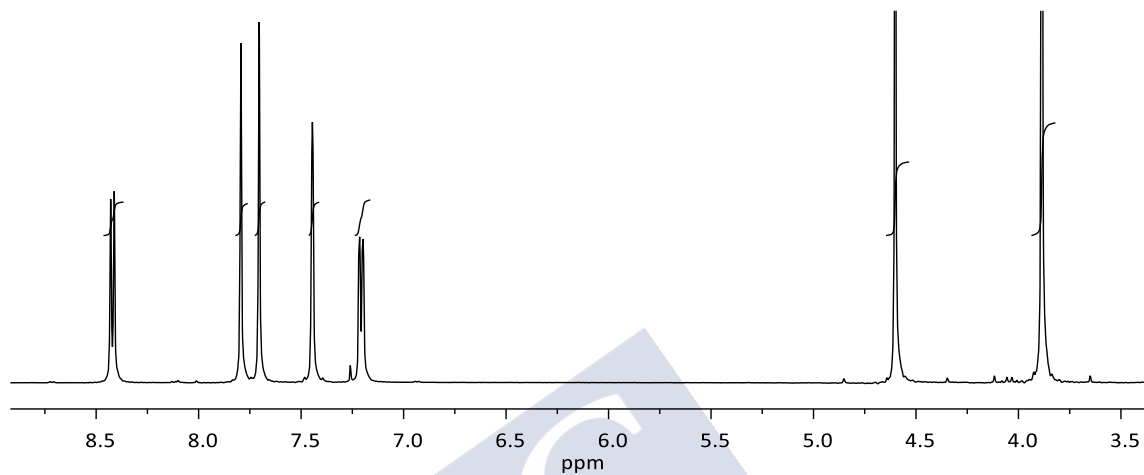


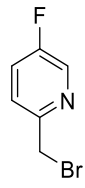
65



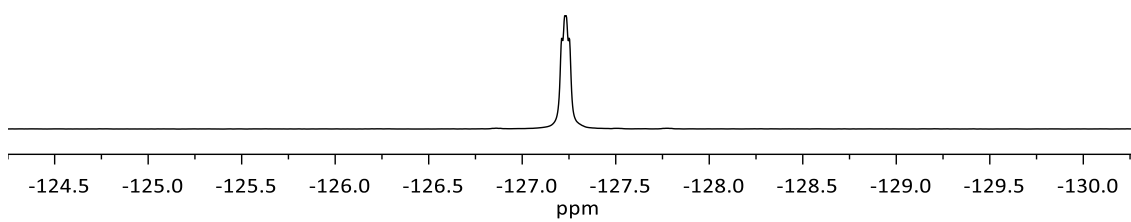
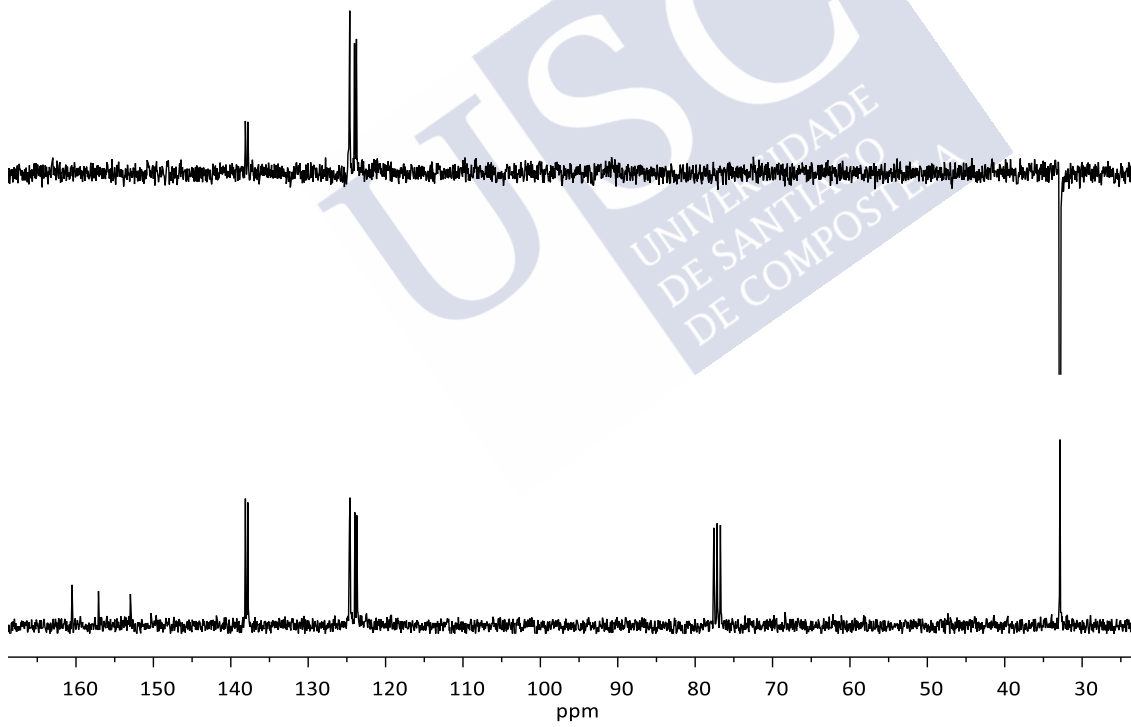
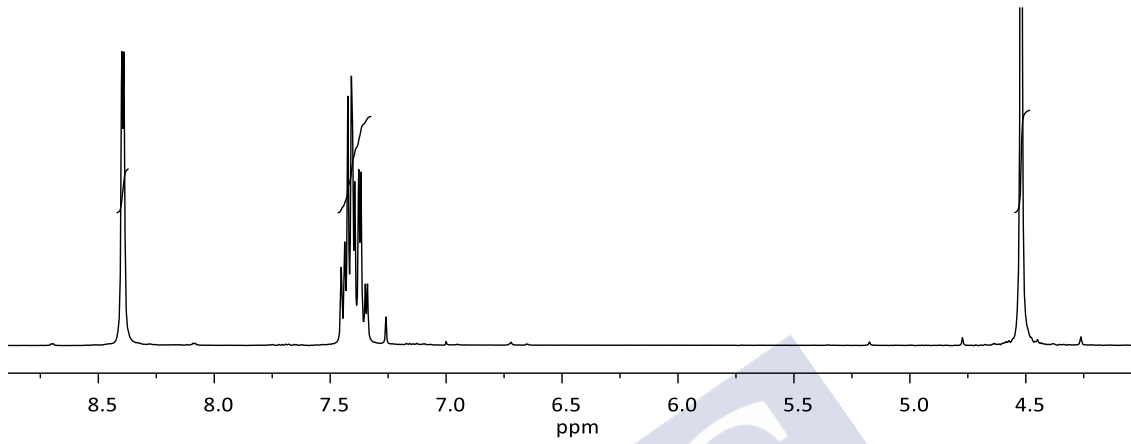


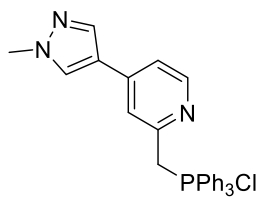
66



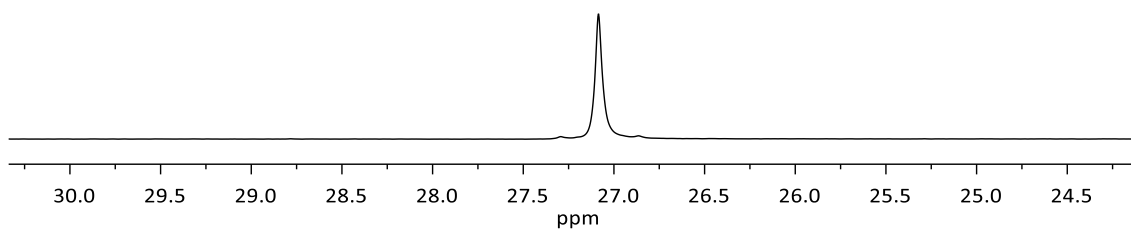
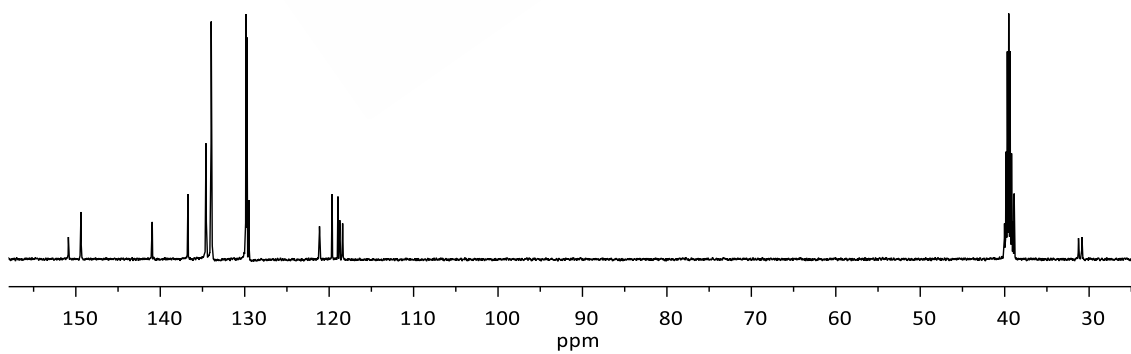
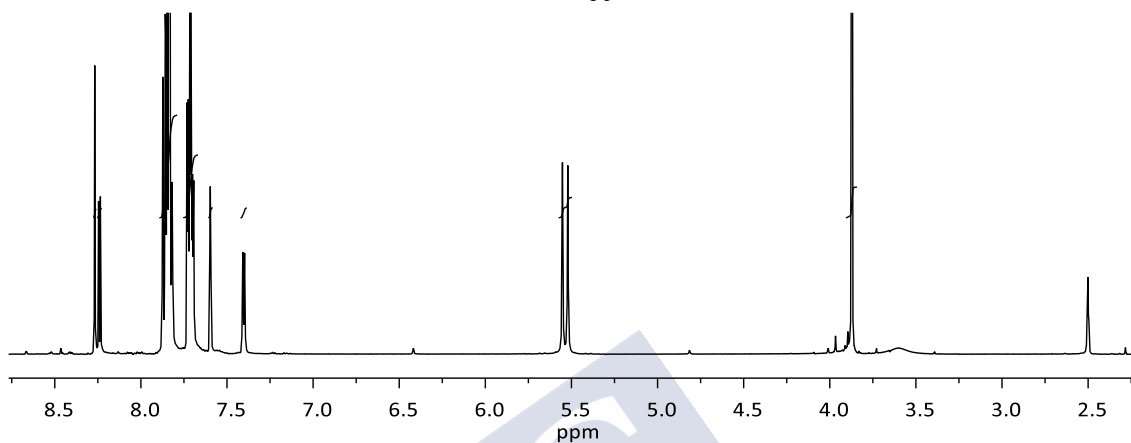


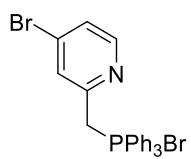
69



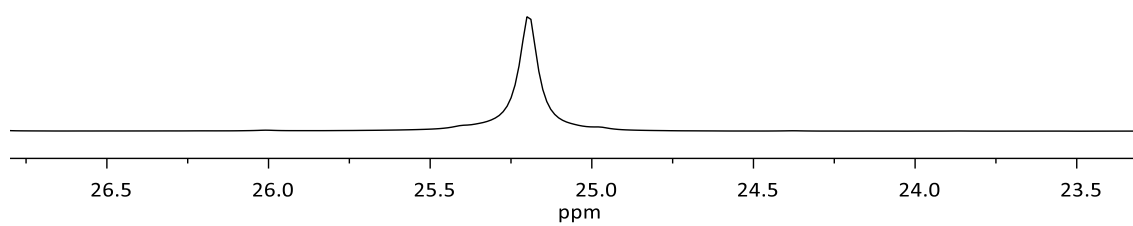
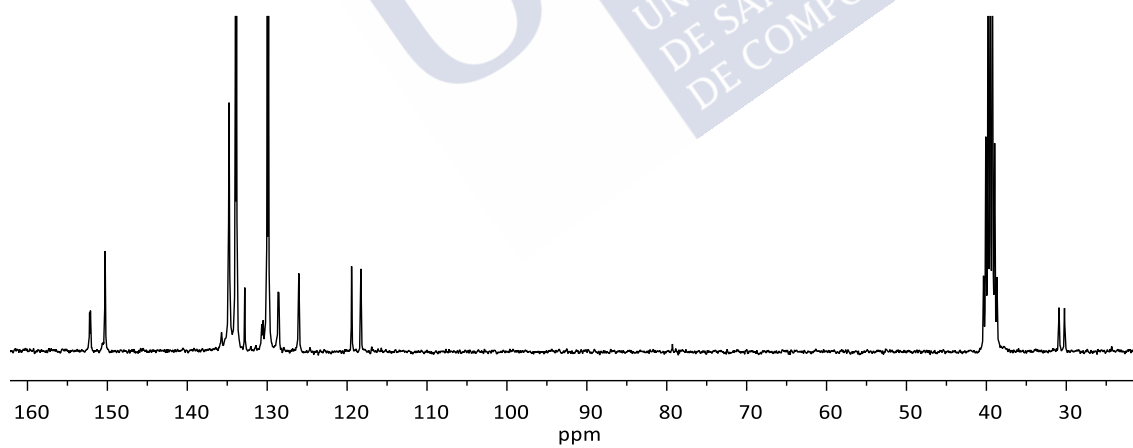
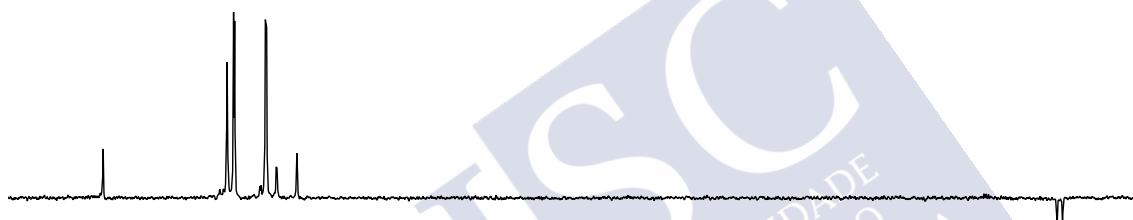
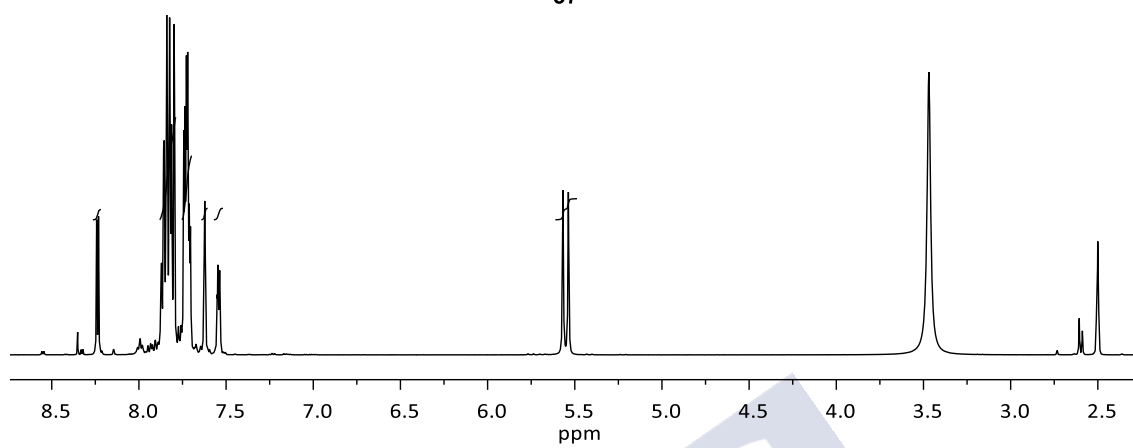


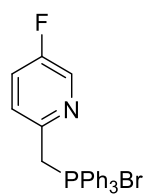
56



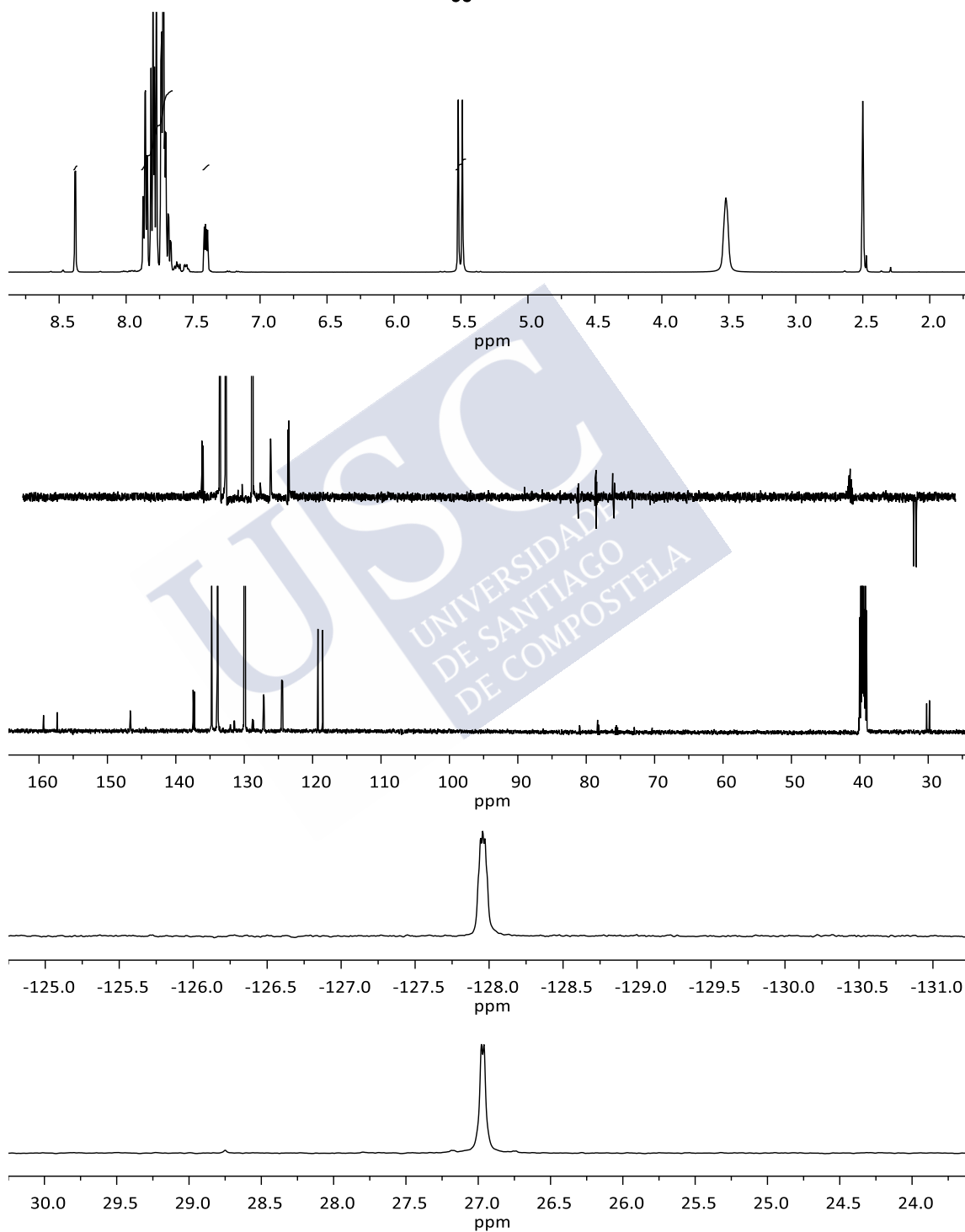


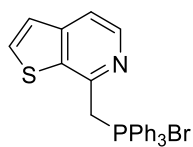
57



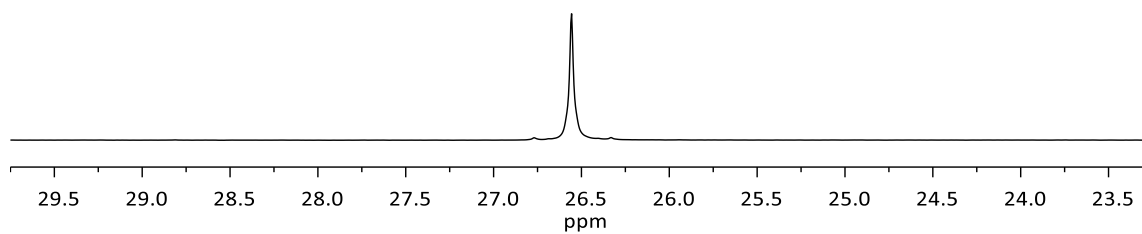
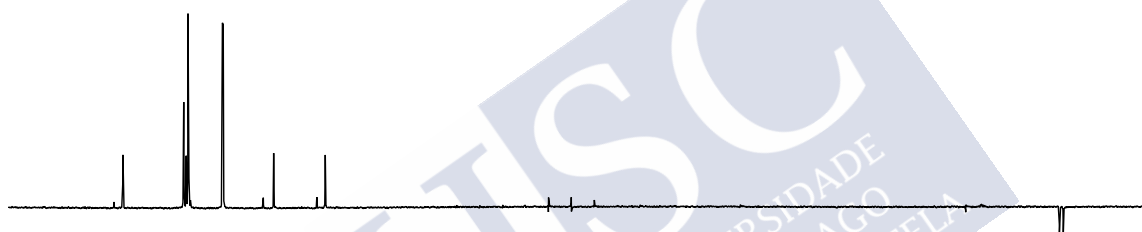
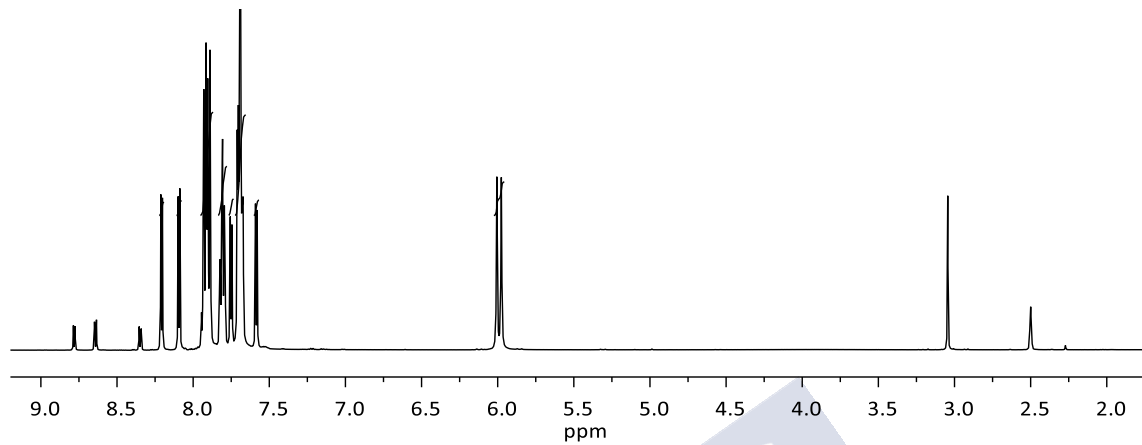


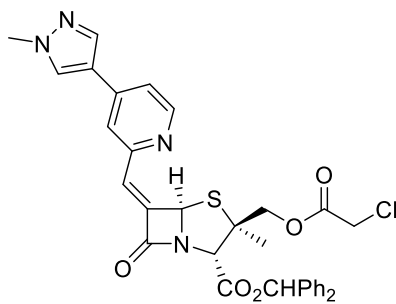
58



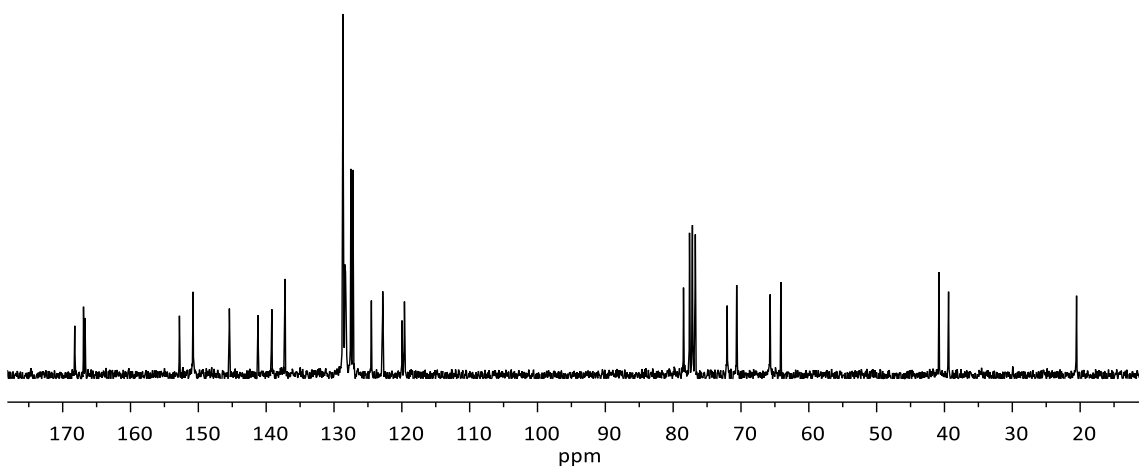
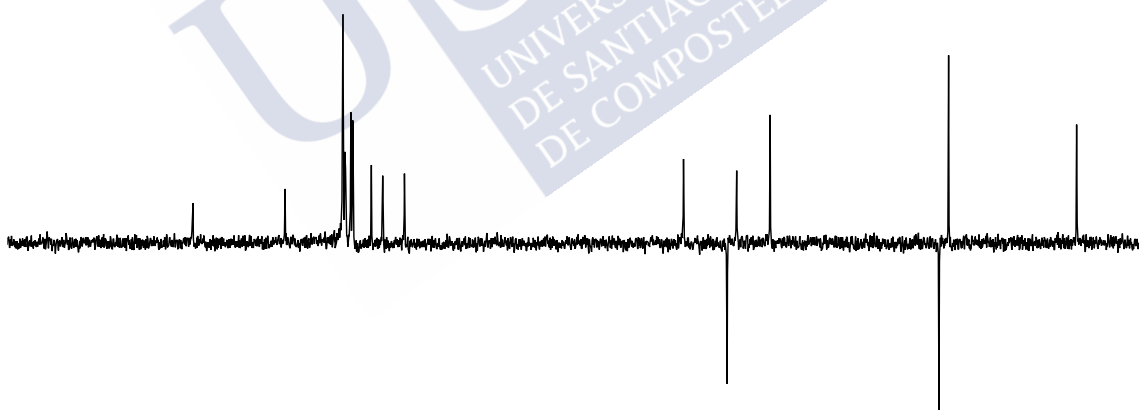
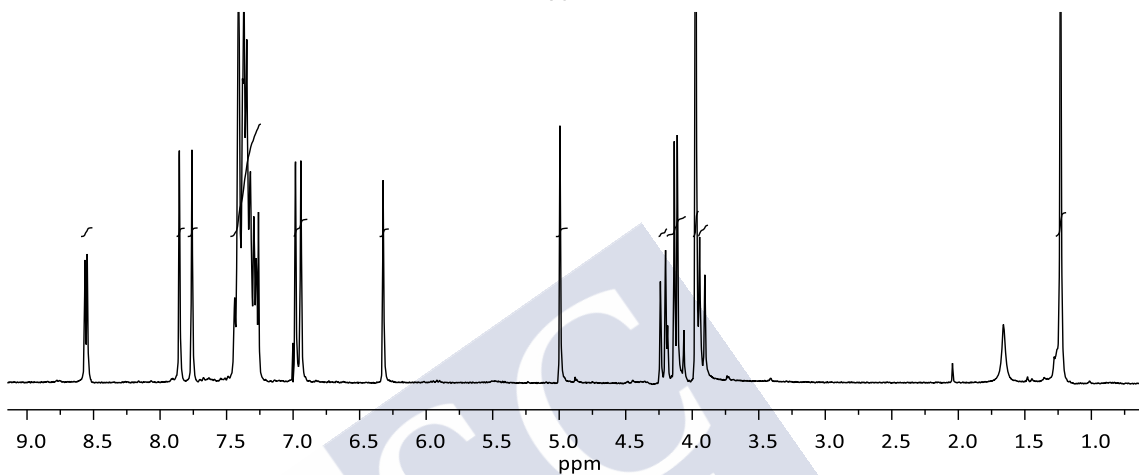


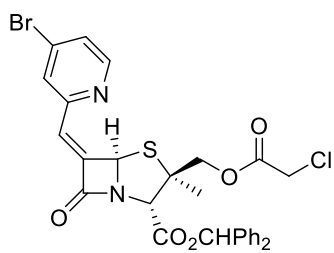
59



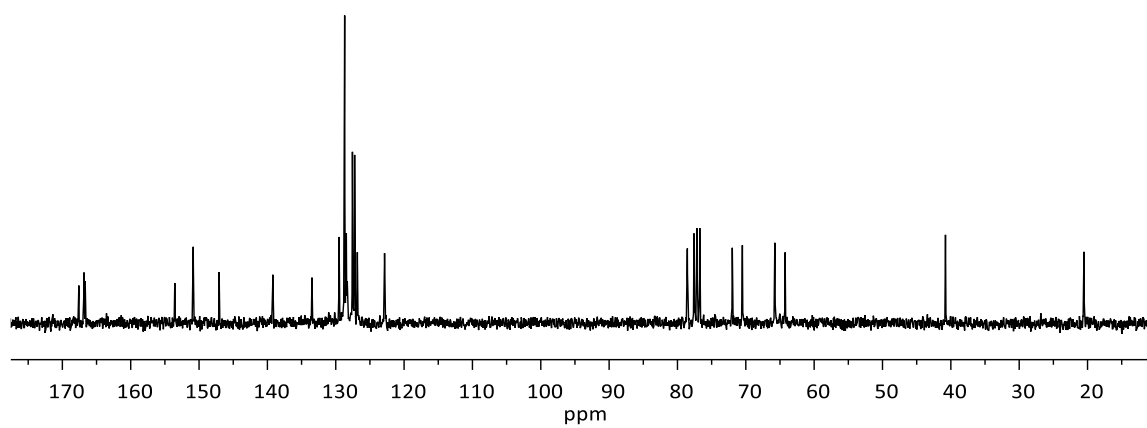
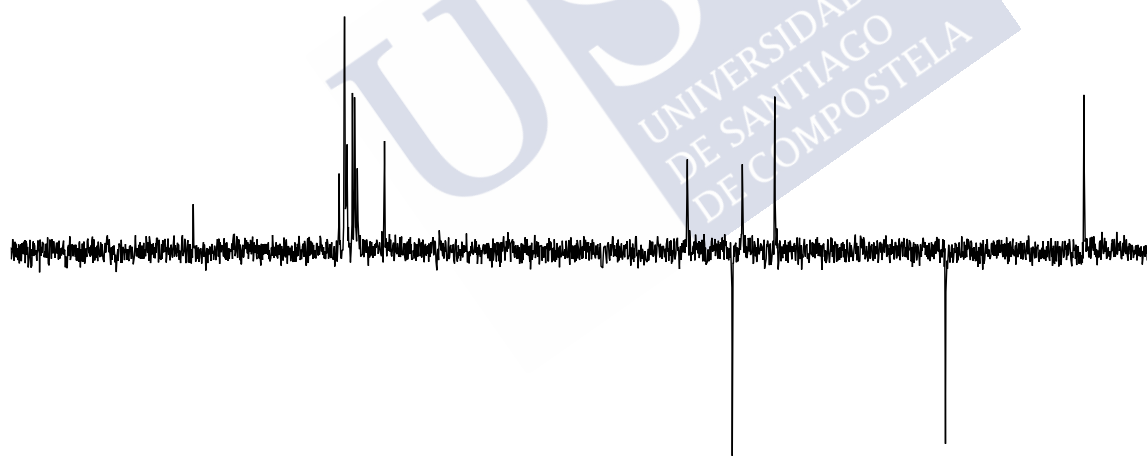
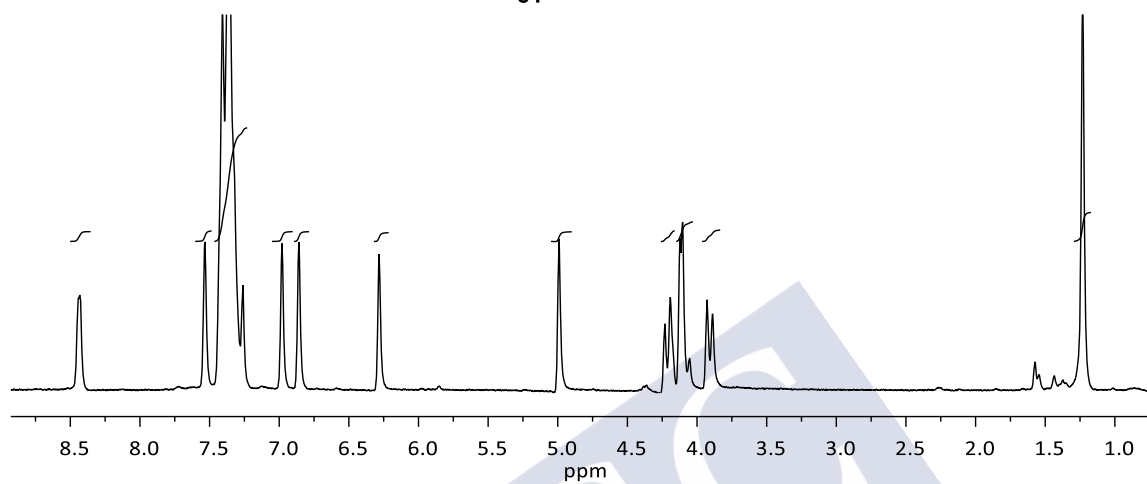


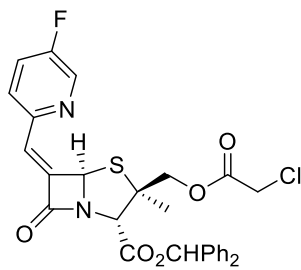
80



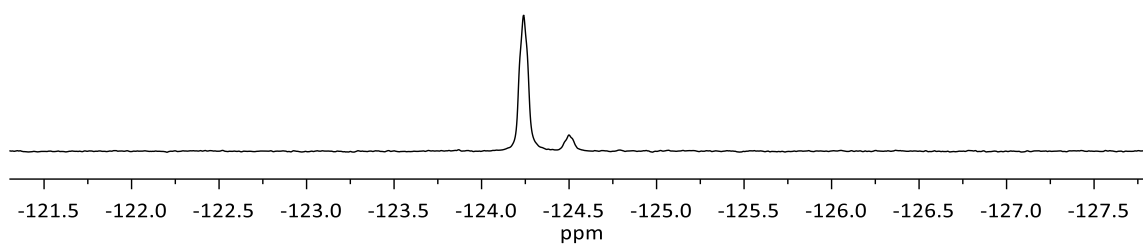
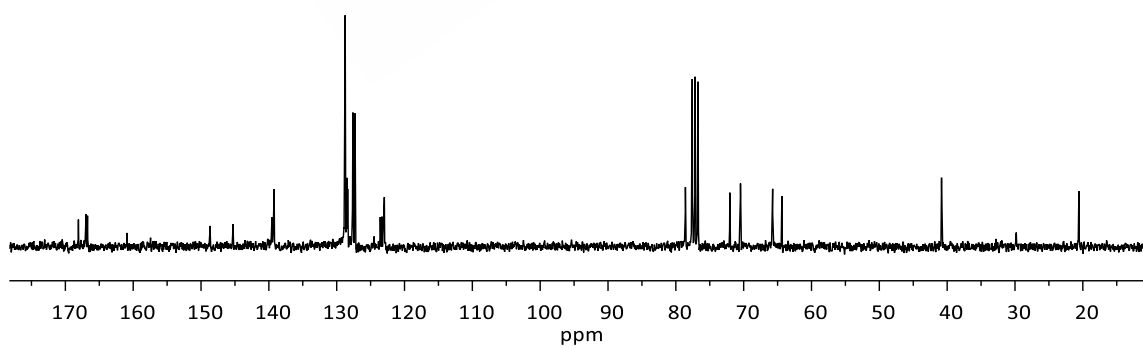
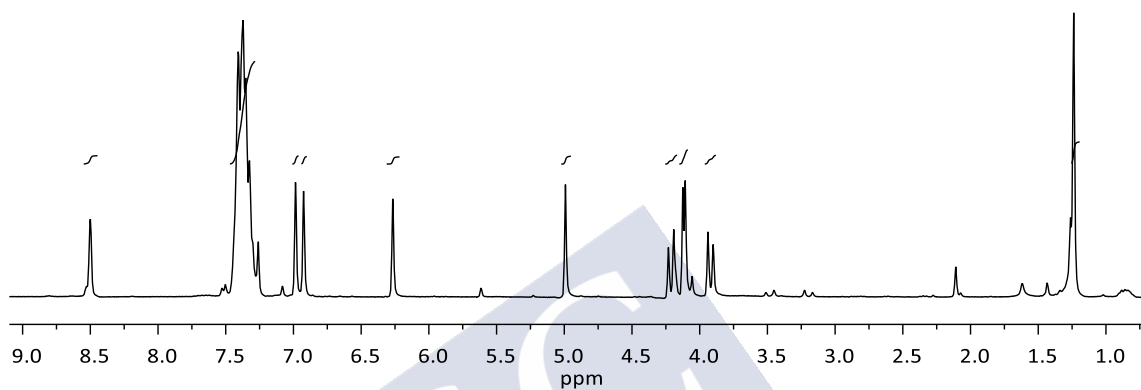


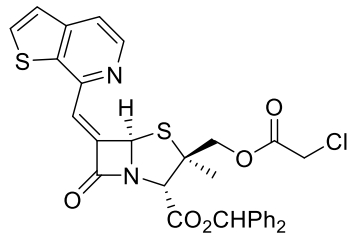
81



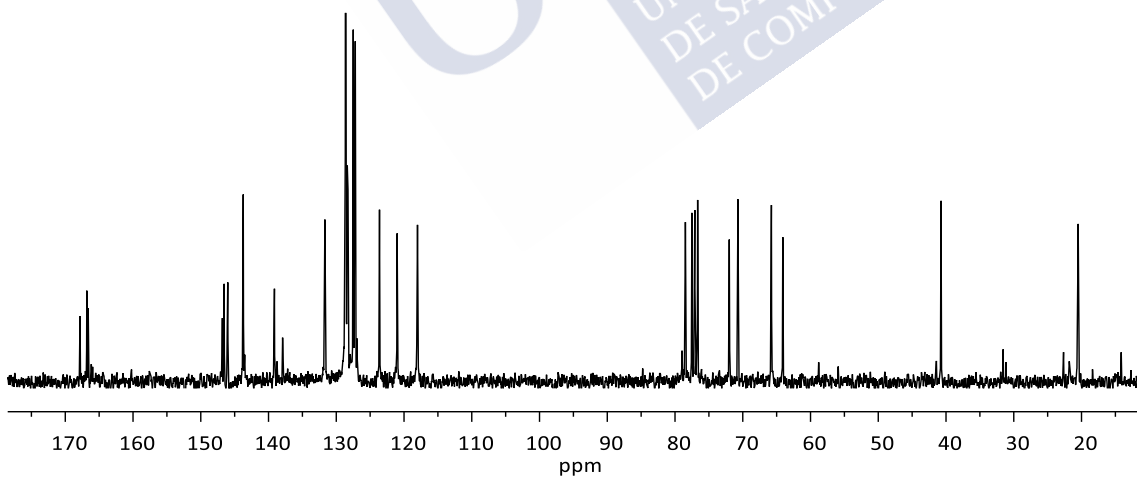
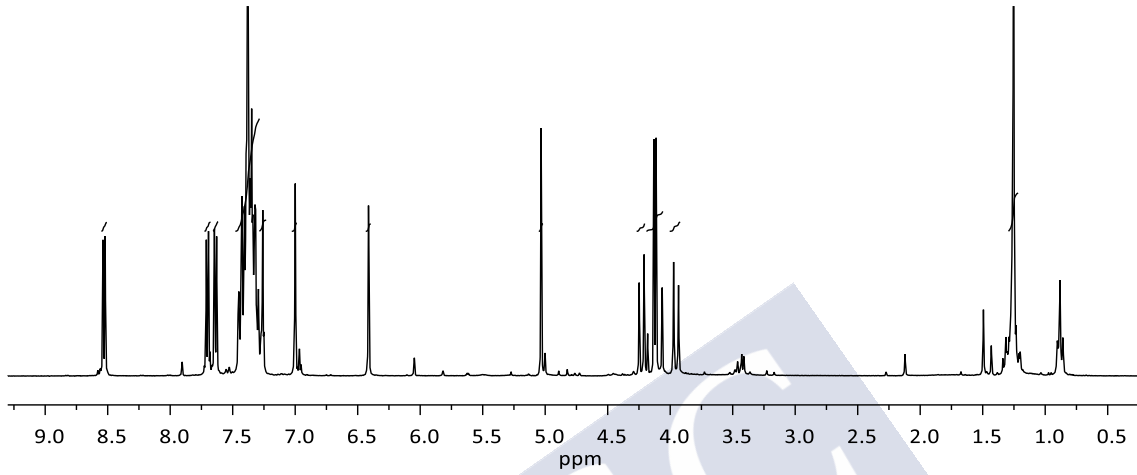


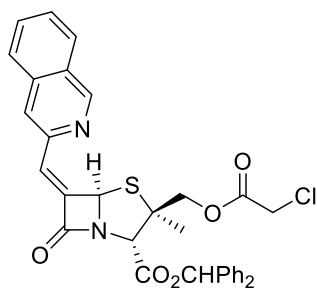
82



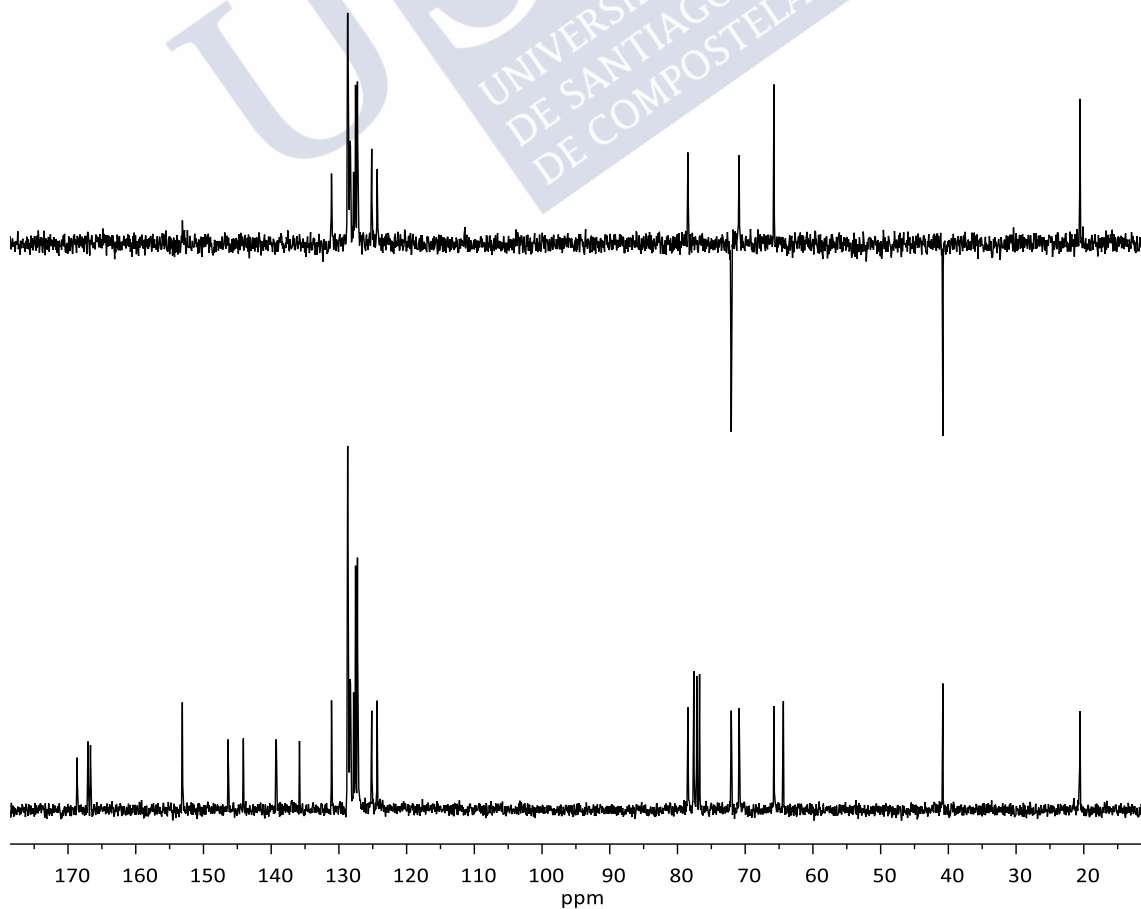
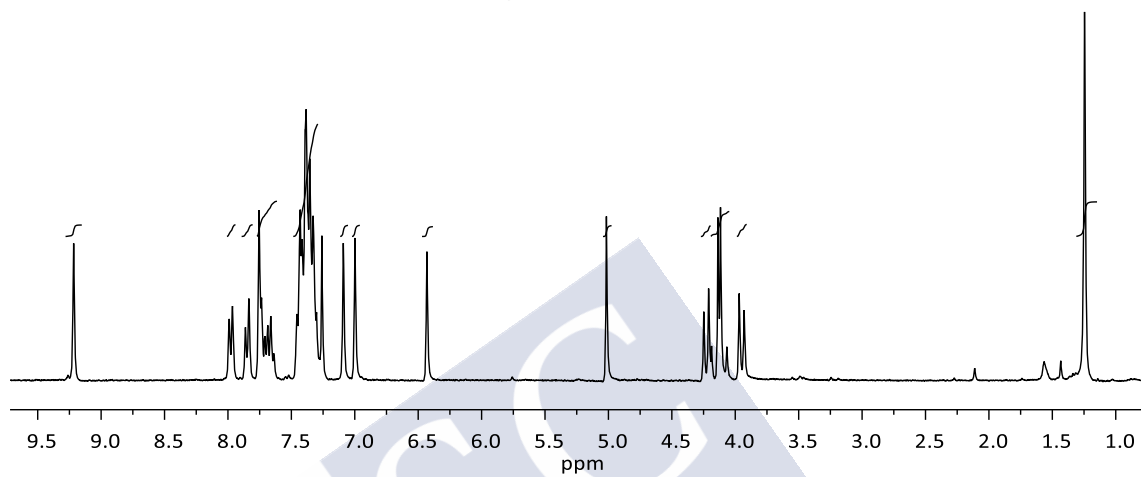


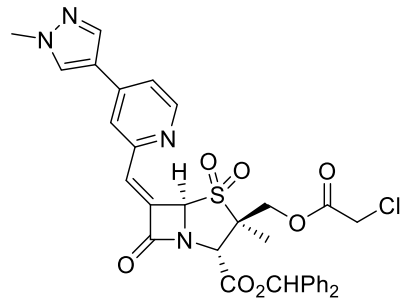
83



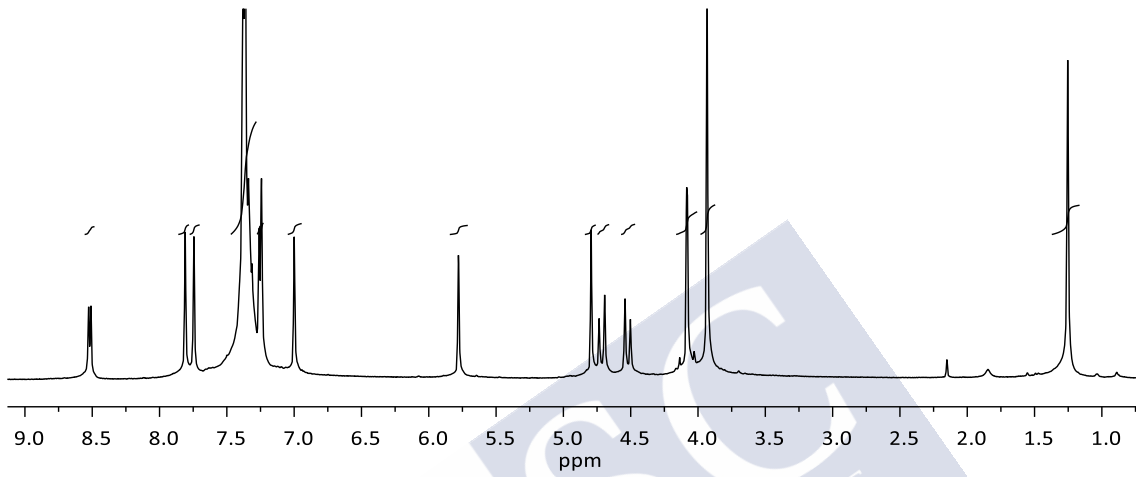


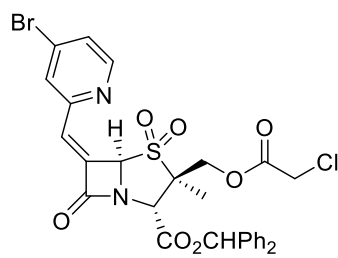
84



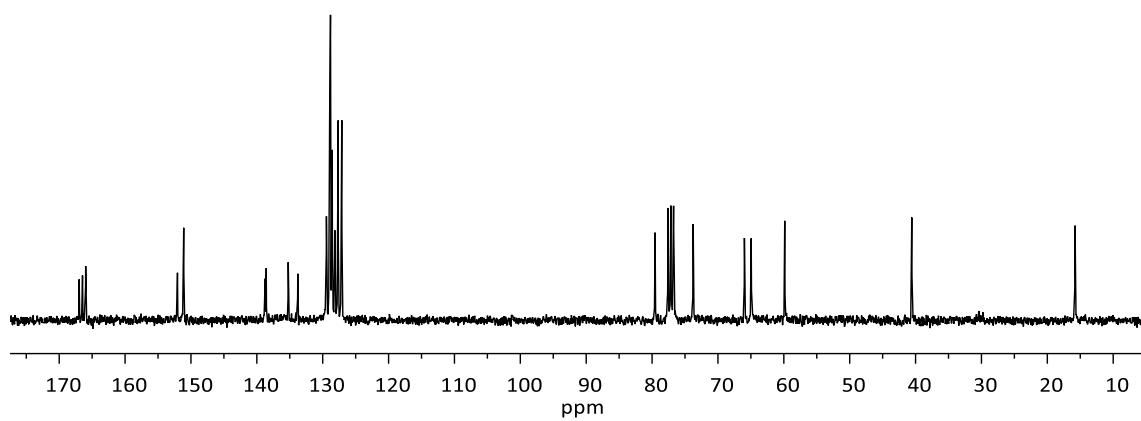
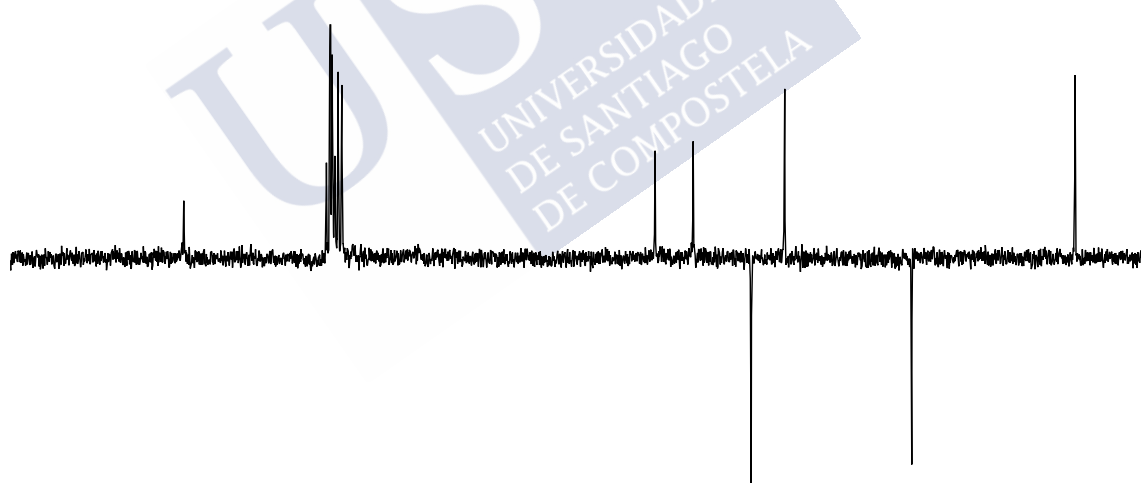
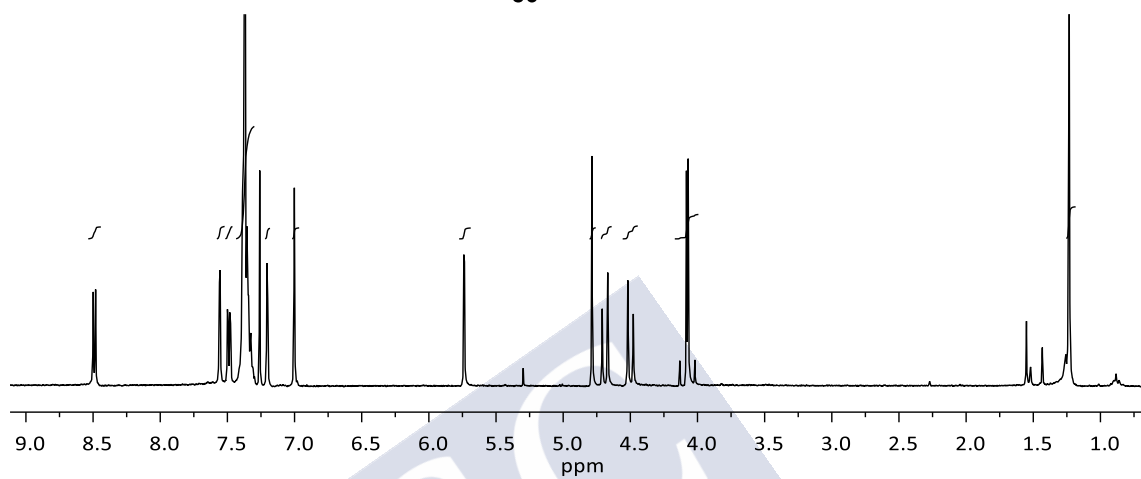


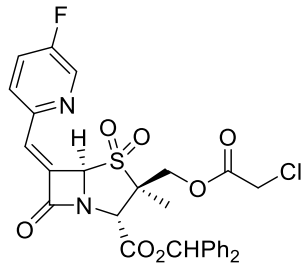
85



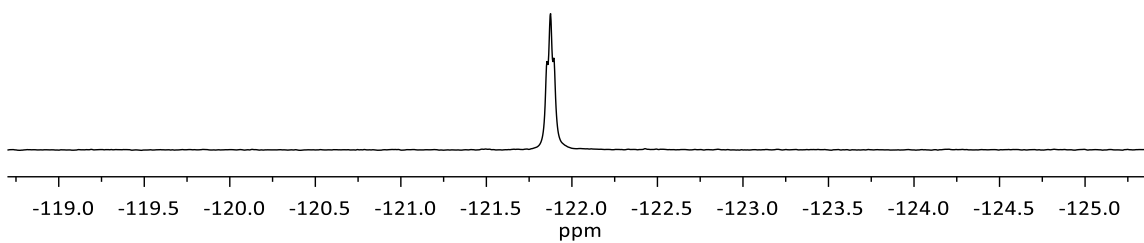
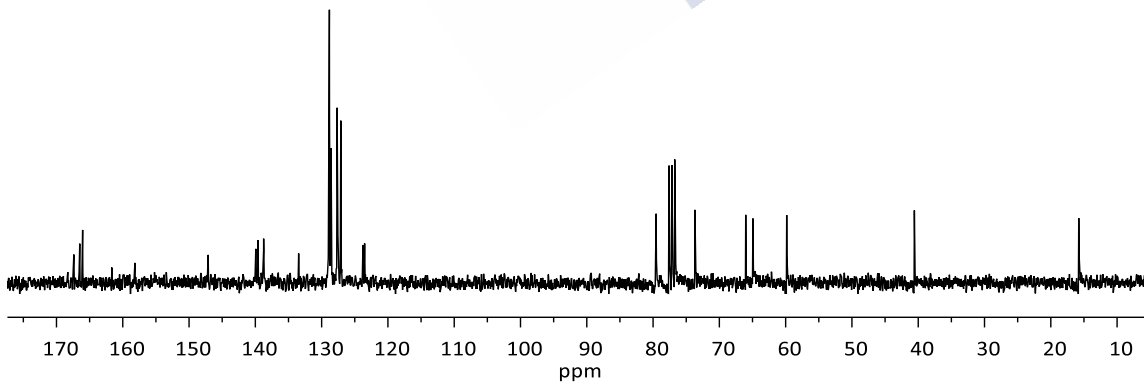
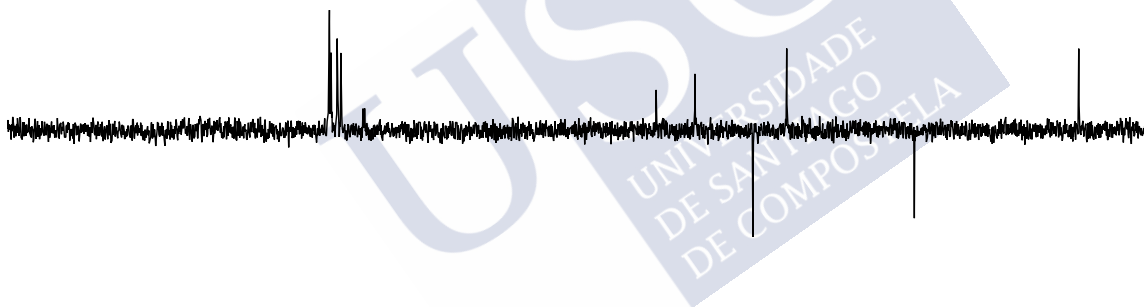
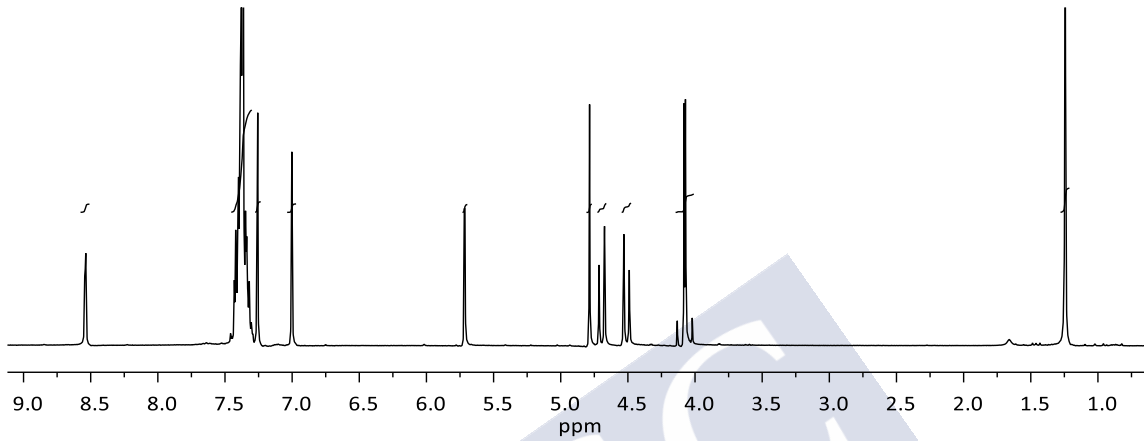


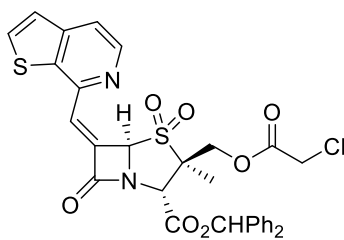
86



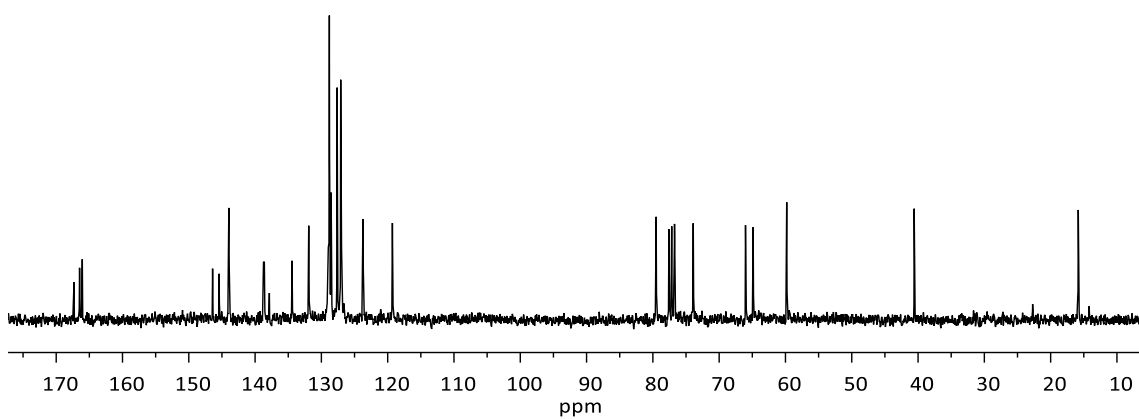
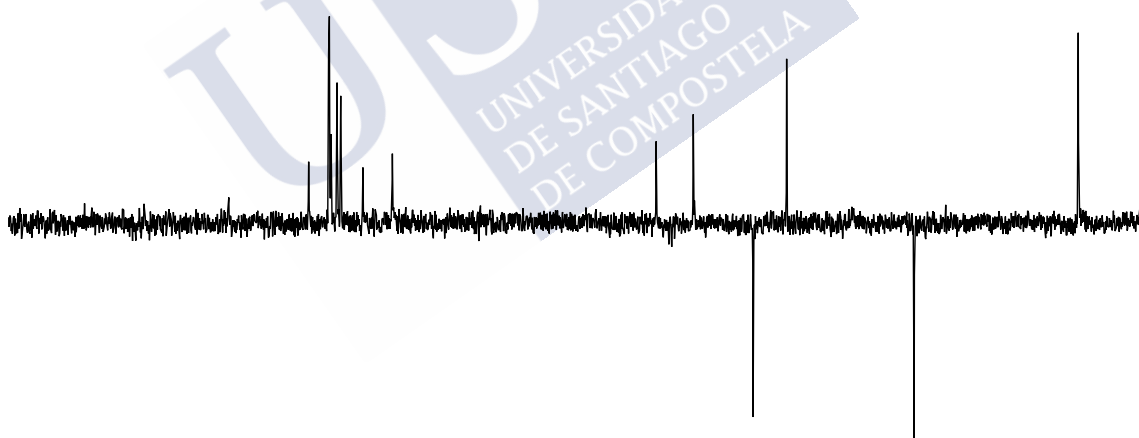
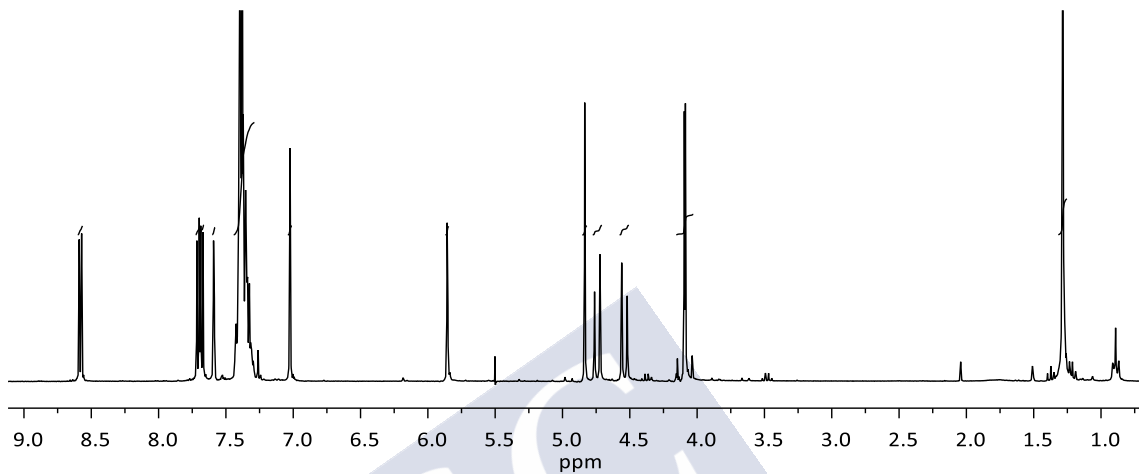


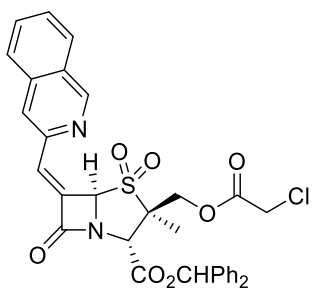
87



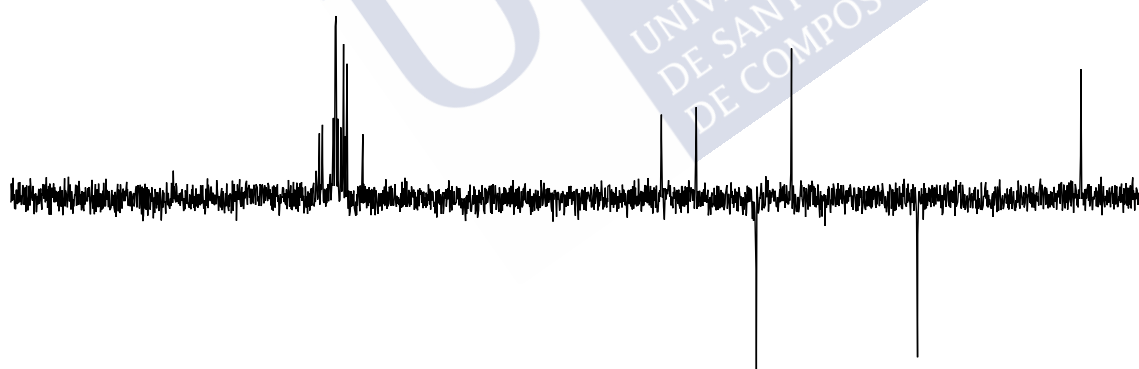
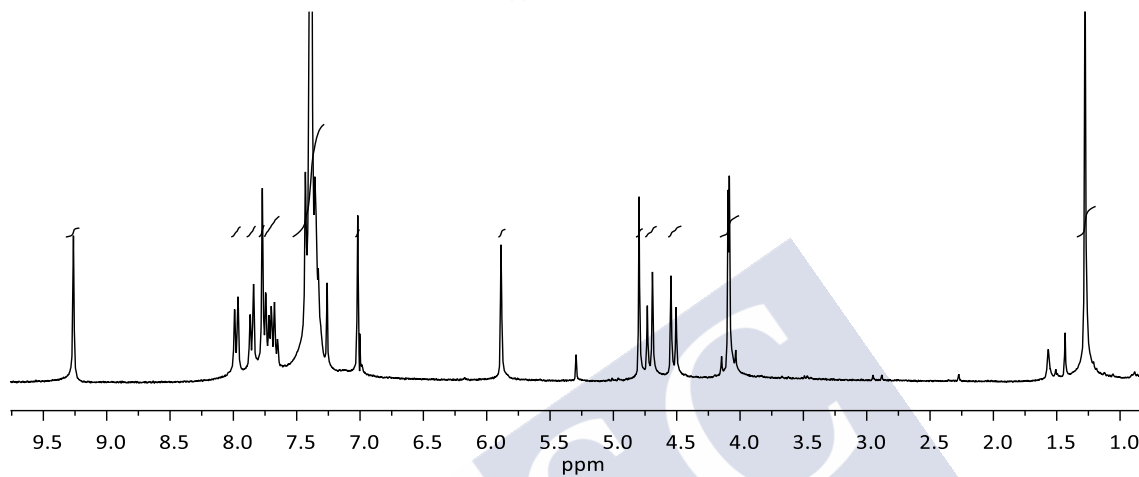


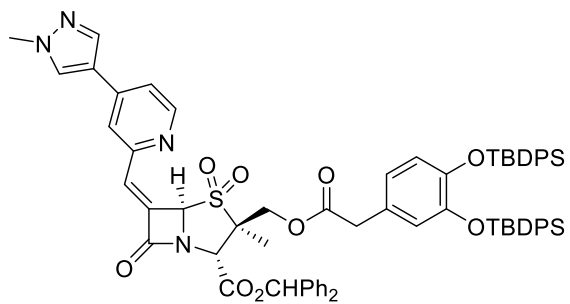
88



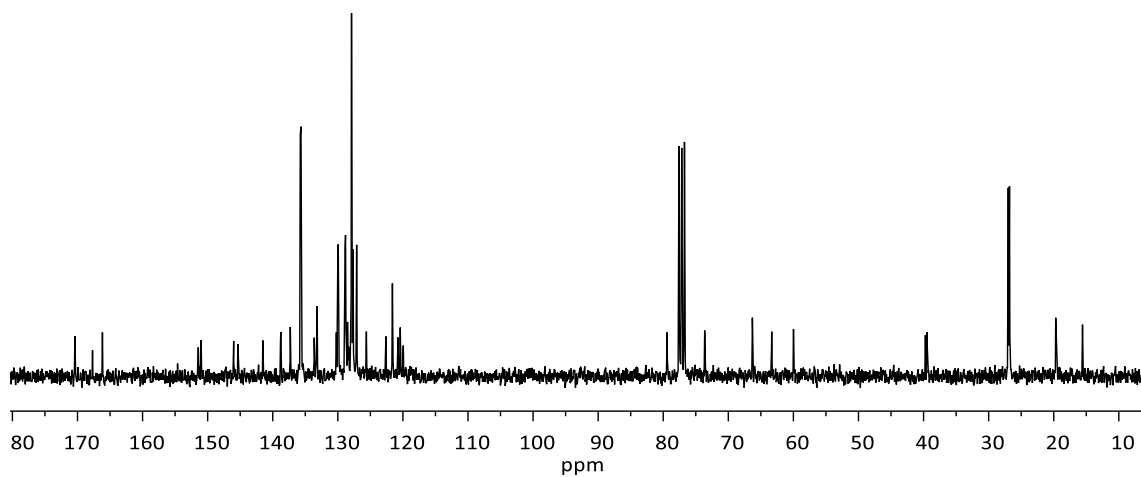
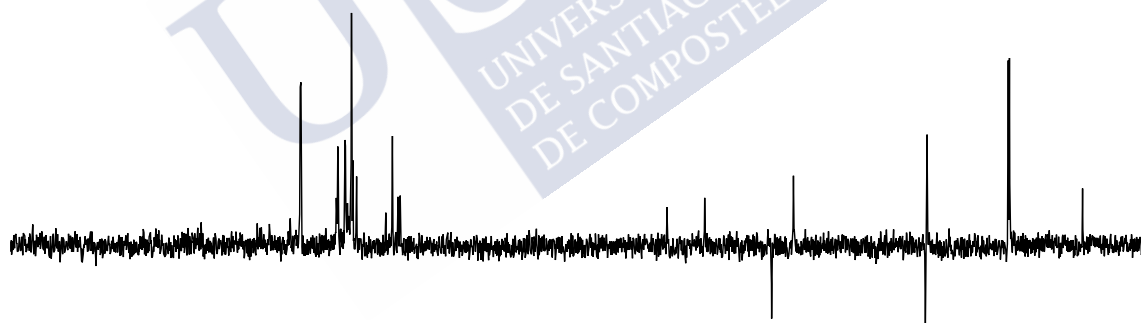
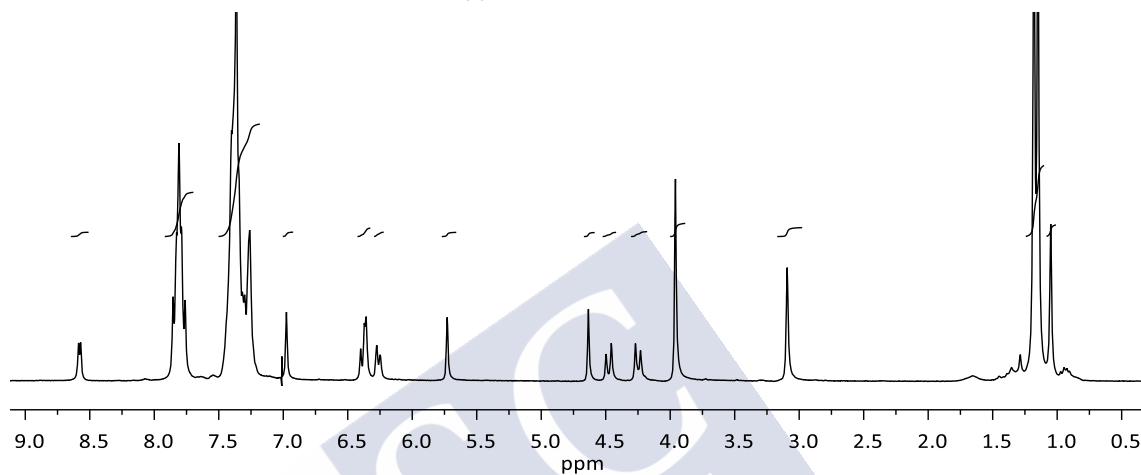


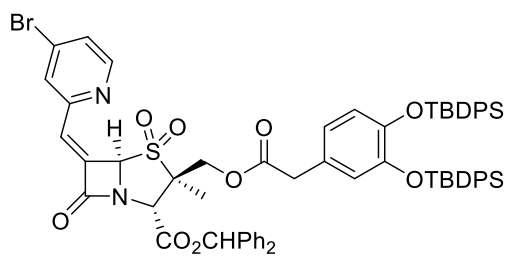
89



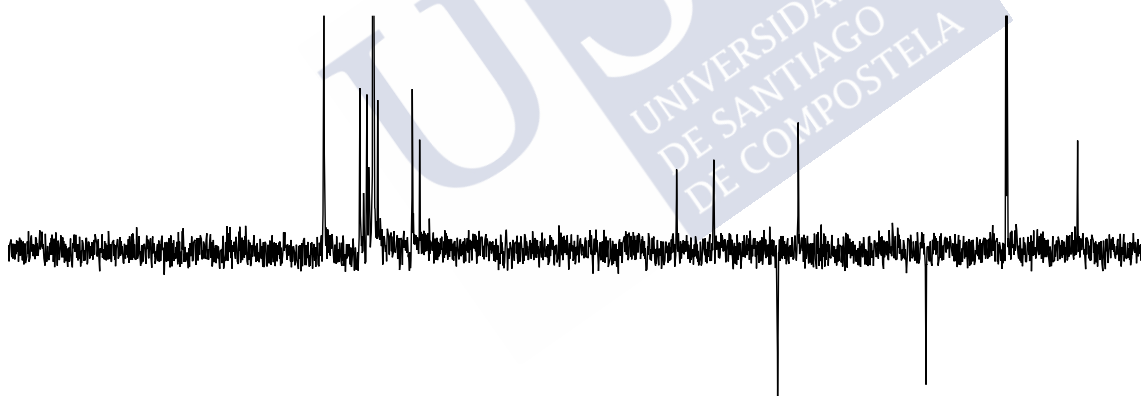
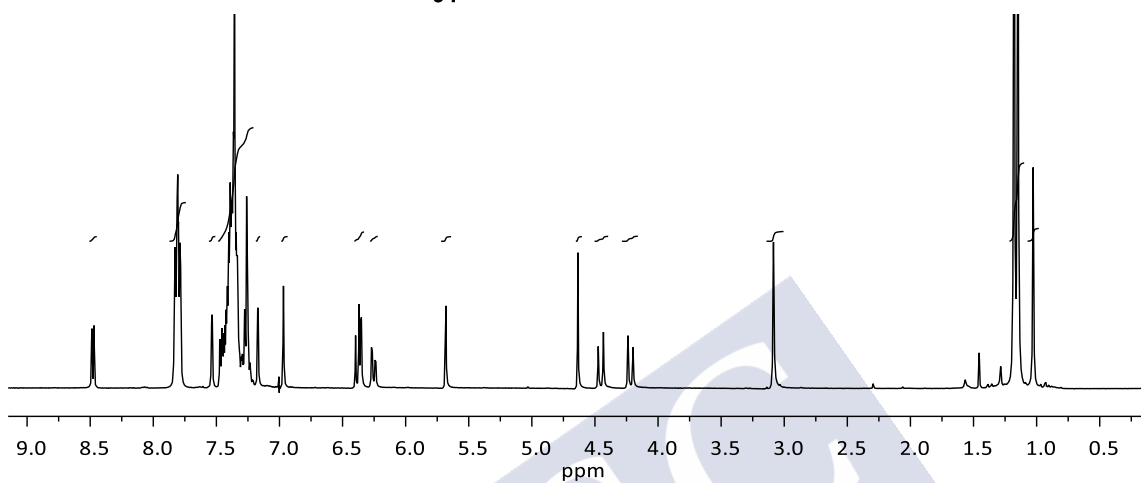


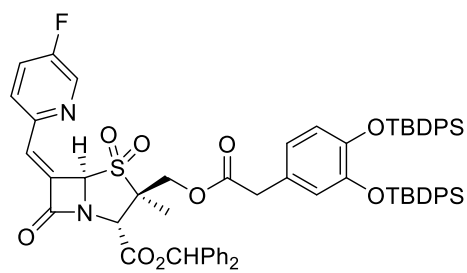
90



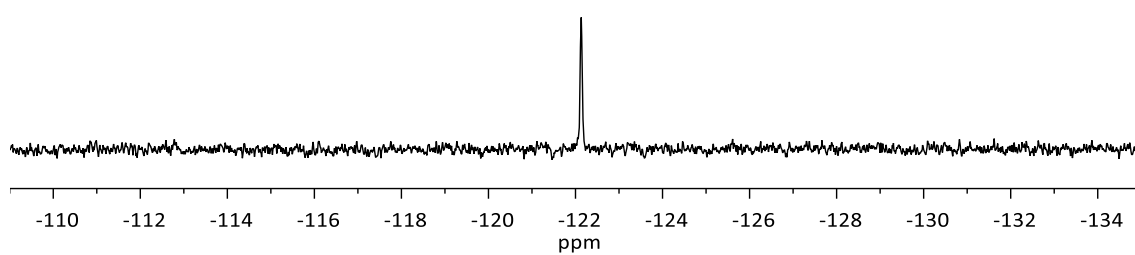
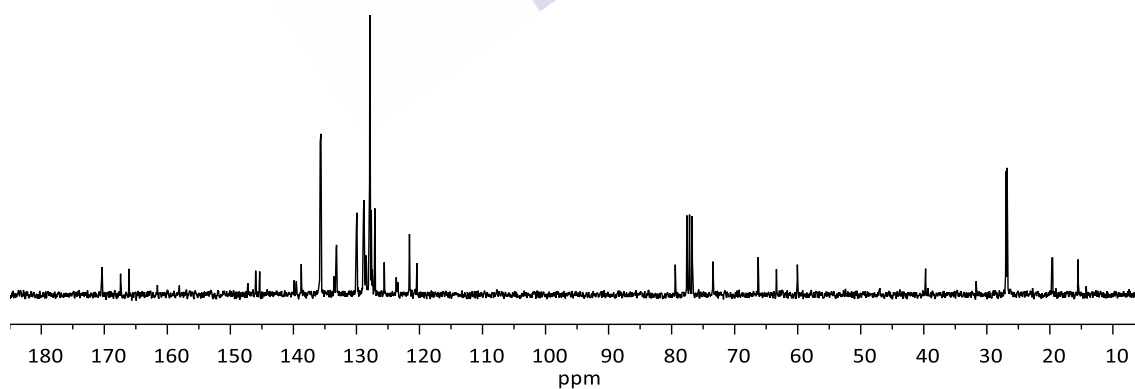
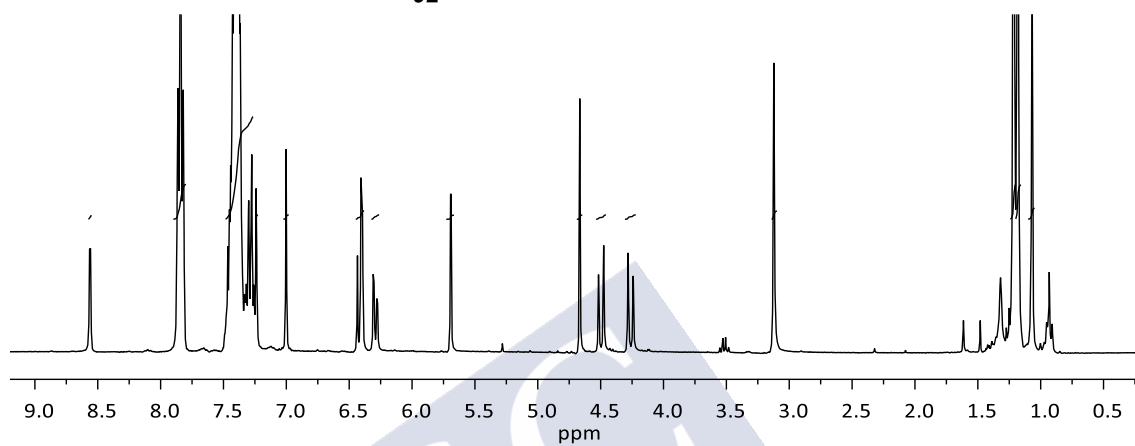


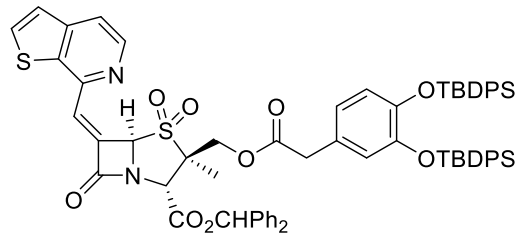
91



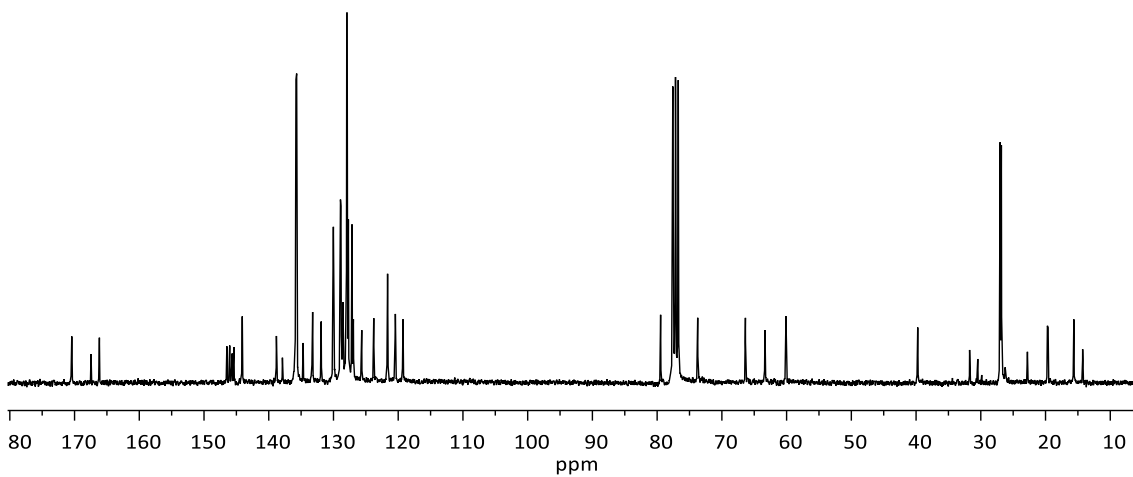
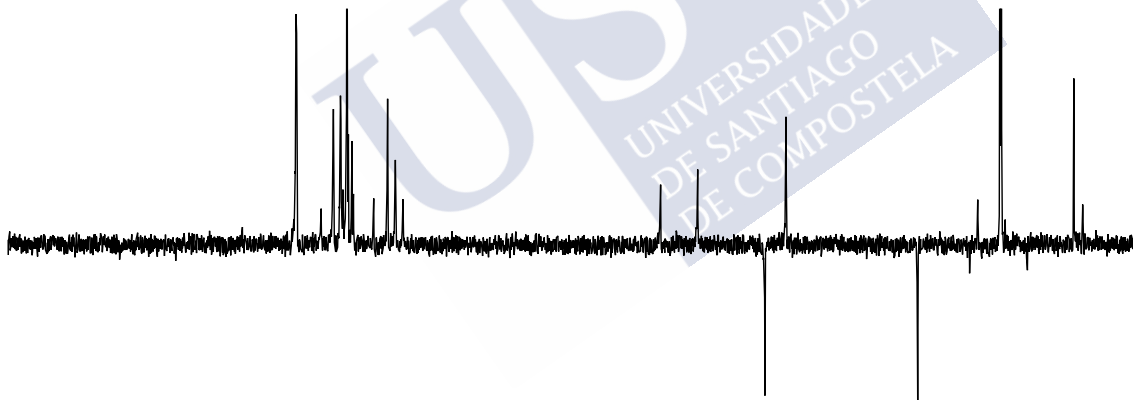
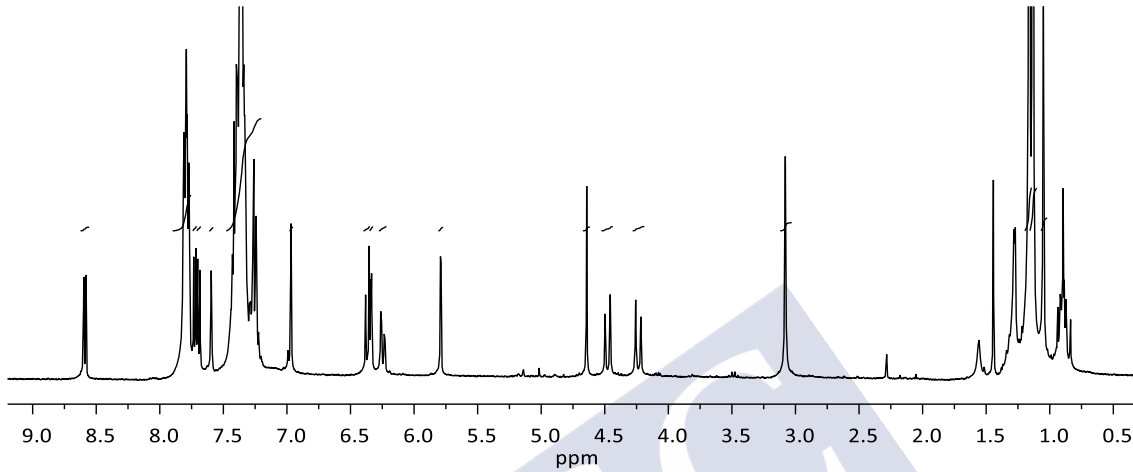


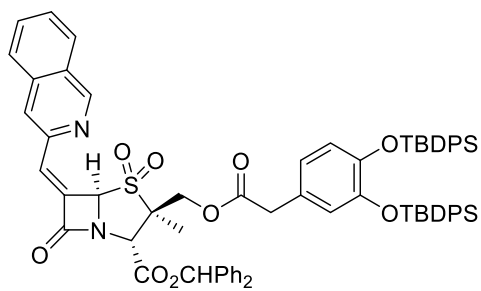
92



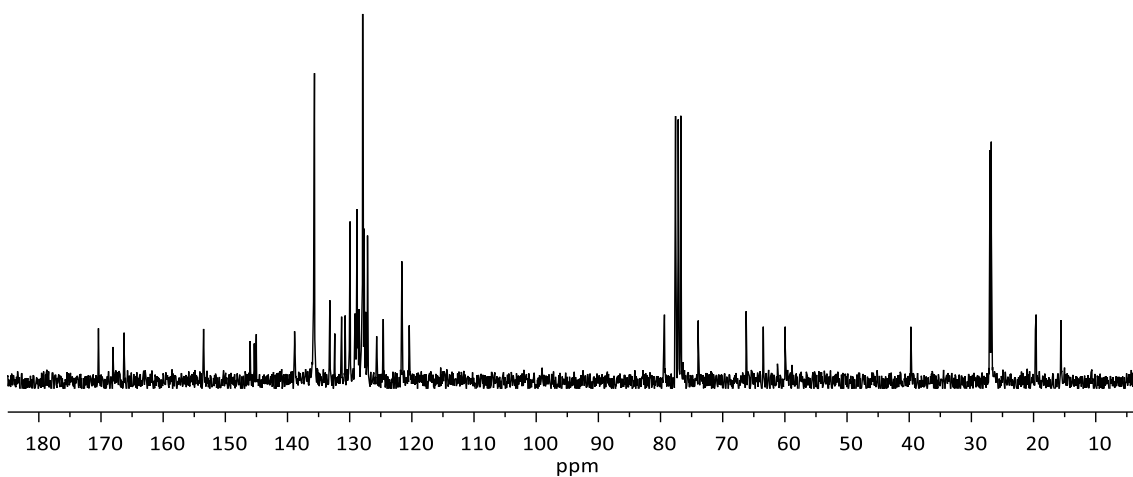
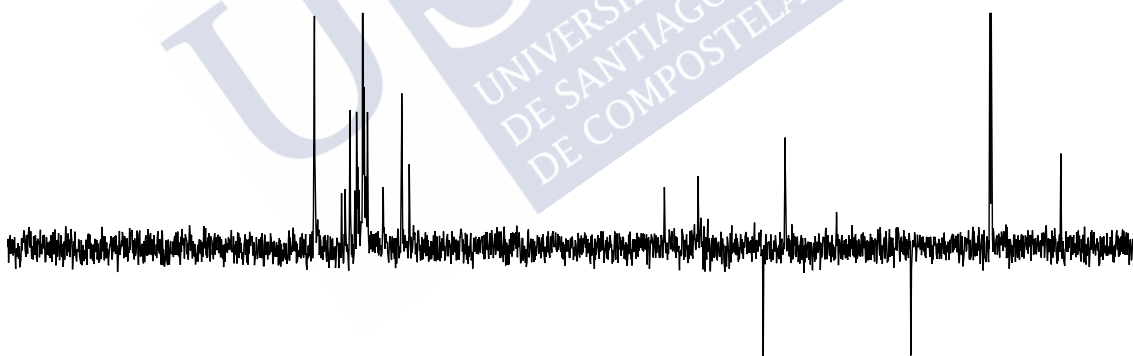
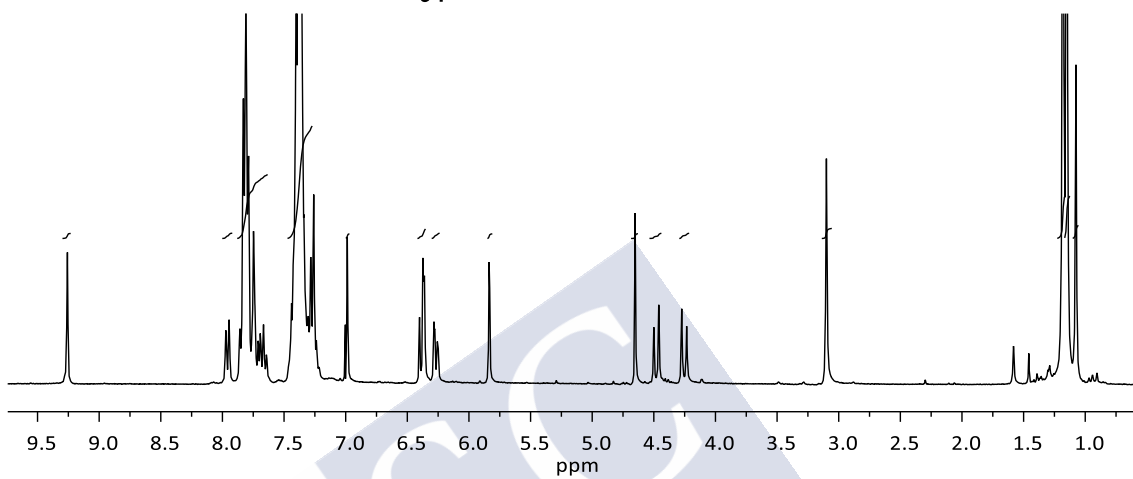


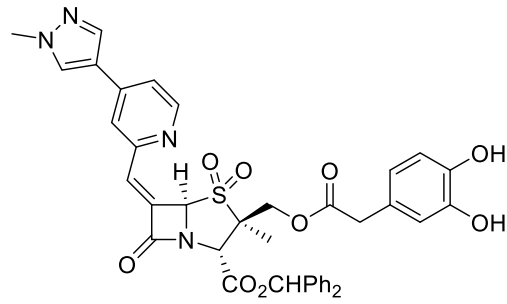
93



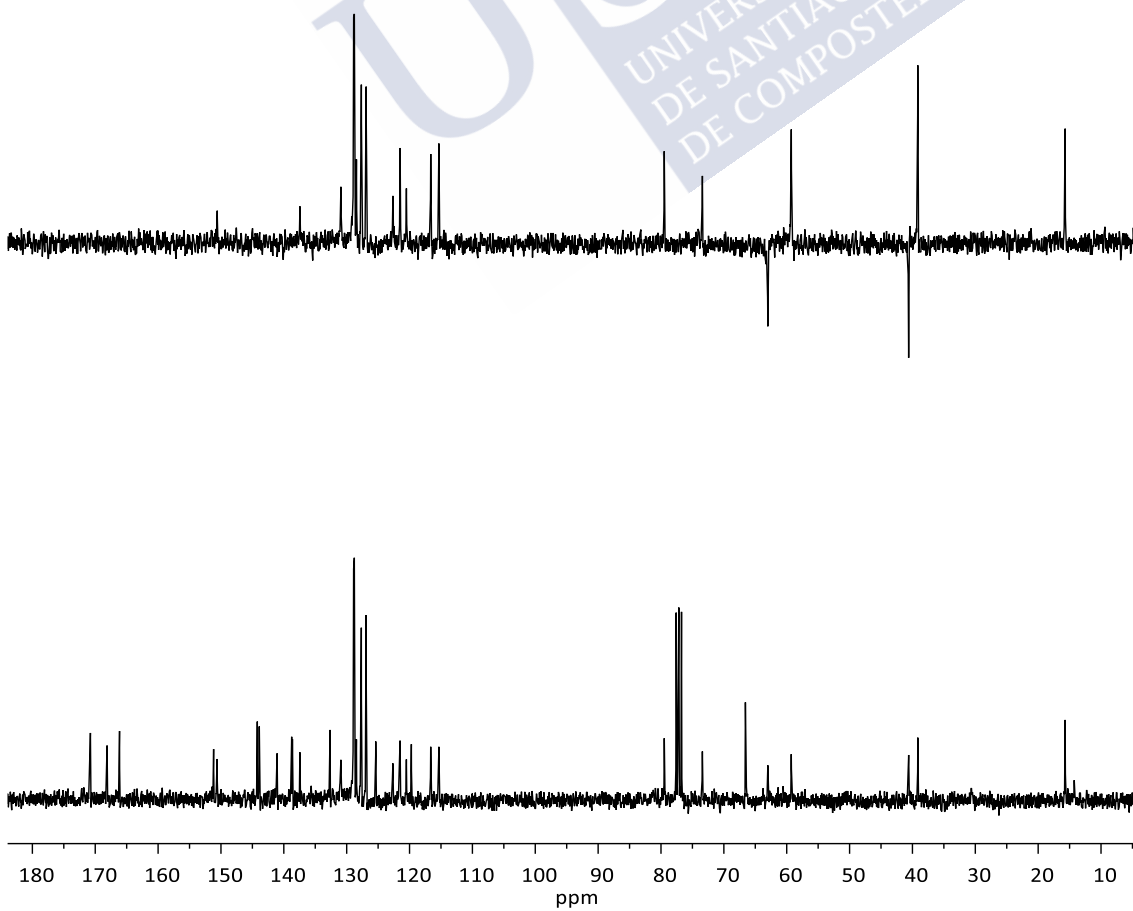
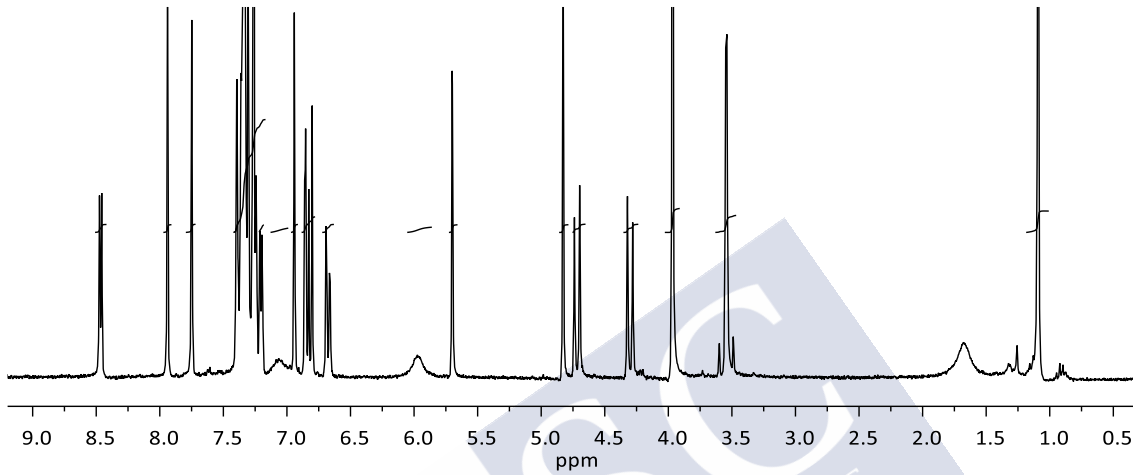


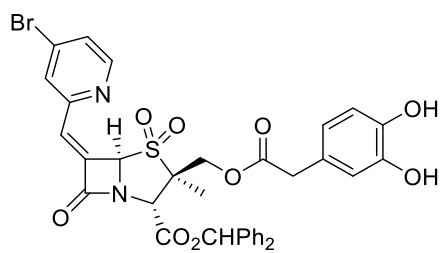
94



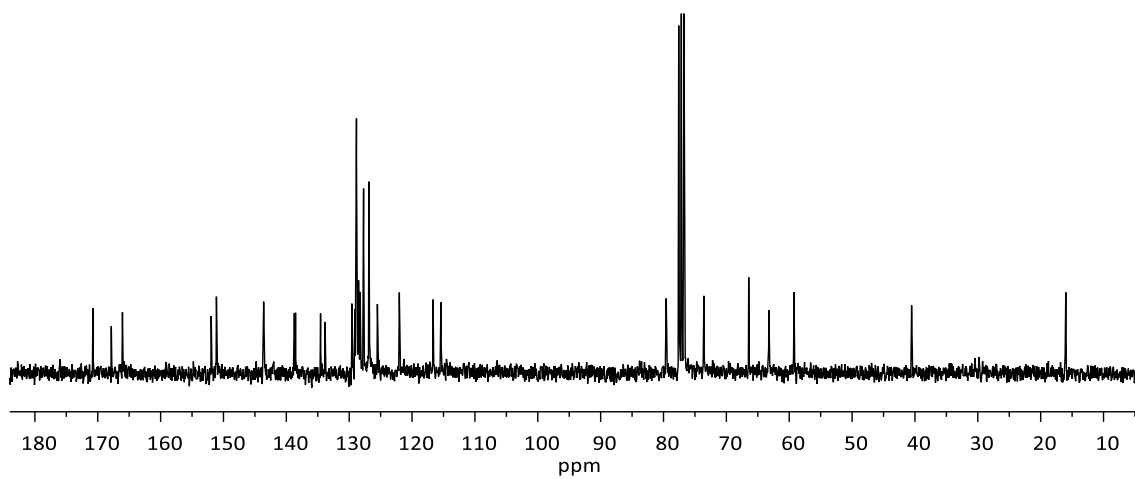
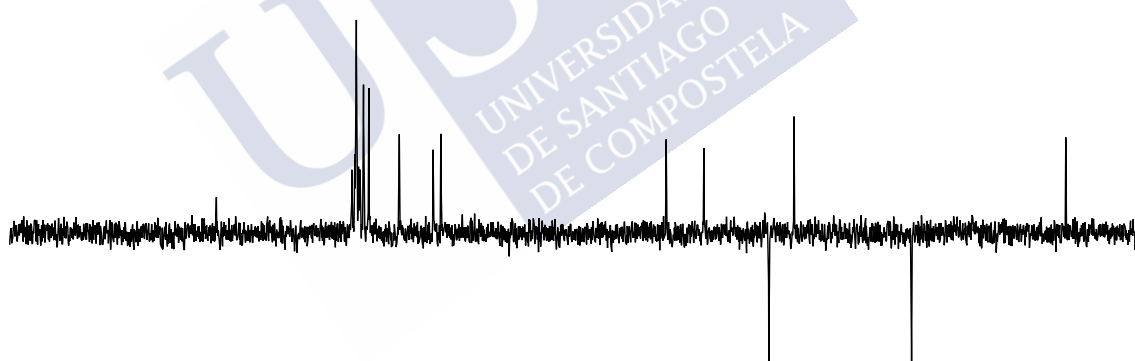
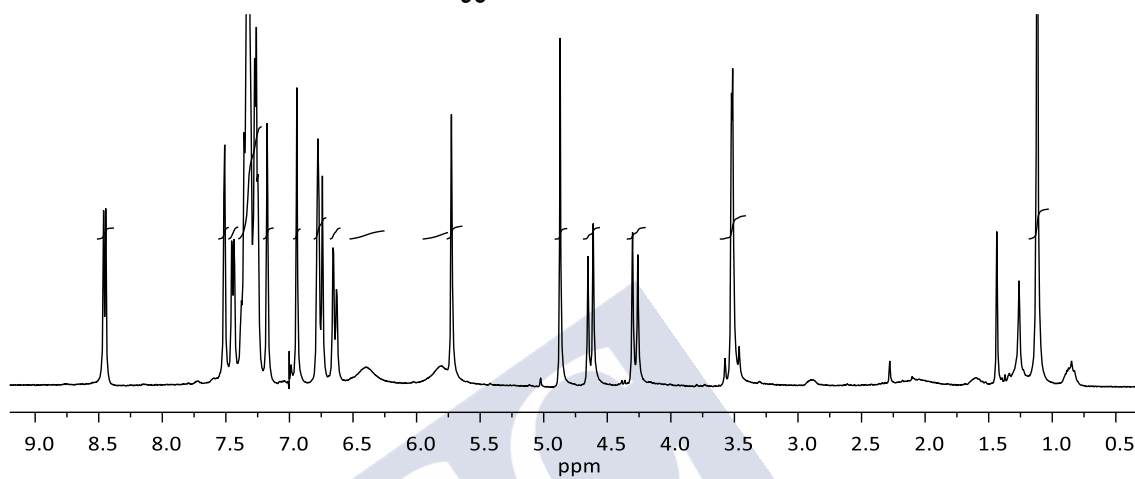


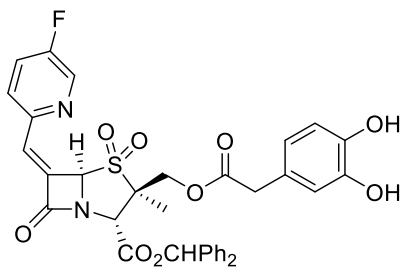
95



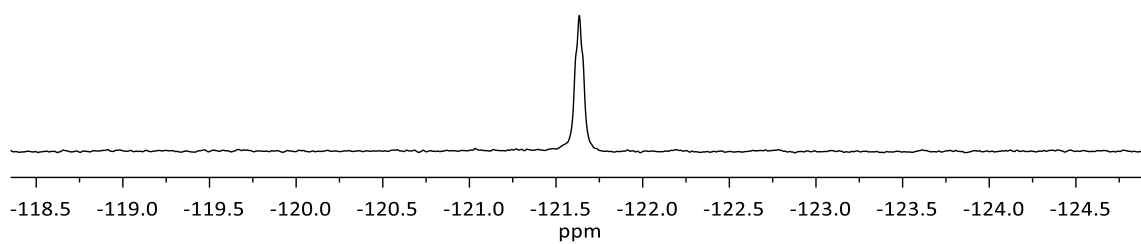
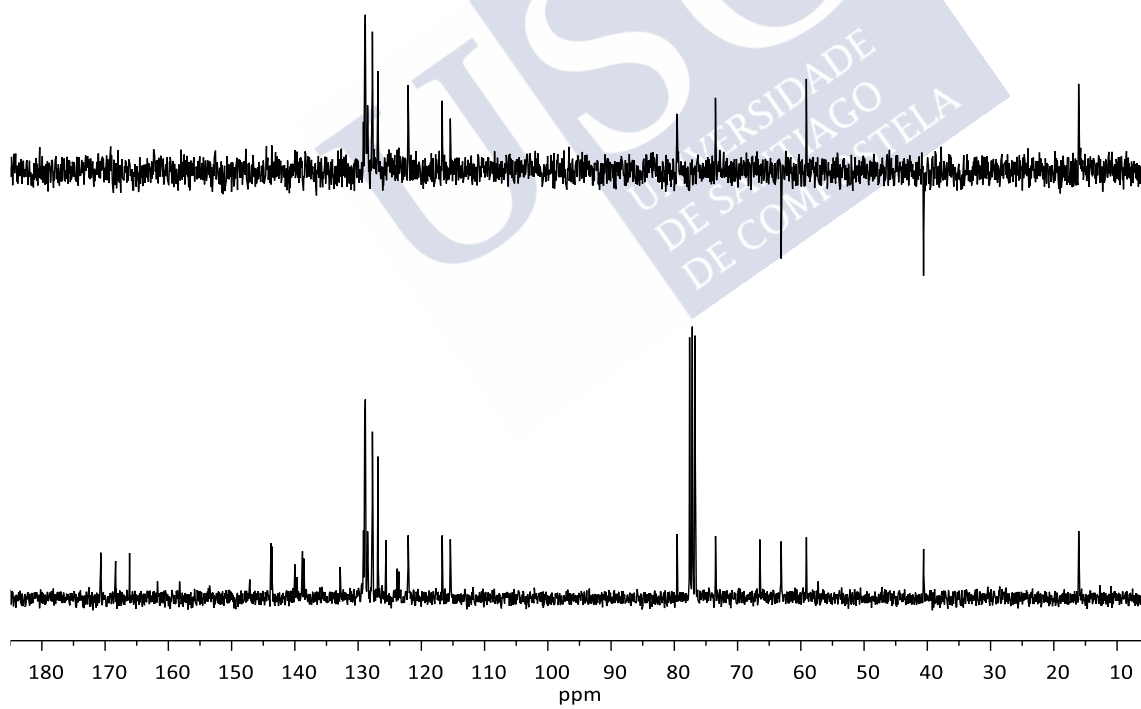
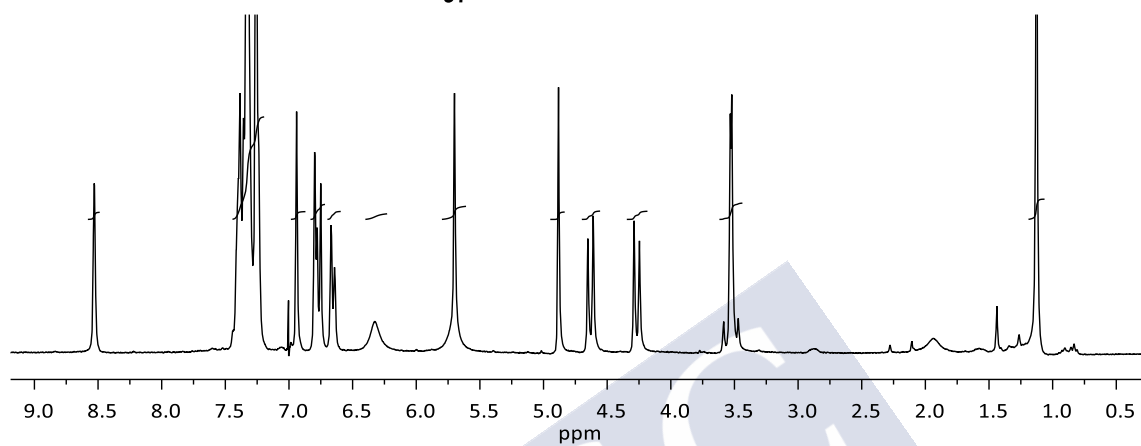


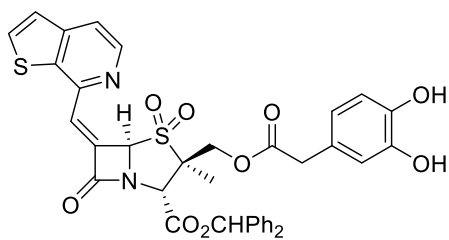
96



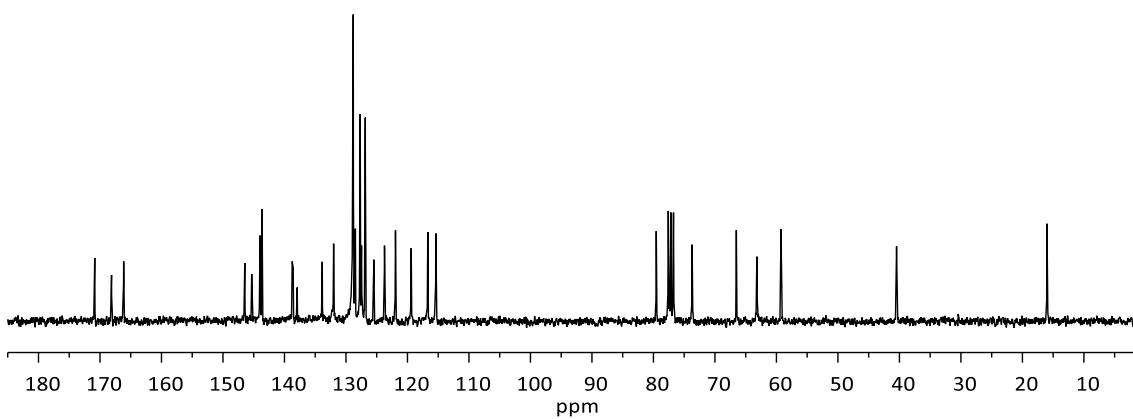
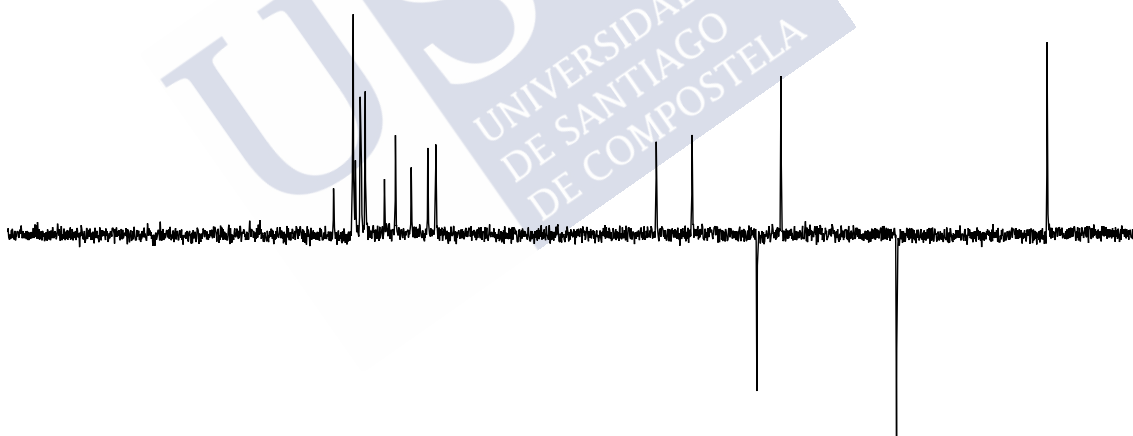
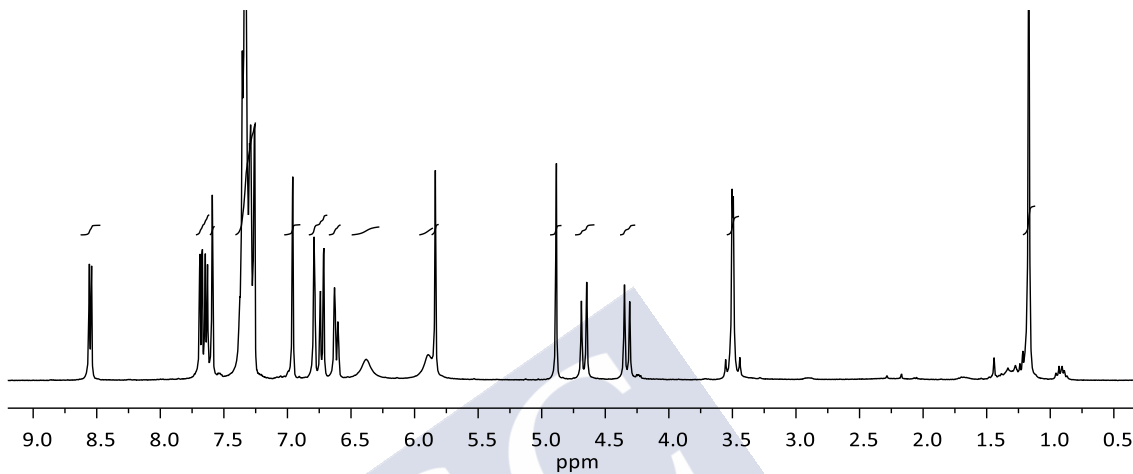


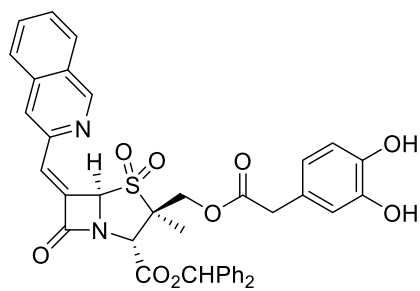
97



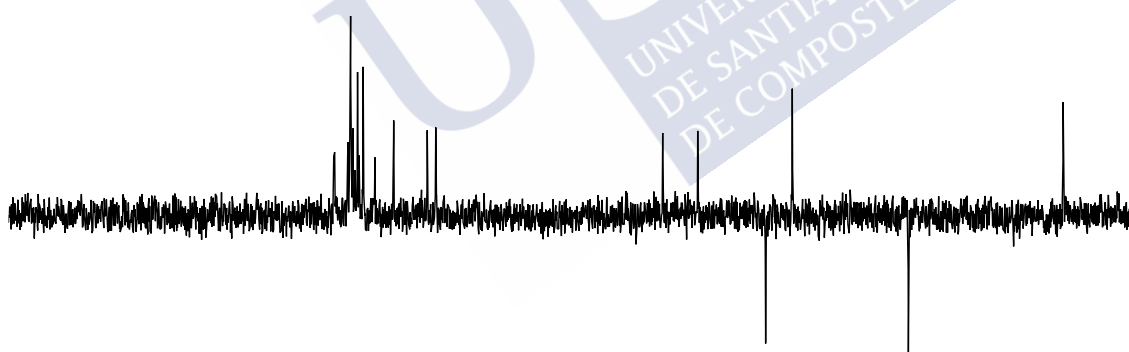
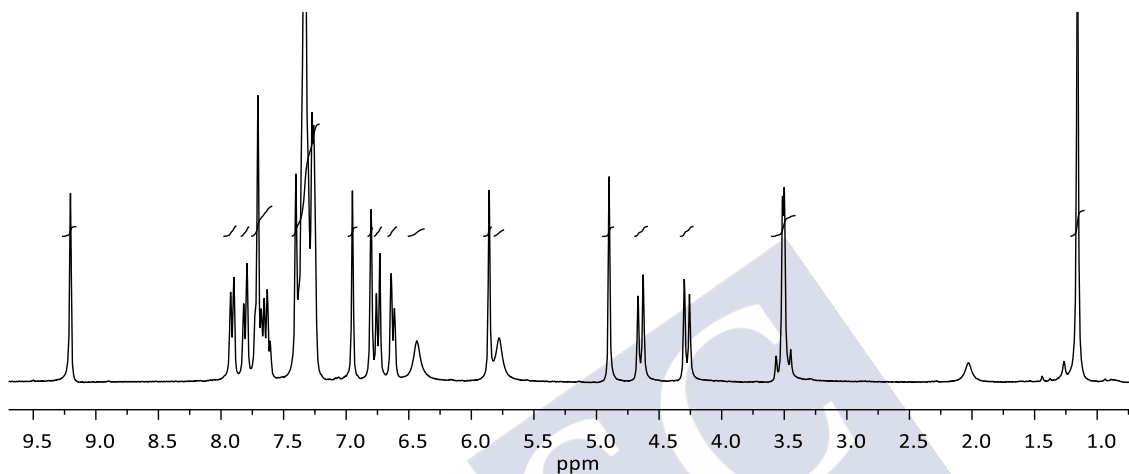


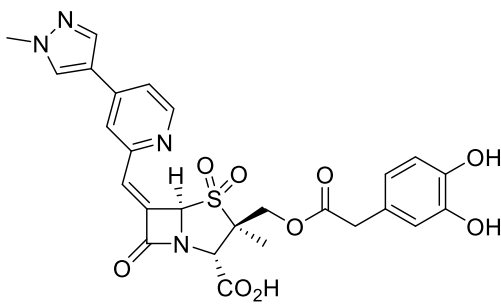
98



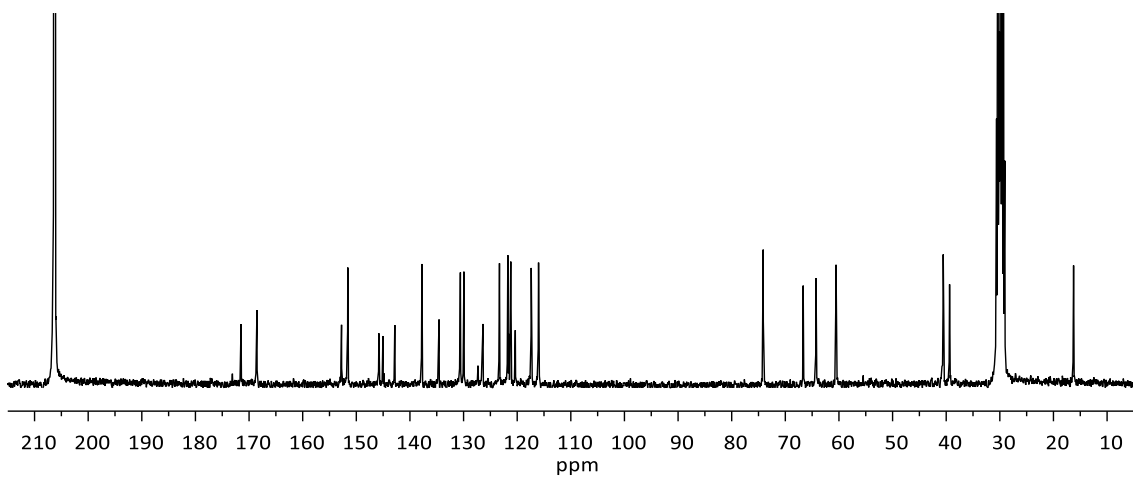
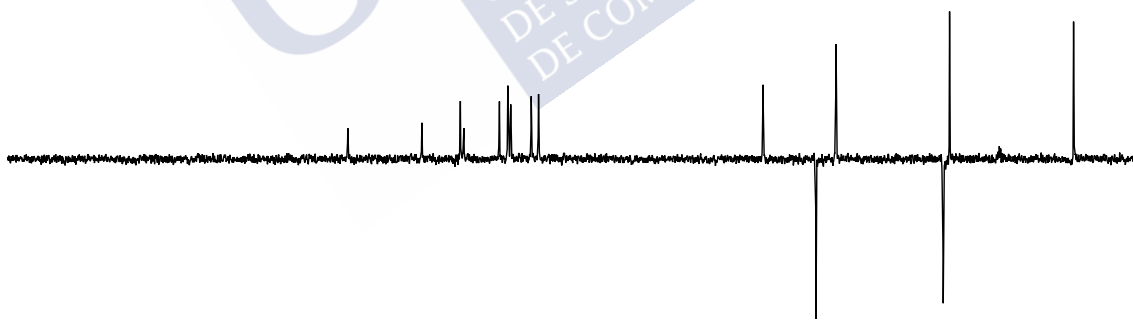
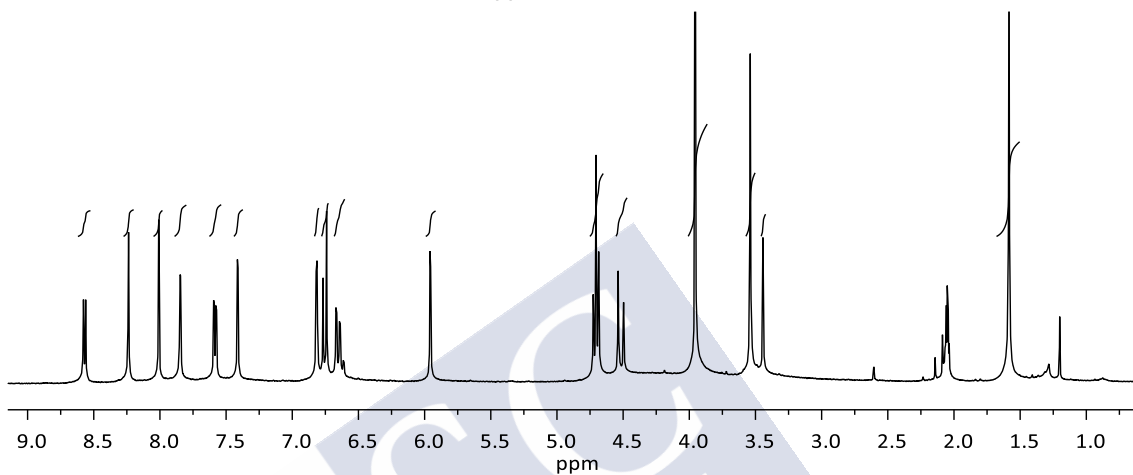


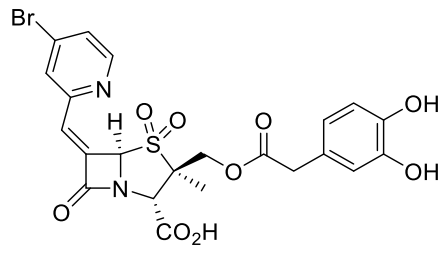
99



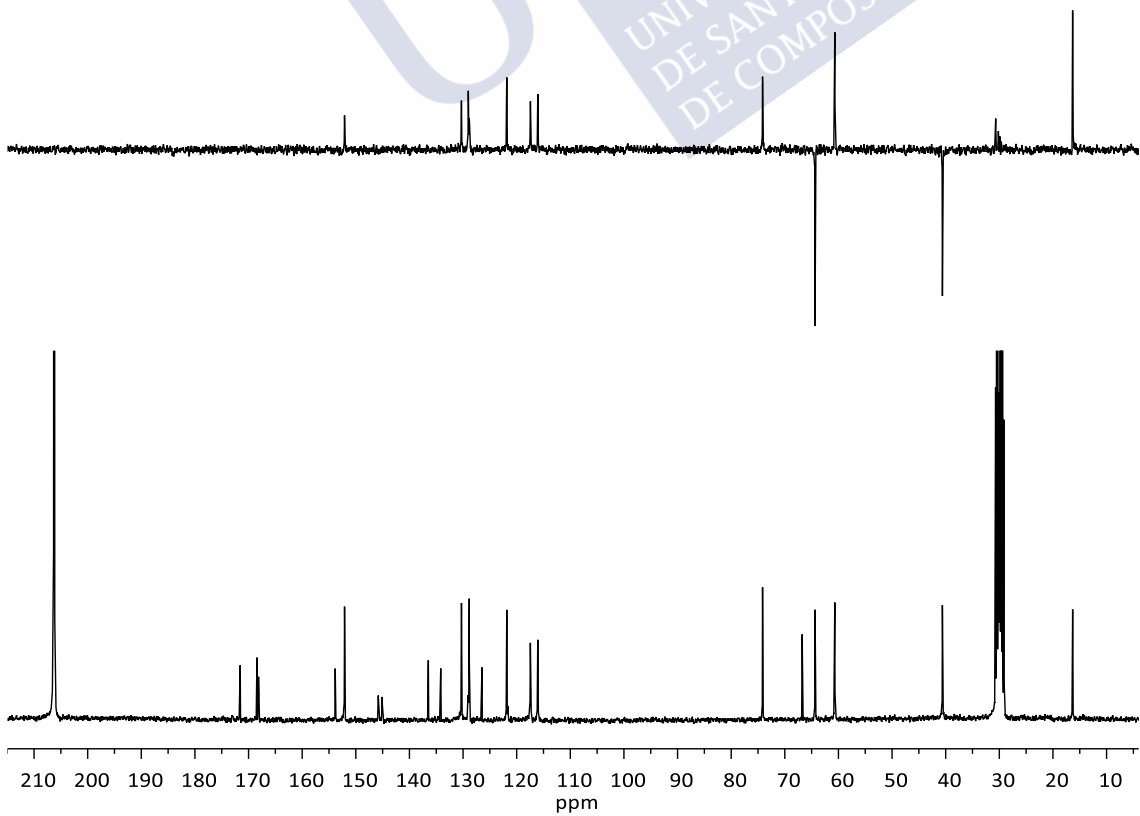
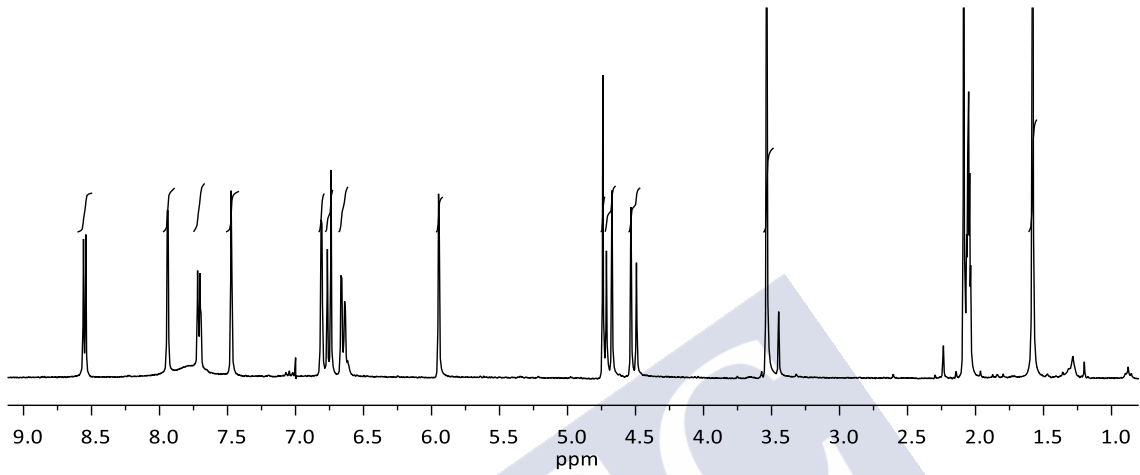


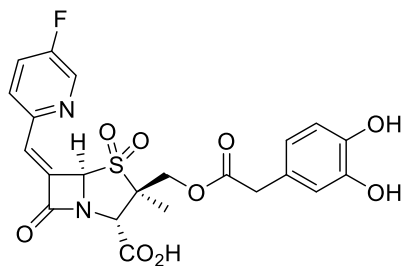
33



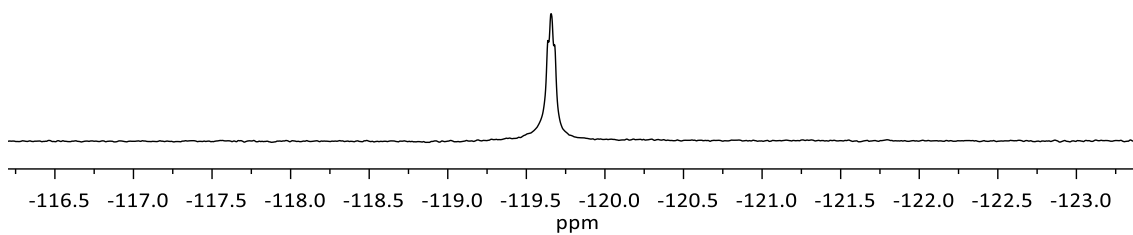
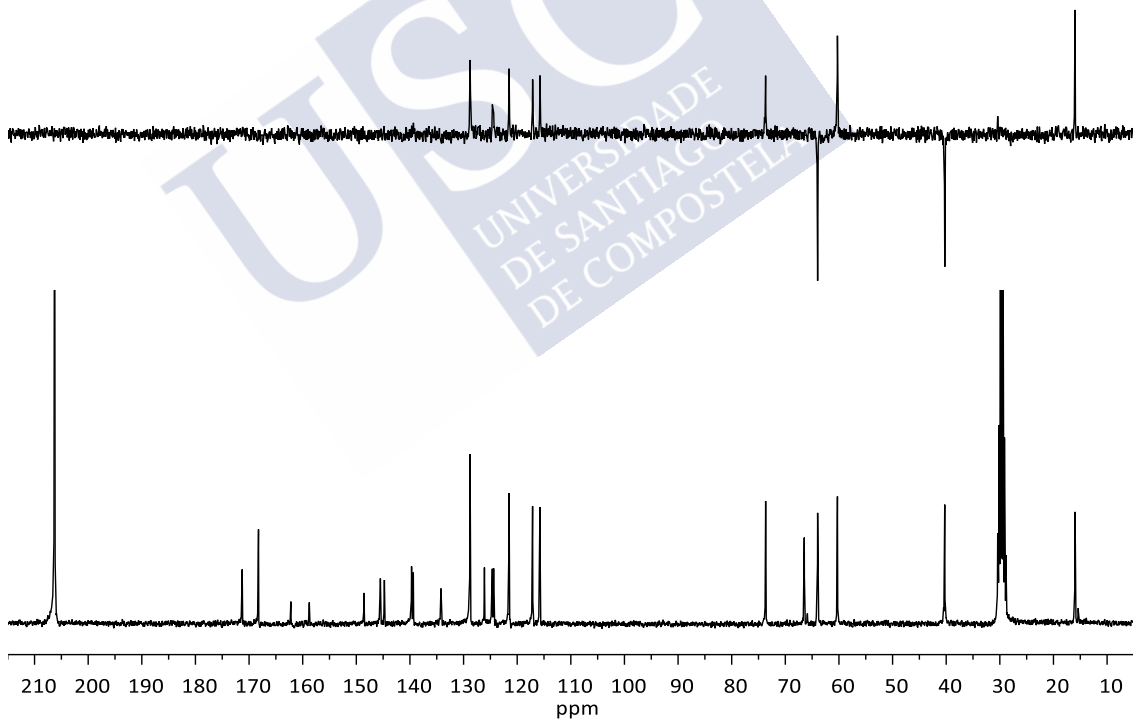
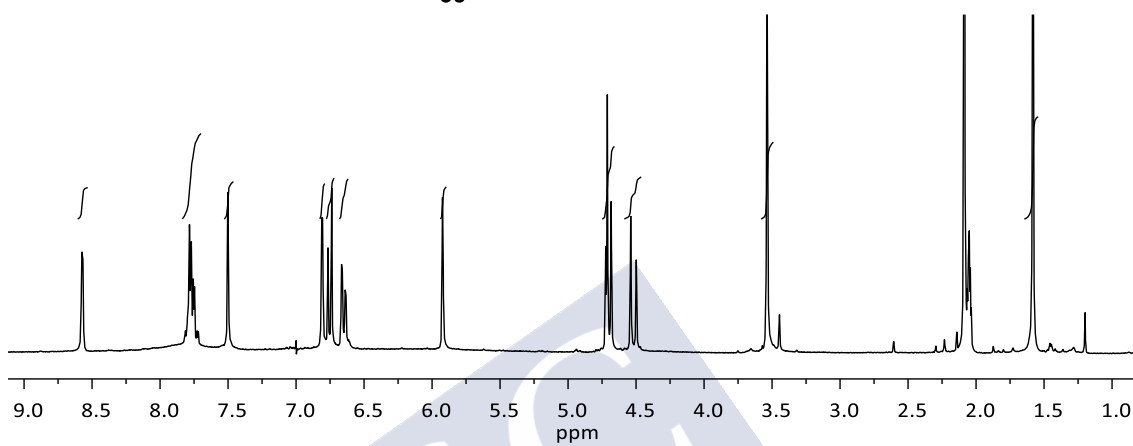


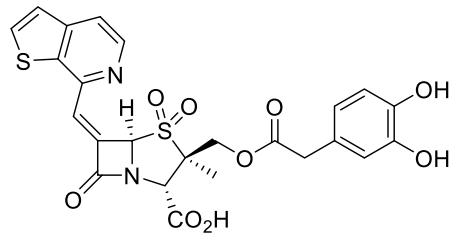
34



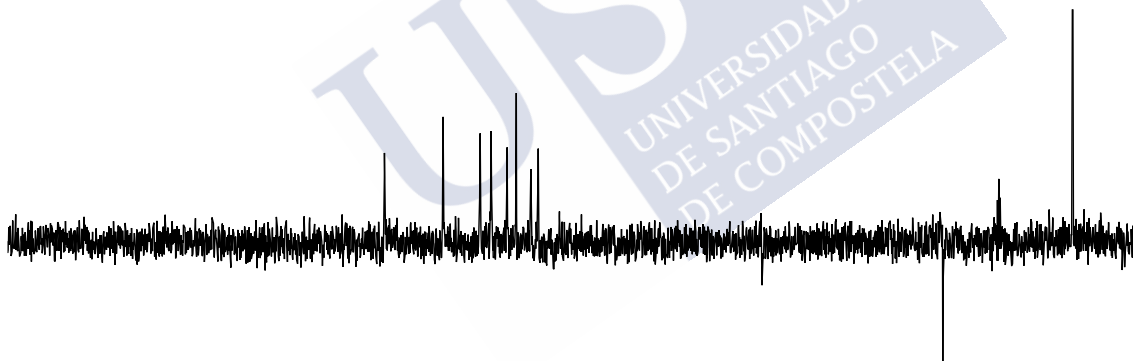
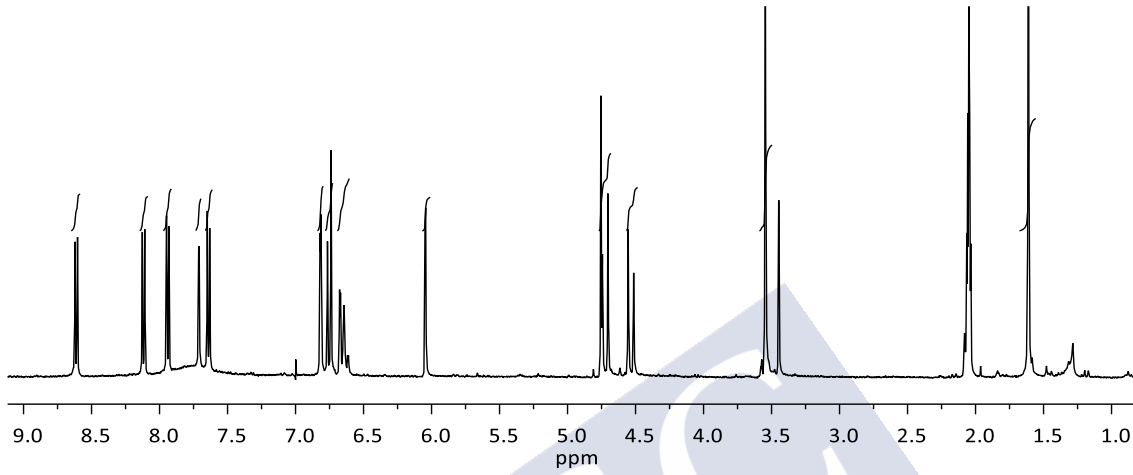


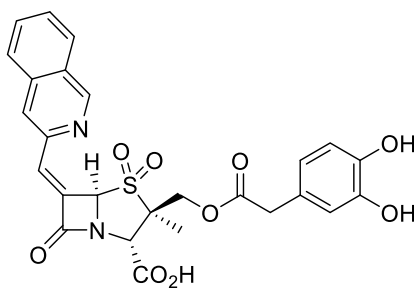
35



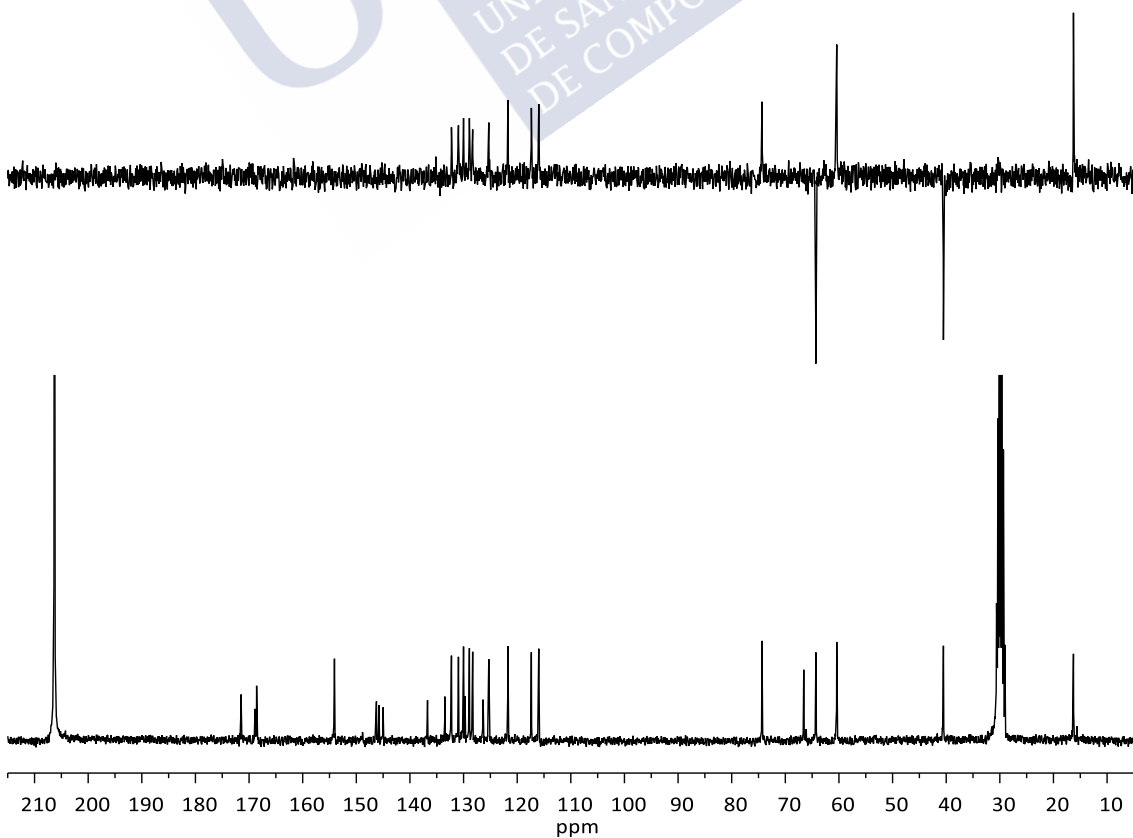
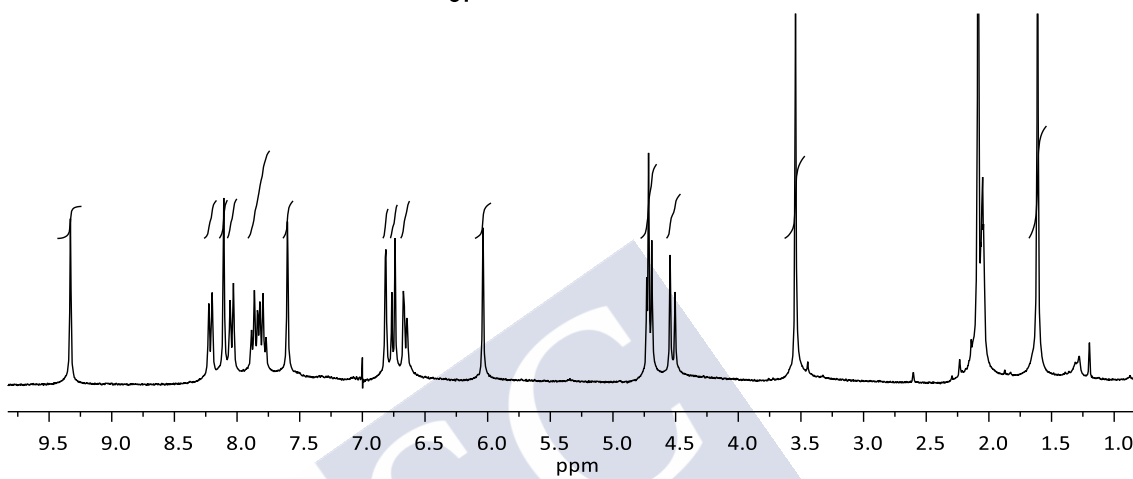


36





37







USC  
UNIVERSIDADE  
DE SAO PAULO  
DE COMPOSTELA

ANEXO II  
*Referencias*

---



- (1) Walsh, C. *Nature* **2000**, *406*, 775–781.
- (2) Böttcher, H. M. *Wonder drugs: a history of antibiotics*. Lippincott, Philadelphia, 1964.
- (3) Fleming, A. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226–236.
- (4) Anderson, R. J.; Groundwater, P. W.; Todd, A.; Worsley, A. J. *Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance and clinical applications*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, 2012.
- (5) Bush, K.; Bradford, P. A. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, a025247.
- (6) Kong, K.F.; Schneper, L.; Mathee, K. *APMIS* **2010**, *118*, 1–36.
- (7) Canzani, D.; Aldeek, F. *J. Nutr. Hum. Health* **2017**, *1*, 28–40.
- (8) Raviña, E. *The Evolution of Drug Discovery*; Wiley-VCH: Weinheim, 2011.
- (9) Brown, E. D.; Wright, G. D. *Nature* **2016**, *529*, 336–343.
- (10) Lewis, K. *Nature* **2012**, *485*, 439–440.
- (11) Toth, M.; Antunes, N. T.; Stewart, N. K.; Frase, H.; Bhattacharya, M.; Smith, C. A.; Vakulenko, S. B. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 9–14.
- (12) Pagalilauan, G. L.; Limaye, A. P. *Med. Clin. N. Am.* **2013**, *97*, 581–600.
- (13) Alós, J. I. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2015**, *33*, 692–699.
- (14) (a) O'Brien S. *J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *79*, 168–172. (b) Fernandes, P. *Curr. Opin. Pharm.* **2015**, *24*, 7–11.
- (15) Ventola, C. L. *P&T Community* **2015**, *40*, 277–283.
- (16) D'Costa, V. M.; King, C. E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W. W. L.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R.; Golding, G. B.; Poinar, H. N.; Wright, G. D. *Nature* **2011**, *477*, 457–461.
- (17) Melander, R. J.; Melander, C. *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3*, 559–563.
- (18) Lakemeyer, M.; Zhao, W.; Mandl, F. A.; Hammann, P.; Sieber, S. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2–39.
- (19) Singh, S. B.; Young, K.; Miesel, L.; *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2011**, *9*, 589–613.
- (20) Palumbi, S. R. *Science* **2001**, *293*, 1786–1790.
- (21) BIOMÉRIEUX. Commercialization and first detection of resistant bacteria for some classes of antibiotics. <https://amr.biomerieux.com/en/challenges/a-lack-of-antibiotics/>
- (22) The White House. National Strategy to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. 2014. <http://www.cdc.gov/drugresistance/federal-engagementin-ar/national-strategy/index.html>.
- (23) Gilbert, N. *Nature* **2018**, *555*, S5–S7.
- (24) Bengtsson-Palme, J.; Kristiansson, E.; Larsson, D. G. J. *FEMS Microbiol. Rev.* **2018**, *42*, fux053.
- (25) Vikesland, P.; Garner, E.; Gupta, S.; Kang, S.; Maile-Moskowitz, A.; Zhu, N. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 4916–4924.
- (26) Chen, L.; Todd, R.; Kiehlbauch, J.; Walters, M.; Kallen, A. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2017**, *66*, 33.

- (27) World Health Organization. Antimicrobial Resistance—Global Report on Surveillance. 2014. <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
- (28) European centre for disease prevention and control (ECDC). The bacterial challenge: time to react. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf).
- (29) Thayer, A. M. *Chem. Eng. News*. **2016**, *94*, 36–43.
- (30) González-Bello, C.; Rodríguez, D.; Pernas, M.; Rodríguez, A.; Colchón, E. J. *Med. Chem.* **2020**, *63*, 1859–1881.
- (31) Goff, D. A.; Kullar, R.; Goldstein, E. J.; Gilchrist, M.; Nathwani, D.; Cheng, A. C.; Cairns, K. A.; Escandon-Vargas, K.; Villegas, M. V.; Brink, A.; van den Bergh, D.; Mendelson, M. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 56–63.
- (32) WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1).
- (33) González-Bello, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4221–4228.
- (34) Moya, B.; Barcelo, I. M.; Bhagwat, M. P.; Bou, G.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01238-17.
- (35) Vázquez-Ucha, C.; Martínez-Gutián, M.; Maneiro, M.; Conde-Pérez, K.; Álvarez-Fraga, L.; Torrens, G.; Oliver, A.; Buynak, J.; Bonomo, R. A.; Bou, G.; González-Bello, C.; Poza, M.; Beceiro, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01092-19.
- (36) (a) Vila, J.; Martí, S.; Sánchez-Céspedes, J. J. *Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 1210–1215. (b) Peleg, A.Y.; Seifert, H.; Paterson, D. L. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 538–582.
- (37) Kramer, A.; Schwebke, I.; Kampf, G. *BMC Infect. Dis.* **2006**, *6*:130.
- (38) Pendleton, J. N.; Gorman, S. P.; Gilmore, B. F. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2013**, *11*, 297–308.
- (39) Wolter, D. J.; Lister, P. D. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 209–222.
- (40) Nikaido, H. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 593–656.
- (41) Chung, P. Y. *FEMS Microbiol. Lett.* **2016**, *363*, fnw219.
- (42) Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *3*, 42–51.
- (43) James, C. E.; Mahendran, K. R.; Molitor, A.; Bolla, J. M.; Bessonov, A. N.; Winterhalter, M.; Pagès, J. M. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5453.
- (44) Guitor, A. K.; Wright, G. D. *CHEST* **2018**, *154*, 1202–1212.
- (45) Piddock, L. J. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 382–402.
- (46) Clark, S. T.; Guttman, D. S.; Hwang, D. M. *FEMS Microbiol. Lett.* **2018**, *365*, fny026.
- (47) Bush K. J. *Infect. Chemother.* **2013**, *19*, 549–559.

- (48) Walsh, C.; Wencewicz, T. *Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities*; ASM Press: Washington DC, 2016.
- (49) Wilson, D. N. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 35–48.
- (50) Thomas, C. M.; Nielsen, K. M. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 711–721.
- (51) Laws, M.; Shaaban, A.; Rahman, K. M. *FEMS Microbiol. Rev.* **2019**, *43*, 490–516.
- (52) Zabawa, T. P.; Pucci, M. J.; Parr, T. R. Jr.; Lister, T. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *33*, 7–12.
- (53) Stavri, M.; Piddock, L. J.; Gibbons, S. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 1247–1260.
- (54) Mahmood, H. Y.; Jamshidi, S.; Sutton, J. M.; Rahman, K. M. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 1062–1081.
- (55) Drawz, S. M.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 1835–1846.
- (56) Corey, E. J.; Czakó, B.; Kürti, L. *Molecules and medicine*; Wiley: New Jersey, 2008.
- (57) Pankey, G. A.; Sabath, L. D. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *38*, 864–870.
- (58) Vázquez-Ucha, J. C.; Maneiro, M.; Martínez-Gutián, M.; Buynak, J.; Bethel, R. C.; Bonomo, R. A.; Bou, G.; Poza, M.; González-Bello, C.; Beceiro, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01172-17.
- (59) Bush, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01076-18.
- (60) Massova, I.; Mobashery, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1–17.
- (61) Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R. A.; Dabos, M. L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P.; Iorga, B. I., Beta-Lactamase DataBase (BLDB) – Structure and Function. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 917–919 <http://www.bldb.eu/>
- (62) Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 1211–1233.
- (63) Bush, K.; Bradford, P. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 295–306.
- (64) Cantón, R.; González-Alba, J. M.; Galán, J. C. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 1–19.
- (65) Piccirilli, A.; Perilli, M.; Amicosante, G.; Conte, V.; Tascini, C.; Rossolini, G. M.; Giani, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e00688-18.
- (66) Walther-Rasmussen, J.; Hoiby, N. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 470–482.
- (67) Piccirilli, A.; Mercuri, P. S.; Galleni, M.; Aschi, M.; Matagne, A.; Amicosante, G.; Perilli, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01851-17.
- (68) Juan, C.; Torrens, G.; González-Nicolau, M.; Oliver, A. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 781–815.
- (69) Tian, G. B.; Adams-Haduch, J. M.; Bogdanovich, T.; Wang, H. N.; Doi, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 2710–2713.

- (70) Cho, H. H.; Kwon, G. C.; Kim, S.; Koo, S. H. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *25*, 1154–1162.
- (71) Berrazeg, M.; Jeannot, K.; Ntsogo, V. Y.; Broutin, I.; Loeffert, S.; Fournier, D.; Plésiat, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 6248–6255.
- (72) Barnes, M. D.; Taracila, M. A.; Rutter, J. D.; Bethel, C. R.; Galdadas, I.; Hujer, A. M.; Caselli, E.; Prati, F.; Dekker, J. P.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. *mBio* **2018**, *9*, e02085-18.
- (73) Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E. C.; Colenso, C. K.; Hirvonen, V. H. A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 3472–3500.
- (74) Cao, V. T.; Arlet, G.; Ericsson, B. M.; Tammelin, A.; Courvalin, P.; Lambert, T. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 895–900.
- (75) Scaife, W.; Young, H. K.; Paton, R. H.; Amyes, G. B. *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, *36*, 585–587.
- (76) Schneider, K. D.; Ortega, C. J.; Renck, N. A.; Bonomo, R. A.; Powers, R. A.; Leonard, D. A. *J. Mol. Biol.* **2011**, *406*, 583–594.
- (77) Perilli, M.; Sabatini, A.; Pontieri, E.; Celenza, G.; Segatore, B.; Bottoni, C.; Bellio, P.; Mancini, A.; Marcocchia, F.; Brisdelli, F.; Amicosante, G. *Microb. Drug Resist.* **2015**, *21*, 97–101.
- (78) Mugnier, P.D.; Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 35–40.
- (79) Staude, M. W.; Leonard, D. A.; Peng, J. W. *Biochemistry* **2016**, *55*, 6535–6544.
- (80) Dortet, L.; Cuzon, G.; Nordmann, P. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 623–627.
- (81) Glasner, C.; Albiger, B.; Buist G et al. *Euro Surveill.* **2013**, *18*, pii:20525.
- (82) Lukic-Grlic, A.; Kos, M.; Zizek, M.; Luxner, J.; Grisold, A.; Zarfel, G.; Bedenic, B. *Chemotherapy* **2019**, *64*, 167–172.
- (83) Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 24–38.
- (84) Golemi, D.; Maveyraud, L.; Vakulenko, S.; Samama, J. P.; Mobashery, S. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2001**, *98*, 14280–14285.
- (85) Santillana, E.; Beceiro, A.; Bou, G.; Romero, A. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2007**, *104*, 5354–5359.
- (86) Docquier, J. D.; Calderone, V.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Giuliani, F.; Bellucci, L.; Tafi, A.; Nordmann, P.; Botta, M.; Rossolini, G. M.; Mangani, S. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 540–547.
- (87) Lahiri, S. D.; Mangani, S.; Jahic, H.; Benvenuti, M.; Durand-Reville, T. F.; De Luca, F.; Ehmann, D. E.; Rossolini, G. M.; Alm, R. A.; Docquier, J. D. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 591–600.
- (88) Kaitany, K. C.; Klinger, N. V.; June, C. M.; Ramey, M. E.; Bonomo, R. A.; Powers, R. A.; Leonard, D. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 4848–4855.

- (89) Pattanaik, P.; Bethel, C. R.; Hujer, A. M.; Hujer, K. M.; Distler, A. M.; Taracila, M.; Anderson, V. E.; Fritsche, T. R.; Jones, R. N.; Pagadala, S. R. R.; Van Den Akker, F.; Buynak, J. D.; Bonomo, R. A. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 945–953.
- (90) Vandavasi, V. G.; Weiss, K. L.; Parks, J. M.; Cooper, J. B.; Ginell, S. L.; Coates, L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01636-16.
- (91) Bou, G.; Santillana, E.; Sheri, A.; Beceiro, A.; Sampson, J. M.; Kalp, M.; Bethel, C. R.; Distler, A. M.; Drawz, S. M.; Pagadala, S. R. R.; van der Akker, F.; Bonomo, R. A.; Romero, A.; Buynak, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13320–13331.
- (92) Leonard, D. A.; Bonomo, R. A.; Powers, R. A. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2407–2415.
- (93) Snoum, R.; Rubinstein, A.; Dembitsky, V. M.; Srebnik, M. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4156–4220.
- (94) Dobozy, O.; Mile, I.; Ferencz, I.; Csanyi, V. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1971**, *6*, 97–105.
- (95) Kiener, P. A.; Waley, S. G. *Biochem. J.* **1978**, *169*, 197–204.
- (96) Beesley, T.; Gascoyne, N.; Knott-Hunziker, V.; Petursson, S.; Waley, S. G.; Jaurin, B.; Grundström, T. *Biochem. J.* **1983**, *209*, 229–233.
- (97) Strynadka, N. C.; Adachi, H.; Jensen, S. E.; Johns, K.; Sielecki, A.; Betzel, C.; Sutoh, K.; James, M. N. *Nature* **1992**, *359*, 700–705.
- (98) Martin, R.; Jones, J. B. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8394–8402.
- (99) Ness, S.; Martin, R.; Kindler, A. M.; Paetzel, M.; Gold, M.; Jensen, S. E.; Jones, J. B.; Strynadka, N. C. *Biochemistry* **2000**, *39*, 5312–5321.
- (100) Eidam, O.; Romagnoli, C.; Dalmaso, G.; Barelier, S.; Caselli, E.; Bonnet, R.; Shoichet, B. K.; Prati, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2012**, *109*, 17448–17453.
- (101) London, N.; Miller, R. M.; Krishnan, S.; Uchida, K.; Irwin, J. J.; Eidam, O.; Gibold, L.; Cimermančič, P.; Bonnet, R.; Shoichet, B. K.; Tauton, J. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1066–1072.
- (102) Santucci, M.; Spyrikis, F.; Cross, S.; Quotadamo, A.; Farina, D.; Tondi, D.; De Luca, F.; Docquier, J.-D.; Prieto, A. I.; Ibacache, C.; Blázquez, J.; Venturelli, A.; Cruciani, G.; Costi, M. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 17716.
- (103) Cendron, L.; Quotadamo, A.; Maso, L.; Bellio, P.; Montanari, M.; Celenza, G.; Venturelli, A.; Costi, M. P.; Tondi, D. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 650–655.
- (104) Lomovskaya, O.; Sun, D.; Rubio-Aparicio, D.; Nelson, K.; Tsivkovski, R.; Griffith, D. C.; Dudley, M. N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01443-17.
- (105) Dhillon, S. *Drugs* **2018**, *78*, 1259–1270.
- (106) Brem, J.; Cain, R.; Cahill, S.; McDonough, M. A.; Clifton, I. J.; Jiménez-Castellanos, J. C.; Avison, M. B.; Spencer, J.; Fishwick, C. W. G.; Schofield, C. J. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12406.

- (107) Cahill, S. T.; Cain, R.; Wang, D. Y.; Lohans, C. T.; Wareham, D. W.; Oswin, H. P.; Mohammed, J.; Spencer, J.; Fishwick, C. W.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J.; Brem, J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02260-16.
- (108) Hamrick, J. C.; Docquier, J. D.; Uehara, T.; Myers, C. L.; Six, D. A.; Chatwin, C. L.; John, K. J.; Vernacchio, S. F.; Cusick, S. M.; Trout, R. E. L.; Pozzi, C.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Mangani, S.; Liu, B.; Jackson, R. W.; Moeck, G.; Xerri, L.; Burns, C. J.; Pevear, D. C.; Daigle, D. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e01963-19.
- (109) Daigle, D.; Hamrick, J.; Chatwin, C.; Kurepina, N.; Kreiswirth, B. N.; Shields, R. K.; Oliver, A.; Clancy, C. J.; Nguyen, M.-H.; Pevear, D.; Xerri, L. *Open Forum Infect. Dis.* **2018**, *5*, S419–S420.
- (110) Krajnc, A.; Brem, J.; Hinchliffe, P.; Calvopiña, K.; Panduwawala, T. D.; Lang, P. A.; Kamps, J. J. A. G.; Tyrrell, J. M.; Widlake, E.; Seward, B. G.; Walsh, T. R.; Spencer, J.; Schofield, C. J. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8544–8556.
- (111) Hamrick, J.; Chatwin, C.; John, K.; Burns, C.; Xerri, L.; Moeck, G.; Pevear, D. *Abstracts of Papers*, 29<sup>th</sup> ECCMIC, Amsterdam, Netherlands, April 13–16, 2019.
- (112) Lomovskaya, O.; Tsivkovski, R.; Nelson, K.; Rubio-Aparicio, D.; Sun, D.; Troto, M.; Dudley, M. N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e00212-20.
- (113) 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. *J. Med. Chem.* **2020**. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01976>.
- (114) Tsivkovski, R.; Totrov, M.; Lomovskaya, O. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e00130-20.
- (115) Bonnefoy, A.; Dupuis-Hamelin, C.; Steier, V.; Delachaume, C.; Seys, C.; Stachyra, T.; Fairley, M.; Guitton, M.; Lampilas, M. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 410–417.
- (116) King, A. M.; King, D. T.; French, S.; Brouillette, E.; Asli, A. J.; Alexander, A. N.; Vuckovic, M.; Maiti, S. N.; Parr, Jr. T. R.; Brown, E. D.; Malouin, F.; Strynadka, N. C. J.; Wright, G. D. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 864–868.
- (117) Ehmann, D. E.; Jahic, H.; Ross, P. L.; Gu, R. F.; Hu, J.; Durand-Réville, T. F.; Lahiri, S.; Thresher, J.; Livchak, S.; Gao, N.; Palmer, T.; Walkup, G. K.; Fisher, S. L. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 27960–27971.
- (118) <https://www.drugbank.ca/drugs/DB09060>.
- (119) Smith, C. A.; Antunes, N. T.; Stewart, N. K.; Toth, M.; Kumarasiri, M.; Chang, M.; Mobashery, S.; Vakulenko, S. B. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 1107–1115.

- (120) Powles, M. A.; Galgoci, A.; Misura, A.; Colwell, L.; Dingley, K. H.; Tang, W.; Wu, J.; Blizzard, T.; Motyl, M.; Young, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02577-17.
- (121) Wu, J.; Racine, F.; Wismer, M. K.; Young, K.; Carr, D. M.; Xiao, J. C.; Katwaru, R.; Si, Q.; Harradine, P.; Motyl, M.; Bhagunde, P. R.; Rizk, M. L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02323-17.
- (122) Durand-Réville, T. F.; Gluler, S.; Comita-Prevoir, J.; Chen, B.; Bifulco, N.; Huynh, H.; Lahiri, S.; Shapiro, A. B.; McLeod, S. M.; Carter, N. M.; Moussa, S. H.; Velez-Vega, C.; Olivier, N. B.; McLaughlin, R.; Gao, N.; Thresher, J.; Palmer, T.; Andrews, B.; Giacobbe, R. A.; Newman, J. V.; Ehmann, D. E.; de Jonge, B.; O'Donnell, J.; Mueller, J. P.; Tommasi, R. A.; Miller, A. A. *Nat. Microb.* **2017**, *2*, 17104–17114.
- (123) Reck, F.; Bermingham, A.; Blais, J.; Casarez, A.; Colvin, R.; Dean, C. R.; Furegati, M.; Gamboa, L.; Growcott, E.; Li, C.; Lopez, S.; Metzger, L.; Nocito, S.; Ossola, F.; Phizackerley, K.; Rasper, D.; Shaul, J.; Shen, X.; Simmons, R. L.; Tang, D.; Tashiro, K.; Yue, Q. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 1045–1051.
- (124) O'Donnell, J.; Tanudra, A.; Chen, A.; Hines, D.; Tommasi, R.; Mueller, J. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 1378–1388.
- (125) Reading, C.; Cole, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 852–857.
- (126) Brown, A. G. *Drug Des. Deliv.* **1986**, *1*, 1–21.
- (127) Shapiro, A. B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01612-17.
- (128) Aronoff, S. C.; Jacobs, M. R.; Johenning, S.; Yamabe, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1984**, *26*, 580–582.
- (129) Papp-Wallace, K. M.; Bethel, C. R.; Caillon, J.; Barnes, M. D.; Potel, G.; Bajaksouzian, S.; Rutter, J. D.; Reghal, A.; Shapiro, S.; Taracila, M. A.; Jacobs, M. R.; Bonomo, R. A.; Jacqueline, C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00105-19.
- (130) Chen, Y. L.; Chang, C. W.; Hedberg, K. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3449–3452.
- (131) Vallejo, J. A.; Martínez-Gutián, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; González-Bello, C.; Poza, M.; Buynak, J. D.; Bethel, C. R.; Bonomo, R. A.; Bou, G.; Beceiro, A. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *7*, 2171–2180.
- (132) Balsamini, C.; Bedini, A.; Diamantini, G.; Spadoni, G.; Tarzia, G.; Tontini, A.; Di Fabio, R.; Donati, D. *Il Farmaco* **1999**, *54*, 101–111.
- (133) Buynak, J. D.; Sheri, A.; Pagadala, S. R. R. Preparation and antibacterial activity of  $\beta$ -lactamase inhibitory compounds. US 20100009954, January, 14, 2010.
- (134) Kalp, M.; Sheri, A.; Buynak, J. D.; Bethel, C. R.; Bonomo, R. A.; Carey, P. R. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21588–21591.
- (135) Micetich, R. G.; Singh, R. A. *Synthesis* **1985**, *1985*, 693–695.

- (136) Lavoie, E. J.; Parhi, A.; Pilch, D. S.; Zhang, Y.; Kaul, M. Preparation of biphenyl guanidines and related compounds as antimicrobial agents. WO2013106761, July, 18, 2013.
- (137) Hirai, K.; Mizushima, Y.; Doteuchi, M. Preparation of [thienopyridinylmethylthio]benzimidazoles as antiulcer agents. EP292051, November 23, 1988.
- (138) Thoraval, J. Y.; Nagai, W.; Yeung Lam Ko, Y. Y. C.; Carrie, R. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 3859–3868.
- (139) Alisop, A.; Brooks, G.; Edwards, P. D.; Kaura, A. C.; Southgate, R. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 921–928.
- (140) Kamiya, T.; Teraji, T.; Saito, Y.; Hashimoto, M.; Nakaguchi, O.; Oku, T. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 3001–3004.
- (141) Buynak, J. D.; Rao, S. A.; Doppalapudi, V. R.; Adam, G.; Petersen, P. J.; Nidamarthy, S. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1997–2002.
- (142) Rodríguez, D.; Maneiro, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; Beceiro, A.; González-Bello, C. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 3737–3755.
- (143) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI supplement M100*, 27<sup>th</sup> ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2017. [https://clsi.org/media/1469/m100s27\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1469/m100s27_sample.pdf)
- (144) <https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>
- (145) Schalk, I. J. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1159–1169.
- (146) Saha, M.; Sarkar, S.; Sarkar, B.; Sharma, B. K.; Bhattacharjee, S.; Tribedi, P. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 3984–3999.
- (147) Ratledge, C.; Dover, L. G. *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, *54*, 881–941.
- (148) Ahmed, E.; Holmström, S. J. M. *Microb. Biotechnol.* **2014**, *7*, 196–208.
- (149) Raymond, K. N.; Allred, B. E.; Sia, A. K. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2496–2505.
- (150) Raymond, K. N.; Carrano, C. J. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 183–190.
- (151) Miller, M. J.; McKee, J. A.; Minnick, A. A.; Dolence, E. K. *Biol. Met.* **1991**, *4*, 62–69.
- (152) McKee, J. A.; Sharma, S. K.; Miller, M. J. *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2*, 281–291.
- (153) <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-antibacterial-drug-treat-complicated-urinary-tract-infections-part-ongoing-efforts>
- (154) Page, M. G. P. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *69*, S529–S537.
- (155) Saino, H.; Sugiyabu, T.; Ueno, G.; Yamamoto, M.; Ishii, Y.; Miyano, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *19*, 3593–3597.
- (156) Richter, M. F.; Hergenrother, P. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1435*, 18–38.
- (157) Richter, M. F.; Drown, B. S.; Riley, A. P.; García, A.; Shirai, T.; Riley, L. S.; Hergenrother, P. J. *Nature* **2017**, *545*, 299–304.
- (158) Nestorovich, E. M.; Danelon, C.; Winterhalter, M.; Bezrukov, S. M.; *Proc.*

- Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 9789–9794.
- (159) Liénard, B. M. R.; Horsfall, L. E.; Galleni, M.; Frère, J.-M.; Schofield, C. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 964–968.
- (160) Matlin, S. A.; Chan, L.; Catherwood, F. J. *Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1990**, 89–96.
- (161) Miwatashi, S.; Suzuki, H.; Okawa, T.; Miyamoto, Y.; Yamasaki, K.; Hitomi, Y.; Shibuya, A. Aromatic ring compound. WO2013/12208 A1, February, 13, 2012.
- (162) English, A. R.; Restsema, J. A.; Girard, A. E.; Lynch, J. E.; Barth, W. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1978**, *14*, 414–419.
- (163) Viehman, J. A.; Nguyen, M. H.; Doi, Y. *Drugs* **2014**, *74*, 1315–1333.
- (164) Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 160–201.
- (165) Totir, M. A.; Helfand, M. S.; Carey, M. P.; Sheri, A.; Buynak, J. D.; Bonomo, R. A.; Carey, P. R. *Biochemistry* **2007**, *46*, 8980–8987.
- (166) Chen, C. C.; Herzberg, O. *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 1103–1113.
- (167) Padayatti, P. S.; Helfand, M. S.; Totir, M. A.; Carey, M. P.; Carey, P. R.; Bonomo, R. A.; van den Akker, F. J. *Biol. Chem.* **2005**, *280*, 34900–34907.
- (168) Kalp, M.; Totir, M. A.; Buynak, J. D.; Carey, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2338–2347.
- (169) Padayatti, P. S.; Helfand, M. S.; Totir, M. A.; Carey, M. P.; Hujer, A. M.; Carey, P. R.; Bonomo, R. A.; van den Akker, R. A. *Biochemistry* **2004**, *43*, 843–848.
- (170) Padayatti, P. S.; Sheri, A.; Totir, M. A.; Helfand, M. S.; Carey, M. P.; Anderson, V. E.; Carey, P. R.; Bethel, C. R.; Bonomo, R. A.; Buynak, J. D.; van den Akker, F. J. *Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13235–13242.
- (171) Corbella, X.; Ariza, J.; Ardanuy, C.; Vuelta, M.; Tubau, F.; Sora, M.; Pujol, M.; Gudiol, F. J. *Antimicrob. Chemother.* **1998**, *42*, 793–802.
- (172) Wood, G. C.; Hanes, S. D.; Croce, M. A.; Fabian, T. C.; Boucher, B. A. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *34*, 1425–1430.
- (173) Cisneros, J. M.; Reyes, M. J.; Pachon, J.; Becerril, B.; Caballero, F. J.; García-Garmendía, J. L.; Ortiz, C.; Cobacho, A. R. *Clin. Infect. Dis.* **1996**, *22*, 1026–1032.
- (174) Swenson, J. M.; Killgore, G. E.; Tenover, F. C. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 5102–5108.
- (175) Reddy, T.; Chopra, T.; Marchaim, D.; Pogue, J. M.; Alangaden, G.; Salimnia, H.; Boikov, D.; Navon-Venezia, S.; Akins, R.; Selman, P.; Dhar, S.; Kaye, S. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2235–2238.
- (176) Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 160–201.
- (177) Barnes, M. D.; Kumar, V.; Bethel, C. R.; Moussa, S. H.; O'Donnell, J.; Rutter, J. D.; Good, C. E.; Hujer, K. M.; Hujer, A. M.; Marshall, S. H.; Kreiswirth, B. N.; Richter, S. S.; Rather, P. N.; Jacobs, M. R.; Papp-Wallace, K. M.; van den Akker, F.; Bonomo, R. A. *mBio* **2019**, *10*, e00159-19.

- (178) Seifert, H.; Müller, C.; Stefanik, D.; Higgins, P. G.; Miller, A.; Kresken, M. J. *Antimicrob. Chemother.* **2020**. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa208>
- (179) Philips, O. A.; Reddy, A.V. V.; Setti, E. L.; Spevak, P.; Czajkowski, D. P.; Atwal, H.; Salama, S.; Micetich, R. G.; Maiti, S. N. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2847–2858.
- (180) Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*; Butterworth Heinemann: Oxford, 1996.
- (181) Tokuyama, R.; Wakamatsu, T.; Ichige, T.; Muto, S.; Itai, A. Preparation of *N*-(3,4-disubstituted phenyl)salicylamide derivatives as inhibitors of STAT6 and NF- $\kappa$ B activation. US7671058B2. June 19, 2007.





USC  
UNIVERSIDAD  
DE SANTIAGO  
DE COMPOSTELA

ANEXO III  
*Publicaciones*

---

1.  $\beta$ -Lactamase Inhibitors To Restore the Efficacy of Antibiotics against Superbugs

2. 6-Arylmethylidene Penicillin-Based Sulfone Inhibitors for Repurposing Antibiotic Efficiency in Priority Pathogens

