ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Esther
Colchón Pierna

Tesis doctoral

Nuevas Terapias Antibacterianas basadas en la Inhibición de las β-Lactamasas y del Enzima Siquimato Quinasa

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Ciencia y Tecnología Química

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

NUEVAS TERAPIAS ANTIBACTERIANAS BASADAS EN LA INHIBICIÓN DE LAS B-LACTAMASAS Y DEL ENZIMA SIQUIMATO QUINASA

Autor

Esther Colchón Pierna

Director: Concepción González Bello

Tutor/a: Concepción González Bello

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Quisiera utilizar este pequeño apartado para agradecer en primer lugar a la profesora Concepción González Bello, directora de esta tesis doctoral, por la invaluable oportunidad que me ha otorgado a lo largo de estos años para aprender y disfrutar de la investigación. Gracias por todos los sabios consejos y constante dedicación que han sido fundamentales en mi desarrollo académico, así como hacer posible mi permanencia en su grupo de investigación.

Al Ministerio de Economía y Competitividad por el apoyo financiero a través del proyecto PID2019-105512RB-I00 cofinanciado por la Agencia Estatal de Investigación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). También agradecer a la Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria da Xunta de Galicia por el apoyo a grupos de referencia competitiva GI-2166, mediante el proyecto ED431C 2021/29. A través de estos apoyos financieros, han contribuido de manera crucial al desarrollo y realización de esta tesis doctoral. Y por último agradecer a la Diputación da Coruña por la concesión de una bolsa de investigación 2022-Área de Ciencias durante el último año de mi doctorado.

Por supuesto no me puedo olvidar de las personas más importantes de mi vida, los que siempre están, y nunca me dejan caer. Gracias, gracias y mil gracias a mis padres, porque sin ellos no habría llegado hasta aquí.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

"Como no estas experimentado en las cosas del mundo, todas las cosas que tienen algo de dificultad parecen imposibles; confía en el tiempo, que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades"

Miguel de Cervantes –Don Quijote de la Mancha

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

Abreviaturas, Siglas, Acrónimos y Unidades

Resumen

1. Introducción....1

1.1 La Resistencia de las Bacterias a los Antibióticos: La Pandemia Silenciosa....3

1.2 Dianas Terapéuticas Objetivo de los Antibióticos en Uso Clínico....7

1.3 Principales Mecanismos de Resistencia Bacteriana a los Antibióticos en Uso Clínico8

1.4 Estrategias para el Tratamiento de Patógenos Multirresistentes....10

1.5 Las β-Lactamasas....12

1.6 Inhibidores de β-Lactamasas....17

1.6.1 1,6-Diazabiciclo[3.2.1]octanos....18

1.6.2 Ácidos Borónicos y Boronatos Cíclicos....20

1.7 Diseño de Antibióticos con Nuevos Mecanismos de Acción....24

1.7.1 El Enzima Siquimato Quinasa....27

1.7.2 Inhibidores Descritos de la Siquimato Quinasa....30

2. Objetivos....37

3. Resultados y Discusión....41

3.1 Desarrollo de Nuevos Inhibidores de β-lactamasas Basados en Sulfonopenicilinas43

3.1.1 Sulfonopenicilinas en Uso Clínico o Previamente Descritas....43

3.1.2 Estrategias sintéticas de introducción del grupo arilmetileno en la posición C6 de las penicilinas....48

3.1.3 Síntesis de los compuestos **52**....51

3.1.3.1 Primera aproximación....51

3.1.3.2 Segunda aproximación....53

3.1.3.3 Tercera aproximación....56

3.1.4 Funcionalización del grupo metilo pro–*R* de las penicilinas....58

3.1.5 Síntesis de los compuestos **53**....63

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.5.1 Derivados *O*-funcionalizados 63
3.1.5.2 Derivados *N*-funcionalizados 64
3.2 Inhibidores del Enzima Siquimato Quinasa 70
3.2.1 Inhibidores Basados en el Movimiento 70
3.2.2 Síntesis del compuesto **54** 75
3.2.2.1 Primera aproximación 75
3.2.2.2 Segunda aproximación 77
4. Metodología 81
4.1 Procedimientos Generales 83
4.2 Preparación de Inhibidores de β-Lactamasas 84
4.2.1 Compuesto **73a** 84
4.2.2 Compuesto **94** 84
4.2.3 Compuesto **102** 85
4.2.4 Compuesto **105a** 85
4.2.5 Compuesto **106a** 86
4.2.6 Compuesto **109a** 87
4.2.7 Compuesto **109b** 88
4.2.8 Compuesto **110a** 88
4.2.9 Compuesto **52a** 88
4.2.10 Compuesto **52b** 89
4.2.11 Compuesto **135** 89
4.2.12 Compuesto **136** 90
4.2.13 Compuesto **142** 90
4.2.14 Compuesto **146** 91
4.2.15 Compuesto **147** 91
4.2.16 Compuesto **154** 92
4.2.17 Compuesto **155** 92

4.2.18 Compuesto **157** 93
4.2.19 Compuesto **160** 93
4.2.20 Compuesto **161** 94
4.2.21 Compuesto **162** 94
4.2.22 Compuesto **163** 94
4.2.23 Compuesto **168** 95
4.2.24 Compuesto **169** 95
4.2.25 Compuesto **170** 96
4.2.26 Compuesto **171** 96
4.2.27 Compuesto **172** 97
4.2.28 Compuesto **173** 97
4.2.29 Compuesto **175** 98
4.2.30 Compuesto **176** 98
4.2.31 Compuesto **177** 99
4.2.32 Compuesto **178** 100
4.2.33 Compuesto **179** 100
4.2.34 Compuesto **181** 101
4.2.35 Compuesto **182** 102
4.2.36 Compuesto **183** 102
4.2.37 Compuesto **184** 102
4.2.38 Compuesto **185** 103
4.2.39 Compuesto **186** 103
4.2.40 Compuesto **187** 104
4.3 Preparación de Inhibidores del Enzima Siquimato Quinasa 104
4.3.1 Compuesto **200** 104
4.3.2 Compuesto **204** 105
4.3.3 Compuesto **205** 105

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.4 Compuesto **207** 106
4.3.5 Oxidación de la Amina **214** 106
4.3.5.1 Datos compuesto **215** 107
4.3.5.2 Datos compuesto **216** 107
4.3.5.3 Datos compuesto **217** 107
4.3.6 Compuesto **218** 108
4.3.7 Compuesto **219** 108
5. Conclusiones **111**
6. Bibliografía **115**
Anexo I: *Listado de Estructuras* 127
Anexo II: *Espectros de RMN* 139
Anexo III: *Publicación* 191

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Abreviaturas, Siglas, Acrónimos y Unidades

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Å	Amstrong
ac.	Acuoso
Ac	Acetilo
Ác.	Ácido
ABC	Transportadores dependientes de ATP
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
Ala	Alanina
AmpC	Enzimas β-lactamasas de tipo C
anh.	Anhidro
API	Active Pharmaceutical Ingredients
Ar	Aromático
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosín trifosfato
ax.	Axial
Boc	*terc*-butoxicarbonil
c	Concentración
c	Cuartete
ºC	Grados centígrados
cat.	Catalítico
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CSA	Ácido camforsulfónico
CHDL	β-Lactamasas de clase D capaz de hidrolizar carbapenems
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear
cm	Centímetros
^{13}C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
Cys	Cisteína
d	Doblete
δ	Desplazamiento químico expresado en ppm relativo al TMS
Δ	Reflujo
dd	Doble doblete
dt	Doble triplete
DAHP	3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato
DBN	1,5-diazabiciclo[4.3.0]non-5-eno
DBOs	Diazaciclooctanos
DEPT	Incremento no distorsionado por transferencia de polarización
DHF	Ácido dihidrofólico
DHFR	Dihidrofolato reductasa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DHPS	Dihidropteroato sintetasa
DIBAL-H	Hidruro de diisobutil aluminio
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DM	Dinámica Molecular
DMDO	Dimetildioxirano
DMF	*N,N*-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ec	Ecuatorial
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
EPSP	5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato
ESBLs	β-Lactamasas de espectro extendido
Et	Etilo
FDA	Administración de Alimentos de Medicamentos
g	Gramo
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
GTP	Guanosín trifosfato
h	Hora(s)
His	Histidina
HMBC	Espectroscopía de correlación heteronuclear a enlaces múltiples
HMQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear de un único cuanto
^{1}H-RMN	Resonancia magnético nuclear de protón
Hp	*Helicobacter pylori*
Hp-SQ	Siquimato quinasa de la cepa *Helicbacter pylori*
Hz	Hercio
IC_{50}	Concentración inhibitoria media máxima
I+D	Investigación y desarrollo
Ile	Isoleucina
Im	Imidazol
IMP	Imipenemasas
IR	Infrarrojo
IT	Intermedio tetrahédrico
J	Constante de acoplamiento expresada en Hz
K_i	Constante de inhibición
K_m	Constante de Michaelis Menten
LDA	Diisopropilamina de litio
LiHMDS	Litio bis(trimetilsilil)amida
Lys	Lisina

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

m	Multiplete
M	Molar
nM	Nanomolar
µM	Micromolar
MATE	Multidrug and toxic-compound extrusion
MBLs	Metalo-β-lactamasas
MCPBA	Ácido *meta*-cloroperbenzoico
Me	Metilo
Met	Metionina
MFS	Major facilitator superfamily
mg	Miligramo
MH^+	Ión molecular
min	Minuto(s)
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mmol	Milimoles
µmol	Micromoles
MS	Tamices moleculares
Mt	*Mycobacterium tuberculosis*
Mt-SQ	Siquimato quinasa de la cepa *Mycobacterium tuberculosis*
m/z	Relación masa/carga
NAD^+	Niotiamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
$NADP^+$	Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NDM	New Delhi metalo-β-lactamasas
NIH	National institute of health
NOE	Efecto nuclear overhauser
OMS	Organización mundial de la salud
OXAs	Oxacilinasas
PABA	Ácido *para*-aminobenzoico
PBP	Protein binding penicillin
PDB	Protein data bank
Pf	Punto de fusión
Phe	Fenilalanina
Ph	Fenilo
Pi	Piridina
ppm	Partes por millón
q	Quintuplete
QM/MM	Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular
quant.	Cuantitativo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RND	Resistance nodulation division
s	Singulete
sa	Singulete ancho
sat.	Saturado
Ser	Serina
SMR	Small multidrug resistance
SQ	Siquimato quinasa
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TAACF	Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility
TBAF	Fluoruro de tetra-*N*-butilamonio
TBAI	Yoduro de tetra-*N*-butilamonio
TBDPS	*tert*-butildifenilsililo
TBDPSCl	Cloruro de *tert*-butildifenilsililo
TFA	Ácido trifluoroacético
TFAA	Anhídrido del ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMEDA	*N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina
TMS	Trimetilsililo
$TMSN_3$	Trimetilsililazida
Val	Valina
VIM	Verona imipenemasa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Resumen

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Los antibióticos son probablemente los fármacos que más han contribuido a la medicina moderna, ya que han permitido curar enfermedades que en el pasado eran mortales, a incrementar significativamente la esperanza de vida, así como han ayudado a manejar las complicaciones infecciosas comunes en pacientes vulnerables sometidos a tratamiento, para los cuales la capacidad para tratar las infecciones secundarias es crucial. Desafortunadamente, hoy en día la eficacia de los antibióticos está seriamente comprometida por la aparición y propagación mundial de cepas bacterianas multirresistentes, que son bacterias capaces de evadir la acción de tres o más fármacos de forma simultánea. Este escenario tan decepcionante es la consecuencia de varios factores: (i) el carácter evolutivo intrínseco y adaptabilidad de las bacterias; (ii) el uso indiscriminado y abusivo que se ha venido haciendo de los antibióticos durante años; y (iii) la falta de inversión en I+D en el desarrollo de nuevos antibióticos por parte de las grandes empresas farmacéuticas después de los años 90, debido a la duración muy limitada de las terapias con antibióticos, lo que las hace menos rentables que los medicamentos utilizados para tratar enfermedades crónicas. Los niveles de resistencia actuales son tan alarmantes que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, de seguir esta tendencia, en el año 2050 el número de muertes por infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos superará a las producidas por cáncer. Por lo tanto, si no se toman medidas para abordar los problemas de resistencia a los antibióticos, corremos el riesgo de tener sólo unas pocas opciones para tratar las infecciones bacterianas.

Esta tesis doctoral pretende contribuir al avance del conocimiento en el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de las infecciones bacterianas más difíciles de tratar y potencialmente mortales. Por una parte, las investigaciones realizadas buscan contribuir al desarrollo de terapias destinadas a reducir el impacto de los mecanismos de resistencia más extendidos en los patógenos hospitalarios mortales, mediante el uso de inhibidores de resistencia que permitan restaurar la eficacia de los antibióticos en uso clínico. Así mismo, es objetivo de esta tesis doctoral el desarrollo de antibióticos con un nuevo mecanismo de acción basado en la desactivación de objetivos biológicos sin explorar en el ámbito clínico, evitando así procesos de resistencia cruzada.

El primer objetivo de esta tesis doctoral va dirigido al desarrollo de nuevos inhibidores de las β-lactamasas, enzimas que causan la hidrólisis de los antibióticos β-lactámicos, el 70% de los antibióticos prescritos, siendo el mecanismo de resistencia

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

bacteriana más extendido y frecuente en los patógenos Gram-negativos más peligrosos. En particular, esta tesis doctoral se centra en la inhibición de las carbapenemasas de tipo D, responsables de la hidrólisis de los carbapenems, considerados como los antibióticos de último recurso, y son producidas por las cepas bacterianas más peligrosas en el ámbito hospitalario, *A. baumannii, P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*. Para ello la tesis aborda el desarrollo de sulfonopenicilinas funcionalizadas en la posición C6 con heterociclos de cinco miembros conteniendo un átomo de nitrógeno en posición 2, los compuestos **52**. Además, la tesis aborda la funcionalización adicional del grupo metilo pro-*R* en las sulfonopenicilinas **52** con un átomo de nitrógeno heterocíclico, los compuestos **53**, que podría estar sustituidos con un grupo quelante de Fe(III) (catecol), con el objeto de dirigir su internalización en el periplasma utilizando las vías bacterianas de absorción de hierro. Para la preparación de los compuestos **52** se abordaron diversas estrategias sintéticas, que incluyen como etapas clave desde una reacción de Wittig, una reacción de acoplamiento cruzado carbono-carbono tipo Stille y una reacción de adición a un grupo carbonilo seguido de eliminación reductora, siendo esta última la más eficiente. La funcionalización adicional del grupo metilo se abordó utilizando diversas estrategias sintéticas, como reacciones de acoplamiento vía enlace éster y amida o reacciones de ciclación 1,3-dipolar, siendo esta última opción donde se obtuvieron los mejores resultados. Es en este objetivo donde se reproduce parcialmente información publicada en el artículo *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 1859–1881.

El segundo objetivo de esta tesis doctoral consistió en el desarrollo de compuestos que sean capaces de interferir con procesos metabólicos bacterianos esenciales para las bacterias patógenas, pero que no sean objetivo de ningún fármaco comercial. En concreto, se centra en el desarrollo de potenciales inhibidores de la siquimato quinasa (SQ, EC 2.7.1.71), el enzima que cataliza la conversión de ácido siquímico en siquimato 3-fosfato, la quinta etapa de la ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos. Este enzima es esencial en patógenos muy relevantes como *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Acinetobacter baylyi*, *Haemophilus influenzae*, *Francisella novicida* y *Pseudomonas aeruginosa*, y no está presente en animales, por lo que la convierte en un objetivo atractivo para el desarrollo de nuevos fármacos contra patógenos potencialmente mortales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para el diseño de los inhibidores, se ha implementado un concepto interesante y poco explotado en el diseño de fármacos, el control de la conformación de la diana. Utilizando la estrategia de «diseño basado en movimiento», se busca el desarrollo de ligandos capaces de bloquear el cierre del centro activo reduciendo la flexibilidad de los dos dominios clave en el enzima, LID y SB. Esta estrategia permite diseñar ligandos que se dirigen a cavidades adicionales generadas durante el movimiento, que quedan ocultas si no se tiene en cuenta la plasticidad intrínseca de la diana. En base a resultados previos realizados en nuestro grupo de investigación, se abordó el desarrollo de análogos del sustrato natural, sustituidos en la posición C5 con grupos aromáticos voluminosos unidos al anillo ciclohexénico a través por un grupo de hidroxilamina, los compuestos **54**. Con ello se pretende reducir la basicidad del grupo amino evitando la repulsión electrostática con los residuos de arginina presentes en el centro activo. La síntesis de estos compuestos se abordó a través de dos rutas sintéticas, cuyas etapas clave consistieron en una reacción de aminación reductora entre un grupo cetona y una bencilhidroxilamina, o mediante oxidación selectiva del grupo amino.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Introducción

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.1 La Resistencia de las Bacterias a los Antibióticos: La Pandemia Silenciosa

El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 supuso un punto de inflexión en la historia de la Medicina y el comienzo de la llamada "Edad de Oro" en la terapia antimicrobiana.[1] Su impacto en la salud humana y animal ha sido muy destacado ya que. (i) han permitido salvar millones de vidas; (ii) han contribuido significativamente a incrementar la esperanza de vida; y (iii) se han convertido en herramientas terapéuticas fundamentales en el tratamiento de otras enfermedades, en especial, en pacientes con un sistema inmune comprometido, tales como los sometidos a quimioterapia contra el cáncer, diálisis para la insuficiencia renal, trasplante de órganos, etc.

Sin embargo, actualmente la eficacia de los antibióticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas está seriamente comprometida con la creciente aparición y propagación a nivel mundial de las bacterias multirresistentes, es decir, patógenos resistentes a tres o más antibióticos diferentes de forma simultánea.[2] La alta capacidad evolutiva y de proliferación inherente de las bacterias favorece, junto con la exposición a estos medicamentos, es, en gran parte, responsable de que este fenómeno natural haya alcanzado proporciones tan alarmantes.[3] Así, por ejemplo, tres años antes del desarrollo comercial de la penicilina ya se detectaron cepas bacterianas resistentes a dicho antibiótico (Figura 1.1).[4] La resistencia a los antibióticos se produce mediante la adquisición horizontal de mecanismos de resistencia de amplio espectro y, en ciertos casos, mediante la selección de mutaciones en genes. Este mecanismo se ha visto incentivado, en gran medida, por el uso inapropiado y excesivo de los antibióticos, tanto en el entorno hospitalario, como en la agricultura y la ganadería, así como, en la contaminación medioambiental, resultado de la descarga de grandes cantidades de ingredientes farmacéuticos activos, conocidos como API (por sus siglas en inglés, Active

[1] Fleming, A. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226–236.

[2] Rochford, C.; Sridhar, D.; Wood, N.; Saleh, Z.; Hartenstein, L.; Ahlawat, H.; Whiting, E.; Dybul, M.; Cars, O.; Goosby, E.; Cassels, A.; Velasquez, G.; Hoffman, S.; Baris, E.; Wadsworth, J.; Gyansa-Lutterodt, M.; Davies, S. *The Lancet* **2018**, *391*, 1976–1978.

[3] 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.

[4] Abraham, E. P.; Chain, E. *Nature* **1940**, *146*, 837.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Pharmaceutical Ingredients), en sistemas acuáticos.[5] Además, la falta de inversión en I+D en el desarrollo de nuevos fármacos por parte de la industria farmacéutica a partir de los años 90, ha contribuido también de forma importante a incrementar el problema. Este escaso interés se atribuye, principalmente, a los limitados beneficios económicos que ofrece este tipo de fármacos, ya que se utilizan por períodos cortos de tiempo (8-10 días), pero el coste asociado a su desarrollo y comercialización, que puede alcanzar entre 500 y 1000 millones de euros, es equivalente al de otras medicinas dirigidas a terapias crónicas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[5] Chemaly, R. F.; Simmons, S.; Dale, C.; Ghantoji, S. S.; Rodríguez, M.; Grubb, J.; Stachowiak, J.; Stibich, M. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **2014**, *2*, 79–90.

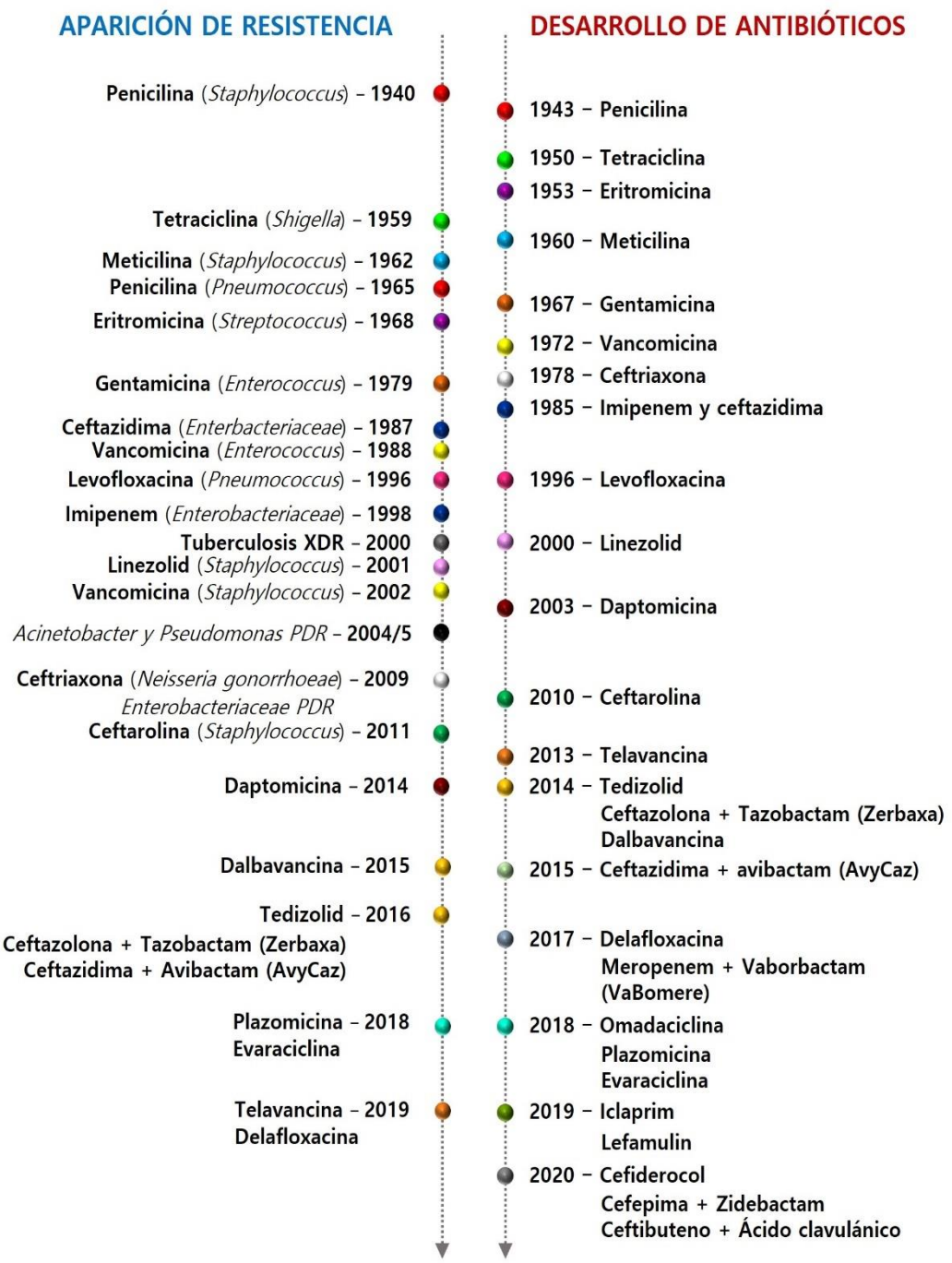


Figura 1.1 Cronología que muestra el descubrimiento de los principales antibióticos y la posterior aparición de resistencia contra ellos.[6]

La pérdida de eficacia de los antibióticos disponibles actualmente es tan alarmante que la Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé la posibilidad de ingresar en una "era post-antibiótica" en la cual infecciones comunes podrían volverse mortales en los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[6] Chakraborty, N.; Jha, D.; Roy, D.; Kumar, P.; Singh-Gaurav, S.; Marinuthu, K.; Ng, O. T.; Lakshminarayanan, R.; Kumar-Verma, N.; Gautam, H. K. *J. Nanobiotech.* 2022, *20*, 375.

próximos años.[7] Para poner esta amenaza en perspectiva, un análisis realizado en 2019 involucrando a 204 países reveló que las infecciones bacterianas multirresistentes causaron la muerte de 4.95 millones de personas en el mundo.[8,9] De seguir esta tendencia se prevé que la resistencia podría causar aproximadamente 10 millones de muertes al año en el año 2050.

En febrero de 2017, la OMS publicó una lista priorizada de «patógenos» para los cuales existe una demanda urgente de nuevos tratamientos, y para los que aconseja centrar los esfuerzos de investigación (Tabla 1.1).[10] La lista se divide en tres categorías: prioridad crítica, elevada y media.[11] Los patógenos de prioridad crítica, los más peligrosos en el entorno hospitalario y los centros de la tercera edad, son las bacterias Gram-negativas resistentes a los carbapenems, los antibióticos considerados de último recurso: *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* y diversas Enterobacteriaceae (incluyendo *Klebsiella pneumonae, Escherichia coli, Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., y *Morganella* spp.).[12,13] Es evidente por tanto que urge el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de las infecciones causadas por las bacterias patógenas más peligrosas.

[7] Tocconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D. L. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327.

[8] Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. **2022**, *399*, 629–655.

[9] Vikesland, P.; Garner, E.; Gupta, S.; Kang, S.; Maile-Moskowitz, A.; Zhu, N. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 916–924.

[10] WHO. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery and Development of New Antibiotics. **2017**. (https://remed.org/wp-content/uploads/2017/03/lobal-priority-list-of-antibiotic-resistant-bacteria-2017.pdf) (último acceso el 27 de septiembre 2023).

[11] Prioritization of Pathogens to Guide Discovery, Research, and Development of New Antibiotics for Drug Resistant Bacterial Infections, Including Tuberculosis. Geneva: World Health Organization; **2017**, (WHO/EMP/IAU/2017.12).

[12] Silver, L. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 6379–6389.

[13] Sheu, C. C.; Chang, Y. T.; Lin, S. Y.; Chen, Y. H.; Hsueh, P. R. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 80.

Tabla 1.1 Lista global de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos por la OMS.

Prioridad	Patógeno
Crítica	*Acinetobacter baumanni,* resistente a los carbapenems
	Pseudomonas aeruginosa, resistente a los carbapenems
	Enterobacteriaceae,[a] resistente a los carbapenem, y a cefalosporinas de 3ª generación
	Mycobacteria, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*
Elevada	*Enterococcus faecium,* resistente a la vancomicina
	Staphylococcus aureus, resistente a la meticilina y a vancomicina
	Helicobacter pylori, resistente a la claritromicina
	Campylobacter, resistente a la fluoroquinolona
	Salmonela spp., resistente a la fluoroquinolona
	Neisseria gonorrhoeae, resistente a cefalosporina de 3ª generación y a la fluoroquinolona
Media	*Streptococcus pneumoniae,* no susceptible a la penicilina
	Haemophilus influenza, resistente a la ampicilina
	Shigella spp., resistente a las fluoroquinolonas

[a] Incluye *Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., y *Morganella* spp.

1.2 Dianas Terapéuticas Objetivo de los Antibióticos en Uso Clínico

La gran mayoría de los antibióticos en uso clínico inciden sobre un conjunto limitado de objetivos biológicos o procesos clave para la supervivencia de la bacteria (Figura 1.2).[14,15] En concreto:

(i) La síntesis de las proteínas: se trata de inhibidores de la síntesis de proteínas que actúan selectivamente sobre los ribosomas. Entre ellos, destacan importantes antibióticos como los macrólidos, las oxazolidinonas y las pleuromutilinas que se unen selectivamente a la subunidad 50S de los ribosomas, o los aminoglucósidos y tetraciclinas que interfieren en la subunidad 30S.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[14] Walsh, C. *Nature*, **2000**, *406*, 775.

[15] Etebu, E.; Arikekpar, I. *Int. J. Appl. Biotechnol. Res.* **2016**, *4*, 90–101.

(ii) La biosíntesis de la pared celular: en este caso los fármacos inciden sobre el el peptidoglicano, una estructura de cadenas entrecruzadas de péptido y glucanos (*N*-acetil glucosamina y ácido *N*-acetil murámico) unidas de manera covalente. Los enzimas bifuncionales que contienen dominios de transpeptidasa y transglicosilasa son las dianas de los antibióticos β-lactámicos, como las penicilinas y las cefalosporinas, miméticos del grupo Ala-Ala que reconoce. Estos compuestos causan la modificación covalente del centro activo, evitando la regeneración de la pared celular, volviendo a la bacteria vulnerable frente a la hidrólisis y susceptible a la lisis.

(iii) Reparación y replicación del ADN: los antibióticos de este grupo, como las fluoroquinolonas, especialmente, el ciprofloxacino, son inhibidores de la formación de nucleótidos y/o bloqueadores de los factores de transcripción y reparación del ADN.

(iv) La membrana plasmática: los fármacos que inciden sobre la membrana celular bacteriana alteran su estructura y función, perturbando así el equilibrio iónico, así como la pérdida de componentes citoplasmáticos. Esto causa lisis celular y, por tanto, la muerte de la bacteria.[16]

(v) La biosíntesis del ácido fólico: la síntesis de los folatos es crucial para las bacterias ya que define su capacidad de replicación y crecimiento. Los antibióticos que inciden sobre la ruta de los folatos bloquean la acción fundamentalmente de dos enzimas, la dihidropteroato sintetasa (DHPS) y la dihidrofolato reductasa (DHFR). Ambas son esenciales para la producción de tetrahidrofolato (THF), cofactor en la síntesis de los nucleótidos.

1.3 Principales Mecanismos de Resistencia Bacteriana a los Antibióticos en Uso Clínico

Los principales mecanismos de resistencia desarrollado por las bacterias para eludir la acción de los antibióticos son los siguientes (Figura 1.2):

(i) La inactivación de los antibióticos: consiste en la producción de enzimas que catalizan la desactivación del antibiótico antes de que incida sobre su diana, bien causando su hidrólisis, o su modificación covalente (acetilación, fosforilación). Este mecanismo representa la causa más prevalente de resistencia a los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[16] Poirel, L.; Jayol, A.; Nordmann, P. *Clin. Microbiol. Rev.* 2017, *30*, 557–596.

antibióticos β-lactámicos, el 70% de los fármacos prescritos, en las bacterias Gram-negativas, la producción de las β-lactamasas. Estos enzimas hidrolizan el anillo β-lactámico responsable de su actividad dando lugar a especies inactivas.

(ii) La activación de las bombas de expulsión: Las bacterias disponen de un mecanismo específico de transporte de una amplia gama de compuestos, las bombas de expulsión, que activan y desactivan a demanda para expulsar el antibiótico al medio externo. Este proceso es particularmente relevante en especies bacterianas como *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.

(iii) Cambios en la permeabilidad de la membrana externa: la bacteria modifica la estructura de su membrana externa para evitar la entrada de fármacos a su interior celular. Estos cambios dificultan la entrada efectiva del antibiótico, disminuyendo su absorción.

(iv) Modificaciones en la diana terapéutica: la bacteria induce cambios en la estructura o la función de la diana, que evita la interacción eficaz del antibiótico con su diana. Este mecanismo implica tanto mutaciones en el gen que codifica la diana, como modificaciones en la estructura de la proteína o la producción de proteínas de unión que bloquean la interacción fármaco-proteína.

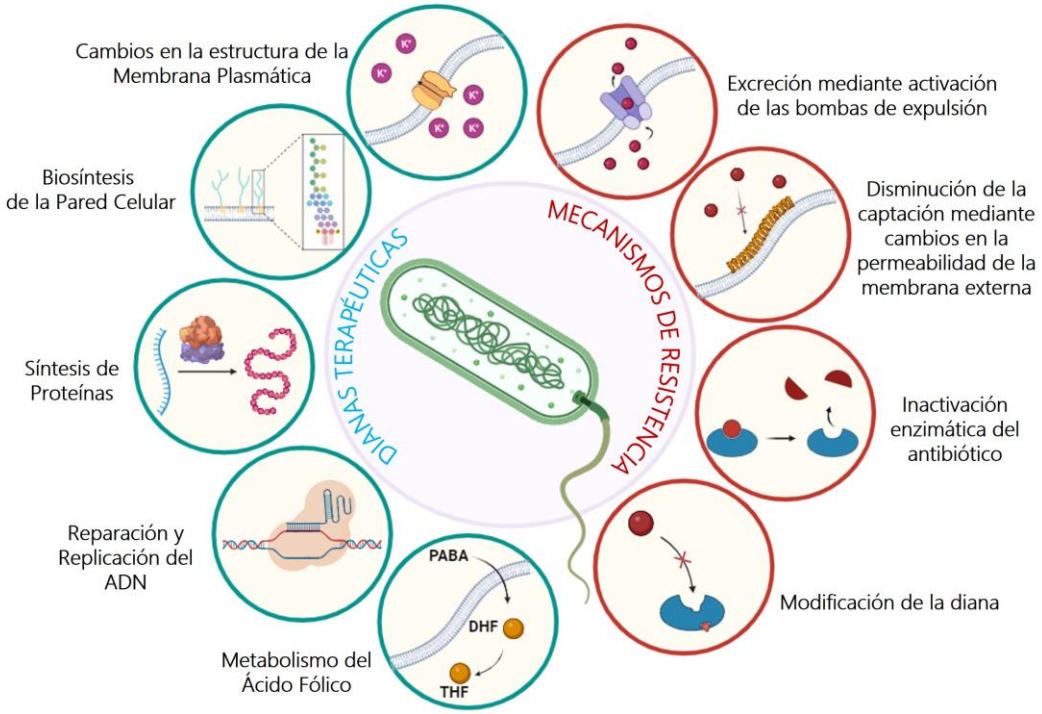


Figura 1.2 Representación esquemática de las principales dianas terapéuticas de los antibióticos en uso clínico (azul), y los mecanismos de resistencia bacteriana a los mismos (rojo). PABA: ácido *para*-aminobenzoico, DHF: ácido dihidrofólico, THF: ácido tetrahidrofólico.

1.4 Estrategias para el Tratamiento de Patógenos Multirresistentes

Actualmente se están explorando diversas estrategias y/o terapias innovadoras para frenar el impacto de los patógenos multirresistentes, entre las que destacan:

(i) El uso de bacteriófagos, virus que infectan exclusivamente a las bacterias.[17]

(ii) Inhibición de la virulencia bacteriana, mediante el desarrollo de compuestos capaces de bloquear los mecanismos de infección de la bacteria, como la formación de biopelículas, toxinas, comunicación célula-célula (también conocido como "Quorum Sensing").[18,19]

(iii) Inmunoterapia, con el desarrollo de vacunas que refuercen la respuesta inmunológica.[20]

(iv) Desarrollo de antibióticos con un nuevo mecanismo de acción basado en la desactivación de procesos biológicos inexplorados.

(v) Inhibidores de resistencia, que en combinación con el antibiótico restauran la acción del fármaco. Estos compuestos, también conocidos como "antibióticos adyuvantes", "potenciadores de antibióticos" o "bloqueadores de la resistencia", presentan muy poca o ninguna actividad antibiótica pero coadministrados con el antibiótico bloquean el mecanismo de resistencia bacteriano restaurando la acción terapéutica del antibiótico.[21]

De entre todas ellas, la terapia combinada "antibiótico + inhibidor de resistencia" es la estrategia más exitosa hasta la fecha y perseguida por la industria farmacéutica.[22] El uso de inhibidores de resistencia presenta dos grandes ventajas: (i) permite reutilizar el excelente arsenal de antibióticos en uso clínico que han demostrado ser seguros y efectivos durante más de 50 años; y (ii) evita la necesidad de dedicar grandes esfuerzos a la desafiante y costosa identificación y validación de nuevos objetivos biológicos.

[17] Rios, A. C.; Moutinho, C. G.; Pinto, F, C.; Del Fiol, F. S.; Jozala, A.; Chaud, M. V.; Vila, M. M. D. C.; Teixeira, J. A.; Balcão. *Microbiol. Research* **2016**, *191*, 51–80.

[18] Dickey, S. W.; Cheung, G. Y. C.; Otto, M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 457–471.

[19] Buroni, S.; Chiarelli, L. R. *Future Microbiol.* **2020**, *15*, 299–301.

[20] Qadri, H.; Shah, A. H.; Alkhanani, M.; Almilaibary, A.; Mir, M. A. *Front. Med.* **2023**, *10*, 1135541.

[21] Tarín-Pelló, A.; Suay-García, B.; Pérez-García, M. T. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2020**, *20*, 1095–1108.

[22] Chang, M.; Mahasenan, K. V.; Hermoso, J. A.; Mobashery, S. *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 917–929.

Hasta la fecha, las investigaciones en el ámbito de los antibióticos adyuvantes se han centrado en el desarrollo de:[23]

(A) inhibidores de las bombas de eflujo: estas últimas son proteínas de transporte que eliminan una amplia variedad de compuestos tóxicos para la bacteria, incluyendo antibióticos. Pese al gran potencial de esta estrategia, su desarrollo ha resultado ser un desafío debido a la falta de especificidad de la mayoría de las bombas de eflujo. Se clasifican en cinco grupos, atendiendo a su homología de secuencia aminoacídica, especificidad por el sustrato, características supramoleculares y la fuente de energía, a saber: (i) transportadores dependientes de ATP (ABC), (ii) de extrusión de multifármacos y compuestos tóxicos (MATE, del término en inglés multidrug and toxic-compound extrusion), (iii) de la superfamilia de facilitadores principales (MFS, del término en inglés major facilitator superfamily), (iv) la superfamilia de resistencia pequeña a múltiples fármacos (SMR, del término en inglés small multidrug resistance) y (v) la superfamilia de nodulación de resistencia y división celular (RND, del término en inglés resistance nodulation division), siendo estas últimas las más prominentes y clínicamente más relevantes.

(B) Permeabilizadores de la membrana externa: son compuestos catiónicos y anfifílicos o quelantes que desestabilizan la parte externa de la membrana externa, ya sea mediante la interacción con los lipopolisacáridos polianiónicos (componentes de la membrana externa) o mediante la captura de cationes del medio externo, respectivamente. Como resultado, esta región de la membrana externa se vuelve más permeable, facilitando la captación del medicamento. Algunos agentes permeabilizadores incluyen las polimixinas, los aminoglicósidos, los péptidos catiónicos, entre otros.

(C) Inhibidores de β-lactamasas: son los antibióticos adyuvantes más exitosos y en uso clínico que permiten restaurar la eficacia de los antibióticos β-lactámicos. Estos inhibidores protegen a estos fármacos de un mecanismo de inactivación bacteriana muy eficiente que consiste en la hidrólisis del anillo β-lactámico. catalizadas por las β-lactamasas (EC 3.5.2.6). Tras el gran éxito inicial obtenido con el descubrimiento del compuesto natural, el ácido clavulánico (**1**),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[23] Si, Z.; Pethe, K.; Chan-Park, M. B. *JACS Au,* 2023, *3*, 276–292.

actualmente se dispone de otros inhibidores β-lactámicos en uso clínico, así como otros en desarrollo (Figura 1.3).

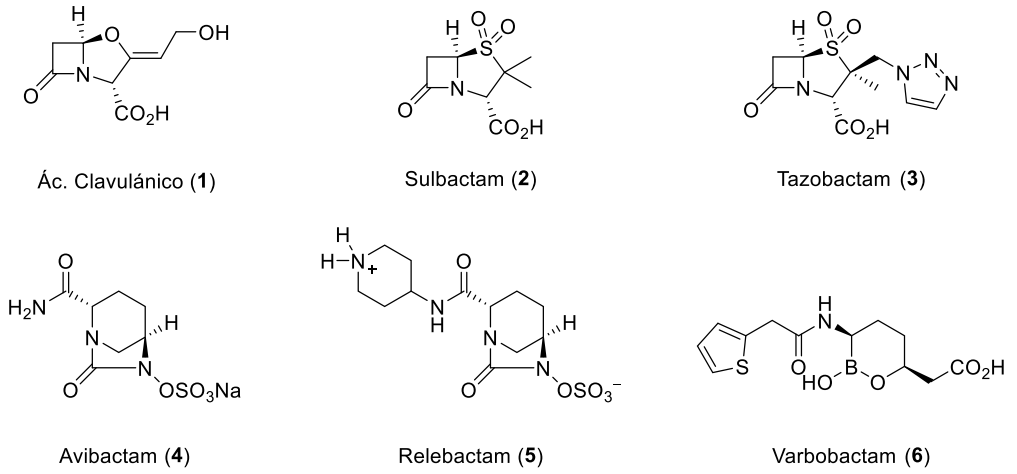


Figura 1.3 Inhibidores de β-lactamasas que en combinación con un antibiótico se encuentran actualmente en uso clínico.

1.5 Las β-Lactamasas

Los antibióticos β-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, y carbapenems) inhiben los enzimas involucrados en la síntesis de la pared celular bacteriana, en concreto, causan la acetilación del residuo de serina catalítico de las proteínas esenciales de unión a la penicilina (PBP, de las siglas en inglés penicillin-binding proteins), que actúan como transpeptidasas durante las etapas finales de la biosíntesis de la pared celular impidiendo la formación de los peptidoglicanos. El mecanismo de las PBP se inicia con el ataque nucleófilo del grupo hidroxilo de la cadena lateral del residuo de serina catalítico al residuo de D-Ala situado en la cadena lateral del pentapéptido unido a una cadena de polisacárido, para dar lugar al intermedio acil-enzima. A continuación, este intermedio sufre el ataque nucleófilo de la cadena lateral del grupo pentaglicina unido a otra unidad de polisacárido. Como resultado de este proceso se forma una red de peptidoglicano constituido por polisacáridos formados por unidades de *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilmurámico alternadas, unidos mediante cadenas peptídicas. La similitud estructural entre la D-Ala-D-Ala de la unidad de dipéptido en el extremo carboxi terminal del pentapéptido y el anillo β-lactámico, una vez unido covalentemente al residuo de serina, hace que sean buenos inhibidores de las PBP. Como resultado de esta modificación, la pared celular se vuelve frágil por

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

degradación de la capa de peptidoglicano, lo que desencadena en la muerte celular (Figura 1.4).[24]

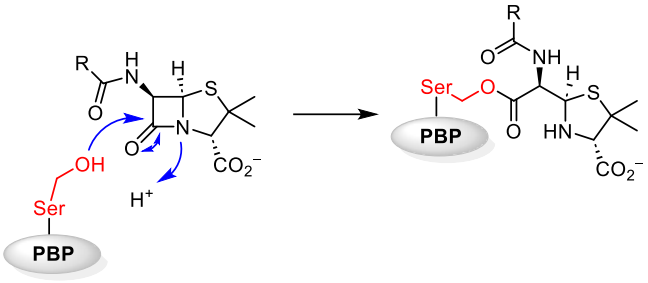


Figura 1.4 Mecanismo de la unión covalente de la penicilina a la proteína fijadora de penicilina (PBP).[25]

La gran eficacia de los antibióticos β-lactámicos, además de su baja toxicidad demostrada durante más de 50 años, han convertido a estos fármacos en un pilar terapéutico clave en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, constituyendo el 70% de los fármacos recetados actualmente a nivel mundial.[26] Desafortunadamente, su utilidad clínica ha disminuido drásticamente conforme se han ido utilizando por la creciente aparición y propagación a nivel mundial de cepas bacterianas productoras de β-lactamasas, los enzimas que catalizan la hidrólisis del anillo β-lactámico para producir especies inactivas. Actualmente se han identificado más de 8100 β-lactamasas diferentes.[27]

Ambler fue el primero en proponer un sistema de clasificación de las β-lactamasas basado en la homología en la secuencia de aminoácidos denominadas clases A, B, C y

[24] Bush, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01076-18.

[25] Anderson, R. J.; Groundwater, P. W.; Todd, A.; Worsley, A. J. *Antibacterial agents, mode of action, mechanisms of resistance and clinical applications*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, 2012.

[26] (a) Dhara, A. K.; Nayak, A. K.; Chattopadhyay, D. Antibiotics: Therapeutic Spectrum and Limitations. Elsevier Sciences: London & Oxford (UK); San Diego & Cambridge (USA), 2023. (b) Bush, K.; Bradford, P. A.; *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, 025247. (c) Toth, M.; Antunes, N. T.; Stewart, N. K.; Frase, H.; Bhattacharya, M.; Smith, C. A.; Vakulenko, S. B. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 9.

[27] (a) Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R. A.; Dabos, M. L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P.; Iorga, B. I. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 917–919. (b) BLDB. Beta-Lactamase DataBase – Structure and Function. http://www.bldb.eu/. (Último acceso el 14 de diciembre de 2023).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

D.[28] Estos enzimas tienen capacidades hidrolíticas bastante distintas y son estructuralmente diversas, siendo las clases más frecuentes A (≈32%) y C (≈30%), seguidas de D (≈20%) y B (≈14%).

Las clases A, C y D son serina-β-lactamasas, que hidrolizan el anillo β-lactámico mediante un mecanismo de catálisis covalente utilizando un residuo de serina como nucleófilo (Figura 1.5.A). El proceso se inicia con la desprotonación de la serina catalítica por un residuo que actúa como base general (generalmente lisina carboxilada o glutamato), seguido del ataque nucleófilo al grupo carbonilo de la β-lactama. En consecuencia, se forma el intermedio tetraédrico **IT1**, que se estabiliza mediante varios enlaces de hidrógeno con los grupos NH principales de los residuos situados en la base del centro activo (hueco oxianiónico). Posteriormente, se produce una apertura del anillo β-lactámico dando lugar al aducto **I**, que finalmente se hidroliza por ataque de una molécula de agua con la asistencia de un residuo del centro activo que actúa como base general. Este proceso conduce a la inactivación del antibiótico y la regeneración de la β-lactamasa.

Las β-lactamasas de clase B inactivan los antibióticos β-lactámicos a través de un mecanismo completamente distinto que no implica la formación de aductos ligando-enzima (Figura 1.5.B). Se dividen en tres subclases, B1, B2 y B3. Las subclases B1 y B3, que son las más abundantes de las tres, exhiben una actividad de amplio espectro ya que pueden hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenems. Todas las β-lactamasas B1 y la mayoría de las B3 son hidrolasas di-zinc-dependientes. Por el contrario, los enzimas B2 son hidrolasas mono-zinc-dependientes e hidrolizan específicamente los carbapenems, presentando escasa eficacia frente a las penicilinas y las cefalosporinas.

Las β-lactamasas de clase B catalizan la hidrólisis del enlace β-lactámico utilizando un anión hidróxido como nucleófilo (catálisis no covalente) que está unido a uno o dos iones Zn (II) (Figura 1.5.B).[29] La hidrólisis catalizada por las subclases B1 y B3 se inicia mediante la coordinación del grupo carboxilato al centro metálico 2 (sitio Zn2) y de su grupo carbonilo al centro metálico 1 (sitio Zn1). Esta coordinación desencadena el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo ubicado entre los dos iones, conduciendo así al

[28] Ambler, R. P.; Coulson, A. F.; Frere, J. M.; Ghuysen, J M.; Joris, B.; Forsman, M.; Levesque, R. C.; Tiraby, G.; Waley, S. G. *Biochem. J.* **1991**, *276*, 269–270.

[29] Meini, M. R.; Llarrull, L. I.; Vila, A. J. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 3419–3432.

estado de transición tetraédrico y la escisión del enlace C–N para formar el intermedio tetraédrico **IT3**, que se estabiliza mediante la coordinación al metal. Este intermediario sufre la apertura del anillo, dando lugar al intermediario aniónico **II** que finalmente se protona para la liberación del producto.[30,31]

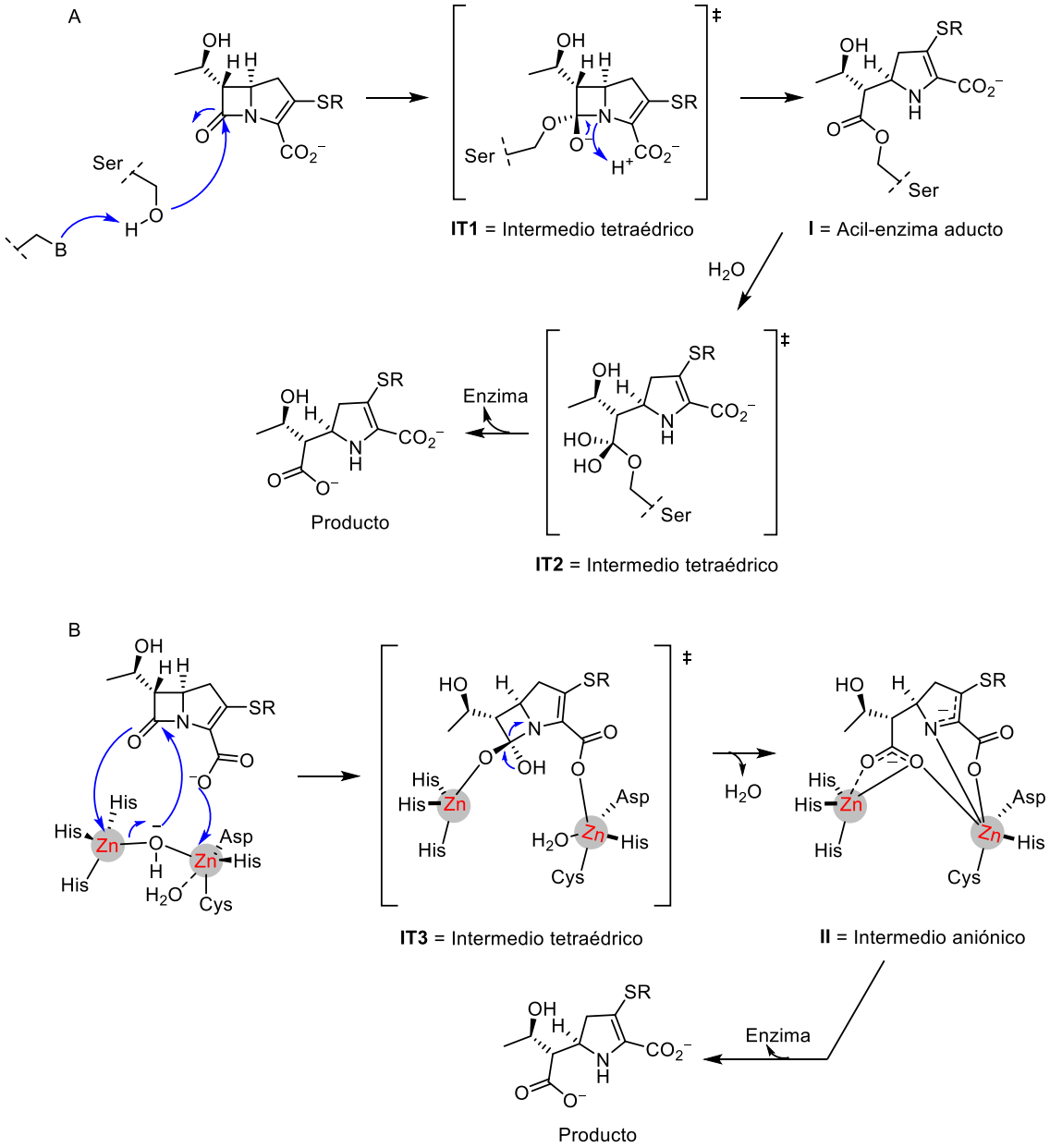


Figura 1.5 Hidrólisis de los carbapenems catalizada por A) serina-β-lactamasas y B) metalo-β-lactamasas. R = cadena lateral de carbapenem.

[30] Lence, E.; González-Bello, C. *Adv. Therap.* **2021**, *4*, 2000246.

[31] González-Bello, C.; Rodríguez, D.; Pernas, M.; Rodríguez, A.; Colchón, E. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 1859–1881.

Las β-lactamasas de clase A, también denominadas penicilinasas, hidrolizan penicilinas y cefalosporinas, además tienen la capacidad de propagarse fácilmente a través de plásmidos, lo que ha generado la aparición de cepas productoras de β-lactamasas de espectro extendido (ESBL, del término en inglés Extended Spectrum Beta-Lactamase), capaces de hidrolizar un rango más amplio de antibióticos β-lactámicos. Los enzimas más representativos de esta familia son PC, TEM, SHV, CTX-M y KPC. Las β-lactamasas de clase B confieren resistencia a las penicilinas, las cefalosporinas, y los carbapenems. En los últimos años, su relevancia clínica ha aumentado considerablemente debido a la propagación de familias de enzimas como NDM (New Delhi metalo-β-lactamasa), VIM (Verona imipenemasa) e IMP (imipenemasas) en bacterias como *P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*. Por otro lado, las β-lactamasas de clase C, también denominadas AmpC, en su mayoría son cromosómicas (aunque se han observado varias β-lactamasas de clase C mediadas por plásmidos) e hidrolizan cefalosporinas. Esto supone que las cepas productoras de estos enzimas son intrínsicamente resistentes a las cefalosporinas. Algunos ejemplos son CMY, FOX y DHA, frecuentes en bacterias como *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*. Por último, las β-lactamasas de clase D, conocidas como "oxacilinasas" (OXA), son el grupo de β-lactamasas de crecimiento más rápido. Estos enzimas hidrolizan penicilinas, cefalosporinas de espectro expandido (p. ej., cefotaxima, ceftazima y cefepima), meticilina y aztreonam. Preocupa especialmente la creciente aparición de algunas enzimas de clase D con actividad carbapenemasa (β-lactamasas de clase D que hidrolizan carbapenems), que están ampliamente dispersas en especies clínicamente relevantes como *A. baumannii* (p. ej., OXA-23, OXA-24/40) o *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, OXA-48).[32] A diferencia de otras β-lactamasas, las carbapenemasas de clase D tienen un centro activo particular, con una entrada rígida y apolar en forma de túnel, que está compuesta por un residuo de metionina y tirosina (OXA-24/40) o fenilalanina (OXA-23), que facilita un control exquisito de la conformación del sustrato para la hidrólisis catalizada por serina, que permite mejorar la actividad de la carbapenemasa. Como consecuencia, la serina catalítica permanece aislada del disolvente y el túnel se comporta como un filtro hidrofóbico que controla el acceso al centro activo solo a ciertos sustratos (Figura 1.6). Desde el punto de vista del diseño de fármacos, esta disposición del centro activo es un reto debido a las limitaciones espaciales y geométricas en comparación con los centros activos más abiertos de las otras β-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[32] 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.

lactamasas. Esto hace que actualmente la mayoría de los inhibidores disponibles en clínica sean poco eficaces frente a este tipo de β-lactamasas.

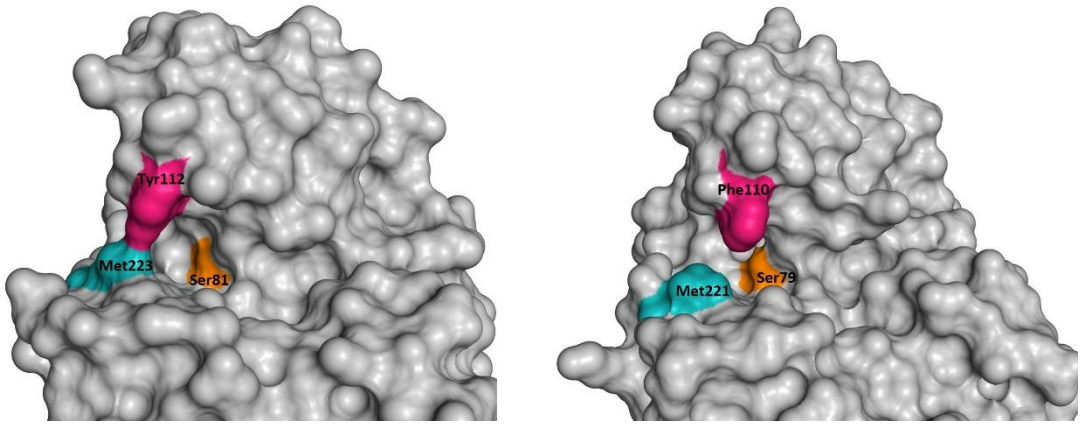


Figura 1.6 Vista global de las estructuras cristalográficas de los enzimas OXA-24 (PDB 3G4P,[33] 1.1 Å) y OXA-23 (PDB 4K0X,[34] 1.31 Å) procedentes de *A. baumannii*.

1.6 Inhibidores de β-Lactamasas

Los primeros inhibidores de β-lactamasas se descubrieron en los años 70. El primero fue el compuesto natural, el ácido clavulánico (**1**, 1972), seguido del sulbactam (**2**, 1978) y tazobactam (**3**, 1984) (Figura 1.3). Estos compuestos son inhibidores covalentes que forman un aducto estable con la serina catalítica, y presentan un limitado espectro de inhibición, principalmente inhibiendo β-lactamasas de clase A y C, pero inactivos frente a las carbapenemasas. Afortunadamente, en los últimos años se han desarrollado inhibidores alternativos, algunos de ellos han sido aprobados por las agencias reguladoras y están ya disponibles en el ámbito clínico. A continuación, se destacan los más significativos:[35,36]

[33] 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 den Akker, F.; Bonomo, R. A.; Romero, A.; Buynak, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13320–13331.

[34] Kaitany, K. C. J.; 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.

[35] Vázquez-Ucha, J. C.; Arca-Suárez, J.; Bou, G.; Beceiro, A. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9308.

[36] Arer, V.; Kar, D. *Front. Genet.* **2023**, *13*, 1060736.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.6.1 1,6-Diazabiciclo[3.2.1]octanos

Este tipo de compuestos fueron diseñados en la década de 1990 por químicos de Hoechst Marion Roussel (ahora parte de Sanofi-Aventis) como posibles nuevos antibióticos de tipo β-lactámicos, ya que se esperaba que el grupo carbamoilo bicíclico fuera un mimético del anillo β-lactámico.[37] Sin embargo, estudios posteriores revelaron que su actividad antibiótica era escasa, pero en cambio poseían una capacidad inhibidora prometedora frente a β-lactamasas de clases A y C.[38] Este importante descubrimiento desencadenó el desarrollo de una gran cantidad de análogos de diazaciclooctanos (DBO) durante el período 2001-2004, lo que permitió la identificación del avibactam (**4**). Este compuesto fue aprobado por la FDA (del término en inglés Food and Drug Administration) en 2014 en combinación con ceftazidima para el tratamiento de las infecciones complicadas del tracto urinario o neumonías bacterianas adquiridas en hospitales o asociadas a ventiladores, causadas por *E. coli, K. pneumoniae* o *P. aeruginosa*.[39] Avibactam (**4**) es un inhibidor reversible que sufre el ataque nucleofílico de la serina catalítica que se ancla al centro activo mediante fuertes interacciones electrostáticas a través del grupo sulfamato. El aducto resultante no experimenta una reacción de hidrólisis, sino que se ha postulado que sufre un proceso de desacilación para regenerar la enzima y el inhibidor (Figura 1.7.B).[40][41] Este novedoso mecanismo de acción alentó al desarrollo de nuevos análogos basados en avibactam (**4**), como son el relebactam (**5**) aprobado en 2019 por la FDA en combinación con imipenem y cilastatina, o el zidebactam (**7**, WCK 5107) y el nacubactam (**8**, OP0595, RO7079901 o RG6080), que se encuentran en fase I de estudios clínicos en combinación con cefepima y meropenem, respectivamente (Figura 1.7.A).[42] En estos inhibidores, el átomo de nitrógeno de la amida primaria del avibactam (**4**) se funcionaliza con diferentes grupos para mejorar la unión y/o las propiedades farmacológicas.

---

[37] Coleman, K. *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, *14*, 550–555.

[38] 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.

[39] Lagacé-Wiens, P.; Walkty, A.; Karlowsky, J. A. *Core. Evid.* **2014**, *9*, 1555.

[40] Krishnan, N. P.; Nguyen, N. Q.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A.; van den Akker, F. *PLoS One*. **2015**, *10*, e0136813.

[41] King, D. T.; King, A. M.; Lal, S. M.; Wright, G. D.; Strynadka, N. C. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 175–184.

[42] (a) Abuhussain, S. S. A.; Avery, L. M.; Abdelraouf, K.; Nicolau, D. P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01931-18. (b) Livermore, D. M.; Mushtaq, S.; Warner, M.; Vicker, A.; Woodford, N. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 1373–1385. (c) Thomson, K. S.; AbdelGhani, S.; Snyder, J. W.; Thompson, G. K. *Antibiotics* **2019**, *8*, 32.

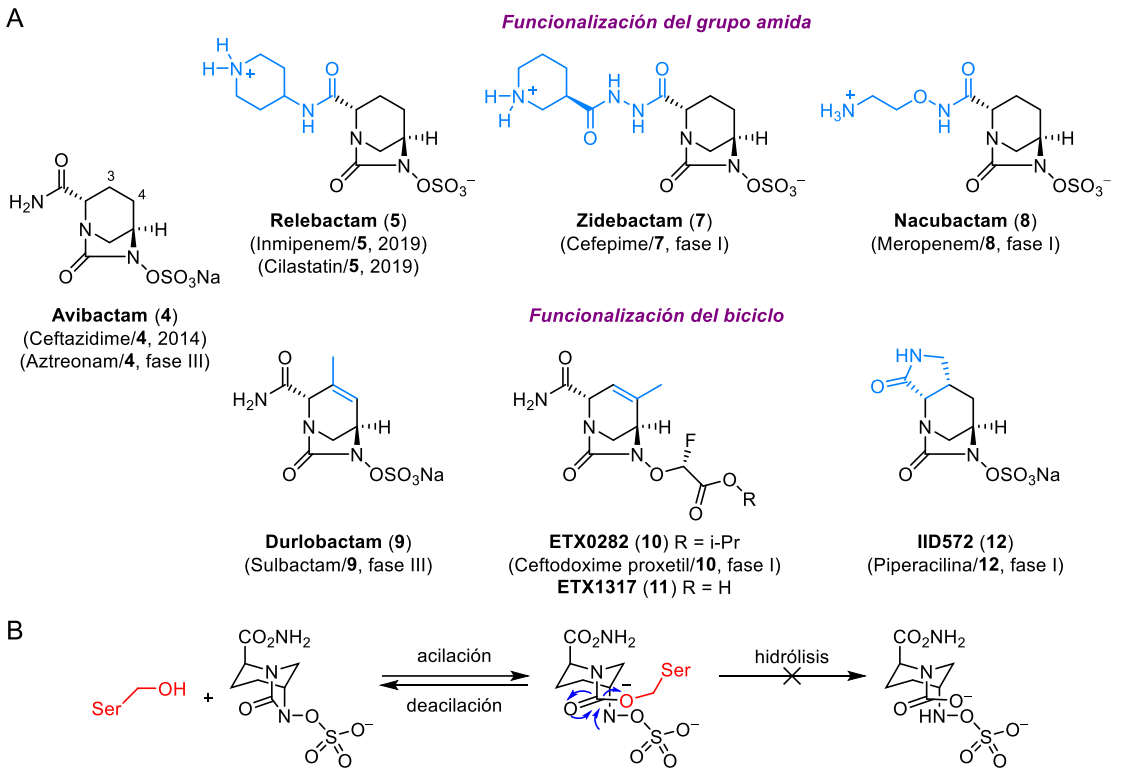


Figura 1.7 (A) Estructura química del avibactam (**4**), relebactam (**5**), zidebactam (**7**), nacubactam (**8**), durlobactam (**9**), ETX0282 (**10**), ETX1317 (**11**) y IID572 (**12**). (B) Mecanismo de inhibición covalente reversible del avibactam (**4**).

Durant-Reville y colaboradores[43] demostraron que un aumento en la rigidez del anillo de seis miembros de avibactam (**4**), que se logró mediante la introducción de un doble enlace en las posiciones 3 y 4 y la funcionalización de la posición 3 con un grupo metilo, no solo mejoraba significativamente la eficacia contra las β-lactamasas de las clases A y C, sino que, aumentaba la capacidad inhibitoria del compuesto contra carbapenemasas de clase D, como la OXA 24/40. Este nuevo análogo llamado durlobactam (**9**, ETX2514), desarrollado por Entasis Therapeutics, es efectivo contra cepas resistentes a carbapenems de Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Lográndose un aumento de 8 veces en la actividad *in vitro* con la combinación piperacilina/durlobactam (CIM = 8 μg/mL) en comparación con la combinación piperacilina/avibactam (CIM = 64 μg/mL). La combinación durlobactam/sulbactam se encuentra actualmente en estudios clínicos de fase III.

[43] Durand-Réville, T. F.; Guler, 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.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Entasis Therapeutics también desarrolló ETX0282 (**10**), un profármaco oral de otro análogo de DBO relevante, ETX1317 (**11**), que es un regioisómero de durlobactam (**9**) en el que el grupo sulfato ha sido reemplazado por un grupo (*R*)-2-fluoroacetato (Figura 1.7.A).[44,45,46] ETX0282 (**10**) en combinación con cefpodoxima proxetil, que es un profármaco de cefpodoxima aprobado para el tratamiento de infecciones del tracto urinario por enterobacterias resistentes a los antibióticos, es una terapia oral prometedora para las infecciones causadas por enterobacterias productoras de BLEE y resistentes a carbapenems. Sin duda, el amplio espectro de actividad de durlobactam (**9**) y ETX0282 (**10**)– o su forma activa ETX1317 (**11**) –representa un gran avance en la restauración de la eficacia de los carbapenems en infecciones causadas por los patógenos prioritarios de la OMS. Sin embargo, al igual que avibactam, estos compuestos son ineficientes contra las metalo-β-lactamasas. Finalmente, el compuesto IID572 (**12**) descrito por Reck y colaboradores,[47] muestra una gran capacidad para restaurar la actividad de la piperalicina como una alternativa a la combinación piperacilina/tazobactam, además en contraste con otros análogos de DBO, este compuesto tiene actividad antibiótica.

1.6.2 Ácidos Borónicos y Boronatos Cíclicos

Los inhibidores de β-lactamasas basados en boro surgieron como resultado del descubrimiento de que los ácidos borónicos inhibían las serinas proteasas.[48] Después de que Dobozy *et al*.[49] demostraran por primera vez que el ácido borónico inhibe la penicilinasa de *Bacillus cereus*, Kiener y Waley desarrollaron posteriormente los primeros inhibidores reversibles, el ácido fenilborónico y el ácido 3-aminofenilborónico,

[44] Veeraraghavan B.; Bakthavatchalam Y. D.; Sahni R. D. *Infect. Dis. Ther*. **2021**, *10*, 1815–1835.

[45] Gilbert, N. *Nature*. **2018**, *555*, S5–S7.

[46] Durand-Réville, T. F.; Comita-Prevoir, J.; Zhang, J.; Wu, X.; May-Dracka, T. L.; Romero, J. A. C.; Wu, F.; Chen, A.; Shapiro, A. B.; Carter, N. M.; McLeod, S. M.; Giacobbe, R. A.; Verheijen, J. C.; Lahiri, S. D.; Sacco, M. D.; Chen, Y.; O'Donnell, J. P.; Miller, A. A.; Mueller, J. P.; Tommasi, R. A. *J. Med. Chem*. **2020**, *63*, 12511–12525.

[47] 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.

[48] Snoum, R.; Rubinstein, A.; Dembitsky, V. M.; Srebnik, M. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4156–4220.

[49] Dobozy, O.; Mile, I.; Ferencz, I.; Csanyi, V. *Acta Biochim. Acad. Sci. Hung*. **1971**, *6*, 97–105.

que mostraron actividades en el rango milimolar.[50,51] La resolución de la estructura cristalográfica del intermedio acil-enzima penicilina G/TEM-1 procedente de *E. coli* (PDB 1FQG,[52] 1.7Å), inspiró el diseño racional de nuevos inhibidores con actividades del rango nanomolar (Figura 1.8.B). El primer inhibidor desarrollado fue el compuesto **13**, descrito por Martin y Jones en 1995,[53] cuya estructura cristalográfica (PDB 1ERM,[54] 1.7 Å) de este compuesto con la enzima TEM-1 corroboró la formación del aducto tetraédrico con la serina catalítica, estructuralmente similar al intermedio **IT2** (Figura 1.8.C). Modificaciones en la estructura de este compuesto, mediante la introducción de grupos funcionales que pudieran promover interacciones adicionales dentro de los bolsillos cercanos a la serina catalítica, llevaron a la identificación de los compuestos **14** y **15**, con actividad en el rango del bajo nanomolar. Posteriormente, Eidam y colaboradores[55] llevaron a cabo un diseño de nuevos compuestos mediante aproximaciones basadas en fragmentos que condujo a la identificación de los tetrazoles **16-18** con actividad inhibitoria en el rango de subnanomolares (Figura 1.8.A).

[50] Kiener, P. A.; Waley, S. G. *Biochem.* **1978**, *169*, 197–204.

[51] Beesley, T.; Gascoyne, N.; Knott-Hunziker, V.; Petursson, S.; Waley, S. G.; Jaurin, B.; Grundström, T. *Biochem.* **1983**, *209*, 229–233.

[52] Strynadka, N. C.; Adachi, H.; Jensen, S. E.; Johns, K.; Sielecki, A.; Betzel, C.; Sutoh, K.; James, M. N. *Nature*, **1992**, *359*, 700–705.

[53] Martin, R.; Jones, J. B. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8394–8402.

[54] 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.

[55] Eidam, O.; Romagnoli, C.; Dalmasso, G.; Barelier, S.; Caselli, E.; Bonnet, R.; Schoichet, B. K.; Prati, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2012**, *109*, 17448–17453.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

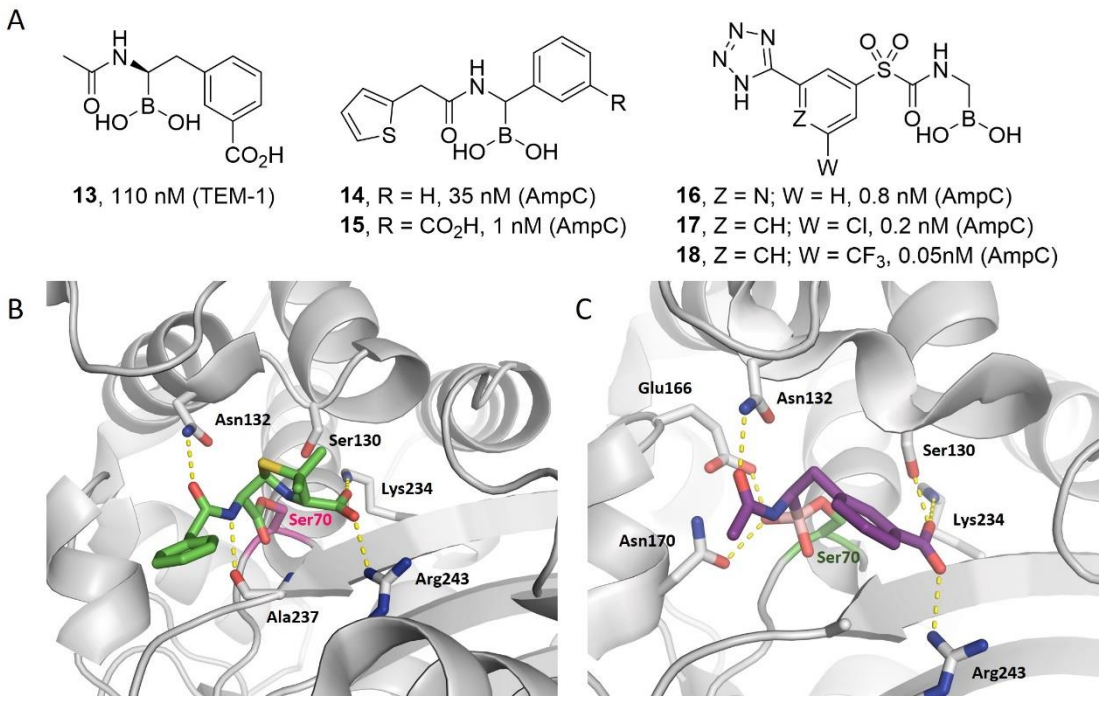


Figura 1.8 (A) Estructura química de Inhibidores de las β-lactamasas basados en ácidos borónicos. Se muestran las constantes de inhibición (K_i) con los enzimas aislados. (B) Estructura cristalina del intermedio acil-enzima en la hidrólisis de la penicilina G catalizada por la enzima TEM-1 (PDB 1FQG, 1.7 Å). (C) Estructura cristalina del complejo formado por la enzima TEM-1 y el compuesto **13** (PDB 1ERM, 1.7 Å).

Por otra parte, London *et al.*[56] identificaron los compuestos **19–21** mediante cribado virtual de una quimioteca de 23.000 ácidos borónicos disponibles comercialmente, con una actividad de amplio espectro contra β-lactamasas clínicamente relevantes, específicamente KPC-2, GES-5, AmpC, OXA-24/40 y NMD-1 (Figura 1.9). Esta misma técnica, permitió la identificación de los primeros inhibidores ácidos borónicos no cíclicos, los compuestos **22** con una potencial actividad inhibidora en el rango nanomolar contra las AmpC.

[56] 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.

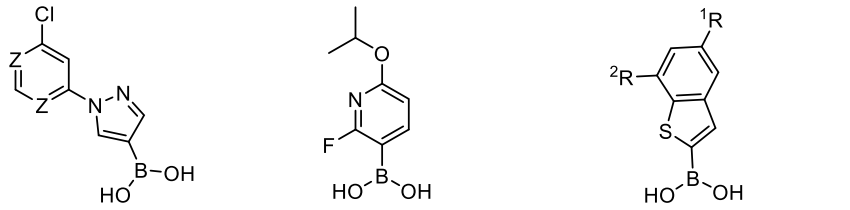


Figura 1.9 Estructura química de los compuestos **19–22**.

El principal obstáculo para el uso de los ácidos borónicos en este campo son sus posibles efectos secundarios debido a la inhibición adicional de las serinas proteasas de los mamíferos. Por lo que, la introducción de los boronatos cíclicos fue un punto de inflexión en el campo debido a su mayor selectividad frente a las β-lactamasas. Esto se debe, principalmente, a su conformación restringida, que no encajaría en el centro activo de la serina proteasas, ya que son más pequeños y están diseñados para transformar sustratos más flexibles. Rempex Pharmaceuticals desarrolló el vaborbactam (**6**, RPX7009), que es el primer inhibidor de β-lactamasa a base de boro aprobado por la FDA en combinación con meropenem (2017, vabomere®) para el tratamiento del tracto urinario complicado. infecciones (Figura 1.10).[57] La característica más destacable del vaborbactam es su fuerte capacidad para restaurar la actividad de los carbapenemes frente a cepas productoras de ESBL, especialmente *Enterobacteriaceae* productoras de KPC, con valores de K_i en el rango nanomolar. Sin embargo, es ineficaz frente a las β-lactamasas de las clases B y D. En 2012, VenatoRx Pharmaceuticals descubrió el taniborbactam (**23**, VNRX-5133), que en combinación con cefepime se encuentra en fase III de desarrollo clínico para el tratamiento de infecciones multirresistentes causadas por *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* productoras de ESBL y carbapenemasas.[58] Otros boronatos cíclicos prometedores son VNRX-7145 (**24**),[59,60] y el Xeruborbactam (**25**,

[57] Krajnc, A.; Lang, P. A.; Panduwawala, T. D.; Brem, J.; Schofield, C. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *50*, 101–110.

[58] a) 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. (b) Burns, C. J.; Daigle, D.; Li, B.; McGarry, D.; Pevear, D. C.; Trout, R. E. L. US8912169B2, December 7, 2012.

[59] 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**, *14*, 7491–7507.

[60] (a) Burns, J.; Trout, R.; Zulli, A.; Mesaros, E.; Jackson, R.; Boyd, S.; Liu, B.; McLaughlin, L.; Chatwin, C.; Hamrick, J.; Daigle, D.; Pevear, D. *257th National Meet. Exposition of the American Chemical*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

QPX7728), desarrollados por Qpex Biopharma, que actualmente se encuentran en desarrollo clínico en combinación con cefepime, ceftibuten y QPX2014, respectivamente.[61,62] Ambos compuestos inhiben la mayoría de las enzimas de clase B en el rango nanomolar. La diferencia entre ellos radica en la capacidad inhibidora superior de QPX7728 frente a carbapenemasas de clase D que se encuentran habitualmente en *A. baumannii* (OXA-23, OXA-24/40), lo que lo convierte en un excelente inhibidor amplio espectro.[63]

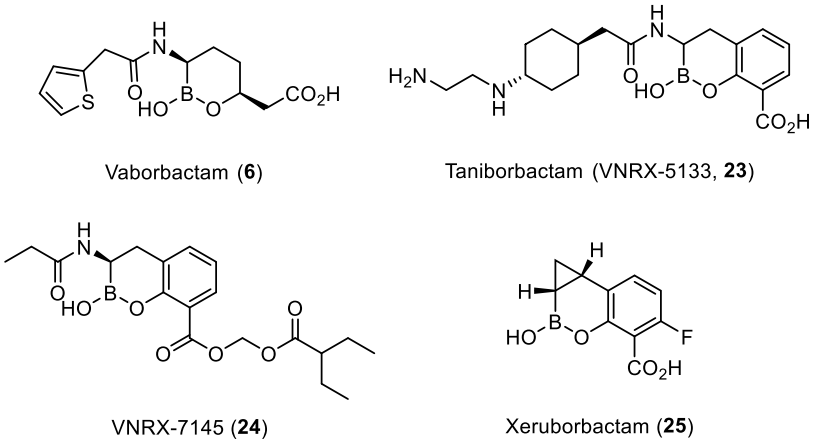


Figura 1.10 Estructura química del vaborbactam (**6**), taniborbactam (**23**), VNRX-7145 (**24**) y xeruborbactam (**25**).

1.7 Diseño de Antibióticos con Nuevos Mecanismos de Acción

El mecanismo de acción de la mayoría de los antibióticos en uso clínico se basa en la inactivación de enzimas/proteínas codificadas por genes esenciales, impidiendo así la síntesis y el ensamblaje de componentes clave necesarios para el crecimiento bacteriano (viabilidad). La mayoría de los antibióticos en uso clínico se dirigen a un número muy pequeño de funciones bacterianas, en concreto, la biosíntesis de la pared celular, la replicación del ADN, la transcripción del ARN, la biosíntesis de los folatos y la biosíntesis de proteínas. Aunque esta estrategia es muy eficaz y ha dado lugar a un buen arsenal

Society, Orlando, FL, U.S., March 31–April 4, 2019, American Chemical Society, Washington, DC **2019**. (b) Hamrick, J.; Chatwin, C.; John, K.; Burns, C.; Xerri, L.; Moeck, G.; Pevear, D. *29th ECCMID, Amsterdam, The Netherlands, April 13–16, 2019*, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Switzerland **2019**.

[61] Nelson, K.; Rubio-Aparicio, D.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Totrov, M.; Dudley, M.; Lomovskaya, O. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e1406–e1420.

[62] Sabet, M.; Tarazi, Z.; Griffith, D. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e01267–20.

[63] Lence, E.; González-Bello, C. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 721826.

de compuestos que han salvado millones de vidas, provoca un estrés importante en las bacterias, que suele desencadenar la aparición de cepas resistentes a los antibióticos. De ahí que la búsqueda de funciones bacterianas inexploradas parece ser una buena opción para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos con un nuevo mecanismo de acción, evitando procesos de resistencia cruzada.

En las bacterias, existe una ruta biosintética, concretamente la vía del ácido siquímico, que ha despertado mucho interés en el descubrimiento de antibióticos con un mecanismo de acción alternativo. Mediante esta ruta se biosintetizan los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), así como otros compuestos aromáticos relevantes, los folatos, la ubiquinona, y las vitaminas E y K.[64,65,66] El hecho de que los enzimas implicados en esta vía sean esenciales en ciertos microorganismos importantes, pero ausentes en los mamíferos, los convierte en objetivos atractivos para el desarrollo de agentes antimicrobianos con un nuevo mecanismo de acción.[67,68,69] En concreto, los enzimas implicados en la ruta del ácido siquímico son objetivos biológicos particularmente atractivos para el desarrollo de nuevas terapias antituberculosas porque seis de los siete enzimas, específicamente las codificadas por los genes *aroF*, *aroG*, *aroB*, *aroD*, *aroE*, *aroK* y *aroA*, son esenciales para *Mycobacterium tuberculosis*, que es el agente causante de la tuberculosis, una enfermedad infecciosa de gran impacto global.[70,71] También es destacable el potencial de estos enzimas para el tratamiento de infecciones causadas por *Helicobacter pylori*. Esta bacteria es el agente causante de las úlceras gástricas y duodenales y también ha sido clasificada como un

[64] Widhalm, J. R.; Dudareva, N. *Mol. Plant.* **2015**, *8*, 83–97.

[65] Almeida, A. M.; Marchiosi, R.; Abrahão, J.; Constantin, R. P.; dos Santos, D. W.; Ferrarese-Filho, O. *Phytochem Rev.* **2023**. doi: 10.1007/s11101-023-09889-6.

[66] Abell, C. Enzymology and Molecular Biology of the Shikimate Pathway, In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Sankawa, U. Ed.; Pergamon, Elsevier Science Ltd.: Oxford, **1999**, *1,* 573–607.

[67] Lamichhane, G.; Freundlich, J. S.; Ekins, S.; Wickramaratne, N.; Nolan, S. T.; Bishai, W. R. *mBio* **2011**, *2*, e00301– e00310.

[68] González-Bello, C. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 960–977.

[69] Pereira, J. H.; Vasconcelos, I. B.; Oliveira, J.; Caceres, R. A.; de Azevedo, W. F. Jr.; Basso, L. A.; Santos, D. S. *Current Drug Targets* **2007**, *8*, 459–468.

[70] Gordon, S.; Simithy, J.; Goodwin, D. C.; Calderón, A. I. *Persp. Med. Chem.* **2015**, *7*, 9–20.

[71] Base de datos de genes esenciales: http://www.essentialgene.org/

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

agente cancerígeno tipo I. Para *H. pylori*, los enzimas codificados por los genes *aroQ*, *aroE*, *aroK* y *aroC* (deshidroquinasa, la siquimato deshidrogenasa, la siquimato quinasa y la corismato sintasa, respectivamente) son esenciales.

La ruta del ácido siquímico comienza con la condensación de la eritrosa-4-fosfato (**26**) y el fosfoenolpiruvato (**27**) mediante la DAHP sintasa (EC 4.1.2.15), generando 3-deoxi-D-arabinoheptulosanato 7-fosfato (**28**) y fosfato (Figura 1.11).[68,72] A continuación, la 3-deshidroquinato sintasa (EC 4.6.1.3) cataliza la transformación de **28** en ácido 3-deshidroquínico (**29**) utilizando NAD^+ como cofactor. Este paso implica cinco reacciones complejas, incluyendo oxidación, eliminación de fosfato, reducción, apertura de anillo y condensación aldólica intramolecular. El tercer enzima en la ruta, la deshidroquinasa (EC 4.2.1.10), cataliza la deshidratación reversible de ácido 3-deshidroquínico (**29**) a deshidrosiquímico (**30**). Posteriormente, la siquimato quinasa (EC. 2.7.1.71) fosforila selectivamente el grupo hidroxilo en posición C3 del ácido siquímico (**31**), utilizando ATP y generando siquimato-3-fosfato (**32**). En la siguiente etapa, la EPSP sintasa (EC 2.5.1.19) cataliza la condensación reversible entre siquimato-3-fosfato (**32**) y fosfoenolpiruvato (**27**), formando 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (**33**). Finalmente, la corismato sintasa (EC 4.6.1.4) lleva a cabo la eliminación 1,4-anti de fosfato mediante la abstracción del hidrógeno *pro*-R en C6, dando como resultado el ácido corísmico (**34**).

[72] Marchiosi, R.; dos Santos, W. D.; Constantin, R. P.; de Lima, R. B.; Soares, A. R.; Finger-Teixeira, A.; Mota, T. R.; de Oliveira, D. M.; Foletto-Felipe, M. D.; Abrahão, J.; Ferrarese-Filho, O. *Phytochem. Rev.* **2020**, *19*, 865–906.

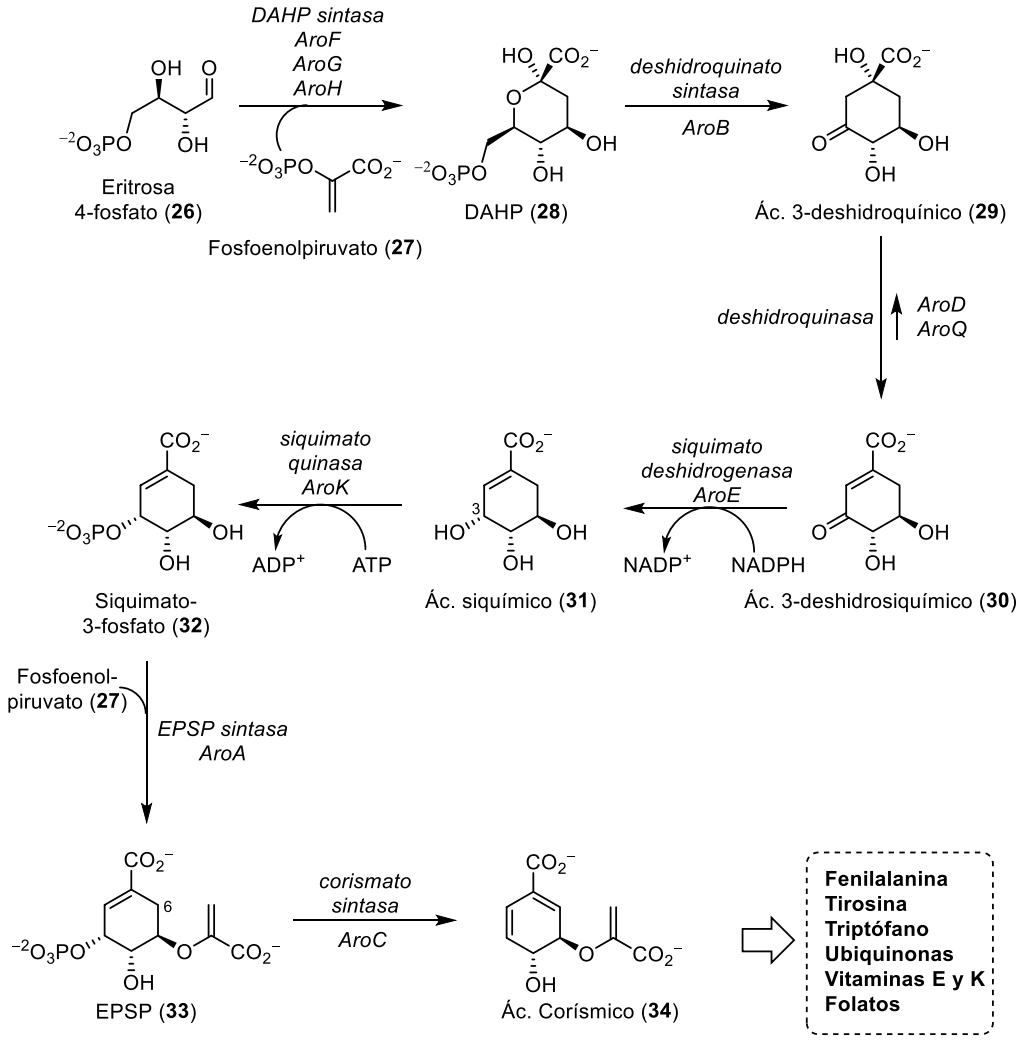


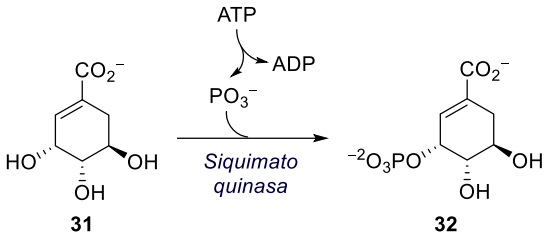
Figura 1.11 La ruta del ácido siquímico. DAHP = 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato. EPSP = 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato. Se indica el gen que codifica para cada enzima.

1.7.1 El Enzima Siquimato Quinasa

Esta tesis doctoral se centra en el desarrollo de inhibidores específicos del quinto enzima de la ruta del ácido siquímico, la siquimato quinasa (SQ). Nos hemos centrado en este enzima porque es esencial en importantes bacterias patógenas, en concreto, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* y *Pseudomonas aeruginosa*, esta última es una de las principales causas de infecciones nosocomiales e inherentemente resistente a la mayoría de los antibióticos en uso clínico. Este enzima también es esencial en *Acinetobacter baylyi*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Campylobacter jejuni* y *Francisella novicida*. La inhibición selectiva del enzima SQ podría dar lugar a nuevos antibióticos activos contra diversas y relevantes enfermedades bacterianas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La SQ es un metaloenzima dependiente de magnesio que cataliza la conversión del ácido siquímico (**31**) en siquimato-3-fosfato (**32**) y ADP utilizando ATP como cofactor (Esquema 1.1). El enzima cataliza la transferencia del grupo γ-fosfato del ATP al grupo hidroxilo C3 del ácido siquímico (**31**). Mediante una combinación de RMN y estudios computacionales, nuestro grupo de investigación demostró que la conversión catalizada por la SQ implica un mecanismo disociativo de transferencia de fosforilo.[73] La reacción se inicia con la formación de un intermediario metafosfato (PO_3^-) mediante la escisión del enlace γ O-P del ATP, seguido del posterior ataque nucleofílico del grupo hidroxilo en posición C3 del ácido siquímico (**31**).



Esquema 1.1 Conversión enzimática catalizada por la SQ.

La SQ tiene dos centros catalíticos, uno para el ácido siquímico (**31**) y otro para el cofactor (ATP), con diferentes interacciones clave en ambos casos. Las estructuras cristalográficas disponibles revelan tres dominios importantes:[74,75,76,77] (1) el dominio CORE que contiene cinco láminas β paralelas y el bucle P, que forma el sitio de unión del ATP y ADP. Contiene la secuencia consenso GXXXXGKT/S (siendo X cualquier residuo; motivo-Walker A), que está conservada en muchas proteínas de unión a ATP o GTP, por lo que nos centramos en el diseño de compuestos que se unen al sitio de unión del ácido siquímico (**31**); (2) el dominio LID (tapa en inglés), que actúa como tapa cerrándose sobre el centro activo cuando se unen los sustratos y que contiene residuos que son esenciales para la unión del ATP y la catálisis; y (3) el dominio de unión al

[73] Prado, V.; Lence, E.; Vallejo, J. A.; Beceiro, A.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2758–2768.

[74] Krell, T.; Coggins, J. R.; Lapthorn, A. J. *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 983.

[75] Dhaliwal, B.; Nichols, C. E.; Ren, J.; Lockyer, M.; Charles, I.; Hawkins, A. R.; Stammers, D. K. *FEBS Lett.* **2004**, *574*, 49.

[76] Cheng, W. C.; Chen, Y. F.; Wang, H. J.; Hsu, K. C.; Lin, S. C.; Chen, T. J.; Yang, J. M.; Wang, W. C. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e33481.

[77] Krell, T.; Maclean, J.; Boam, D. J.; Cooper, A.; Resmini, M.; Brocklehurst, K.; Kelly, S. M.; Price, N. C.; Lapthorn, A. J.; Coggins, J. R. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1137–1149.

sustrato (SB, de las siglas en inglés shikimic acid binding), que es responsable del reconocimiento y unión del ácido siquímico (**31**).

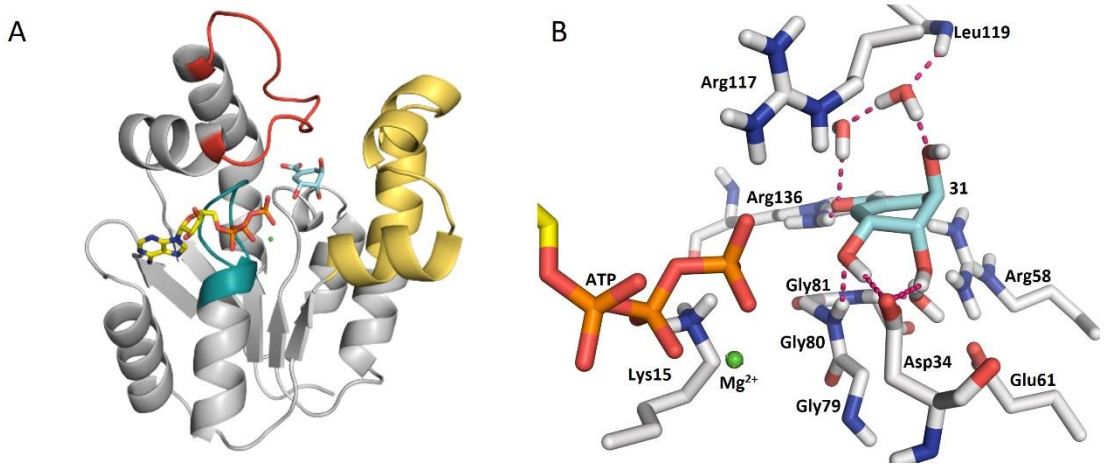


Figura 1.12 (A) Estructura tridimensional del complejo de Michaelis de la SQ procedente de *M. tuberculosis* (SQ-*Mt*) obtenida mediante estudios de dinámica molecular. Se destacan los tres dominios principales: CORE (azul), LID (rojo) y SB (amarillo) y la posición del ATP (amarillo), ácido siquímico (**31**, celeste) y el Mg^{2+} (esfera verde). (B) Vista detallada de las interacciones más importantes del del ácido siquímico (**31**) en el centro activo de SQ-*Mt*. Los enlaces de hidrógeno se muestran con líneas discontinuas rosas.

Estudios de dicroísmo circular,[77] fluorescencia[78] y estructurales[79,80] sugirieron que el ATP se une primero al enzima e induce el plegamiendo del dominio LID sobre el centro activo. A continuación, el ácido siquímico (**31**) se une al centro catalítico, lo que desencadena el plegamiento adicional del dominio LID sobre este. De esta forma los residuos de arginina Arg110 y Arg117 logran interaccionar con el ATP y el ácido siquímico (**31**), respectivamente, adoptando así el dominio SB una disposición muy cerrada aislando de forma eficiente el sustrato del disolvente.

Las estructuras cristalográficas disponibles del enzima SQ revelan que el ácido siquímico (**31**) se ancla en el centro activo mediante: (i) un puente salino entre su grupo carboxilato y el grupo guanidinio del residuo de arginina conservada (Arg136 en *M. tuberculosis*); (ii) dos enlaces de hidrógenos entre los grupos hidroxilos C3 y C4 y la

[78] Dhaliwal, B.; Nichols, C. E.; Ren, J.; Lockyer, M.; Charles, I.; Hawkins, A. R.; Stammers, D. K. *FEBS Lett.* **2004**, *574*, 49–54.

[79] Gu, Y.; Reshentnikova, L.; li, Y.; Wu, Y.; Yan, H.; Singh, S.; Ji, X. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 779– 789.

[80] Hartmann, M. D.; Bourenkov, G. P.; Oberschall, A.; Strizhov, N.; Bartunik, H. D. *J. Mol. Biol.* **2006**, *364*, 411– 423.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cadena lateral del residuo de aspártico conservado (Asp34 en *M. tuberculosis*); (iii) un enlace de hidrógeno entre el grupo hidroxilo C3 y el grupo NH de la cadena principal del residuo de glicina conservado (Gly80 en *M. tuberculosis*); y (iv) una red de moléculas de agua (Figura 1.12.B).[81,82]

El enzima reconoce una conformación inestable de un anillo de ciclohexeno con dos de los tres grupos hidroxilo en disposición axial. Al forzar la disposición axial de los grupos hidroxilo C4 y C5, el enzima controla la disposición ecuatorial del grupo hidroxilo C3 y permite su reacción selectiva de transferencia de fosforilo. La interacción del enlace de hidrógeno con la amida de cadena principal NH del residuo Gly80, permite la orientación adecuada del par solitario de oxígeno del grupo hidroxilo C3 para la reacción de transferencia de fosforilo. El grupo hidroxilo C4 se fija en disposición axial mediante enlaces de hidrógeno con la cadena lateral del Asp34 conservado y con una molécula estructural de agua. El grupo hidroxilo C5 se dispone en axial gracias a contactos con residuos del LID mediados por una red de moléculas de agua.

1.7.2 Inhibidores Descritos de la Siquimato Quinasa

Los inhibidores descritos hasta la fecha del enzima SQ se pueden dividir en cinco categorías, principalmente basadas en la estructura del inhibidor, que incluyen:[83]

(i) Derivados rígidos del sustrato natural: en nuestro grupo de investigación se desarrollaron diversos derivados del ácido siquímico (**31**) de conformación restringida (Figura 1.13). El fundamento de la idea surgió del estudio de: (a) los requisitos de unión del sustrato; este enzima es un ejemplo sorprendente de cómo la transformación específica de sólo uno de los tres grupos hidroxilo del ligando se logra mediante una estabilización exquisitamente diseñada de su conformación de alta energía; (b) el mecanismo de transferencia de fosforilo; y (c) el movimiento enzimático esencial para la liberación del producto. Teniendo en cuenta que los ligandos flexibles al unirse a su objetivo biológico pueden sufrir una penalización entrópica debido a la congelación de sus enlaces susceptibles de giro para lograr la conformación de unión activa, la organización previa de la conformación del ligando o la estabilización de las disposiciones activas de alta energía requeridas mediante la introducción de

[81] Cheng, W. C.; Chang, Y. N.; Wang, W. C. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 8156−8163.

[82] Blanco, B.; Prado, V.; Lence, E.; Otero, J. M.; García-Doval, C.; Van Raaij, M. J.; Llamas-Saiz, A. L.; Lamb, H.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12366-12376.

[83] Rajput, V. S.; Runthala, A.; Khan, I. A. *Curr. Drug Targets* **2023**, *24*, 388−405.

restricciones conformacionales es una estrategia muy atractiva en este caso. Se desarrollaron los compuestos **35** y **36** en los que la conformación se fija mediante un puente éter entre las posiciones C3 y C5 de **31**.[82] Ambos compuestos demostraron ser inhibidores competitivos reversibles de la SQ procedente de *M. tuberculosis* (SQ-*Mt*) con valores de K_i de 62 y 46 μM, respectivamente, que es inferior a la K_m (544 μM).

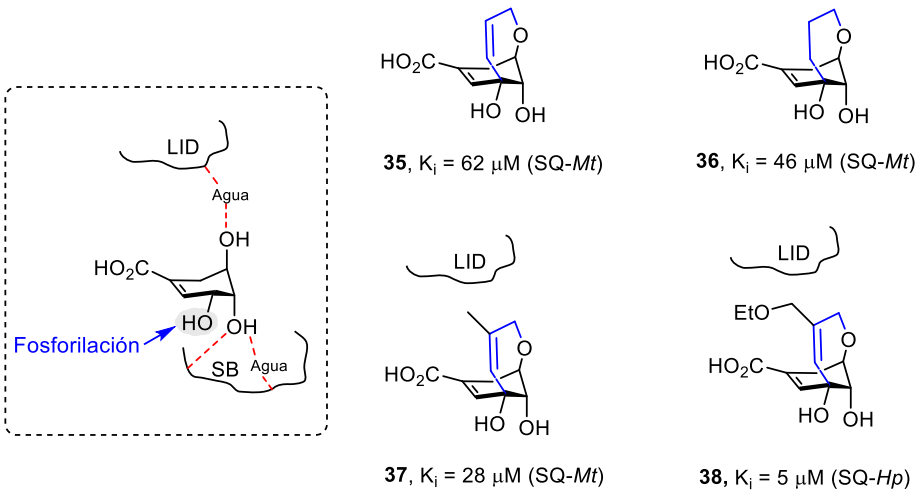


Figura 1.13 Estructura química de los ácidos siquímicos de conformación restringida **35–38**, inhibidores competitivos reversibles del enzima SQ.

La resolución de la estructura cristalográfica de SQ-*Mt* con ADP y **35** en el centro activo (PDB 4BQS, 2.15 Å), demostró que el ligando ocupa el centro activo con una disposición e interacciones polares similares (enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas) al sustrato natural (Figura 1.14).[82] La estructura muestra que la rigidez de la conformación diaxial de los grupos hidroxilo C4 y C5 en **31** por un puente éter C3-C5 causa una reducción dramática en la flexibilidad de los dominios LID y SB. Con el fin de mejorar la eficacia de estos inhibidores promoviendo interacciones lipofílicas entre el ligando y el dominio LID, se introdujeron diversos sustituyentes en el puente éter que permitió identificar inhibidores de actividad mejorada que permiten cerrar más eficientemente el centro activo.[84] Los más relevantes demostraron ser los compuestos **37** y **38** con valores de K_i frente SQ-*Mt* y SQ-*Hp* de 39 μM y 5 μM, respectivamente (Figura 1.13).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[84] Pernas, M.; Blanco, B.; Lence, E.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 2514.

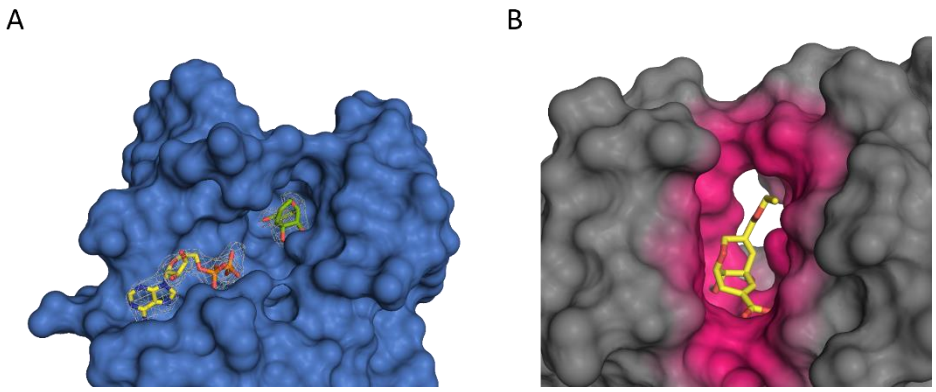
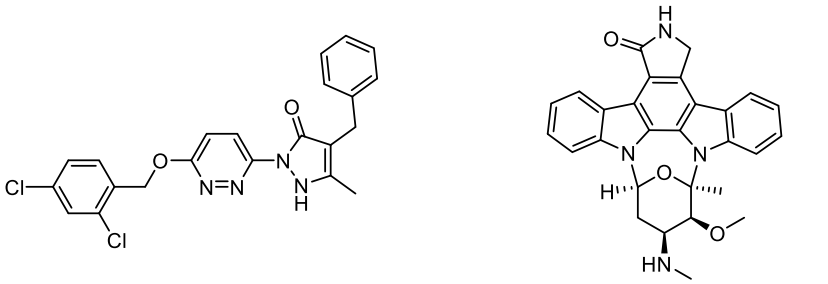


Figura 1.14 (A) Estructura cristalográfica de la SQ-Mt con ADP y el compuesto **35** en el centro activo (PDB 4BQS, 2.15 Å).[82] (B) Modo de unión del compuesto **38** en el centro activo de SQ-*Hp* obtenido mediante estudios de simulación dinámica.[84]

(i) Pirazolonas y sus derivados: estos inhibidores fueron desarrollados por la farmacéutica AstraZeneca identificándose mediante un cribado virtual de alto rendimiento basado en fragmentos, utilizando una quimioteca de 700.000 compuestos-fragmento.[85] Esta estrategia permitió identificar inhibidores potencialmente activos, seleccionando como fragmento base, la pirazolona. En el estudio de los 400 compuestos resultantes del cribado, se observó que los anillos de piridazinona y piridazina son esenciales para inhibir el enzima. Se identificaron compuestos con valores de IC_{50} muy buenos, como es el caso del compuesto **39** con un valor de 0.4 μM, aunque se desconoce como interaccionan con el enzima y su mecanismo de inhibición (Figura 1.15). Mulabagal y Calderón identificaron, mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas y posterior evaluación con el enzima aislado, el compuesto estauroporina (**40**) como un potencial inhibidor competitivo con el ATP, con un valor de IC_{50} de 0.3 μM.[86]



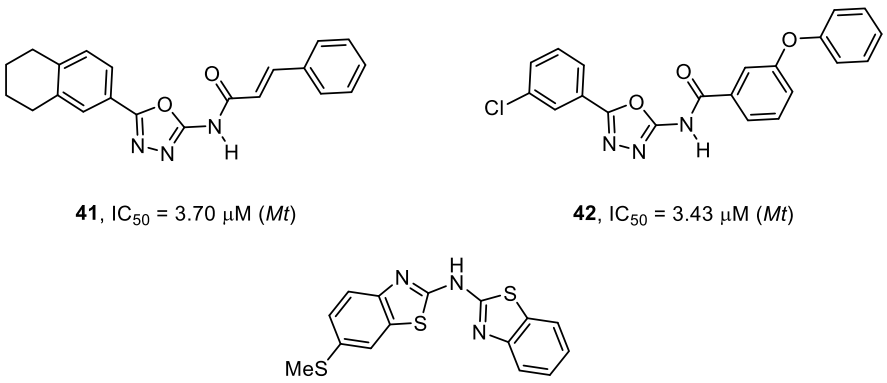
39, IC_{50} = 0.4 μM (SQ-*Mt*) **40**, IC_{50} = 0.3 μM (SQ-*Mt*)

Figura 1.15 Estructuras químicas de los inhibidores **30** y **40**.

[85] Bandodkar, B. S.; Schmitt, S. *WO/2007/020426 A1. February 22, **2007**.

[86] Mulabagal, V.; Calderon, A. I. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3616–3621.

(ii) Oxadiazol-amidas y 2-aminobenzotiazoles: mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas sobre una quimioteca de alrededor de 400 compuestos antimicobacterianos, previamente identificados por el Centro de Adquisición y Coordinación Antimicrobiana de la Tuberculosis del NIH (TAACF, The Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility, de sus siglas en inglés), Simithy *et al.*[87] identificaron los compuestos **41–43**, con valores de IC_{50} entre 1.9 y 3.7 μM que se hipotiza podrían ser agentes intercalantes de los dominios LID y SB, aunque su mecanismo de acción detallado todavía se desconoce (Figura 1.16).



41, IC_{50} = 3.70 μM (*Mt*)

42, IC_{50} = 3.43 μM (*Mt*)

43, IC_{50} = 1.9 μM (*Mt*)

Figura 1.16 Estructuras químicas de los inhibidores **41**-**43**.

(iii) Manzaminas: son una clase de compuestos pertenecientes a la familia de los alcaloides, que contienen un sistema de anillos policíclicos asociados a un motivo β-carbolina, aislados de las esponjas marinas. Presentan actividades antibacterianas, antiinflamatorias, antiparasitarias e insecticidas. Al evaluar una librería de veintiséis alcaloides, seis de ellos exhibieron actividad contra SQ-*Mt*, los compuestos **44–47** (Figura 1.17).[88] Todos ellos mostraron un modo de inhibición no competitivo, a excepción del compuesto **47** que mostró una inhibición dependiente del tiempo, siendo este el inhibidor más eficaz de la serie.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[87] Simithy, J.; Reeve, N.; Hobrath, J.V.; Reynolds, R.C. *Tuberculosis,* **2014**, *94*, 152-158.

[88] Simithy, J.; Fuanta, N. R.; Alturki, M.; Hobrath, J. V.; Wahba, A. E.; Pina, I.; Rath, J.; Hamann, M. T.; DeRuiter, J.; Goodwin, D. C.; Calderón, A. I. *Biochem.* **2018**, *57*, 4923–4933.

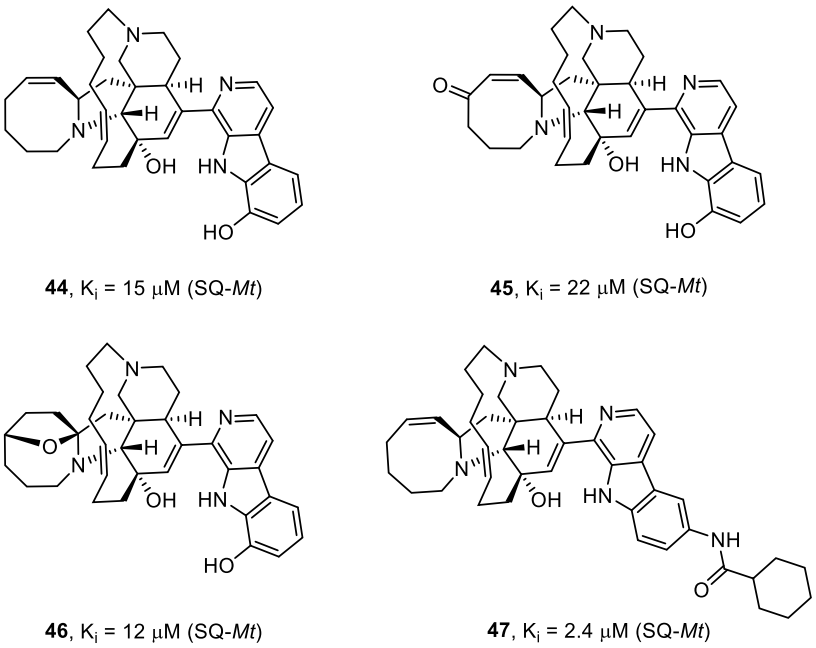
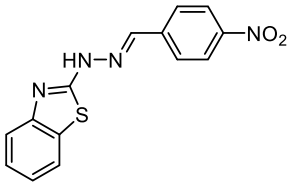


Figura 1.17 Estructura química de los compuestos **44-47**.

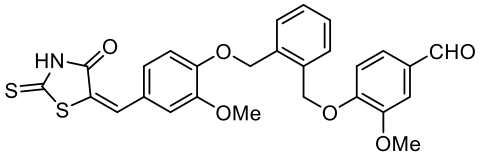
(iv) Inhibidores identificados a partir de quimiotecas comercialmente disponibles: Mehra y colaboradores identificaron varios inhibidores no competitivos para ATP y el sustrato natural mediante un cribado de 20.000 compuestos disponibles en la base de datos de ChemBridge.[89] El compuesto **48** fue el más relevante con un valor IC_{50} de 10.7 μM frente a SQ-*Mt*, que los autores sugieren sería un inhibidor alostérico que interaccionaría con el dominio SB (Figura 1.18). Por otro lado, Han *et al.*[90] identificaron, también mediante cribado de alto rendimiento a partir de una quimioteca de aproximadamente 3000 compuestos, los derivados **49** y **50** con valores de IC_{50} de 5.5 y 6.4 μM, respectivamente, frente a SQ-*Hp* (Figura 1.18). Por último, Cheng y colaboradores[81] identificaron el sulfonato **51**, con un valor de IC_{50} de 4.9 μM frente a SQ-*Hp*. La estructura cristalográfica del enzima variante E114A del SQ-*Hp* complejado con **51** (PDB 3N2E, 2.53 Å) reveló que dicho ligando evita el cierre del centro activo para la catálisis al causar un cambio conformacional en el dominio LID.

[89] Mehra, R.; Rajput, V.S.; Gupta, M.; Chib, R.; Kumar, A.; Wazir, P.; Khan, I. A.; Nargotra, A. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 930–940.

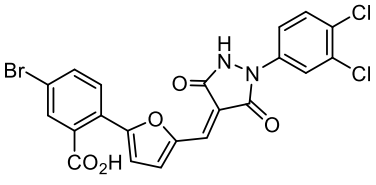
[90] Han, C.; Zhang, J.; Chen, L.; Chen, K.; Shen, X.; Jiang, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 656-662.



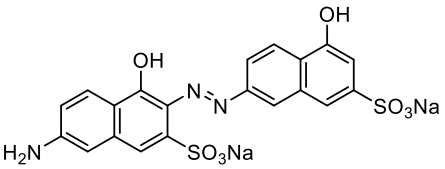
48, IC_{50} = 10.7 μM (*Mt*)



49, IC_{50} = 5.5 μM (*Hp*)



50, IC_{50} = 6.4 μM (*Hp*)



51, IC_{50} = 4.9 μM (*Hp*)

Figura 1.17 Estructura química de los compuestos **48–51**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. Objetivos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. Objetivos

Los objetivos de esta tesis doctoral son:

(1) El desarrollo de nuevos antibióticos adyuvantes para restaurar la eficacia de los antibióticos β-lactámicos en uso clínico, reduciendo el impacto de uno de los mecanismos de resistencia bacteriana más extendidos, la hidrólisis enzimática del anillo β-lactámico catalizada por las β-lactamasas. Para ello, se abordará la síntesis de análogos del sulbactam, un inhibidor de resistencia en uso clínico, funcionalizados en su posición C6 con grupos arilmetilideno, las sulfonopenicilinas **52**, en las que el grupo arilo consiste en un heterocíclo de 5 miembros con un átomo de nitrógeno en posición 2 (Figura 2.1A). Así mismo, se estudiará la funcionalización del grupo metilo pro-*R* en las sulfonopenicilinas **52** con un átomo de nitrógeno heterocíclico, los compuestos **53**, que podría estar sustituidos con un grupo quelante de Fe(III) (catecol), con el objeto de dirigir su internalización en el periplasma utilizando las vías bacterianas de absorción de hierro.

(2) El desarrollo de potenciales inhibidores de enzima siquimato quinasa (SQ), una diana terapéutica no explotada en clínica, pero con un gran potencial para el desarrollo de antibióticos frente a patógenos potencialmente mortales (*M. tuberculosis*, *P. aeruginosa* y *H. pylori*) con un mecanismo de acción novedoso y sin resistencia cruzada a los fármacos disponibles. Para ello, se desarrollarán análogos del ácido siquímico (**31**), el sustrato natural, sustituidos en la posición C5 con grupos aromáticos voluminosos unidos al anillo ciclohexénico a través por un grupo de hidroxilamina, los compuestos **54** (Figura 2.1B). Con estos compuestos se busca favorecer la interacción con el dominio SB del enzima, que juega un papel crucial en el aislamiento del sustrato natural del medio acuoso y en la estabilización de la conformación de alta energía necesaria para el proceso de fosforilación.

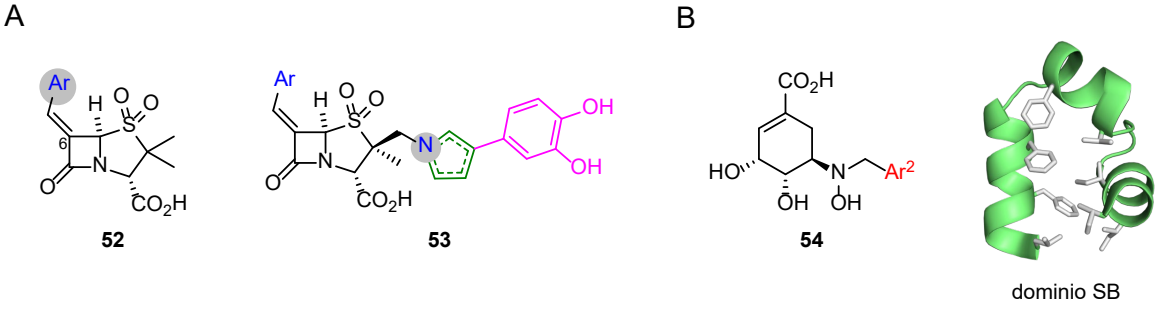


Figura 2.1.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. Resultados

Este apartado se encuentra parcialmente publicado en la revista *Journal of Medicinal Chemistry* como:

González-Bello, C*.; Rodríguez, D.; Pernas, M.; Rodríguez, A.; Colchón, E. *"β-Lactamase Inhibitors To Restore the Efficacy of Antibiotics againts Superbugs" J. Med. Chem.* 2020, *63*, 1859–1881. (doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279) Número especial: Women in Medicinal Chemistry.

Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CiQUS), Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Editorial: ACS Publications ISSN: 0022-2623 y 1520-4804

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.1 Desarrollo de Nuevos Inhibidores de β-lactamasas Basados en Sulfonopenicilinas

3.1.1 Sulfonopenicilinas en Uso Clínico o Previamente Descritas

Las sulfonopenicilinas son los primeros inhibidores de β-lactamasas utilizados en clínica. Surgieron en 1976 después del descubrimiento por parte del Grupo Beecham (ahora parte de GSK) del ácido clavulánico (**1**), un compuesto natural que ahora se utiliza en combinación con penicilinas como la amoxicilina, bajo el nombre de Augmentine®.[91,92] El ácido clavulánico (**1**) es un sustrato suicida de las β-lactamasas, ya que, después de sufrir el ataque nucleófilo del residuo de serina catalítico, se genera un intermedio imina que reacciona con un residuo nucleofílico del centro activo, o bien experimenta una reacción de hidrólisis, generando un nuevo grupo electrófilo reactivo (Esquema 3.1).

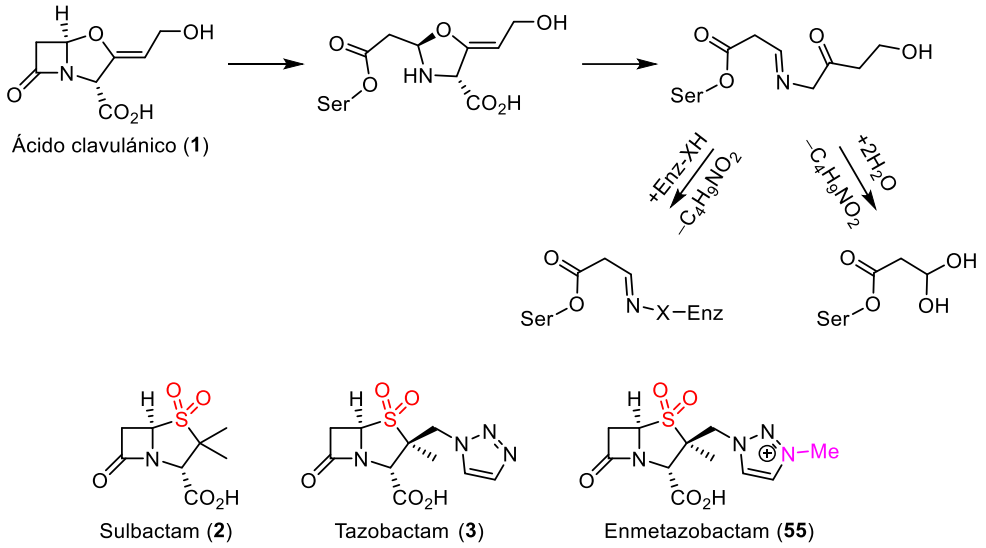


Figura 3.1 Estructuras químicas del ácido clavulánico (**1**), sulbactam (**2**), tazobactam (**3**), enmetazobactam (**55**), y representación esquemática del mecanismo de inhibición de **1**.

El mecanismo de inhibición irreversible del ácido clavulánico (**1**) inspiró el diseño posterior de otros compuestos relacionados mecanísticamente, lo que condujo al desarrollo del sulbactam (**2**) (Figura 3.1).[93] A diferencia de las penicilinas, después de la reacción con el enzima, se genera un grupo sulfinato que promueve interacciones electrostáticas muy fuertes con la cadena lateral de los residuos próximos en el centro

[91] Reading, C.; Cole, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 852–857.

[92] Brown, A. G. *Drug Des. Delivery* **1986**, *1*, 1–21.

[93] English, A. R.; Retsema, J. A.; Girard, A. E.; Lynch, J. E.; Barth, W. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1978**, *14*, 414–419.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

activo.[94] Este inhibidor se utiliza en la práctica clínica en combinación con ampicilina, cefoperazona o ceftriaxona, y, además, tiene cierta actividad antibacteriana intrínseca contra especies de *Acinetobacter* y otros patógenos, por lo que actualmente se encuentra en estudio clínico en combinación con durlobactam (fase III). Desafortunadamente, no es efectivo frente a las β-lactamasas más peligrosas como las carbapenemasas de clase D. La funcionalización posterior de uno de los grupos metilos del sulbactam llevó al desarrollo del tazobactam (**3**), que actualmente se utiliza en la práctica clínica en combinación con ceftolozano o piperacilina.[95] Recientemente, Allecra Therapeutics desarrolló un derivado del tazobactam, el enmetazobactam (**55**, AAI101), resultado de la incorporación de un grupo metilo en la posición terminal del grupo 1,2,3-triazol.[96,97] Es un compuesto neutro diseñado para mejorar la entrada en el espacio periplásmico de las bacterias, donde se encuentran las β-lactamasas. En relación con el tazobactam, presenta una vida media prolongada. Este compuesto es un potente inhibidor de las serina-β-lactamasas de clase A, específicamente ESBL. Actualmente, la combinación del enmetazobactam con cefepime, una cefalosporina también neutra, se encuentra en fase III de desarrollo clínico para el tratamiento de pacientes con infecciones complicadas del tracto urinario.[98]

En 1986 investigadores de la farmacéutica Pfizer descubrieron que la introducción de un grupo (2-piridil)metileno en la posición C6 del sulbactam (**2**), el compuesto **56**, aumenta la capacidad inhibitoria frente a ciertas β-lactamasas en el rango del bajo micromolar (Figura 3.2.A).[99] El compuesto presenta un mecanismo de inhibición novedoso ya que la reacción con el enzima desencadena la formación de un aducto de indolizina **II** que es resistente a la hidrólisis, por lo que el enzima permanece inactivado por más tiempo. La formación de este aducto se explica porque la imina conjugada **I**

[94] 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.

[95](a) Micetich, R. G.; Maiti, S. N.; Spevak, P.; Hall, T. W.; Yamabe, S.; Ishida, N.; Tanaka, M.; Yamazaki, T.; Nakai, A.; Ogawa, K. *J. Med. Chem*. **1987**, *30*, 1469−1474. (b) Aronoff, S. C.; Jacobs, M. R.; Johenning, S.; Yamabe, S. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1984**, *26*, 580−582.

[96] Crandon, J. L.; Nicolau, D. P. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2015**, *59*, 2688−2694.

[97] 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.

[98] Palanisamy, S. U.; Paul-Satyaseela, M.; Narayanan, S.; Balasubramanian, G.; Appu, A.; Manickam, S.; Periasamy, H. WO 2012070071, Nov 25, 2010.

[99] Chen, Y. L.; Chang, C. W.; Hedberg, K. *Tetrahedron Lett*. **1986**, *27*, 3449−3452.

resultante del ataque nucleofílico de la serina catalítica al anillo β-lactámico en **56**, desencadena un segundo ataque nucleofílico intramolecular por parte del átomo de nitrógeno del anillo de piridina.

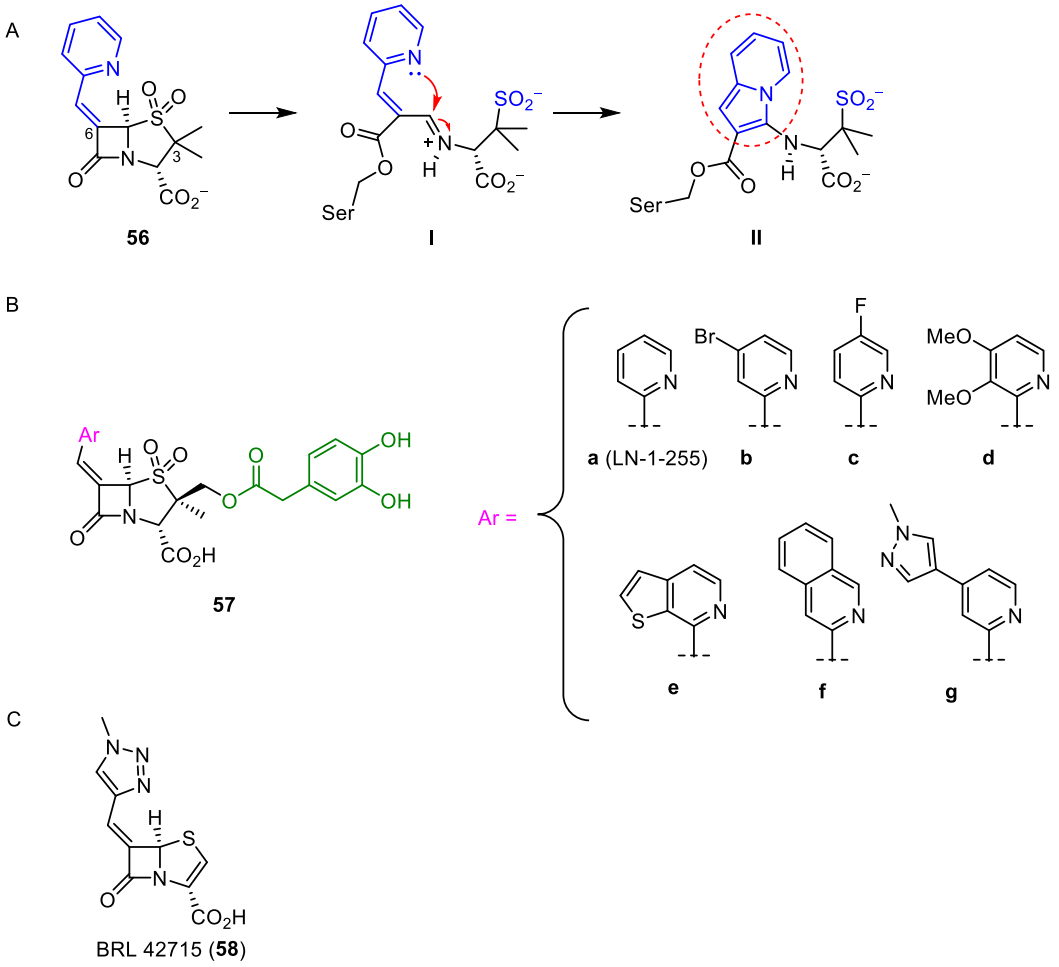


Figura 3.2 (A) Mecanismo de inhibición del compuesto **56**. (B) Estructuras químicas del compuesto LN-1-255 (**57a**) y las 6-arilmetilideno sulfonopenicilinas **57b-g**. (C) Estructura química del penem BRL 42715 (**58**).

Posteriormente, Buynak[100] descubrió que la modificación del grupo metilo pro-*R* en la posición C3 del compuesto **56**, el compuesto LN-1-255 (**57a**), con un grupo quelante de hierro permitía expandir el rango de actividad a las carbapenemasas más peligrosas de clase D.[101] Estudios microbiológicos posteriores, para los cuales nuestro grupo de investigación desarrolló una estrategia sintética del mismo a gran escala y que supone más de 10 etapas sintéticas, demostraron que este compuesto es un inhibidor muy

[100] Buynak, J. D *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1951–1964.

[101] 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.; van den Akker, F.; Bonomo, R. A.; Romero, A.; Buynak, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13320–13331.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

eficaz contra la carbapenemasa OXA-48 que se encuentra ampliamente distribuida en cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*, así como contra todas las β-lactamasas de clase D que hidrolizan carbapenems del patógeno *A. baumannii* [OXA -23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 y OXA-235, y OXA-51 (cromosómico)].[102,103] Demostramos que el compuesto **57** también tiene una excelente capacidad para restaurar la eficacia del imipenem *in vitro* (32 a 128 veces) y una buena actividad *in vivo* en modelos preclínicos de neumonía murina.[104] El grupo catecol del compuesto facilita su internalización en el periplasma a través de las vías de captación de hierro bacteriano gracias a la formación de complejos de hierro estables.

En la búsqueda de nuevos inhibidores de β-lactamasas basados en la estructura de **57a**, en nuestro grupo de investigación desarrollamos los derivados **57b-g** con los que se estudió el efecto de la densidad electrónica del anillo de piridina (Figura 3.2B). Los mejores resultados se obtuvieron reduciendo la densidad electrónica del anillo mediante la introducción de un sustituyente bromuro (*para*) o fluoruro (*meta*), compuestos **57b** y **57c**, respectivamente.[105] Las combinaciones imipenem/**57b** e imipenem/**57c** restauraron casi por completo la eficacia antibiótica en las cepas de *A. baumannii* productoras de carbapenemasas OXA-23 y OXA-24/40 (1 μg mL^{-1}), y también proporcionaron buenos resultados frente a cepas de *K. pneumoniae* productoras de la carbapenemasa OXA-48 (4 μg mL^{-1}). Estos derivados **57b** y **57c** mantienen o mejoran la actividad del compuesto original **57a** frente a los enzimas β-lactamasas de clase D que hidrolizan carbapenems (OXA-23, OXA-24/40), y también se restableció la eficacia antibiótica en cepas de *E. coli* portadoras de β-lactamasas de clase A (TEM-1 y CTX-M-2) y clase C (CMY-2 y DHA-1). También demostraron tener valores de K_I en el rango nanomolar bajo frente a OXA-24/40. Por otra parte, estudios realizados con **57a**, **57b** y **57c** frente a una colección de aislados clínicos multirresistentes

[102] Vázquez-Ucha, J. C.; Maneiro, M.; Martínez-Guitián, M.; Buynak, J. D.; Bethel, C. R.; Bonomo, R. A.; Bou, G.; Poza, M.; González-Bello, C.; Beceiro, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01172-17.

[103] Vallejo, J. A.; Martínez-Guitián, 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**, *71*, 2171–2180.

[104] Vázquez-Ucha, J. C.; Martínez-Guitián, M.; Maneiro, M.; Conde-Perez, K.; Álvarez-Fraga, L.; Torrens, G.; Oliver, A.; Buynak, J.D.; Bonomo, R. A.; Bou, G.; González-Bello, C.; Poza, M.; Beceiro, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01092-19.

[105] Rodríguez, D.; Maneiro, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; Beceiro, A.; González-Bello, C. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 3737–3755.

y cepas mutantes de laboratorio de *P. aeruginosa* con diferentes niveles de expresión de ampC revelaron que estos compuestos mostraron una eficiencia inhibitoria similar a la del avibactam, disminuyendo las CIM de ceftazidima para todas las cepas analizadas y también mejorando la cinética de inhibición en relación con el avibactam- inhibidor reversible con una tasa de desacilación lenta - con valores de vida media de tiempo de residencia entre 2.8 y 3.8 veces superiores a los del avibactam.[106] El bromuro **57b** demostró ser el inhibidor con mayor afinidad de la serie (K_I = 15.6 nM), como lo indica el K_I aproximadamente 5 veces menor en relación con el compuesto original **57a**, y la mayor eficiencia inhibidora (k_{inact}/K_I), que fue respectivamente 3.3 y 4.2 veces mayor que los valores producidos por los inhibidores **57a** y **57c**. Los estudios de simulación de dinámica molecular realizados utilizando diversas enzimas AmpC revelaron que el grupo aromático en **57a**, **57b** y **57c** se sitúan en la entrada tipo túnel adyacente a la serina catalítica, e induce el plegamiento de la hélice H10, lo que indica el valor potencial de este bolsillo no siempre evidente en el diseño de fármacos. Esto último, junto con los excelentes resultados obtenidos con los inhibidores **57a**, **57b** y **57c** frente a las BLEE CTX-M-2 de Enterobacteriaceae y las carbapenemasas de clase D OXA-23 y OXA-24/40 de *A. baumannii*, identifican estos compuestos, particularmente el bromuro **57b**, como inhibidores de serina-β-lactamasa de amplio espectro capaces de restaurar la actividad de las cefalosporinas y carbapenems en uso clínico contra los patógenos multirresistentes más importantes.

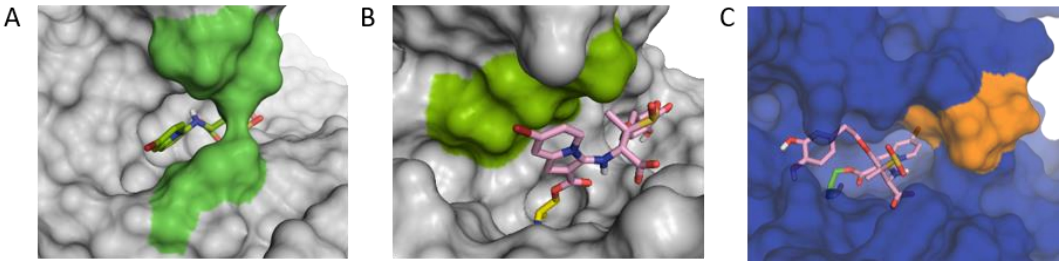


Figura 3.3 Estructuras tridimensionales de las β-lactamasas OXA-24/40 (A), OXA-48 (B) y PDC-1 (C) inactivadas por el compuesto **57b**.

Por otra parte, Coleman y colaboradores[107] descubrieron que la introducción de un grupo [4-(1,2,3-triazolil)]metileno en la posición C6 de un penem proporciona el inhibidor de β-lactamasa más potente jamás identificado, el BRL 42715 (**58**), siendo

[106] Vázquez-Ucha, J. C.; Rodríguez, D.; Lasarte-Monterrubio, C.; Lence, E.; Arca-Suarez, J.; Maneiro, M.; Gato, E.; Perez, A.; Martínez-Guitián, M.; Oliver, J. A.; Bou, G.; González-Bello, C.; Beceiro, A. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 6310–6328.

[107] Coleman, K.; Griffin, D. R. J.; Page, J. W. J.; Upshon, P. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 1580–1587.

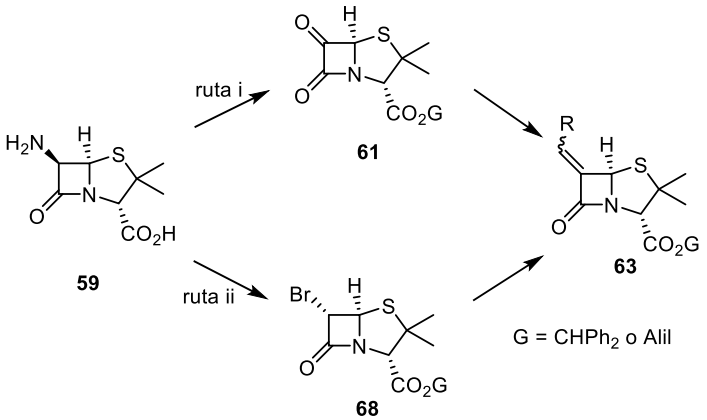
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

capaz de restaurar eficientemente la actividad antibiótica de la amoxicilina en cepas bacterianas que albergan diversas β-lactamasas (Figura 3.2.B). Lamentablemente, el BRL 42715 (**58**) resultó ser demasiado inestable para su desarrollo clínico, donde se especula sea debido a la presencia del grupo α,β-insaturado del penem, y, además, es rápidamente hidrolizado por las metalo-β-lactamasas para dar un derivado de dihidrothiazepina.[108]

Con estos precedentes en esta tesis doctoral nos planteamos desarrollar nuevas sulfonopenicilinas como inhibidores de las β-lactamasas más peligrosas que combinen los dos grupos funcionales más destacados de los compuestos **57** y el BRL 42715 (**58**), en concreto la funcionalización del grupo metilo pro-*R* de los análogos **57** y, por otro lado, el grupo arilmetilideno (heterociclo de 5 miembros) de **58**. Así mismo se busca explorar estrategias sintéticas alternativas a las desarrolladas para la síntesis de estos compuestos, con el objeto de valorar su potencial en las etapas más críticas del proceso.

3.1.2 Estrategias sintéticas de introducción del grupo arilmetileno en la posición C6 de las penicilinas

La introducción de grupos arilmetileno en la posición C6 de las penicilinas se ha descrito utilizando dos tipos de procesos clave: (i) reacción de Wittig entre una sal de fosfonio y la cetona **61**; o (ii) adición nucleófila de un derivado de Grignard del bromuro **76** al aldehído adecuado seguido de eliminación (Esquema 3.1). Ambas metodologías implican el uso del ácido 6-aminopencilánico (**59**) comercialmente disponible como producto de partida. Además, en ambos casos, la geometría del doble enlace formado es predominantemente *Z*.



Esquema 3.1.

[108] Osborne, N. F.; Broom, N. J. P.; Coulton, S.; Harbridge, J. B.; Harris, M. A.; Stirling-François, I.; Walker, G. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. **1989**, 371–373.

Ruta i_Reacción de Wittig: esta estrategia implica la preparación de la cetona **69** para la que se han descrito diversas aproximaciones (Esquema 3.2):

(1) Ruta A - oxidación de Swern del alcohol **60**, que se obtiene por desaminación del ácido 6-aminopenicilánico **59** por tratamiento con nitrito sódico y ácido perclórico y la posterior esterificación del ácido carboxílico.[109] La cetona **61** resultante se usó directamente sin purificación en la posterior reacción de Wittig, obteniendo mezclas de los isómeros *Z* y *E*. Desafortunadamente esta estrategia sintética presenta algunas complicaciones, como es el bajo rendimiento (20%) en la obtención del alcohol **60**, además de los variables rendimientos de la reacción de Wittig, entre 20–80%.[110]

(2) Ruta B - alternativamente, Buynak y colaboradores[111,112] describieron la transformación de la amina **59** en la correspondiente cetona **61** mediante: (i) la formación de la correspondiente sal de diazonio por tratamiento con isopropil nitrito y cantidades catalíticas de ácido trifluoroacético; y (ii) la oxidación del crudo de reacción con óxido de propileno en presencia catalítica de octanoato de rodio. Sin embargo, este protocolo en nuestro grupo de investigación fue poco reproducible, en particular a gran escala.

(3) Ruta C – en nuestro grupo de investigación hemos desarrollado un procedimiento alternativo a la ruta B, que consisten en el uso de anhídrido trifluorometansulfónico y trietilamina, seguido de hidrólisis con ácido clorhídrico diluido.[105] El procedimiento es reproducible incluso a gran escala. La posterior reacción de Wittig entre la cetona **61** y sales de fosfonio de 2-piridinio proporciona mayoritariamente el isómero *Z*. La oxidación del sulfuro **63** por tratamiento con ácido *meta*-cloroperbenzoico, y posterior eliminación del grupo bencidrilo por tratamiento con *m*-cresol condujo a la sulfonopenicilina **66**.

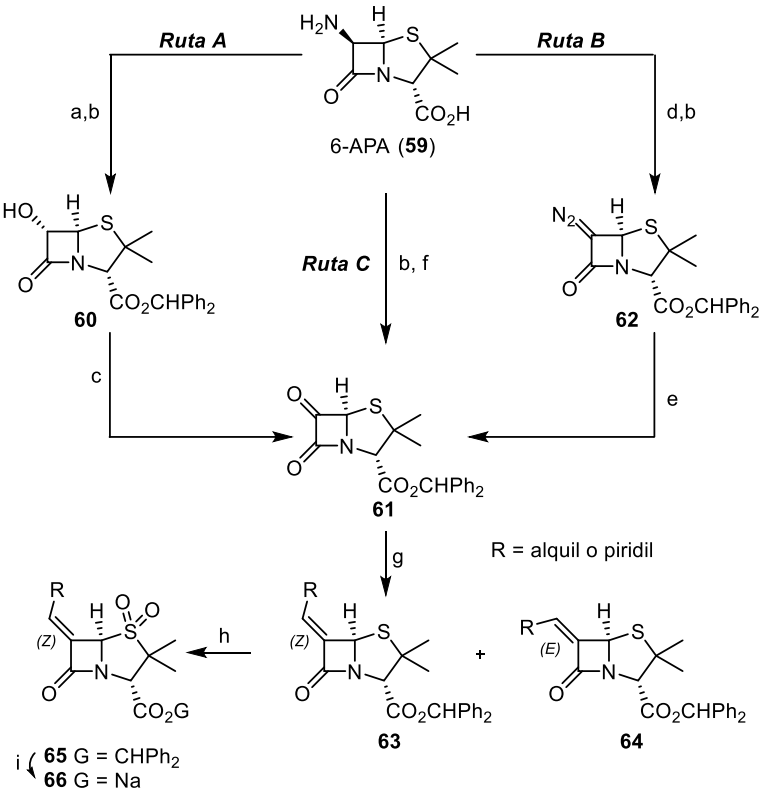
[109] Hauser, D.; Sigg, H. P. *Helv. Chim. Acta*. **1967**, *50*, 1327–1335.

[110] Chen, Y. L.; Chang, C. W.; Hedberg, K.; Guarino, K.; Welch, W. M.; Kiessling, L. Retsema, J. A.; Haskell, S. L.; Anderson, M.; Manousos, M.; Barret, J. F. *J. Antibiot.* **1987**, *6*, 803–822.

[111] Buynak, J. D.; Rao, A. S.; Doppalapudi, V. R. Patent WO99/33838, July 8, 1999.

[112] Pattanaik, P.; Bethel, C. R.; Hujer, A. M.; Hujer, K. M.; Distler, A. M.; Taracilla, M.; Anderson, V. E.; Fristche, T. R.; Jones, R. N.; Pagadala, S. R. R.; vander Akker, F.; Buynak, J. D.; Bonomo, R. A. *J. Biol. Chem*. **2009**, *284*, 945–953.

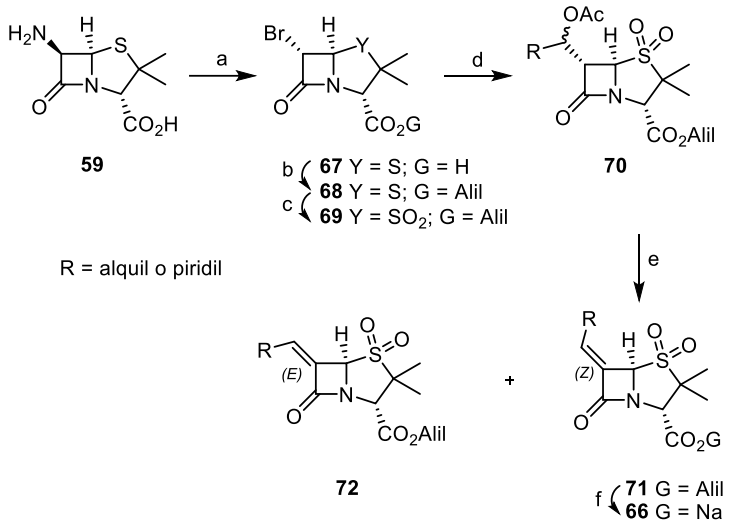
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Esquema 3.2 *Condiciones y reactivos:* (a) $NaNO_2$ (ac.), $HClO_4$, t.a. (b) Ph_2CN_2, CH_2Cl_2, t.a. (c) DMSO, TFAA, Et_3N, CH_2Cl_2, –78 ºC → t.a. (d) Me_2CHONO (cat.), TFA, t.a. (e) óxido de propileno, (cat.) $Rh_2(Oct)_4$, PhH, t.a. (f) 1. Tf_2O, Et_3N, CH_2Cl_2, –78 ºC →0 ºC. 2. Et_3N, –78 ºC. 3. HCl (0.5 M), –78 ºC → t.a. (g) 1. RCH_2PPh_3Cl, *t*-BuOK o amida sódica, THF, t.a. 2. **61**, THF, –78 ºC. (h) MCPBA, CH_2Cl_2, t.a. (i) 1. *m*-cresol, 50 ºC. 2. $NaHCO_3$.

Ruta ii_Reacción de Condensación Grignard: consiste en la preparación del magnesiano derivado del bromuro **69** por tratamiento con bromuro de metilmagnesio, seguido de adicción nucleófila al aldehído correspondiente, y atrapado del alcóxido resultante como acetato por reacción con anhídrido acético en presencia de piridina (Esquema 3.3). Esto proporciona una mezcla inseparable de los dos posibles diasteroisómeros que por tratamiento con 1,5-diazabiciclo[4.3.0]non-5-eno (DBN), proporciona los isómeros *Z* y *E* con rendimientos variables del 20–90%.[110] Es importante resaltar que este procedimiento utiliza la sulfonopiridinas como producto de partida. Finalmente, la separación de los isómeros y la desprotección del grupo alilo con tratamiento con paladio tetraquis(trifenilfosfina), trifenilfosfina y 2-metilhexanoato de potasio proporciona la sulfonopiridina **66**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

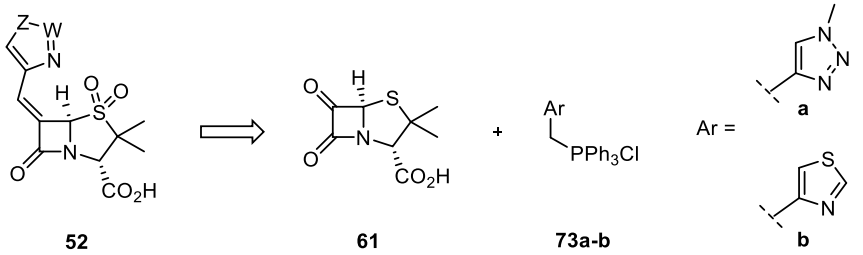


Esquema 3.3. *Condiciones y reactivos:* (a) KBr, H_2SO_4 (1.25 M), Na_2SO_3, H_2O, MeOH, t.a., 90%. (b) BrAlil, $NaHCO_3$, Et_3N, t.a., 87%. (c) MCPBA, CH_2Cl_2, t.a. 62% (d) MeMgBr, RCHO, Ac_2O, Pi, THF, t.a., 70−100%. (e) DBN, CH_2Cl_2, t.a., 20−90%. (f) $Pd(PPh_3)_4$, Ph_3P, 2-metilhexanoato de potasio, AcOEt, t.a., 33−91%.

3.1.3 Síntesis de los compuestos 52

3.1.3.1 Primera aproximación

En primer lugar, se exploró la introducción del grupo arilmetileno mediante la estrategia sintética cuya etapa clave implica la reacción de Wittig entre las sales de fosfonio **73** y la cetona **61**, cuya síntesis se llevó a cabo en dos etapas a partir del ácido (+)-6-aminopenicilánico (**59**) disponible comercialmente siguiendo los protocolos descritos anteriormente (Esquema 3.4).[105]

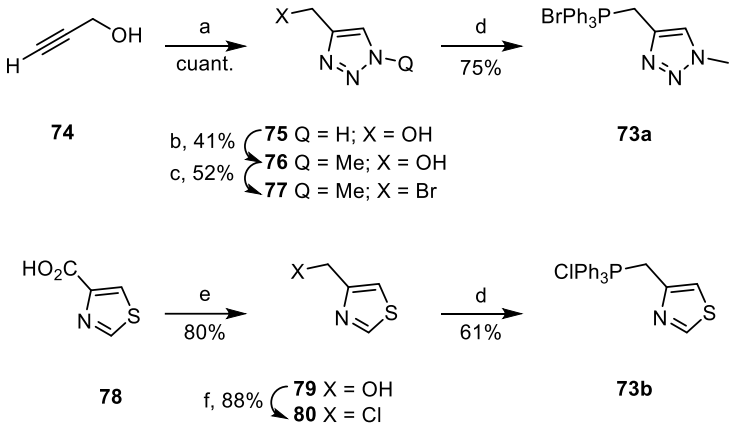


Esquema 3.4 Análisis retrosintético de los compuestos **52**.

La síntesis de la sal de fosfonio **73a** se realizó en cuatro etapas a partir del alcohol propargílico (**74**) disponible comercialmente (Esquema 3.5). En primer lugar, una reacción de ciclación 1,3-dipolar entre el alcohol propargílico (**74**) y trimetilsililazida proporcionó el triazol **75** con excelente rendimiento, cuya alquilación por tratamiento con yoduro de metilo y carbonato potásico condujo al compuesto **76** con un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

rendimiento del 41%.[113 114] Este se transformó en el bromuro **77**[115] mediante una reacción de Appel y finalmente tratamiento con trifenilfosfina en tolueno proporcionó la sal de fosfonio deseada **73a** con un rendimiento del 75%. La sal de fosfonio **73b** se preparó a partir del ácido 4-tiazolcarboxílico (**78**) comercialmente disponible, siguiendo protocolos previamente descritos.[116,117,118] El ácido 4-tiazolcarboxílico (**78**) se redujo por tratamiento con borano dimetilsulfuro al alcohol **79**, mediante sustitución nucleófica el alcohol **79** se transformó en el cloruro **80** y finalmente por tratamiento con trifenilfosfina en tolueno se obtuvo la sal de fosfonio **73b** con un rendimiento del 61%.



Esquema 3.5 *Reactivos y condiciones:* (a) $TMSN_3$, MeOH, 105 ºC. (b) MeI, K_2CO_3, MeCN, t.a. (c) CBr_4, Ph_3P, CH_2Cl_2, t.a. (d) Ph_3P, PhMe, Δ. (e) BH_3MeS, THF, Δ (f) $SOCl_2$, CH_2Cl_2, Δ.

La reacción de Wittig entre la cetona **61** y los correspondientes iluros de las sales de fosfonio **73** obtenidos por tratamiento con *terc*-butóxido potásico, proporcionó una mezcla inseparable de los dos posibles isómeros *Z* y *E,* los compuestos **81** y **82**, respectivamente (Esquema 3.6). Además, los rendimientos no superaron el 10% en el mejor de los casos. Estos resultados nos llevaron a explorar otras aproximaciones más eficientes que se discuten a continuación.

[113] Klein, R. S.; Heras de Las, P. G.; Tam, S. Y. K.; Wempem, I.; Fox, J. J. *J. Het. Chem.* **1976**, *13*, 589.

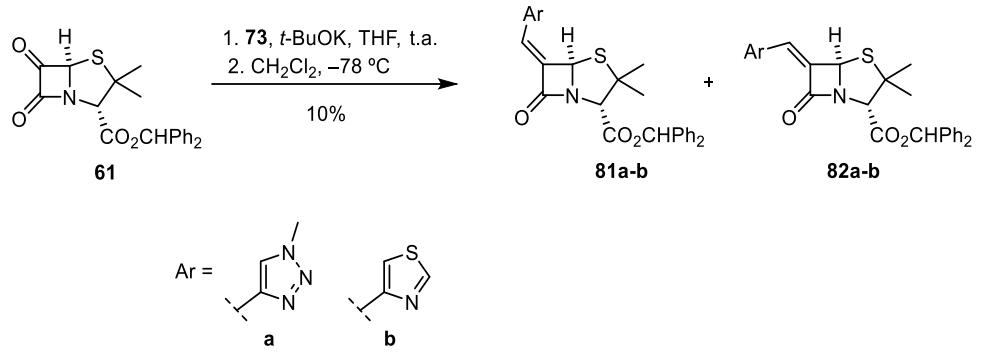
[114] Kidwai, M.; Jain, A. *Appl. Organometal. Chem.* **2011**, *15*, 620.

[115] Berdini, V.; Buck, I. M.; Day, J. E. H.; Griffiths-Jones, C. M.; Heightman, T. D.; Howard, S.; Murray, C. W.; Norton, D. O'Reilly, M.; Woolford, A. J. WO2017068412 A1, 2017.

[116] Baker, S. J.; Goldsmith, P. J.; Hancox, T. C.; Pegg, N. A.; Price, S.; Shuttleworth, S. J.; Sohal, S. WO2007122410 A1, 2007.

[117] Kikelj, D.; Urleb, U. *Science of Synthesis* **2002**, *11*, 627–833.

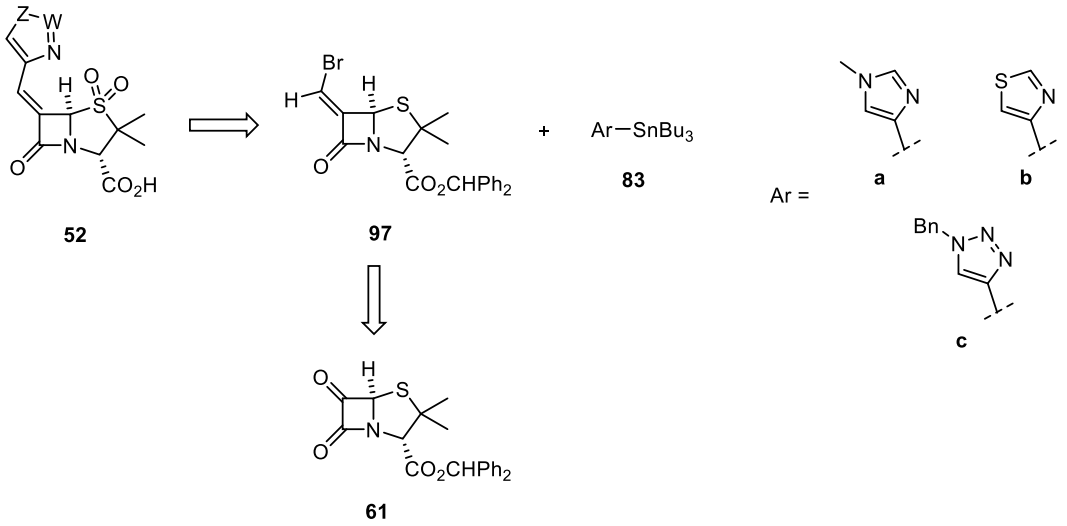
[118] Hartey, C. D.; Mordaunt, J. E.; Shah, P.; Slater, M. J. WO2007088148 A1, 2007.



Esquema 3.6

3.1.3.2 Segunda aproximación

La segunda estrategia sintética explorada consistió en la incorporación de los anillos heterocíclicos de 5-miembros mediante una reacción de acoplamiento cruzado carbono-carbono tipo Stille, entre el bromuro **97** y los estannanos **83** (Esquema 3.7).[119] La ventaja de esta aproximación es que permitiría controlar la configuración *Z* del doble enlace.



Esquema 3.7

En primer lugar, se sintetizaron los estannanos **83a** y **83b** en tres etapas a partir de los compuestos comerciales imidazol (**84**) y tiazolidinediona (**87**), respectivamente

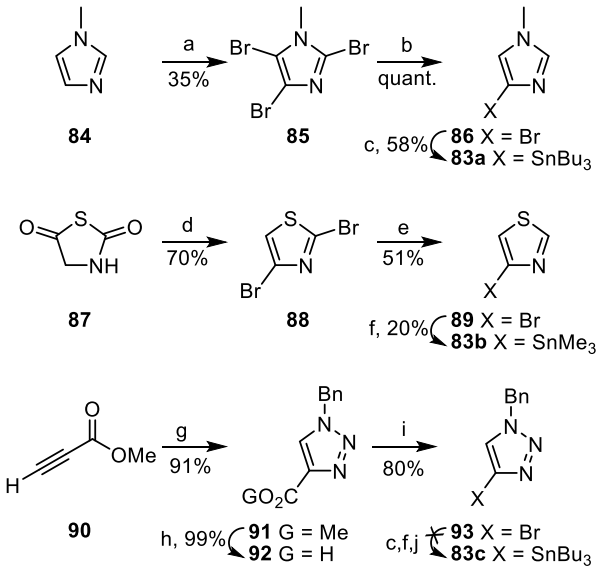
[119] Buynak, J. D.; Doppalapudi, V. R.; Frotan, M.; Kumar, R.; Chambers, A. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 5709–5718.

siguiendo procedimientos anteriormente descritos (Esquema 3.8).[120,121] La síntesis abarcó la bromación del imidazol **84**, y la simultánea aromatización y bromación de la tiazolidinediona **87**, seguido de una desbromación de los bromos en las posiciones 2 y 5 para el anillo de imidazol **85**, y el bromo en posición 2 para el anillo de tiazol **88**. Finalmente, se llevó a cabo la sustitución de los bromuros **86** y **89** por los estannanos correspondientes. En cuanto al compuesto **83c**, su obtención se inició a partil del metil propiolato (**90**) y bencilazida comercialmente disponibles.[122] A través de una reacción de cicloadición 1,3-dipolar se obtuvo el triazol **91**. El grupo éster metílico presente en el triazol **91** mediante hidrolisis básica se obtuvo el ácido carboxílico **92**. Posteriormente, mediante tratamiento con hidróxido potásico y bromo se obtuvo el bromuro **93**. Se realizaron varios intentos para la sustitución del bromuro **93** por un estannano, sin embargo, todas las condiciones empleadas resultaron infructuosas.

[120] (a) O'Connell, J. F.; Parquette, J.; Yelle, W. E.; Wang, W.; Rapoport, H. *Synthesis* **1988**, *10*, 767-71. (b) Ebright, R. H.; Ebright, Y. W.; Shen, J.; Bacci, J.; Hiebel, A. C.; Solvibile, W.; Self, C.; Olson, G. WO2013192352 A1 2013. (c) Zhao, B.; Zhang, M.; Yu, H.; Yang, S.; Chen, Z.; Xu, Y. WO2018214867 A1 2018.

[121] (a) Grubb, A. M.; Schmidt, M. J.; Seed, A. J.; Sampson, P. *Synthesis* **2012**, *44*, 1026-1029. (b) Uzelac, E. J.; Rasmussen, S. C. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 5947-5951. (c) Han, Y.; Siliphaivanh, P.; Spencer, K.; Tummanapalli, S. *World Int. Prop. Org.* WO2017095725 A1, 2017.

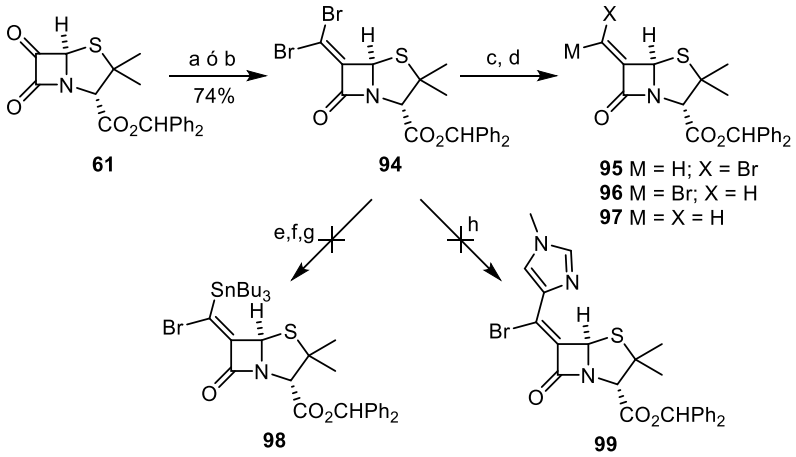
[122] (a) Lei, M.; Hu, R.; Wang, Y.; Zhang, H. *Heterocycles* **2014**, *88*, 1511-1517. (b) Aebi, J.; Binggeli, A.; Green, L.; Hartmann, G.; Maerki, H. P.; Mattei, P.; Ricklin, F.; Roche, O. *World Int. Prop. Org.*, WO2009003861 A1 2009. (c) Afanas'ev, O. I.; Tsyplenkova, O. A.; Seliverstov, M. Yu.; Sosonyuk, S. E.; Proskurnina, M. V.; Zefirov, N. S. *Russian Chem. Bull.* **2015**, *64*, 1470–1472.



Esquema 3.8 *Reactivos y condiciones:* (a) Br_2, NaOAc, AcOH, t.a. (b) Na_2SO_3, H_2O, AcOH, Δ. (c) 1. EtMgBr, THF, −15 ºC. 2. $SnBu_3Cl$, −15 ºC. (d) P_4O_{10}, Bu_4NBr, t.a. (e) $NaBH_4$, MeCN, Δ. (f) *n*-BuLi, $SnMe_3Cl$, Et_2O, −78 ºC. (g) BnN_3, MeOH, Δ. (h) KOH, THF-H_2O, t.a. (i) KOH, Br_2, H_2O, t.a. (j) $(SnBu_3)_2$, $Pd(PPh_3)_4$, PhMe, t.a.

El compuesto **95** se obtuvo en dos etapas a partir de la cetona **61** (Esquema 3.9). En primer lugar, el tratamiento de la cetona **61** con trifenilfosfina y tetrabromuro de carbono proporcionó el dibromuro **94** en un rendimiento del 74%. La segunda etapa consistió en el tratamiento del dibromuro obtenido con isopropil bromuro de magnesio en tetrahidrofurano y posterior calentamiento −100 ºC en ácido acético. Desafortunadamente, la reacción no condujo exclusivamente al compuesto **95** como había sido descrito, sino que en su lugar se obtuvo una mezcla de los dos posibles compuestos de monodesbromación **95** y **96**, así como trazas del compuesto **97** resultante de la reacción en ambas posiciones del alqueno. Se ensayaron estas mismas condiciones a otras temperaturas, así como, otras condiciones de reacción como el tratamiento con $ClNH_4$, Zn/Cu en metanol y tetrahidrofurano pero en todos los casos se obtuvo el mismo resultado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

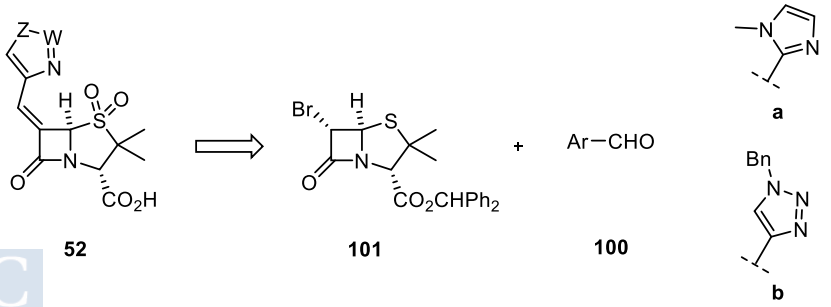


Esquema 3.9 *Condiciones y reactivos:* (a) Ph_3P, CBr_4, CH_2Cl_2, −78 ºC. (b) 1. $BrPh_3PCH_2Br$, *t*-BuOK, THF, −15 ºC → 0 ºC. 2. **61**, CH_2Cl_2, −78 ºC. (c) 1. *i*-PrMgBr, THF, −100 ºC ó −60 ºC. 2. AcOH, −100 ºC ó −60 ºC. (d) NH_4Cl, Zn/Cu, MeOH/THF, 0 ºC→ t.a. (e) $(Bu_3Sn)_2$, $Pd_2(dba)_3$, DMF, t.a. (f) $(Bu_3Sn)_2$, $Pd(PPh_3)_4$, PhMe, t.a. (g) *n*-BuLi, Me_3SnCl, Et_2O, −78 ºC. (h) **83a**, $Pd_2(dba)_3$, DMF, t.a.

La falta de regioselectividad observada en la aproximación anterior en la reacción de desbromación, se exploró la reacción de Wittig entre la cetona **61** y el bromuro de (bromometil)trifenilfosfina, lo que permitiría acceder de forma directa a los compuestos **95** o **96**. Desafortunadamente se obtuvo el compuesto dibromado **94**. Se ensayó también el acoplamiento tipo Stille entre el compuesto dibromado **94** y el estannano **83a**, utilizando como catalizador tris(dibencilidenacetona) dipaladio(0), observándose únicamente la descomposición del producto de partida. Por otro lado, se ensayó la funcionalización regioselectiva del dibromuro **94** como tributilestannano utilizando varias condiciones, pero en ninguno de los casos se obtuvo el compuesto deseado. Estos resultados negativos nos llevaron a explorar otras aproximaciones.

3.1.3.3 Tercera aproximación

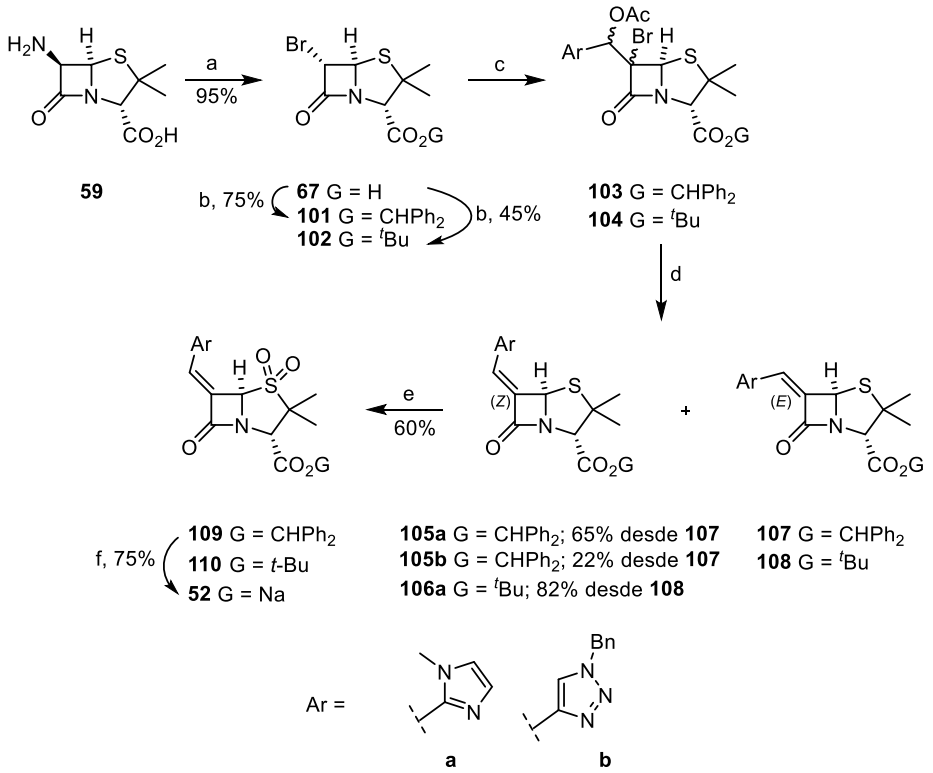
En tercer lugar, se abordó la síntesis de los compuestos objetivo mediante adición nucleofílica a los correspondientes aldehídos heterocíclicos y posterior reducción eliminatoria entre el bromuro **101** y los aldehídos **100a-b** (Esquema 3.10).



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Esquema 3.10 Esquema retrosintético propuesto para la síntesis del compuesto objetivo **52**.

La síntesis del bromuro **101** se llevó a cabo en dos etapas siguiendo los protocolos previamente descritos, que consisten en la sustitución del grupo amino por un bromuro,[123][124] y la esterificación del ácido carboxílico en **67**. A continuación, el bromuro **101** se trató con eterato de etilo de bromuro de magnesio, seguido de tratamiento con los aldehídos 1-metil-2-imidazolcarboxaldehído (**100a**), disponible comercialmente, o 1-metilfenil-1*H*-1,2,3-triazolcarboxaldehído (**100b**), preparado según los protocolos ya descritos,[125] y una base orgánica, seguido de atrapado con anhídrido acético. Se ensayaron diversas bases, tales como trietilamina, LiHMDS (bis(trimetilsilil)amida de litio), LDA (diisopropilamida de litio) y litio difenilamida. Las dos últimas bases mencionadas proporcionaron los compuestos deseados, como una mezcla inseparable por cromatografía en columna de los posibles diasteroisómeros **103** que se utilizaron en la siguiente etapa. Los mejores rendimientos se obtuvieron utilizando litio difenilamida.



Esquema 3.11 *Condiciones y reactivos:* (a) KBr, H_2SO_4 (1.25 M), Na_2SO_3, H_2O, MeOH, t.a. (b) Ph_2CN_2, CH_2Cl_2/MeOH, t.a. o H_2SO_4, isobuteno, CH_2Cl_2, t.a. (c) 1. $MgBr_2$ Et_2O, Ph_2NLi, 1-metil-2-

[123] Wei-Liang, X.; Yun-Zheng, L.; Qing-Shan, Z.; He-Sung, Z. *Synthesis* **2005**, *3*, 442–446.

[124] Cignarella, G.; Pifferi, G.; Testa, E. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 2668–2669.

[125] (a) Yoshida, T.; Sakashita, H.; Numata, A.; Tahara, S.; Kawasumi, H. WO2008156142 A1 2008. (b) Pisal, M. M.; Annadate, R. A.; Athalye, M. C.; Kumar, D.; Chavan, S. P.; Sarkar, D.; Borate, H. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 979-988.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

imidazolcarboxaldehído o 1-metilfenil-1*H*-1,2,3-triazolcarboxaldehído, THF, –78 ºC. 2. Ac_2O, 0 ºC. (d)Zn, AcOH, t.a. o Zn, NH_4Cl, TMEDA, THF, t.a. (e) MCPBA, CH_2Cl_2, t.a. (f) *m*-cresol, 50 ºC.

Posteriormente, la reacción de reducción eliminatoria se llevó a cabo por tratamiento de la mezcla de diasteroisómeros **103** con Zn y ácido acético, obteniendo una mezcla (2:1) de los dos posibles isómeros *Z* y *E*, compuestos **105** y **107**, respectivamente (Esquema 3.11). Como los rendimientos obtenidos fueron bajos, se reemplazó el ácido acético por cloruro amónico y *N, N, N′,N′*-trimetiletilendiamina lo que proporcionó exclusivamente el compuesto **105** con rendimientos del 65% para el anillo de imidazol (**105a**) y 23% para el anillo de triazol (**105b**), utilizando el grupo bencidrilo, como grupo protector.[126] Finalmente, el compuesto **105** se transformó en el compuesto deseado **52** por oxidación con ácido *m*-cloroperbenzoico (rendimiento del 60%) seguido de desprotección del grupo bencidrilo en la sulfona resultante **109** por calentamiento con *m*-cresol (rendimiento del 75%).

Se exploró también la utilidad en la estrategia sintética de proteger el ácido carboxílico en **67** como ester *terc*-butílico. Este cambio proporcionó un aumento considerable de los rendimientos en las etapas clave del proceso (reacción de adición nucleofílica y reducción eliminatoria), llegando a obtener el compuesto **106a** con rendimientos del 82%. Sin embargo, la etapa final de desprotección del éster en **110** por tratamiento con TFA (ácido trifluororacético) en diclorometano, resultó ser más problemática de lo esperado, no proporcionando el ácido esperado **52**, sino un compuesto que no fue posible identificar. Se ensayaron otras condiciones de reacción como el tratamiento con ácido acético o HCl a distintas temperaturas, pero en ninguno de los casos se obtuvo el producto deseado. Por lo que los siguientes estudios se realizaron utilizando el grupo protector bencidrilo.

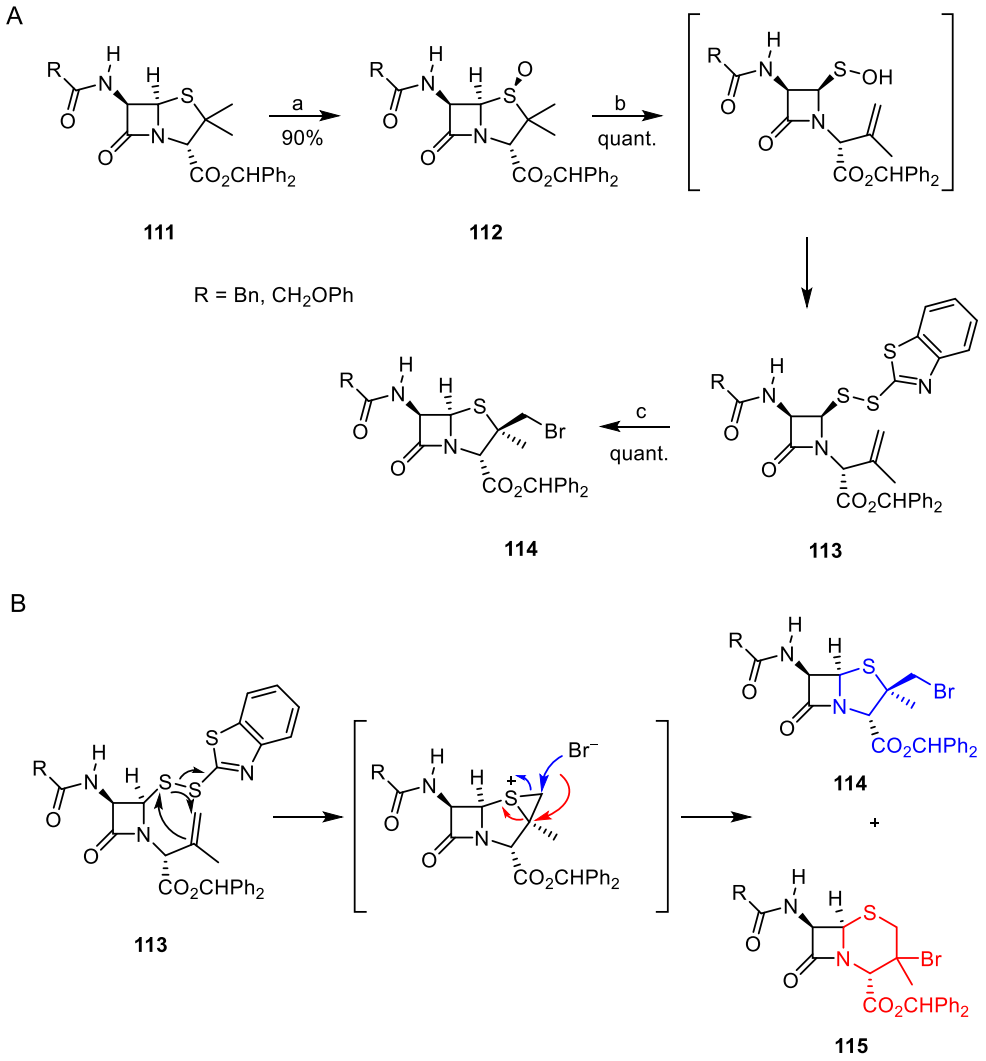
3.1.4 Funcionalización del grupo metilo pro-*R* de las penicilinas

Los primeros trabajos de funcionalización del grupo metilo pro-*R* de las penicilinas fueron descritos por Kamiya y colaboradores.[127] Los autores emplearon una reacción de reordenamiento sigmatrópico inducido térmicamente utilizando los sulfóxidos **112**, preparados por oxidación de los tioéteres **111** con ácido meta-cloroperbenzoico y funcionalizados en la posición C6 con un grupo amida (Esquema 3.12.A). El proceso

[126] Osborne, N. F.; Broom, N. J. P.; Coulton, S.; Harbridge, J. B.; Harris, M. A.; Stirling-François, I.; Walker, G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 371–373.

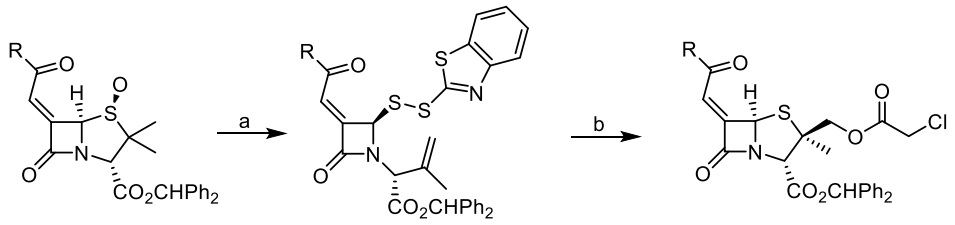
[127] Kamiya, T.; Teraji, T.; Saito, Y.; Hashimoto, M.; Nakaguchi, O.; Oku, T. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 3001–3004.

implica la captura del intermedio de reacción con 2-mercaptobenzotiazol proporcionando los disulfuros **113** en excelente rendimiento. A continuación, la funcionalización y ciclación por tratamiento con bromo en diclorometano proporciona el compuesto **114** con rendimiento cuantitativo. En este caso, el proceso conduce a la formación mayoritaria del compuesto cinético, no observándose formación del producto termodinámico, la cefalosporina **115**. Los autores resaltan que el bromuro **114** es relativamente estable en estado sólido, pero que en disolución (DMF) a temperatura ambiente se convierte cuantitativamente en la cefalosporina **115**.



Esquema 3.12 (A) *Condiciones y reactivos:* (a) MCPBA, CH_2Cl_2, t.a. (b) 2-mercaptobenzotiazol, PhMe, Δ. (c) Br_2, CH_2Cl_2, t.a. (B) Mecanismo de la reacción de ciclación donde se observa la formación del isómero cinético (anillo de 5 miembros) señalado en azul y el isómero termodinámico (anillo de 6 miembros), señalado en rojo.

Buynak y colaboradores[128] aplicaron la metodología desarrollada por Kamiya y colaboradores a diversas 6-alquilidenpenicilinas, obteniéndose de forma mayoritaria los derivados cinéticos **118** en rendimientos excelentes (Esquema 3.13). Los autores demostraron que la presencia del grupo ester o amida en la posición C6 es crucial para la obtención selectiva el compuesto cinético, ya que su sustitución por un grupo 2-piridilo conduce a una mezcla inseparable del producto cinético y termodinámico en el mejor de los casos en proporción (4:1). En escala de gramos la proporción se reduce a (2:1).



Esquema 3.13 *Condiciones y reactivos:* (a) 2-mercaptobenzotiazol, PhMe, Δ. (c) AgOAc, $ClCH_2CO_2H$, CH_2Cl_2, t.a.

En nuestro grupo de investigación hemos desarrollado una metodología sintética que permite la síntesis reproducible y a gran escala de 6-arilmetilen sulfonopenicilinas funcionalizadas en el grupo metilo pro-*R* con diversos grupos ester.[105,129] Esta metodología surge de la optimización de las etapas críticas desarrolladas anteriormente por Buynak y colaboradores[130] que en nuestro laboratorio resultaron ser poco reproducibles (Esquema 3.14). La síntesis comienza con la preparación del sulfóxido **119** en tres pasos a partir del ácido (+)-6-aminopenicilánico (**59**), que implica la esterificación del ácido carboxílico,[131,132] protección del grupo amino libre y la oxidación del grupo tioéter.[133] El sulfóxido **119**, se transforma en el disulfuro **120** siguiendo la estrategia descrita Kamiya y colaboradores.[127] Sin embargo, cuando esta reacción se lleva a cabo en tolueno, como se describe, se observa además la formación del alqueno

[128] Buynak, J. D.; Rao, A. S.; Doppalapudi, V. R.; Adam, G.; Petersen, P. J.; Nidamarthy, S. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9,* 1997–2002.

[129] Rodríguez, D. Tesis doctoral. New irreversible inhibitors of beta-lactamases for recovering antibiotics efficiency against superbugs. **2020**.

[130] Buynak, J. D.; Rao, A. S.; Doppalapudi, V. R. WO 99/33838, July 8, 1999.

[131] Micetich, R. G.; Singh, R. *Synthesis* **1985**, *1985*, 693–695.

[132] Thoraval, J. Y.; Nagai, W.; Yeung Lam Ko, Y. Y. C.; Carrie, R. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 3859–3868.

[133] Buynak, J. D.; Rao, A. S.; Doppalapudi, V. R. WO 99/33838, July 8, 1999.

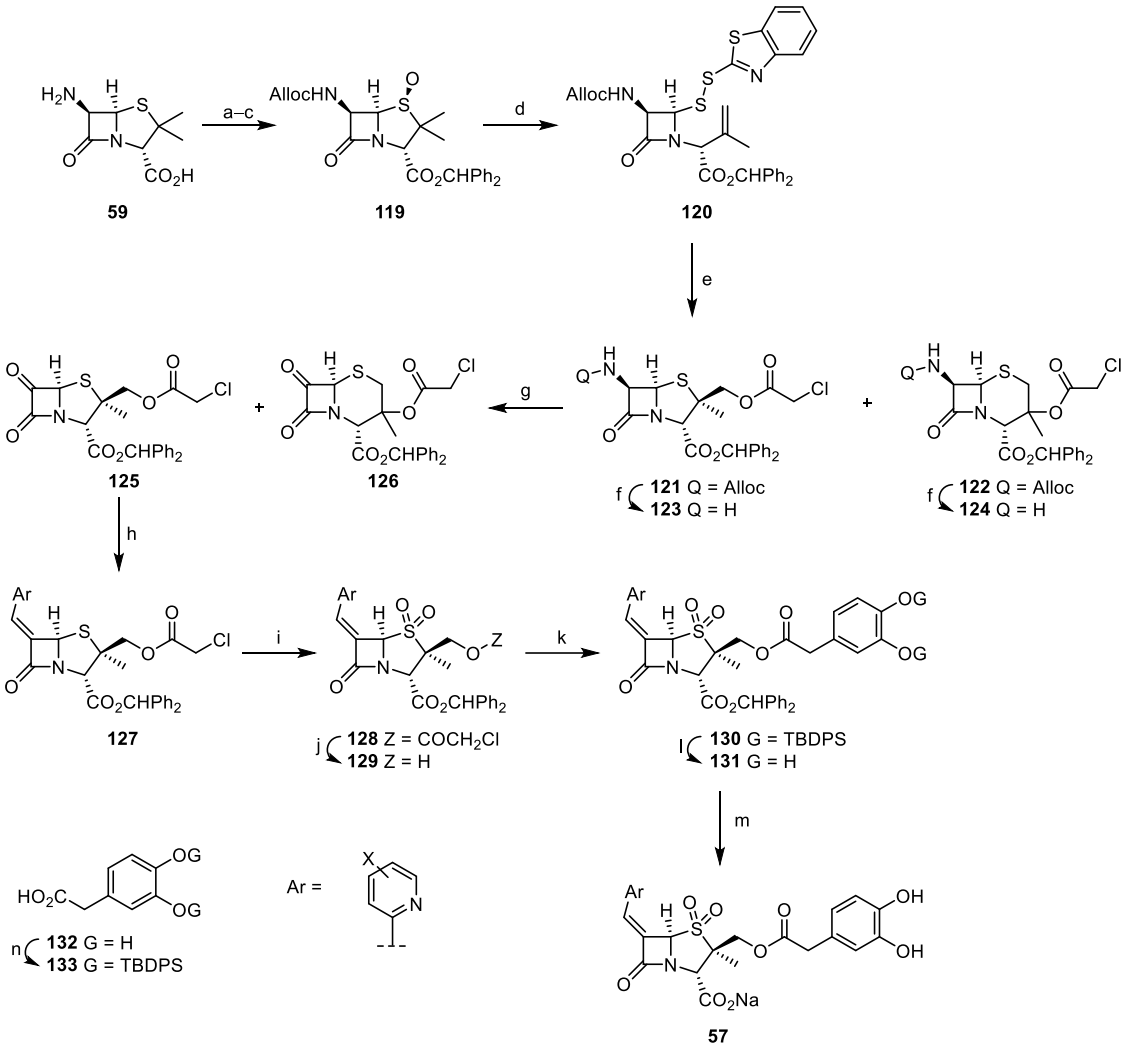
termodinámico no deseado. Además, el uso de otros disolventes y mezclas de los mismos, así como diferentes temperaturas y tiempos de reacción, producen mezclas de reacción complejas que resultaron ser tediosas de purificar. La formación del alqueno termodinámico se evita cuando la reacción se lleva a cabo en dioxano a reflujo y en presencia de $MgSO_4$ anhidro. En estas condiciones, se obtiene el disulfuro **120** con un rendimiento del 91% como único producto de reacción y sin necesidad de purificación. A continuación, la ciclación del disulfuro **120** para la modificación del grupo metilo pro-*R* con un grupo éster siguiendo protocolos previamente descritos por Buynak y colaboradores mediante tratamiento con acetato de plata y ácido cloroacético proporciona una mezcla cromatográficamente inseparable del producto cinético (compuesto **121**) y el termodinámico (compuesto **122**) en una proporción de 2:1.

Buynak y colaboradores describieron la transformación de la amina **123** (y su isómero **124** de seis miembros) en la correspondiente cetona **125** (y su isómero **126** de seis miembros) a través de una secuencia de dos reacciones: (i) la formación de la correspondiente sal de diazonio mediante tratamiento con nitrito de isopropilo y cantidades catalíticas de ácido trifluoroacético; y (ii) oxidación del crudo de reacción con óxido de propileno en presencia de cantidades catalíticas de octanoato de rodio. Sin embargo, en nuestras manos este protocolo era poco reproducible y en muchos casos suponía la pérdida de grandes cantidades de producto. Sin embargo, el tratamiento de la amina **123** (y su isómero **124** de seis miembros) con anhídrido tríflico y trietilamina y la posterior hidrólisis mediante tratamiento con HCl diluido proporcionó la cetona **125** (y su isómero **126** de seis miembros) de manera reproducible. Además, después de la reacción de Wittig entre la cetona **125** (y **126**) y diversas sales de fosfonio, es posible aislar los análogos **127** de cinco miembros deseados de sus homólogos de seis miembros. En estas condiciones, y a diferencia de los protocolos anteriores, se evita el uso posterior de mezclas de compuestos en los pasos restantes de la síntesis. Los compuestos **127** se obtienen con unos rendimientos globales desde las aminas **123** y **124** del 20–49%.

Finalmente, la oxidación de **127** con ácido *m*-cloroperbenzoico seguida de la desprotección del grupo cloroacetoxi en la sulfona resultante **128** mediante tratamiento con tiourea y piridina conduce a los alcoholes **129**. La esterificación de **129** con el ácido protegido **133** usando *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida (EDC) como agente de acoplamiento en presencia de cantidades catalíticas de 4-*N,N*-dimetilaminopiridina proporciona los ésteres **130** con buenos rendimientos. El ácido protegido **133** se prepara en dos etapas a partir del ácido 3,4-dihidroxifenilacético (**132**)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

disponible comercialmente. Finalmente, la eliminación de los grupos protectores TBDPS en **130** mediante tratamiento con TBAF/AcOH, seguido de la eliminación del grupo protector bencidrilo en los catecoles resultantes **131** mediante reacción con *m*-cresol y tratamiento posterior con bicarbonato de sodio, proporciona satisfactoriamente los compuestos objetivo **57**.



Esquema 3.14 *Reactivos, condiciones y rendimientos:* (a) Ph_2CN_2, CH_2Cl_2/MeOH, t.a., 87%. (b) $ClCO_2Allil$, Pi, CH_2Cl_2, −10 ºC, 93%. (c) $MeCO_3H$, CH_2Cl_2, −5 ºC, 95%. (d) 2-mercaptobenzotiazol, $MgSO_4$, dioxano, Δ, 91%. (e) $ClCH_2CO_2H$, AgOAc, AcOEt, t.a. (f) Bu_3SnH, $Pd(PPh_3)_4$ (cat.), AcOH, CH_2Cl_2, t.a., 86% desde **119**. (g) (1) Tf_2O, Et_3N, CH_2Cl_2, −78 ºC a 0 ºC. (2) Et_3N, −78 ºC. (3) HCl (0.5 M). (h) correspondientes sales de fosfonio, CH_2Cl_2, −78 ºC o t.a. 20−49% desde las aminas **123** y **124**. (i) MCPBA, CH_2Cl_2, t.a., 70−81%. (j) tiourea, Pi, DMF, 0 ºC a t.a. (k) **133**, EDC, DMAP, CH_2Cl_2, −15 ºC a t.a., 37−73% desde **128**. (l) TBAF, AcOH, THF, 0 ºC, 66−88%. (m) (1) *m*-cresol, 50 ºC. (2) $NaHCO_3$ o NH_4HCO_3, 27−66%. (n) (1) TBDPSCl, Im, DMF, t.a. (2) LiOH (aq), THF, t.a. (3) HCl (aq), 64%.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.5 Síntesis de los compuestos 53

Con los precedentes anteriormente descritos, en esta tesis doctoral abordamos a continuación el desarrollo de una estrategia sintética que permitiera, no solamente la introducción de grupos arilalquilideno (heterociclos de 5 miembros) de forma eficiente en el núcleo penicilánico discutida en el apartado anterior, sino que además fuese compatible con la funcionalización adicional del grupo metilo pro-*R* con grupos amino o triazoles.

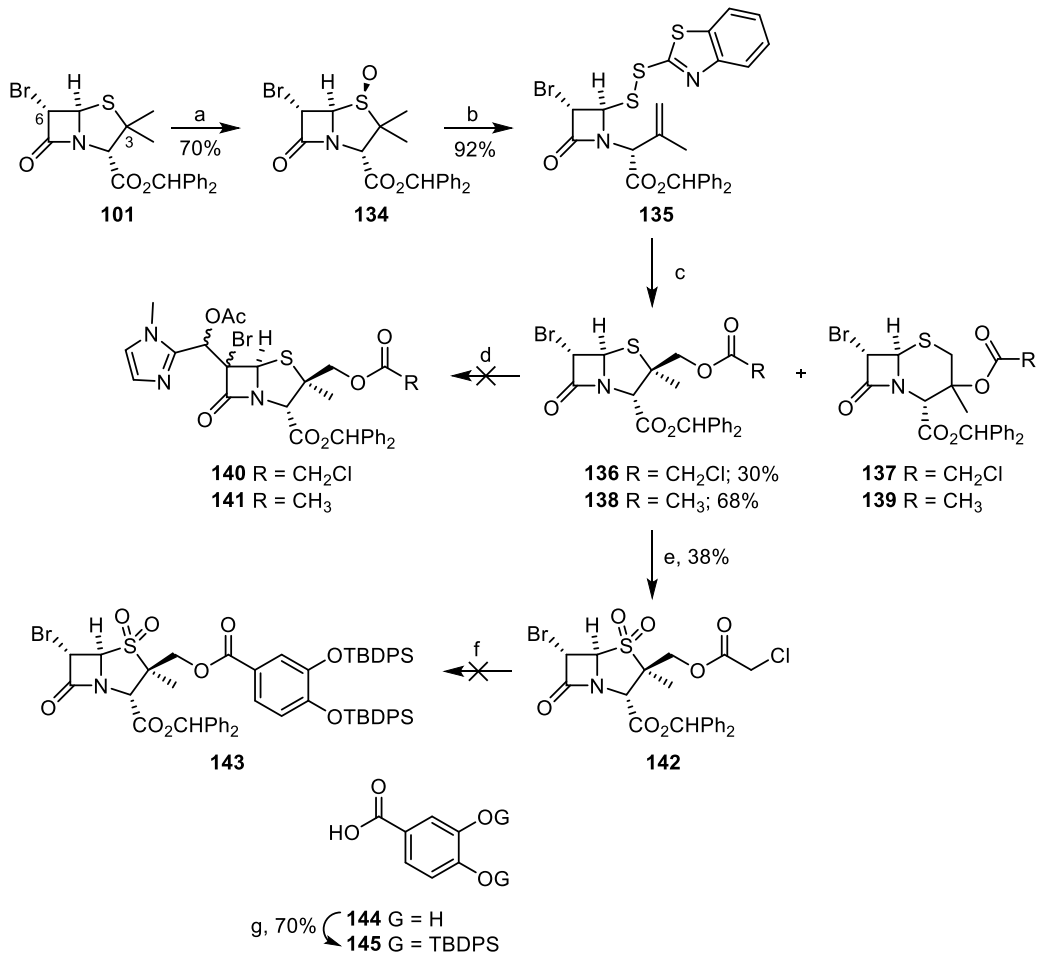
3.1.5.1 Derivados *O*-funcionalizados

En primer lugar, se abordó la funcionalización del grupo metilo pro-*R* del núcleo penicilánico con un átomo de oxígeno (grupos OH y relacionados) mediante una estrategia similar a la desarrollada en el grupo de investigación para los compuestos **57**, que implica una reacción de reordenamiento sigmatrópico inducido térmicamente, y posterior modificación de la posición C6 con la metodología desarrollada previamente. Esto se llevó a cabo utilizando el sulfóxido **134**, obtenido por oxidación del bromuro **101** con un rendimiento del 70%, y que contiene la funcionalización adecuada en la posición C6 para la introducción del grupo arilalquilideno, como se detalló en apartados anteriores (Esquema 3.15). Utilizando las condiciones desarrolladas en nuestro grupo de investigación se obtuvo el disulfuro **135** con un rendimiento del 92%. El tratamiento de **135** con acetato de plata y ácido cloroacético, proporcionó una mezcla cromatográficamente inseparable del compuesto cinético **136** (anillo de cinco miembros) y el compuesto termodinámico **137** (anillo de seis miembros) en una proporción 8:1. Desafortunadamente todos los intentos realizados de adición del carbanión derivado de la mezcla de bromuros **136** y **134** al 1-metil-2-imidazolcarboxaldehído no proporcionó resultados satisfactorios. Considerando que estos negativos resultados quizá se debieran a la acidez del grupo CH_2 en α al cloruro, y que podría estar compitiendo en la generación del carbanión, se preparó el análogo sin cloruro **138**. Sin embargo, los ensayos realizados con el compuesto **138**, tampoco dio lugar a resultados satisfactorios.

Por otra parte, se estudió también la incorporación del grupo catecol antes de la funcionalización de la posición C6. Para ello el tioéter **136** se oxidó a la sulfona **142** por tratamiento con ácido *m*-cloroperbenzoico obteniéndose con un rendimiento del 38% (Esquema 3.15). La incorporación del grupo catecol se abordó en dos etapas: (i) la eliminación del grupo cloroacetoxi en **142** por tratamiento con tiourea y piridina; y (ii) la esterificación del alcohol resultante con el ácido **145**. Desafortunadamene, esta última etapa no condujo al compuesto deseado. En vista de los resultados negativos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

obtenidos, estudiamos otras opciones para la funcionalización del grupo metilo que se describen a continuación.



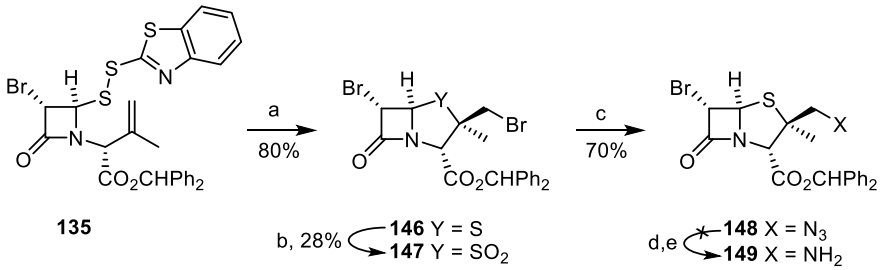
Esquema 3.15 *Condiciones y reactivos*: (a) $MeCO_3H$, CH_2Cl_2, −5 ºC. (b) 2-mercaptobenzotiazol, $MgSO_4$, dioxano, Δ. (c) $ClCH_2CO_2H$ o AcOH, AgOAc, AcOEt, t.a. (d) 1. $MgBr_2$ Et_2O, Ph_2NLi, 1-metil-2-imidazolcarboxaldehído, THF, −78 ºC. 2. Ac_2O, 0 ºC. (e) MCPBA, CH_2Cl_2, t.a. (f) 1. tiourea, Pi, DMF, 0 ºC → t.a. 2. **145**, EDC, DMAP, CH_2Cl_2, −15 ºC → t.a. (g) 1. TBDPSCl, Im, DMF, t.a. 2. LiOH (ac.), THF, t.a. 3. HCl (ac.).

3.1.5.2 Derivados *N*-funcionalizados

Se estudió la funcionalización con un grupo amino, en lugar de alcohol como en el apartado anterior, del grupo metilo pro-*R* del anillo penicilánico. Para ello, en primer lugar, con el fin de incrementar la reactividad del grupo metileno en reacciones de sustitución nucleófila, se llevó a cabo la síntesis del bromuro **146** partir del disulfuro **135** por tratamiento con dibromuro de cobre en acetato de etilo con un rendimiento del

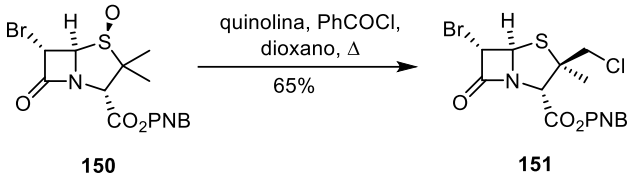
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

80%.[134] A continuación, el tratamiento del bromuro **146** con azida sódica a 0 ºC proporcionó la azida **148**[135] en un rendimiento del 70%. Sin embargo, la reducción del grupo azida resultó ser más complejo de lo esperado. Así tanto el tratamiento con cloruro de cobalto, TBAI (yoduro de tetra-*n*-butilamonio) y borohidruro sódico, como la hidrogenación catalizada por paladio, no condujo en ninguno de los casos a la obtención de la amina **149**. Estas mismas condiciones se ensayaron con la sulfona **147**, obtenida por oxidación de **149** con ácido *meta*-cloroperbenzoico en un rendimiento del 28%.



Esquema 3.16 *Condiciones y reactivos:* (a) $CuBr_2$, AcOEt, t.a. (b) MCPA, CH_2Cl_2, t.a. (c) NaN_3, DMF, 0 ºC. (d) $CoCl_2$, TBAI, $NaBH_4$, MeOH/CH_2Cl_2/H_2O, t.a. (e) H_2, Pd/C, MeOH, t.a.

Gottstein[136] y colaboradores describieron que el tratamiento del sulfóxido **150** con cloruro de benzoilo y quinolina proporciona, en un solo paso y mayoritariamente, el cloruro cinético **151** (Esquema 3.17). El uso de la quinolina es importante en la conversión, ya que parece dirigir la reorganización predominante hacia la estructura de penicilina, en lugar de la de cefalosporina.



Esquema 3.17

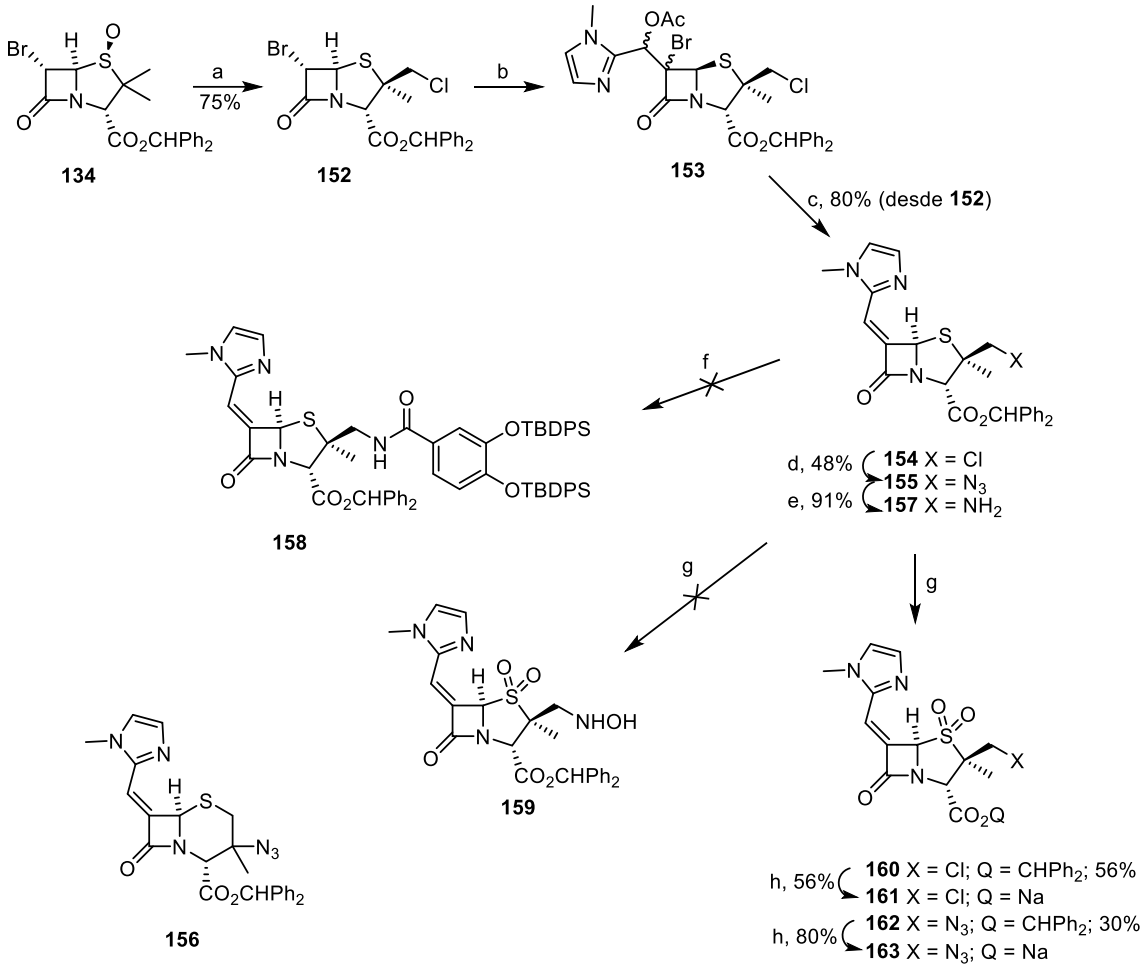
[134] Micetich, R. G.; Maiti, S.; Spevak, P.; Tanaka, M.; Yamazaki, T.; Ogawa, K. *Synthesis* **1986**, *4*, 292–296.

[135] Taniguchi, M.; Sasaoka, M.; Matsumura, K.; Kawahara, I.; Kase, K.; Susuki, D.; Torii, S.; Tanaka, H.; Tanaka, M.; Nakai, A. EP306924 A1 1989.

[136] Gottstein, W. J.; Crast, L. B.; Graham. R. G.; Haynes, U. J.; McGregor, D. N. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 1531-1534.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estos resultados nos animaron a estudiar la introducción del grupo amino en el grupo metilo pro-*R* a partir del cloruro **152**, en lugar del bromuro **146** previamente estudiado (Esquema 3.18).



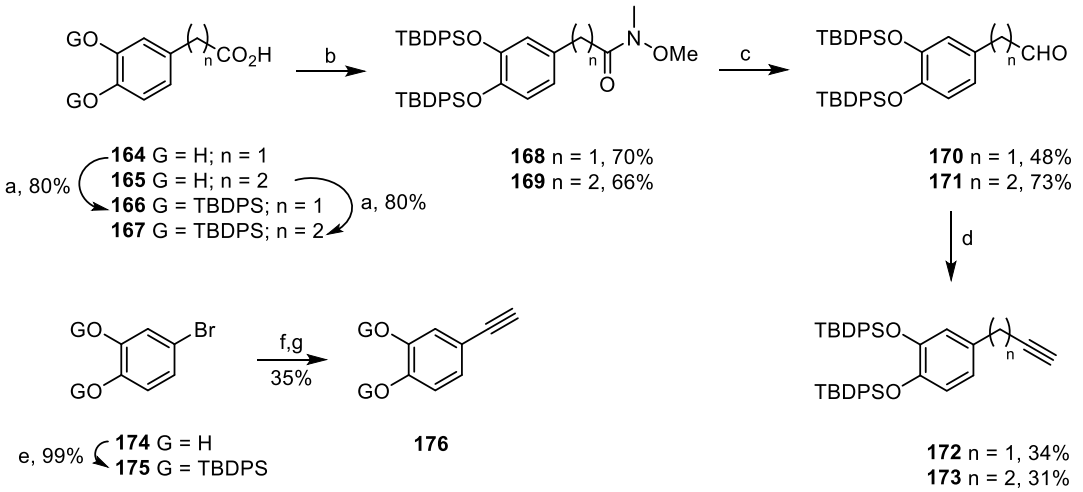
Esquema 3.18 *Condiciones y reactivos:* (a) quinolina, PhCOCl, dioxano, Δ. (b) (1) $MgBr_2$ Et_2O, Ph_2NLi, 1-metil-2-imidazolcarboxaldehído, THF, −78 ºC. (2) Ac_2O, 0 ºC. (c) Zn, NH_4Cl, TMEDA, t.a. (d) NaN_3, DMF, 65 ºC. (e) Ph_3P, THF-H_2O, Δ. (f) **145**, EDC, DMAP, CH_2Cl_2, −15 ºC → t.a. (g) MCPBA, CH_2Cl_2, t.a. (h) 1. *m*-cresol, 50 ºC. 2. $NaHCO_3$.

Así el calentamiento del sulfóxido **134** con quinolina y cloruro de benzoilo en dioxano proporcionó el cloruro **152** en un rendimiento del 75% (Esquema 3.16). Este cloruro se transformó con éxito en el compuesto **154** en un rendimiento global del 80%. El tratamiento del cloruro **154** con azida sódica a 65 ºC proporcionó una mezcla cromatográficamente separable del compuesto cinético **155** (anillo de 5 miembros) y el termodinámico **156** (anillo de seis miembros), en una proporción 2:1. 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, el compuesto **155** ha de

utilizarse rápidamente, pues, incluso en ausencia de disolvente, se observa la conversión del compuesto cinético al termodinámico. La reducción de la azida **155** mediante una reacción de Staüdinger proporcionó la amina **157** en un rendimiento del 91%. Desafortunadamente, todos los intentos de acilación de la amina **157** con el ácido **145** utilizando EDC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida] como agente acoplante y DMAP (4-dimetilaminopiridina) como base no dieron el resultado deseado. Así mismo, se abordó la conversión de la amina **157** en la hidroxilamina **159** por oxidación con ácido *meta*-cloroperbenzoico, pero desafortunadamente se obtuvo un compuesto que no fuimos capaces de identificar.

Finalmente, el cloruro **154** y la azida **155** se convirtieron en los correspondientes ácidos **161** y **163** en dos etapas: (i) oxidación con ácido *meta*-cloroperbenzoico de los tioéteres **154** y **155** que se obtuvieron en rendimientos del 30% y 56%, respectivamente; y (ii) desprotección de los grupos bencidrilos por calentamiento de las sulfonas **160** y **162** con *m*-cresol y posterior tratamiento con bicarbonato sódico, proporcionando los ácidos **161** y **163** en rendimientos del 56% y 80%, respectivamente.

Una vez lograda la funcionalización eficiente del grupo metilo pro-*R* del anillo penicilánico con un grupo azida, abordamos la introducción de grupos sideróforos (catecol) a través de un grupo triazol que se sintetizaría mediante una reacción de cicloadición 1,3-dipolar. Con este objetivo se prepararon los alquinos terminales **172–173** y **176** a partir de los ácidos **164-165** y del bromuro **174** (Esquema 3.19).



Esquema 3.19 *Condiciones y reactivos:* (a) 1. TBDPSCl, Im, DMF, t.a. 2. LiOH (ac.), THF, t.a. 3. HCl (ac.). (b) EDC, hidroxibenzotriazol, hidruro de *N, O*-dimetilhidroxilamina, Et_3N, CH_2Cl_2, t.a. (c) DIBAL-H, CH_2Cl_2, –78 ºC. (d) dimetil (1-diazo-2-oxopropil)fosfonato, MeOH, t.a. (e) TBDPSCl, Im, DMF, t.a. (f) $Pd(PPh_3)_4$, Et_3N, trimetilsililacetileno, THF, 80 ºC. (g) $AgNO_3$, EtOH-H_2O, KCN, t.a.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los alquinos **172-173** requeridos se obtuvieron en cuatro etapas que impican: (i) la protección de los grupos fenólicos como TBDP éteres por tratamiento con TBDPCl en presencia de imidazol; (ii) la conversión del grupo ácido en **166-167** en las amidas **168-169**, respectivamente, mediante reacción de acoplamiento peptídico utilizando hidrocloruro de dimetilhidroxilamina, EDC, hidroxibenzotriazol, y trietilamina; (iii) la reducción con DIBAL (hidruro de diisobutilaluminio) de **168-169** proporcionando los aldehídos **170-171**; y (iv) conversión de los aldehídos **170-171** en los alquinos **172-173** por tratamiento con el reactivo de Ohira-Bestmann[137] (dimetil(1-diazo-2-oxopropil)fosfonato) y carbonato potásico. Finalmente, el alquino **176** se preparó en tres etapas a partir del bromuro **174**: (i) protección de los grupos fenólicos como TBDP éteres; (ii) acoplamiento cruzado carbono-carbono tipo Sonogashira (sin cobre), entre el bromuro **175** y trimetilacetileno utilizando tetraquis(trifenilfosfina) paladio (0) como catalizador, utilizando el crudo en la siguiente reacción; y (iii) eliminación del grupo trimetilsililo por tratamiento con nitrato de plata acuoso.[138]

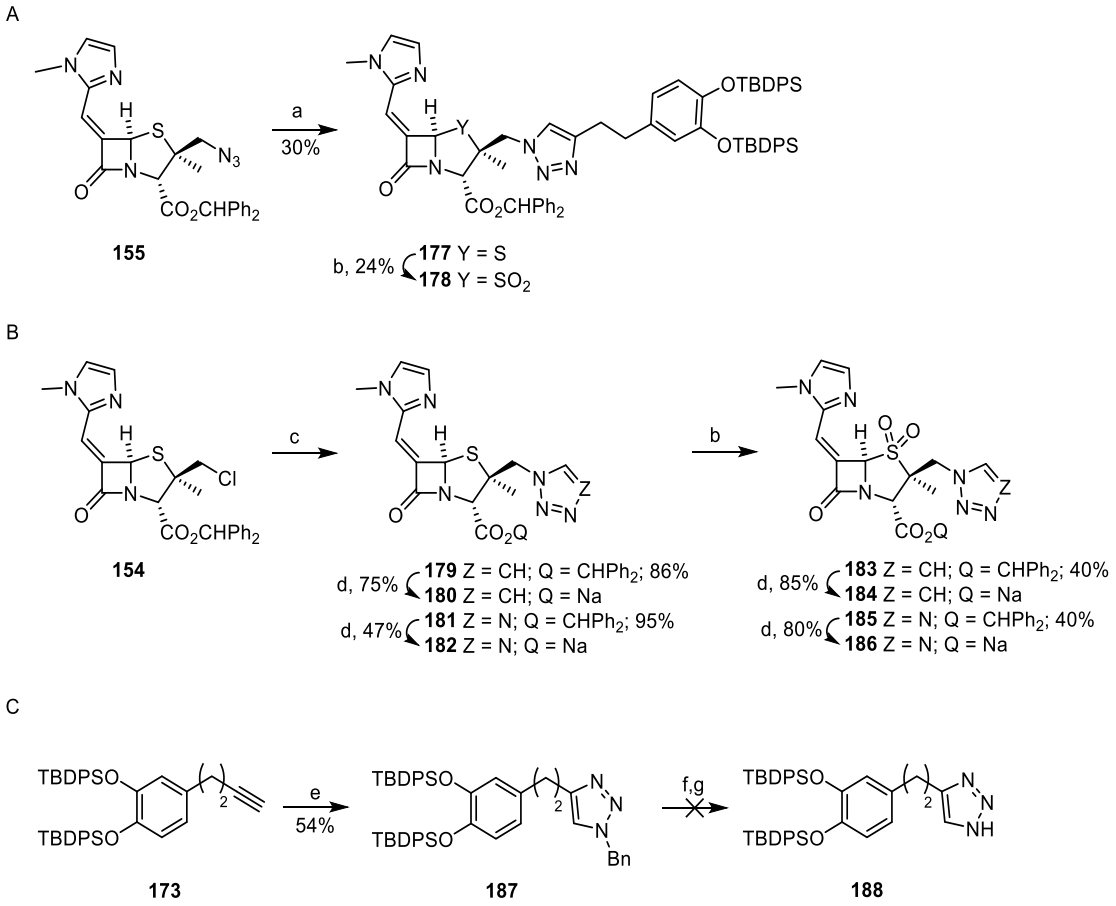
La ciclación 1,3-dipolar catalizada por cobre entre el alquino **173** y la azida **155** proporcionó el triazol **177** con un rendimiento del 30%, que se transformó en la sulfona **178** por oxidación con ácido *meta*-cloroperbenzoico (Esquema 3.20.A). Teniendo en cuenta que los rendimientos en la formación de la azida **155** y del triazol **177** demostraron ser bajos, esto implicó la pérdida de cantidades altas de producto, lo que imposibilitó los intentos de cicloadición 1,3-dipolar con los alquinos sintetizados **172** y **176**. Por este motivo, se estudiaron otras vías alternativas de incorporación del heterociclo. Con este fin se abordó la sustitución nucleófila del cloruro **154** utilizando triazol o tetrazol en presencia de carbonato de plata (Esquema 3.20.B). En ambos casos los resultados fueron excelentes obteniéndose el triazol **179** y el tetrazol **181** en un rendimiento del 86% y 95%, respectivamente. Ambos compuestos se transformaron en las correspondientes sulfonas **183** y **185** (rendimiento 40%) siguiendo los procedimientos anteriores. La desprotección del grupo bencidrilo en los tioéteres **179** y **181** y las sulfonas **183** y **185** por calentamiento en *m*-cresol y basificación condujo a los ácidos **180**, **182**, **184** y **186** en forma de sal sódica.

Finalmente, teniendo en cuenta que la funcionalización del grupo metilo pro-*R* con un grupo triazol, demostró ser más eficiente si se lleva a cabo por sustitución nucleófila

[137] (a) Ohira, S. *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 561–564. (b) Müller, S.; Liepold, B.; Roth, G. J.; Bestmann, H. J. *Synlett* **1996**, 521–522; (c) Roth, G. J.; Liepold, B.; Muller, S. J.; Bestmann, H. J. *Synthesis* **2004**, 59–62.

[138] Gazvoda, M.; Virant, M.; Pinter, B.; Košmrlj, J. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4814.

directa utilizando un triazol como nucleófilo, que el proceso en dos etapas que implica la preparación de la azida **155** y posterior reacción de cicloadición-1,3-dipolar con un alquino adecuado, se abordó el uso de triazoles funcionalizados con el grupo catecol (Esquema 3.20.C). Para ello se abordó la preparación del triazol **187** a partir del alquino **173**. Desafortunadamente, pese a que la reacción de ciclación-1,3-dipolar entre el alquino **173** y bencilazida proporcionó el compuesto **187** en un rendimiento del 54%, todos los ensayos de desprotección mediante hidrogenación catalítica realizados no fueron efectivos. Por falta de tiempo no se ha podido abordar otros procedimientos de desprotección con las que concluir la estrategia sintética.



Esquema 3.20 *Condiciones y reactivos*: (a) **173**, ascorbato sódico, $CuSO_4$, THF/H_2O, t.a. (b) MCPBA, CH_2Cl_2, t.a. (c) 1*H*-triazol ó 1*H*-tetrazol, Ag_2CO_3, MeCN, 30 ºC. (d) (1) *m*-cresol, 50 ºC. (2) $NaHCO_3$. (e) BnN_3, ascorbato sódico, $CuSO_4$, THF/H_2O, t.a. (f) H_2, Pd/C (cat), MeOH, t.a. (g) H_2, Pd/C (cat), AcOH, MeOH, t.a.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2 Inhibidores del Enzima Siquimato Quinasa

3.2.1 Inhibidores Basados en el Movimiento

La mayoría de las aproximaciones empleadas en el diseño de inhibidores basados en la estructura del enzima SQ, y de otras dianas terapéuticas en general, se basan en estudios de modelado molecular (molecular docking) o cribado virtual (virtual screening) utilizando las estructuras cristalográficas disponibles. Con estos estudios *in silico*, en el que la diana se considera como un molde rígido (modelo llave-cerradura), se predice la orientación más favorable de los ligandos propuestos en una región definida de la diana (Figura 3.4). Como muestra de ello, los resultados obtenidos vienen dirigidos por la geometría, polaridad y distribución de las cargas del hueco seleccionado en la diana.

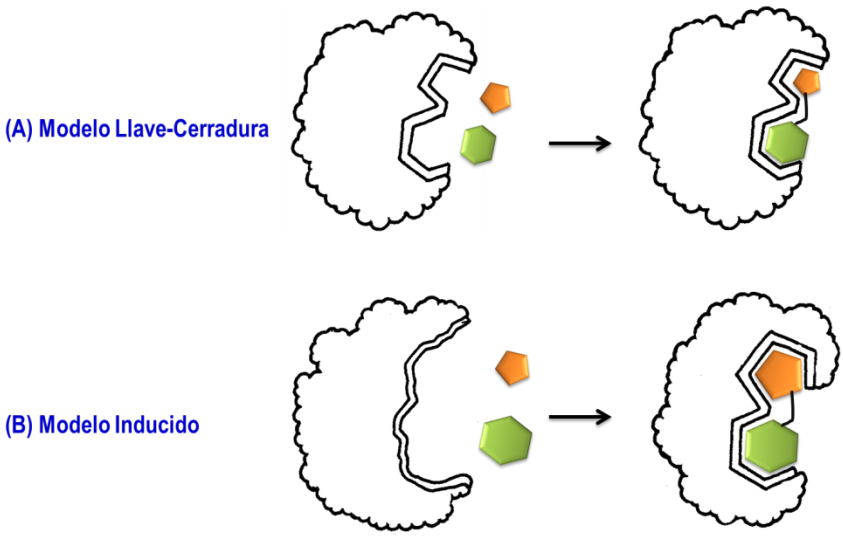


Figura 3.4 Representación esquemática del diseño de ligandos basado en la estructura utilizando el modelo llave-cerradura (A) y el modelo inducido (B).

Pese a que los estudios de modelado molecular están muy extendidos, en gran medida por que son sencillos de realizar y no requieren un esfuerzo computacional muy elevado, tanto por tiempo como metodología, sin embargo, pueden dar lugar a falsos positivos o negativos. Esto se debe a que al considerar los enzimas como moldes rígidos que no sufren cambios conformacionales cuando se unen a los ligandos es una visión poco realista. Los enzimas son sistemas «dinámicos» que adoptan diversas conformaciones durante la catálisis para maximizar las interacciones con el estado de transición y/o el intermedio de reacción. De ahí que es el modelo de ajuste inducido el que más se aproxima a esta realidad. Generalmente, en la forma libre adoptan una

conformación abierta para recibir el sustrato a transformar. Una vez que el sustrato se une al centro activo, habitualmente, un bucle flexible (en este caso el LID) se pliega sobre el sustrato, cerrando el centro activo para su conversión. Finalmente, se desencadenan cambios conformacionales en el enzima que desestabilizan la interacción del producto con los residuos del centro activo, permitiendo su expulsión, y recuperar así la conformación abierta para iniciar el siguiente ciclo. Sin embargo, el tener en cuenta el dinamismo de la diana en el diseño de inhibidores son estrategias más exigentes, tanto en metodología, en tiempo de computación, e implementación, por lo que son estudios menos generales.

De cara al diseño de inhibidores enzimáticos, parece razonable que, además de buscar la estabilización de una disposición cerrada del centro activo que evite la entrada del sustrato(s), el impedir el cierre del centro activo para la catálisis sería una estrategia alternativa interesante en el diseño de inhibidores. Esta aproximación basada en el movimiento, que busca reducir el movimiento intrínseco de zonas clave en la diana ha sido poco explotada hasta la fecha por las exigencias metodológicas de la aproximación. Sin embargo, ofrece un gran potencial ya que permitiría el diseño de ligandos que se dirigen a cavidades adicionales generadas durante el movimiento, no evidentes en las estructuras cristalográficas disponibles. Los recientes avances en los métodos de simulación de biomacromoléculas que han consolidado su valor como importantes herramientas en el diseño de fármacos, capaces de dilucidar los movimientos esenciales necesarios para la catálisis, son sin duda clave en el éxito de esta aproximación.

Esta atractiva estrategia, en la que nuestro grupo de investigación ha sido pionero en su implementación, nos permitió diseñar ligandos que se dirigen a cavidades adicionales generadas durante el movimiento que quedan ocultas si no se tiene en cuenta la plasticidad intrínseca de la diana. Mediante el «diseño de ligandos basado en el movimiento» hemos desarrollado inhibidores reversibles competitivos con actividad nanomolar y con actividad antibacteriana *in vitro* muy destacada. El punto de partida para el diseño ha sido el estudio del movimiento enzimático esencial para la liberación del producto (Figura 3.5).[82] Los estudios de simulación de dinámica molecular revelaron que la catálisis sólo tiene lugar si: (1) los dominios LID y SB están plegados sobre los sustratos; (2) el grupo guanidinio de la arginina esencial, que se encuentra en el dominio LID, está en contacto estrecho con el grupo γ-fosfato del ATP para su activación; y (3) los dos sustratos están ubicados muy cerca y aislados del medio acuoso para la reacción. Los estudios revelaron que la expulsión del producto de la reacción, el ácido siquimato-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3-fosfato (**32**), requiere un movimiento de apertura muy amplio (más de 10 Å) de los dominios LID y SB, que permite que los residuos de arginina conservados rompan las interacciones favorables que anclan el producto al centro activo, fundamentalmente centradas en las interacciones electrostáticas de los grupos carboxi y fosfato.

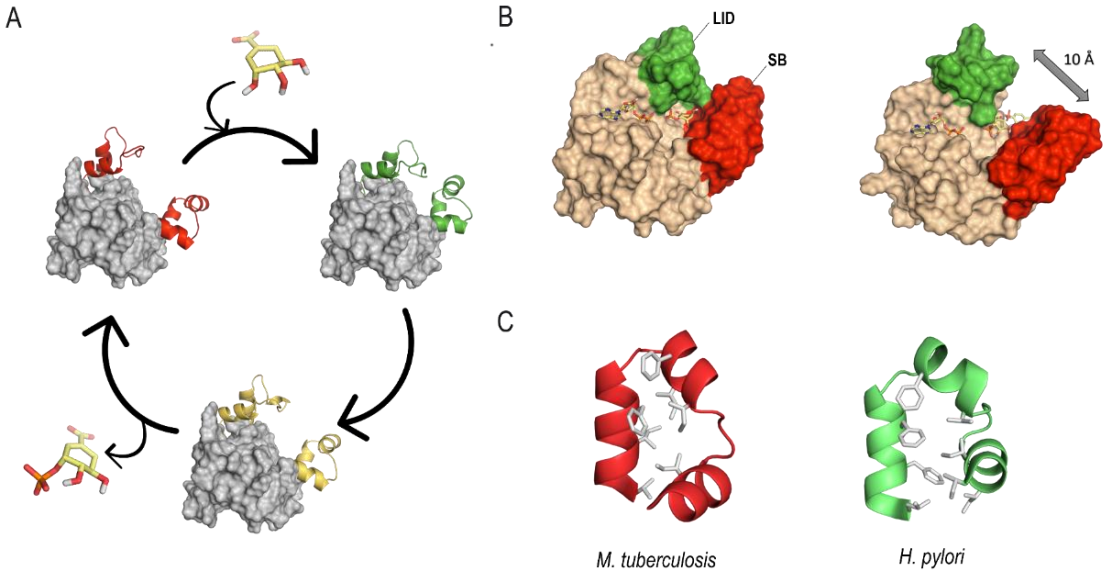


Figura 3.5 (A) Representación esquemática de los cambios conformacionales de los dominios LID y SB del enzima SQ procedente de *M. tuberculosis* durante la catálisis obtenidos mediante estudios de dinámica molecular.[82] (B) Vista general de la conformación cerrada y abierta de la SQ procedente de *M. tuberculosis*. (C) Vista detallada de los dominios SB de la SQ procedente de *M. tuberculosis* y *H. pylori*.

Teniendo en cuenta que el dominio SB: (i) aísla el sustrato del medio acuoso; (ii) favorece la estabilización de la conformación de alta energía, exquisitamente diseñada para lograr la disposición ecuatorial del grupo hidroxilo C3 para la fosforilación selectiva por ATP; y (iii) se trata de un bolsillo totalmente apolar y muy conservado que involucra, principalmente, los residuos conservados Phe49, Phe57, Ile37 y Ile45, así como otros residuos apolares en las proximidades (Ile60 e Ile48) (la numeración corresponde a la SQ procedente de *M. tuberculosis*); se desarrollaron análogos al sustrato natural que incorporan diversos grupos bencilo o anillos aromáticos en la posición C5 del ácido siquímico (**31**) capaces de estabilizar conformaciones más abiertas del enzima. Entre los *O*-bencil derivados desarrollados, el 5-benzotiofenil derivado **189** (K_i = 560 nM) y 3-nitrobencil derivado **190** (K_i = 460 nM) demostraron ser los inhibidores competitivos reversibles más potentes (Figura 3.6).[139] Además, se desarrolló una estrategia profármaco que demostró ser eficaz lográndose una excelente actividad *in vitro* contra

[139] Prado, V.; Lence, E.; Maneiro, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; Beceiro, A.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5471–5487.

cepas de *H. pylori*, con un valor de CIM de 4 μg mL^{-1}. Con ello se desarrollaron los primeros análogos del sustrato natural con actividad *in vitro*.

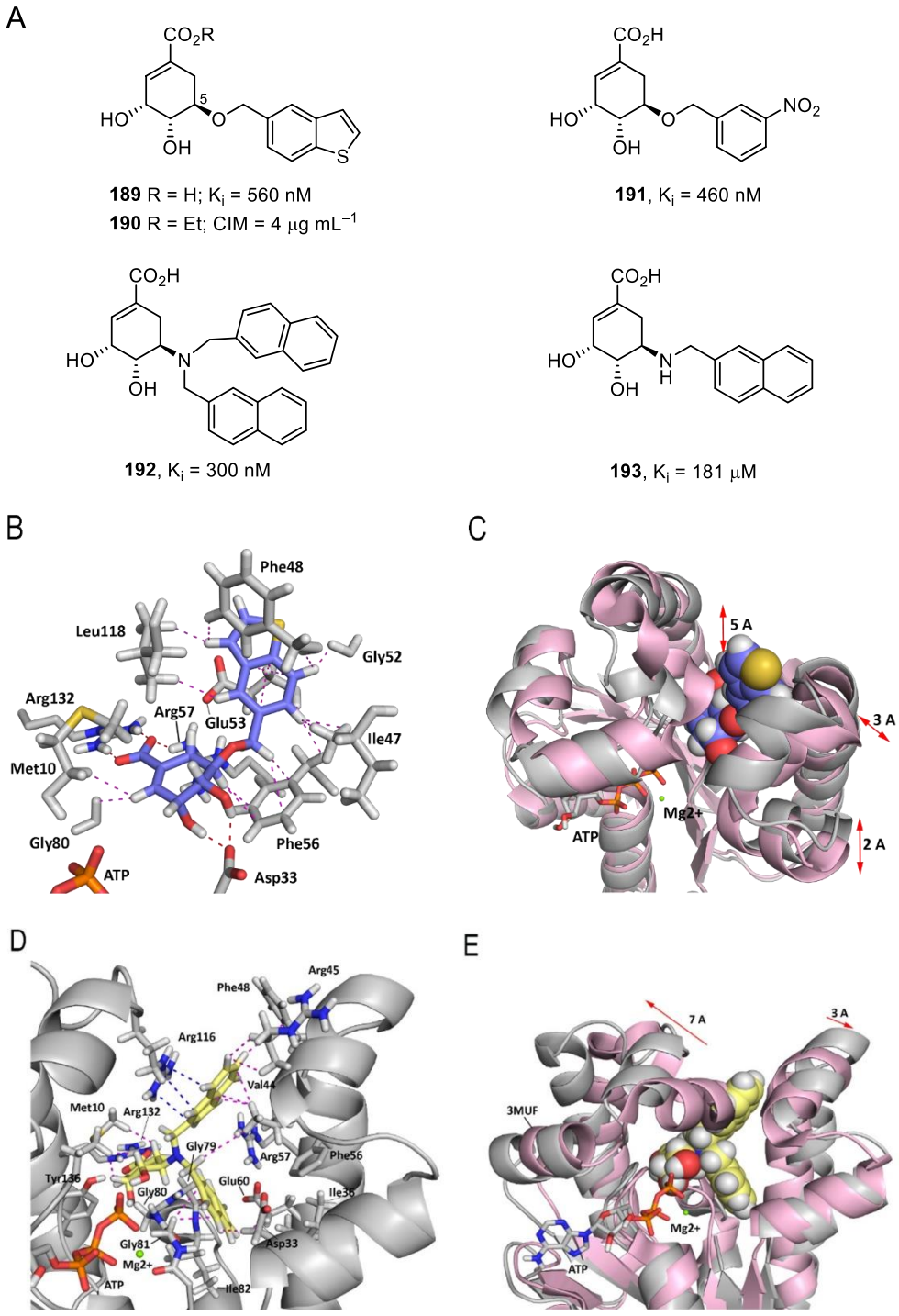


Figura 3.6 (A) Estructura química de los inhibidores análogos al sustrato natural más relevantes. Se indican los valores de las K_i frente a la SQ procedente de *H. pylori* y la actividad *in vitro* de la proforma **190**. (B,D) Modo de unión de los compuestos **189** y **192** en el centro activo de la SQ-*Hp* obtenidos mediante estudios de simulación. (C,E) Cambios conformacionales en los dominios LID y SB del enzima SQ-*Hp* inducidos por la unión de los compuestos **189** y **192**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Posteriormente, en nuestro grupo de investigación exploramos la sustitución de la unión éter por amino, ya que favorece la solubilidad de los derivados en medios acuosos. Entre los *N*-bencil derivados desarrollados, la *N,N*-dinaftilamina **192** (K_i = 300 nM) demostró ser el inhibidor más potente, actividad que se pierde significativamente cuando la amina es secundaria, el compuesto **193** (K_i = 181 μM).[140] La baja afinidad de las aminas secundarias quizá se deba al estado de protonación de las mismas en el centro activo, que contiene diversos residuos de argininas también cargados positivamente. Pese a que las aminas terciarias, como la *N,N*-dinaftilamina **192**, podrían también unirse al centro activo en forma de sal de amonio, los dos grupos voluminosos que posee permitirían aislar en gran medida dicha carga de los grupos guanidinios, lo que explica su afinidad.

Por otra parte, recientemente hemos demostrado la utilidad de los grupos hidroxilamina en el desarrollo de inhibidores irreversibles del enzima deshidroquinasa tipo I, los compuestos **195** y **196** (Figura 3.7).[141,142] La unión covalente de estos compuestos se produce gracias a que el grupo saliente (grupo NHOH) se encuentra en estado neutro, ya que posee valores estimados de pKa alrededor de 6, similares al de un residuo de histidina.

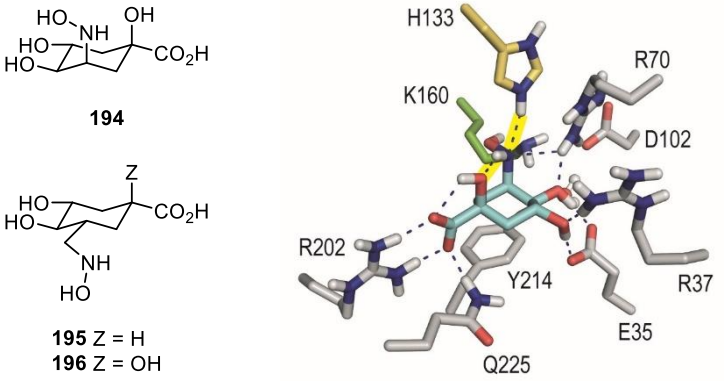


Figura 3.7 Estructura química de los inhibidores irreversibles **194-196** y modo de unión del compuesto **194** en el centro activo de la deshidroquinasa tipo I procedente de *S. aureus* obtenido mediante estudios de simulación de dinámica molecular.

[140] Prado, V.; Lence, E.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 17988–18000.

[141] Rodríguez, A.; Maneiro, M.; Lence, M.; Otero, J. M.; van Raaij, M. J.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Front. Mol. Biosci.* **2023**, *10*, 1111598.

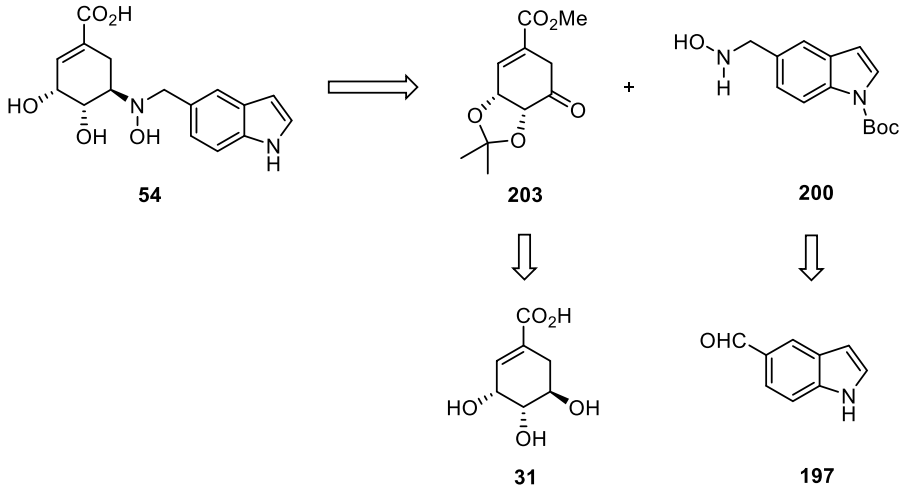
[142] Maneiro, M.; Lence, M.; Sanz-Gaitero, M.; Otero, J. M.; van Raaij, M. J.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 3127-3135.

En vista de todos estos resultados, en esta tesis doctoral nos planteamos analizar el potencial inhibitorio de los análogos del ácido siquímico modificados con un grupo bencilo en la posición C5 unidos al núcleo ciclohexénico via un grupo NHOH. Como sistema modelo, se abordó la síntesis del compuesto **54**, que incorpora un grupo 5-indoilo.

3.2.2 Síntesis del compuesto 54

3.2.2.1 Primera aproximación

En primer lugar, se abordó la síntesis del compuesto **54** mediante una estrategia sintética que implicaría como etapa clave una reacción de aminación reductora entre la cetona **203** previamente descrita,[143] y la hidroxilamina **200**, que se prepararía a partir del 1*H*-indol-5- carboxaldehído (**197**) comercial (Esquema 3.18).



Esquema 3.18 Análisis retrosintético para el compuesto **54**.

La síntesis de la hidroxilamina **200** se llevó a cabo en tres etapas a partir del 1*H*-indol-5-carboxaldehído (**197**) (Esquema 3.19). Siguiendo procedimientos bibliográficos, el aldehído **197** se protegió como grupo *terc*-butiloxicarbonilo proporcionando el compuesto **198** en un rendimiento del 93%.[144] A continuación, el tratamiento del aldehído **198** con hidrocloruro de hidroxilamina y acetato de sodio, en presencia de tamices moleculares, condujo a la oxima **199** en un rendimiento del 58%.[145] Finalmente,

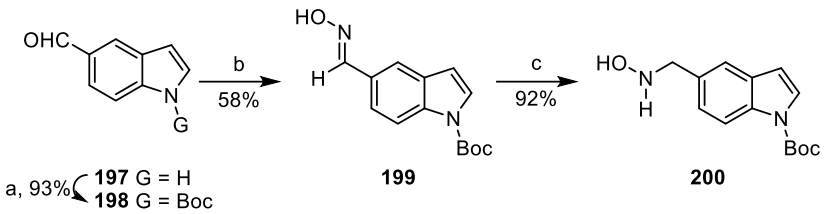
[143] Kumar, B. S.; Mishra, G. P.; Rao, B. V. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 1838–1849.

[144] Tan, G.; Das, M.; Keum, H.; Belloti, P.; Daniliuc, C.; Glorius, F. *Nat. Chem.* **2022**, *14*, 1174–1184.

[145] Charrier, J. D.; Maccormick, S.; Storck, P. H.; Pinder, J.; O'Donnell, M. E.; Knegtel, R. M. A.; Young, S. C. Y.; Kay, D.; Reaper, P. M.; Durrant, S. J. WO2012138938 A1 2012.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la reducción de la oxima **199** por tratamiento con cianoborohidruro sódico en ácido acético proporcionó la hidroxilamina **200** en un rendimiento del 92%.



Esquema 3.19. *Condiciones y reactivos:* (a) Boc_2O, DMAP, THF, t.a. (b) $H_2NOH.HCl$, NaOAc, 4 Å tamices moleculares, MeOH, t.a. (c) $NaBH_3CN$, AcOH, t.a.

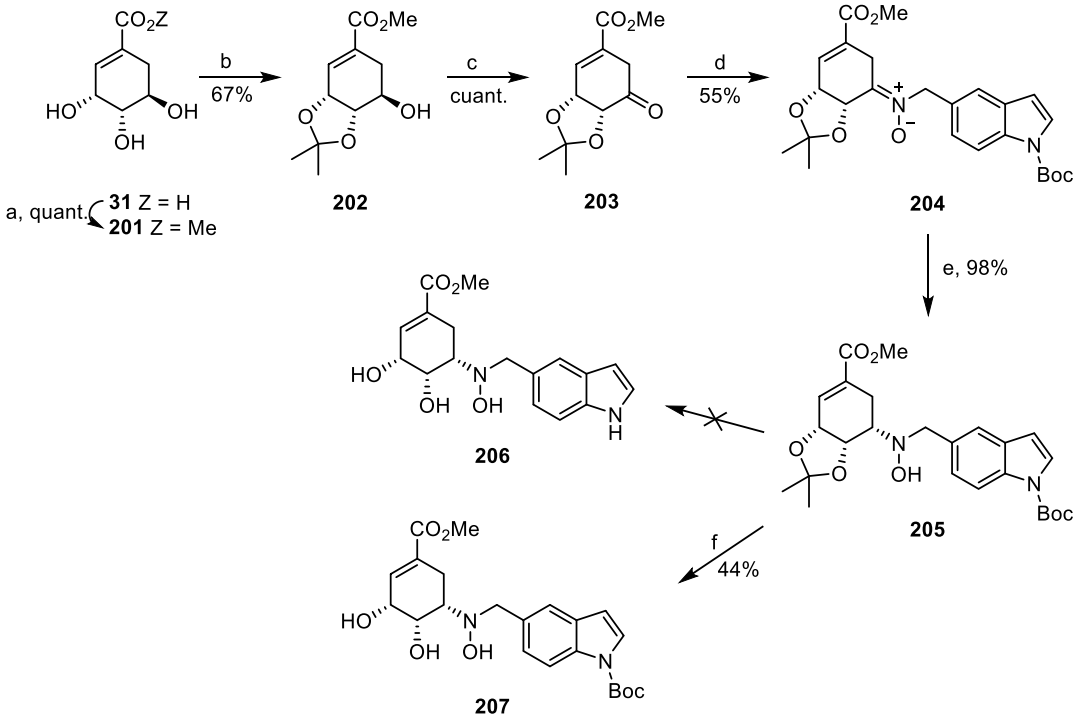
La síntesis de la cetona **173**[143] se llevó a cabo en tres etapas a partir del ácido siquímico (**33**) siguiendo procedimientos descritos en bibliografía (Esquema 3.20.). En primer lugar, la esterificación del ácido **33** mediante calentamiento en medio ácido en metanol proporcionó el ester metílico **171** en un rendimiento excelente.[146] A continuación, la protección del diol 1,2-cis en **171** por tratamiento con dimetoxipropano en medio ácido proporcionó el alcohol **172** (rendimiento 67%), que por oxidación con el reactivo de Dess-Martin condujo a la cetona **173** en rendimiento cuantitativo.[147]

Se abordó a continuación la unión covalente de la hidroxilamina **200** con la cetona **203** (Esquema 3.20.). En primer lugar, el tratamiento de **200** y **203** con acetato de sodio en presencia de tamices moleculares proporcionó el compuesto **204** en un rendimiento del 54%, cuya reducción con cianoborohidruro de sodio en presencia de ácido acético proporcionó la hidroxilamina **205** en un rendimiento del 98%. En esta etapa debido al solapamiento de señales clave en el espectro de ^{1}H RMN no fue posible elucidar la estereoquímica del nuevo centro quiral generado, aunque si en etapas posteriores. Se ensayó la desprotección simultánea del grupo acetal y el grupo BOC (*terc*-butiloxicarbonilo) utilizando diversas condiciones ácidas, como TFA acuoso al 95% y 50% y HCl (6 M), diversas temperaturas de reacción (desde temperatura ambiente hasta 60 ºC). Sin embargo, todos los ensayos realizados condujeron únicamente a la desprotección del grupo acetal, obteniéndose el compuesto **207** en un rendimiento del 44%. La configuración de la posición C5 en **207** se determinó mediante experimentos NOE. Así, la irradiación de la señal de H4 (4.42 ppm) condujo a un incremento de las

[146] Sánchez-Abella, L.; Fernández, S.; Armesto, N.; Ferrero, M.; Gotor, V. J. Org. Chem. **2006**, 71, 5396-5399

[147] Bianco, A.; Brufani, M.; Manna, F.; Melchioni, C. *Carbohydr. Res.* **2001**, *332*, 23–31.

señales de H5 (3.81 ppm) y H3 (3.61 ppm) en un 4.9% y 5.4%, respectivamente. Teniendo en cuenta que se obtenía la estereoquímica no deseada, se decidió abordar una estrategia sintética alternativa.



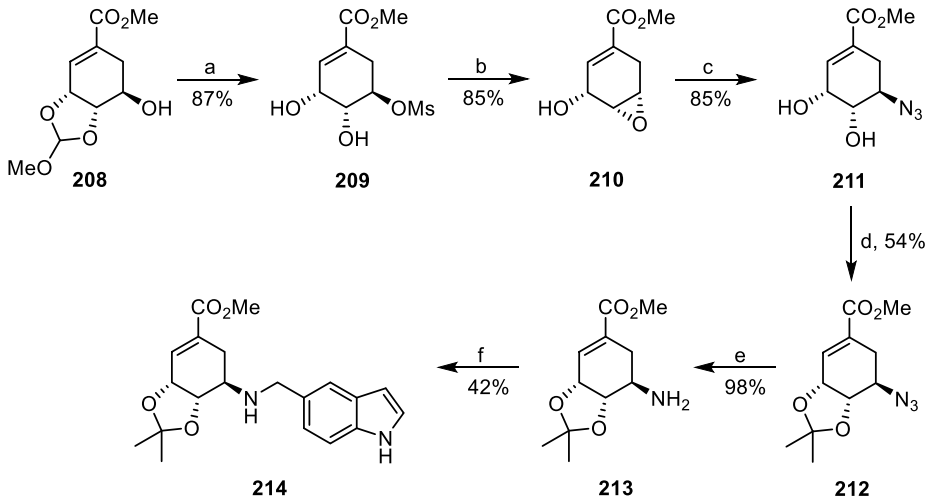
Esquema 3.20. *Condiciones y reactivos:* (a) HCl (c), MeOH, Δ. (b) CSA (cat), dimetoxipropano, t.a. (c) reactivo de Dess-Martin, CH_2Cl_2, t.a. (d) **200**, NaOAc, 4 Å tamices moleculares, MeOH, t.a. (e) $NaBH_3CN$, AcOH, t.a. (f) HCl (6 M), EtOH, 60 ºC.

3.2.2.2 Segunda aproximación

A continuación, se abordó la síntesis del compuesto **54**, mediante la oxidación selectiva del grupo amino en el compuesto **214** que se sintetizó siguiendo los procedimientos descritos previamente en nuestro grupo de investigación (Esquema 3.21).[148,140]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[148] Pansegrau, P. D.; Anderson, K. S.; Widlanski, T.; Ream, J. E.; Sammons, R. D.; Sikorski, J. A.; Knowles, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2589–2592.



Esquema 3.21. *Condiciones y reactivos*: (a) 1. MsCl, Et_3N, CH_2Cl_2, 0 ºC to RT. 2. MeOH/H_2O/HCl (100:1:0.1), RT. (b) NaOMe, MeOH, RT. (c) NaN_3, AcOH, 40 ºC. (d) $Me_2C(OMe)_2$, CSA (cat), Δ. (e) Ph_3P, H_2O, THF, Δ. (f) ArCHO, $NaBH_3CN$, NaOAc, 4 Å MS, MeOH, RT.

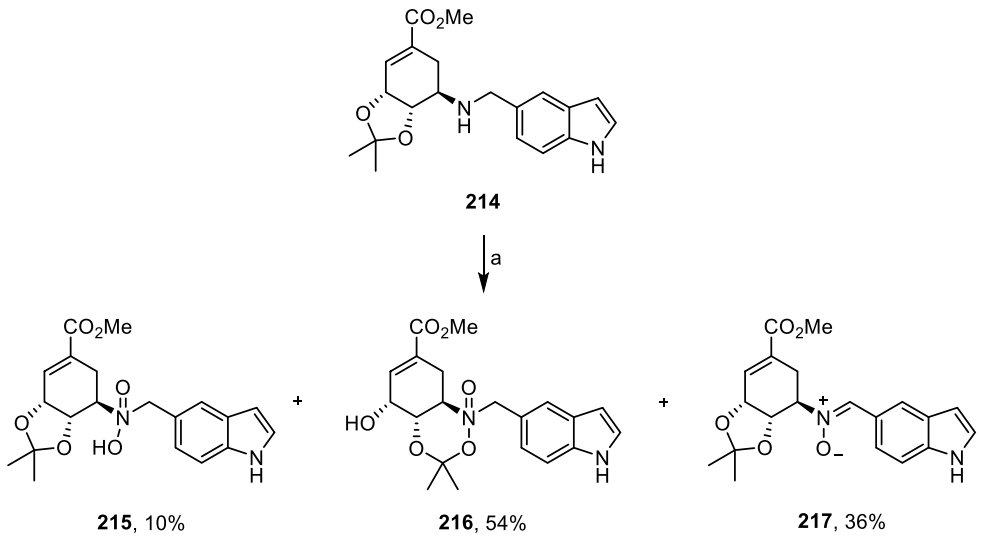
Para la oxidación del grupo amino en **214** se probaron las condiciones resumidas en la Tabla 3.1. De los oxidantes ensayados, solamente dimetildioxirano (DMDO),[149] preparado *in situ*, demostró ser eficiente, proporcionando una mezcla de los compuestos **215–217** cromatográficamente separables con unos rendimientos de 10%, 54% y 36%, respectivamente (Esquema 3.22). La adición inicial de trifenilfosfina al DMDO resultó ser clave para que transcurriese la reacción, al comprobar que solamente muestras de la amina **214** contaminadas con restos de óxido de trifenilfosfina procedente de reacciones anteriores, conducían a los compuestos oxidados **215** y **216**. La formación del compuesto **216** se explica por migración por la misma cara del grupo acetal. Este tipo de migraciones se han descrito con anterioridad en derivados del ácido siquímico, que están favorecidas por la estructura ciclohexénica que presenta, donde los sustituyentes se disponen en conformación pseudo-axial y/o pseudo-ecuatorial. De hecho, la eficacia de esta migración se ha utilizado en la protección selectiva de los distintos grupos hidroxilos que contiene mediante la selección de las condiciones de reacción más apropiadas (control cinético vs termodinámico).[150,151] Por último, el compuesto **217** se produciría mediante una reacción de β-deshidratación facilitada por la acidez de los hidrógenos metilénicos en α al grupo oxidado. Este último proceso ya

[149] Taber, D. F.; DeMatteo, P. W.; Hassan, R. A. *Org. Synth.* **2013**, *90*, 350–357.

[150] Manthey, M. K.; González-Bello, C.; Abell, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1997**, *1*, 625-628.

[151] González-Bello, C.; Manthey, M. K.; Harris, J. M.; Hawkins, A. R.; Coggins, J. R.; Abell, C. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1591-1597.

fue descrito por Colonna y colaboradores en reacciones de oxidación de grupos amino por DMDO.[152]



Esquema 3.22 *Condiciones y reactivos*: (a) 1. DMDO, Ph_3P, Me_2CO, t.a. 2. **214**, Me_2CO, –45 ºC.

Tabla 3.1[a]

Reactivos	Disolvente	Temperatura (ºC)	Rendimiento (%)
t-BuOOH	MeOH-H_2O	35	–
t-BuOOH, SiO_2	tolueno	80	–
Oxone,® SiO_2	tolueno	80	–
Oxone,® SiO_2	benceno	80	–
K_2HPO_3, BzOOBz	THF	76	–
DMDO, Ph_3P	acetona	–45	54

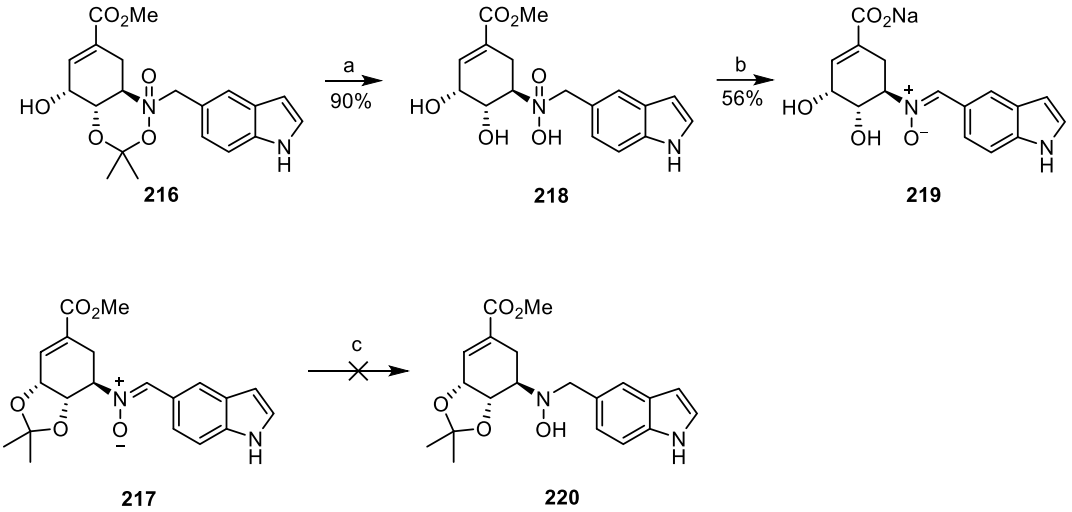
[a]Todas las reacciones se llevaron a cabo en la misma escala de reacción (0.14 mmol) y se siguieron mediante cromatografía en capa fina. Tiempo de reacción = 20 h.

En un principio no se detectó la sobreoxidación del átomo de nitrógeno en los compuestos **215** y **216**, ya que en los correspondientes espectros de masas el ion molecular, en todos los casos, supone la pérdida de metano (grupo metilo). Sin embargo, los resultados obtenidos con las posteriores etapas de desprotección no resultaban compatibles con grupos hidroxilamina convencionales. Así, la desprotección del grupo acetal por calentamiento con ácido acético acuoso (50%) a 66 ºC y la posterior hidrólisis básica del grupo ester por tratamiento con NaOH o LiOH reveló la formación de la oxima **219**, en lugar del compuesto deseado **54**, que presenta un singulete característico a 8.01 ppm correspondiente al CH del grupo imino (Esquema 3.23). Así

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[152] Colonna, S.; Pironti, V.; Carrea, G.; Pasta, P.; Zambianchi, F. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 569–575.

mismo, el tratamiento de **218** tanto con NaOH como LiOH proporcionó en todos los casos el compuesto **219**, resultado de la β-eliminación de agua. Finalmente, se ensayó la reducción del compuesto **217** por tratamiento con cianoborohidruro de sodio en presencia de ácido acético, sin embargo, estas condiciones no proporcionaron el compuesto deseado **220**.



Esquema 3.23 *Condiciones y reactivos*: (a) AcOH (50%), 66 ºC. (b) NaOH ó LiOH (0.5 M), THF, t.a. (c) $NaBH_3CN$, AcOH, t.a.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. Metodología

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.1 Procedimientos Generales

Todos los reactivos y sustancias de partida son comerciales y se utilizaron sin previa purificación. En general, se utilizaron disolventes secos comerciales (tetrahidrofurano, metanol, *N,N*-dimetilformamida, tolueno, dioxano y diclorometano), pero, para ciertas reacciones, los disolventes se secaron según los procedimientos descritos por Amarego y Perrin[153] por destilación desde un agente desecante adecuado, en atmósfera inerte e inmediatamente antes de su uso. Los agentes desecantes utilizados fueron: Na/benzofenona para el tetrahidrofurano, CaH_2 para el diclorometano, la trietilamina y piridina.

El seguimiento de las reacciones se efectuó mediante cromatografía en capa fina empleando para ello placas de aluminio de 20 × 20 cm con gel de sílice 60 F_{254} (Merck). Las manchas se visualizaron con luz UV (254 nm) y revelador de Hanessian (molibdato de cerio) o disolución de nihidrina, según el caso.

La purificación de los compuestos sintetizados se realizó mediante cromatografía en columna a presión reducida utilizando gel de sílice, Normasil 60® (40−63 μm, VWR), como fase estacionaria.

Para los procesos de liofilización se utilizó un liofilizador Buchi Lyovapor L-300 acoplado a una bomba Edwards RV de alto vacío.

Los espectros de RMN se registraron en espectrómetros VARIAN Mercury 300, Inova 400 o Inova 500 a las frecuencias indicadas y en disolventes deuterados. La asignación de las señales de RMN se realizó mediante una combinación de experimentos monodimensionales (^1H, ^{13}C con desacoplamiento de banda ancha y DEPT-135) y, en algunos casos, mediante además experimentos NOE y bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC). Los desplazamientos químicos (δ) se indican en unidades de ppm y las constantes de acoplamiento (*J*) en Herzios (Hz).

Los espectros de masas de alta y baja resolución se registraron en un espectrómetro Bruker Microtof utilizando electrospray (ESI) como procedimiento de ionización. Los datos obtenidos se expresan en unidades de masa (*m/z*).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[153] Armarengo, W. L. F.; Perrin, D. D. Purificación of Laboratory Chemicals; Butterworth Heinemann: Oxford, 1996.

Los espectros de IR se realizaron en un espectrofotómetro Jasco FT/IR Perkin Elmer con reflectancia total atenuada (ATR).

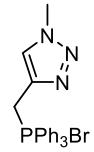
Para la medida de la rotación óptica se utilizó un polarímetro automático Jasco DIP-370 o Jasco P-2000 y se expresan en 10^{-1} grados cm^2 g^{-1}.

En las reacciones de hidrólisis, se utilizó agua desionizada y purificada (Milli-Q) obtenida mediante un equipo Millipore Milli-Q-POD.

Se empleó el programa PyMOL para visualizar y representar las estructuras de los enzimas.[154]

4.2 Preparación de Inhibidores de β-Lactamasas

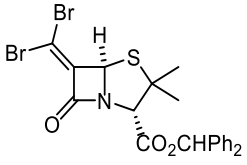
4.2.1 Compuesto 73a



73a

Una disolución del bromuro **77** (63 mg, 0.36 mmol) en tolueno seco (1.6 mL), bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se trató con trifenilfosfina (119 mg, 0.45 mmol) y la mezcla resultante se calentó a 100 ºC durante 16 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se concentró el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se trató con dietil éter. El precipitado resultante se filtró y se lavó con dietil éter, proporcionando la sal de fosfonio **73a** (118 mg, 75%) en forma de sólido blanco. Pf: 253–256 ºC. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d*6*) δ: 7.07–7.03 (m, 3H, 3xArH), 6.95–6.89 (m, 12H, 12xArH), 6.45 (d, *J* =1.9 Hz, 1H, ArH), 4.55 (d, *J* =15.2 Hz, 2H, CH_2P) y 3.17 (s, 3H, NCH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, DMSO-d*6*) δ: 135.8 (d, J_{C-P} = 7 Hz, C), 135.7 (d, J_{C-P} = 5 Hz, 3xCH), 133.9 (d, J_{C-P} = 8 Hz, 6xCH), 130.1 (d, J_{C-P} = 11 Hz, 6xCH), 118.6 (d, J_{C-P} = 72 Hz, 3xC), 41.7 (CH_3) y 20.0 (d, J_{C-P} = 43 Hz, CH_2) ppm. ^{31}P RMN (202 MHz, DMSO-d*6*) δ: 23.1 (s, 1P) ppm. EM (ESI) *m/z* = 358 (M–Br). EMAR calcd para $C_{22}H_{21}N_3P$ (M–Br): 358.1469; encontrado, 358.1468.

4.2.2 Compuesto 94



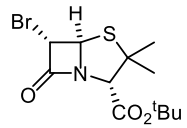
94

Una disolución de trifenilfosfina (509 mg, 1.92 mmol) en diclorometano seco (2.5 mL), bajo atmósfera de argón y a 0 ºC, se trató con tetrabromuro de carbono (319 mg, 0.96 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, y, a continuación, se enfrió a –78 ºC y se trató con una disolución a –78 ºC de la cetona **61**[105] (200 mg, 0.48 mmol) en diclorometano seco (3.2

[154] http://www.pymol.org/

mL). La mezcla resultante se agitó a –78 ºC durante 30 min y después se dejó alcanzar temperatura ambiente. Se concentró el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclorometano. Se obtuvo el dibromuro **94** (140 mg, 50%) en forma de aceite naranja. $[\alpha]_D^{20}$ = +160.4º (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.38–7.35 (m, 10H, 10xArH), 6.95 (s, 1H, CH), 5.70 (s, 1H, H5), 4.64 (s, 1H, H2), 1.57 (s, 3H, CH_3) y 1.27 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 166.6 (C), 164.5 (C), 146.2 (C), 139.1 (2xC), 128.7 (2xCH), 128.4 (2xCH), 128.3 (2xCH), 127.5 (CH), 127.1 (CH), 92.7 (C), 78.5 (CH), 71.7 (CH), 69.6 (CH), 64.2 (C), 33.9 (CH_3) y 25.2 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1773 (CO) y 1741 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 557 y 559 (MNa^+). EMAR calcd para $C_{22}H_{19}{}^{81}Br_2NO_3SNa$ (MNa^+): 559.9325; encontrado, 559.9339.

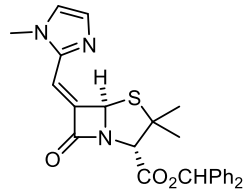
4.2.3 Compuesto 102



102

Una disolución del ácido **67** (500 mg, 1.78 mmol) en diclorometano seco (2 mL), bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se trató con ácido sulfúrico (43 µL, 0.81 mmol) y una disolución de isobutileno en diclorometano disponible comercialmente (2.56 mL, 3.65 mmol, 8%). Tras 15 min de agitación, la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y agua. Se separó la fase acuosa y la fase orgánica se lavó sucesivamente con una disolución acuosa de NaOH (10%) y agua, se secó (Na_2SO_4 anh.), se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (10:90) dietil éter/hexano, proporcionando el compuesto **102** (295 mg, 43%) como un sólido blanco. $[\alpha]_D^{20}$ = +122.0 (*c* 1.0, $CHCl_3$). Pf: 90–97 ºC. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.37 (s, 1H, H6), 4.78 (s, 1H, H5), 4.40 (s, 1H, H2), 1.57 (s, 3H, CH_3) 1.50 (s, 3H, CH_3) y 1.48 (s, 9H, 3×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 168.0 (C), 166.7 (C), 84.1 (C) 71.2 (CH), 71.1 (CH), 65.6 (C) 50.4 (CH), 35.1 (CH_3), 28.7 (3xCH_3), y 26.4 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1780 (CO) y 1725 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 358 y 360 (MNa^+). EMAR calcd para $C_{12}H_{18}{}^{79}BrO_3SNa$ (MNa^+): 358.0083; encontrado, 358.0081.

4.2.4 Compuesto 105a



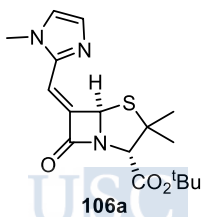
105a

Una disolución del bromuro **101** (200 mg, 0.44 mmol) en tetrahidrofurano seco (5.3 mL), bajo atmósfera de argón, a –78 ºC y aislada de la luz, se trató sucesivamente con eterato de etilo de bromuro de magnesio (150 mg, 0.58 mmol), y con una disolución de difenilamiduro de litio (1.6 mL, 0.36 M) recién preparada por

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tratamiento de una disolución de difenilamina (98 mg, 0.58 mmol) en tetrahidrofurano seco (1.3 mL), bajo atmósfera de argón y a –20 ºC, con *n*-BuLi (0.3 mL, 2 M en hexano). A continuación, la mezcla de la reacción se trató con 1-metil-1*H*-imidazol-2-carboxaldehido (53 mg, 0.48 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a –78 ºC durante 3 h y posteriormente se trató con anhídrido acético (55 µL, 0.58 mmol), se llevó a 0 ºC y se agitó durante 1 h a esa temperatura. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua y se separaron las fases. La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua y disolución saturada de NaCl, se secó (Na_2SO_4 anh.), se filtró y se concentró a presión reducida el disolvente. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (75:25) dietil éter/hexano, proporcionando una mezcla de los dos posibles diasteroisómeros. A continuación, una disolución de dicha mezcla de diasteroisómeros (272 mg, 0.45 mmol) en tetrahidrofurano seco (4.2 mL), bajo atmósfera de argón, a temperatura ambiente y protegida de la luz, se trató sucesivamente con Zn en polvo (148 mg, 2.27 mmol), *N,N,N′,N′*-tetrametiletilendiamina (0.34 mL, 2.27 mmol) y cloruro amónico (96 mg, 1.80 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 2 h y a continuación se filtró. El filtrado se lavó sucesivamente con $NaHCO_3$ (5%), agua y NaCl (sat.). El extracto orgánico se secó (Na_2SO_4 anh.), se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente dietil éter, proporcionando el compuesto **105a** (112 mg, 54%) como una espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = +421.4 (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.33–7.21 (m, 10H, 10×ArH), 7.12 (s, 1H, CH), 6.87 (s, 1H, ArH), 6.85 (s, 1H, ArH), 6.75 (s, 1H, CO_2CHPh_2), 6.09 (s, 1H, H5), 4.54 (s, 1H, H2), 3.58 (s, 3H, NCH_3), 1.48 (s, 3H, CH_3) y 1.17 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 169.4 (CO), 167.3 (CO), 142.2 (C), 141.9 (C), 139.4 (C), 139.3 (C), 131.6 (CH), 128.6 (4×CH), 128.3 (CH), 128.1 (CH), 127.5 (2×CH), 127.1 (2×CH), 123.3 (CH), 110.7 (CH), 78.1 (CH), 70.6 (CH), 69.6 (CH), 63.2 (C), 33.2 (CH_3), 32.9 (CH_3) y 25.8 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1749 (CO) y 1682 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 460 (MH^+). EMAR calcd para $C_{26}H_{26}N_3O_3S$ (MH^+): 460.1689; encontrado, 460.1689.

4.2.5 Compuesto 106a

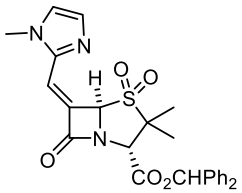


106a

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **105a**, empleando: (i) el bromuro **102** (400 mg, 1.19 mmol), tetrahidrofurano (14.3 mL), eterato de etilo de bromuro de magnesio (400 mg, 1.48 mmol), difenilamina (262 mg, 1.50 mmol), *n*-BuLi (0.6 mL, 2.5 M en hexano), 1-metil-1*H*-imidazol-2-carbaldehido (144 mg, 1.31 mmol), anhídrido acético (0.15 mL, 1.50 mmol). Eluyente cromatografía: (75:25) dietil

éter/hexano. (ii) la mezcla de diasteroisómeros (477 mg, 0.97 mmol), tetrahidrofurano (9 mL), Zn (319 mg, 4.88 mmol), *N,N,N′,N′*-trietiletilendiamina (0.74 mL, 4.88 mmol) y cloruro amónico (208 mg, 3.88 mmol). Eluyente de cromatografía: dietil éter. Rendimiento: 279 mg (82%). Espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = + 591.9° (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.20 (s, 1H, CH), 6.95 (s, 1H, ArH), 6.82 (s, 1H, ArH), 6.14 (s, 1H, H5), 4.40 (s, 1H, H2), 3.71 (s, 3H, CH_3), 1.55 (s, 3H, CH_3), 1.52 (s, 3H, CH_3) y 1.50 (s, 9H, 3×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 169.3 (C), 167.3 (C), 142.9 (C), 142.0 (C), 131.4 (CH), 123.2 (CH), 110.2 (CH), 82.8 (C), 71.2 (CH), 69.5 (CH), 63.1 (C), 33.3 (CH_3), 33.0 (CH_3), 28.1 (3×CH_3) y 26.2 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1761 (CO) y 1737 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 350 (MH^+). EMAR calcd para $C_{17}H_{24}N_3O_3S$ (MH^+): 350.1533; encontrado, 350.1540.

4.2.6 Sulfona 109a

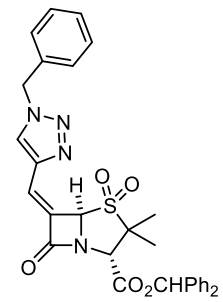


109a

Una disolución del compuesto **105a** (50 mg, 0.11 mmol) en diclorometano seco (0.7 mL), bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se trató con ácido *m*-cloroperbenzoico (38 mg, 0.22 mmol, 77%). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y a continuación se diluyó con diclorometano y disolución saturada de Na_2SO_3. La mezcla se agitó durante 10 min y se separó la fase orgánica. Esta última se lavó sucesivamente con $NaHCO_3$ (sat.), agua y NaCl (sat.), se secó (Na_2SO_4 anh.), se filtró y se concentró a presión reducida el disolvente. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía por columna de gel de sílice, utilizando como eluyente dietil éter, proporcionando la sulfona **109a** (23 mg, 43%) como una espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = + 340.7 (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.45 (m, 10H, 10×ArH), 7.34 (s, 1H, CH), 7.24 (s, 1H, ArH), 7.09 (s, 1H, ArH), 7.07 (s, 1H, CO_2CHPh_2), 5.82 (s, 1H, H5), 4.61 (s, 1H, H2), 3.80 (s, 3H, CH_3), 1.66 (s, 3H, CH_3) y 1.29 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 168.8 (C), 166.7 (C), 141.3 (C), 139.1 (C), 138.9 (C), 132.3 (CH), 129.4 (C), 128.9 (2×CH), 128.8 (3×CH), 128.4 (CH), 127.8 (2×CH), 126.9 (2×CH), 124.4 (CH), 116.3 (CH), 79.0 (CH), 71.2 (CH), 64.8 (C), 63.4 (CH), 33.0 (CH_3), 20.0 (CH_3) y 18.4 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1768 (CO) y 1688 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 492 (MH^+). EMAR calcd para $C_{26}H_{26}N_3O_5S$ (MH^+): 492.1588; encontrado, 492.1590.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

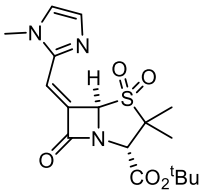
4.2.7 Sulfona 109b



109b

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **109a**, empleando: **105b** (62 mg, 0.11 mmol), CH_2Cl_2 (0.7 mL), ácido *m*-cloroperbenzoico (40 mg, 0.23 mmol, 77%). Eluyente cromatografía: dietil éter. Rendimiento: 35 mg (54%). Espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = +263.4 (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.68 (s, 1H, CH), 7.40–7.27 (m, 16H, 16×ArH), 7.02 (s, 1H, CO_2CHPh_2), 5.65 (s, 1H, H5), 5.57 (d, *J* = 15 Hz, 1H, C*H*HPh), 5.52 (d, *J* = 15 Hz, 1H, CH*H*Ph), 4.56 (s, 1H, H2), 1.60 (s, 3H, CH_3) y 1.22 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 168.2 (C), 166.5 (C), 141.2 (C), 139.1 (C), 138.8 (C), 133.9 (C), 129.5 (C), 129.4 (2×CH), 129.2 (CH), 128.9 (2×CH), 128.8 (3×CH), 128.4 (3×CH), 127.8 (2×CH), 126.9 (2×CH), 125.1 (CH), 120.7 (CH), 79.0 (CH), 70.9 (CH), 64.8 (C), 63.4 (CH), 54.5 (CH_2), 19.9 (CH_3) y 18.5 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1774 (CO) y 1688 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 569 (MH^+). EMAR calcd para $C_{31}H_{29}N_4O_5S$ (MH^+): 569.1853; encontrado, 569.1856.

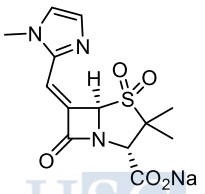
4.2.8 Sulfona 110a



110a

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **109a** empleando: **106a** (256 mg, 0.73 mmol), CH_2Cl_2 (4.8 mL), ácido *meta*-cloroperbenzoico (253 mg, 1.46 mmol, 77%). Eluyente cromatografía: dietil éter. Rendimiento: 116 mg (42%). Espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = + 512.5 (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.22 (s, 1H, CH), 7.11 (s, 1H, ArH), 6.98 (s, 1H, ArH), 5.71 (s, 1H, H5), 4.28 (s, 1H, H2), 3.70 (s, 3H, CH_3), 1.55 (s, 3H, CH_3), 1.50 (s, 9H, 3×CH_3) y 1.47 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 168.8 (C), 166.3 (C), 141.2 (C), 132.0 (CH), 129.8 (C), 124.4 (CH), 115.9 (CH), 83.8 (C), 71.2 (CH), 64.5 (CH), 63.8 (C), 33.0 (CH_3), 28.1 (3×CH_3), 20.2 (CH_3) y 18.7 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1773 (CO) y 1731 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 382 (MH^+) EMAR calcd para $C_{17}H_{24}N_3O_5S$ (MH^+): 382.1431; encontrado, 382.1438.

4.2.9 Compuesto 52a



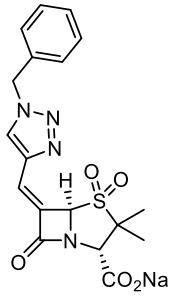
52a

Una disolución del éster **109a** (34 mg, 69.10 µmol) en *m*-cresol (0.4 mL) se calentó a 50 ºC durante 5 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con dietil éter y se trató con $NaHCO_3$ (3 mL, 30 mM). Se separó la fase orgánica y la fase acuosa se liofilizó. El residuo obtenido se purificó mediante columna de MCI GEL® CHP2OP (Mitsubishi Chemical Corporation), utilizando como eluyente agua Milli-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Q, proporcionando el compuesto **52a** (10 mg, 30%) como una espuma marrón. $[\alpha]_D^{20}$ = +243.6 (*c* 1.0, H_2O). ^{1}H RMN (300 MHz, D_2O) δ: 7.46 (s, 1H, ArH), 7.29 (s, 1H, ArH), 7.20 (s, 1H, CH), 5.90 (s, 1H, H5), 4.25 (s, 1H, H2), 3.80 (s, 3H, CH_3), 1.58 (s, 3H, CH_3) y 1.50 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, D_2O) δ: 173.8 (C), 162.2 (C), 143.7 (C), 133.8 (CH), 129.9 (C), 128.7 (CH), 120.5 (CH), 73.2 (CH), 68.5 (C), 68.3 (CH), 35.4 (CH_3), 22.2 (CH_3) y 20.4 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1761 (CO) y 1603 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 324 (M–Na). HRMS calcd para $C_{13}H_{14}N_3O_5S$ (M–Na): 324.0660; encontrado, 324.0658.

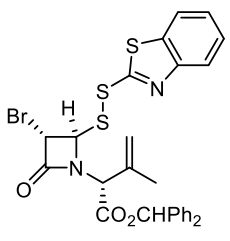
4.2.10 Compuesto 52b



52b

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **52a**, empleando: éster **109b** (35 mg, 61.51 µmol), *m*-cresol (0.4 mL), $NaHCO_3$ (2.2 mL, 30 mM). Tiempo de reacción 5 h. Eluyente cromatografía: agua Milli-Q. Rendimiento: 15 mg (60%). Espuma amarilla. $[\alpha]_D^{20}$ = +208.4 (*c* 1.0, H_2O). ^{1}H RMN (300 MHz, D_2O) δ: 8.30 (s, 1H, CHAr), 7.49–7.38 (m, 6H, 6×ArH), 6.18 (s, 1H, H5), 5.68 (s, 2H, CH_2), 4.44 (s, 1H, H2), 1.75 (s, 3H, CH_3) y 1.44 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, D_2O) δ: 174.0 (C), 170.1 (C), 141.7 (C), 134.6 (C), 129.2 (2×CH), 128.9 (CH), 128.8 (C), 128.1 (2×CH), 127.6 (CH), 119.8 (CH), 80.7 (CH), 74.2 (CH), 67.8 (C), 53.9 (CH_2), 19.6 (CH_3) y 18.1 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1761 (CO) y 1609 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 401 (M–Na). EMAR calcd para $C_{18}H_{17}N_4O_5S$ (M–Na): 401.0925; encontrado, 401.0926.

4.2.11 Compuesto 135



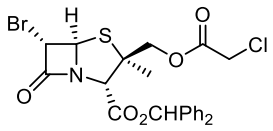
135

Una disolución del sulfóxido **134**[134] (1 g, 2.16 mmol) en dioxano seco (8.6 mL), a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte, se trató con $MgSO_4$ (anh.) (1 g, 8.64 mmol) y 2-mercaptobenzotiazol (398 mg, 2.38 mmol). La suspensión amarilla resultante se calentó a reflujo durante 14 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, el sólido en suspensión se filtró. Los filtrados y los lavados se concentraron a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en dietil éter y se trató con carbón activo. La suspensión obtenida se agitó durante 30 min y se filtró sobre Celita®. Los filtrados y los lavados se concentraron a presión reducida, proporcionando el disulfuro **135** (1.2 g, 92%) en forma de espuma amarilla. $[\alpha]_D^{20}$ = −164.8° (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.45 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H, ArH), 7.40–7.25 (m, 11H, 11×ArH), 6.94 (s, 1H, C*H*Ph_2), 5.36 (s, 1H, H3), 5.15 (s, 1H, C*H*H), 5.09 (s, 1H, CH*H*), 5.01 (s, 1H, $CHCO_2$), 4.94 (s, 1H, H2) y 1.89 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.9 (C), 167.1 (C), 162.4 (C), 154.4 (C), 139.1 (C),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

139.0 (C), 136.8 (C), 136.2 (C), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 127.4 (CH), 127.3 (CH), 126.8 (CH), 125.4 (CH), 122.7 (CH), 121.4 (CH), 118.9 (CH_2), 79.1 (CH), 71.2 (CH), 60.2 (CH), 48.3 (CH) y 21.4 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1779 (CO) y 1739 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 611 y 613 (MH^+). EMAR calcd para $C_{28}H_{24}{}^{81}BrN_2O_3S_3$ (MH^+): 613.0108; encontrado 613.0112.

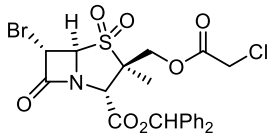
4.2.12 Compuesto 136



136

Una disolución del disulfuro **135** (802 mg, 1.31 mmol) en acetato de etilo (8.2 mL), bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se trató con ácido cloroacético (500 mg, 5.29 mmol) y acetato de plata (437 mg, 2.62 mmol). Tras 30 min de agitación, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado y los lavados se lavaron sucesivamente con $NaHCO_3$ (sat.), agua y NaCl (sat.). El extracto orgánico se secó (Na_2SO_4 anh.), se filtró y concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (50:50) dietil éter/hexano. Se obtuvieron 206 mg (30%) de una mezcla (3:1) de los correspondientes derivados de 5- (penam) y 6-miembros (cepam), respectivamente, en forma de espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = + 69.0 (*c* 1.0, $CHCl_3$), ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.39–7.37 (m, 10H, 10×ArH), 6.97 (s, 1H, C*H*Ph_2), 5.50 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H6), 4.90 (s, 1H, H2), 4.88 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H5), 4.34 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, C*H*H), 4.16 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, C*H*HCl), 4.10 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H, CH*H*Cl) 3.90 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, CH*H*) y 1.27 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 166.7 (C), 166.4 (C), 165.7 (C), 138.9 (C), 138.8 (C), 128.8 (4×CH), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 127.5 (2×CH), 127.2 (2×CH), 79.0 (CH), 72.0 (CH_2), 70.7 (CH), 66.8 (C), 65.3 (CH), 49.6 (CH), 40.7 (CH_2) y 20.8 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1780 (CO) y 1737 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 560 y 562 (MNa^+). EMAR calcd para $C_{23}H_{21}{}^{79}BrClNO_5SNa$ (MNa^+): 559.9905; encontrado, 559.9915.

4.2.13 Compuesto 142

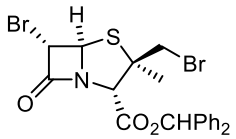


142

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **109a**, empleando: **136** (271 mg, 0.48 mmol), CH_2Cl_2 (1.3 mL) y ácido *meta*-cloroperbenzoico (173 mg, 1.00 mmol, 77%). Eluyente cromatografía: dietil éter. Rendimiento: 109 mg (38%). Espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = + 45.7° (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.39–7.35 (m, 10H, 10×ArH), 7.00 (s, 1H, C*H*Ph_2), 5.21 (d, *J* = 1.6 Hz, H6), 4.82 (s, 1H, H2), 4.76 (d, *J* = 1.6 Hz, H5), 4.62 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, C*H*H), 4.50 (d, *J* = 12.3 Hz, CH*H*), 4.12 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, C*H*HCl), 4.06 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, CH*H*Cl) y 1.18 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 166.4 (C), 165.6 (C), 164.8 (C), 138.4 (C), 138.2 (C), 129.0 (2×CH), 128.9

(2×CH), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 127.6 (2×CH), 127.1 (CH), 126.6 (CH), 80.0 (CH), 70.8 (CH), 65.1 (CH_2), 64.9 (C), 59.9 (CH), 41.6 (CH), 40.4 (CH_2) y 15.5 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1804 (CO) y 1744 (CO) cm^{-1}.

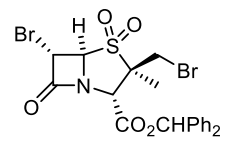
4.2.14 Compuesto 146



146

Una disolución del disulfuro **135** (758 mg, 1.23 mmol) en diclorometano seco (5.6 mL), bajo atmósfera de argón y a 0 ºC, se trató con CuBr (333 mg, 2.32 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla de la reacción se filtró sobre Celita®. El filtrado y los lavados (diclorometano) se concentraron a presión reducida. El crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (20:80) dietil éter/hexano, proporcionando el bromuro **146** (519 mg, 80%) en forma de espuma marrón. $[\alpha]_D^{20}$ = + 92.1 (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.37−7.35 (m, 10H, 10xArH), 6.94 (s, 1H, C*H*Ph_2), 5.51 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H6), 5.23 (s, 1H, H2), 4.81 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H5), 3.55 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, C*H*H), 3.45 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH*H*) y 1.36 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 166.4 (C), 165.7 (C), 138.9 (2×C), 128.7 (4×CH), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 127.5 (2×CH), 127.2 (2×CH), 78.9 (CH), 70.6 (CH), 68.8 (C), 65.4 (CH), 49.9 (CH), 42.2 (CH_2) y 22.0 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1784 (CO) y 1739 (CO) cm^{-1}.

4.2.15 Compuesto 147

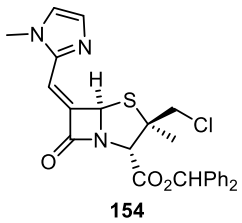


147

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **109a**, empleando: el sulfuro **146** (200 mg, 0.39 mmol), CH_2Cl_2 (2.6 mL), ácido *meta*-cloroperbenzoico (175 mg, 0.78 mmol, 77%). Eluyente cromatografía: dietil éter. Rendimiento: 58 mg, (28%). Espuma amarilla. $[\alpha]_D^{20}$ = + 47.0° (*c* 1.2, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.36 (m, 10H, 10xArH), 6.98 (s, 1H, C*H*Ph_2), 5.09 (s, 1H, H6), 4.99 (s, 1H, H5), 4.65 (s, 1H, H2), 4.01 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, C*H*H), 3.80 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, CH*H*) y 1.07 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 166.1 (C), 165.6 (C), 138.7 (C), 138.5 (C), 129.0 (2×CH), 128.9 (CH), 128.8 (2×CH), 128.6 (CH), 127.6 (2×CH), 127.0 (2×CH), 79.6 (CH), 78.8 (C), 78.3 (CH), 63.6 (CH), 39.0 (CH), 31.5 (CH_2) y 14.9 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1794 (CO) y 1744 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 557 y 559 (M^+). HRMS calcd para $C_{21}H_{23}{}^{79}Br_2N_2O_4S$ (M^+): 556.9740; encontrado, 556.9726.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

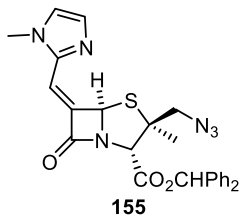
4.2.16 Compuesto 154



154

Se preparó siguiendo el proceso descrito en el compuesto **105a**, empleando: (i) cloruro **152** (536 mg, 1.11 mmol), THF (14 mL), eterato de etilo de bromuro de magnesio (387 mg, 1.49 mmol), difenilamina (254 mg, 1.50 mmol), *n*-BuLi (0.6 mL, 2.5 M en hexano), tetrahidrofurano (4.7 mL), 1-metil-1*H*-imidazol-2-carbozaldehido (139 mg, 1.26 mmol), anhidrido acético (0.15 mL, 1.44 mmol). Eluyente cromatografía: (75:25) dietil éter/hexano. (ii) La mezcla de diasteroisómeros (481.3 mg, 0.76 mmol), tetrahidrofurano (7 mL), Zn en polvo (250 mg, 3.81 mmol), *N,N,N′,N′*-tetrametiletilendiamina (0.6 mL, 3.81 mmol) y cloruro amónico (163 mg, 3.04 mmol). Eluyente cromatografía: dietil éter. Rendimiento: 372 mg (84%). Sólido beige. $[\alpha]_D^{20}$ = +470.12° (*c* 1.1, $CHCl_3$). Pf: 161–163 ºC. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.45–7.26 (m, 10H, 10xArH), 7.21 (s, 1H, CH), 6.99 (d, 2H, *J* = 3.3 Hz, 2xArH), 6.85 (s, 1H, C*H*Ph_2), 6.23 (s, 1H, H5), 5.24 (s, 1H, H2), 3.71 (s, 3H, CH_3), 3.50 (s, 2H, CH_2) y 1.31 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 168.4 (C), 166.8 (C), 142.9 (C), 142.1 (C), 139.4 (C), 139.3 (C), 131.9 (CH), 128.7 (CH), 128.3 (CH), 128.3 (CH), 127.5 (CH), 127.3 (CH), 123.5 (CH), 110.8 CH), 78.4 (CH), 69.9 (CH), 66.4 (C), 64.9 (CH), 53.3 (CH_2), 32.9 (CH_3) y 20.7 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1764 (CO) y 1734 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 494 (MH^+). EMAR calcd para $C_{26}H_{25}ClN_3O_3S$ (MH^+): 494.1300; encontrado, 494.1299.

4.2.17 Compuesto 155

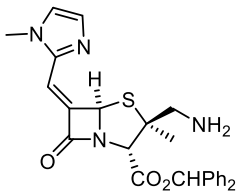


155

Una disolución del cloruro **154** (230 mg, 0.47 mmol) en *N,N*-dimetilformamida seca (2.6 mL), bajo atmósfera inerte y a temperatura ambiente, se trató con azida sódica (152 mg, 2.34 mmol) y se calentó a 70 ºC durante 3.5 h. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con una mezcla (4:1) agua/acetato de etilo. La fase acuosa se separó y la fase orgánica se lavó sucesivamente con agua (×3) y NaCl (sat.), se secó (Na_2SO_4 anh.), se filtró y se concentró a presión reducida el disolvente. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente dietil éter, proporcionando la azida **155** (112 mg, 48%) en forma de espuma beige. $[\alpha]_D^{20}$ = +497.8° (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.44–7.29 (m, 10H, 10xArH), 7.22 (s, 1H, CH), 6.98 (s, 2H, 2xArH), 6.85 (s, 1H, C*H*Ph_2), 6.21 (s, 1H, H5), 4.94 (s, 1H, H2), 3.72 (s, 3H, CH_3), 3.37 (s, 2H, CH_2) y 1.22 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 168.7 (C), 166.9 (C), 142.8 (C), 142.1 (C), 139.3 (C), 139.3 (C), 131.8 (CH), 128.8 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 127.5 (CH), 127.3 (CH),

123.5 (CH), 110.9 (CH), 78.4 (CH), 69.9 (CH), 65.8 (C), 65.6 (CH), 62.1 (CH_2), 32.9 (CH_3) y 21.1 (CH_3) ppm. IR (ATR): 2103 (N_3), 1749 (CO) y 1682 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 501 (MH^+). EMAR calcd para $C_{26}H_{25}N_6O_3S$ (MH^+): 501.1703; encontrado, 501.1709.

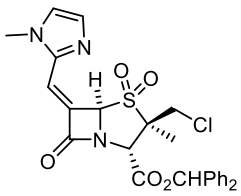
4.2.18 Compuesto 157



157

Una disolución de la azida **155** (131 mg, 0.26 mmol) en tetrahidrofurano seco (6.5 mL), a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se trató con trifenilfosfina (137 mg, 0.52 mmol) y agua (1 mL) y la disolución resultante se calentó a 80 ºC durante 24 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (50:50) acetato de etilo/hexano, proporcionando la amina **157** (113 mg, 91%) en forma de espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = + 227.0 (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.34–7.29 (m, 10H, 10xArH), 7.20 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, CH), 6.97 (s, 1H, C*H*Ph_2), 6.94 (sa, 2H, NH_2), 6.90 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, ArH), 6.89 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, ArH), 6.69 (s, 1H, H5), 4.19 (s, 1H, H2), 3.75 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H, CH*H*), 3.68 (s, 3H, CH_3), 3.42 (dd, *J* = 7.8 y 14.5 Hz, 1H, C*H*H) y 1.29 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.8 (C), 172.0 (C), 143.7 (C), 143.4 (C), 139.3 (C), 139.2 (C), 130.2 (CH), 128.6 (2×CH), 128.5 (2×CH), 128.4 (CH), 128.0 (2×CH), 127.9 (CH), 126.7 (2×CH), 122.2 (CH), 114.0 (CH), 78.6 (CH), 70.1 (CH), 64.3 (CH), 59.5 (C), 59.3 (CH_2), 33.1 (CH_3) y 21.8 (CH_3) ppm. IR (ATR): 3325 (NH_2), 1729 (CO) y 1653 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 475 (MH^+). EMAR calcd para $C_{26}H_{27}N_4O_3S$ (MH^+): 475.1798; encontrado, 475.1797.

4.2.19 Compuesto 160



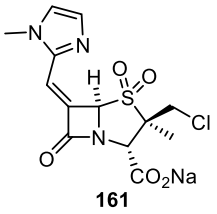
160

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **109a**, empleando: el cloruro **154** (50 mg, 0.10 mmol), CH_2Cl_2 (0.6 mL) y ácido *meta*-cloroperbenzoico (35 mg, 0.20 mmol, 77%). Eluyente cromatografía: dietil éter. Rendimiento: 30 mg (56%). Espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = +324,5° (*c* 1.0, $CHCl_3$), ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.37–7.32 (m, 10H, 10×ArH), 7.26 (s, 1H, CH), 7.14 (s, 1H, C*H*Ph_2), 7.00 (s, 1H, ArH), 6.99 (s, 1H, ArH), 5.79 (s, 1H, H5), 4.82 (s, 1H, H2), 3.98 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, C*H*HCl), 3.84 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, CH*H*Cl) 3.73 (s, 3H, NCH_3) y 1.34 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.9 (C), 166.1 (C), 141.3 (C), 138.9 (C), 138.8 (C), 132.5 (CH), 130.4 (C), 128.9 (2×CH), 128.8 (2×CH), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 127.6 (2×CH), 127.2 (2×CH), 124.6 (CH), 116.4 (CH), 79.4 (CH), 73.6 (CH), 67.7 (C), 61.5 (CH), 45.2 (CH_2), 33.0 (CH_3) y 16.3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(CH_3) ppm. IR (ATR): 1767 (CO) y 1682 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 526 (MH^+). EMAR calcd para $C_{26}H_{25}ClN_3O_5S$ (MH^+): 526.1198; encontrado, 526.1201.

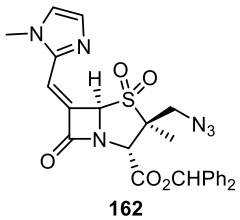
4.2.20 Compuesto 161



161

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **52a**, empleando: el éster **160** (15 mg, 28.52 µmol), *m*-cresol (0.2 mL), disolución acuosa de $NaHCO_3$ (1.4 mL, 23mM) Eluyente cromatografía: agua Milli-Q. Rendimiento: 6.2 mg (56%). Espuma marrón. $[\alpha]_D^{20}$ = +255.5° (*c* 0.6, H_2O). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.49 (s, 1H, ArH), 7.39 (s, 1H, ArH), 7.32 (s, 1H, ArH), 6.16 (s, 1H, H5), 4.46 (s, 1H, H2), 4.25 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, C*H*HCl), 4.17 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH*H*Cl), 3.89 (s, 3H, CH_3) y 1.58 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 173.0 (C), 169.8 (C), 131.2 (CH), 128.2 (2×C), 125.5 (CH), 79.9 (CH), 79.1 (C), 65.9 (CH), 44.5 (CH_2), 32.8 (CH_3) y 13.9 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1751 (CO) y 1603 (CO) cm^{-1}.

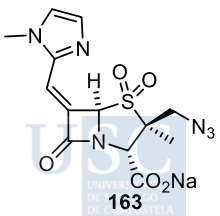
4.2.21 Compuesto 162



162

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **109a**, empleando: el sulfuro **155** (51 mg, 0.10 mmol), CH_2Cl_2 (0.6 mL), ácido *meta*-cloroperbenzoico (35 mg, 0.20 mmol, 77%). Eluyente cromatografía: dietil éter. Rendimiento: 16 mg (30%). Espuma beige. $[\alpha]_D^{20}$ = +330.2° (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.36 (m, 10H, 10xArH), 7.16 (s, 1H, CH), 6.99 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H, 2xArH), 5.75 (s, 1H, H5), 4.73 (s, 1H, H2), 3.84 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, C*H*H), 3.74–3.71 (m, 4H, NCH_3 and CH*H*) y 1.22 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 166.1 (C), 141.1 (C), 138.8 (C), 138.6 (C), 132.3 (CH), 129.9 (C), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 127.5 (CH), 127.0 (CH), 124.4 (CH), 116.3 (CH), 79.2 (CH), 72.7 (CH), 66.7 (C), 60.3 (CH), 53.1 (CH_2), 32.9 (CH_3) y 16.3 (CH_3) ppm. IR (ATR): 2109 (N_3), 1773 (CO) y 1688 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 533 (MH^+). EMAR calcd para $C_{26}H_{25}N_6O_5S$ (MH^+): 533.1602; encontrado, 533.1619.

4.2.22 Compuesto 163

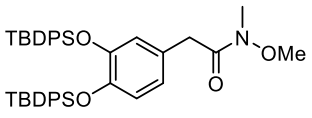


163

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **52a**, empleando: la azida **162** (32 mg, 60 µmol), *m*-cresol (0.4 mL), $NaHCO_3$ (3.1 mL, 23 mM). Eluyente cromatografía: agua Milli-Q. Rendimiento: 20 mg (80%). Espuma amarilla. ^{1}H RMN (300 MHz, D_2O) δ: 7.54 (s, 1H, ArH), 7.37 (s, 1H, ArH), 7.29 (s, 1H, ArH), 5.98 (s,

1H, H5), 4.47 (s, 1H, H2), 4.10 (s, 2H, CH_2), 3.87 (s, 3H, CH_3) y 1.66 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, D_2O) δ: 172.4 (C), 170.5 (C), 131.2 (CH), 127.2 (C), 126.0 (CH), 118.0 (CH), 71.8 (CH), 67.9 (C), 62.9 (CH), 53.0 (CH_2), 32.8 (CH_3) y 15.9 (CH_3) ppm. IR (ATR): 2109 (N_3), 1756 (CO) y 1614 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 365 (M–Na). EMAR calcd para $C_{13}H_{13}N_6O_5S$ (M–Na): 365.0674; encontrado, 365.0674.

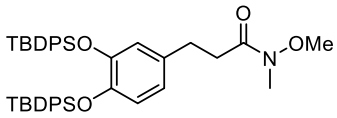
4.2.23 Compuesto 168



168

Una disolución del ácido **166**[105] (300 mg, 0.47 mmol) en diclorometano seco (1.6 mL), a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte, se trató con el hidrocloruro de la *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) (360 mg, 1.88 mmol), hidroxibenzotriazol (166 mg, 1.08 mmol), trietilamina seca (80 µL, 0.56 mmol) e hidrocloruro de *N,O*-dimetilhidroxilamina (46 mg, 0.47 mmol). La disolución resultante se agitó durante 48 h y a continuación se concentró a presión reducida el disolvente. El residuo resultante se disolvió en acetato de etilo y agua. La fase acuosa se separó y la fase orgánica se lavó sucesivamente con H_2SO_4 (0.5 M) y NaCl (sat.). El extracto orgánico se secó ($MgSO_4$ anh.), se filtró y se concentró a presión reducida el disolvente. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (75:25) dietil éter/hexano, proporcionando la amida **168** (225 g, 70%) en forma de espuma blanca. ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.87 (t, *J* = 5.7 Hz, 8H, 8×ArH), 7.50–7.40 (m, 12H, 12×ArH), 6.48–6.39 (m, 3H, 3×ArH), 3.26 (s, 2H, CH_2), 3.12 (s, 3H, OCH_3), 2.96 (s, 3H, NCH_3), 1.22 (s, 9H, 3×CH_3) y 1.21 (s, 9H, 3×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 172.1 (C), 145.7 (C), 144.8 (C), 135.5 (8×CH), 133.1 (4×C), 129.7 (4×CH), 127.7 (8×CH) 127.2 (C), 121.3 (CH), 121.2 (CH), 120.3 (CH), 60.7 (OCH_3), 38.5 (CH_2), 26.7 (2×SiC(CH_3)$_3$), y 19.4 (2×Si*C*(CH_3)$_3$) ppm. IR (ATR): 1663 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 688 (MH^+). EMAR calcd para $C_{42}H_{50}NO_4Si_2$ (MH^+): 688.3273; encontrado, 688.3272.

4.2.24 Compuesto 169



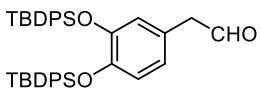
169

Se preparó siguiendo el procedimiento experimental descrito para el compuesto **168**, empleando: el ácido **167** (2.3 g, 3.67 mmol), CH_2Cl_2 (12 mL), hidrocloruro de la *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (2.9 g, 18.68 mmol), hidroxibenzotriazol (1.3 g, 9.62 mmol), trietilamina (0.6 mL, 4.32 mmol) e hidrocloruro de *N,O*-dimetilhidroxilamina (351 mg, 4.20 mmol). Eluyente cromatografía: (50:50) dietil éter/hexano. Rendimiento: 1.6 g (66%). Aceite incoloro. ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.81 (d, *J* = 6.4 Hz, 8H, 8×ArH), 7.44–7.35 (m, 12H, 12×ArH), 6.36 (d, *J* = 8.2 Hz,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1H, ArH), 6.29 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, ArH), 6.22 (dd, *J* = 2.0 and 8.2 Hz, 1H, ArH), 3.39 (s, 3H, OCH_3), 3.04 (s, 3H, NCH_3), 2.40 (m, 2H, CH_2CO), 2.18 (m, 2H, CH_2), 1.16 (s, 9H, 3×CH_3) and 1.15 (s, 9H, 3×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz $CDCl_3$) δ: 145.9 (2×C), 144.4 (2×C), 135.8 (6×CH), 133.5 (3×C), 129.9 (4×CH), 127.8 (10×CH), 120.6 (CH) 120.5 (CH), 120.2 (CH), 61.1 (OCH_3), 33.6 (CH_2), 29.9 (CH_2), 26.9 (2×SiC(CH_3)$_3$), and 19.6 (2×SiC(CH_3)$_3$) ppm. IR (ATR): 1663 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 702 (MH^+). EMAR calcd para $C_{43}H_{52}NO_4Si_2$ (MH^+): 702.3429; encontrado, 702.3424.

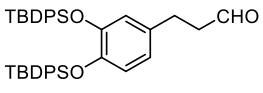
4.2.25 Compuesto 170



170

Una disolución de la amida **168** (70 mg, 0.10 mmol) en diclorometano seco (0.6 mL), bajo atmósfera inerte y a –78 ºC, se trató gota a gota con hidruro de diisobutilaluminio (0.15 mL, 0.15 mmol, 1 M en tolueno) y se agitó durante 30 min. Se añadió agua, se dejó alcanzar temperatura ambiente y el disolvente orgánico se concentró a presión reducida. La disolución acuosa resultante se diluyó con acetato de etilo y disolución saturada de tartrato potásico. La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (×5). Los extractos orgánicos se juntaron, se secaron (Na_2SO_4 anh.), se filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (20:80) dietil éter/hexano, proporcionando el aldehído **170** (30 mg, 48%) en forma de aceite incoloro. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.16 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, CHO), 7.87 (d, *J* = 7.8 Hz, 8H, 8×ArH), 7.52–7.41 (m, 12H, 12×ArH), 6.48 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 6.30 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, ArH), 6.25–6.22 (dd, *J* = 2.1 and 8.1 Hz, 1H, ArH), 3.09 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H, CH_2), 1.24 (s, 9H, 3×CH_3) and 1.22 (s, 9H, 3×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 199.6 (C), 146.3 (C), 145.5 (C), 135.6 (4×CH), 135.5 (4×CH), 133.0 (2×C), 132.9 (2×C), 129.9 (4×CH), 127.9 (4×CH), 127.8 (4×CH), 123.8 (C), 121.7 (2×CH), 120.7 (CH), 49.4 (CH_2), 26.7 (2×SiC(CH_3)$_3$) and 19.5 (2×SiC(CH$_3$)$_3$) ppm. IR (ATR): 1724 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 629 (MH^+). EMAR calcd para $C_{40}H_{45}O_3Si_2$ (MH^+): 629.2902; encontrado, 629.2899.

4.2.26 Compuesto 171



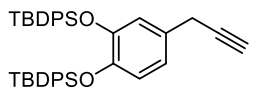
171

Se preparó siguiendo el procedimiento experimental descrito para el compuesto **170**, empleando: la amida **169** (100 mg, 0.14 mmol), CH_2Cl_2 (0.8 mL), hidruro de diisobutilaluminio (0.21 mL, 0.21 mmol, 1 M en tolueno). Eluyente cromatografía: (20:80) dietil éter/hexano. Rendimiento: 72 mg (73%). Aceite incoloro. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.45 (s, 1H, CHO), 7.83 (d, *J* = 7.3 Hz, 8H, 8×ArH), 7.47–7.38 (m, 12H, 12×ArH), 6.38 (d, *J* = 7.9 Hz,

USC DE COMPOSTELA

1H, ArH), 6.22–6.19 (m, 2H, 2×ArH), 2.42 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_2), 2.16 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH_2), 1.19 (s, 9H, 3×CH_3) and 1.18 (s, 9H, 3×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 201.7 (C), 145.9 (C), 144.4 (C), 135.6 (8×CH+2×C), 133.2 (2×C), 132.2 (C), 129.9 (2×CH), 129.8 (2×CH), 127.8 (4×CH), 127.7 (4×CH), 120.3 (2×CH), 120.2 (CH), 44.6 (CH_2), 27.2 (CH_2), 26.8 (2×SiC(*C*H_3)$_3$) and 19.5 (2×Si*C*(CH_3)$_3$) ppm. IR (ATR): 1724 (CO) cm^{-1}.

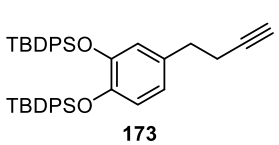
4.2.27 Compuesto 172



172

Una disolución del aldehído **170** (500 mg, 0.84 mmol) y dimetil (1-diazo-2-oxopropil)fosfonato (184 mg, 0.96 mmol) en metanol seco (0.8 mL), a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte, se trató con carbonato potásico anhidro (221 mg, 1.60 mmol). Tras 2 h de agitación, se concentró a presión reducida el disolvente y el residuo obtenido se diluyó en dietil éter y agua. La fase acuosa se separó y la fase orgánica se lavó con disolución saturada de NaCl, se secó (Na_2SO_4 anh.), se filtró y se concentró a presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (10:90) dietil éter/hexano, proporcionando el alquino **172** (169 mg, 34%) en forma de aceite incoloro. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.88–7.86 (d, *J* = 6.1 Hz, 8H, 8×ArH), 7.46–7.35 (m, 12H, 12×ArH), 6.42 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 6.34 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.25 (dd, *J* = 2.3 and 8.3 Hz, 1H, ArH), 2.34 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH_2), 1.94 (dt, *J* = 2.7 and 8.0 Hz, 2H, CH_2), 1.73 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, CCH), 1.22 (s, 9H, 3×CH_3) y 1.21 (s, 9H, 3×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 145.9 (C), 144.6 (C), 135.8 (4×CH), 135.7 (4×CH), 135.6 (C), 133.5 (C), 133.4 (C), 132.8 (C), 130 (2×CH), 129.9 (2×CH), 127.9 (4×CH), 127.8 (4×CH), 127.8 (C), 120.6 (CH), 120.5 (CH), 120.1 (CH), 84.0 (C), 68.4 (CH), 34.0 (CH_2), 26.9 (2×SiC(*C*H_3)$_3$), 20.1 (CH_2) y 19.6 (2×Si*C*(CH_3)$_3$) ppm. IR (ATR): 3303 (C≡C) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 639 (MH^+). EMAR calcd para $C_{42}H_{47}O_2Si_2$ (MH^+): 639.3109; encontrado, 639.3112.

4.2.28 Compuesto 173



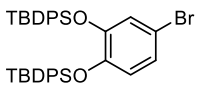
173

Se preparó siguiendo el procedimiento experimental descrito para el compuesto **172**, empleando: el aldehído **171** (512 mg, 0.80 mmol) y dimetil (1-diazo-2-oxopropil)fosfonato (184 mg, 0.96 mmol), metanol (0.8 mL), y carbonato potásico anhidro (221 mg, 1.60 mmol). Eluyente cromatografía: (10:90) dietil éter/hexano. Rendimiento: 156 mg (31%). Aceite incoloro. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.88–7.86 (d, *J* = 6.1 Hz, 8H, 8×ArH), 7.48–7.4 (m, 12H, 12×ArH), 6.42 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 6.34 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.25 (dd, *J* = 2.3 and 8.3 Hz, 1H, ArH), 2.34 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH_2), 1.94 (dt, *J* = 2.7 and 8.0 Hz, 2H, CH_2), 1.73 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, CCH), 1.22 (s, 9H, 3×CH_3) and 1.21 (s, 9H, 3×CH_3)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 145.9 (C), 144.6 (C), 135.8 (4×CH), 135.7 (4×CH), 135.6 (C), 133.5 (C), 133.4 (C), 132.8 (C), 130 (2×CH), 129.9 (2×CH), 127.9 (4×CH), 127.8 (4×CH), 127.8 (C), 120.6 (CH), 120.5 (CH), 120.1 (CH), 84.0 (C), 68.4 (CH), 34.0 (CH_2), 26.9 (2×SiC(CH_3)$_3$), 20.1 (CH_2) and 19.6 (2×SiC(CH_3)$_3$) ppm. IR (ATR): 3303 (C≡C) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 639 (MH^+). EMAR calcd para $C_{42}H_{47}O_2Si_2$ (MH^+): 639.3109; encontrado,639.3112.

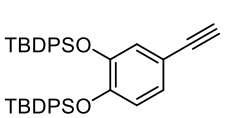
4.2.29 Compuesto 175



175

Una disolución del 4-bromobenceno-1,2-diol (**174**) (100 mg, 0.53 mmol) en *N,N*-dimetilformamida seca (1.1 mL), a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte, se trató con imidazol (92 mg, 1.35 mmol) y cloruro de *terc*-butildifenilsililo (365 mg, 1.37 mmol). Tras 24 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se diluyó con una mezcla (1:4) acetato de etilo/agua, se separó la fase orgánica y la fase acuosa se lavó con acetato de etilo (×3). Los extractos orgánicos se juntaron, se lavaron con HCl (10%), se secaron (Na_2SO_4 anh.), se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (40:60) dietil éter/hexano. Se obtuvo el compuesto **175** (350 mg, 99%) en forma de espuma blanca. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.85–7.79 (dt, *J* = 1.5 and 7.7 Hz, 8H, 8×ArH), 7.52–7.38 (m, 12H, 12×ArH), 6.59 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.53–6.49 (dd, *J* = 2.4 and 8.6 Hz, 1H, ArH), 6.33 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 1.21 (s, 9H, 3×CH_3) y 1.17 (s, 9H, 3×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 147.1 (C), 145.7 (C), 135.7 (4×CH), 135.6 (4×CH), 132.8 (2×C), 133.4 (2×C), 130.2 (2×CH), 130.1 (2×CH), 128.1 (4×CH), 128.0 (4×CH), 123.7 (2×CH) 121.5 (CH), 112.2 (C), 26.9 (SiC(CH_3)$_3$), 23.7 (SiC(CH_3)$_3$), 19.7 (SiC(CH_3)$_3$) y 19.6 (SiC(CH_3)$_3$) ppm. EM (ESI) *m/z* = 682 y 684 (M^+). EMAR calcd para $C_{38}H_{45}{}^{79}BrNO_2Si_2$ (M^+): 682.2167; encontrado, 682.2163.

4.2.30 Compuesto 176

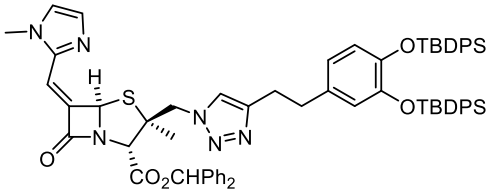


176

Una disolución del bromuro **175** (100 mg, 0.15 mmol) en tetrahidrofurano (0.2 mL) y trietilamina (0.6 mL), ambos secos, bajo atmósfera de argón y en tubo sellado, se trató sucesivamente con tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (8.6 mg, 7.50 μmol) y trimetilsililacetileno (20 μL, 0.16 mmol). La mezcla resultante se calentó a 80 ºC durante 24 h, y a continuación, tras enfriar a temperatura ambiente, se diluyó en acetato de etilo y agua. Se separó la fase acuosa y la fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl (1 M) (×3) y NaCl (sat.). El extracto orgánico se secó (Na_2SO_4 anh.), se filtró y se concentró a presión reducida. El crudo obtenido se disolvió en etanol (0.32 mL) se trató, a

temperatura ambiente, con una disolución de nitrato de plata (0.31 mL, 0.35 M) en una mezcla (2.3:1) etanol/agua. Tras 2 h de agitación, la mezcla se trató con disolución acuosa de cianuro potásico (0.1 mL, 7.6 M) y se dejó durante 5 min. La mezcla se diluyó con dietil éter y agua, se separó la fase acuosa. La fase orgánica se lavó con disolución saturada de NaCl, se secó (Na_2SO_4 anh.), se filtró y se concentró a presión reducida el disolvente. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (1:99) dietil éter/hexano, proporcionando el alquino **176** (31.5 mg, 35%) como aceite incoloro. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.78 (t, *J* = 8.0 Hz, 10H, 10×ArH), 7.46–7.35 (m, 17H, 17×ArH), 6.59 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 6.53 (dd, *J* = 1.6 y 8.3 Hz, 1H, ArH), 6.34 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, ArH), 2.67 (s, 1H, CH), 1.15 (s, 9H, 3×CH_3) y 1.12 (s, 9H, 3×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 147.4 (C), 145.8 (C), 135.6 (4×CH), 135.5 (4×CH), 132.8 (C), 132.7 (C), 129.9 (6×CH), 127.8 (9×CH), 125.3 (CH), 123.9 (CH), 120.3 (CH), 113.9 (C), 75.1 (C), 26.8 (SiC(*C*H_3)$_3$), 26.6 (SiC(*C*H_3)$_3$), 19.5 (Si*C*(CH$_3$)$_3$) y 19.4 (Si*C*(CH$_3$)$_3$) ppm. EM (ESI) *m/z* = 611 (MH^+). EMAR calcd para $C_{40}H_{43}O_2Si_2$ (MH^+): 611.2796; encontrado, 611.2796

4.2.31 Compuesto 177



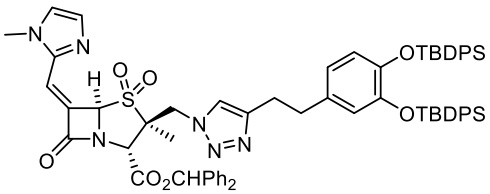
177

Una disolución de la azida **155** (92 mg, 0.18 mmol) en tetrahidrofurano (0.8 mL) y agua (0.6 mL) a temperatura ambiente, se trató con el alquino **173** (115 mg, 0.18 mmol), disolución acuosa de ascorbato sódico (0.62 mL, 0.32 M) y de sulfato de cobre (0.62 mL, 0.32 M). Después de 24 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. Se separó la fase acuosa y la fase orgánica se lavó sucesivamente con agua y NaCl (sat.), se secó (Na_2SO_4 anh.), se filtró y se concentró a presión reducida el disolvente. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (80:20) dietil éter/hexano, proporcionando el compuesto **177** (50 mg, 30%) en forma de espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = +208.2° (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.80–7.78 (m, 10H, 10×ArH), 7.42–7.21 (m, 20H, 20×ArH), 7.00 (s, 1H, ArH), 6.94 (s, 1H, CHAr), 6.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2×ArH), 6.31–6.27 (m, 2H, 2×ArH), 6.22 (s, 1H, H5), 6.07 (dd, *J* = 2.3 y 8.2 Hz, 1H, ArH), 4.90 (s, 1H, H2), 4.32 (d, *J* = 14.4 Hz, 1H, C*H*HN), 4.24 (d, *J* = 14.4 Hz, 1H, CH*H*N), 3.69 (s, 3H, NCH_3), 2.38 (s, 4H, 2×CH_2), 1.42 (s, 3H, CH_3), 1.15 (s, 9H, 3×CH_3) y 1.13 (s, 9H, 3×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 168.9 (C), 166.4 (C), 147.3 (C), 146.0 (C), 144.4 (C), 142.3 (C), 142.0 (C), 139.2 (2×C), 135.8 (6×CH), 135.7 (6×CH), 133.5 (2×C), 133.4 (2×C), 132.1 (CH), 130.0 (2×CH), 129.9 (2×CH), 128.7 (8×CH), 128.4 (CH),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

128.3 (CH), 127.9 (4×CH), 127.8 (4×CH), 127.5 (2×CH), 127.3 (2×CH), 125.6 (CH), 123.6 (CH), 122.2 (CH), 120.7 (CH), 120.5 (CH), 120.1 (CH), 111.3 (CH), 78.6 (CH), 69.9 (CH), 65.9 (CH), 60.0 (CH_2), 34.6 (C), 33.0 (CH_2), 30.5 (CH_3), 27.1 (CH_2), 26.9 (2×SiC(CH_3)$_3$), 21.4 (2×Si*C*(CH_3)$_3$) y 19.6 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1754 (CO) y 1684 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 1139 (MH^+). EMAR calcd para $C_{68}H_{71}N_6O_5SSi_2$ (MH^+): 1139.4740; encontrado, 1139.4704.

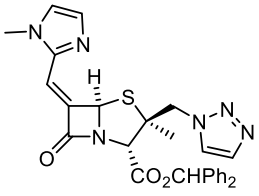
4.2.32 Compuesto 178



178

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **109a**, empleando: el sulfuro **177** (41 mg, 35.99 µmol), CH_2Cl_2 (0.2 mL), ácido *meta*-cloroperbenzoico (16 mg, 92.71 µmol, 77%). Eluyente cromatografía: dietil éter. Rendimiento: 10 mg (24%). Espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = +130.5° (*c* 0.6, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.80–7.77 (m, 9H, 9×ArH), 7.44–7.36 (m, 22H, 22×ArH), 7.23 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, ArH), 7.19 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, CH), 7.07 (s, 1H, $CHPh_2$), 7.00 (s, 1H, ArH), 6.99 (s, 1H, ArH), 6.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 6.22 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.09 (dd, *J* = 2.2 y 8.4 Hz, 1H, ArH), 5.71 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H5), 4.96 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, C*H*H), 4.78 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, CH*H*), 4.65 (s, 1H, H2), 3.76 (s, 3H, CH_3), 2.45–2.29 (m, 4H, 2×CH_2), 1.43 (s, 3H, CH_3), 1.15 (s, 9H, 3×CH_3) y 1.13 (s, 9H, 3×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 168.0 (C), 165.9 (C), 147.9 (C), 145.9 (C), 144.4 (C), 141.2 (C), 138.7 (C), 138.5 (C), 135.7 (8×CH), 133.5 (2×C), 133.4 (2×C), 132.6 (CH), 130.1 (CH), 130.0 (CH), 129.9 (2×CH), 129.4 (C), 129.1 (2×CH), 128.9 (2×CH), 128.6 (CH), 128.0 (4×CH), 127.9 (4×CH), 127.7 (2×CH), 127.3 (2×CH), 125.7 (CH), 124.7 (CH), 123.0 (CH), 120.7 (CH), 120.6 (CH), 120.1 (CH), 116.8 (CH), 80.0 (CH), 72.7 (CH), 67.1 (2×C), 60.6 (CH), 50.2 (CH_2), 34.6 (CH_2), 33.0 (CH), 30.5 (CH_3), 27.1 (CH_2), 26.9 (2×SiC(CH_3)$_3$), 19.6 (2×Si*C*(CH_3)$_3$) y 15.6 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1782 (CO) y 1687 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 1171 (MH^+). EMAR calcd para $C_{68}H_{70}N_6O_7SSi_2$ (MH^+): 1171.4638; encontrado, 1171.4669.

4.2.33 Compuesto 179



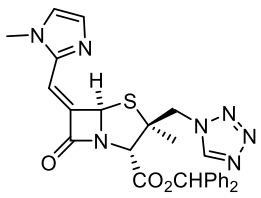
179

Una disolución del cloruro **154** (47 mg, 95.14 µmol) en acetonitrilo (0.2 mL) y agua (6 µL), se trató sucesivamente con 1*H*-triazol (3 µL, 0.49 mmol) y carbonato de plata (52 mg, 0.19 mmol). La suspensión resultante se calentó a 30 ºC durante 20 h y a continuación se filtró. El filtrado y los lavados se concentraron a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en acetato de etilo y agua. La fase acuosa se separó y la fase orgánica se lavó sucesivamente con agua y NaCl (sat.), se

USC DE COMPOSTELA

secó (Na_2SO_4 anh.), se filtró y se concentró a presión reducida el disolvente. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente dietil éter, proporcionando el compuesto **179** (47 mg, 95%) en forma de espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = +274.9° (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.75 (s, 1H, ArH), 7.69 (s, 1H, ArH), 7.39–7.31 (m, 10H, 10xArH), 7.02 (s, 1H, $CHPh_2$), 6.93 (s, 1H, ArH), 6.92 (s, 1H, ArH), 6.32 (s, 1H, H5), 4.90 (s, 1H, H2), 4.47 (s, 2H, CH_2), 3.76 (s, 3H, CH_3) y 1.22 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 168.9 (C), 166.3 (C), 142.6 (C), 141.7 (C), 139.1 (2×C), 133.7 (CH), 131.6 (CH), 128.8 (2×CH), 128.7 (2×CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 127.5 (2×CH), 127.3 (2×CH), 125.2 (CH), 123.8 (CH), 111.2 (CH), 78.7 (CH), 70.0 (CH), 65.7 (CH), 60.0 (CH_2), 33.2 (CH_3) y 21.4 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1754 (CO) y 1684 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 527 (MH^+). EMAR calcd para $C_{28}H_{27}N_6O_3S$ (MH^+): 527.1860; encontrado, 527.1865.

4.2.34 Compuesto 181

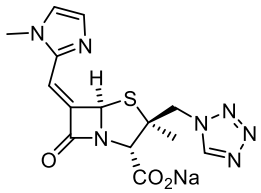


181

Una disolución del cloruro **154** (400 mg, 0.81 mmol) en acetonitrilo (1.5 mL) y agua (0.5 mL), se trató sucesivamente con 1*H*-tetrazol (18 mL, 8.10 mmol, 0.45 M en MeCN) y carbonato de plata (335 mg, 1.21 mmol). La suspensión resultante se calentó a 30 ºC durante 20 h y a continuación se filtró. El filtrado y los lavados se concentraron a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en acetato de etilo y agua. La fase acuosa se separó y la fase orgánica se lavó sucesivamente con agua y NaCl (sat.), se secó (Na_2SO_4 anh.), se filtró y se concentró a presión reducida el disolvente. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente dietil éter, proporcionando el compuesto **181** (337 mg, 86%) en forma de espuma beige. $[\alpha]_D^{20}$ = +392.1° (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.73 (s, 1H, ArH), 7.37–7.31 (m, 10H, 10xArH), 7.25 (s, 1H, CH), 7.02 (s, 1H, $CHPh_2$), 6.95 (s, 1H, ArH), 6.92 (s, 1H, ArH), 6.26 (s, 1H, H5), 4.77 (s, 1H, H2), 4.55 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H, C*H*H), 4.43 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H, CH*H*), 3.78 (s, 3H, CH_3), y 1.23 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 169.1 (C), 166.0 (C), 143.8 (CH), 141.9 (C), 141.8 (C), 139.0 (C), 138.9 (C), 132.2 (CH), 128.8 (CH), 128.8 (CH), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 127.6 (CH), 127.3 (CH), 123.9 (CH), 111.8 (CH), 78.9 (CH), 70.2 (CH), 65.7 (CH), 65.3 (C), 58.1 (CH_2), 33.1 (CH_3) y 21.4 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1754 (CO) y 1684 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 528 (MH^+). EMAR calcd para $C_{27}H_{26}N_7O_3S$ (MH^+): 528.1812; encontrado, 528.1809.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

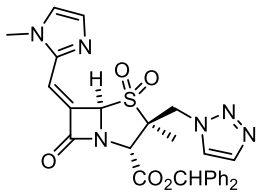
4.2.35 Compuesto 182



182

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **52a**, empleando: el ester **181** (60 mg, 0.11 mmol), *m*-cresol (0.7 mL), disolución acuosa de $NaHCO_3$ (3 mL, 40 mM). Eluyente cromatografía: agua Milli-Q. Rendimiento: 19 mg (47%). Espuma beige. $[\alpha]_D^{20}$ = +473.9° (*c* 1.0, H_2O). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.28 (s, 1H, ArH), 7.34 (s, 1H, ArH), 7.24 (s, 1H, ArH), 6.19 (s, 1H, H5), 4.84 (s, 2H, CH_2), 4.72 (s, 1H, H2), 3.86 (s, 3H, NCH_3) y 1.64 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 173.5 (C), 170.1 (C), 145.1 (C), 141.4 (C), 139.1 (C), 130.6 (CH), 125.2 (CH), 112.5 (CH), 68.6 (CH), 68.1 (CH), 66.0 (C), 57.4 (CH_2), 32.8 (CH_3) y 22.4 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1744 (CO) y 1601 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 360 (M–Na). EMAR calcd para $C_{14}H_{14}N_7O_3S$ (M–Na): 360.0884; encontrado, 360.0880.

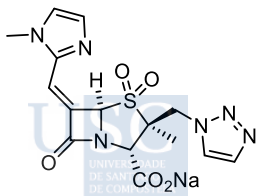
4.2.36 Compuesto 183



183

Se preparó siguiendo el procedimiento experimental descrito para el compuesto **109a**, empleando: el triazol **179** (259 mg, 0.49 mmol), CH_2Cl_2 (3.3 mL), ácido *meta*-cloroperbenzoico (220 mg, 1.27 mmol). Eluyente cromatografía: (75:25) acetato de etilo/hexano. Rendimiento: 100 mg (40%). Espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = +235.6° (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.75 (s, 1H, ArH), 7.68 (s, 1H, ArH), 7.47–7.34 (m, 10H, 10xArH), 7.24 (s, 1H, CHAr), 7.21 (s, 1H, $CHPh_2$), 7.02 (s, 2H, 2xArH), 5.82 (s, 1H, H5), 5.16 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, C*H*H), 5.05 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, CH*H*), 4.68 (s, 1H, H2), 3.77 (s, 3H, NCH_3) y 1.14 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 168.3 (C), 166.3 (C), 141.4 (C), 139.1 (C), 139.0 (C), 134.7 (CH), 132.5 (CH), 129.5 (2×CH), 129.3 (2×CH), 129.1 (2×CH), 128.1 (2×CH), 127.7 (2×CH), 126.3 (CH), 125.2 (CH), 117.1 (CH), 80.5 (CH), 73.0 (CH), 67.6 (C), 61.0 (CH), 50.8 (CH_2), 33.6 (CH_3), 30.2 (C) y 16.2 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1776 (CO) y 1686 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 559 (MH^+). EMAR calcd para $C_{28}H_{27}N_6O_5S$ (MH^+): 559.1758; encontrado, 559.1740.

4.2.37 Compuesto 184

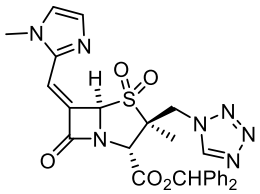


184

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **52a**, empleando: el éster **183** (17 mg, 30.41 µmol), *m*-cresol (0.2 mL), disolución acuosa de $NaHCO_3$ (1 mL, 23 mM). Eluyente cromatografía: agua Milli-Q. Rendimiento: 10 mg (85%). Espuma marrón. $[\alpha]_D^{20}$ = +175.5° (*c* 0.9, H_2O). ^{1}H RMN (500 MHz,

D_2O) δ: 8.11 (s, 1H, ArH), 7.85 (s, 1H, ArH), 7.54 (s, 1H, ArH), 7.32 (s, 1H, ArH), 7.19 (s, 1H, ArH), 5.94 (s, 1H, H5), 5.35 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, C*H*H), 5.20 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH*H*), 4.54 (s, 1H, H2), 3.83 (s, 3H, NCH_3), y 1.51 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz, D_2O) δ: 173.6 (C), 172.2 (C), 142.5 (C), 135.5 (CH), 132.8 (CH), 129.2 (CH), 128.1 (C), 127.7 (CH), 120.0 (CH), 73.3 (CH), 69.3 (CH), 64.2 (CH), 51.9 (CH_2), 34.3 (CH_3) y 17.2 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1761 (CO) y 1614 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 391 (M−Na). EMAR calcd para $C_{15}H_{15}N_6O_5S$ (M−Na): 391.0830; encontrado, 391.0831.

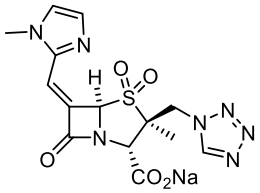
4.2.38 Compuesto 185



185

Se preparó siguiendo el procedimiento experimental descrito para el compuesto **109a**, empleando: el sulfuro **181** (100 mg, 0.19 mmol), CH_2Cl_2 (1.3 mL), ácido *meta*-cloroperbenzoico (85 mg, 0.37 mmol). Eluyente cromatografía: (75:25) acetato de etilo/hexano. Rendimiento: 42 mg (40%). Espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = +252.2° (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.75 (s, 1H, ArH), 7.43–7.37 (m, 10H, 10xArH), 7.21 (s, 1H, CH), 7.04 (s, 1H, $CHPh_2$), 7.04 (s, 1H, ArH), 7.02 (s, 1H, ArH), 5.80 (s, 1H, H5), 5.10 (s, 2H, CH_2), 4.66 (s, 1H, H2), 3.76 (s, 3H, NCH_3) y 1.15 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.8 (C), 165.7 (C), 144.3 (CH), 141.0 (C), 138.5 (C), 132.4 (CH), 129.1 (2×CH), 129.0 (CH), 128.9 (2×CH), 128.7 (CH), 127.7 (2×CH), 127.2 (2×CH), 125.0 (CH), 117.1 (CH), 80.1 (CH), 72.8 (CH), 66.3 (C), 60.3 (CH), 48.5 (CH_2), 33.1 (CH_3) y 15.8 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1765 (CO) y 1686 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 560 (MH^+). EMAR calcd para $C_{27}H_{26}N_7O_5S$ (MH^+): 560.1711; encontrado, 560.1704.

4.2.39 Compuesto 186

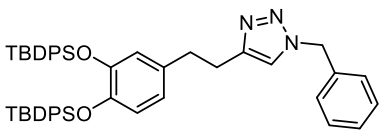


186

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **52a**, empleando: el sulfuro **185** (9 mg, 16.07 µmol), *m*-cresol (0.1 mL), disolución acuosa de $NaHCO_3$ (1 mL, 23 mM). Rendimiento: 5.2 mg (80%). Espuma marrón. $[\alpha]_D^{20}$ = +181.8° (*c* 0.5, H_2O). ^1H RMN (300 MHz, D_2O) δ: 9.41 (s, 1H, ArH), 7.59 (s, 1H, ArH), 7.37 (s, 1H, ArH), 7.25 (s, 1H, ArH), 6.02 (s, 1H, H5), 5.35 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, C*H*H), 5.21 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, CH*H*), 4.63 (s, 1H, H2), 3.89 (s, 3H, CH_3) y 1.62 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, D_2O) δ: 170.5 (C), 145.6 (C), 141.0 (C), 131.3 (CH), 126.5 (C), 126.2 (CH), 118.6 (CH), 71.9 (CH), 67.1 (CH), 62.4 (CH), 48.7 (CH_2), 32.8 (NCH_3) y 15.7 (CH_3). IR (ATR): 761 (CO) y 1619 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 393 (M−Na). EMAR calcd para $C_{15}H_{15}N_7O_5S$ (M−Na): 393.0861; encontrado, 393.0846.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.40 Compuesto 187

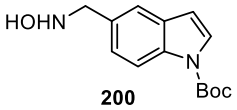


187

Se preparó siguiendo el procedimiento experimental descrito para el compuesto **177**, empleando: bencil azida (21 mg, 0.15 mmol), tetrahidrofurano (0.7 mL), alquino **173** (100 mg, 0.15 mmol), y disoluciones acuosas de ascorbato sódico (0.6 mL, 0.32 M) y sulfato de cobre (0.5 mL, 0.32 M). Eluyente cromatografía: (50:50) dietil éter/hexano. Rendimiento: 66 mg (54%). Aceite incoloro. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.81 (t, *J* =7.9 Hz, 8H, 8×ArH), 7.45–7.32 (m, 16H, 16×ArH), 7.14–7.11 (m, 1H, ArH), 6.62 (s, 1H, ArH), 6.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 6.29 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.09 (dd, *J* = 2.2 y 8.2 Hz, 1H, ArH), 5.34 (s, 2H, NCH_2), 2.43 (s, 4H, 2×CH_2) y 1.17 (s, 18H, 6×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 147.8 (C), 146.0 (C), 144.4 (C), 135.7 (12×CH), 135.1 (C), 133.5 (3×C), 133.4 (2×C), 130.0 (2×CH), 129.9 (CH), 129.1 (CH), 128.6 (CH), 127.9 (4×CH), 127.8 (4×CH), 120.9 (CH), 120.8 (CH), 120.5 (CH), 120.0 (CH), 53.8 (CH_2), 34.5 (CH_2), 27.0 (CH_2), 26.9 (2×SiC(CH_3)$_3$) y 19.6 (2×Si*C*(CH_3)$_3$) ppm. EM (ESI) *m/z* = 772 (MH^+). EMAR calcd para $C_{49}H_{54}N_3O_2Si_2$ (MH^+): 772.3749; encontrado, 772.3747.

4.3 Preparación de Inhibidores del Enzima Siquimato Quinasa

4.3.1 Compuesto 200

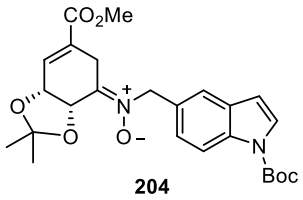


200

Una disolución de la oxima **199**[145] (168 mg, 0.64 mmol) en ácido acético (1.6 mL), a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se trató con cianoborohidruro sódico (49 mg, 0.77 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 1 h, y a continuación se concentró el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en una mezcla de acetato de etilo y agua. Se separó la fase acuosa y la fase orgánica se lavó con disolución saturada de $NaHCO_3$ y de NaCl, se secó (Na_2SO_4 anh.) y se concentró a presión reducida el disolvente. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (50:50) acetato de etilo/hexano, proporcionando la hidroxilamina **200** (82 mg, 49%), en forma de aceite incoloro. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.60 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, ArH), 7.49 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.26 (dd, *J* = 1.7 y 8.5 Hz, 1H, ArH), 6.54 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, ArH), 6.27 (s, 2H, NHOH), 4.08 (s, 2H, CH_2) y 1.69 (s, 9H, 3×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 149.7 (C), 134.8 (C), 131.0 (C), 130.8 (C), 126.4 (CH), 125.5 (CH), 121.7 (CH), 115.2 (CH), 107.3 (CH), 83.8 (C), 58.3 (CH_2) y 28.2 (3×CH_3) ppm. IR (ATR): 3263 (NH, OH) y 1729 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 263 (MH^+). EMAR calcd para $C_{14}H_{19}N_2O_3$ (MH^+): 263.1390; encontrado, 263.1387.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

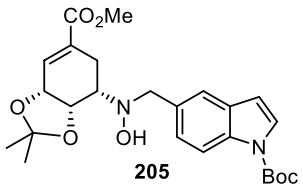
4.3.2 Compuesto 204



204

Una suspensión de la cetona **203**[143] (100 mg, 0.44 mmol), tamices moleculares 4 Å (100 mg) y acetato sódico anhidro (72 mg, 0.88 mmol) en metanol seco (2.2 mL), a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se trató con la hidroxilamina **200** (115 mg, 0.44 mmol). y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se filtró. El filtrado y los lavados se concentraron a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (75:25) dietil éter/hexano. Se obtuvo el compuesto **204** (114 mg, 55%) como un aceite amarillo. $[\alpha]_D^{20}$ = –87.5° (*c* 1.5, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.99 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.70 (s, 1H, ArH), 7.60 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 6.55 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H2), 5.68 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, C*H*HAr), 5.25 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, CH*H*Ar), 4.96 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H4), 4.51 (q, *J* = 3.7 Hz, 1H, H3), 3.77 (s, 3H, CH_3), 2.92 (dd, *J* = 3.9 y 18.6 Hz, 1H, C*H*H-6), 2.59–2.53 (m, 1H, CH*H*-6), 1.66 (s, 9H, 3×CH_3), 1.45 (s, 3H, CH_3) y 1.36 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 166.9 (C), 149.7 (C), 140.6 (C), 135.3 (C), 131.6 (C), 131.1 (C), 127.6 (C), 126.8 (2×CH), 124.8 (CH), 121.3 (CH), 115.5 (CH), 109.9 (C), 107.3 (CH), 84.1 (C), 73.0 (CH), 70.0 (CH), 66.3 (CH_2), 52.3 (CH), 29.8 (C), 28.3 (3×CH_3), 27.8 (CH_3), 26.8 (CH_2) y 26.5 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1730 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 471 (MH^+) EMAR calcd para $C_{25}H_{31}N_2O_7$ (MH^+): 471.2126; encontrado, 471.2131.

4.3.3 Compuesto 205



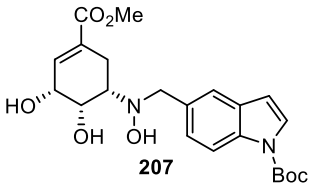
205

Este compuesto se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **200** utilizando: oxima **204** (80 mg, 0.17 mmol), ácido acético (0.4 mL) y cianoborohidruro sódico (13 mg, 0.2 mmol). Eluyente cromatografía: (50:50) acetato de etilo/hexano. Rendimiento = 98% (78 mg). Espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = +25.1° (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.57 (s, 2H, 2xArH), 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2xArH), 6.52 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H2), 5.88 (sa, 1H, OH), 4.71–4.68 (m, 1H, H3), 4.54–4.51 (m, 1H, H4), 4.27 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, NC*H*H), 4.05 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, NCH*H*), 3.76 (s, 3H, CH_3), 3.75 (s, 1H, H5), 3.12 (m, 1H, C*H*H-6), 3.03 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, CH*H*-6), 1.65 (s, 9H, 3×CH_3), 1.31 (s, 3H, CH_3) y 1.28 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 166.2 (C), 149.8 (C), 137.5 (CH), 134.7 (C), 131.1 (C), 130.7 (C), 129.8 (C), 126.3 (CH), 126.1 (CH), 122.1 (CH), 115.0 (CH), 109.1 (C), 107.3 (CH), 83.8 (C), 76.4 (CH), 73.6 (CH), 63.4 (CH),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

61.5 (CH_2), 51.9 (CH), 28.2 (3×CH_3), 27.3 (CH_2), 25.9 (CH_3) y 24.2 (CH_3) ppm. IR (ATR): 3452 (OH) y 1729 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* =473 (MH^+). EMAR calcd para $C_{25}H_{33}N_2O_7$ (MH^+): 473.2282; encontrado, 473.2271.

4.3.4 Compuesto 207



207

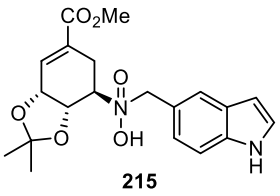
Una disolución del acetal **205** (93 mg, 0.19 mmol) en etanol (1.3 mL) y HCl (54 µL, 6 M), se calentó a 60 ºC durante 4 h. Después de enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se concentró a presión reducida el disolvente y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (3:97) metanol/diclorometano. Se obtuvo el diol **207** (38 mg, 45%), en forma de espuma blanca. $[\alpha]_D^{20}$ = +33.1° (*c* 1.4, MeOH). ^{1}H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.10 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.65 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.62 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, ArH), 7.41 (dd, *J* = 1.8 y 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.08 (s, 1H, H2), 6.62 (dd, *J* = 0.8 y 3.7 Hz, 1H, ArH), 4.42 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H, H4), 4.30 (d, *J* = 13.2 Hz, NC*H*H), 4.19 (d, *J* = 13.2 Hz, NCH*H*), 3.81 (m, 1H, H5), 3.79 (s, 3H, CH_3), 3.61 (sept, *J* = 2.0 Hz, 1H, H3), 2.62 (dd, *J* = 6.0 y 17.0 Hz, C*H*H-6), 2.51–2.44 (m, 1H, CH*H*-6) y 1.71 (s, 9H, 3×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 168.5 (C), 151.1 (C), 137.7 (CH), 135.9 (C),133.6 (C), 132.0 (C), 130.9 (C), 127.0 (CH), 126.9 (CH), 122.9 (CH), 115.6 (CH), 108.4 (CH), 84.9 (C), 71.2 (CH), 70.0 (CH), 66.2 (CH), 62.1 (CH_2), 52.3 (CH_3), 29.6 (CH_2) y 28.3 (3×CH_3) ppm. IR (ATR): 3366 (OH) and 1723 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 433 (MH^+). EMAR calcd para $C_{22}H_{29}N_2O_7$ (MH^+): 433.1969; encontrado, 433.1953.

4.3.5 Oxidación de la Amina 214

Una disolución de dimetil dioxirano (DMDO) (11 mL, 0.65 mmol), bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se trató con trifenilfosfina (47 mg, 0.18 mmol) y se agitó durante 10 min. A continuación, la mezcla se enfrió a –45 ºC y se trató con una disolución de la amina **214** (105 mg, 0.29 mmol) en acetona (2 mL). Tras 10 min a esa temperatura, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua y se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (×2). Los extractos orgánicos se juntaron, se secaron (Na_2SO_4 anh.), se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (60:40) dietil éter/hexano, proporcionando los compuestos **215** (11 mg, 10%, espuma beige), **216** (59.3 mg, 54%, espuma blanca) y **217** (39.5 mg, 36%, sólido rosa).

USC DE COMPOSTELA

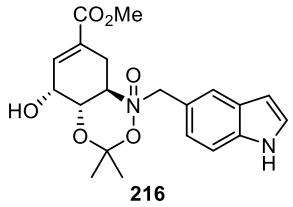
4.3.5.1 Datos compuesto 215



215

$[\alpha]_D^{20}$ = –96.1° (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.27 (s, 1H, NH), 7.61 (s, 1H, ArH), 7.27 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.19 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, ArH), 7.14 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H, ArH), 6.84 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H2), 6.48 (s, 1H, ArH), 4.59 (s, 1H, H3), 4.41 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H4), 4.20 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, NC*H*H), 4.12 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, NCH*H*), 3.74 (s, 3H, CH_3), 3.00–2.92 (m, 1H, H5), 2.84 (dd, *J* = 4.9 y 17.5 Hz, 1H, C*H*H-6), 2.50–2.41 (m, 1H, CH*H*-6), 1.37 (s, 3H, CH_3), y 1.32 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, $CDCl_3$) δ: 166.9 (C), 135.4 (C), 133.9 (CH), 132.3 (C), 128.5 (C), 128.0 (C), 124.6 (CH), 123.9 (CH), 121.8 (CH), 111.0 (CH), 109.1 (C), 102.6 (CH), 73.8 (CH), 72.5 (CH), 62.3 (CH_2), 61.8 (CH), 52.1 (CH_3), 27.9 (CH_3), 25.8 (CH_3) y 22.2 (CH_2) ppm. IR (ATR): 3392 (NH, OH) and 1712 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 373 (M–CH_4). EMAR calcd para $C_{19}H_{21}N_2O_6$ (M–CH_4): 373.1758; encontrado, 373.1758.

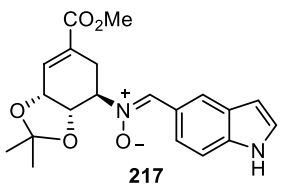
4.3.5.2 Datos compuesto 216



216

$[\alpha]_D^{20}$ = –78.4° (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.26 (s, 1H, NH), 7.61 (s, 1H, ArH), 7.28 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.15 (t, *J* = 3.0 Hz, 1H, ArH), 6.85 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, ArH), 6.48 (s, 1H, H2), 6.04 (sa, 1H, OH), 4.59 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, H3), 4.40 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H4), 4.19 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, NC*H*H), 4.11 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, NCH*H*), 3.74 (s, 3H, CH_3), 2.97–2.92 (m, 1H, H5), 2.84 (dd, *J* = 4.8 y 17.4 Hz, 1H, C*H*H-6), 2.49–2.43 (m, 1H, CH*H*-6), 1.37 (s, 3H, CH_3) y 1.32 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 166.7 (C), 135.1 (C), 133.6 (CH), 132.1 (C), 128.4 (C), 127.7 (C), 124.3 (CH), 123.6 (CH), 121.5 (CH), 110.7 (C), 108.8 (CH), 102.4 (CH), 73.6 (CH), 72.3 (CH), 62.1 (CH_2), 61.5 (CH), 51.9 (CH_3), 27.6 (CH_3), 25.6 (CH_3) y 21.9 (CH_2) ppm. IR (ATR): 3384 (NH, OH) and 1709 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 373 (M–CH_4). EMAR calcd para $C_{19}H_{21}N_2O_6$ (M–CH_4): 373.1758; encontrado, 373.1760.

4.3.5.3 Datos compuesto 217



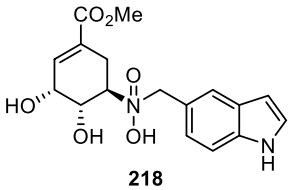
217

$[\alpha]_D^{20}$ = –31.3° (*c* 1.0, $(CH_3)_2CO$). Pf: 221.7–222.2 ºC. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.95 (s, 1H, CH), 8.32 (sa, 1H, NH), 7.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.54 (s, 1H, ArH), 7.41 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.24 (s, 1H, ArH), 7.03 (s, 1H, ArH), 6.61 (s, 1H, H2), 4.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H3), 4.89 (m, 1H, H4), 3.93 (m, 1H, H5), 3.79 (s, 3H, CH_3), 3.01–2.99 (m, 2H, CH_2), 1.52 (s, 3H, CH_3) y 1.40 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$(CD_3)_3CO$) δ: 166.4 (C), 136.3 (CH), 133.7 (CH), 132.4 (C), 128.5 (C), 126.6 (CH), 123.8 (C), 123.7 (CH), 122.3 (CH), 111.7 (CH), 110.0 (C), 103.3 (CH), 74.3 (CH), 73.8 (CH), 72.6 (CH), 52.2 (CH_3), 28.1 (CH_3), 28.0 (CH_2) y 25.5 (CH_3) ppm. IR (ATR): 3236 (NH) y 1719 (CO). EM (ESI) *m/z* = 371 (MH^+). EMAR calcd para $C_{20}H_{23}N_2O_5$ (MH^+): 371.1601; encontrado, 371.1606.

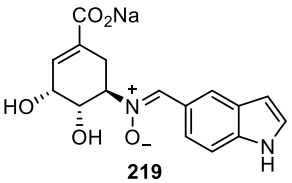
4.3.6 Compuesto 218



218

Una disolución del acetal **216** (27 mg, 72 µmol) en ácido acético acuoso (7.2 mL, 50%) se calentó a 66 ºC durante 18 h. Después de enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se concentró a presión reducida el disolvente y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente (75:25) acetato de etilo/hexano, proporcionando el diol **218** (16 mg, 76%) como espuma beige. $[\alpha]_D^{20}$ = –86.3° (*c* 1.5, MeOH). ^{1}H RMN (500 MHz, CD_3OD) δ: 7.57 (s, 1H, ArH), 7.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.21 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, ArH), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH), 6.83 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, ArH), 6.42 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, H2), 4.40 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H, H3), 4.14 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, NC*H*H), 3.97 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, NCH*H*), 3.86 (dd, *J* = 3.9 y 9.2 Hz, 1H, H4), 3.77 (s, 3H, CH_3), 3.21 (m, 1H, H5) y 2.75–2.64 (m, 2H, CH_2-6) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz, CD_3OD) δ: 168.8 (C), 137.4 (C), 137.0 (CH), 132.4 (C), 129.5 (C), 129.3 (C), 125.8 (CH), 124.1 (CH), 122.1 (CH), 111.8 (CH), 102.3 (CH), 70.5 (CH), 66.8 (CH), 62.9 (CH_2), 52.5 (CH_3) y 23.1 (CH_2) ppm. IR (ATR): 3368 (OH, NH) y 1703 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* =333 (M–CH_4). EMAR calcd para $C_{16}H_{17}N_2O_6$ (M–CH_4): 333.1445; encontrado, 333.1446.

4.3.7 Compuesto 219



219

Una disolución del éster **218** (32 mg, 96 µmol) en THF (1 mL) a temperatura ambiente, se trató con una disolución acuosa de hidróxido de sodio (0.4 mL, 0.5M) y se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua Milli-Q y se concentró el THF a presión reducida. La disolución acuosa obtenida se lavó con dietil éter (×2). El extracto acuoso se liofilizó, y el crudo obtenido se purificó mediante columna de MCI GEL® CHP2OP (Mitsubishi Chemical Corporation) usando agua Milli-Q como eluyente, proporcionando el ácido **219** (15 mg, 56%) como espuma amarilla. ^{1}H RMN (300 MHz, D_2O) δ: 8.76 (s, 1H, ArH), 8.01 (s, 1H, CH), 7.96 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, ArH), 7.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.46 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, ArH), 6.70 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H2), 6.55 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, ArH), 4.45 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, H3), 4.38–4.29 (m, 1H, H5),

4.21 (dd, *J* = 4.0 y 10.9 Hz, 1H, H4), 3.02–2.94 (m, 1H, C*H*H-6) y 2.82 (dd, *J* = 5.5 y 17.1 Hz, 1H, CH*H*-6) ppm. ^{13}C RMN (63 MHz, D_2O) δ: 174.6 (C), 143.4 (CH), 137.7 (C), 136.5 (C), 129.4 (CH), 127.4 (C), 127.3 (CH), 124.2 (CH), 124.1 (CH), 120.4 (C), 111.8 (CH), 102.7 (CH), 71.1 (CH), 68.3 (CH), 65.7 (CH), 29.4 y (CH_2) ppm. IR (ATR): 3278 (OH) y 1550 (CO) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 315 (M–Na). EMAR calcd para $C_{16}H_{15}N_2O_5$ (M–Na): 315.0986; encontrado, 315.0989.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

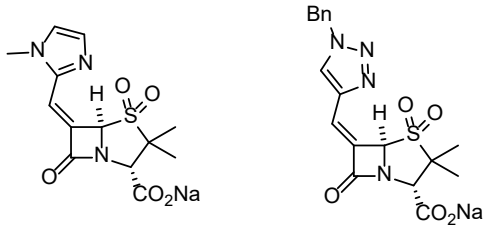
5. Conclusiones

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. Conclusiones

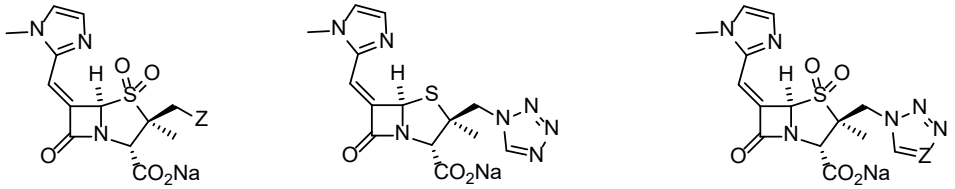
(1) Se ha logrado la síntesis de los compuestos **52a** y **52b** en seis etapas a partir del ácido (+)-6-aminopenicilánico (**59**) comercialmente disponible (Figura 5.1). De las tres rutas sintéticas exploradas, cuyas etapas claves comprenden: (i) una reacción de Wittig; (ii) una reacción de acoplamiento cruzado carbono-carbono tipo Stille; y (iii) una reacción de adición nucleófila a un grupo carbonilo, seguido de reducción eliminatoria; esta última (iii) demostró ser la ruta más efectiva, proporcionando los compuestos **52a** y **52b** en buen rendimiento.



52a **52b**

Figura 5.1

(2) Se ha desarrollado una metodología sintética robusta para la síntesis de las sulfonopenicilinas del tipo **53** funcionalizadas con un átomo de nitrógeno y cloruro en su grupo metilo pro-*R*, en concreto, se preparó la azida **163**, el triazol **184**, el tetrazol **186**, el cloruro **161**, además de la penicilina **182** (Figura 5.2). De entre los distintos métodos de funcionalización estudiados, la sustitución nucleófila del cloruro **154** con un triazol o tetrazol demostró ser la más satisfactoria y versátil.



161 Z = Cl
163 Z = N_3

182

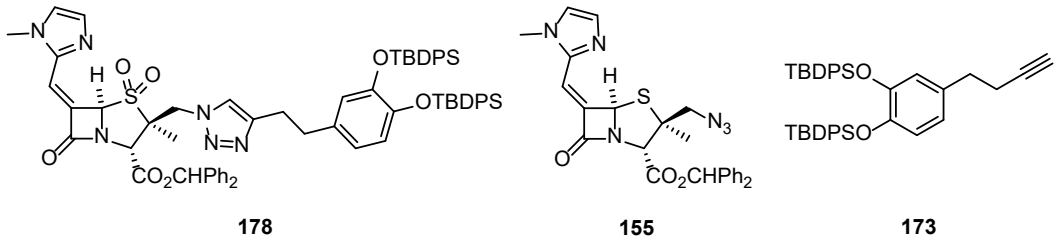
184 Z ≡ CH
186 Z ≡ N

Figura 5.2

(3) Se ha logrado la preparación de un precursor avanzado de las sulfonopenicilinas **53** que incorporan un grupo sideróforo, el compuesto **178**, mediante la funcionalización selectiva del grupo metilo pro-*R* con un grupo azida,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

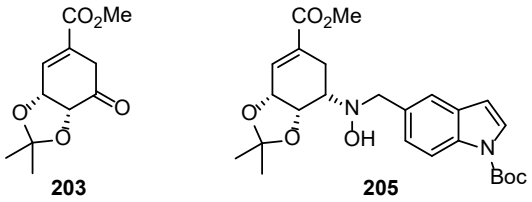
compuesto **155**, y ciclación 1,3-dipolar con el alquino terminal **173**, que se preparó en cuatro etapas a partir del ácido **165** (Figura 5.3).



178 **155** **173**

Figura 5.3

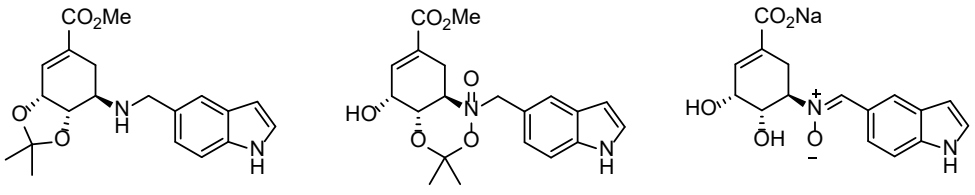
(4) La estrategia sintética desarrollada para la preparación del compuesto objetivo **54**, potencial inhibidor del enzima siquimato quinasa, mediante aminación reductora entre la cetona **203** previamente descrita y la hidroxilamina **200**, preparada en tres etapas a partir del aldehído **197**, conduce al derivado **205** que posee la estereoquímica contraria a la deseada (Figura 5.4).



203 **205**

Figura 5.4

(5) La oxidación selectiva del grupo amino en el compuesto **214**, obtenido en seis etapas a partir del ácido siquímico siguiendo procedimientos previamente descritos, por tratamiento con DMDO conduce, fundamentalmente, a la sobreoxidación del grupo amino y la migración del grupo acetal, proporcionando el compuesto **216** (Figura 5.5). Dicha sobreoxidación favorece reacciones de β-eliminación, en las etapas finales de desprotección del grupo ester, y la obtención del compuesto **219** en lugar del compuesto objetivo **54**.



214 **216** **219**

Figura 5.5

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. Bibliografía

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

(1) Fleming, A. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226–236.

(2) Rochford, C.; Sridhar, D.; Wood, N.; Saleh, Z.; Hartenstein, L.; Ahlawat, H.; Whiting, E.; Dybul, M.; Cars, O.; Goosby, E.; Cassels, A.; Velasquez, G.; Hoffman, S.; Baris, E.; Wadsworth, J.; Gyansa-Lutterodt, M.; Davies, S. *The Lancet* **2018**, *391*, 1976–1978.

(3) 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.

(4) Abraham, E. P.; Chain, E. *Nature* **1940**, *146*, 837.

(5) Chemaly, R. F.; Simmons, S.; Dale, C.; Ghantoji, S. S.; Rodríguez, M.; Grubb, J.; Stachowiak, J.; Stibich, M. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **2014**, *2*, 79–90.

(6) Chakraborty, N.; Jha, D.; Roy, D.; Kumar, P.; Singh-Gaurav, S.; Marinuthu, K.; Ng, O. T.; Lakshminarayanan, R.; Kumar-Verma, N.; Gautam, H. K. *J. Nanobiotech.* **2022**, *20*, 375.

(7) Tocconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D. L. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327.

(8) Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* **2022**, *399*, 629–655.

(9) Vikesland, P.; Garner, E.; Gupta, S.; Kang, S.; Maile-Moskowitz, A.; Zhu, N. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 916–924.

(10) WHO. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery and Development of New Antibiotics. **2017**. (https://remed.org/wp-content/uploads/2017/03/lobal-priority-list-of-antibiotic-resistant-bacteria-2017.pdf) (último acceso el 27 de septiembre 2023).

(11) Prioritization of Pathogens to Guide Discovery, Research, and Development of New Antibiotics for Drug Resistant Bacterial Infections, Including Tuberculosis. Geneva: World Health Organization; **2017**, (WHO/EMP/IAU/2017.12).

(12) Silver, L. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 6379–6389.

(13) Sheu, C. C.; Chang, Y. T.; Lin, S. Y.; Chen, Y. H.; Hsueh, P. R. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 80.

(14) Walsh, C. *Nature*, **2000**, *406*, 775.

(15) Etebu, E.; Arikekpar, I. *Int. J. Appl. Biotechnol. Res.* **2016**, *4*, 90–101.

(16) Poirel, L.; Jayol, A.; Nordmann, P. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 557–596.

(17) Rios, A. C.; Moutinho, C. G.; Pinto, F, C.; Del Fiol, F. S.; Jozala, A.; Chaud, M. V.; Vila, M. M. D. C.; Teixeira, J. A.; Balcão. *Microbiol. Research* **2016**, *191*, 51–80.

(18) Dickey, S. W.; Cheung, G. Y. C.; Otto, M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 457–471.

(19) Buroni, S.; Chiarelli, L. R. *Future Microbiol.* **2020**, *15*, 299–301.

(20) Qadri, H.; Shah, A. H.; Alkhanani, M.; Almilaibary, A.; Mir, M. A. *Front. Med.* **2023**, *10*, 1135541.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(21) Tarín-Pelló, A.; Suay-García, B.; Pérez-García, M. T. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2020**, *20*, 1095–1108.

(22) Chang, M.; Mahasenan, K. V.; Hermoso, J. A.; Mobashery, S. *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 917–929.

(23) Si, Z.; Pethe, K.; Chan-Park, M. B. *JACS Au,* **2023**, *3*, 276–292.

(24) Bush, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01076-18.

(25) Anderson, R. J.; Groundwater, P. W.; Todd, A.; Worsley, A. J. *Antibacterial agents, mode of action, mechanisms of resistance and clinical applications*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, 2012.

(26) (a) Dhara, A. K.; Nayak, A. K.; Chattopadhyay, D. Antibiotics: Therapeutic Spectrum and Limitations. Elsevier Sciences: London & Oxford (UK); San Diego & Cambridge (USA), 2023. (b) Bush, K.; Bradford, P. A.; *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, 025247. (c) Toth, M.; Antunes, N. T.; Stewart, N. K.; Frase, H.; Bhattacharya, M.; Smith, C. A.; Vakulenko, S. B. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 9.

(27) (a) Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R. A.; Dabos, M. L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P.; Iorga, B. I. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 917–919. (b) BLDB. Beta-Lactamase DataBase – Structure and Function. http://www.bldb.eu/. (Último acceso el 14 de diciembre de 2023).

(28) Ambler, R. P.; Coulson, A. F.; Frere, J. M.; Ghuysen, J M.; Joris, B.; Forsman, M.; Levesque, R. C.; Tiraby, G.; Waley, S. G. *Biochem. J.* **1991**, *276*, 269–270.

(29) Meini, M. R.; Llarrull, L. I.; Vila, A. J. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 3419–3432.

(30) Lence, E.; González-Bello, C. *Adv. Therap.* **2021**, *4*, 2000246.

(31) González-Bello, C.; Rodríguez, D.; Pernas, M.; Rodríguez, A.; Colchón, E. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 1859–1881.

(32) 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.

(33) 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 den Akker, F.; Bonomo, R. A.; Romero, A.; Buynak, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13320–13331.

(34) Kaitany, K. C. J.; 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.

(35) Vázquez-Ucha, J. C.; Arca-Suárez, J.; Bou, G.; Beceiro, A. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9308.

(36) Arer, V.; Kar, D. *Front. Genet.* **2023**, *13*, 1060736.

(37) Coleman, K. *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, *14*, 550–555.

(38) 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.

(39) Lagacé-Wiens, P.; Walkty, A.; Karlowsky, J. A. *Core. Evid.* **2014**, *9*, 1555.

(40) Krishnan, N. P.; Nguyen, N. Q.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A.; van den Akker, F. *PLoS One*. **2015**, *10*, e0136813.

(41) King, D. T.; King, A. M.; Lal, S. M.; Wright, G. D.; Strynadka, N. C. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 175−184.

(42) (a) Abuhussain, S. S. A.; Avery, L. M.; Abdelraouf, K.; Nicolau, D. P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01931-18. (b) Livermore, D. M.; Mushtaq, S.; Warner, M.; Vicker, A.; Woodford, N. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 1373−1385. (c) Thomson, K. S.; AbdelGhani, S.; Snyder, J. W.; Thompson, G. K. *Antibiotics* **2019**, *8*, 32.

(43) Durand-Réville, T. F.; Guler, 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.

(44) Veeraraghavan B.; Bakthavatchalam Y. D.; Sahni R. D. *Infect. Dis. Ther.* **2021**, *10*, 1815−1835.

(45) Gilbert, N. *Nature*. **2018**, *555*, S5−S7.

(46) Durand-Réville, T. F.; Comita-Prevoir, J.; Zhang, J.; Wu, X.; May-Dracka, T. L.; Romero, J. A. C.; Wu, F.; Chen, A.; Shapiro, A. B.; Carter, N. M.; McLeod, S. M.; Giacobbe, R. A.; Verheijen, J. C.; Lahiri, S. D.; Sacco, M. D.; Chen, Y.; O'Donnell, J. P.; Miller, A. A.; Mueller, J. P.; Tommasi, R. A. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 12511−12525.

(47) 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.

(48) Snoum, R.; Rubinstein, A.; Dembitsky, V. M.; Srebnik, M. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4156−4220.

(49) Dobozy, O.; Mile, I.; Ferencz, I.; Csanyi, V. *Acta Biochim. Acad. Sci. Hung.* **1971**, *6*, 97−105.

(50) Kiener, P. A.; Waley, S. G. *Biochem.* **1978**, *169*, 197−204.

(51) Beesley, T.; Gascoyne, N.; Knott-Hunziker, V.; Petursson, S.; Waley, S. G.; Jaurin, B.; Grundström, T. *Biochem.* **1983**, *209*, 229−233.

(52) Strynadka, N. C.; Adachi, H.; Jensen, S. E.; Johns, K.; Sielecki, A.; Betzel, C.; Sutoh, K.; James, M. N. *Nature*, **1992**, *359*, 700−705.

(53) Martin, R.; Jones, J. B. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8394−8402.

(54) 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.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(55) Eidam, O.; Romagnoli, C.; Dalmasso, G.; Barelier, S.; Caselli, E.; Bonnet, R.; Schoichet, B. K.; Prati, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2012**, *109*, 17448–17453.

(56) 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.

(57) Krajnc, A.; Lang, P. A.; Panduwawala, T. D.; Brem, J.; Schofield, C. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *50*, 101–110.

(58) (a) 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. (b) Burns, C. J.; Daigle, D.; Li, B.; McGarry, D.; Pevear, D. C.; Trout, R. E. L. US8912169B2, December 7, 2012.

(59) 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**, *14*, 7491–7507.

(60) (a) Burns, J.; Trout, R.; Zulli, A.; Mesaros, E.; Jackson, R.; Boyd, S.; Liu, B.; McLaughlin, L.; Chatwin, C.; Hamrick, J.; Daigle, D.; Pevear, D. *257th National Meet. Exposition of the American Chemical Society, Orlando, FL, U.S., March 31–April 4, 2019,* American Chemical Society, Washington, DC **2019**. (b) Hamrick, J.; Chatwin, C.; John, K.; Burns, C.; Xerri, L.; Moeck, G.; Pevear, D. *29th ECCMID, Amsterdam, The Netherlands, April 13–16, 2019*, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Switzerland **2019**.

(61) Nelson, K.; Rubio-Aparicio, D.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Totrov, M.; Dudley, M.; Lomovskaya, O. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e1406–e1420.

(62) Sabet, M.; Tarazi, Z.; Griffith, D. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e01267–20.

(63) Lence, E.; González-Bello, C. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 721826.

(64) Widhalm, J. R.; Dudareva, N. *Mol. Plant.* **2015**, *8*, 83–97.

(65) Almeida, A. M.; Marchiosi, R.; Abrahão, J.; Constantin, R. P.; dos Santos, D. W.; Ferrarese-Filho, O. *Phytochem Rev.* **2023**. doi: 10.1007/s11101-023-09889-6.

(66) Abell, C. Enzymology and Molecular Biology of the Shikimate Pathway, In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Sankawa, U. Ed.; Pergamon, Elsevier Science Ltd.: Oxford, **1999**, *1,* 573–607.

(67) Lamichhane, G.; Freundlich, J. S.; Ekins, S.; Wickramaratne, N.; Nolan, S. T.; Bishai, W. R. *mBio* **2011**, *2*, e00301– e00310.

(68) González-Bello, C. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 960–977.

(69) Pereira, J. H.; Vasconcelos, I. B.; Oliveira, J.; Caceres, R. A.; de Azevedo, W. F. Jr.; Basso, L. A.; Santos, D. S. *Current Drug Targets* **2007**, *8*, 459–468.

(70) Gordon, S.; Simithy, J.; Goodwin, D. C.; Calderón, A. I. *Persp. Med. Chem.* **2015**, *7*, 9–20.

(71) Base de datos de genes esenciales: http://www.essentialgene.org/

(72) Marchiosi, R.; dos Santos, W. D.; Constantin, R. P.; de Lima, R. B.; Soares, A. R.; Finger-Teixeira, A.; Mota, T. R.; de Oliveira, D. M.; Foletto-Felipe, M. D.; Abrahão, J.; Ferrarese-Filho, O. *Phytochem. Rev.* **2020**, *19*, 865–906.

(73) Prado, V.; Lence, E.; Vallejo, J. A.; Beceiro, A.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2758–2768.

(74) Krell, T.; Coggins, J. R.; Lapthorn, A. J. *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 983.

(75) Dhaliwal, B.; Nichols, C. E.; Ren, J.; Lockyer, M.; Charles, I.; Hawkins, A. R.; Stammers, D. K. *FEBS Lett.* **2004**, *574*, 49.

(76) Cheng, W. C.; Chen, Y. F.; Wang, H. J.; Hsu, K. C.; Lin, S. C.; Chen, T. J.; Yang, J. M.; Wang, W. C. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e33481.

(77) Krell, T.; Maclean, J.; Boam, D. J.; Cooper, A.; Resmini, M.; Brocklehurst, K.; Kelly, S. M.; Price, N. C.; Lapthorn, A. J.; Coggins, J. R. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1137–1149.

(78) Dhaliwal, B.; Nichols, C. E.; Ren, J.; Lockyer, M.; Charles, I.; Hawkins, A. R.; Stammers, D. K. *FEBS Lett.* **2004**, *574*, 49–54.

(79) Gu, Y.; Reshentnikova, L.; li, Y.; Wu, Y.; Yan, H.; Singh, S.; Ji, X. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 779–789.

(80) Hartmann, M. D.; Bourenkov, G. P.; Oberschall, A.; Strizhov, N.; Bartunik, H. D. *J. Mol. Biol.* **2006**, *364*, 411– 423.

(81) Cheng, W. C.; Chang, Y. N.; Wang, W. C. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 8156–8163.

(82) Blanco, B.; Prado, V.; Lence, E.; Otero, J. M.; García-Doval, C.; Van Raaij, M. J.; Llamas-Saiz, A. L.; Lamb, H.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12366-12376.

(83) Rajput, V. S.; Runthala, A.; Khan, I. A. *Curr. Drug Targets* **2023**, *24*, 388–405.

(84) Pernas, M.; Blanco, B.; Lence, E.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 2514.

(85) Bandodkar, B. S.; Schmitt, S. *WO/2007/020426 A1. February 22, **2007**.

(86) Mulabagal, V.; Calderon, A. I. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3616–3621.

(87) Simithy, J.; Reeve, N.; Hobrath, J.V.; Reynolds, R.C. *Tuberculosis,* **2014**, *94*, 152-158.

(88) Simithy, J.; Fuanta, N. R.; Alturki, M.; Hobrath, J. V.; Wahba, A. E.; Pina, I.; Rath, J.; Hamann, M. T.; DeRuiter, J.; Goodwin, D. C.; Calderón, A. I. *Biochem.* **2018**, *57*, 4923–4933.

(89) Mehra, R.; Rajput, V.S.; Gupta, M.; Chib, R.; Kumar, A.; Wazir, P.; Khan, I. A.; Nargotra, A. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 930–940.

(90) Han, C.; Zhang, J.; Chen, L.; Chen, K.; Shen, X.; Jiang, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 656-662.

(91) Reading, C.; Cole, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 852–857.

(92) Brown, A. G. *Drug Des. Delivery* **1986**, *1*, 1–21.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(93) English, A. R.; Retsema, J. A.; Girard, A. E.; Lynch, J. E.; Barth, W. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1978**, *14*, 414–419.

(94) 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.

(95) (a) Micetich, R. G.; Maiti, S. N.; Spevak, P.; Hall, T. W.; Yamabe, S.; Ishida, N.; Tanaka, M.; Yamazaki, T.; Nakai, A.; Ogawa, K. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1469–1474. (b) Aronoff, S. C.; Jacobs, M. R.; Johenning, S.; Yamabe, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1984**, *26*, 580–582.

(96) Crandon, J. L.; Nicolau, D. P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 2688–2694.

(97) 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.

(98) Palanisamy, S. U.; Paul-Satyaseela, M.; Narayanan, S.; Balasubramanian, G.; Appu, A.; Manickam, S.; Periasamy, H. WO 2012070071, Nov 25, 2010.

(99) Chen, Y. L.; Chang, C. W.; Hedberg, K. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3449–3452.

(100) Buynak, J. D *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1951–1964.

(101) 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.; van den Akker, F.; Bonomo, R. A.; Romero, A.; Buynak, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13320–13331.

(102) Vázquez-Ucha, J. C.; Maneiro, M.; Martínez-Guitián, M.; Buynak, J. D.; Bethel, C. R.; Bonomo, R. A.; Bou, G.; Poza, M.; González-Bello, C.; Beceiro, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01172-17.

(103) Vallejo, J. A.; Martínez-Guitián, 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**, *71*, 2171–2180.

(104) Vázquez-Ucha, J. C.; Martínez-Guitián, M.; Maneiro, M.; Conde-Perez, K.; Álvarez-Fraga, L.; Torrens, G.; Oliver, A.; Buynak, J.D.; Bonomo, R. A.; Bou, G.; González-Bello, C.; Poza, M.; Beceiro, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01092-19.

(105) Rodríguez, D.; Maneiro, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; Beceiro, A.; González-Bello, C. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 3737–3755.

(106) Vázquez-Ucha, J. C.; Rodríguez, D.; Lasarte-Monterrubio, C.; Lence, E.; Arca-Suarez, J.; Maneiro, M.; Gato, E.; Perez, A.; Martínez-Guitián, M.; Oliver, J. A.; Bou, G.; González-Bello, C.; Beceiro, A. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 6310–6328.

(107) Coleman, K.; Griffin, D. R. J.; Page, J. W. J.; Upshon, P. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 1580–1587.

(108) Osborne, N. F.; Broom, N. J. P.; Coulton, S.; Harbridge, J. B.; Harris, M. A.; Stirling-François, I.; Walker, G. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 371–373.

(109) Hauser, D.; Sigg, H. P. *Helv. Chim. Acta.* **1967**, *50*, 1327–1335.

(110) Chen, Y. L.; Chang, C. W.; Hedberg, K.; Guarino, K.; Welch, W. M.; Kiessling, L. Retsema, J. A.; Haskell, S. L.; Anderson, M.; Manousos, M.; Barret, J. F. *J. Antibiot.* **1987**, *6*, 803–822.

(111) Buynak, J. D.; Rao, A. S.; Doppalapudi, V. R. Patent WO99/33838, July 8, 1999.

(112) Pattanaik, P.; Bethel, C. R.; Hujer, A. M.; Hujer, K. M.; Distler, A. M.; Taracilla, M.; Anderson, V. E.; Fristche, T. R.; Jones, R. N.; Pagadala, S. R. R.; vander Akker, F.; Buynak, J. D.; Bonomo, R. A. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 945–953.

(113) Klein, R. S.; Heras de Las, P. G.; Tam, S. Y. K.; Wempem, I.; Fox, J. J. *J. Het. Chem.* **1976**, *13*, 589.

(114) Kidwai, M.; Jain, A. *Appl. Organometal. Chem.* **2011**, *15*, 620.

(115) Berdini, V.; Buck, I. M.; Day, J. E. H.; Griffiths-Jones, C. M.; Heightman, T. D.; Howard, S.; Murray, C. W.; Norton, D. O'Reilly, M.; Woolford, A. J. WO2017068412 A1, 2017.

(116) Baker, S. J.; Goldsmith, P. J.; Hancox, T. C.; Pegg, N. A.; Price, S.; Shuttleworth, S. J.; Sohal, S. WO2007122410 A1, 2007.

(117) Kikelj, D.; Urleb, U. *Science of Synthesis* **2002**, *11*, 627–833.

(118) Hartey, C. D.; Mordaunt, J. E.; Shah, P.; Slater, M. J. WO2007088148 A1, 2007.

(119) Buynak, J. D.; Doppalapudi, V. R.; Frotan, M.; Kumar, R.; Chambers, A. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 5709–5718.

(120) (a) O'Connell, J. F.; Parquette, J.; Yelle, W. E.; Wang, W.; Rapoport, H. *Synthesis* **1988**, *10*, 767-71. (b) Ebright, R. H.; Ebright, Y. W.; Shen, J.; Bacci, J.; Hiebel, A. C.; Solvibile, W.; Self, C.; Olson, G. WO2013192352 A1 2013. (c) Zhao, B.; Zhang, M.; Yu, H.; Yang, S.; Chen, Z.; Xu, Y. WO2018214867 A1 2018.

(121) (a) Grubb, A. M.; Schmidt, M. J.; Seed, A. J.; Sampson, P. *Synthesis* **2012**, *44*, 1026-1029. (b) Uzelac, E. J.; Rasmussen, S. C. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 5947-5951. (c) Han, Y.; Siliphaivanh, P.; Spencer, K.; Tummanapalli, S. *World Int. Prop. Org.* WO2017095725 A1, 2017.

(122) (a) Lei, M.; Hu, R.; Wang, Y.; Zhang, H. *Heterocycles* **2014**, *88*, 1511-1517. (b) Aebi, J.; Binggeli, A.; Green, L.; Hartmann, G.; Maerki, H. P.; Mattei, P.; Ricklin, F.; Roche, O. *World Int. Prop. Org.*, WO2009003861 A1 2009. (c) Afanas'ev, O. I.; Tsyplenkova, O. A.; Seliverstov, M. Yu.; Sosonyuk, S. E.; Proskurnina, M. V.; Zefirov, N. S. *Russian Chem. Bull.* **2015**, *64*, 1470–1472.

(123) Wei-Liang, X.; Yun-Zheng, L.; Qing-Shan, Z.; He-Sung, Z. *Synthesis* **2005**, *3*, 442–446.

(124) Cignarella, G.; Pifferi, G.; Testa, E. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 2668–2669.

(125) (a) Yoshida, T.; Sakashita, H.; Numata, A.; Tahara, S.; Kawasumi, H. WO2008156142 A1 2008. (b) Pisal, M. M.; Annadate, R. A.; Athalye, M. C.; Kumar, D.; Chavan, S. P.; Sarkar, D.; Borate, H. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 979-988.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(126) Osborne, N. F.; Broom, N. J. P.; Coulton, S.; Harbridge, J. B.; Harris, M. A.; Stirling-François, I.; Walker, G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 371–373.

(127) Kamiya, T.; Teraji, T.; Saito, Y.; Hashimoto, M.; Nakaguchi, O.; Oku, T. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 3001–3004.

(128) Buynak, J. D.; Rao, A. S.; Doppalapudi, V. R.; Adam, G.; Petersen, P. J.; Nidamarthy, S. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9,* 1997–2002.

(129) Rodríguez, D. Tesis doctoral. New irreversible inhibitors of beta-lactamases for recovering antibiotics efficiency against superbugs. **2020**.

(130) Buynak, J. D.; Rao, A. S.; Doppalapudi, V. R. WO 99/33838, July 8, 1999.

(131) Micetich, R. G.; Singh, R. *Synthesis* **1985**, *1985*, 693–695.

(132) Thoraval, J. Y.; Nagai, W.; Yeung Lam Ko, Y. Y. C.; Carrie, R. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 3859–3868.

(133) Buynak, J. D.; Rao, A. S.; Doppalapudi, V. R. WO 99/33838, July 8, 1999.

(134) Micetich, R. G.; Maiti, S.; Spevak, P.; Tanaka, M.; Yamazaki, T.; Ogawa, K. *Synthesis* **1986**, *4*, 292–296.

(135) Taniguchi, M.; Sasaoka, M.; Matsumura, K.; Kawahara, I.; Kase, K.; Susuki, D.; Torii, S.; Tanaka, H.; Tanaka, M.; Nakai, A. EP306924 A1 1989.

(136) Gottstein, W. J.; Crast, L. B.; Graham. R. G.; Haynes, U. J.; McGregor, D. N. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 1531-1534.

(137) (a) Ohira, S. *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 561–564. (b) Müller, S.; Liepold, B.; Roth, G. J.; Bestmann, H. J. *Synlett* **1996**, 521–522; (c) Roth, G. J.; Liepold, B.; Muller, S. J.; Bestmann, H. J. *Synthesis* **2004**, 59–62.

(138) Gazvoda, M.; Virant, M.; Pinter, B.; Košmrlj, J. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4814.

(139) Prado, V.; Lence, E.; Maneiro, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; Beceiro, A.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5471–5487.

(140) Prado, V.; Lence, E.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 17988–18000.

(141) Rodríguez, A.; Maneiro, M.; Lence, M.; Otero, J. M.; van Raaij, M. J.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Front. Mol. Biosci.* **2023**, *10*, 1111598.

(142) Maneiro, M.; Lence, M.; Sanz-Gaitero, M.; Otero, J. M.; van Raaij, M. J.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 3127-3135.

(143) Kumar, B. S.; Mishra, G. P.; Rao, B. V. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 1838–1849.

(144) Tan, G.; Das, M.; Keum, H.; Belloti, P.; Daniliuc, C.; Glorius, F. *Nat. Chem.* **2022**, *14*, 1174–1184.

(145) Charrier, J. D.; Maccormick, S.; Storck, P. H.; Pinder, J.; O'Donnell, M. E.; Knegtel, R. M. A.; Young, S. C. Y.; Kay, D.; Reaper, P. M.; Durrant, S. J. WO2012138938 A1 2012.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(146) Sánchez-Abella, L.; Fernández, S.; Armesto, N.; Ferrero, M.; Gotor, V. J. Org. Chem. **2006**, 71, 5396-5399.

(147) Bianco, A.; Brufani, M.; Manna, F.; Melchioni, C. *Carbohydr. Res.* **2001**, *332*, 23–31.

(148) Pansegrau, P. D.; Anderson, K. S.; Widlanski, T.; Ream, J. E.; Sammons, R. D.; Sikorski, J. A.; Knowles, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2589–2592.

(149) Taber, D. F.; DeMatteo, P. W.; Hassan, R. A. *Org. Synth.* **2013**, *90*, 350–357.

(150) Manthey, M. K.; González-Bello, C.; Abell, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1997**, *1*, 625-628.

(151) González-Bello, C.; Manthey, M. K.; Harris, J. M.; Hawkins, A. R.; Coggins, J. R.; Abell, C. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1591-1597.

(152) Colonna, S.; Pironti, V.; Carrea, G.; Pasta, P.; Zambianchi, F. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 569–575.

(153) Armarengo, W. L. F.; Perrin, D. D. Purificación of Laboratory Chemicals; Butterworth Heinemann: Oxford, **1996**.

(154) http://www.pymol.org/

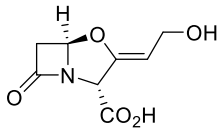
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

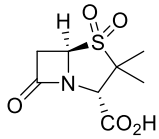
Anexo I: Listado de Estructuras

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

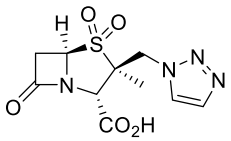
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



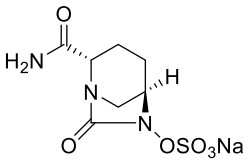
Ác. Clavulánico (**1**)



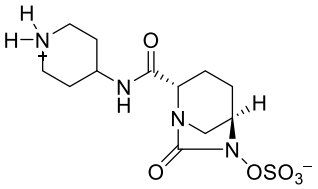
Sulbactam (**2**)



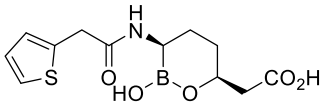
Tazobactam (**3**)



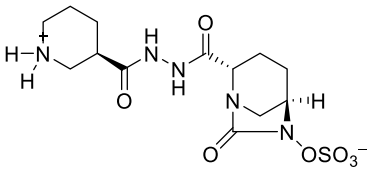
Avibactam (**4**)



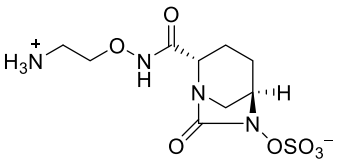
Relebactam (**5**)



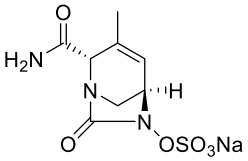
Varbobactam (**6**)



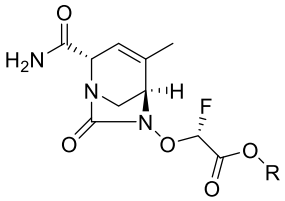
Zidebactam (**7**)



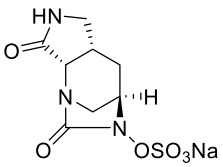
Nacubactam (**8**)



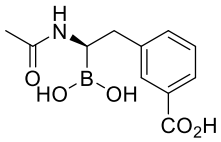
Durlobactam (**9**)



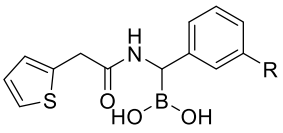
ETX0282 (**10**) R = i-Pr
ETX1317 (**11**) R = H



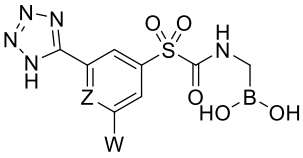
IID572 (**12**)



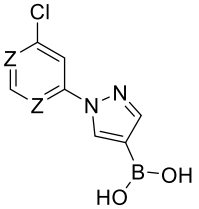
13



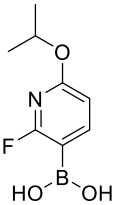
14, R = H
15, R = CO_2H



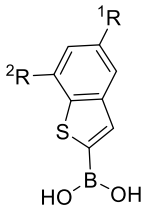
16, Z = N; W = H
17, Z = CH; W = Cl
18, Z = CH; W = CF_3



19 Z = CH
20 Z = N

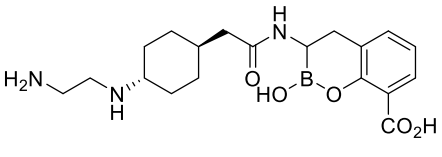


21



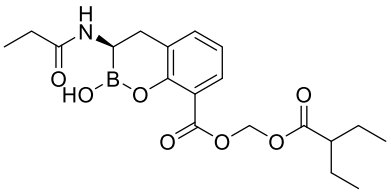
22

^{1}R = H, CH_2Br, CH_2NH_2, CH_2NO_2
^{2}R = H, CO_2H, $CO_2{}^tBu$, $NHCO_2{}^tBu$

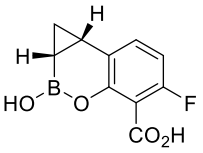


Taniborbactam (VNRX-5133, **23**)

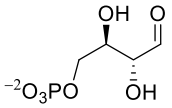
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



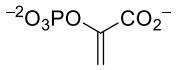
VNRX-7145 (**24**)



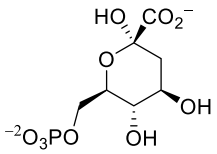
Xeruborbactam (**25**)



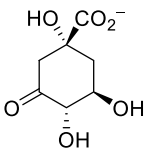
Eritrosa 4-fosfato (**26**)



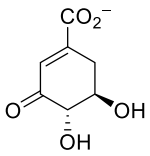
Fosfoenolpiruvato (**27**)



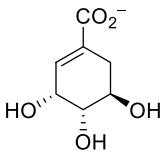
DAHP (**28**)



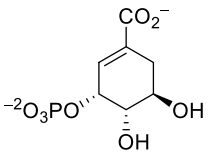
Ác. 3-deshidroquínico (**29**)



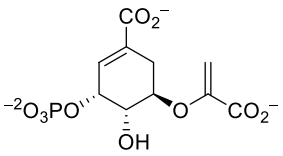
Ác. 3-deshidrosiquímico (**30**)



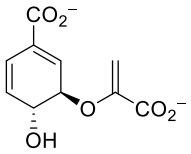
Ác. siquímico (**31**)



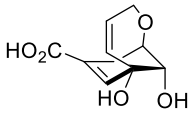
Siquimato-3-fosfato (**32**)



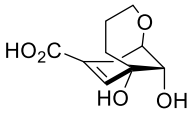
EPSP (**33**)



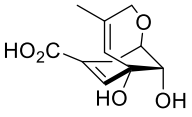
Ác. Corísmico (**34**)



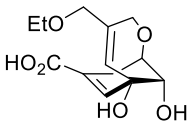
35



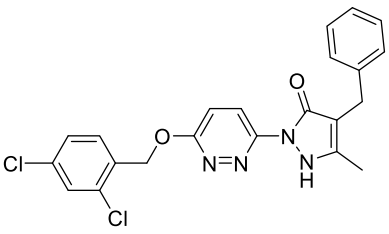
36



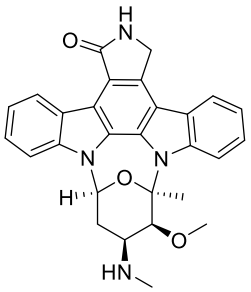
37



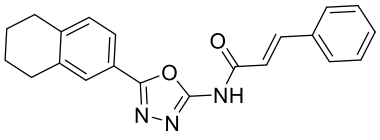
38



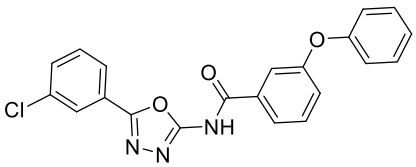
39



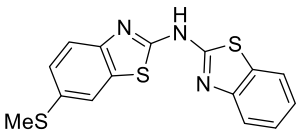
40



41

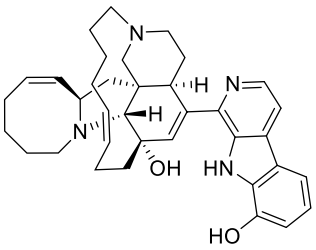


42

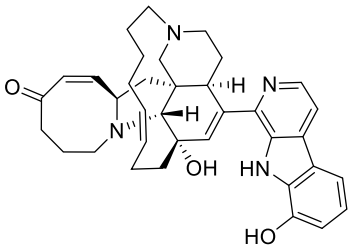


43

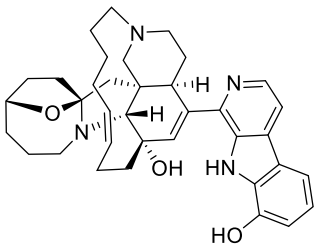
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



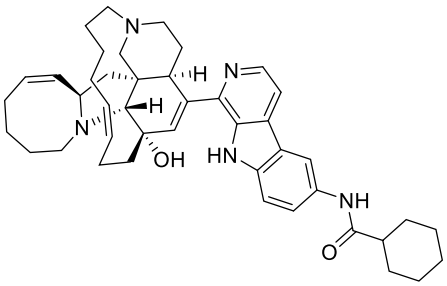
44



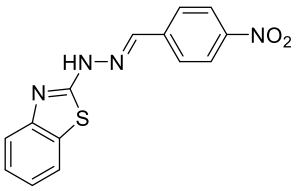
45



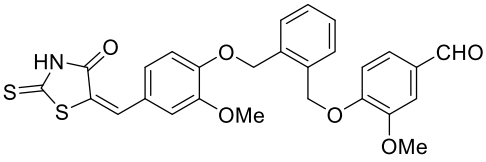
46



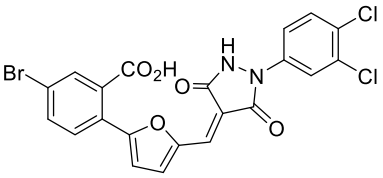
47



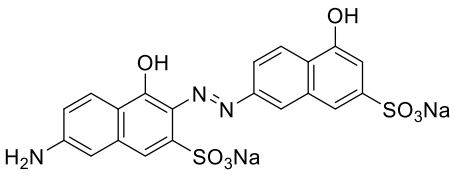
48



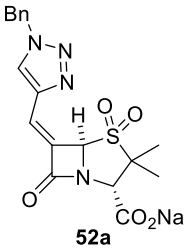
49



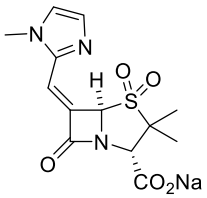
50



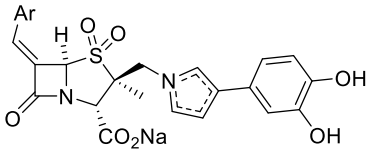
51



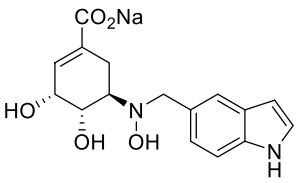
52a



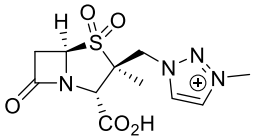
52b



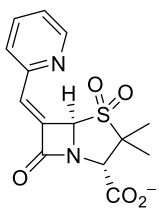
53



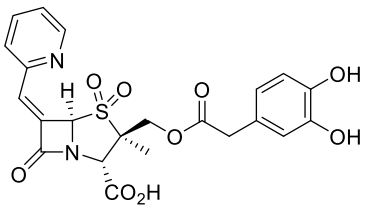
54



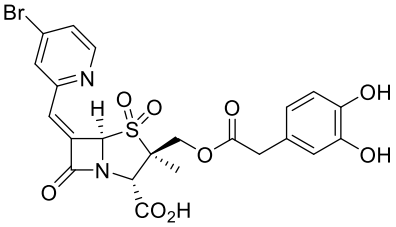
Enmebactam (**55**)



56

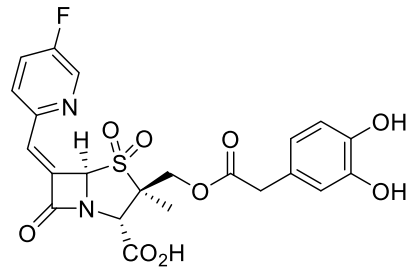


LN-1-255 **(57a)**

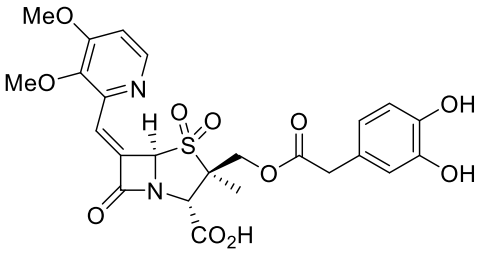


57b

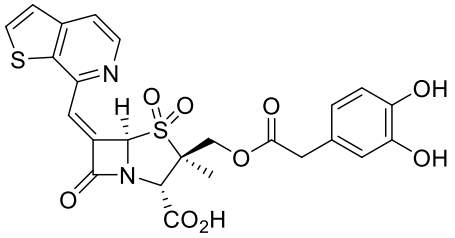
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



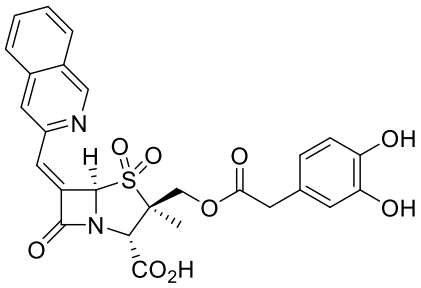
57c



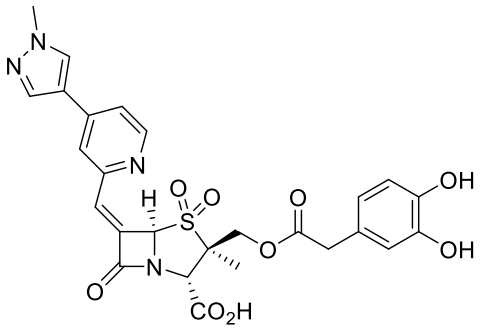
57d



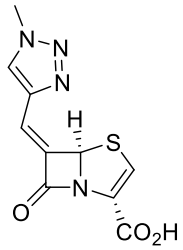
57e



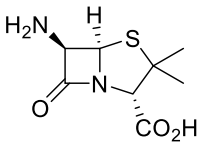
57f



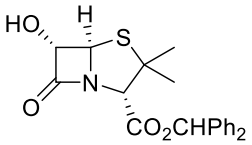
57g



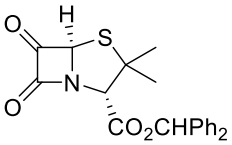
BRL 42715 (**58**)



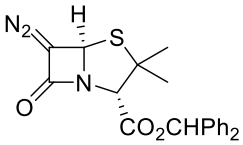
6-APA (**59**)



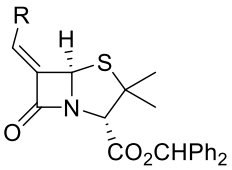
60



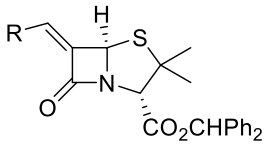
61



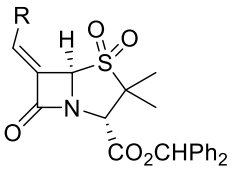
62



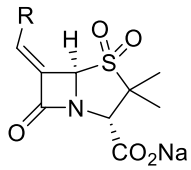
63 R = Alquil o piridil



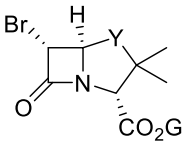
64 R = Alquil o piridil



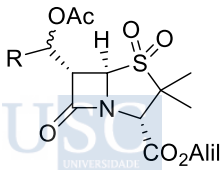
65 R = Alquil o piridil



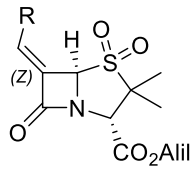
66 R = Alquil o piridil



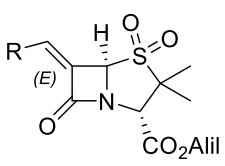
67 Y = S; G = H
68 Y = S; G = Alil
69 Y = SO_2; G = Alil



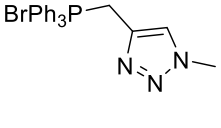
70 R = Alquil o piridil



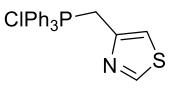
71 R = Alquil o piridil



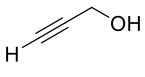
72 R = Alquil o piridil



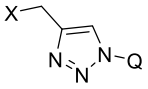
73a



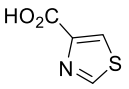
73b



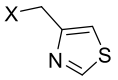
74



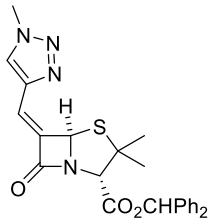
75 Q = H; X = OH
76 Q = Me; X = OH
77 Q = Me; X = Br



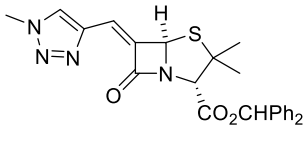
78



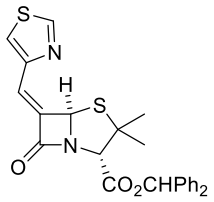
79 X = OH
80 X = Cl



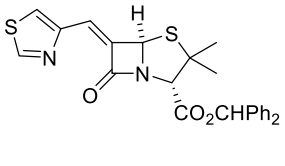
81a



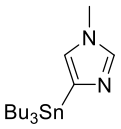
82a



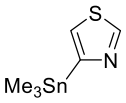
81b



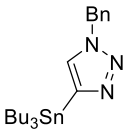
82b



83a



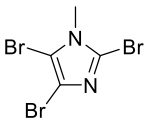
83b



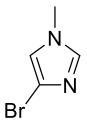
83c



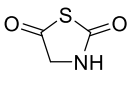
84



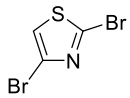
85



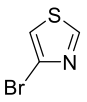
86



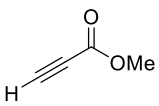
87



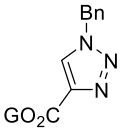
88



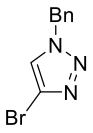
89



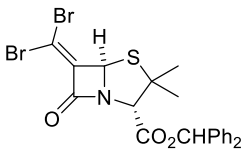
90



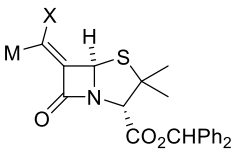
91 G = Me
92 G = H



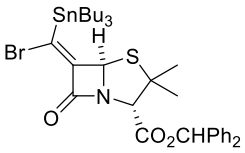
93



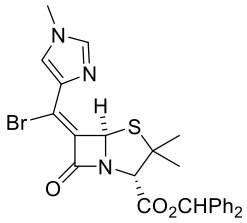
94



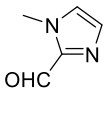
95 M = H; X = Br
96 M = Br; X = H
97 M = X = H



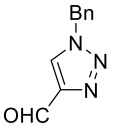
98



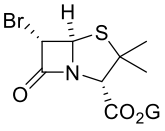
99



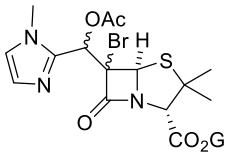
100a



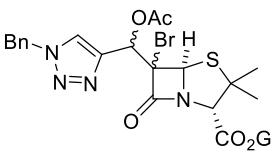
100b



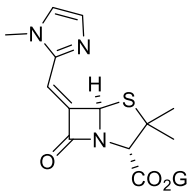
101 G = $CHPh_2$
102 G = ^{t}Bu



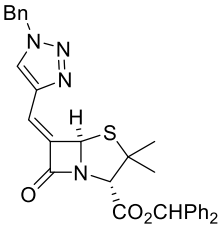
103a G = $CHPh_2$
104a G = ^{t}Bu



103b G = $CHPh_2$
104b G = ^{t}Bu

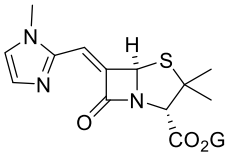


105a G = $CHPh_2$
106a G = ^{t}Bu

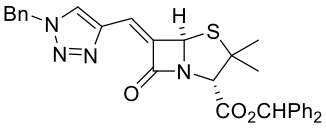


105b G = $CHPh_2$

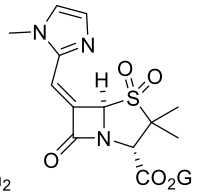
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



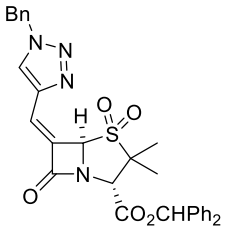
107a G = $CHPh_2$
108a G = ^{t}Bu



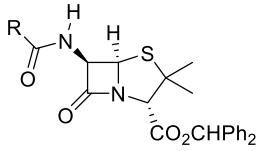
107b



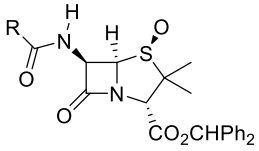
109a G = $CHPh_2$
110a G = *t*-Bu



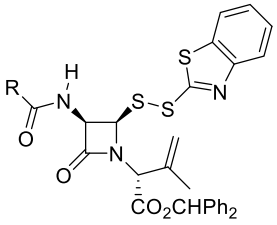
109b



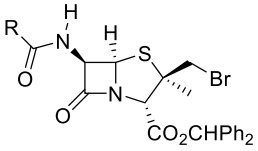
111 R = Bn, CH_2OPh



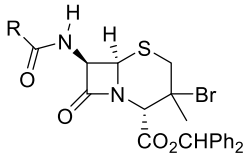
112 R = Bn, CH_2OPh



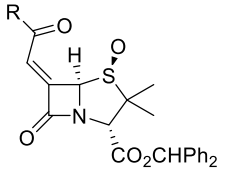
113 R = Bn, CH_2OPh



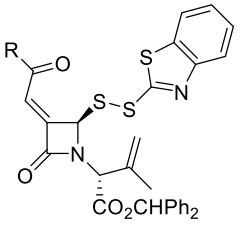
114 R = Bn, CH_2OPh



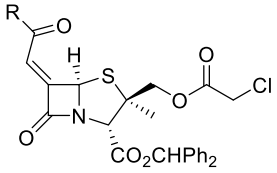
115 R = Bn, CH_2OPh



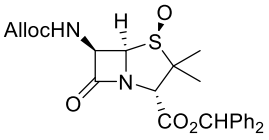
116 R = OMe, ^{t}Bu o NH_2



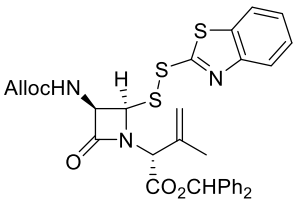
117 R = OMe, ^{t}Bu o NH_2



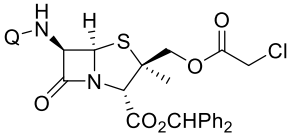
118 R = OMe, ^{t}Bu o NH_2



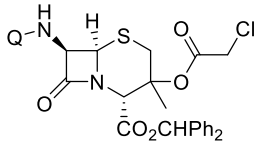
119



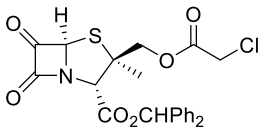
120



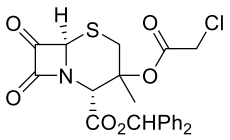
121 Q = Alloc
123 Q = H



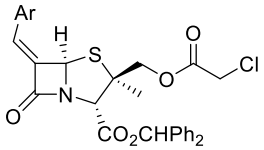
122 Q = Alloc
124 Q = H



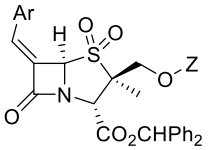
125



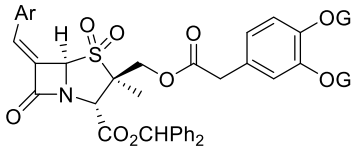
126



127

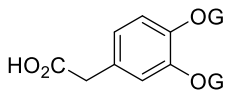


128 Z = $COCH_2Cl$
129 Z = H

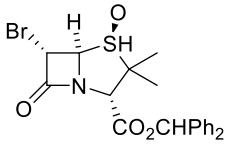


130 G = TBDPS
131 G = H

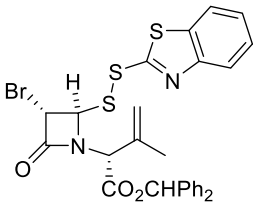
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



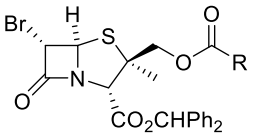
132 G = H
133 G = TBDPS



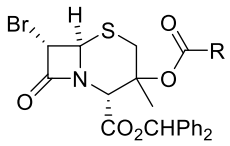
134



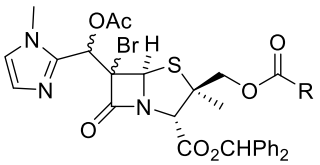
135



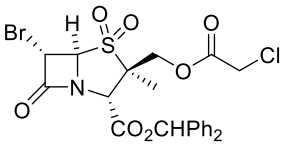
136 R = CH_2Cl
138 R = CH_3



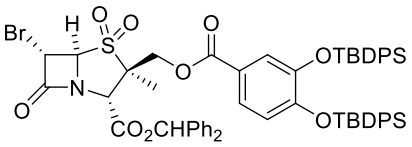
137 R = CH_2Cl
139 R = CH_3



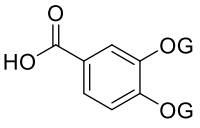
140 R = CH_2Cl
141 R = CH_3



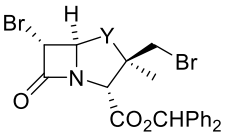
142



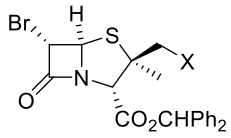
143



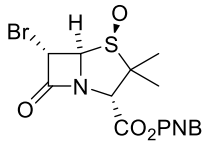
144 G = H
145 G = TBDPS



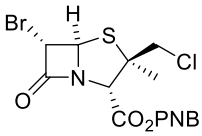
146 Y = S
147 Y = SO_2



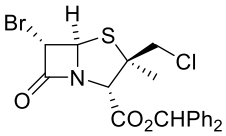
148 X = N_3
149 X = NH_2



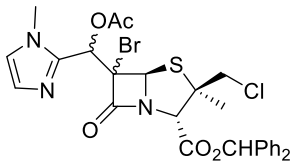
150



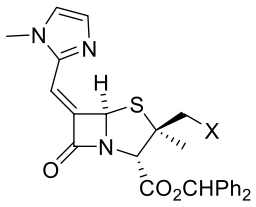
151



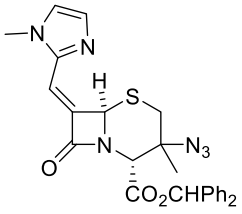
152



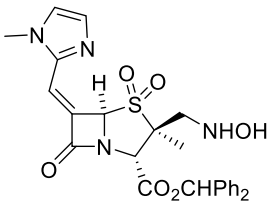
153



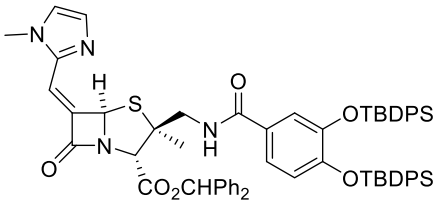
154 X = Cl
155 X = N_3
157 X = NH_2



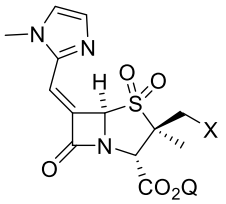
156



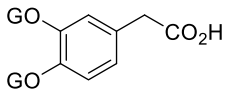
159



158

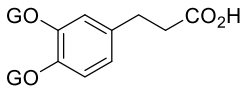


160 X = Cl; Q = $CHPh_2$
161 X = Cl; Q = Na
162 X = N_3; Q = $CHPh_2$
163 X = N_3; Q = Na

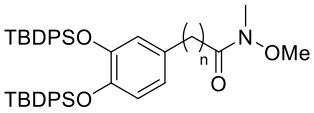


164 G = H
166 G = TBDPS

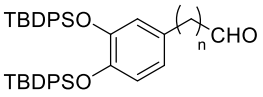
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



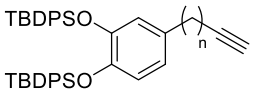
165 G = H
167 G = TBDPS



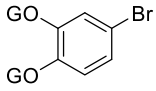
168 n = 1
169 n = 2



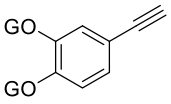
170 n = 1
171 n = 2



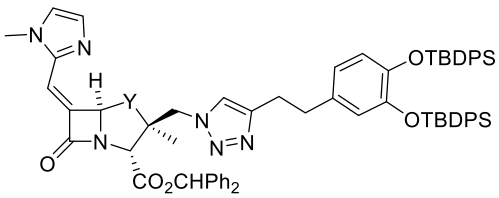
172 n = 1
173 n = 2



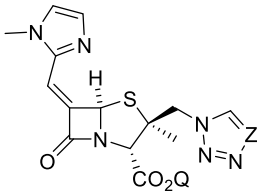
174 G = H
175 G = TBDPS



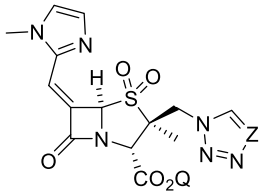
176



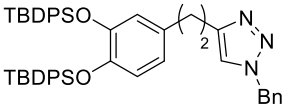
177 Y = S
178 Y = SO_2



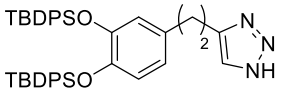
179 Z = CH; Q = $CHPh_2$
180 Z = CH; Q = Na
181 Z = N; Q = $CHPh_2$
182 Z = N; Q = Na



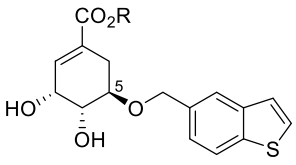
183 Z = CH; Q = $CHPh_2$
184 Z = CH; Q = Na
185 Z = N; Q = $CHPh_2$
186 Z = N; Q = Na



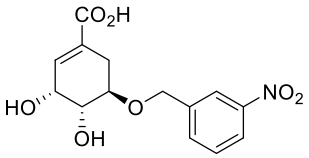
187



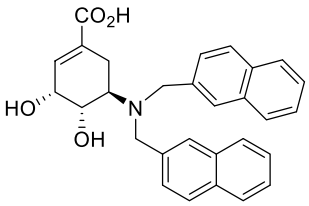
188



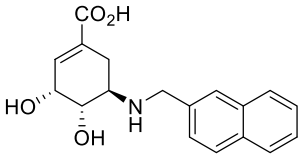
189 R = H
190 R = Et



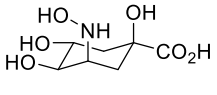
191



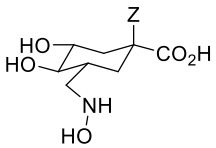
192



193

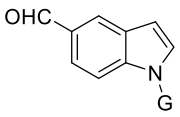


194

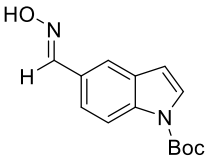


195 Z = H
196 Z = OH

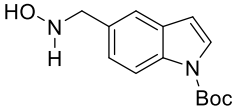
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



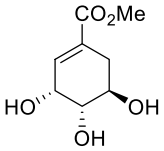
197 G = H
198 G = Boc



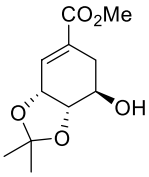
199



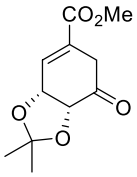
200



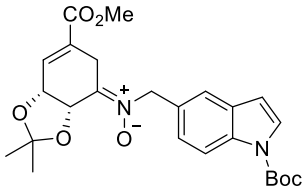
201



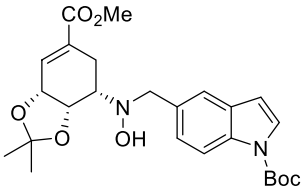
202



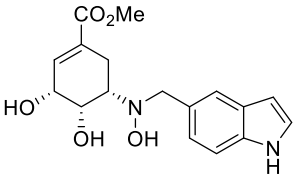
203



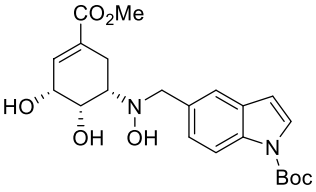
204



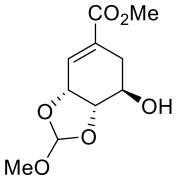
205



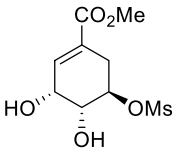
206



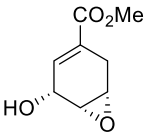
207



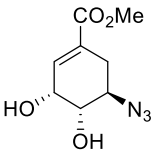
208



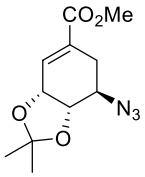
209



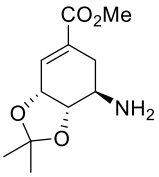
210



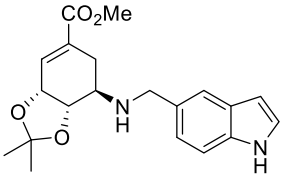
211



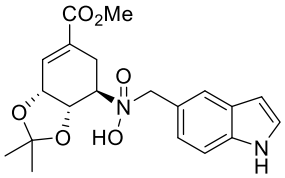
212



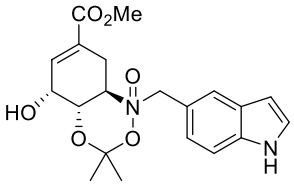
213



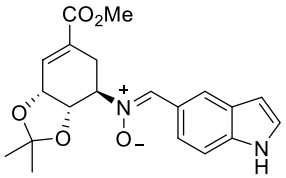
214



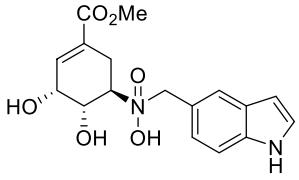
215



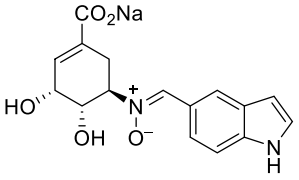
216



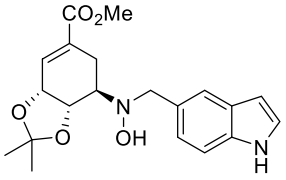
217



218



219



220

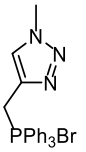
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

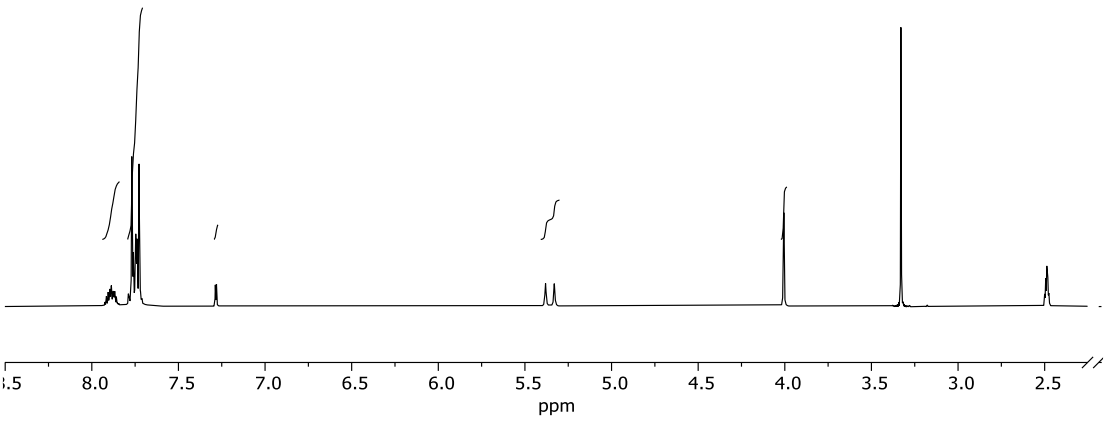
Anexo II: Espectros de RMN

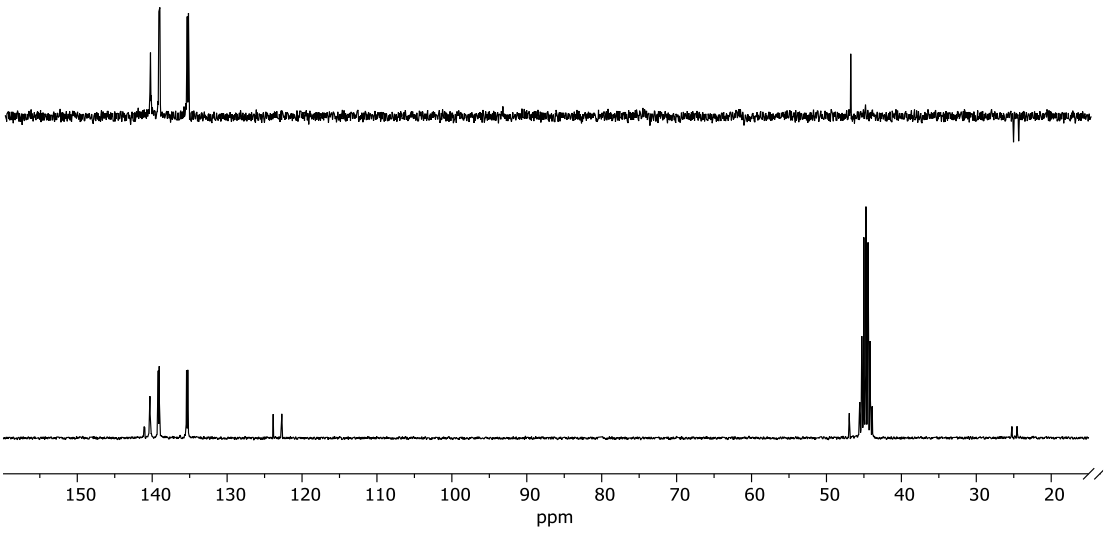
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

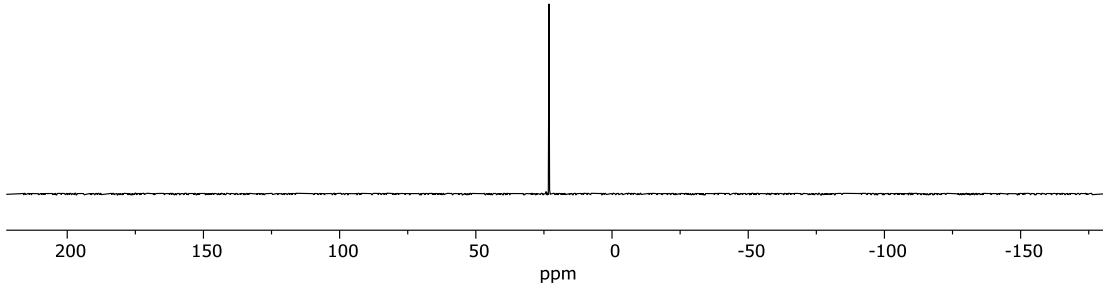
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



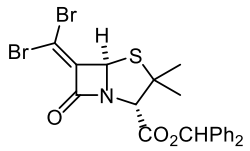
73a



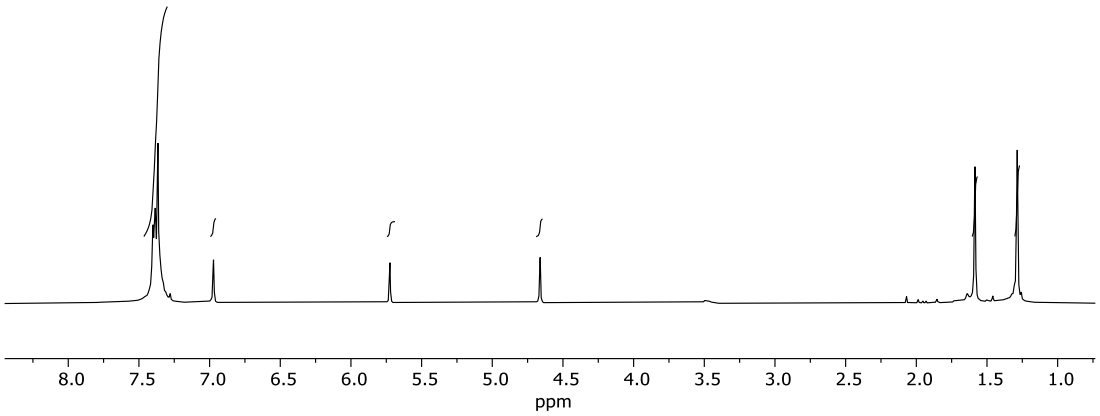




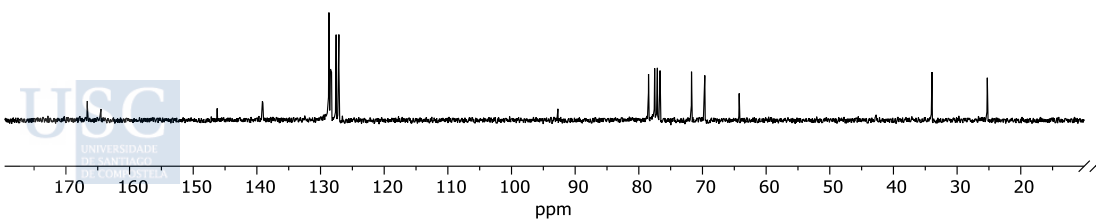
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



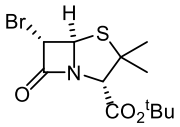
94



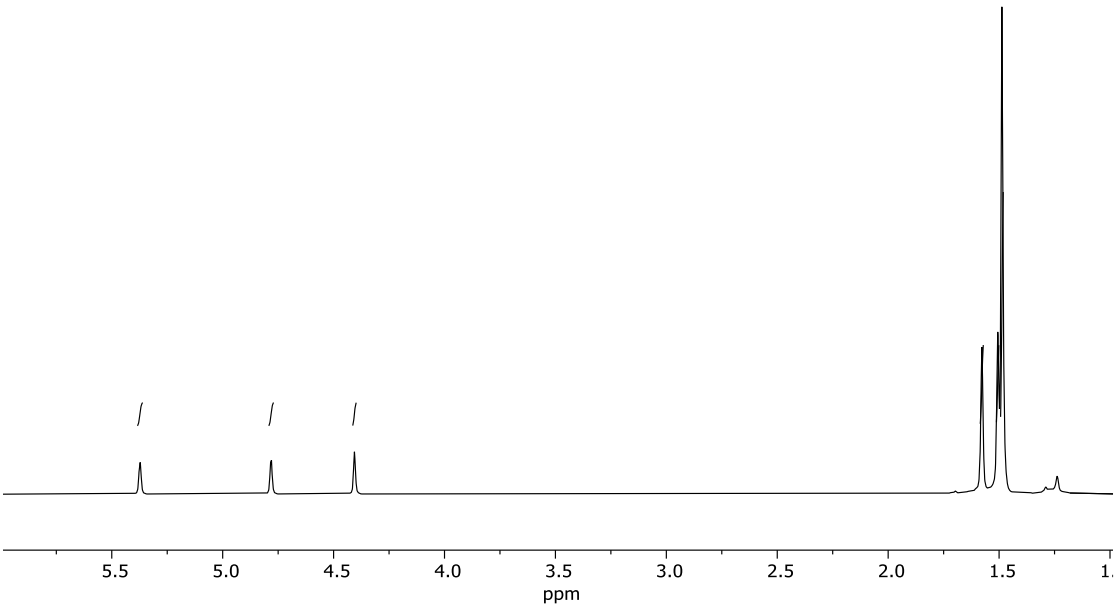


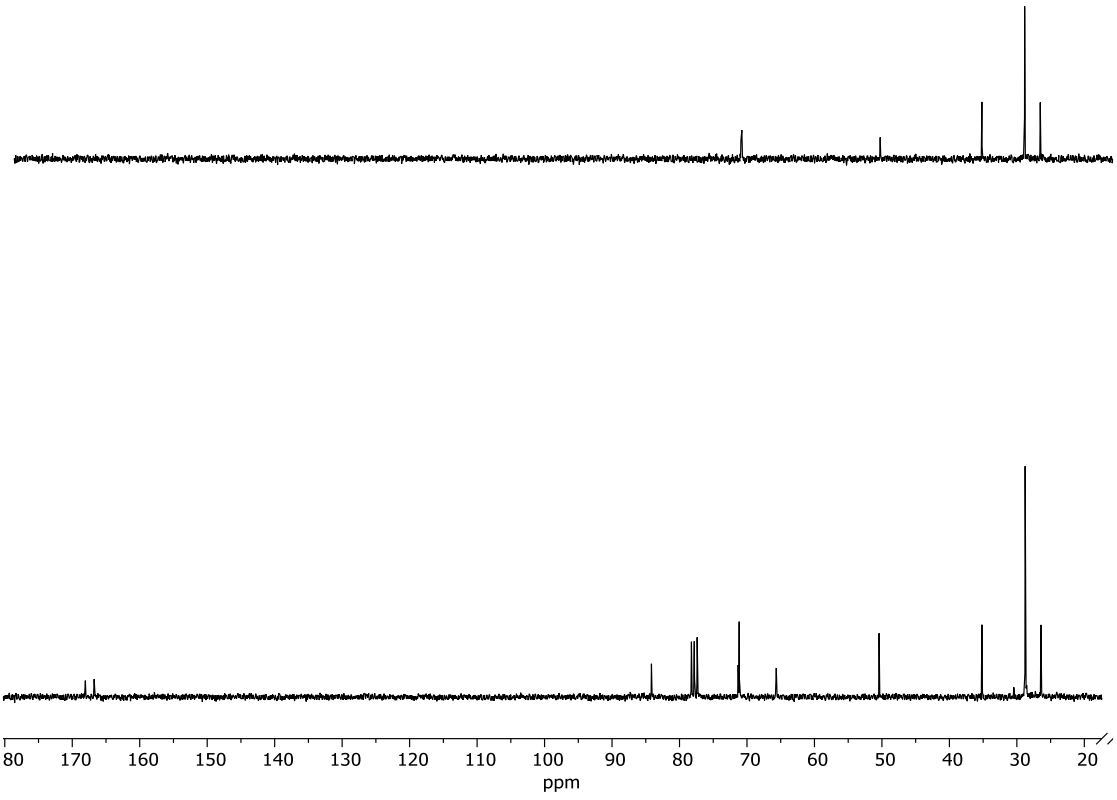


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

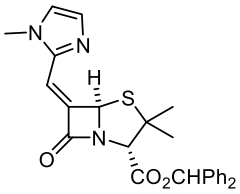


102

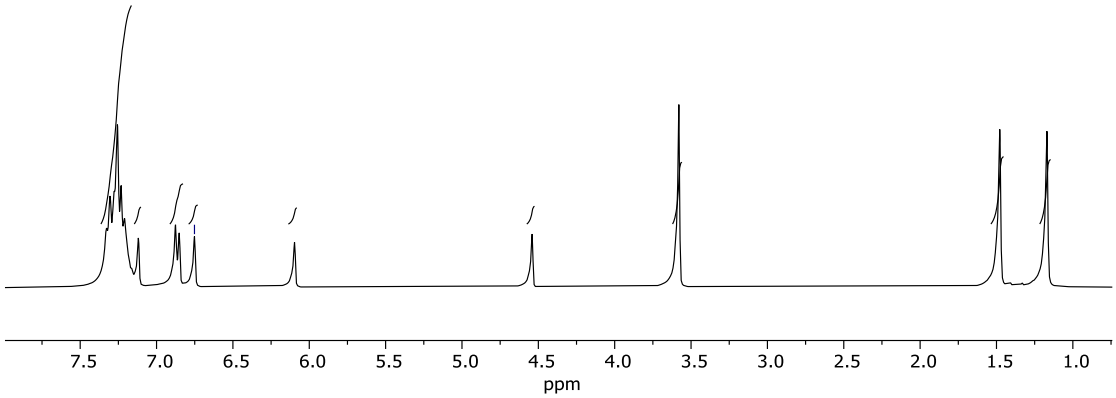


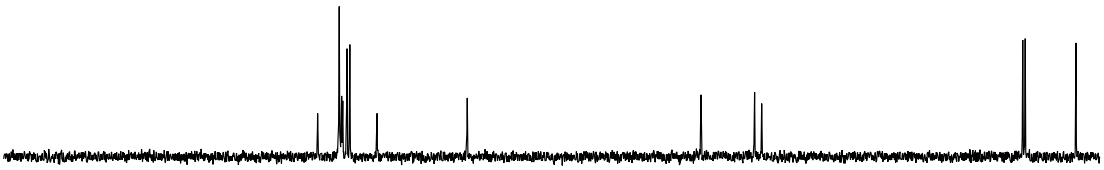


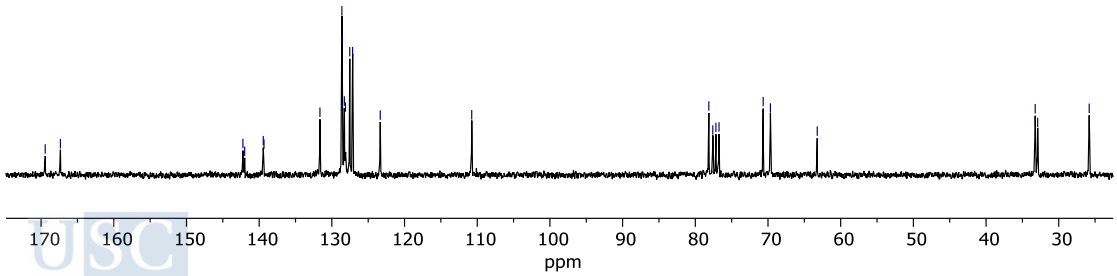
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



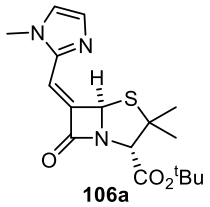
105a



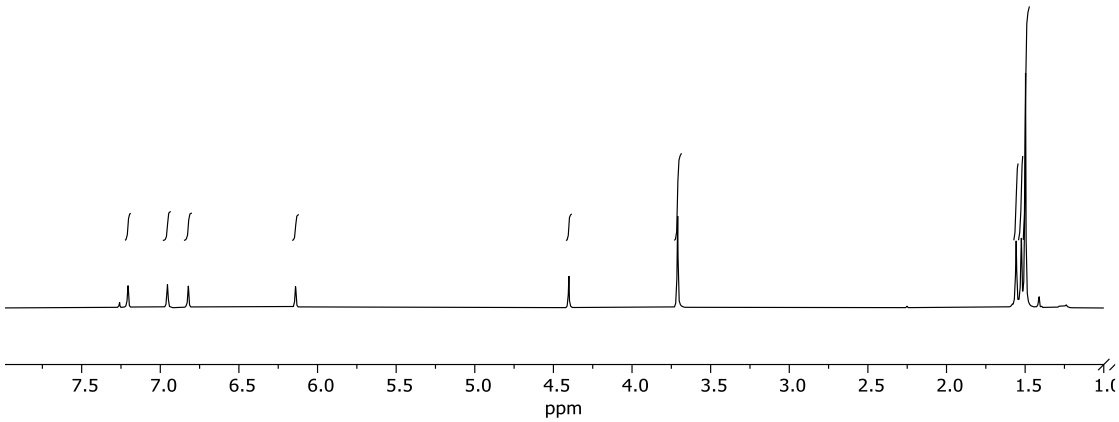


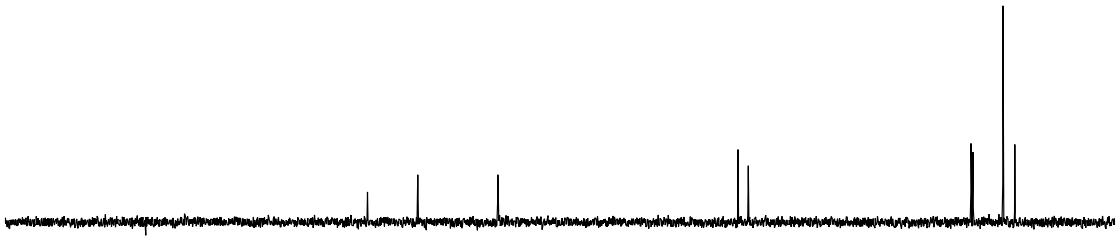


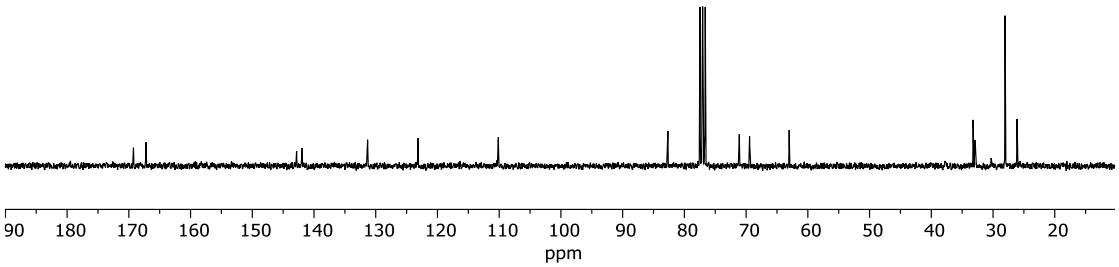
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



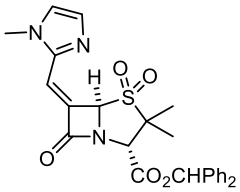
106a



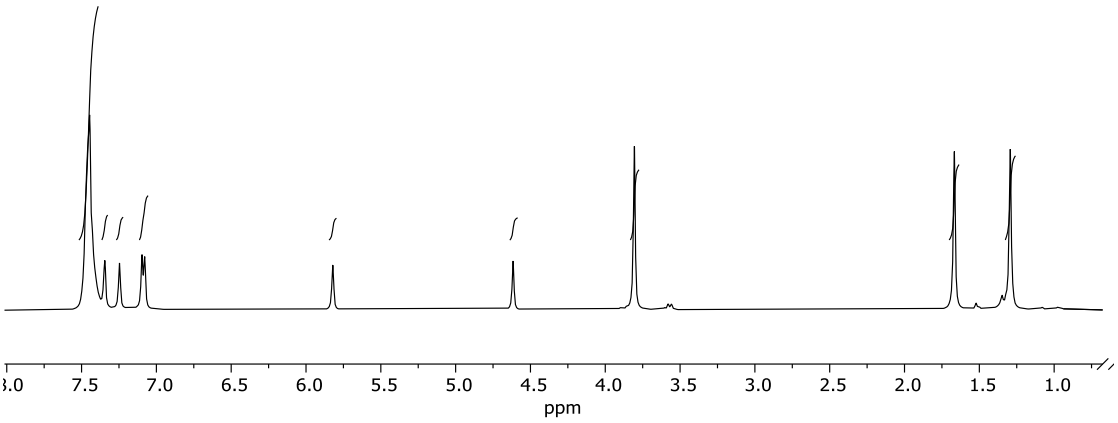




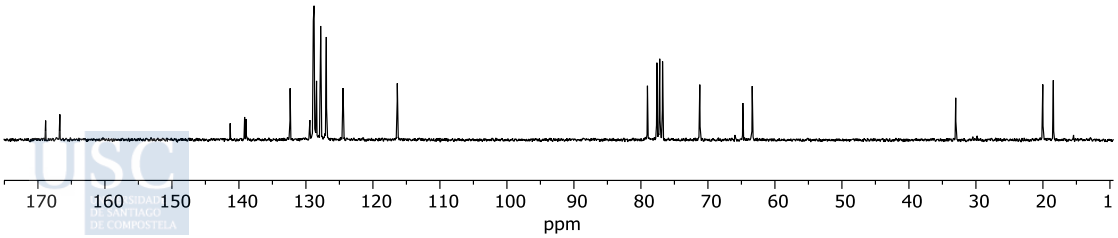
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



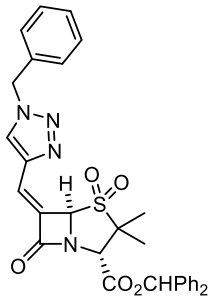
109a



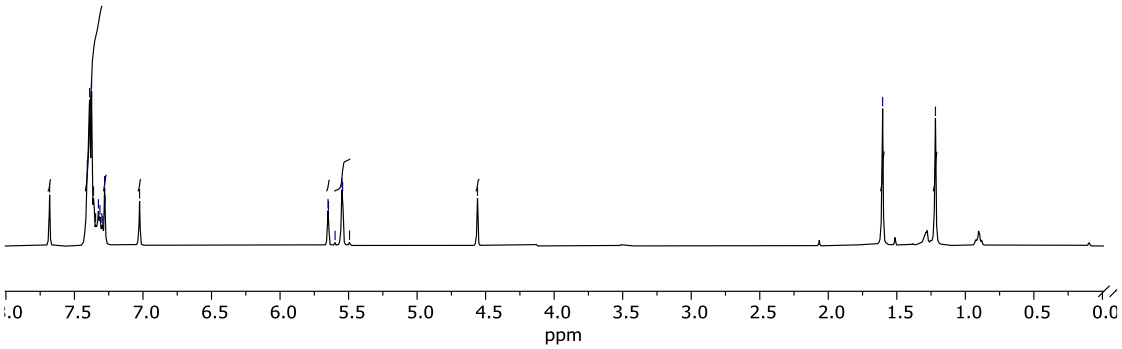


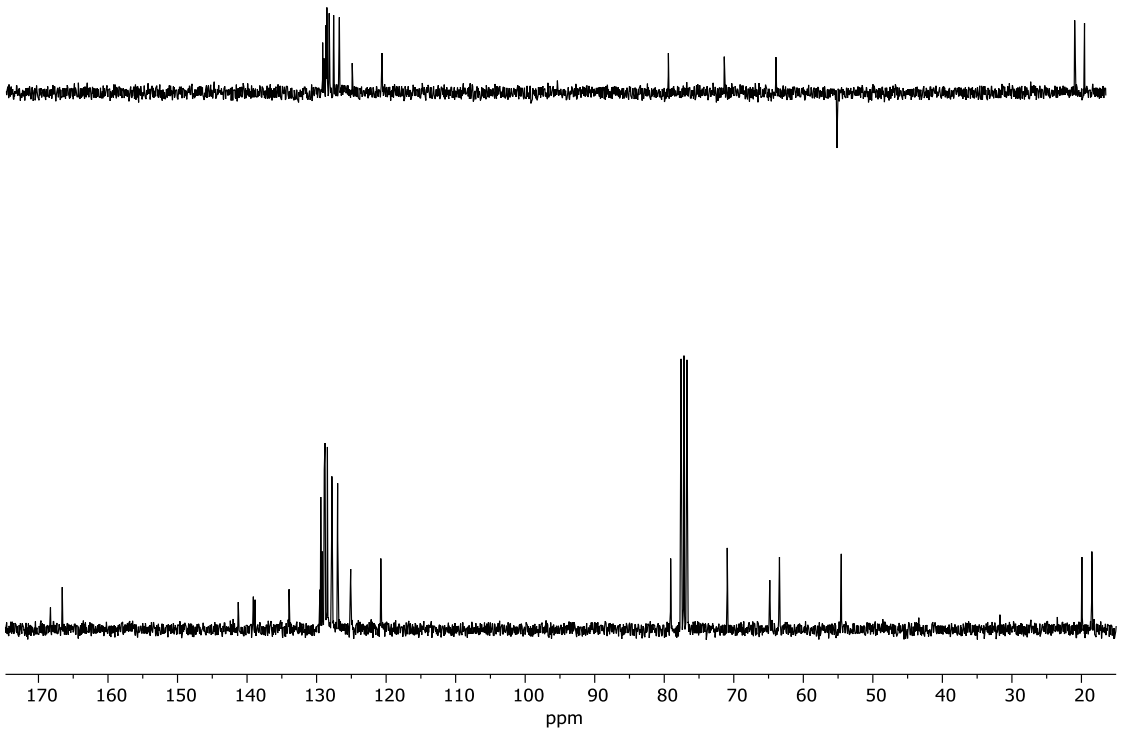


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

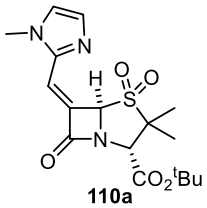


109b

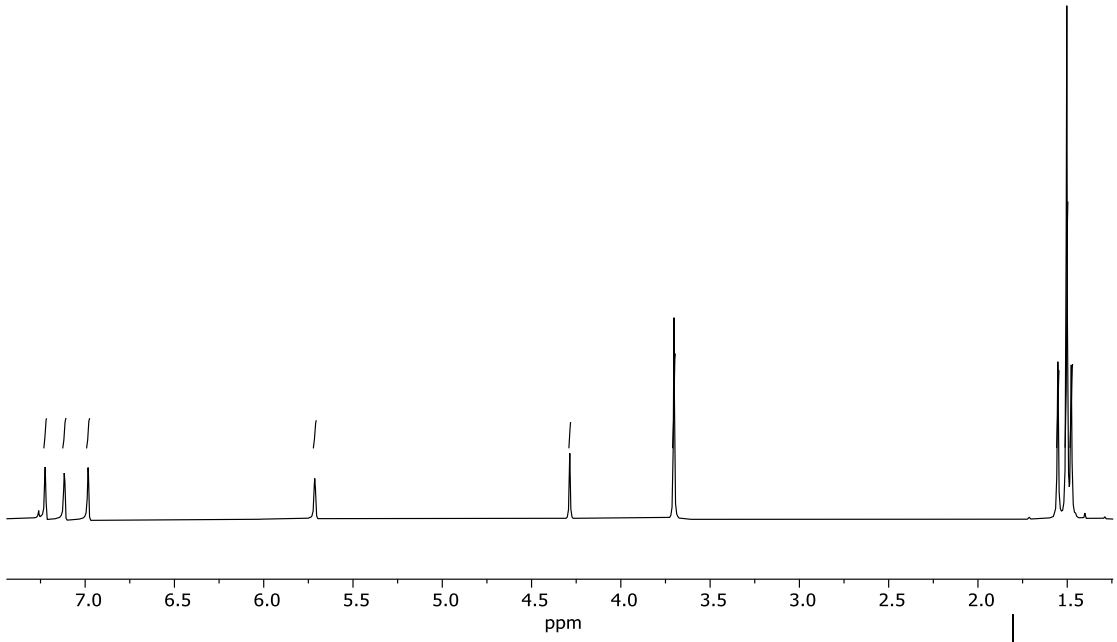


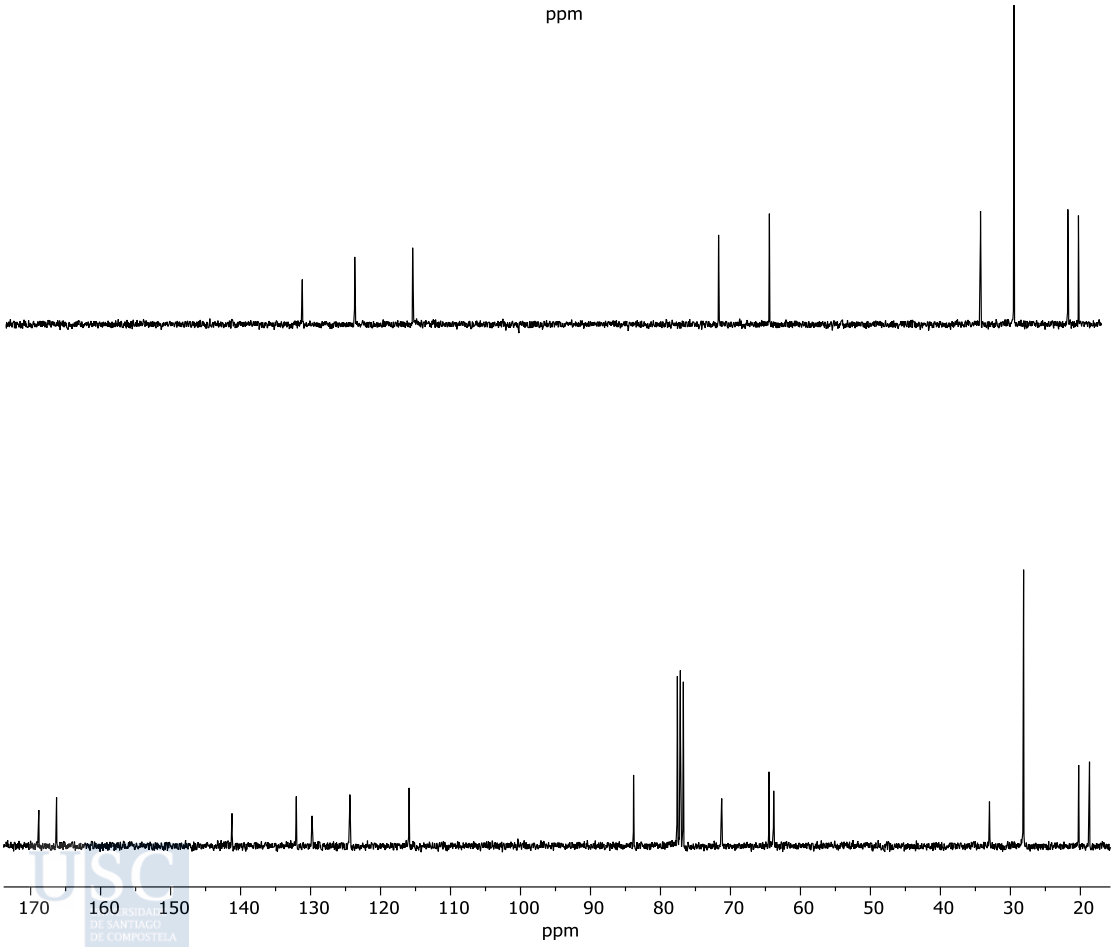


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

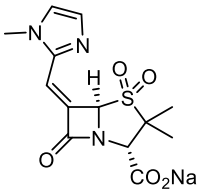


110a

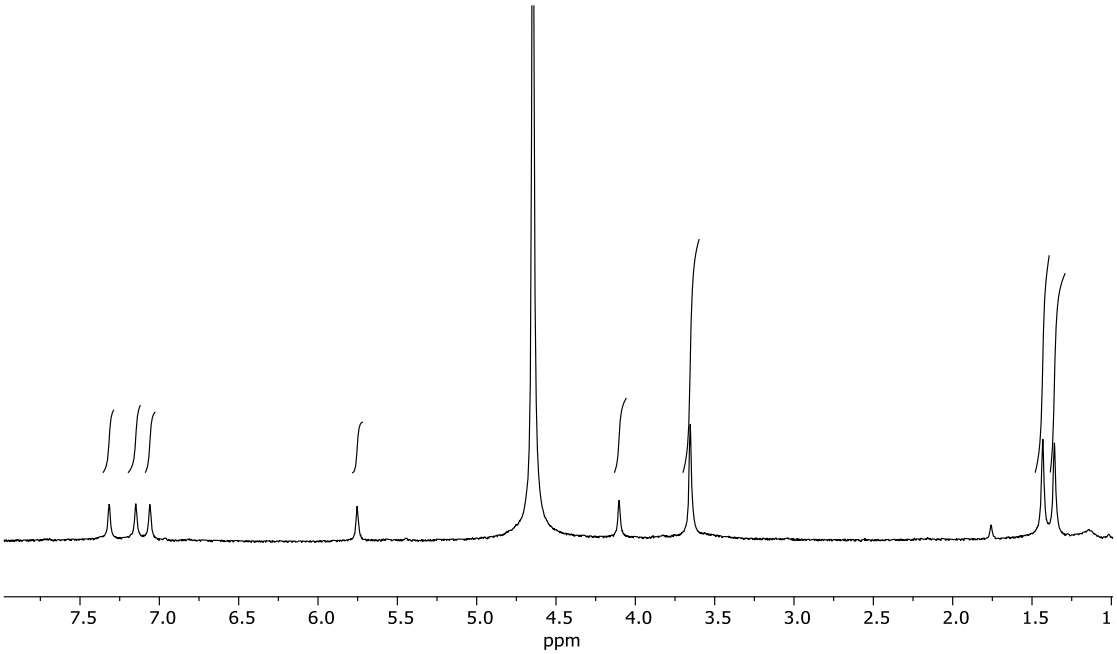


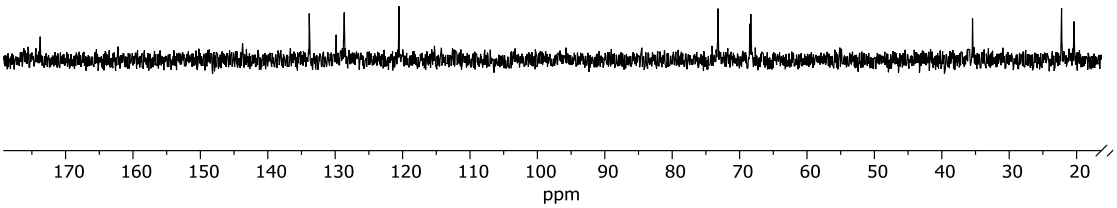


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

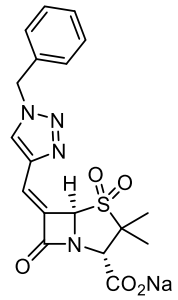


52a

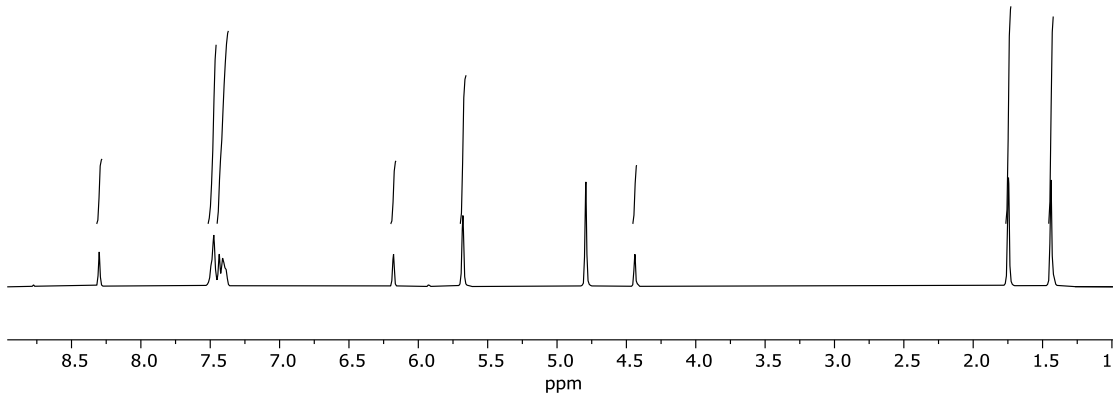


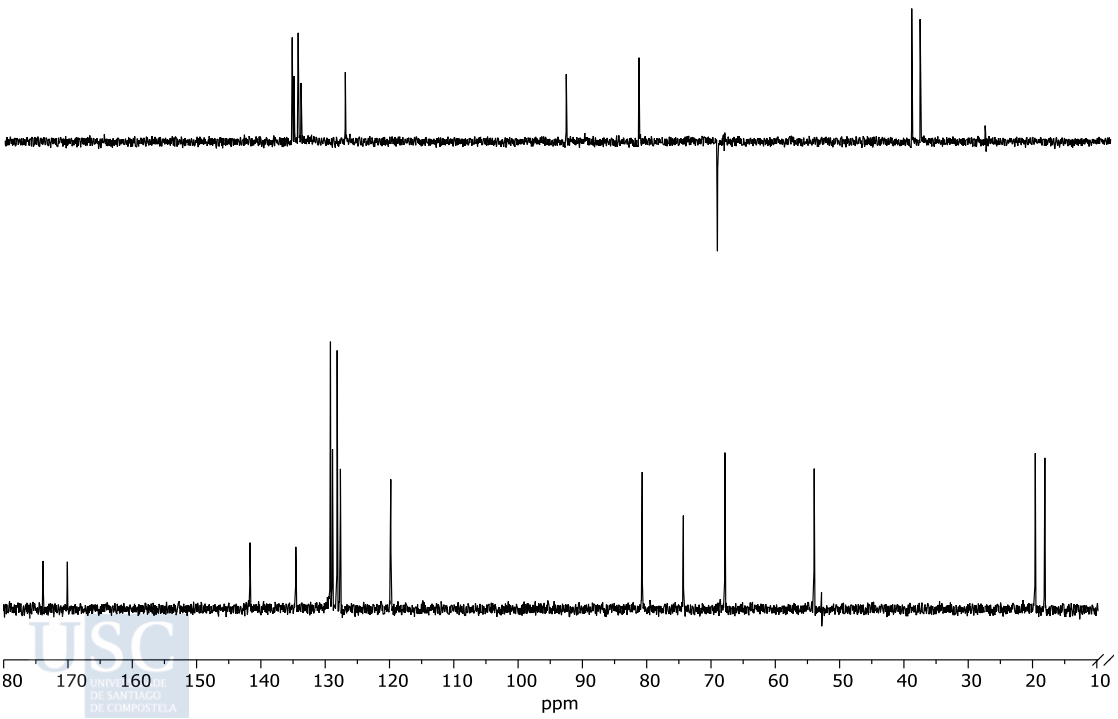


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

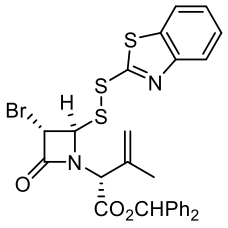


52b

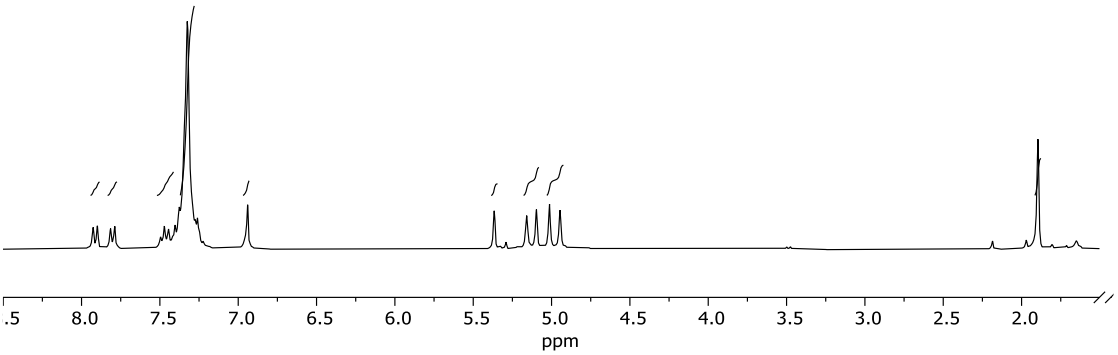




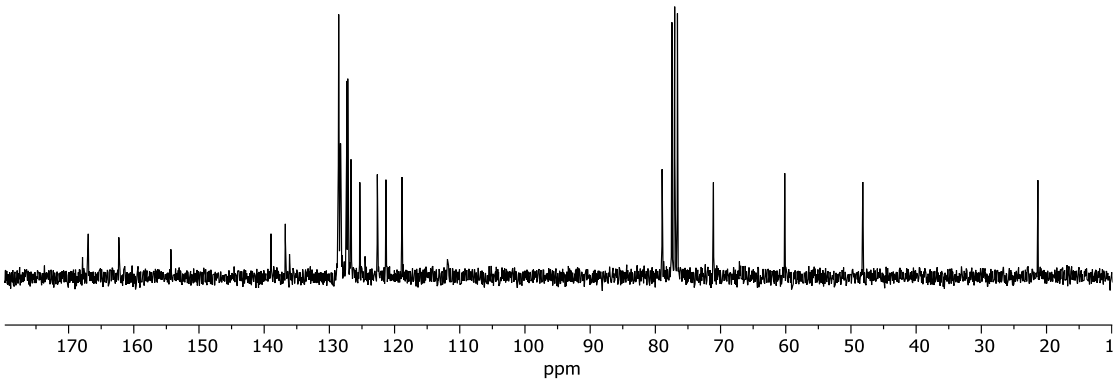
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



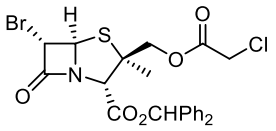
135



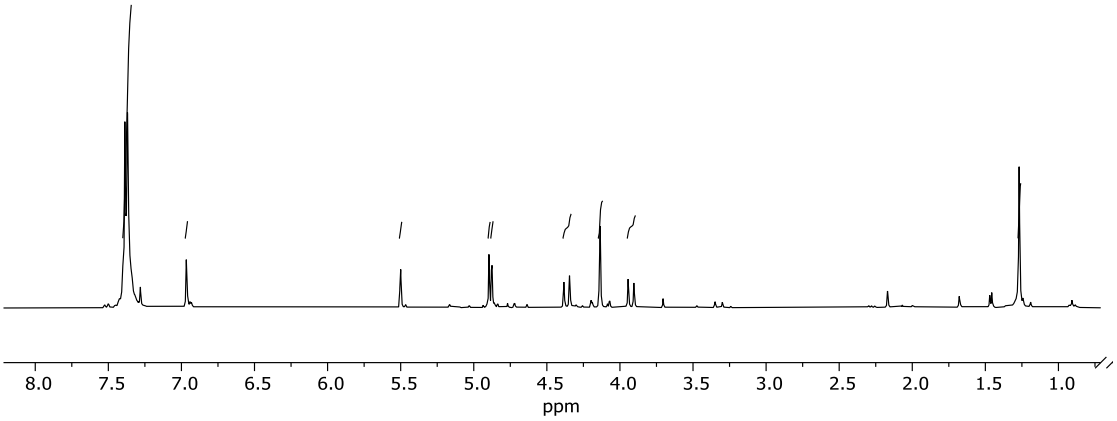


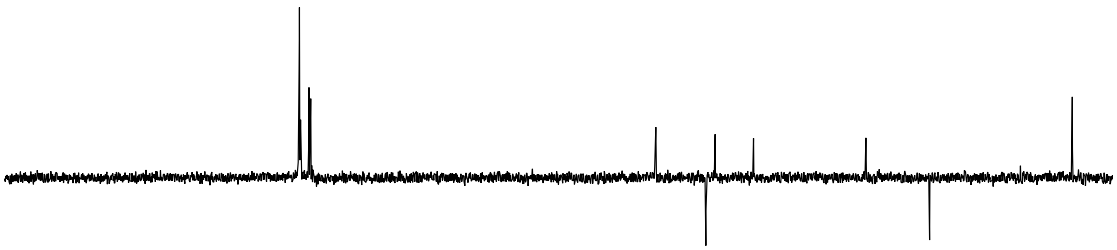


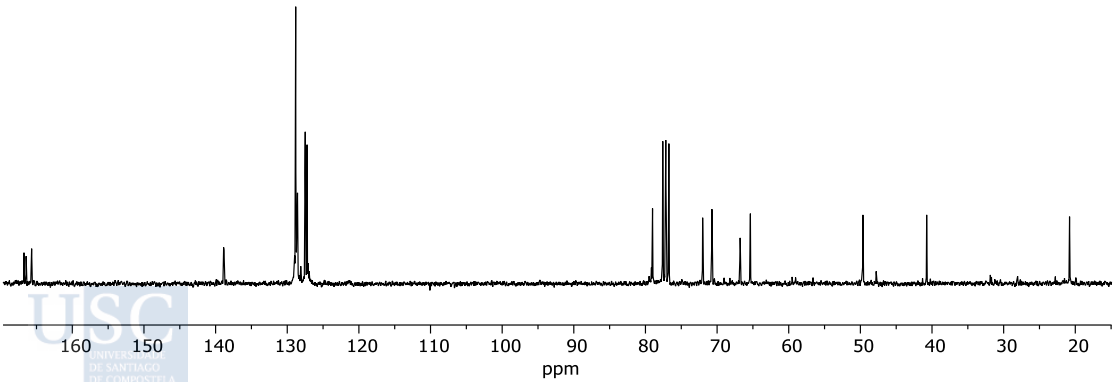
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



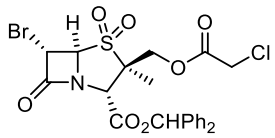
136



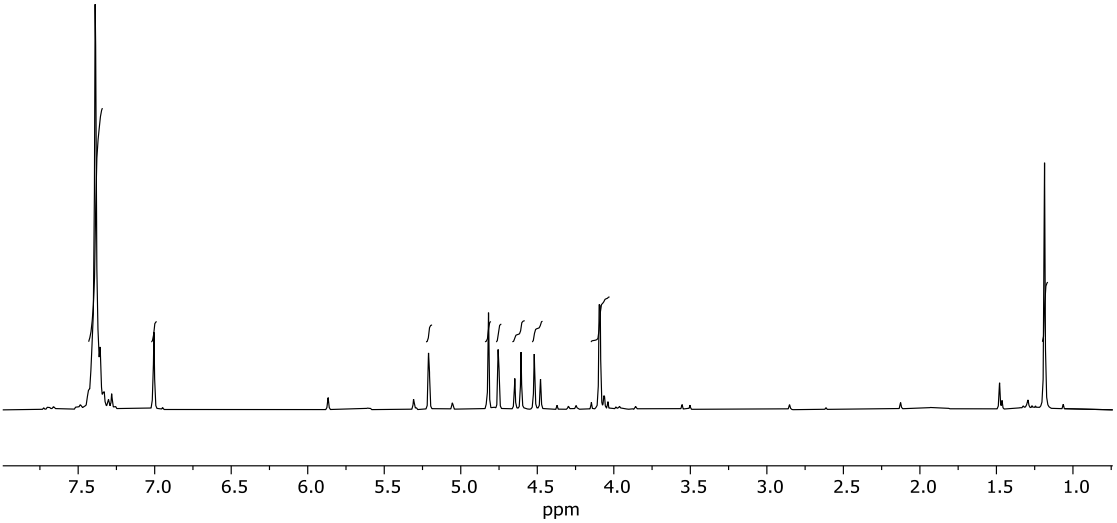


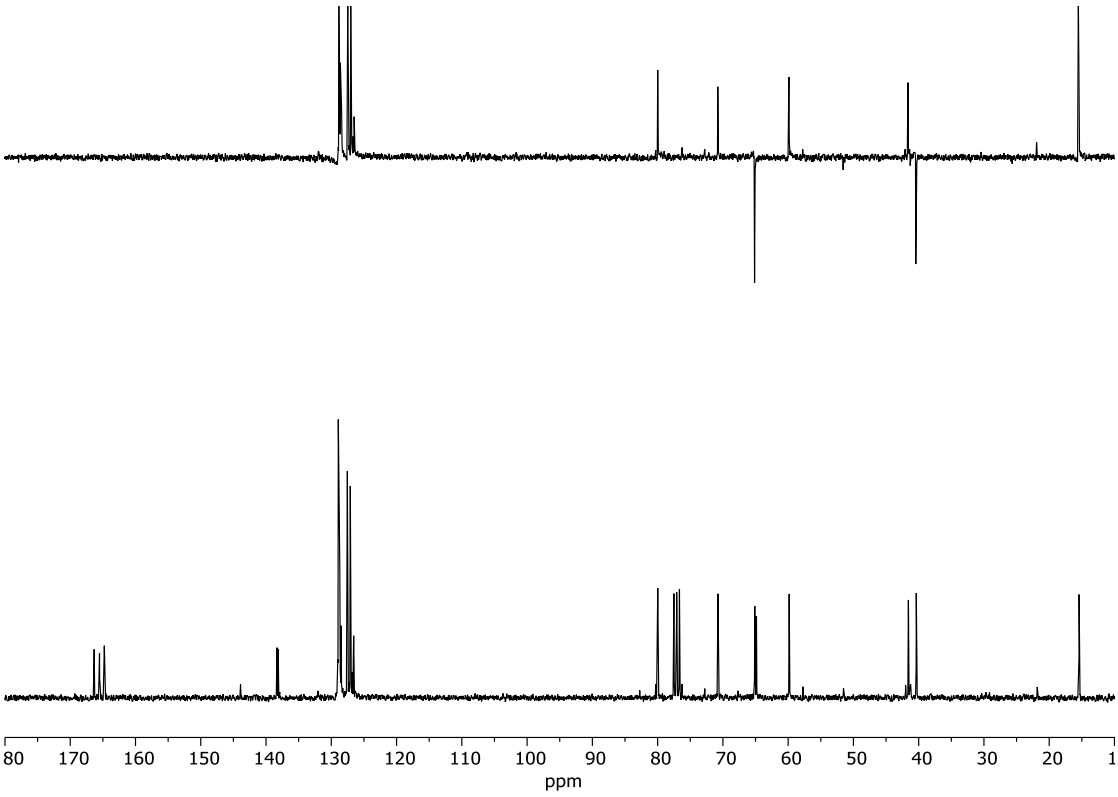


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

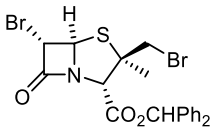


142

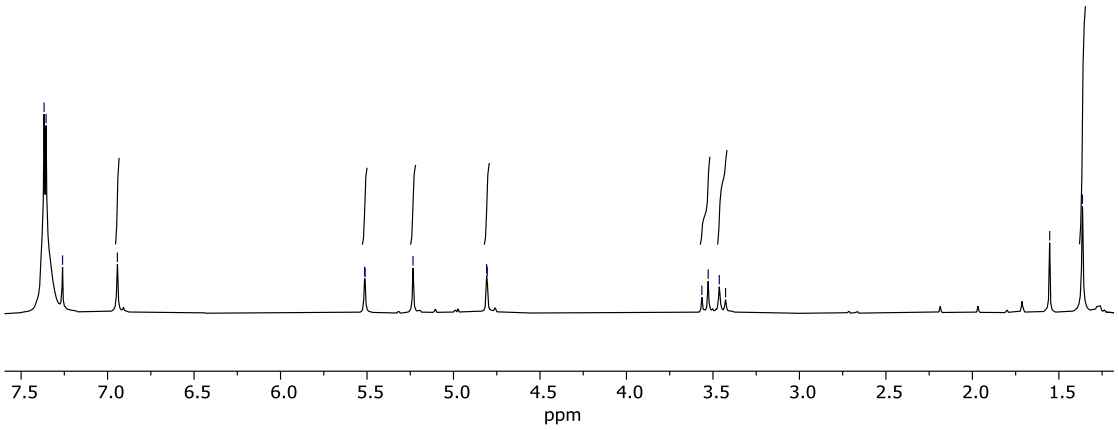


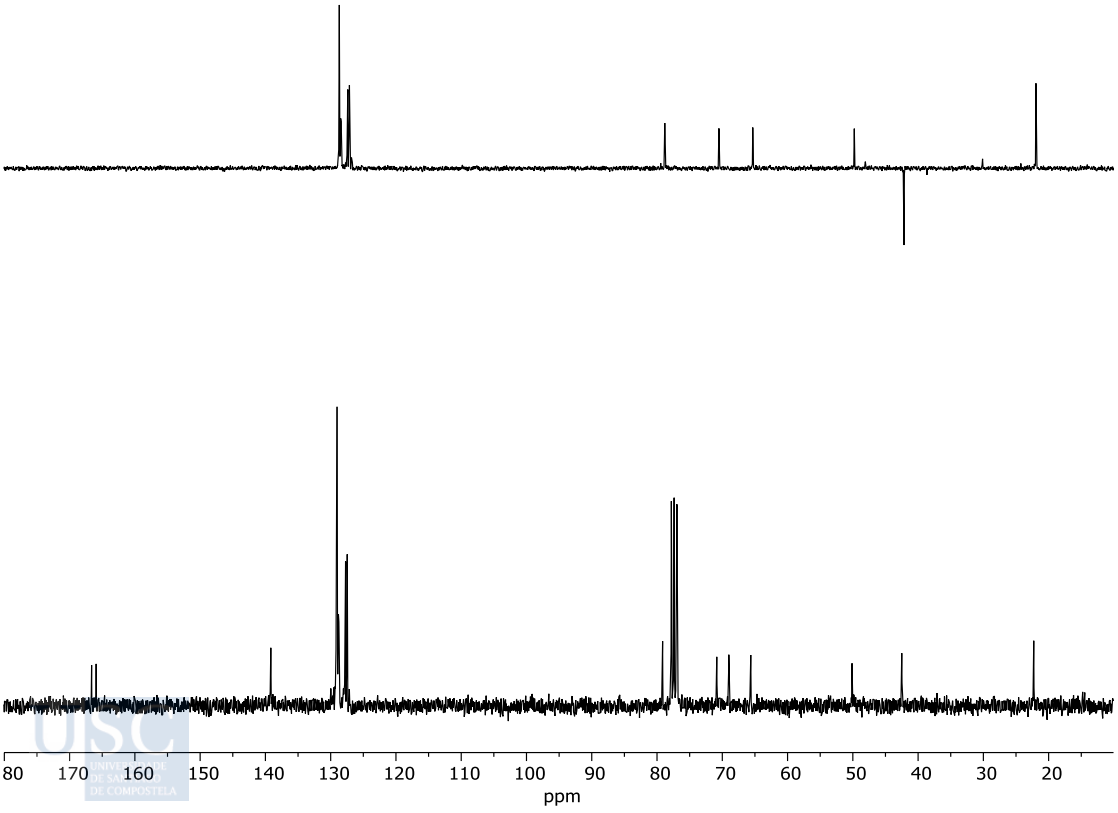


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

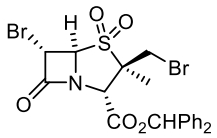


146

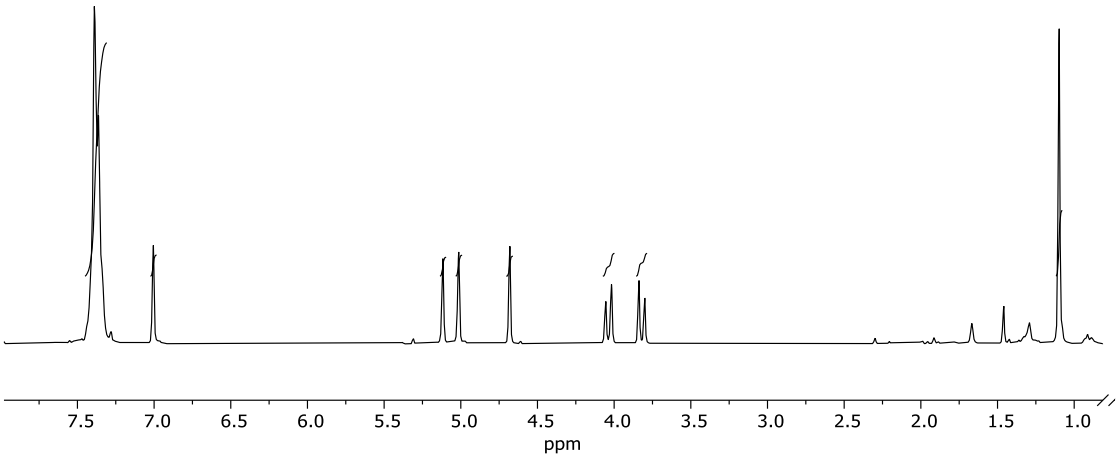




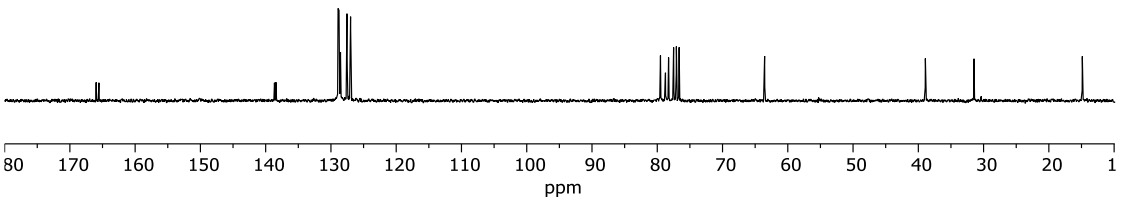
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



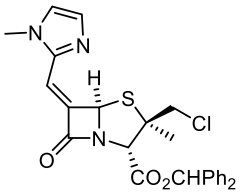
147



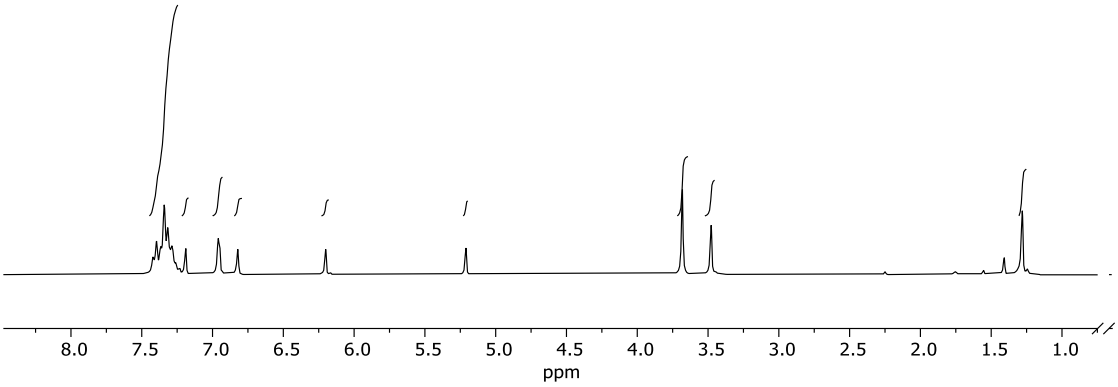


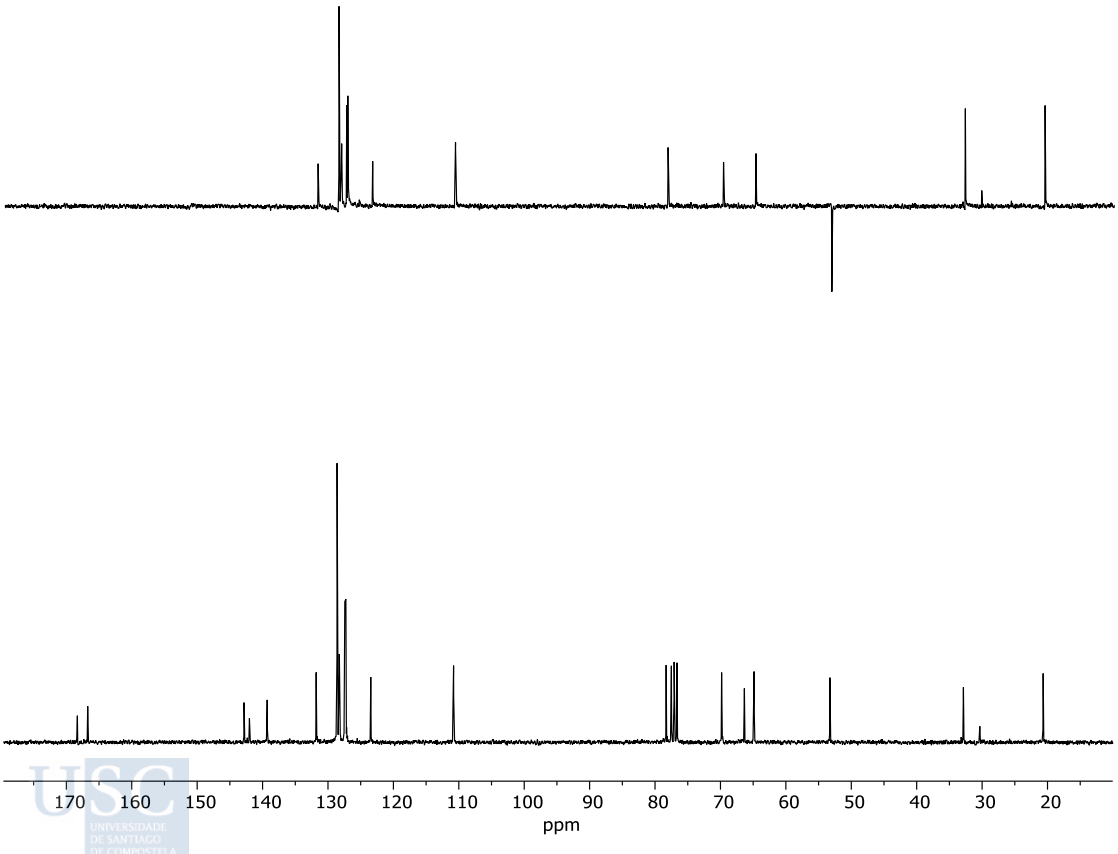


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

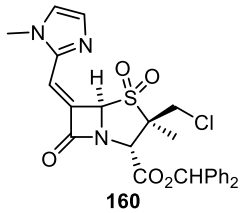


154

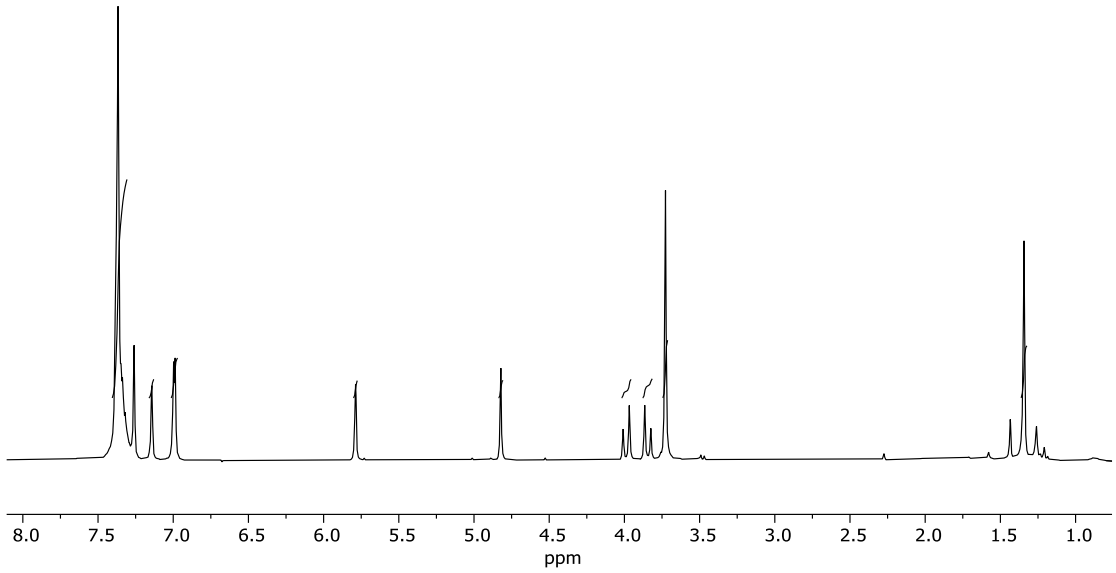




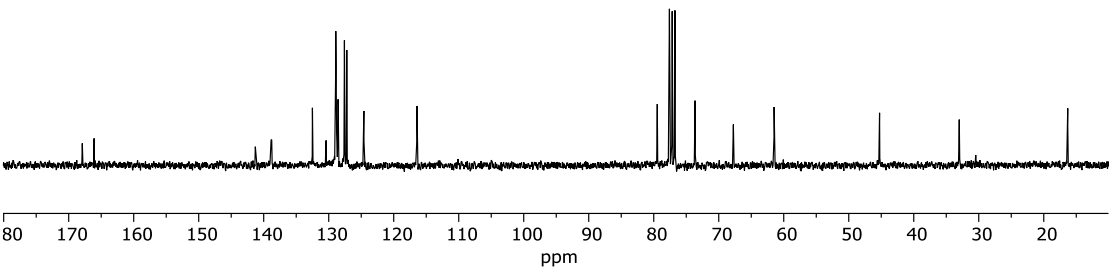
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



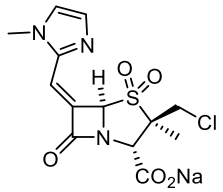
160



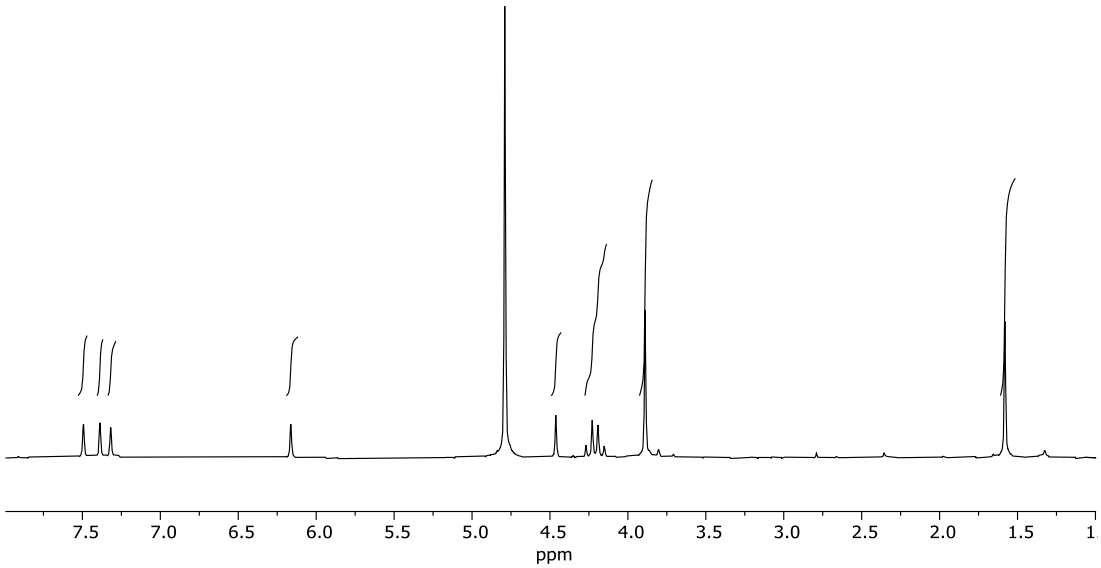




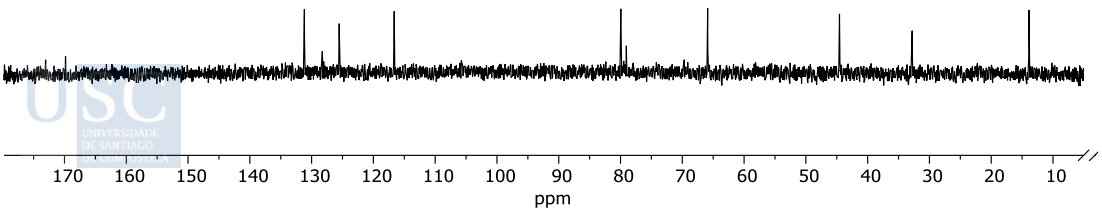
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



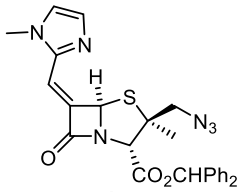
161



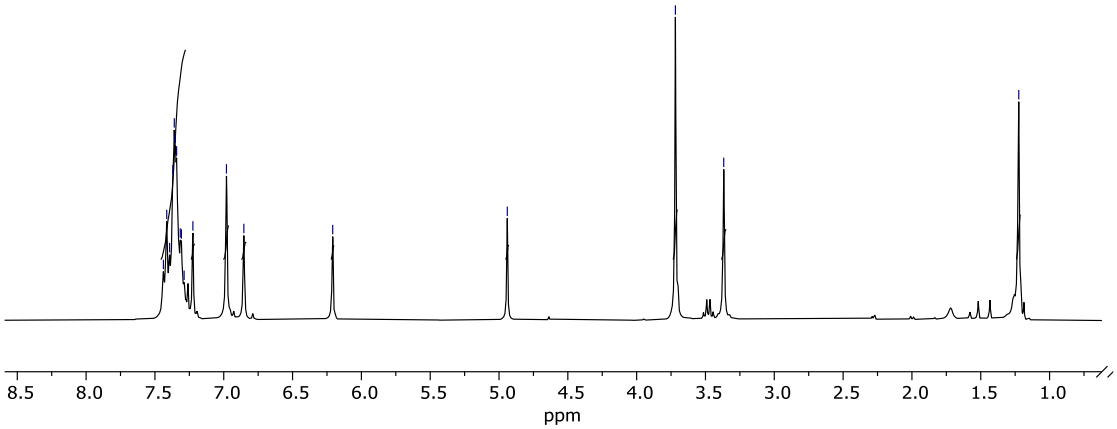




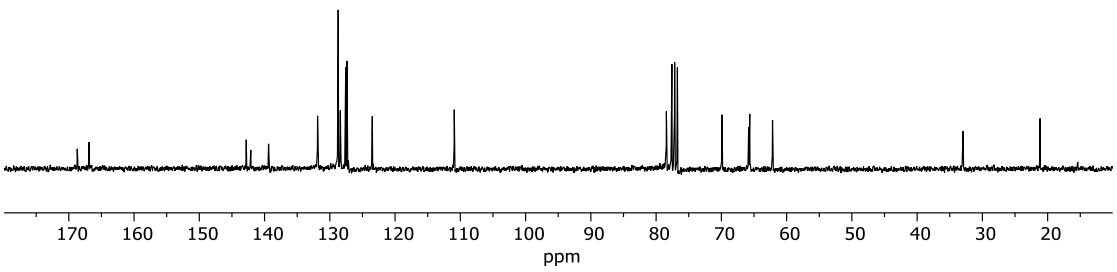
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



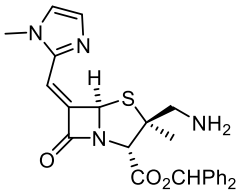
155



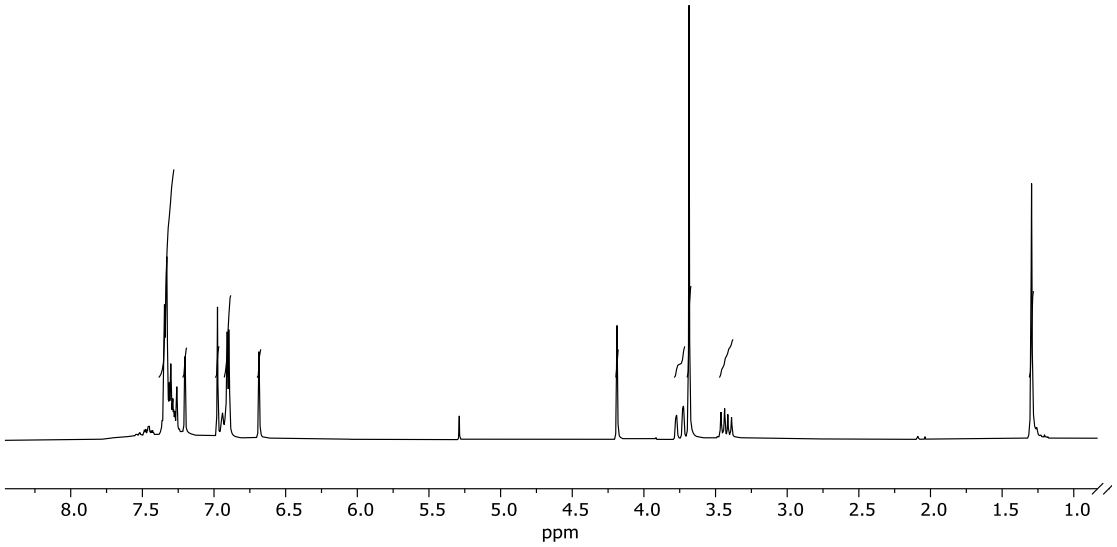


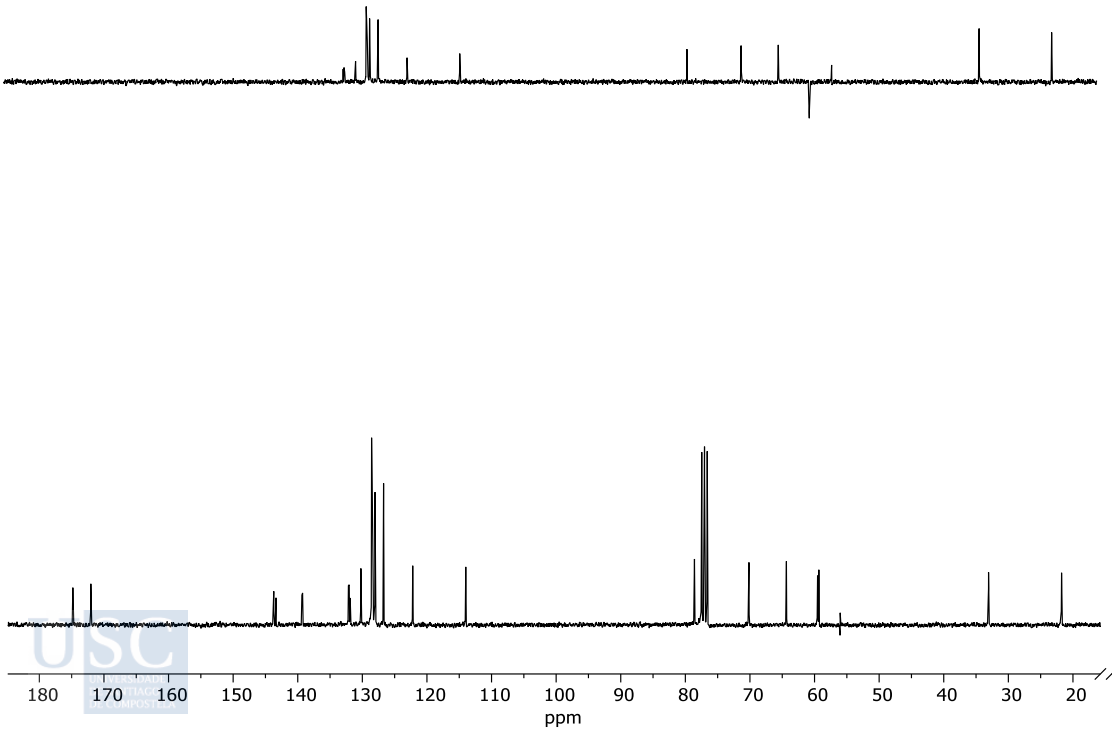


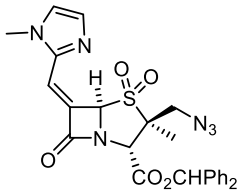
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA


N
N
H
S
NH2
N
O
CO2CHPh2

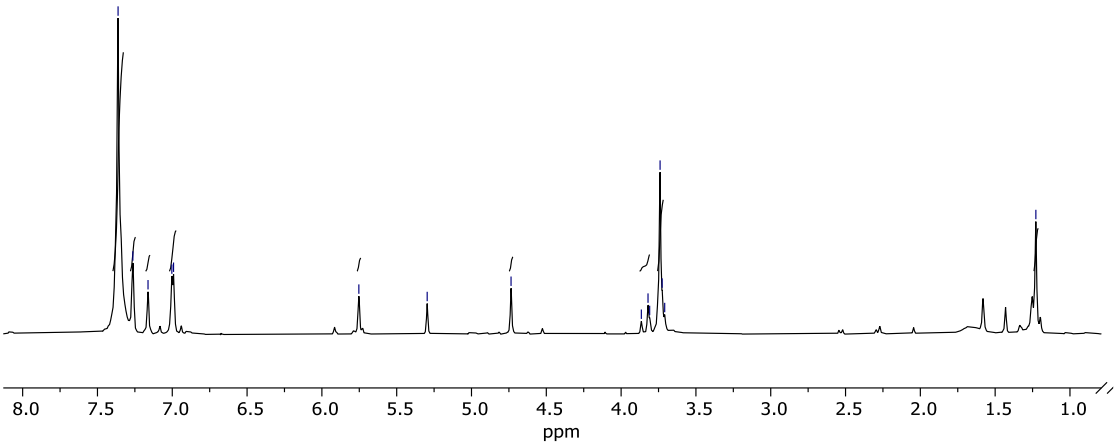
157


8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm

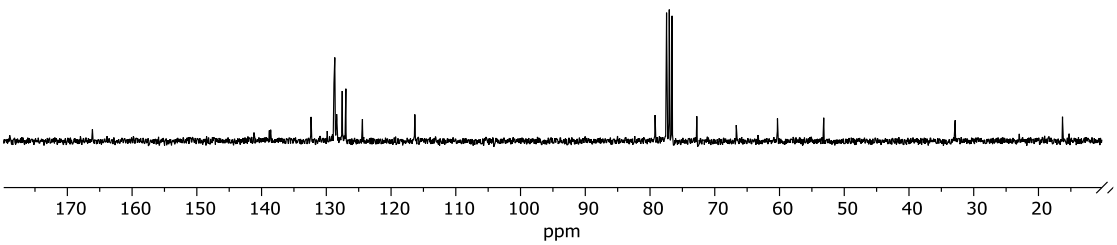

180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm



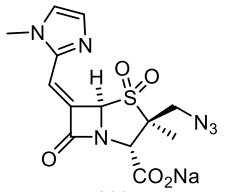
162



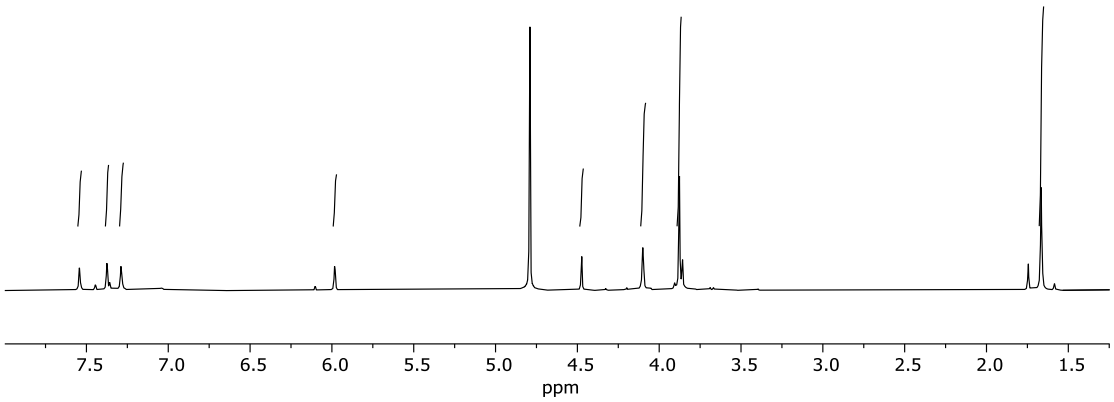




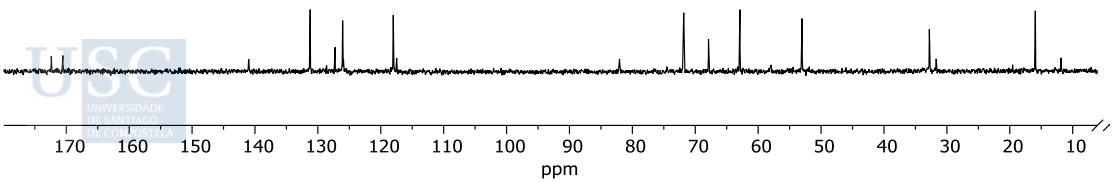
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



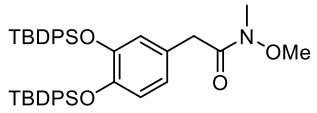
163



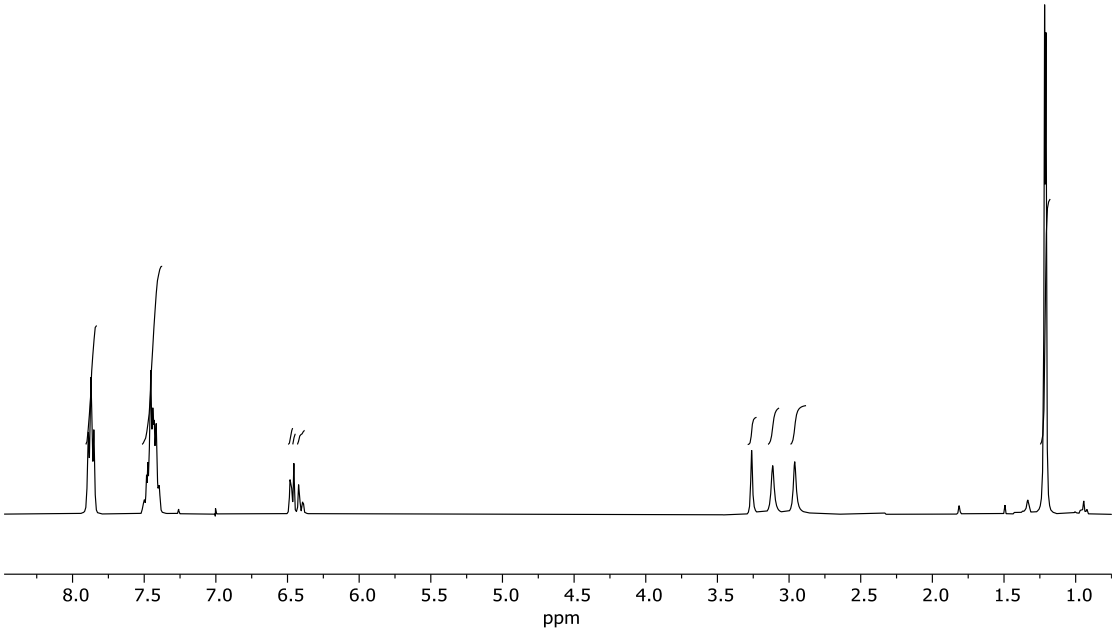


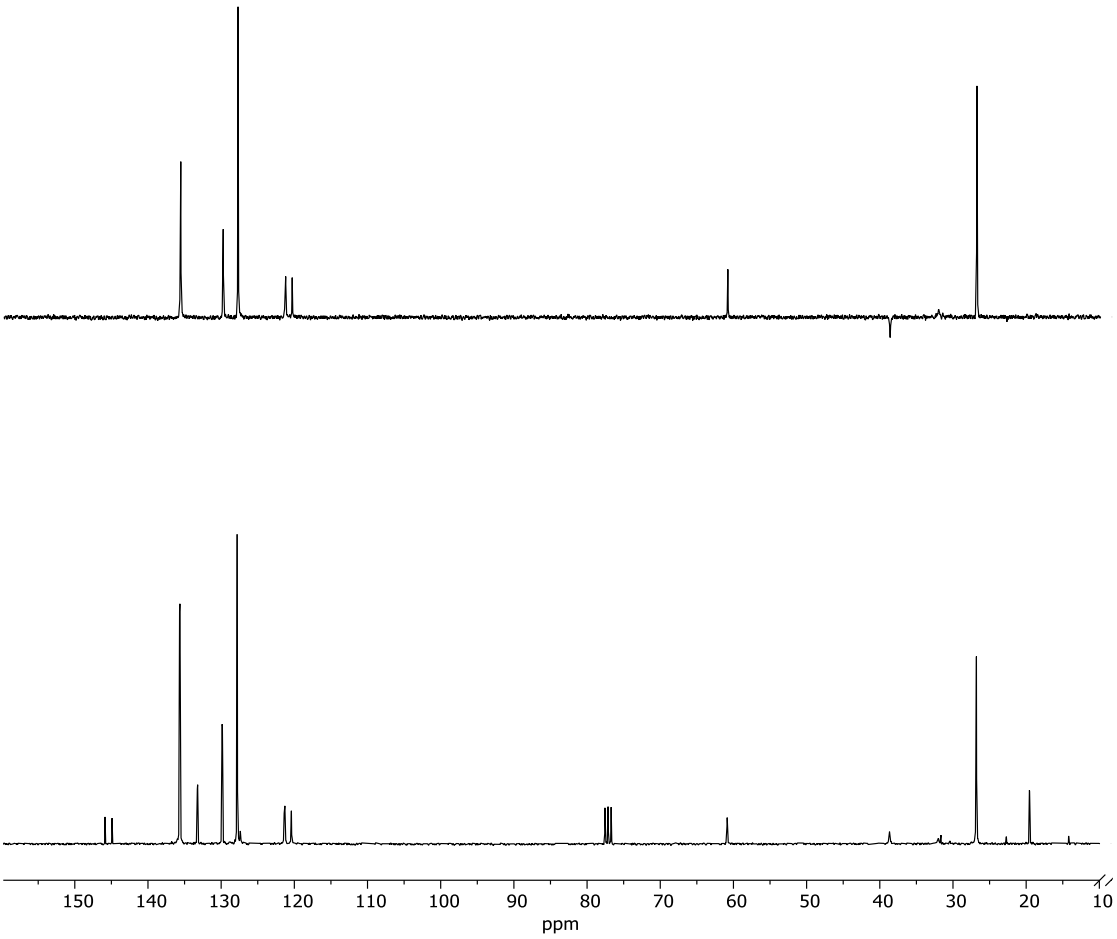


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

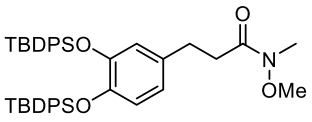


168

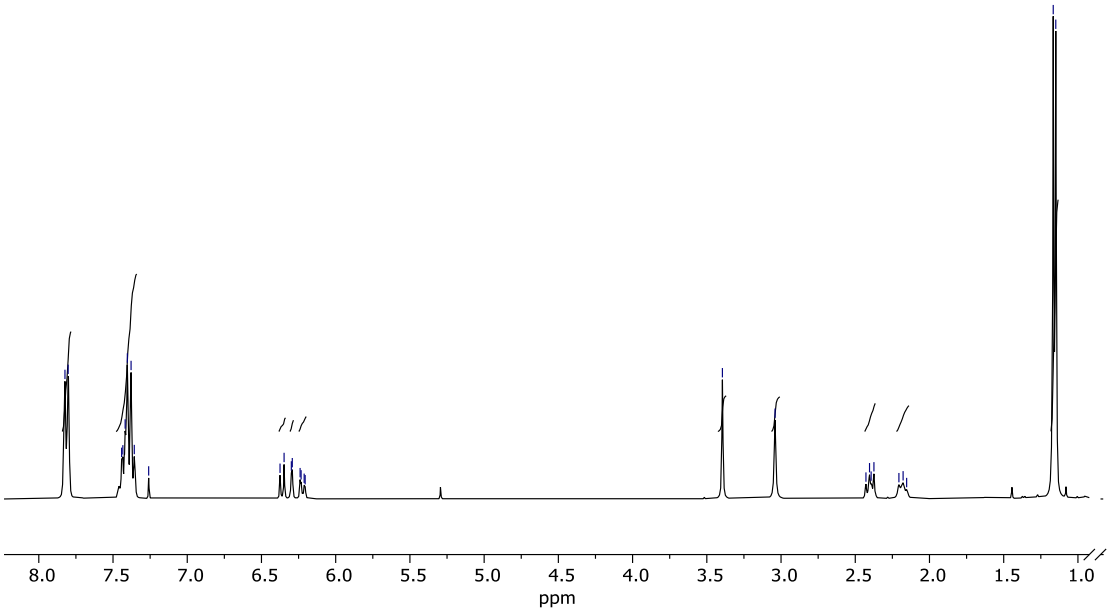


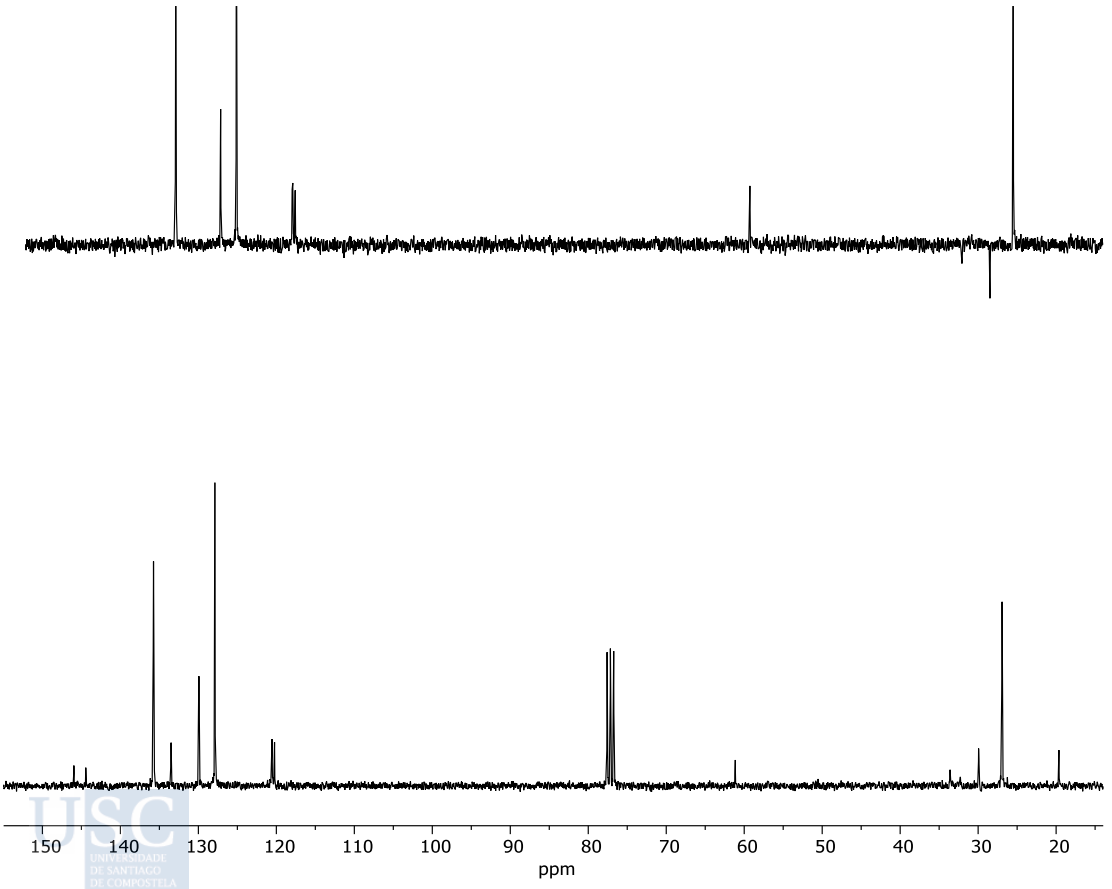


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

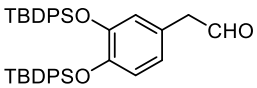


169

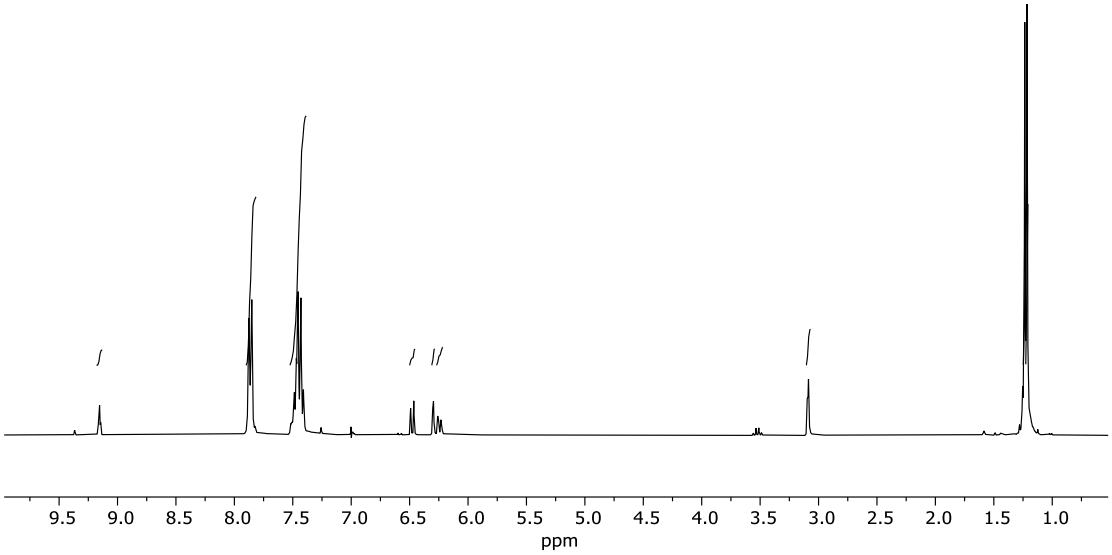


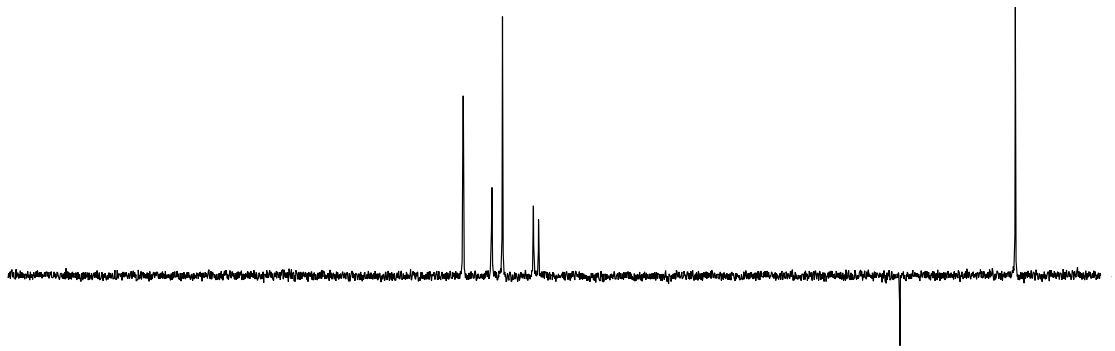


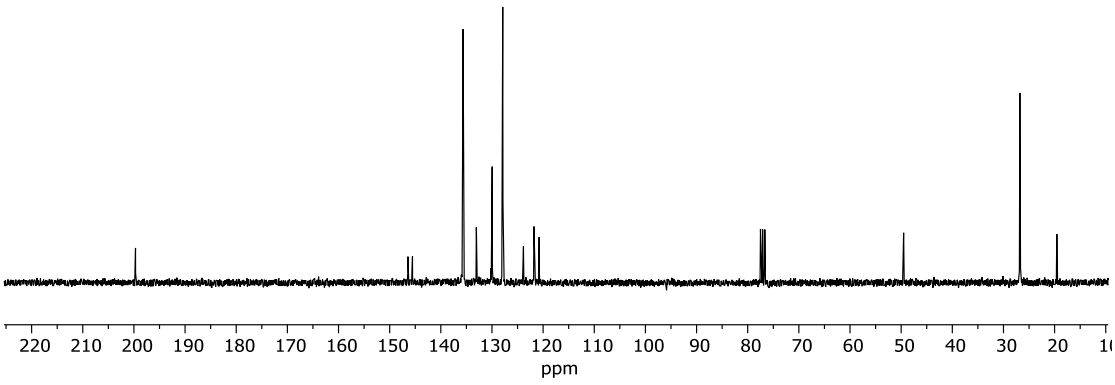
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



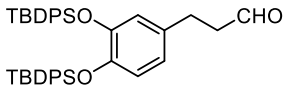
170



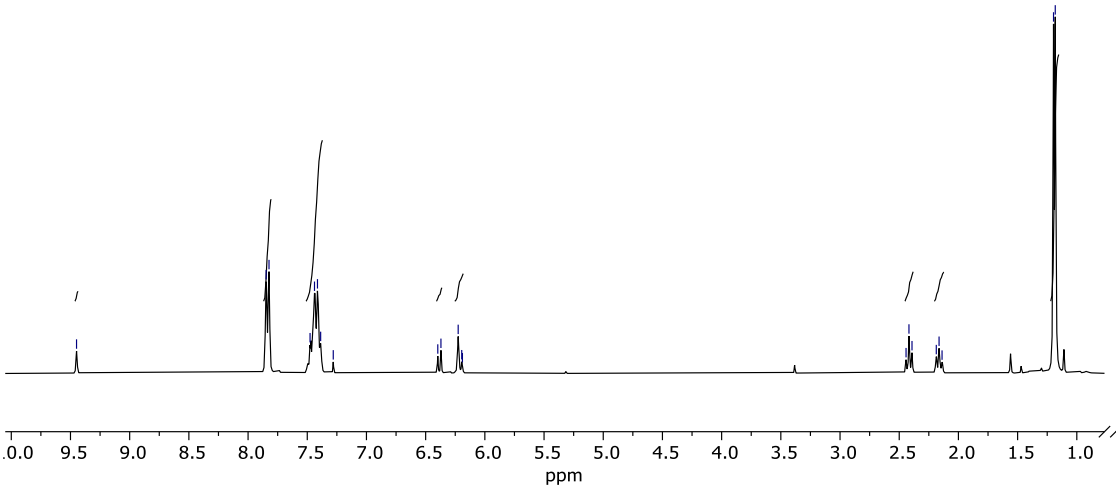


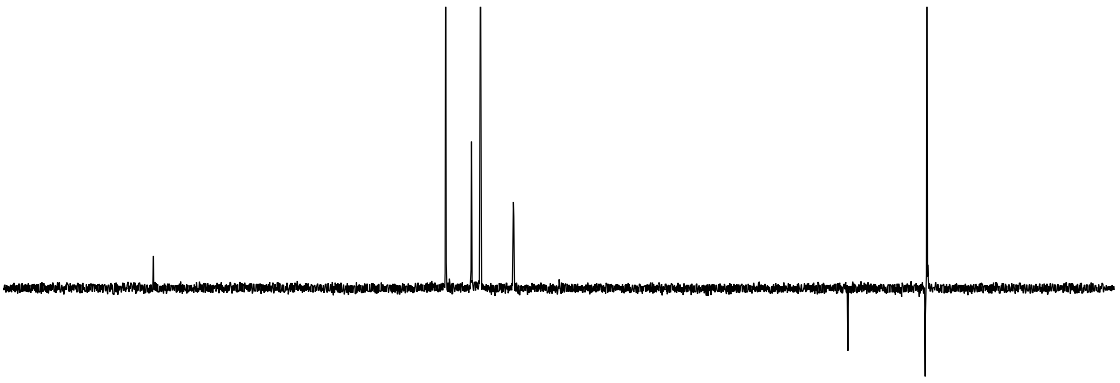


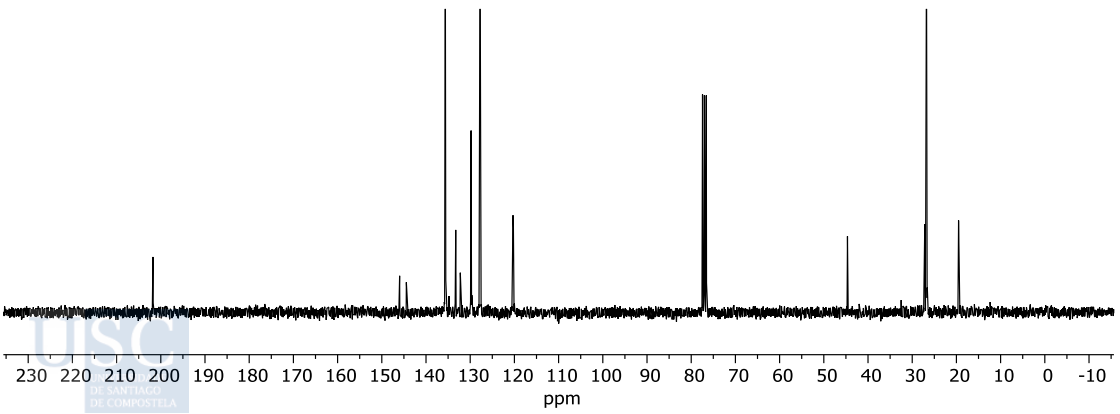
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



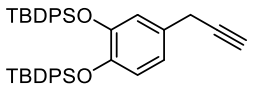
171



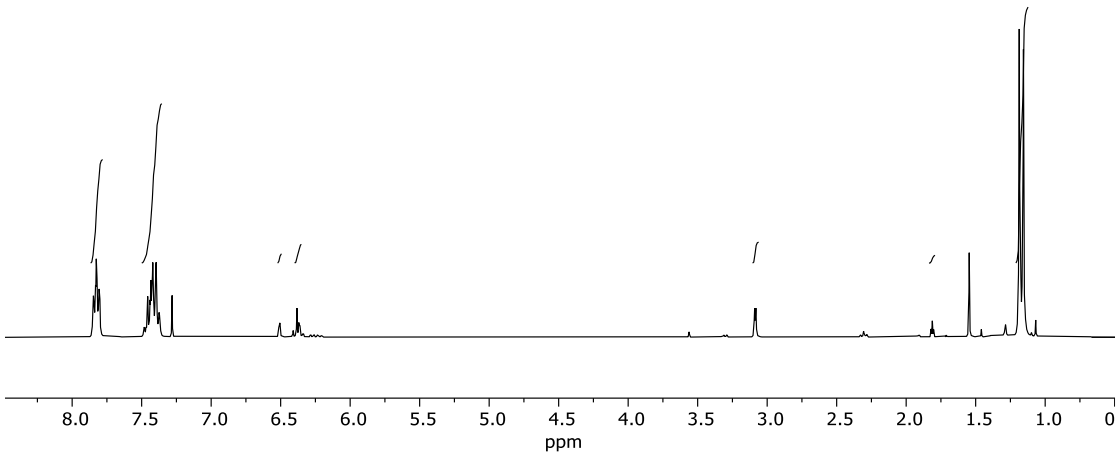




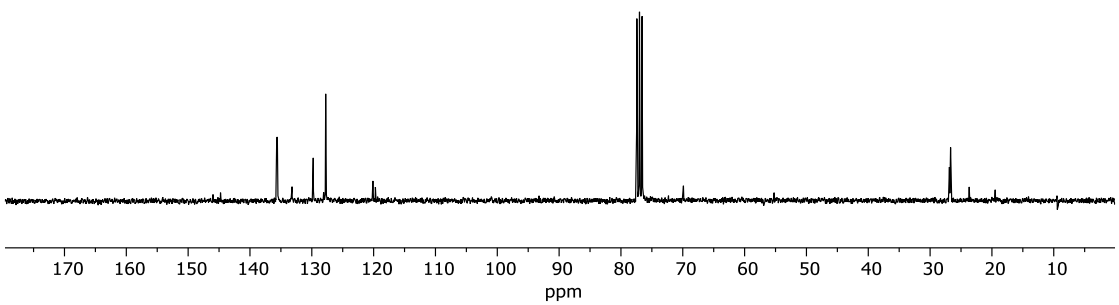
USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



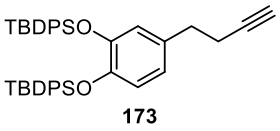
172



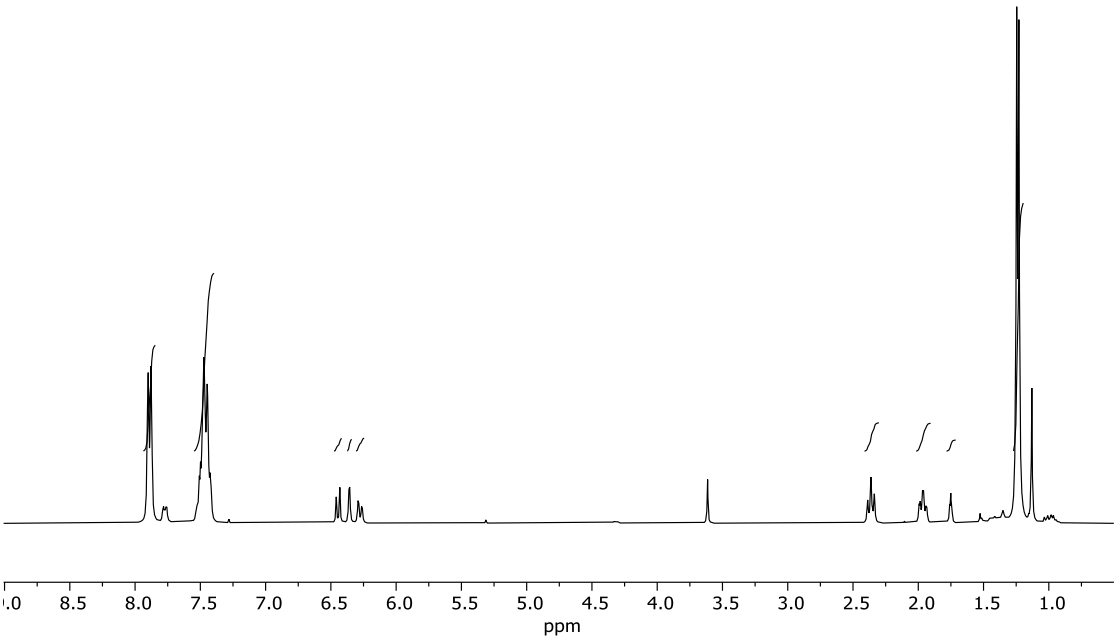


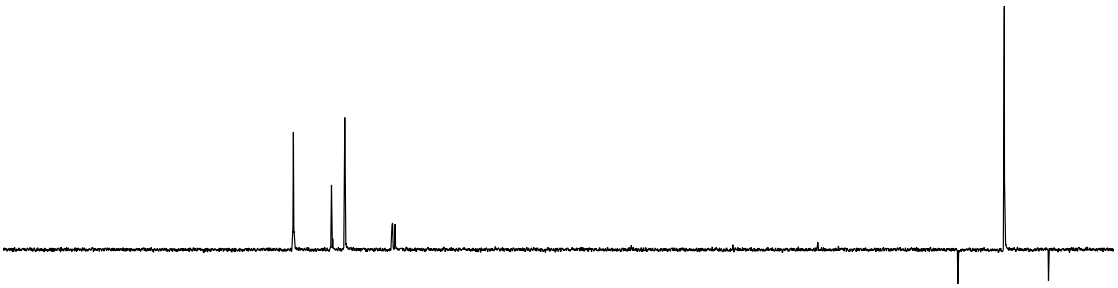


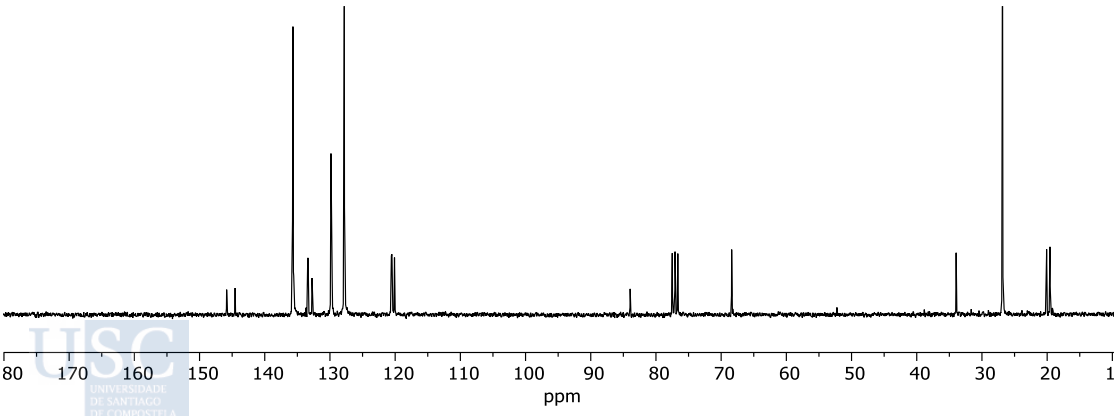
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



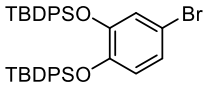
173



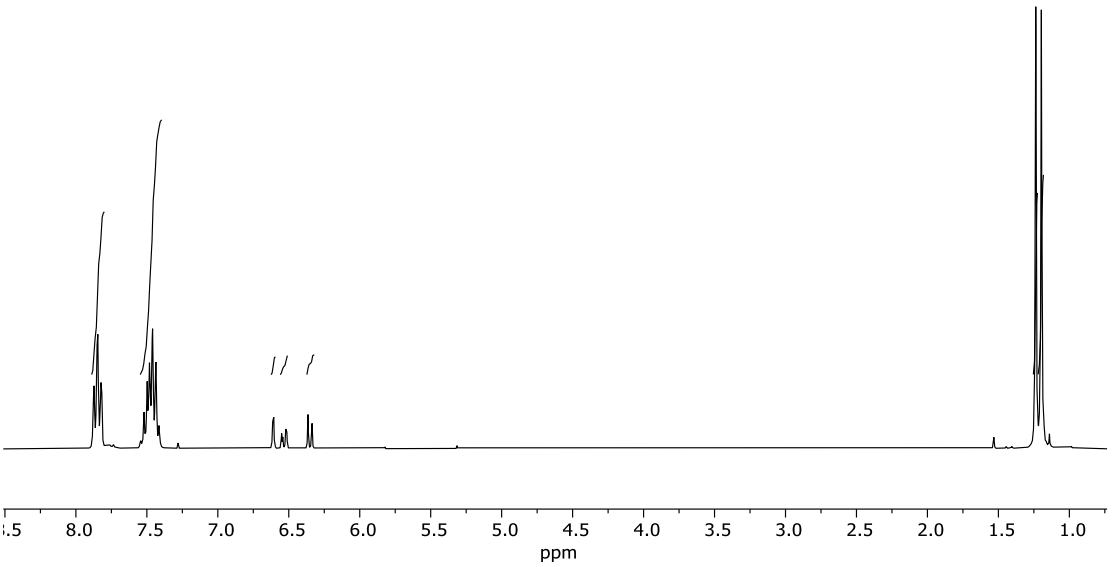




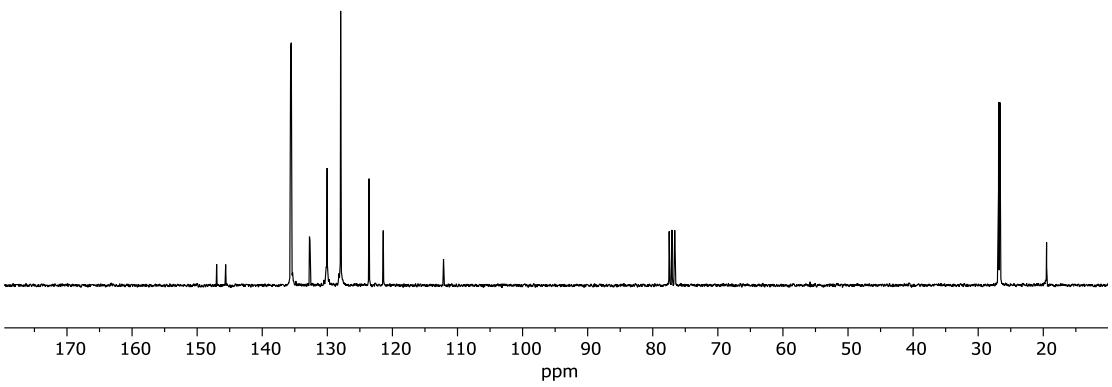
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



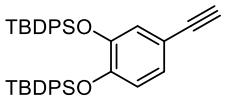
175



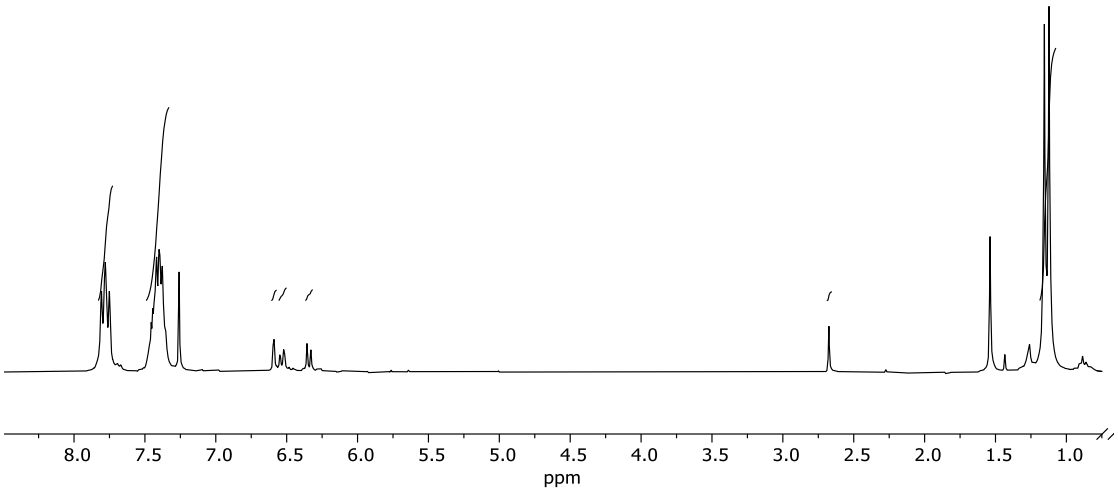


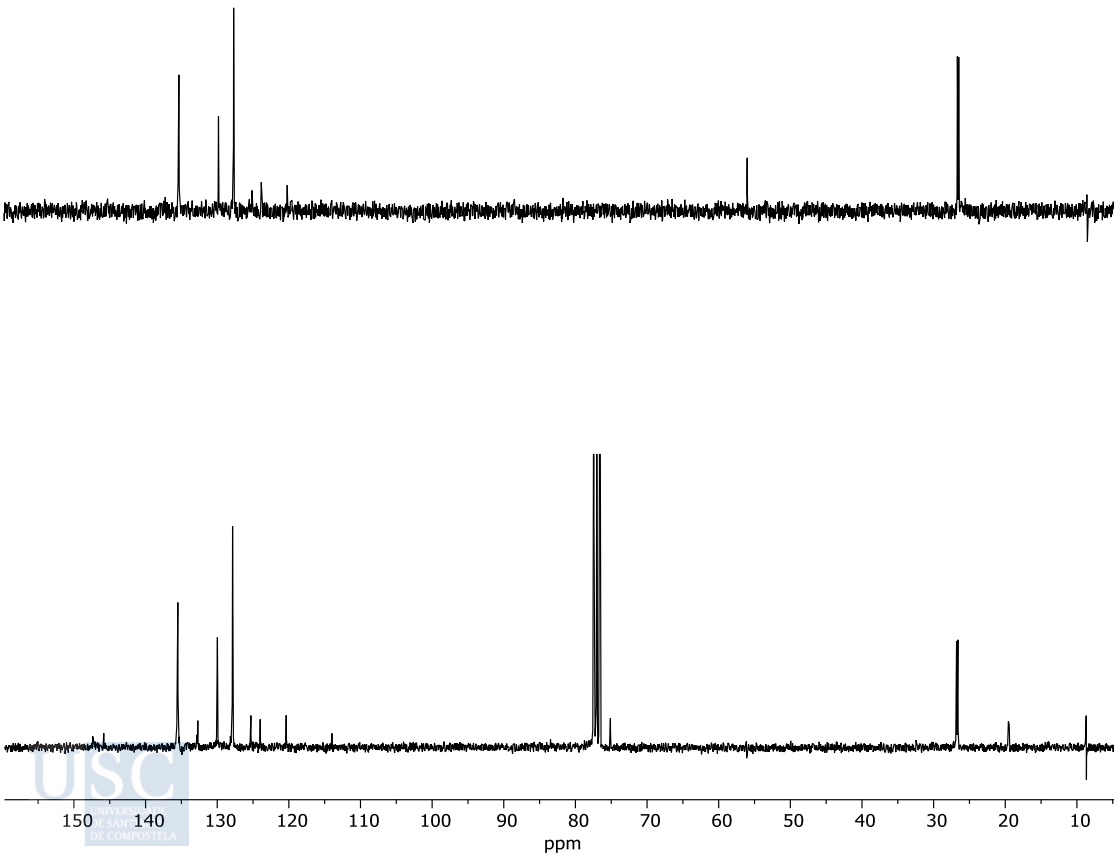


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

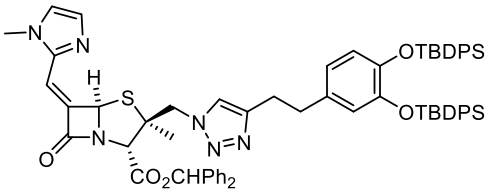


176

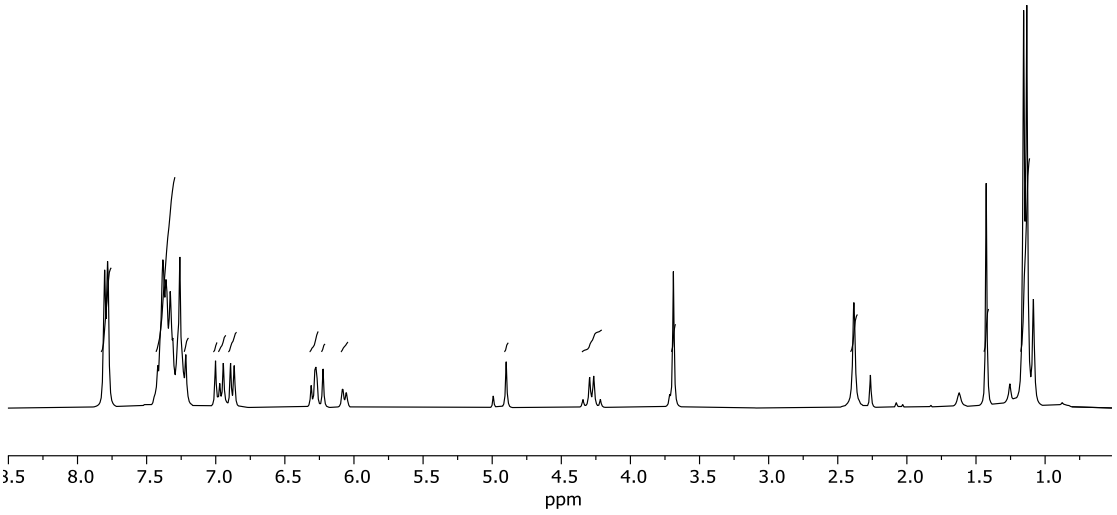


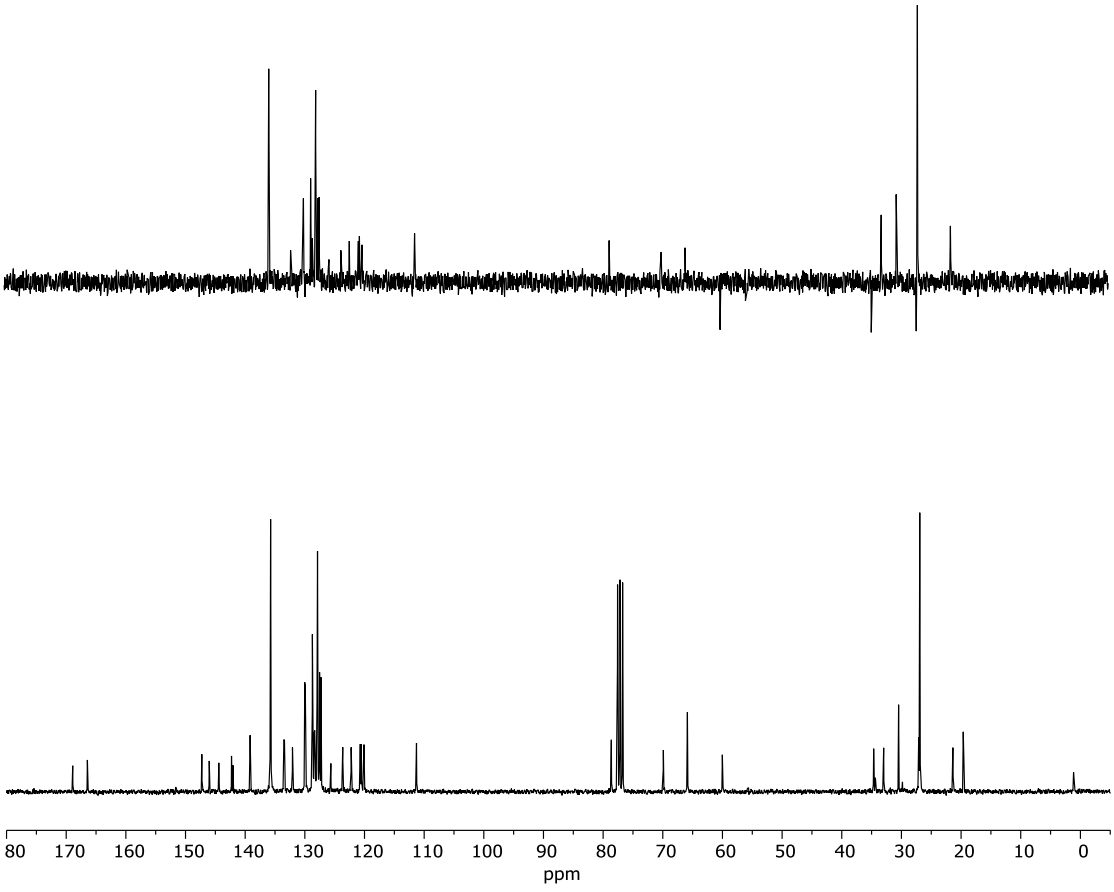


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

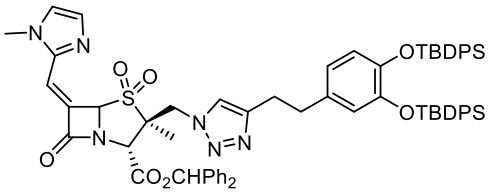


177

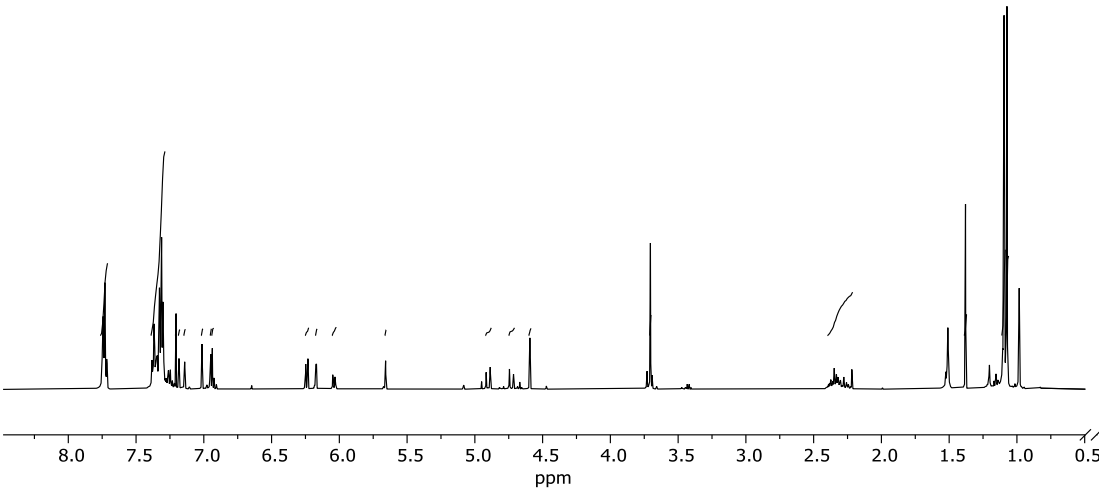


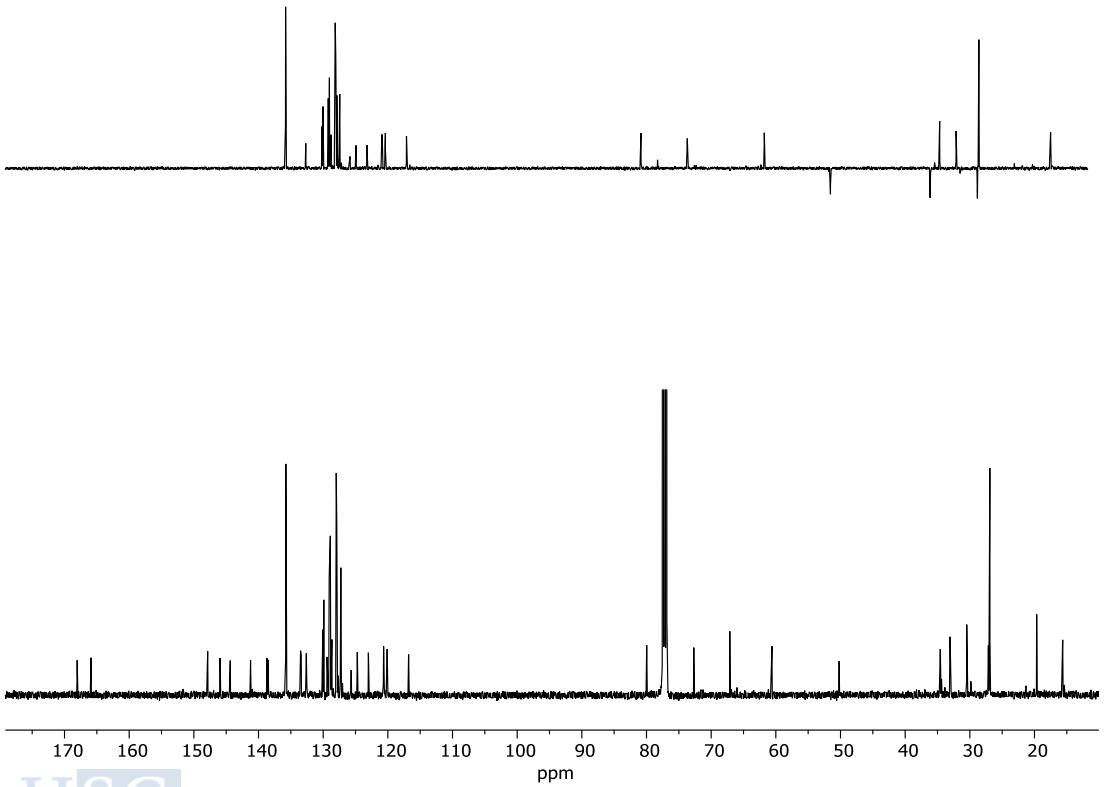


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

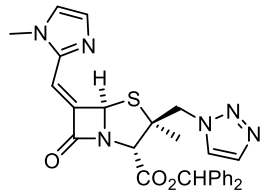


178

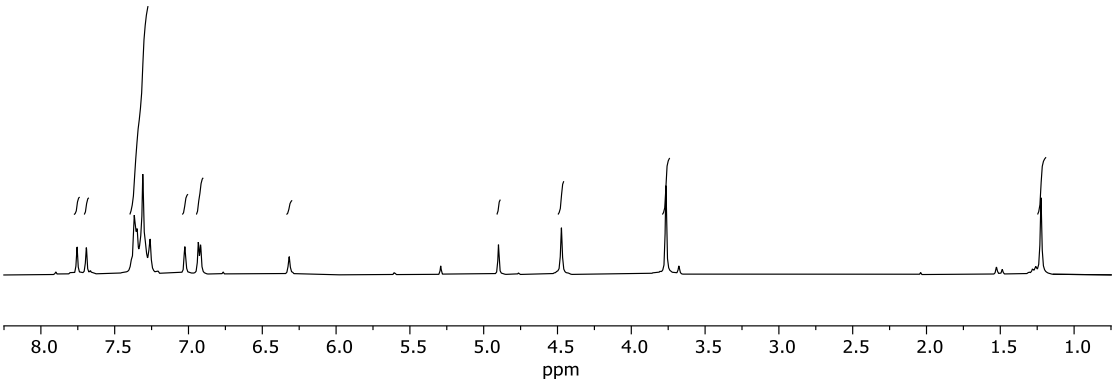




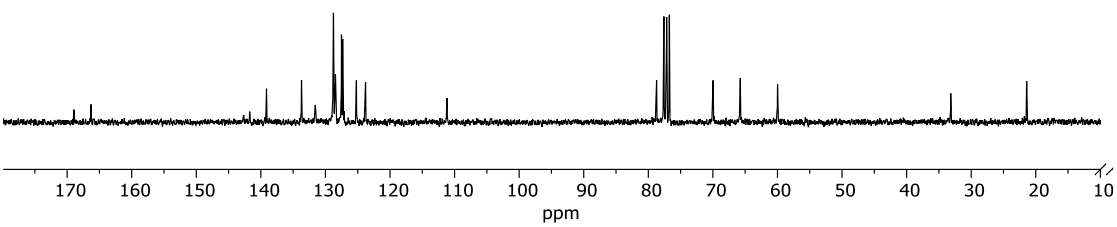
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



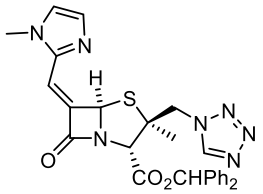
179



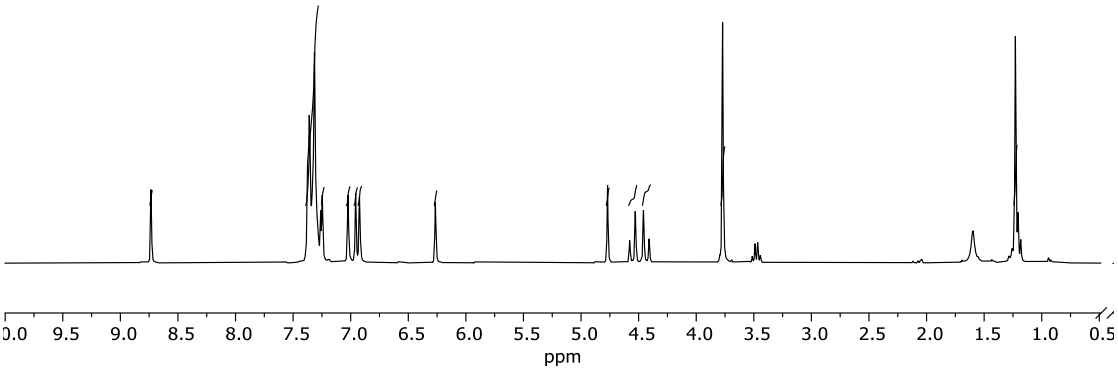




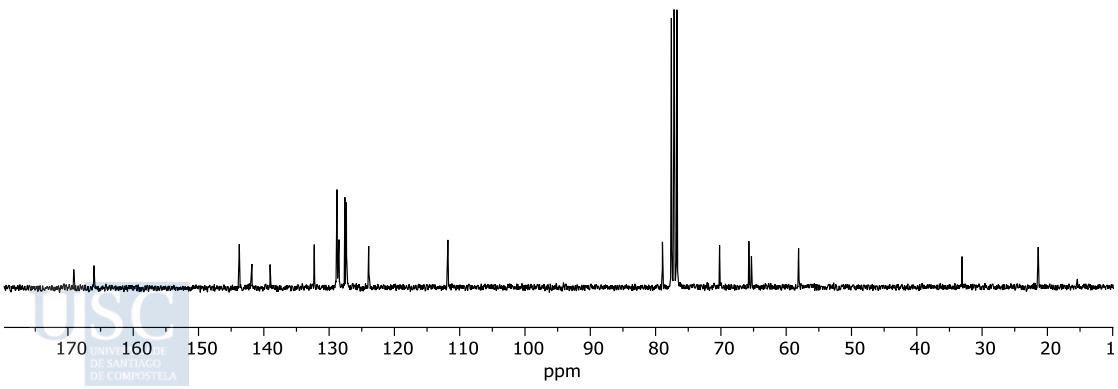
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



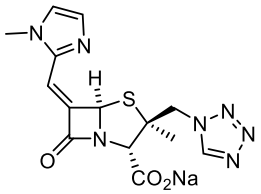
181



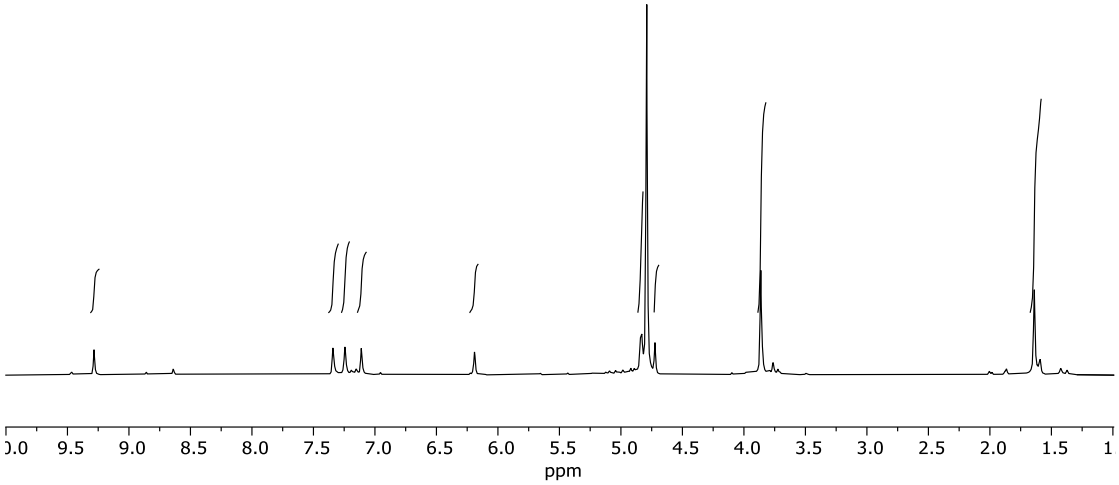




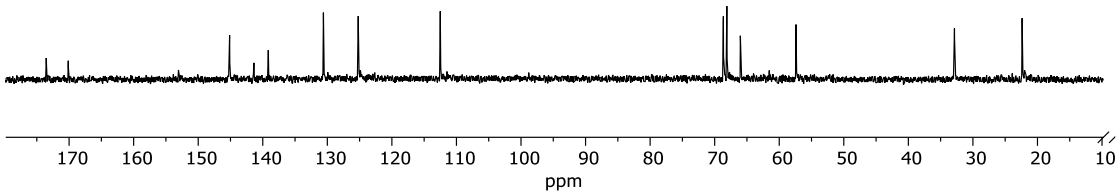
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



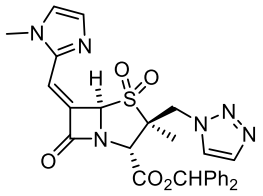
182



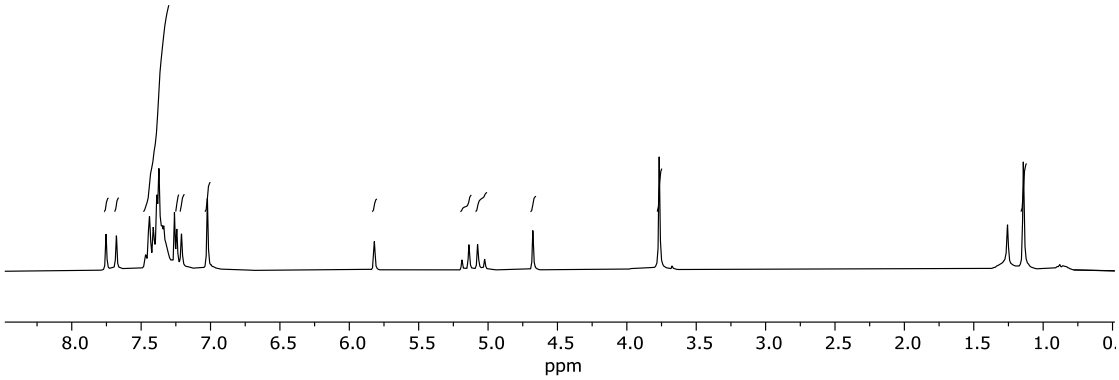


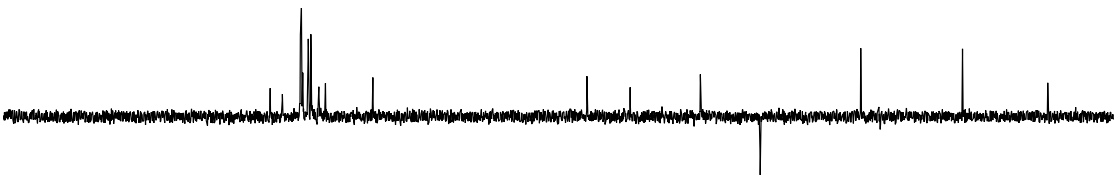


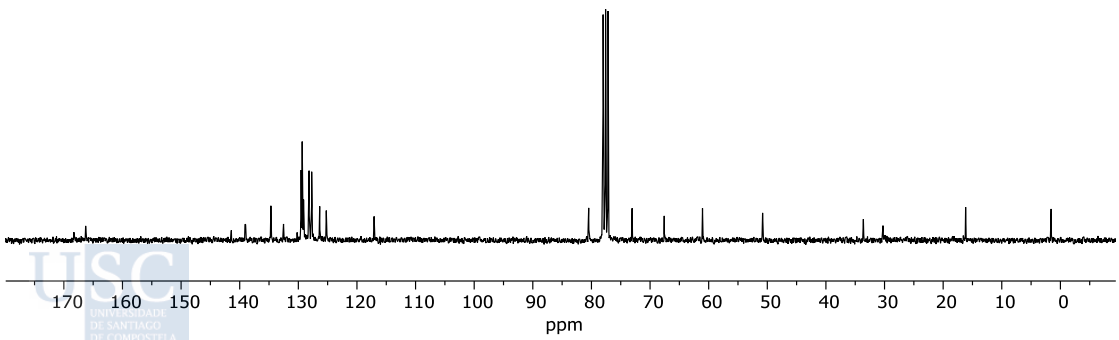
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



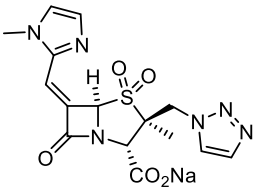
183



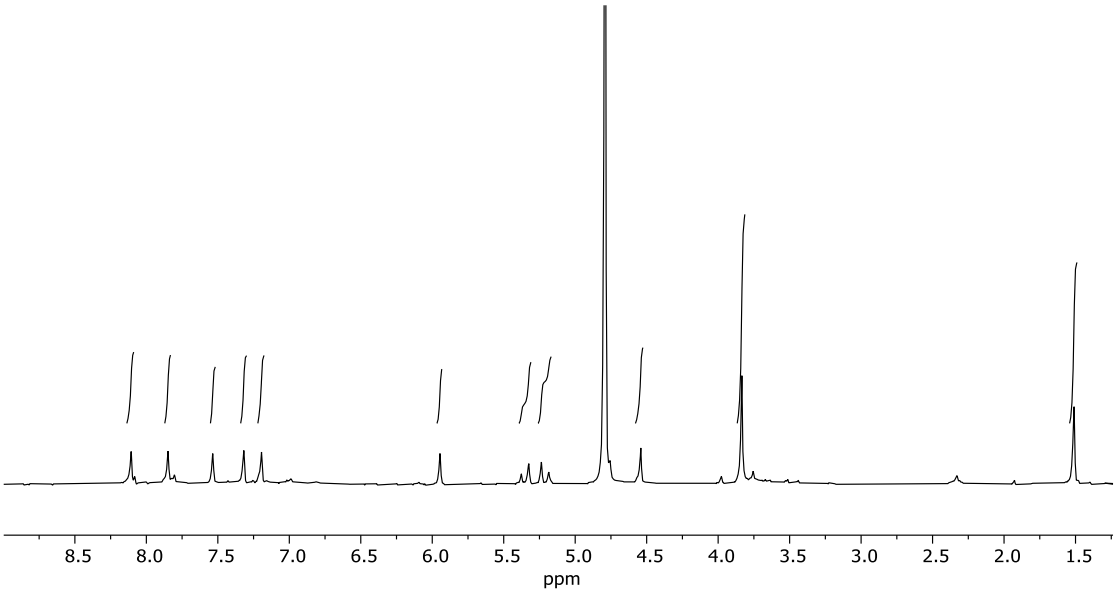




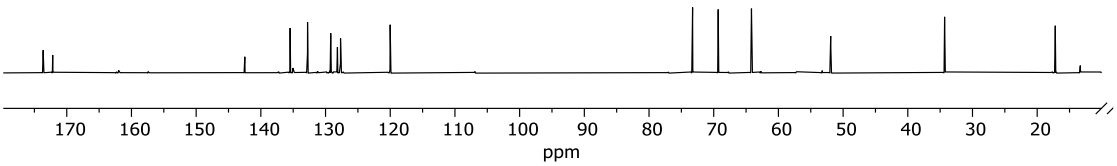
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



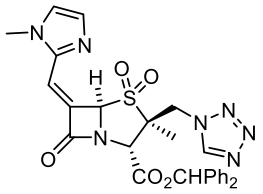
184



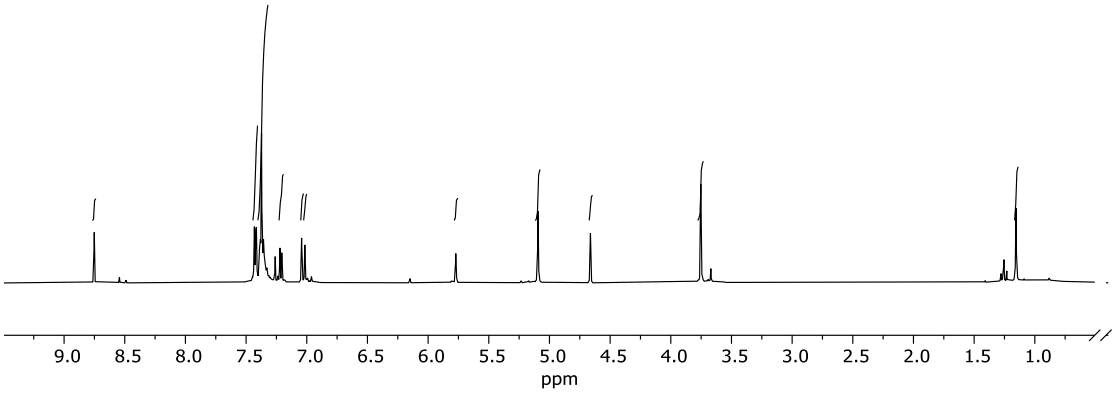


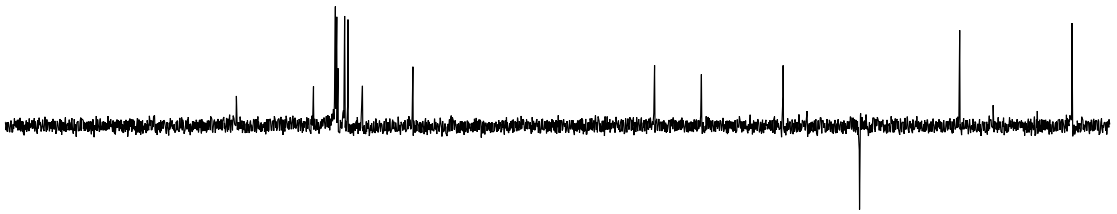


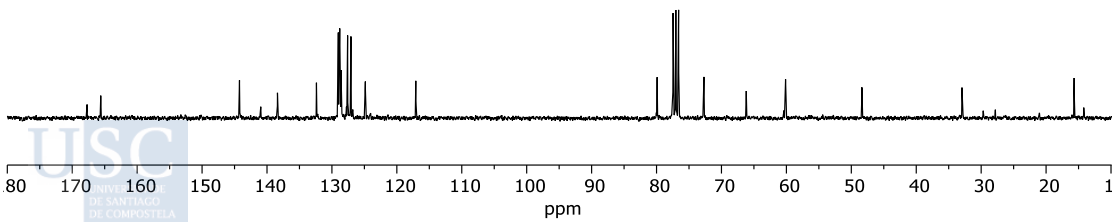
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



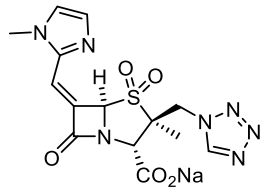
185



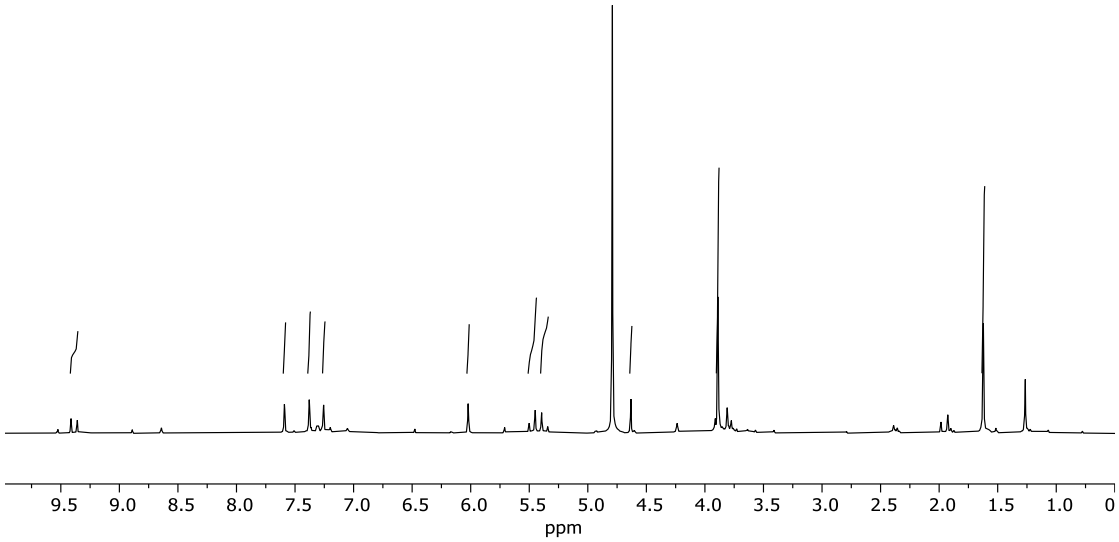


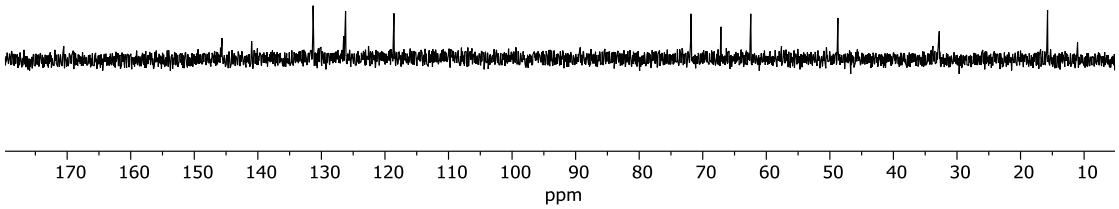


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

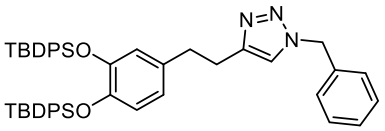


186

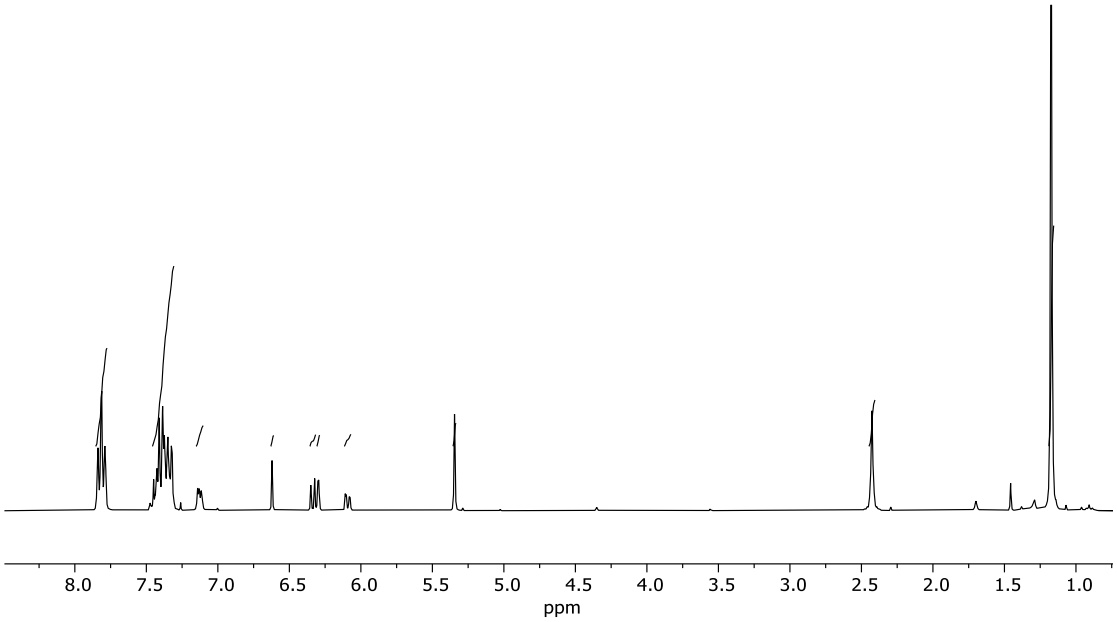


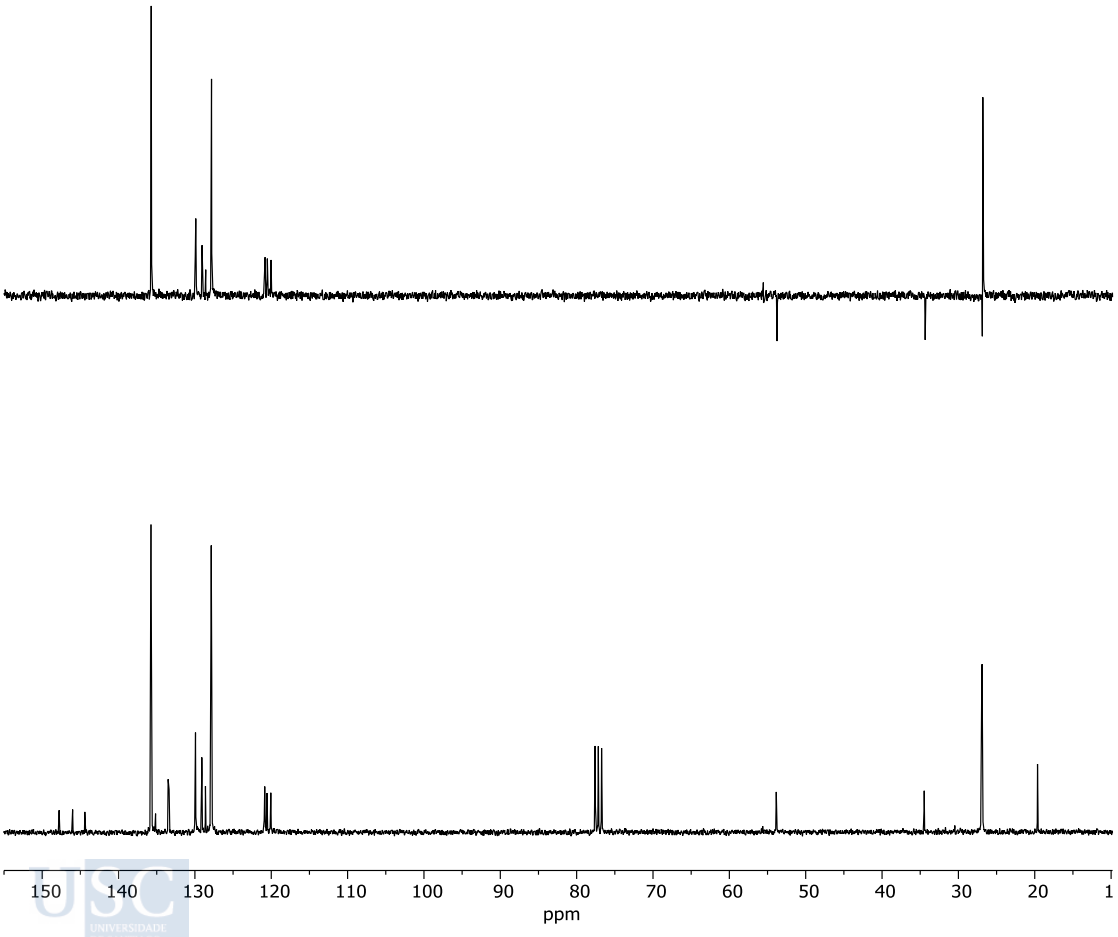


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

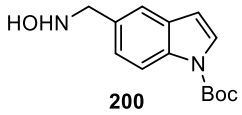


187

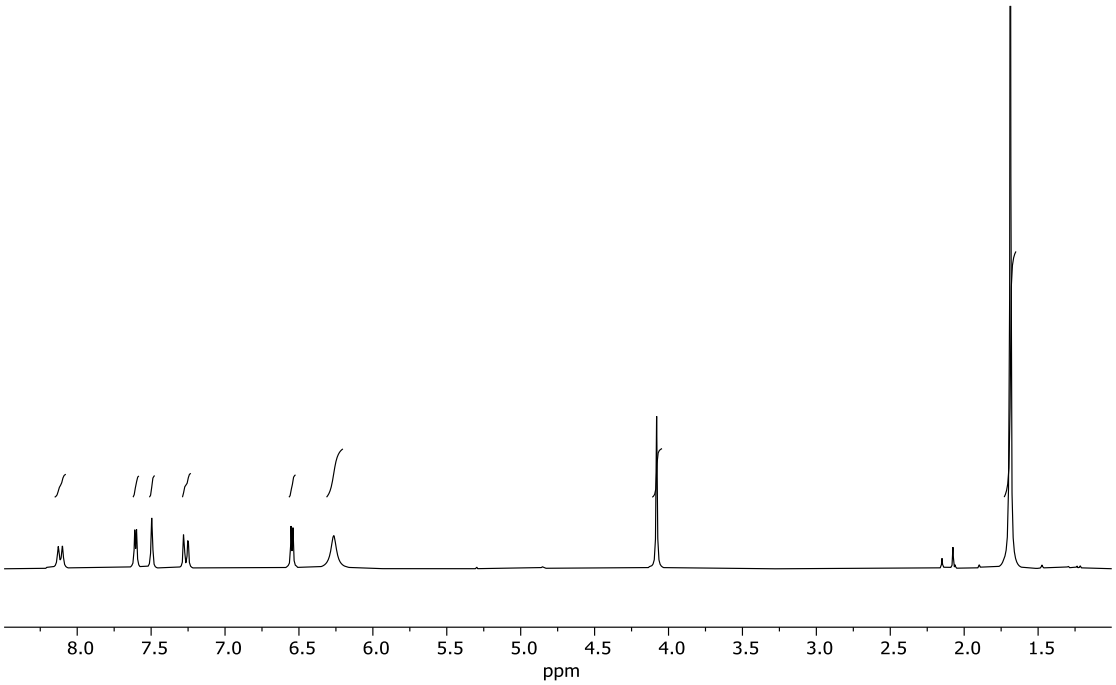


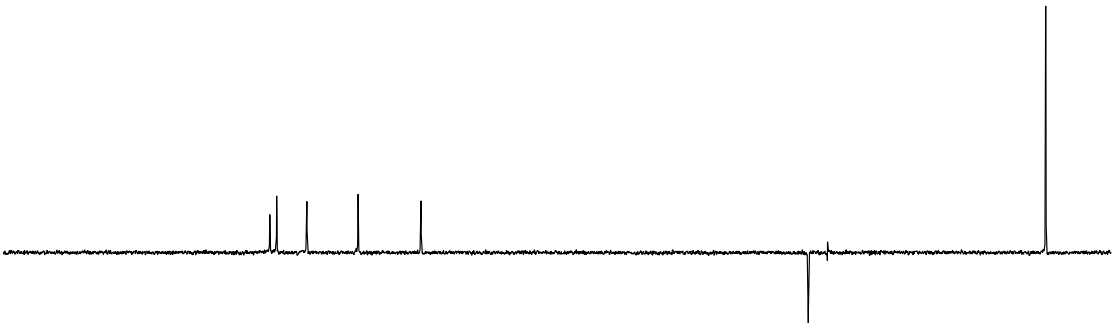


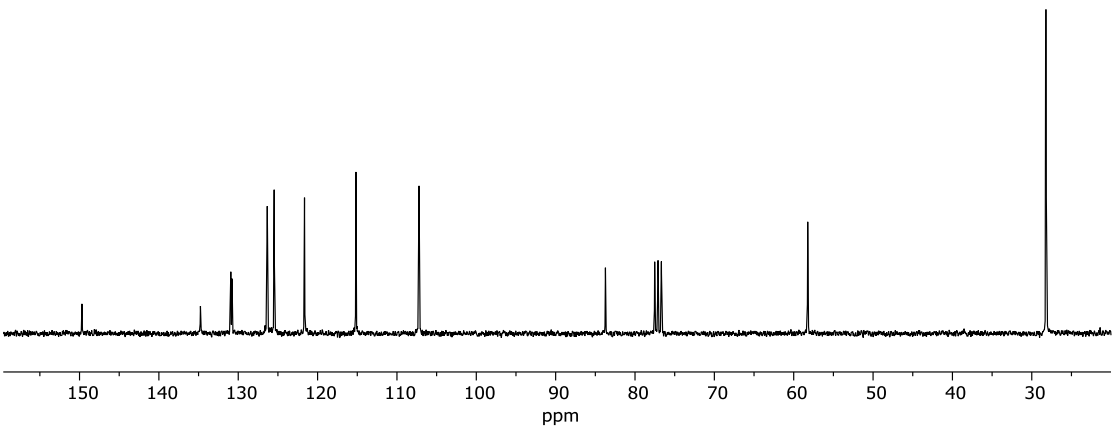
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



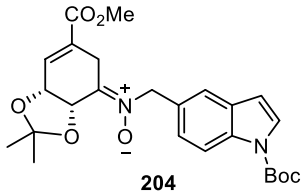
200



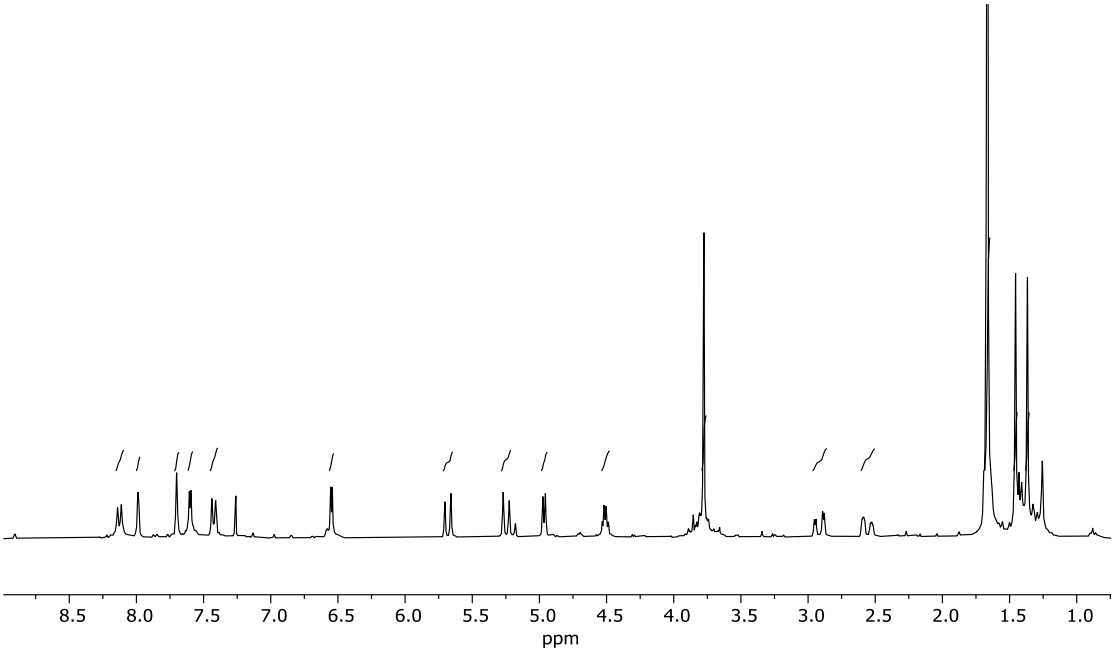


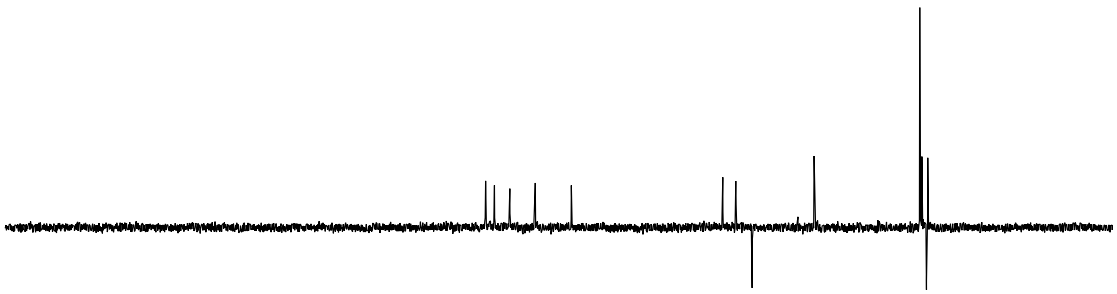


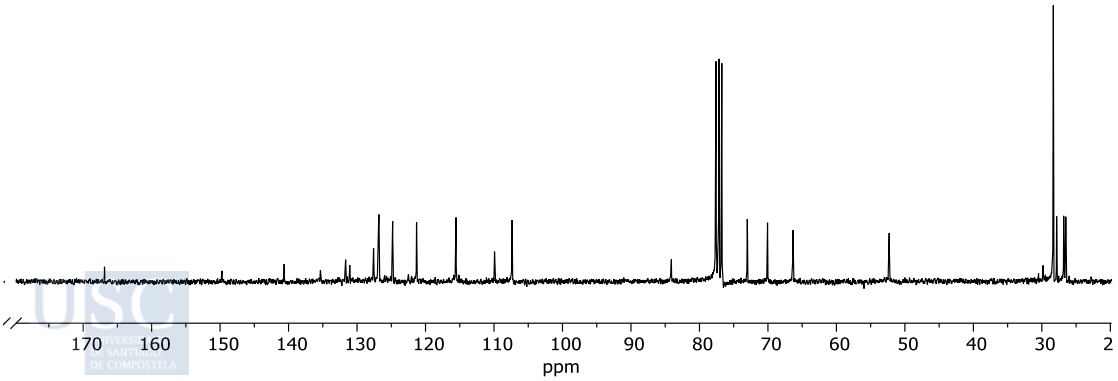
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



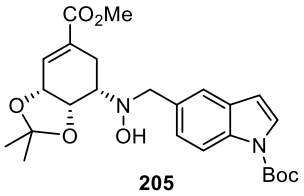
204



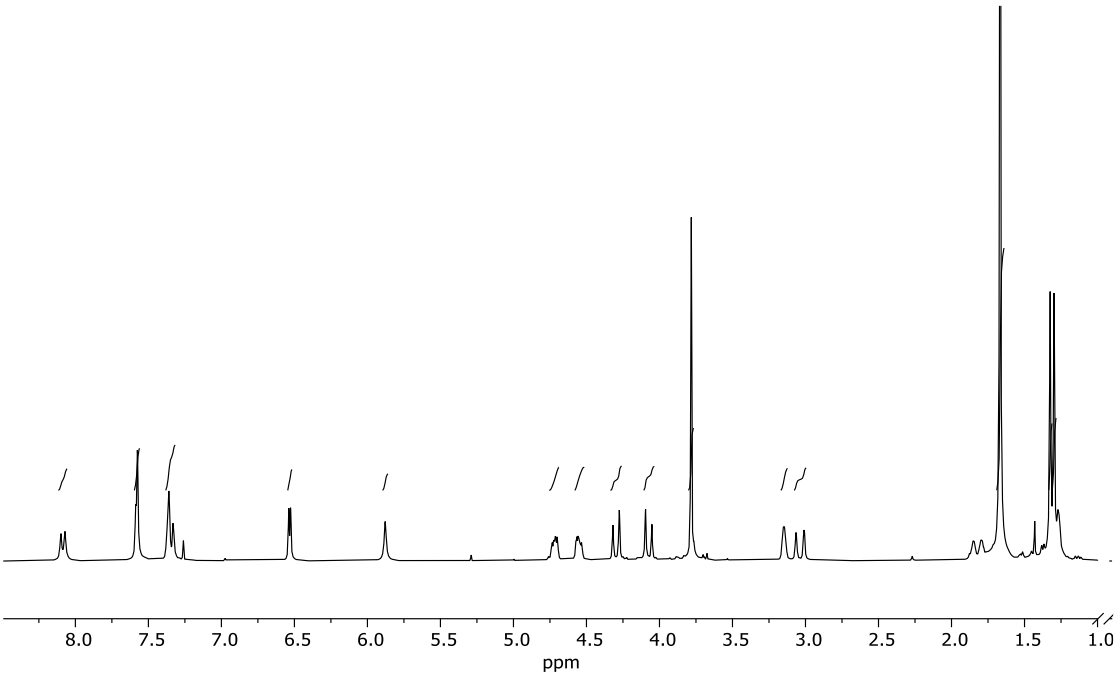


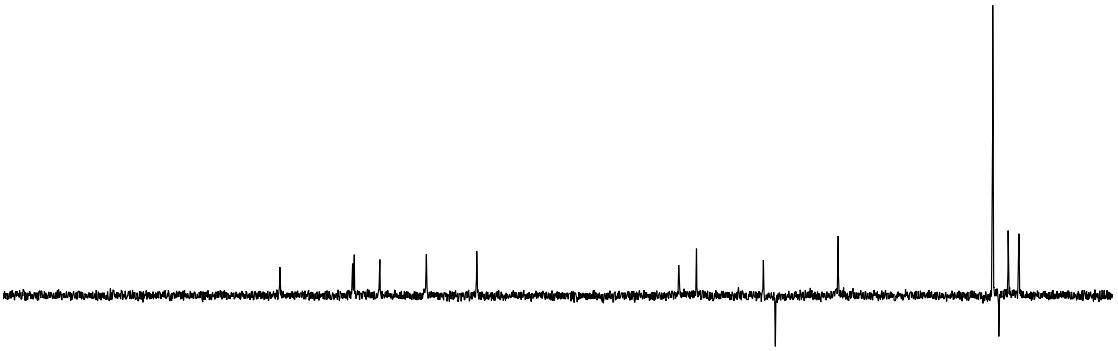


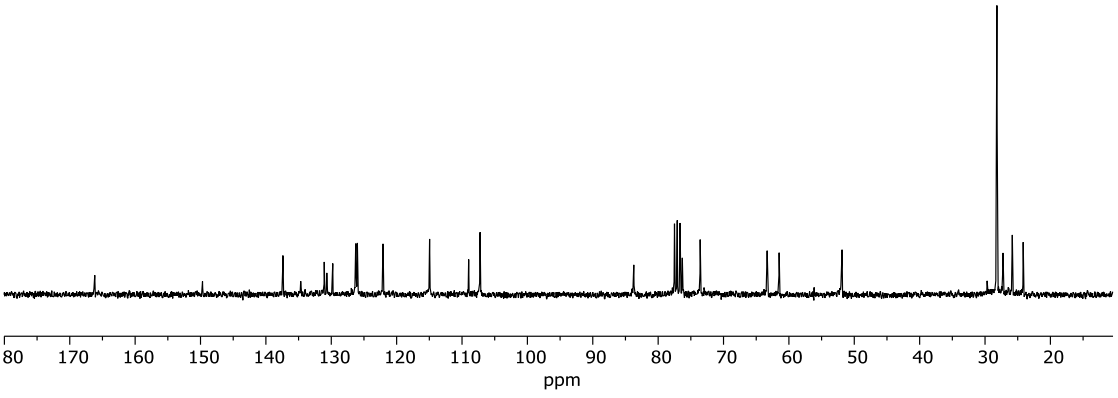
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



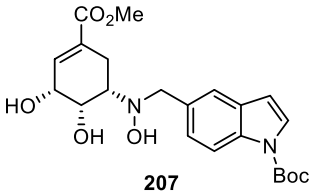
205



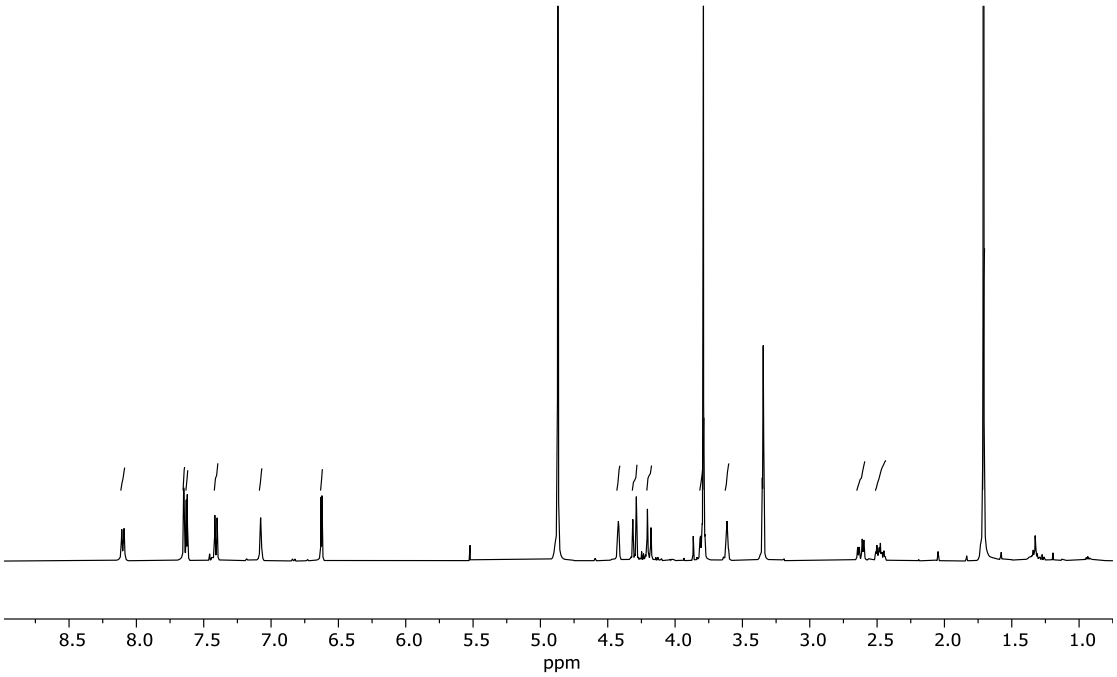


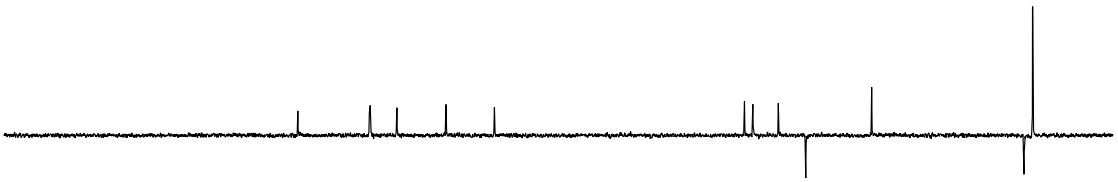


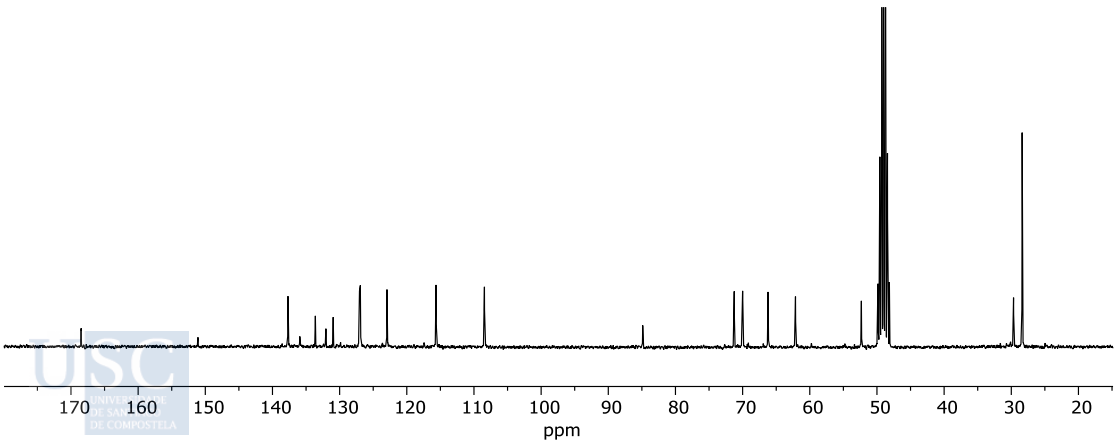
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



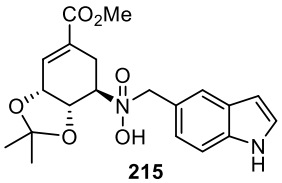
207



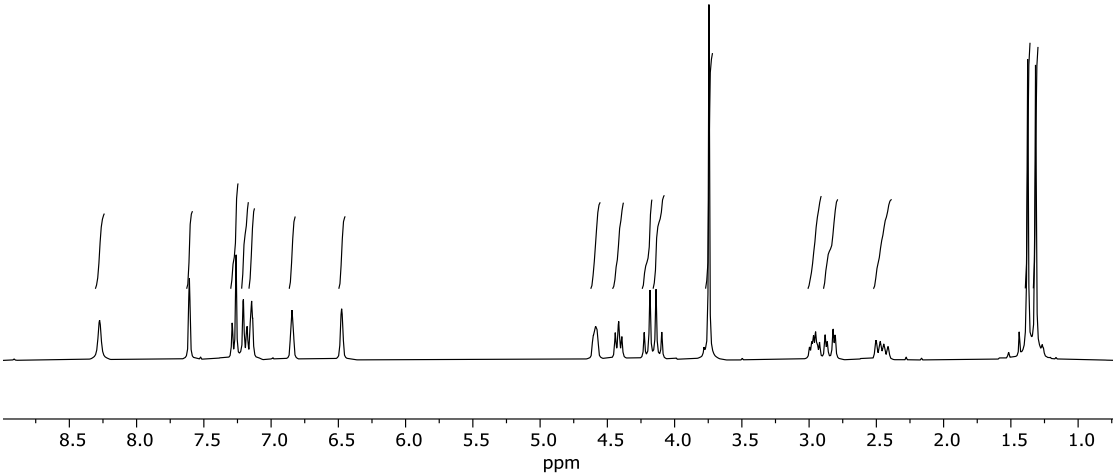


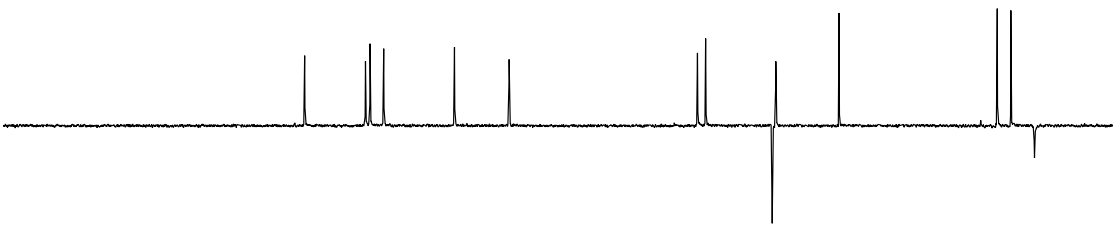


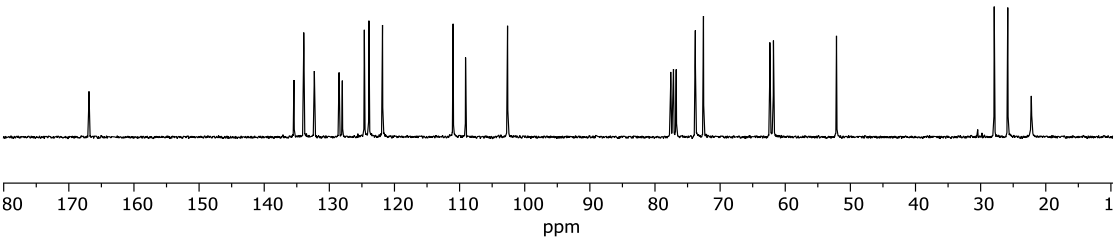
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



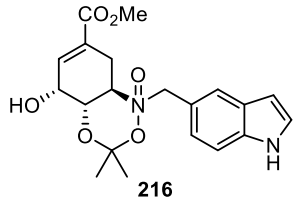
215



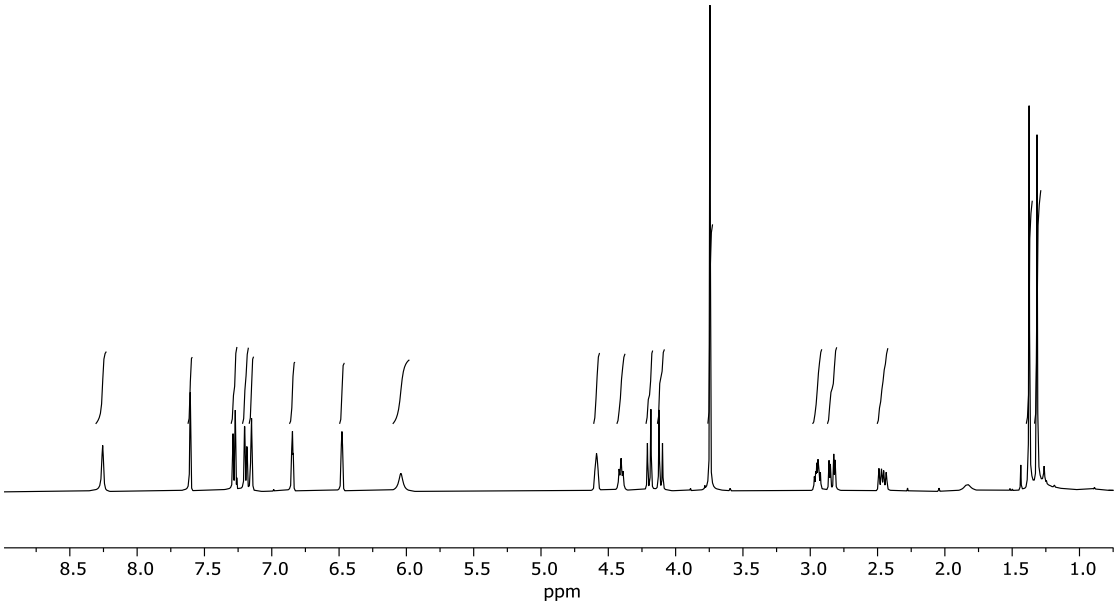


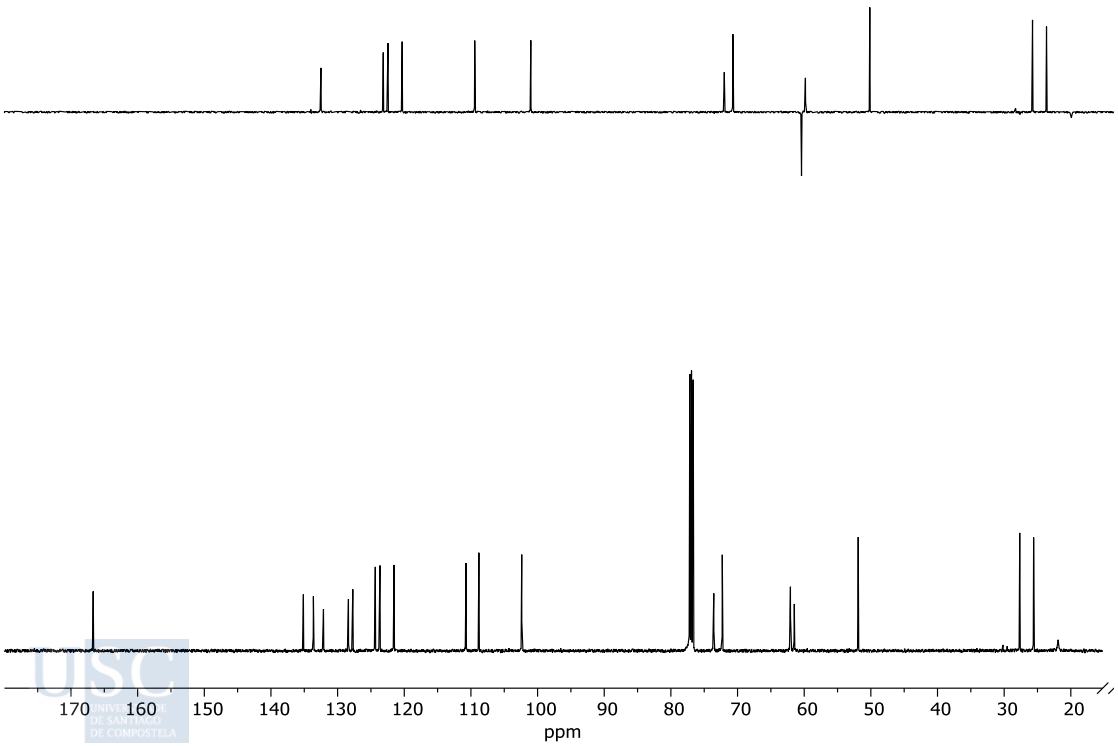


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

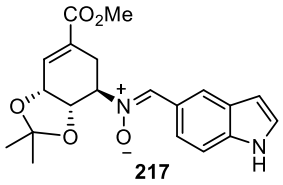


216

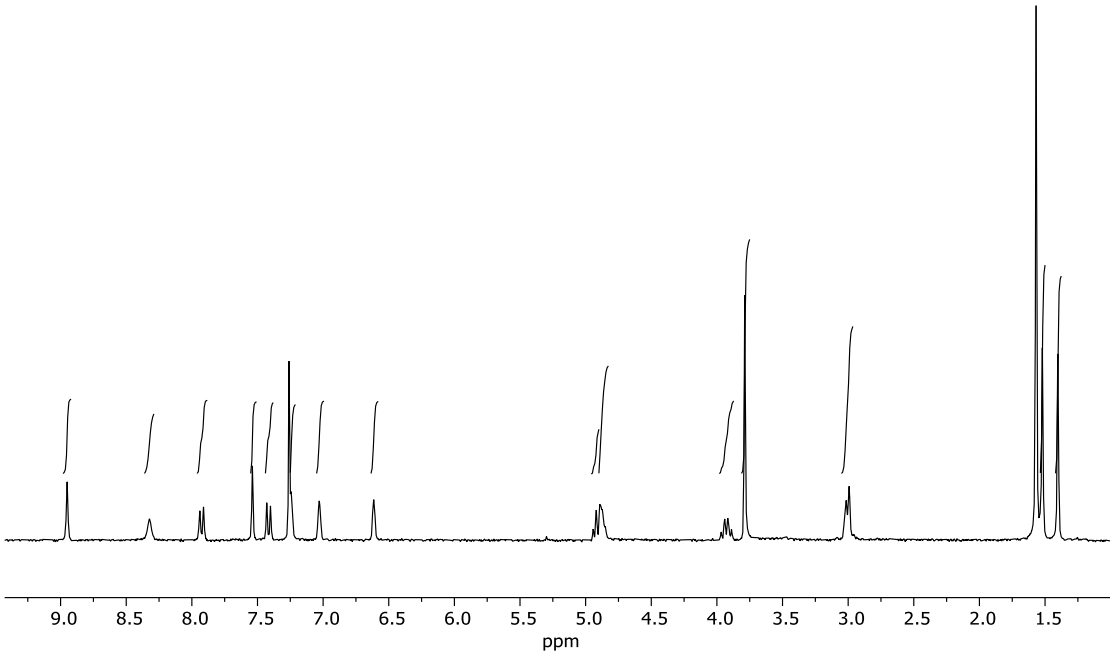


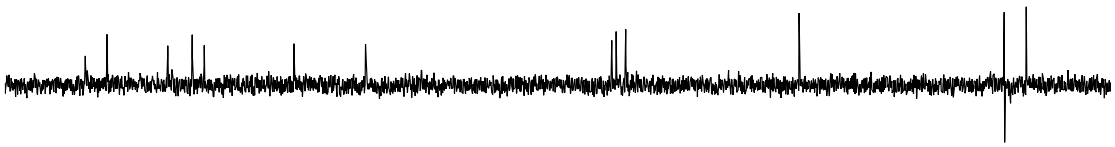


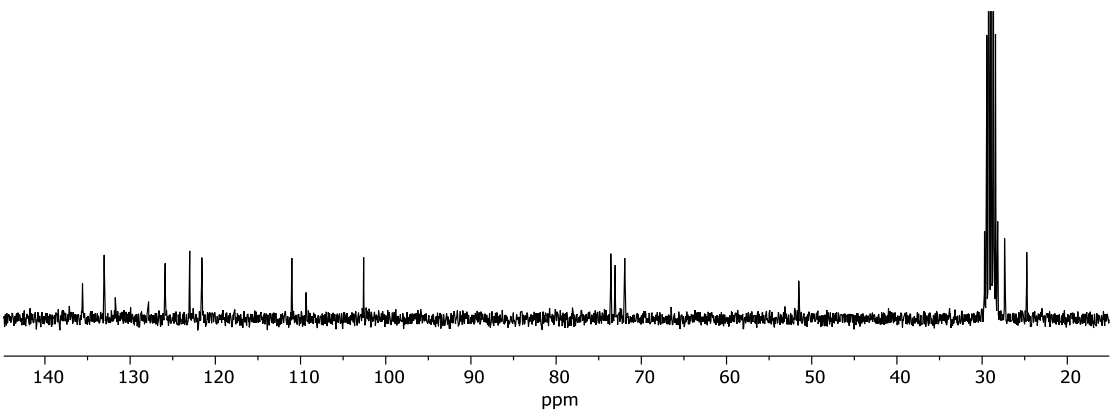
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



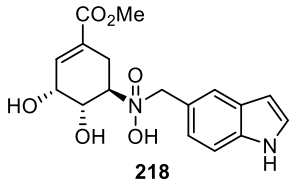
217



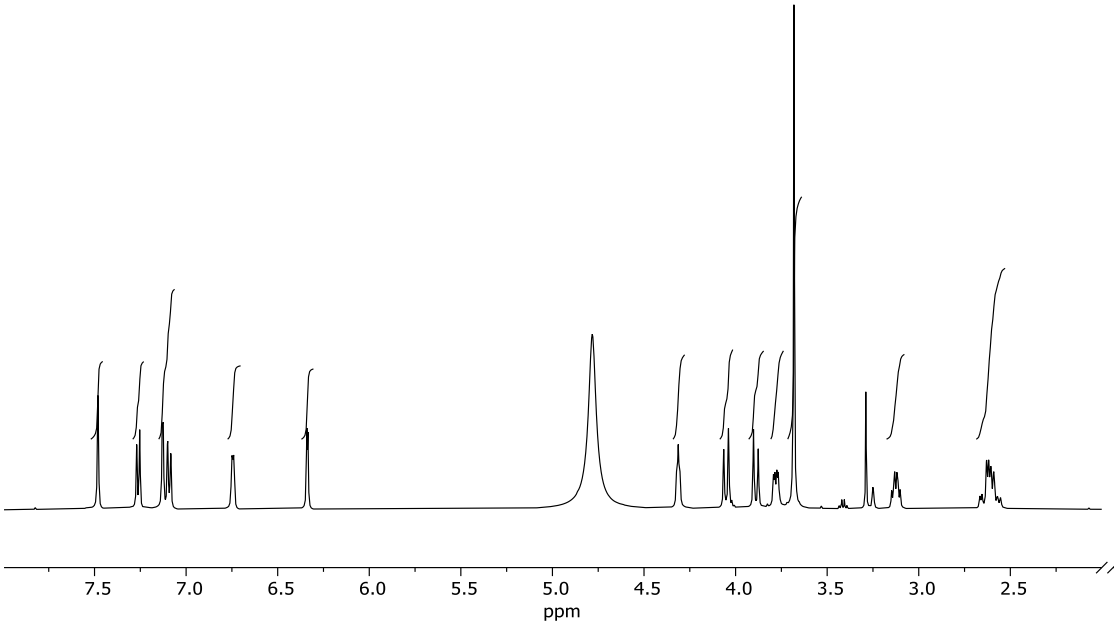


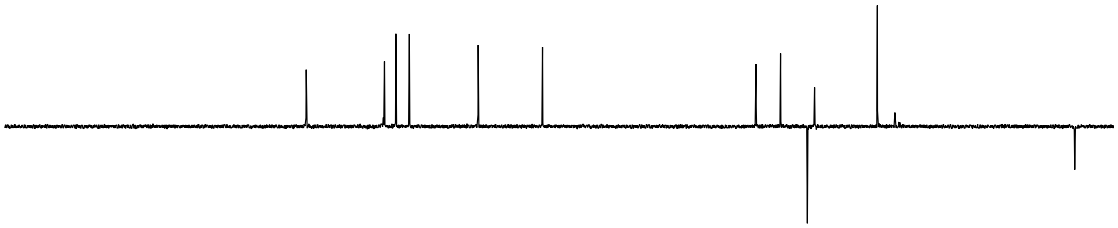


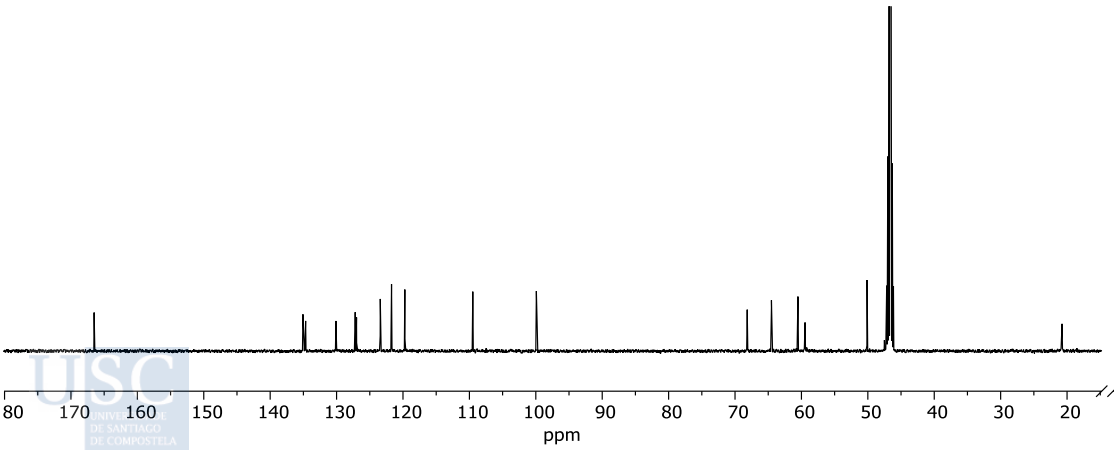
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



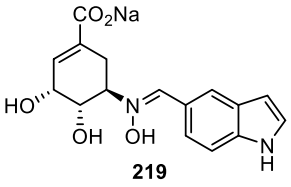
218



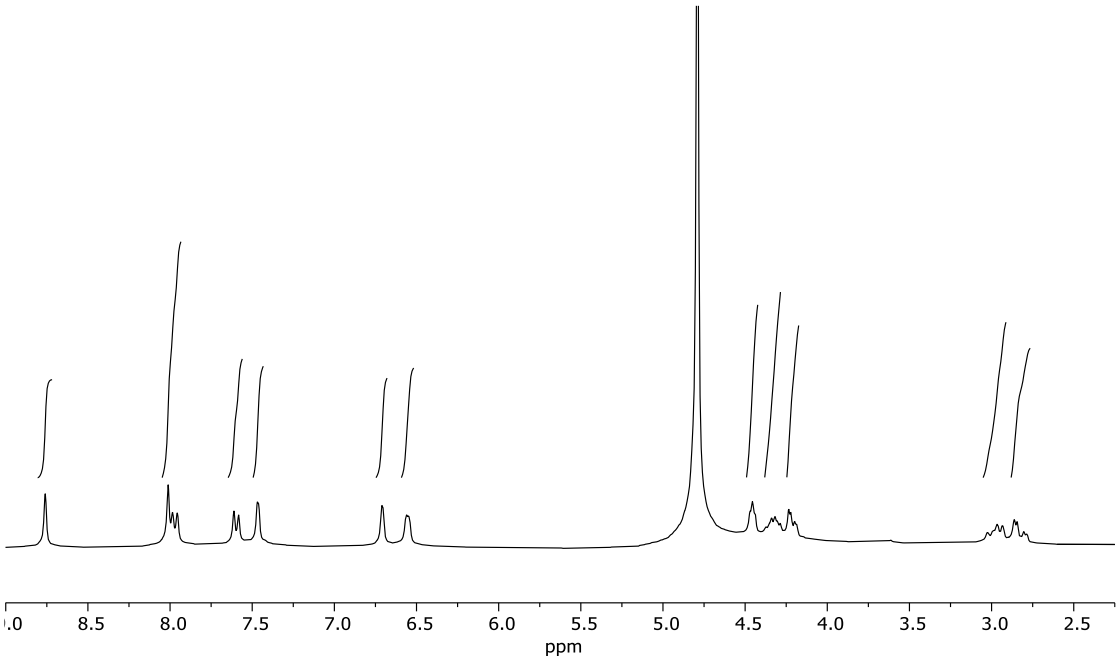


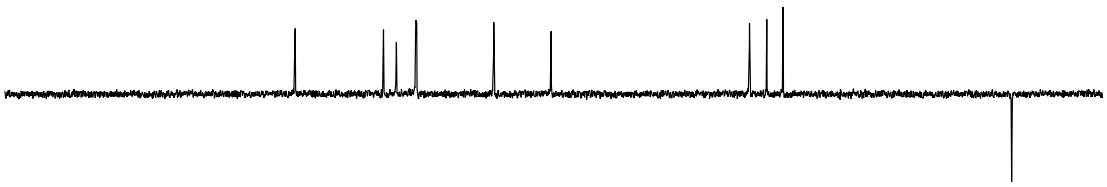


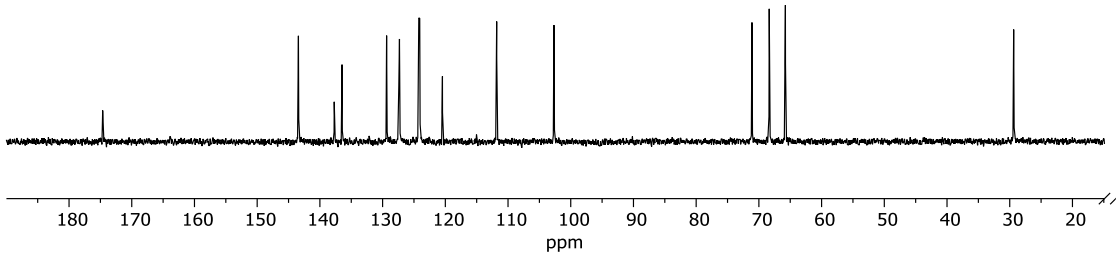
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



219







USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO III: Publicación

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La información descrita en el apartado de Resultados, ha sido parcialmente publicada en la revista científica *Journal of Medicinal Chemistry.*

Referencia: González-Bello, C.*; Rodríguez, D.; Pernas, M.; Rodríguez, A.; Colchón, E. *"β-Lactamase Inhibitors To Restore the Efficacy of Antibiotics againts Superbugs" J. Med. Chem.* 2020, *63*, 1859–1881. (doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279)

Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CiQUS), Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, 15782, Santiago de Compostela, Spain.

Special Issue: Women in Medicinal Chemistry

Editorial: ACS Publications © – American Chemical Society

Print Edition ISSN: 0022-2623

Web Edition ISSN: 1520-4804

Contribución: mi contribución se ha centrado en la parte del artículo relativa a las sulfonopenicilinas.

Índices de calidad: La revista *Journal Medicinal Chemistry* presenta actualmente un índice de impacto de 8.039, (2022-2023 Journal's Impact IF), un índice de CiteScore de 12.3 (calculado por Scopus el 5 de mayo de 2023) y ocupa las categorías de: cuartil 1 (Q1) en Bioquímica, genética y Biología Molecular, así como en Farmacología, Toxicología y Farmacia. En el SCImago Journal Rank (SJR) presenta la posición 1.805 (calculado por Scimago) y, en el Source Normalized Impact per Paper (SNIP) ocupa la posición 1.655 (calculado por Scopus).

Autorización de la revista: La revista *Journal Medicinal Chemistry*, pertenece a la editorial American Chemical Society (ACS publications ©), permite el uso del artículo por parte de la autora como parte de su tesis doctoral: https://pubs.acs.org/page/policy/authorchoice_termsofuse.html

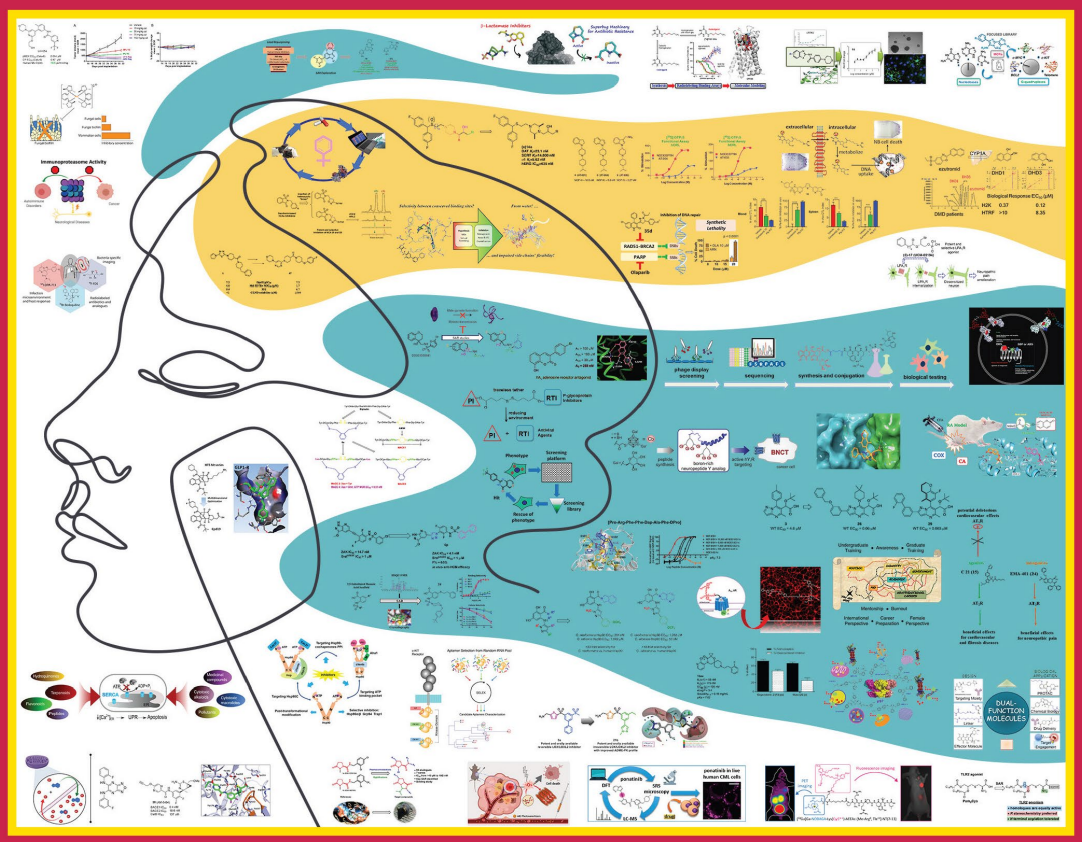
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA


ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.
Search text, DOI, authors, etc.
My Activity
Publications
ADVERTISEMENT
ACS Publications
ORGANOMETALLIC CHEMISTRY INSPIRED BY
IRINA BELETSKAYA
SPECIAL ISSUE
Read Now
RETURN TO ISSUE
< PREV
PERSPECTIVE
NEXT >
β-Lactamase Inhibitors To Restore the Efficacy of Antibiotics against Superbugs
Concepción González-Bello*, Diana Rodríguez, Marina Pernas, Ángela Rodríguez, and Esther Colchón
Cite this: J. Med. Chem. 2020, 63, 5, 1859−1881
Publication Date: October 30, 2019
https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01279
Copyright © 2019 American Chemical Society. This publication is licensed under these Terms of Use.
Request reuse permissions
Open Access
Article Views
14542
Altmetric
19
Citations
90
LEARN ABOUT THESE METRICS
Share
Add to
Export
RIS
PDF (12 MB)
This publication is Open Access under the license indicated.
Learn More
SUBJECTS: Antimicrobial agents, Crystal structure, Inhibitors, Monomers,
Journal of Medicinal Chemistry

March 12, 2020
Volume 63 • Number 5
pubs.acs.org/jmc

Journal of Medicinal Chemistry

Special Issue:
Women in Medicinal Chemistry



ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

www.acs.org

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

This is an open access article published under an ACS AuthorChoice License, which permits copying and redistribution of the article or any adaptations for non-commercial purposes.

Journal of Medicinal Chemistry

Perspective

Cite This: J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

pubs.acs.org/jmc

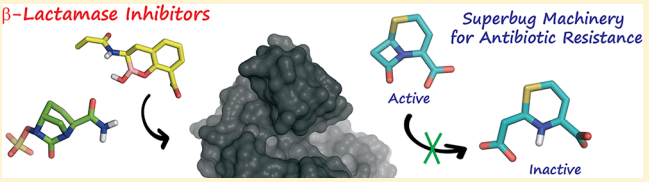
β-Lactamase Inhibitors To Restore the Efficacy of Antibiotics against Superbugs

Concepción González-Bello,* Diana Rodríguez, Marina Pernas, Ángela Rodríguez, and Esther Colchón

Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CiQUS), Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Infections caused by resistant bacteria are nowadays too common, and some pathogens have even become resistant to multiple types of antibiotics, in which case few or even no treatments are available. In recent years, the most successful strategy in anti-infective drug discovery for the treatment of such problematic infections is the combination therapy "antibiotic + inhibitor of resistance". These inhibitors allow the repurposing of antibiotics that have already proven to be safe and effective for clinical use. Three main types of compounds have been developed to block the principal bacterial resistance mechanisms: (i) β-lactamase inhibitors; (ii) outer membrane permeabilizers; (iii) efflux pump inhibitors. This Perspective is focused on β-lactamase inhibitors that disable the most prevalent cause of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria, i.e., the deactivation of the most widely used antibiotics, β-lactams (penicillins, cephalosporines, carbapenems, and monobactams), by the production of β-lactamases. An overview of the most recently identified β-lactamase inhibitors and of combination therapy is provided. The article also covers the mechanism of action of the different types of β-lactamase enzymes as a basis for inhibitor design and target inactivation.



Downloaded via 93.156.208.96 on November 23, 2023 at 11:44:09 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

1. BACTERIAL RESISTANCE TO ANTIBIOTICS: OPTIONS?

The discovery of antibiotics has managed to cure diseases that were fatal in the past, thus contributing to increased life expectancy. Unfortunately, the ability of these drugs to cure bacterial infections is now at serious risk due to the emergence and worldwide spread of superbugs (multiresistant bacteria).[1−10] These microorganisms have the innate ability to find new ways to resist treatment and are able to transmit genetic material to other bacteria, which can in turn become drug-resistant. We are in danger of entering an era in which antibiotics are no longer available to treat infections in clinical settings, including the common infectious complications in vulnerable patients who are receiving cancer chemotherapy, organ transplants, dialysis for kidney failure, and general surgery for which the ability to treat secondary infections is crucial. Although bacterial resistance to antibiotics is an inevitable natural phenomenon because of the great adaptability and the intrinsic evolutionary character of bacteria, human behavior is one of the main factors responsible for converting this natural behavior into one of the gravest public health issues of the early 21st century.[11] Infections from resistant bacteria are now too common, and some pathogens have even become resistant to multiple types of antibiotics, in which case few or even no treatments are available. This situation has been reached due to (i) the inappropriate and excessive use of antibiotics in medicine, the veterinary field and agriculture over the years, with these drugs even used for the treatment of nonbacterial infections; (ii) a severe investment gap in R&D by the pharmaceutical industry after the 1990s because antibiotics are not profitable enough; and (iii) the lack of innovative strategies for the development of new antibiotics.[12,13] Thus, most of the antibiotics in clinical use inhibit the same small number of biological targets, specifically, protein synthesis, cell-wall biosynthesis, DNA replication, RNA transcription, folate biosynthesis, and membrane structure.[14] In addition, most of the antibiotics currently in clinical development are modifications of those discovered in the middle of the last century with the aim of making them more efficient and robust against resistant bacteria.[15] However, since antibiotics lose their utility quickly and resistance to these well-established essential targets is well-known and widespread, long-term actions are required to curtail the spread of superbugs. In particular, there is a critical need for new therapies to treat deadly infections caused by priority Gram-negative pathogens such as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., and *Morganella* spp.) as published by the World Health Organization (WHO) in February 2017.[16] In addition, it is crucial to develop approaches to predict and prevent the evolution of antibiotic resistance and to achieve the rapid, sensitive and correct diagnosis of the presence of this type of

Special Issue: Women in Medicinal Chemistry

Received: August 5, 2019
Published: October 30, 2019

© 2019 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

strain to avoid inappropriate prescription of ineffective antibiotics or the use of unnecessary ones.[17]

In recent years the most successful strategy in anti-infective drug discovery for the treatment of the aforementioned difficult to treat infections, and an approach that is pursued by the pharmaceutical industry, is the combination therapy "antibiotic + inhibitor of resistance". This type of therapy involves the use of an antibiotic in conjunction with an inhibitor of the resistance mechanism developed by the bacterium against the antibiotic, thus recovering the antibacterial effect of the latter.[18−32] The use of inhibitors of resistance has two big advantages: (i) it allows for repurposing the excellent arsenal of life-saving antibiotics available in the clinic that have proven to be safe and effective over the years and (ii) it avoids the need to devote great efforts to the challenge and expensive identification and validation of new therapeutic targets.[29] The main bacterial resistance mechanisms, which are summarized in Figure 1, are (1)

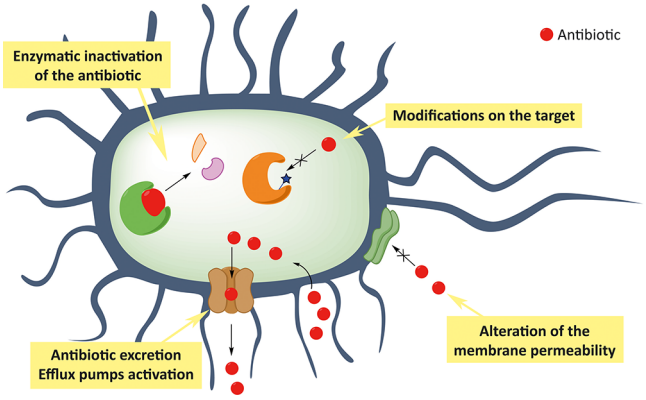


Figure 1. Principal bacterial mechanisms of antibiotic resistance.

modification(s) of the cellular target that alters the antibiotic binding in such a way that its efficacy is reduced; (2) decreased uptake by alteration of the outer membrane permeability by changes mainly in the terminal moieties; (3) activation of efflux pumps to increase antibiotic excretion; and (4) degradation of the antibiotic by bacterial enzymes to generate inactive forms of the drug.[33] In the last resistance mechanism, Crofts et al.[34] have shown that bacteria can even catabolize the hydrolyzed antibiotic as food.[35] On the basis of these bacterial resistance mechanisms, three main types of inhibitors of resistance have been developed: (i) efflux pump inhibitors; (ii) outer membrane permeabilizers; and (iii) β-lactamase inhibitors. This Perspective focuses on the last compounds, β-lactamase inhibitors, that disable the most prevalent cause of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria, i.e., the deactivation of the most widely used antibiotics, β-lactams, by the production of β-lactamases (mechanism 4). An overview of the most recent advances in the identification of β-lactamase inhibitors for combination therapy is provided, including non-β-lactam β-lactamase inhibitors (boron-based inhibitors, 1,6-diazabicyclo[3,2,1]octanes, thiol derivatives, and dicarboxylate compounds) as well as penicillin-based sulfone inhibitors. The article also includes an overview of the different types of β-lactamase enzymes and their mechanism of action as a basis for the design of the inhibitors reported and their mode of action.

2. ENZYMATIC INACTIVATION OF ANTIBIOTICS BY β-LACTAMASE ENZYMES

β-Lactamase enzymes hydrolyze the β-lactam ring of penicillins, cephalosporins, monobactams, and carbapenems in an acylation/deacylation-based process.[36−38] Due to the large diversity of these enzyme substrates, various classifications have been made, as recently reported by Bush and Bradford.[39] The most widely used categorization is probably that based on protein sequence similarities, with four major β-lactamase classes identified, namely, A, B, C, and D. Three of these, classes A, C, and D, are serine-β-lactamases as they use a catalytic serine residue as the reactive nucleophile and class B enzymes are zinc-dependent hydrolases. Serine-β-lactamases employ covalent catalysis for the β-lactam hydrolysis in a multistep mechanism that involves the formation of diverse enzyme adducts (Figure 2A). First, the nucleophilic attack of the catalytic serine to the carbonyl group of the β-lactam takes place, which is triggered by an enzyme residue acting as a general base (usually a lysine or carboxylated lysine or glutamate), to give the tetrahedral addition intermediate TI1, which is stabilized by several NH hydrogen bond donors in the bottom part of the active site (named the oxyanion hole). Subsequently, TI1 undergoes ring-opening to yield the enzyme adduct I, in which the catalytic serine is covalently attached to the modified β-lactam by the formation of an ester. The resolution by X-ray crystallography of the acyl−enzyme intermediate of the variant TEM-1 β-lactamase enzyme in which Glu166 was replaced by Asn166 revealed that hydrolysis of the enzyme adduct I occurs by nucleophilic attack of a water molecule assisted by a residue acting as a general base (Glu166 in *E. coli* TEM-1).[40]

Among the β-lactamases, class A enzymes are a quite diverse group according to the type of substrate that they can hydrolyze, as summarized in Table 1. The most common enzymes are the plasmid-encoded β-lactamases: TEM and SHV, both of which can be found in most *Enterobacteriaceae*, and CTX-M, which is commonly found in *E. coli* and *K. pneumoniae*. All of these enzymes hydrolyze penicillins and cephalosporins. This group also contains those enzymes that specifically hydrolyze carbapenems (serine carbapenemasases), including KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase), SME (*Serratia marcescens* enzymes), NMC-A (non-metallocarbapenemase-A), and certain variants of GES (Guiana extended spectrum).[41] Moreover, class C enzymes are serine-β-lactamases that specifically hydrolyze cephalosporins (serine cephalosporinases). The most representative examples of this group are AmpC-type-β-lactamases that hydrolyze most cephalosporins, including expanded spectrum cephalosporins (ceftazidime, cefotaxime, and ceftriaxone) and cephamycins (cefoxitin).

Class D enzymes, which are also known as "oxacillinases (OXA)", are the most rapidly growing group of β-lactamases.[42] These enzymes hydrolyze penicillins, expanded spectrum cephalosporins (e.g., cefotaxime, ceftazime, and cefepime), methicillin, and aztreonam. Of particular concern is the growing emergence of some class D enzymes with carbapenemase activity (carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases), which are widely dispersed in clinically relevant species such as *A. baumannii* (e.g., OXA-23 or OXA-24/40) or *Enterobacteriaceae* (e.g., OXA-48). In the OXA-24/40 and OXA-23 enzymes, the carbapenem hydrolysis is improved by the presence of a hydrophobic bridge that allows the antibiotic to remain in the productive conformation for a longer time.[43]

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

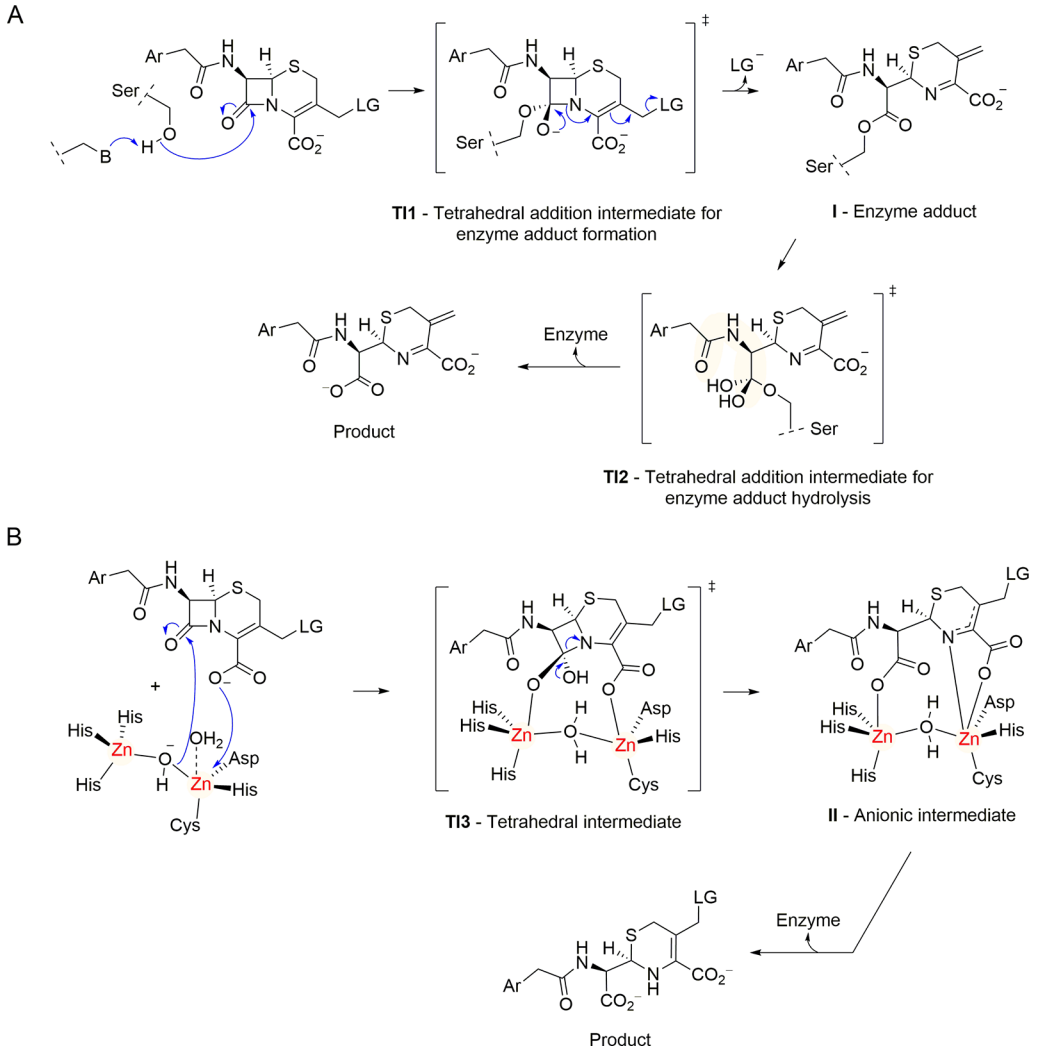


Figure 2. Hydrolysis mechanism of cephalosporins by serine-β-lactamases (A) and metallo-β-lactamases (B). Note how the overall structures of the tetrahedral intermediates **TI1** and **TI3** are similar. LG = leaving group.

Table 1. Classification of the β-Lactamase Enzymes

Ambler class	substrates	most relevant examples
A (serine-β-lactamases of diverse activity)	Penicillins	Penicillinases from Gram-positive bacteria
	Penicillins and narrow-spectrum cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	Penicillins, narrow and expanded spectrum cephalosporins	SHV-2, TEM-10, CTX-M, GES-1
	Penicillins	TEM-30, SHV-72
	Penicillins and carbenicillin	PSE
	Penicillins, cephalosporins, and carbapenems	KPC, SME, NMC-A, GES-2
B (metallo-β-lactamases)	β-Lactams, including carbapenems, with the exception of monobactams	IMP, VIM, NDM
C (serine cephalosporinases)	Cephalosporins	AmpC, CMY, ACT-1, DHA
D (serine oxacillinases)	Penicillins and cloxacillin; some of them hydrolyze cephalosporins and/or carbapenems.	OXA-1/30, OXA-10, OXA-23, OXA-24/40, OXA-48

Thus, this uncommon active site structure is composed of the side chains of a methionine and a tyrosine (OXA-24/40) or phenylalanine (OXA-23) that is markedly different from that of the other β-lactamases (Figure S1). As a consequence, the catalytic serine is isolated from the solvent environment by a tunnel-like structure that does not undergo significant conformational changes and behaves as a hydrophobic filter that controls access to the active site to only certain substrates. From the drug design point of view, this arrangement of the active site is a handicap due to the spatial and geometric limitations when compared with the more open active centers of the other β-lactamases. On the contrary, although the bridge is absent in the OXA-48 enzyme, which has a similar tertiary structure to that of OXA-10 and OXA-13, its carbapenemase efficiency is quite close to that of the OXA-24/40 enzyme. This is achieved by employing an alternative strategy of fixing the carbapenem in the efficient conformation for hydrolysis, which is achieved by locating a large hydrophobic region near the active site (Figure S1).

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

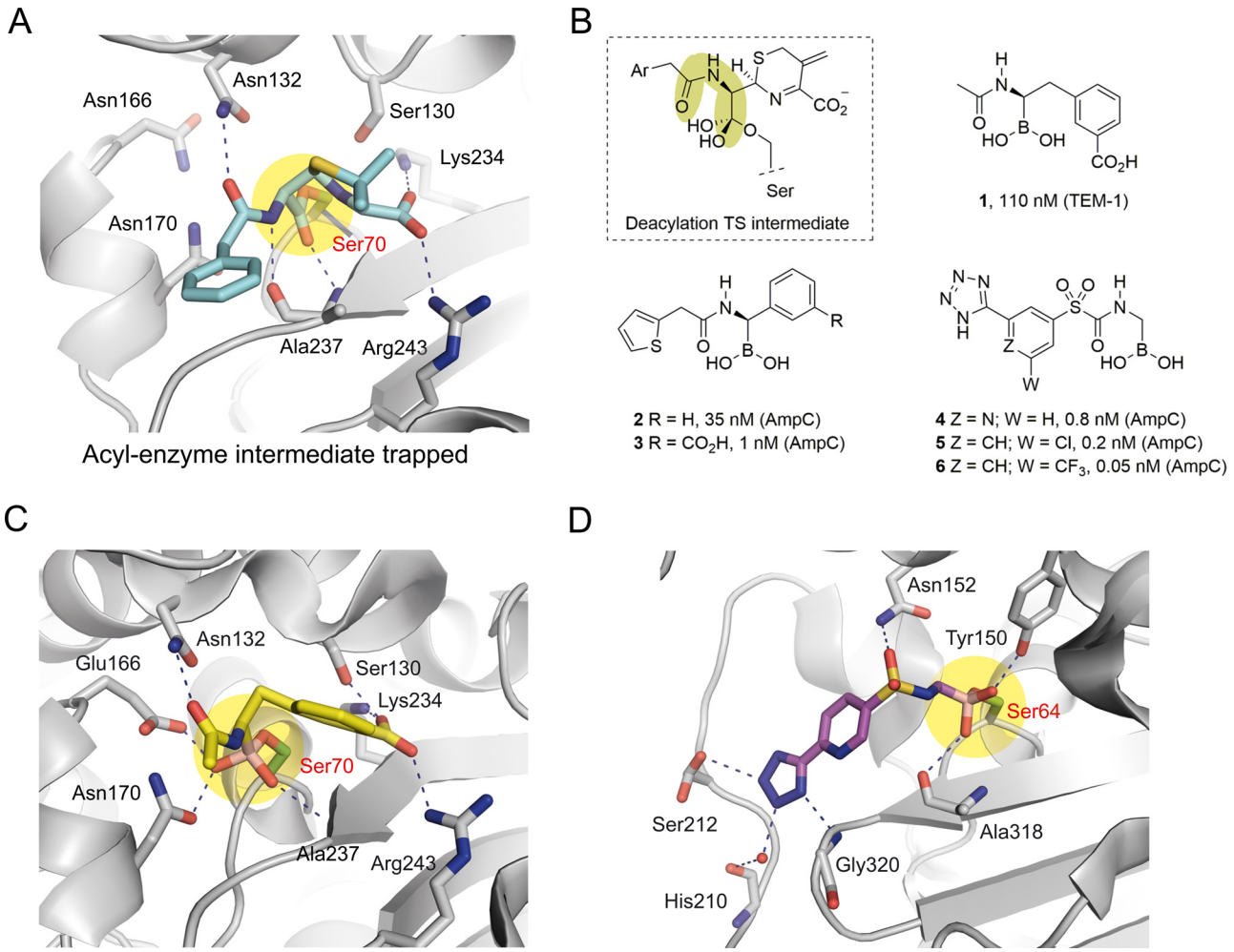


Figure 3. (A) Crystal structure of the acyl−enzyme intermediate in the hydrolysis of penicillin G catalyzed by the TEM-1 β-lactamase enzyme (PDB entry 1FQG, 1.7 Å). (B) Selected examples of boron-based β-lactamase inhibitors as mimetics of the deacylation intermediate in serine β-lactamase catalyzed reactions. The inhibition constants (K_i) with the isolated enzymes, which are indicated in brackets, are shown. (C) Crystal structure of the TEM-1 β-lactamase enzyme in complex with boronic acid derivative **1** acyl−enzyme intermediate in the hydrolysis of penicillin G by the RTEM-1 β-lactamase enzyme (PDB entry 1ERM, 1.7 Å). (D) Crystal structure of the AmpC/**5** adduct (PDB entry 4E3K, 1.43 Å). Relevant side chain residues are shown and labeled. The covalent linkage to the catalytic serine (green) is highlighted with a yellow shadow.

On the other hand, class B enzymes use one or two Zn^{2+} ions to catalyze the hydrolysis of the β-lactam bond (Figure 2B).[44,45] For those enzymes with a dinuclear metal center in the active site, one of the Zn^{2+} ions has a tetrahedral coordination sphere (Zn1 site), which is usually composed of three histidine residues and a hydroxide anion, and the other Zn^{2+} ion has a trigonal bipyramidal sphere (Zn2 site) that involves a histidine, a cysteine, and an aspartate residue and a water molecule. The hydroxide anion is located between the two metal ions. In monozinc-dependent enzymes, the coordination of the Zn^{2+} ion is similar to that in the Zn2 site, but it is tetrahedral instead of bipyramidal and involves a water molecule and three residues, a histidine, a cysteine, and an aspartate. Unlike the other β-lactamases, hydrolysis does not occur by covalent catalysis; i.e., the conversion does not involve the formation of enzyme adducts. The reaction is triggered by the nucleophilic attack of a Zn(II)-bound hydroxide anion to the β-lactam carbonyl group to afford the tetrahedral intermediate TI3, which is stabilized by coordination to the metal. This intermediate undergoes ring opening, which is the rate-limiting step,[46,47] to give the anionic intermediate II that suffers protonation for product release. It is still unclear how this protonation occurs and if it is a general mechanism for all the β-lactam antibiotics. Recently, on the basis of crystallographic studies on the hydrolysis of two carbapenems, specifically imipenem and meropenem, by NDM-1 enzyme in combination with the NMR monitoring of meropenem enzyme catalyzed hydrolysis, Feng et al.[48] found that the carbapenem hydrolysis is distinct from that of penicillins or cephalosporins. Thus, the capture of three distinct enzyme complexes in the hydrolysis of imipenem and meropenem revealed a tautomerization of the double bond in the thiazole ring with the stereoselective protonation of the position bearing the antibiotic side chain (see PDB entries 5YPK, 5YPI, 5YPM, 5YPN, and 5YPL). The degree of stereoselectivity seems to depend on the type of side chain of the antibiotic, which is relevant for future inhibitor designs. In addition, these crystal structures demonstrate the absence of a bridging water molecule, which is observed in the corresponding intermediates of penicillins and cephalosporins hydrolysis (see PDB entries 5ZGE and 4HL2), reinforzing the idea of relevant differences in the carbapenem hydrolysis compared with other β-lactam antibiotics.[49−51] With the exception of monobactams, metallo-β-lactamases hydrolyze most β-lactams,

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

including carbapenems. The lack of therapeutic options against relevant metallo-β-lactamases, such as IMI (IMIpenem-hydrolyzing β-lactamases), VIM (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase), and NDM (New Delhi metallo-β-lactamase), and their spread worldwide are a major concern today.

On the basis of the enzymatic mechanisms outlined above (and as one would expect for enzymes undergoing covalent catalysis), the vast majority of β-lactamase inhibitors of serine β-lactamases reported (classes A, C, and D) cause the covalent modification of the catalytic serine. As discussed in the following section, some of these compounds are reversible inhibitors and others are irreversible ones. In the same way, the inhibitors of metallo-β-lactamase enzymes usually coordinate to the catalytic Zn^{2+} ion for enzyme inactivation. The most relevant inhibitors of both types of enzymes are described in sections 3 and 4, and the discussion is organized based on the types of functional groups that are mainly responsible for the inhibition.

3. NON-β-LACTAM β-LACTAMASE INHIBITORS

The most relevant β-lactamase inhibitors with a non-β-lactam structure are presented in this section. The discussion includes boron-based inhibitors (section 3.1), 1,6-diazabicyclo[3,2,1]-octanes (section 3.2), thiol derivatives (section 3.3), and dicarboxylate derivatives and related compounds (section 3.4).

3.1. Boron-Based β-Lactamase Inhibitors. Among the β-lactamase inhibitors developed to date, boron-based β-lactamase inhibitors are probably the current best hope against resistant bacteria. These compounds arose as a result of the discovery that serine proteases can be inhibited by boronic acids.[53] After Dobozy et al.[54] demonstrated for the first time that boric acid inhibits the penicillinase enzyme from *Bacillus cereus*, Kiener and Waley[55] subsequently developed the first reversible inhibitors, specifically phenylboronic acid and 3-aminophenylboronic acid, against *B. cereus* β-lactamase I, and these showed activities in the millimolar range.[56] The determination of the X-ray crystal structure of the acyl-enzyme intermediate in the hydrolysis of penicillin G by the TEM-1 β-lactamase enzyme (PDB entry 1FQG,[40] 1.7 Å) was crucial in inspiring subsequent rational designs of novel boron-based inhibitors with activities in the nanomolar range (Figure 3A). The first potent transition-state analog inhibitor, compound **1**, was described by Martin and Jones,[57] and this had a K_i of 110 nM against TEM-1 β-lactamase (Figure 3B).[58−60] The crystal structure of the latter enzyme in complex with compound **1** (PDB entry 1ERM, 1.7 Å)[61,62] corroborated the formation of the tetrahedral adduct with the catalytic serine, which is structurally similar to TI2 (Figures 3C and 2A). Modifications of this scaffold, mainly by introducing functional groups that are able to promote extra binding interactions within the two pockets close to the catalytic serine, led to the identification of compounds **2** and **3**, which have inhibitory activities in the low nanomolar range (Figure 3B).[63,64] The resolution of the crystal structures of the AmpC β-lactamase/**2**,**3** enzyme adducts (PDB entries 1MY8 and 1MXO, respectively) showed in atomic detail the relevance of the carboxylate group in **3** (strong electrostatic interaction) as well as the side chain [(thiophen-2-yl)acetamido group], which is observed in natural penicillins. Both compounds also showed synergy with ceftazidime against diverse clinically isolated bacterial pathogens that produce class C β-lactamases, although the *in vitro* activity was relatively modest. In order to overcome this issue, Eidam et al.[65] performed a fragment-based approach that led to the identification of novel scaffolds, tetrazoles **4**−**6**, that had inhibitory activities in the subnanomolar range (Figure 3B). Compound **4** proved to have the highest K_i value of the three examples, but it gave better *in vitro* activity than the other tetrazoles since its combination with cefotaxime improved the antibiotic efficacy by 20-fold. The presence of the pyridine moiety in **4** seems to enhance its bacterial permeability. The combination cefotaxime/**4** also proved to be effective *in vivo* as it is able to cure 65% of mice infected with β-lactamase-expressing *E. coli*. The crystal structure of the AmpC β-lactamase/**4** enzyme adduct (PDB entry 4E3K, 1.43 Å) showed that the tetrazole moiety is anchored to the side chain penicillin binding pocket of the active site by diverse strong hydrogen bonding interactions, which might account for its high potency (Figure 3D).

Moreover, London et al.[66] identified new potent boronic acid inhibitors, namely, compounds **7**−**9** (Figure 4A). This was carried out by virtual screening of a library of 23 000 commercially available boronic acids, by using the covalent docking method DOCKovalent (http://covalent.docking.org) and the enzyme coordinates of AmpC enzyme in complex with 2-trifluoromethyl-4-tetrazolyl benzene sulfonamide boronic acid inhibitor (PDB entry 4E3N,[65] 1.49 Å). Of the three compounds identified, compound **8** proved to be the best in repurposing cefotaxime activity in diverse bacterial pathogens that produce AmpC. The resolution of the crystal structures of the AmpC/ligand adducts, such as PDB entry 4LV1 (with **7**, 1.74 Å), revealed the key role of the pyrazol-4-yl moiety in **7** and **8** in anchoring the ligand to the active site by strong hydrogen bonding interactions with the side chain residues within the active site (Figure 4C). Covalent docking studies also allowed the identification of the first noncyclic boronic acid inhibitors, benzo[*b*]thiophen-2-ylboronic acids **10**, with a broad-spectrum activity against clinically relevant β-lactamases, specifically KPC-2, GES-5, AmpC, OXA-24/40, and NMD-1 (Figure 4B).[67,68] These boronic acids proved to be more potent against AmpC, leading to inhibition constants in the nanomolar range, while inhibition in the micromolar range was obtained with the other enzymes tested. The X-ray crystal structures of the NDM-1 enzyme in complex with these compounds revealed a tetrahedral coordination of the boronic acid moiety with the two catalytic Zn^{2+} ions by displacing of the catalytic hydroxide anion (Figure 4D). The broad-spectrum activity of these compounds, as well as the structural information available, can be a good starting point for the future development of chemical sensors based on this scaffold for the detection of metallo-β-lactamases.

A major concern in the use of inhibitors derived from boronic acids has always been the potential off-target effects due to inhibition of mammalian serine proteases. In order to improve the selectivity of such inhibitors against β-lactamases, cyclic boronates were explored, and this allowed the discovery of varborbactam (**11**, RPX7009, Figure 5A).[69−72] This compound did not show any inhibition of mammalian serine proteases, but it is a potent inhibitor of serine carbapenemases, in particular KPC-type enzymes, of other class A (CTX-M, SHV, TEM) and class C (P99, MIR, FOX) enzymes, but it does not inhibit β-lactamases of classes B and D. The crystal structure of CTX-M-15 covalently modified by varborbactam (PDB entry 4XUZ, 1.5 Å) demonstrates the covalent modification of the catalytic serine by the formation of a tetrahedral boron adduct and reveals that the carboxylate moiety in the ligand also contributes to fix further the adduct

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

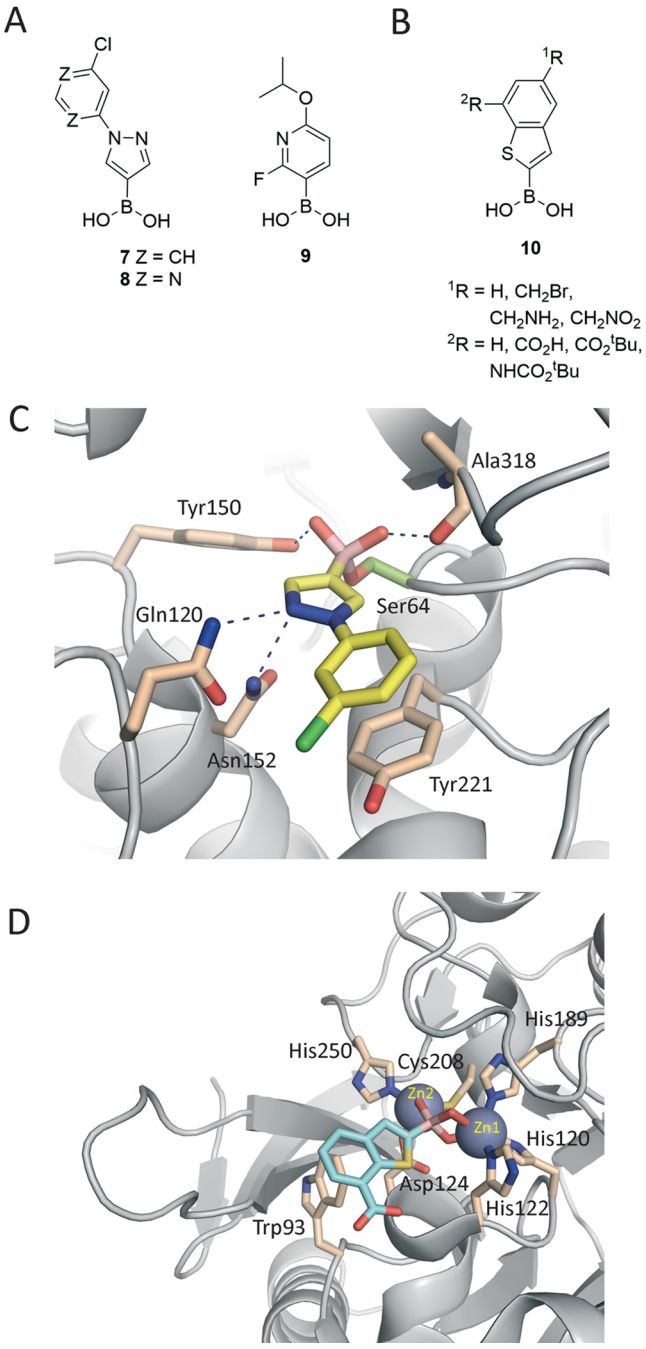


Figure 4. (A) Boron-based inhibitors of AmpC identified by covalent docking of a library of 23 000 commercially available boronic acid derivatives. (B) Identified benzo[*b*]thiophen-2-ylboronic acids of broad-spectrum activity. (C) Crystal structure of AmpC covalently modified with inhibitor **7** (PDB entry 4LV1, 1.74 Å). Note how the pyrazol-4-yl ring is anchored to the active site by strong hydrogen bonding interactions. (D) Crystal structure of NDM-1 in complex with boronic acid **10** (^{1}R = H, ^{2}R = CO_2H) (PDB entry 6Q30, 1.5 Å). Relevant side chain residues are shown and labeled. The catalytic serine is highlighted in green, and the catalytic Zn^{2+} ions are shown as spheres.

into the active site (Figure 5B).[73] At vaborbactam concentrations of 8 μg mL^{-1}, the vaborbactam/meropenem combination therapy restores meropenem efficacy and provides MIC values for the antibiotic of ≤2 μg mL^{-1} in KPC-producing *Enterobacteriaceae*. Vaborbactam in combination with meropenem was approved in 2017 by the FDA for the treatment of complicated urinary tract infections, including pyelonephritis.

Vaborbactam is synthesized in six steps from chiral *tert*-butyl (*R*)-3-hydroxypent-4-enoate (**17**) (Scheme 1).[73] Protection of **17** as a TBS-ether is followed by regioselective hydroboration of the protected alcohol **18** using pinacolborane and Ir(COD)Cl_2 as catalyst to give pinacol boronate **19**. This compound is transformed into the more stable pinanediol boronate **20**. The key step in the synthesis is the stereoselective chloromethylation of **20** using Matteson's reaction, followed by stereospecific displacement with hexamethyldisilazide of the resulting chloride **21** and subsequent *in situ* acylation. Finally, deprotection of the resulting boronate **22** under acidic conditions gives vaborbactam.

Vaborbactam has the disadvantage, like some other inhibitors that will be discussed later, of its ineffectiveness against metallo-β-lactamases and class D enzymes. It is therefore not surprising that a great deal of effort has been devoted to develop inhibitors with a broad spectrum of activity by inhibiting metallo- and serine-β-lactamases. It is worth highlighting that (i) there are no clinically available options for infections caused by metallo-β-lactamases and (ii) an increasing number of pathogens coproducing both serine- and metallo-β-lactamases have been reported.[74] The mechanism of action of these two types of enzymes are quite different. In the first case the process involves the formation of enzyme covalent adducts (covalent catalysis) that are absent in the second case (noncovalent catalysis), but in both cases the general structures of the first tetrahedral intermediate TI1 and the tetrahedral intermediate TI3 bear certain similarities (Figures 5A and 2B). On the basis of this premise, the screening of other types of cyclic boronates led to the identification of broad spectrum inhibitors **12** and **13**, which inhibit all four classes of β-lactamases, including CTX-M-15 (class A), VIM-2 (class B), NDM-1 (class B), AmpC (class C), and the carbapenem-hydrolyzing class D enzymes OXA-23 and OXA-48.[75,76] As revealed by the crystal structure of VIM-2/**13** enzyme complex (PDB entry 5FQC, 1.45 Å),[75] the effectiveness of these salicylic acid derivatives against metallo-β-lactamases lies in the presence of a carboxylate group *ortho* to the cyclic boronate moiety (aromatic), a feature that allows the effective coordination of the carboxylate group to the catalytic Zn^{2+} metal cation (Figure 5C). In 2012, VenatoRx Pharmaceuticals discovered taniborbactam (VNRX-5133, **14**) (Figure 5A).[77] In combination with the fourth-generation cephalosporin cefepime, taniborbactam is currently in clinical development (phase III) to treat multidrug-resistant infections caused by ESBL- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *P. aeruginosa*. This injectable cyclic boronate β-lactamase inhibitor has a broad spectrum of activity, including classes A, C, and certain D enzymes, as well as some clinically relevant metallo-β-lactamases such as NDM-1 and VIM-1/2.[78] The crystal structure of the NDM-1/**14** enzyme complex (PDB entry 6RMF, 1.51 Å) reveals that, as for benzo[*b*]-thiophen-2-ylboronic acids **10**, the catalytic hydroxide anion is displaced by the boron atom (Figure 5D). More importantly, the structure demonstrates the ability of these types of cyclic boronates **12**−**14** to form stable tricyclic enzyme complexes with the catalytic metal ions, which was not observed before, and that could be responsible of their excellent inhibitory potencies. This unusual enzyme complex (tricyclic boronate) would result from the intramolecular cyclization of the oxygen

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

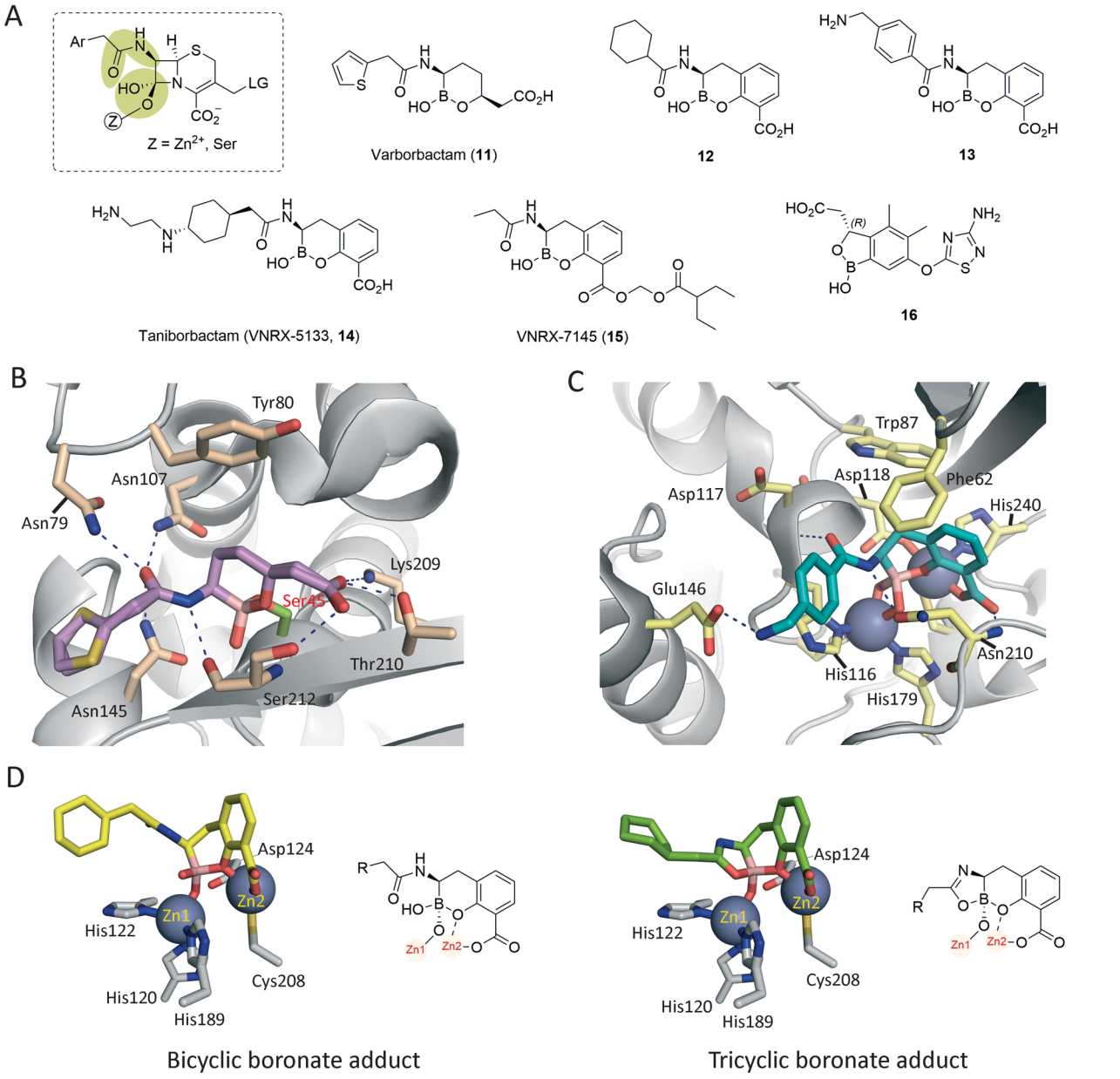


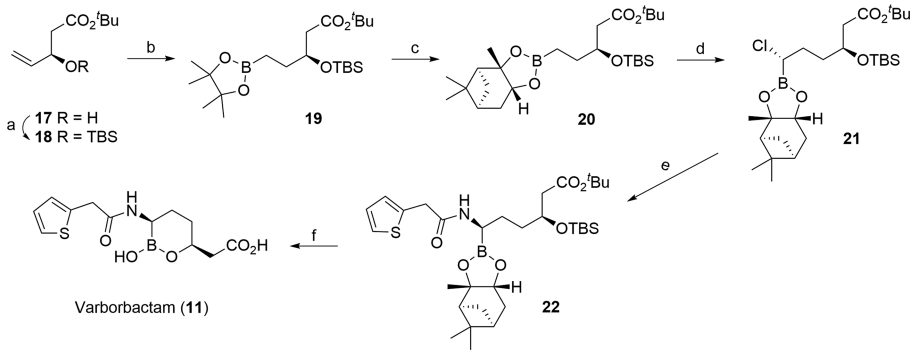
Figure 5. (A) Selected examples of cyclic boronate inhibitors. (B) Crystal structure of CTX-M-15 covalently modified by vaborbactam (PDB entry 4XUZ, 1.5 Å). (C) Crystal structure of the VIM-2/**13** enzyme complex (PDB entry 5FQC, 1.45 Å). (D) Crystal structure of the NDM-1/**14** enzyme complex (PDB entry 6RMF, 1.51 Å). The two types of enzyme adducts observed in the crystal structure, specifically the bicyclic (left) and the tricyclic boronate adducts (right), are shown in separated images. Note that in the crystal structure the ethylamino group in the ligand was removed because no electron density for these atoms was observed. Relevant side chain residues are shown and labeled. The catalytic serine is highlighted in green, and Zn^{2+} ions are shown as spheres.

atom of the acylamino moiety of the ligand with the free hydroxyl group of the expected, and also observed, bicyclic enzyme complex. This finding highlights the ability of boron-based compounds to form distinct types of enzyme complexes to enhance binding, which might inspire the future design of new cyclic boron-based inhibitors. The main advantage of taniborbactam over vaborbactam is its clinical potential against relevant metallo-β-lactamases for which no therapeutic options are currently available. In addition, although taniborbactam also significantly improves the efficacy of vaborbactam against diverse serine-β-lactamases, in certain cases its inhibition potency against certain enzymes, e.g., OXA-48 or IMI-1, is still lower than other β-lactamase inhibitors.[78]

An also promising cyclic boronate β-lactamase inhibitor in the pipeline is VNRX-7145 (**15**), which is an orally bioavailable compound that undergoes *in vivo* biotransformation to the active VNRX-5236 (Figure 5A).[79,80] When combined with ceftibuten, VNRX-5236 provides similar *in vitro* activity as the combinations of ceftazidime/avibactam and meropenem/varborbactam and shows lower MIC_{90} values relative to meropenem/vaborbactam in strains harboring the carbapenemases KPC and OXA-48. Another boron-based inhibitor with a huge potential that is currently in the pipeline is QPX7728 (chemical structure not disclosed yet). This compound, which was developed by Qpex Biopharma, is a potent inhibitor of the major β-lactamases, including metallo-β-lactamases, that efficiently restores the activity of diverse β-

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

Scheme 1. Synthesis of Vaborbactam (11)[a]

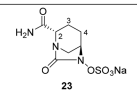
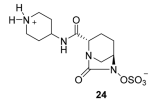
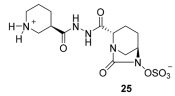
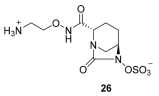
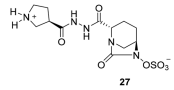
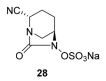


[a]Reagents, conditions, and yields: (a) TBSCl, imidazole, CH_2Cl_2, rt (94%); (b) $[Ir(COD)Cl]_2$, dppb, pinacolborane, CH_2Cl_2, rt (96%); (c) (+)-pinanediol, THF, rt (91%); (d) (1) CH_2Cl_2, ^{n}BuLi, THF, −95 °C; (2) $ZnCl_2$, THF, −95 °C (88%); (e) (1) LiHMDS, THF, −78 °C to rt; (2) 2-thiopheneacetic acid, EDC, HOBT, CH_2Cl_2; (3) NMM, CH_2Cl_2, (70%); (f) HCl (3 M), 1,4-dioxane, Δ (64%).

lactam antibiotics, including oral drugs, in multidrug resistant *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, as well as *Enterobacteriaceae*.[81,82] The combination meropenem/QPX7728 was revealed to be the most efficient leading to MIC_{50}/MIC_{90} values of 1/8 μg mL^{-1} and 0.5/4 μg mL^{-1} at fixed QPX7728 concentrations of 4 μg mL^{-1} and 8 μg mL^{-1}, respectively. Other types of cyclic boronate derivatives such as oxaborole derivative **16** were also investigated.[83] However, despite the inhibitory potency of **16** against AmpC and OXA-23, its ability to restore the antibiotic capacity of ceftazidime is unfortunately low.

3.2. 1,6-Diazabicyclo[3,2,1]octanes. These types of compounds were designed in the 1990s by chemists at Hoechst Marion Roussel (now part of Sanofi-Aventis) as potential new β-lactam-type antibiotics, since it was expected that the bicyclic carbamoyl moiety would be a good mimic of the β-lactam ring.[84] However, even though this was not considered at that time to be the case, the initial examples proved to have promising inhibitory capacity against classes A and C β-lactamase enzymes. This important discovery triggered the development of a large number of DBO analogs during the period 2001−2004,[85−88] which allowed the identification of avibactam (**23**), also known as AVE1330A and NXL104 (Table 2).[52,89] In the beginning, very little attention was paid to the antibiotic activity of **23**, which was considered low, and hence its main application was focused on its activity as a non-β-lactam β-lactamase inhibitor, thus rescuing antibiotics in clinical use from bacterial resistance. Avibactam was approved in 2014 by the FDA in combination with ceftazidime for the treatment of (i) complicated intra-abdominal infections (in combination with metronidazole) in adult and pediatric patients (three months or older) caused by the following susceptible Gram-negative microorganisms *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* complex, and *P. aeruginosa* and (ii) complicated urinary tract infections including pyelonephritis in adult and pediatric patients (three months or older), caused by *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *C. freundii* complex, *P. mirabilis*, and *P. aeruginosa*, and in 2019 for (iii) hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia in patients 18 years and older.[90] Moreover, the combination therapy aztreonam/avibactam is currently in clinical trials (phase II). Other potential combinations of avibactam such as ceftaroline fosamil/avibactam and ceftazidime/fosfomycin/avibactam were also proposed by research clinicians.[91−93] A prodrug of avibactam for oral administration has also been described recently.[94]

Table 2. Avibactam (23) and Its More Relevant Analogs 24−28[a]

DBO Inhibitor	Chemical structure	Enhanced antibiotic	References
Avibactam (AVE1330A, NXL104)	 23	Ceftazidime	85−86,89
Relebactam (MK 7655)	 24	Imipenem-cilastatin	106,107
Zidebactam (WCK 5107)	 25	Cefepime	101−104
Nacubactam (OP0595, RO7079901, RG6080)	 26	Meropenem	104,108
WCK 5153	 27	Cefepime	112,113
WCK 4234	 28	Imipenem, meropenem	112,113

[a]Other inhibitor names are provided in parentheses.

The novel mechanism of action of avibactam, which will be discussed below, and its effectiveness against a large number of β-lactamase enzymes, specifically classes A and C and some class D,[95] encouraged the development of novel avibactam analogs in the subsequent years.[96−104] As a result of this effort, new avibactam-based analogs were identified and the most relevant examples, namely, relebactam (**24**, MK 7655), zidebactam (**25**, WCK 5107), and nacubactam (**26**, OP0595, RO7079901, or RG6080), are already in clinical studies (Table 2). In these inhibitors the nitrogen atom of the primary amide in avibactam is functionalized with different moieties to improve binding and/or pharmacological properties. Zidebactam in combination with cefepime (namely, WCK 5222) is currently under phase 1 clinical development by Wockhardt for infections caused by multidrug-resistant Gram-negative pathogens, including *P. aeruginosa* and *A. baumannii*.[105−107]

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

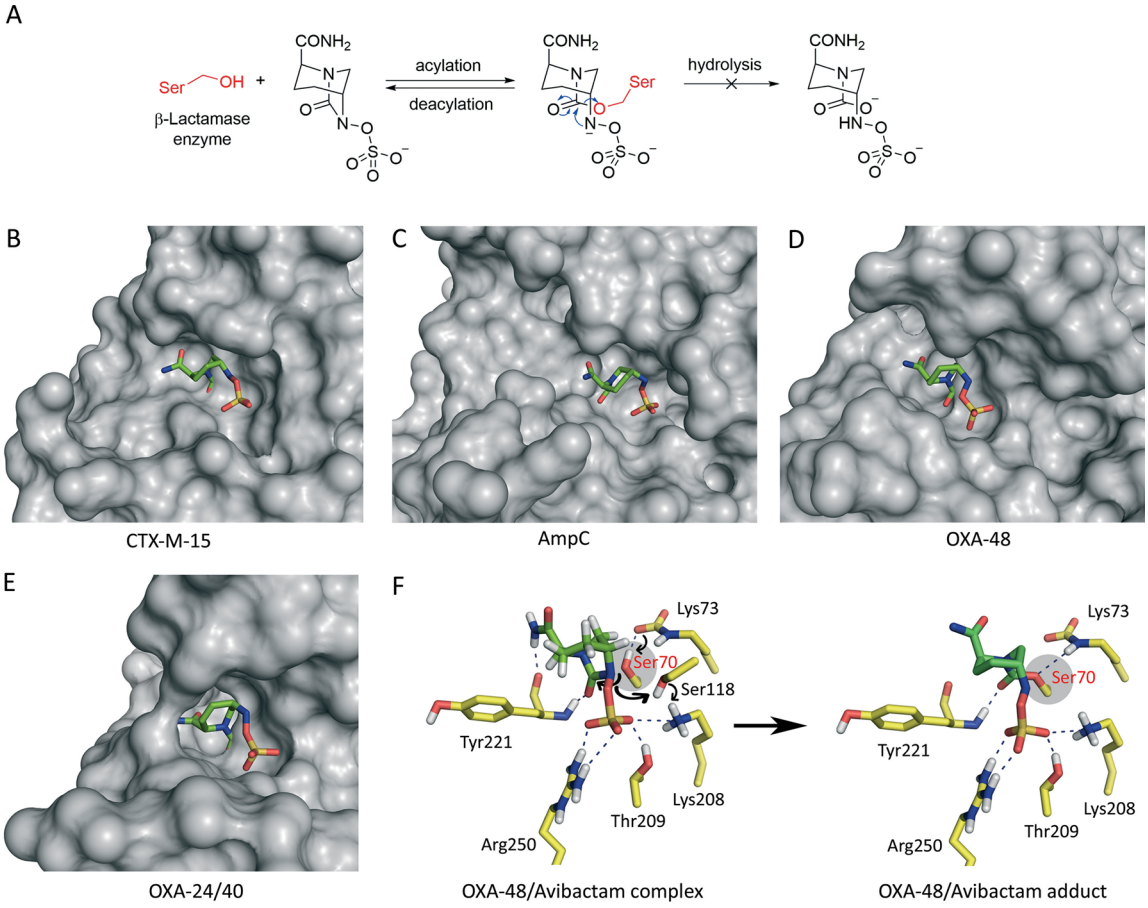


Figure 6. (A) Reversible covalent inhibition mechanism of avibactam (**23**). (B–E) Detailed view of the active site of diverse β-lactamase enzymes inhibited by avibactam: (B) CTX-M-15 (PDB entry 4S2I,[119] 1.6 Å); (C) AmpC (PDB entry 4HEF,[120] 1.86 Å); (D) OXA-48 (PDB entry 4WMC,[43] 2.3 Å); (E) OXA-24/40 (PDB entry 4WM9,[43] 2.4 Å). Note how OXA-24/40 has a very closed active site while the other enzymes have totally open ones. (F) Proposed inhibition mechanism of avibactam in class D β-lactamase enzymes.[43] The OXA-48/avibactam complex was obtained by docking studies using the program GOLD 5.2.2 and the enzyme coordinates observed in the OXA-48/avibactam adduct (PDB entry 4S2N,[119] 2.0 Å). Relevant side chain residues and polar interactions (blue dashed lines) are shown and labeled. The position of the catalytic serine (Ser70) is highlighted with a gray shadow.

This compound is also active against metallo-β-lactamase-producing high-risk clones.[102] Relebactam in combination therapy with imipenem-cilastatin proved to be efficient *in vivo* in mouse models of disseminated and pulmonary infection caused by imipenem-resistant clinical isolates of *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*.[108−110] Moreover, the imipenem-cilastatin/relebactam combination therapy was found to be less effective in the delayed pulmonary model than in the immediate pulmonary model. This combination therapy of relebactam was approved by FDA in July 2019 for the treatment of (i) complicated urinary tract infections, including pyelonephritis, and (ii) complicated intra-abdominal infections in patients 18 years and older, caused by the following susceptible Gram-negative microorganisms: *E. cloacae, E. coli, K. aerogenes, K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa*. Nacubactam, which was developed by NacuGen Therapeutics (Fedora Pharmaceuticals & Meiji Seika Pharma joint venture), is currently under clinical studies in combination with meropenem. This compound, which is the first DBO inhibitor that was shown to have intrinsic *in vivo* antibacterial activity by inhibition of the cell wall PBP2 enzyme, provides a broad-spectrum activity when used in combination with β-lactam antibiotics, and it also has an improved stability against common β-lactamases.[111−113]

Other, more recently developed, avibactam analogs that stand out due to their excellent microbiological properties are WCK 5153 (**27**), which is structurally very similar to zidebactam, and WCK 4234 (**28**), in which the amide group is replaced by a nitrile moiety (Table 2). WCK 5153 proved to be a good inhibitor of classes A and C β-lactamases, but it was inefficient against hard to inhibit OXA carbapenemases, such as OXA-24/40 and OXA-23.[114,115] WCK 4234 strongly potentiates imipenem and meropenem against *Enterobacteriaceae* strains that harbor OXA-48/OXA-181 or KPC enzymes to give MIC values for the antibiotics of ≤ 2 $\mu g\ mL^{-1}$ in almost all cases.[116,117] WCK 4234 also showed an improved kinetic profile when compared to avibactam and relebactam against OXA-24/40, OXA-23, and KPC-2.[116] The combination meropenem/WCK 4234 was efficient in *in vivo* studies in murine perintonitis and neutropenic lung infection model caused by multiresistant *A. baumannii*.[116]

In contrast to other β-lactamase inhibitors, avibactam is a reversible covalent inhibitor against most β-lactamases.[118−120] The mechanism involves nucleophilic attack of the catalytic serine, mediated by a lysine or a carboxy-lysine residue in the vicinity, to the carbonyl group of the carbamoyl moiety of avibactam, which is anchored to the enzyme active site by strong electrostatic interactions through its sulfamate moiety

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

(Figure 6A). Except for KPC enzymes, the resulting adduct does not undergo hydrolysis but rather a deacylation process to regenerate the enzyme and the inhibitor, which occurs as it is favored by the geometric arrangement of the enzyme adduct. For KPC enzymes, instead of the reversible inhibition, the hydrolysis of the enzyme adduct takes place because the avibactam enzyme adduct slowly undergoes desulfation, which prevents the regeneration of the urea moiety.[121] The reversibility of the inhibition process is rather different between the classes A and C enzymes when compared with class D carbapenemases. Thus, while for classes A and C β-lactamases the process is very fast (half-life values of minutes), it is very slow (days) for class D enzymes, which suggests a mainly irreversible process for the latter enzymes.[43] It was proved that this difference is due to a much slower acylation process for the latter enzymes, in particular for the OXA-23 and OXA-24/40 enzymes compared with other OXA-type enzymes, such as OXA-48, for which avibactam is a more effective inhibitor. The uncommon tunnel-like structure of the OXA-23 and OXA-24/40 active site, which behaves as a hydrophobic filter that controls access to the active site to only certain substrates, probably hinders the binding of spherical ligands such as avibactam. This situation can be easily visualized by comparing the available crystal structures of classes A and C β-lactamases, such as CTX-M-15 (PDB entry 4S2I, 1.6 Å) and AmpC (PDB entry 4HEF, 1.86 Å), respectively, and OXA-48 (PDB entry 4WMC, 2.3 Å), covalently modified by avibactam, with the corresponding OXA-24/40 one (PDB entry 4WM9, 2.4 Å) (Figure 6B–D vs Figure 6E).

Although avibactam is an excellent inhibitor of enzymes of classes A and C and some class D, such as OXA-48, its efficacy against bacterial pathogens harboring OXA-23 and OXA-24/40, which are carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamase enzymes widely dispersed in clinically relevant Gram-negative species such as *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, is low. It is therefore not surprising that much effort is currently devoted to identify avibactam-based analogs with an extended spectrum of activity. On the basis of the available structural information (such as PDB entry 4WM9,[43] 2.4 Å), Durand-Reville et al.[122] demonstrated that an increase in the rigidity of the six-membered ring of avibactam, which was achieved by the introduction of a double bond in positions 3 and 4 and the functionalization of position 3 with a methyl group, not only improves significantly the efficacy against β-lactamases of classes A and C but more importantly enhances the inhibitory capacity of the compound against class D carbapenemases such as OXA-24/40 (Figure 7). The new avibactam analog, namely, durlobactam (**29**, ETX2514), is effective against carbapenem-resistant *Entereobacteriaceae*, multidrug-resistant *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, and it also has an increased intrinsic antibacterial activity against *Entereobacteriaceae*. Thus, an 8-fold increase *in vitro* activity is achieved with the piperacillin/durlobactam combination (MIC = 8 μg mL^{-1}) vs the piperacillin/avibactam one (MIC = 64 μg mL^{-1}) (Table 3). Moreover, durlobactam proved to be a selective inhibitor of PBP2 in *E. coli* and *A. baumannii*, with efficacies (k_{inact}/K_i) of 10^4 and 10^3 (M^{-1} s^{-1}), respectively. However, despite having achieved a great leap in the inhibition of the challenging OXA-24/40 enzyme, the efficiency achieved is still far from that obtained against classes A and C (between 100-fold and 1000-fold higher). Remarkably, the authors found that imipenem/durlobactam and sulbactam/durlobactam effectively restore

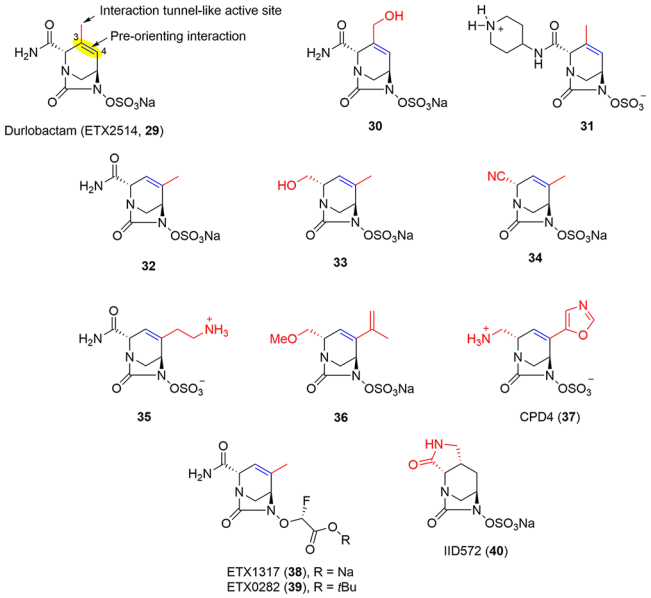


Figure 7. Reported avibactam analogs. The modifications in the avibactam scaffold are highlighted in red (substituents) and blue (double bond).

Table 3. MIC Values (μg mL^{-1}) of Piperacillin with Diverse Resistant Strains of *P. aeruginosa* in the Presence and Absence of Selected DBO Inhibitors[122]

inhibitor[a]	KPC-2	AmpC	OXA-24/40
none	>64	>64	>64
avibactam	8	8	64
durlobactam	4	2	8
32	4	8	16
33	8	32	64
34	64	>64	8
36	>64	>64	>64

[a]Inhibitor concentration = 4 μg mL^{-1}.

imipenem and sulbactam susceptibility in *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, respectively. The latter combination is currently under clinical development.

The resolution of the crystal structure of OXA-24/40 covalently modified by durlobactam (PDB entry 6MPQ, 1.95 Å) reported by Barnes et al.[123] reveals that the rigidification of the six-membered ring of the DBO analog fixes the position of the methyl group of the ligand toward the tunnel-like enzyme active site (Figure 8). As a consequence, a more open conformation of the active site is achieved and a different arrangement of the primary amide moiety (position 2, 66° rotation) is also observed. Shapiro et al.[124] studied the reversibility of the inhibition of classes A, C, and D β-lactamase enzymes by durlobactam. The authors reported that the dissociation constants vary significantly, with the β-lactamase having the lowest constant with the class D type enzymes. Thus, durlobactam is recycled intact for certain enzymes expressed in *P. aeruginosa*, such as AmpC, CTX-M-15, P99, SHV-5, and TEM-1. However, this is not the case for KPC-2, OXA-10, OXA-23, OXA-24/40, and OXA-48.

Other modifications of the six-membered ring of avibactam were explored, and these included functionalization of the double bond either in position 3 or 4 with apolar (methyl, isopropenyl) or polar substituents (CH_2OH, $CH_2CH_2NH_3$)

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859–1881

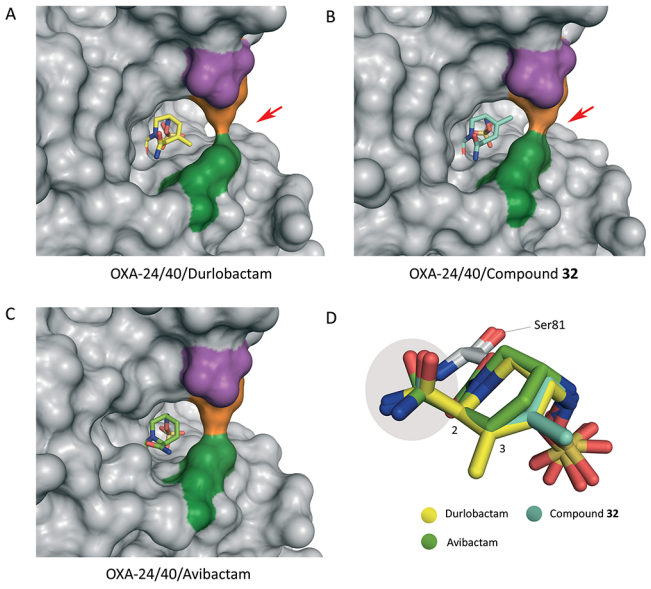
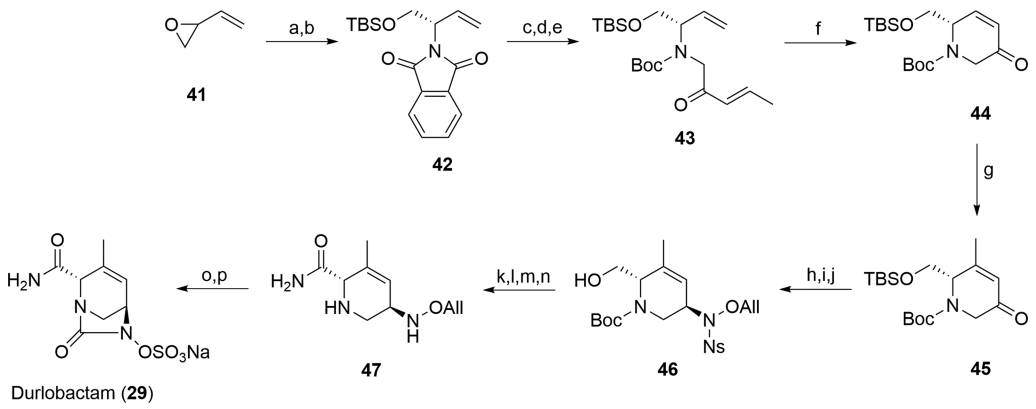


Figure 8. Detailed view of the crystal structure of OXA-24/40 covalently modified by durlobactam (A, PDB entry 6MPQ), compound **32** (B, PDB entry 5VFD), and avibactam (C, PDB entry 4WM9). The tunnel-like active site, which is composed by Tyr112 (orange), Thr111 (magenta), and Met223 (green), is highlighted. Note how a more open active site is observed in the durlobactam/OXA-24/40 and **32**/OXA-24/40 adducts. (D) Comparison of the covalently modified catalytic serine (Ser81) by durlobactam (yellow), **32** (blue), and avibactam (green). Note the different arrangement of the amide moiety in position 2 of durlobactam and **32** in comparison to avibactam.

and/or replacement of the amide moiety by other groups (Figure 7, compounds **30**–**39**). Among them, it is worth mentioning the durlobactam regioisomer, compound **32**, with a decrease in the MIC values of piperacillin of between 2- and 4-fold in *P. aeruginosa* strains harboring KPC-2 and OXA-24/40 enzymes, respectively (Table 3). Like durlobactam, compound **32** also causes a more open conformation of the tunnel-like entrance of OXA-24/40 and a different arrangement of the primary amide moiety (Figure 8B and Figure 8D). The discovery that an increase in the rigidity of the six-membered ring of avibactam (i) improves the inhibitory potency of these compounds against certain β-lactamases for which avibactam proved to be inefficient and (ii) also enhances their antibiotic activity by inhibition of PBP2 has had a great impact in the field, which has triggered the development of promising new potential candidates. A good example is ETX0282 (**39**), an analog of compound **32** in which the sulfate moiety has been replaced by a (*R*)-2-fluoroacetate providing an orally available drug (Figure 7). ETX0282 is a prodrug of the DBO inhibitor ETX1317 (**38**) that is currently in clinical development in combination with cefpodoxime proxetil, a clinically approved proform of cefpodoxime for the treatment of antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* urinary tract infection.[1,125] As durlobactam, ETX1317 (**38**) has intrinsic *in vitro* antibacterial activity against some *Enterobacteriaceae* by inhibition of PBP2, but that is not translated *in vivo* when dosed alone. ETX1317 efficiently restores the cefpodoxime activity in *Enterobacteriaceae* strains expressing ESBL, AmpC-overexpressing, KPC and OXA-48-like enzymes. Also remarkable is the recently developed DBO analog CDP4 (**37**) that incorporates an oxazole moiety into the six-membered ring of avibactam (Figure 7).[126] CDP4, which is a globally neutral ligand, was shown to have excellent antibacterial activity due to the effective inhibition of PBP2.[127] Thus, the MIC_{50} values of CPD4 are 0.031 μg mL^{-1} and 1 μg mL^{-1} on *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively, which are significantly lower than the corresponding ones of avibactam (32 μg mL^{-1} and >32 μg mL^{-1}, respectively). CPD4 proved to be a good β-lactamase inhibitor of some class D enzymes, such as OXA-48 and OXA-15, while causes a modest inhibition of class A enzymes, such as TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, and KPC-2. Its efficiency against class C enzymes is low.

The main drawback of durlobactam is perhaps the 16 synthetic steps required for its preparation (Scheme 2). The synthesis involves the preparation of the chiral 3,6-dihydropyridine **44** by ring-closing metathesis of dialkene **43**, which is

Scheme 2. Synthesis of Durlobactam[a]



[a]Reagents, conditions, and yields: (a) allylpalladium chloride dimer, (*R*,*R*)-DACH-naphthyl Trost ligand, phthalimide, Na_2CO_3, CH_2Cl_2, rt (94%); (b) TBSCl, imidazole, CH_2Cl_2, rt (quant); (c) hydrazine, MeOH, 65 °C (94%); (d) 1. 2-bromo-*N*-methoxy-*N*-methylacetamide, $CsCO_3$, MeCN/H_2O, 0 °C; (2) Boc_2O, (66%); (e) prop-1-enylmagnesium bromide, THF, 0 °C (87%); (f) Hoveyda–Grubbs second generation (cat.), PhMe, 65 °C (70%); (g) (1) MeLi, CuI, Et_2O, 0 °C; (2) TMSCl, Et_3N, rt. 3. $Pd(OAc)_2$, MeCN, rt (58%); (h) $NaBH_4$, $CeCl_3$, MeOH, 0 °C (86%); (i) *N*-allyloxy-2-nitrobenzenesuldonamide, Ph_3P, DIAD, PhMe, rt (77%); (j) TBAF, THF, 0 °C (79%); (k) CrO_3, H_5IO_6, MeCN, 0 °C to rt (86%); (l) NH_4Cl, HATU, DIPEA, DMF, rt (70%); (m) $ZnBr_2$, CH_2Cl_2, rt (91%); (n) PhSH, K_2CO_3, MeCN, rt (71%); (o) triphosgene, DEPEA, MeCN, 0 °C (82%); (p) (1) $Pd(PPh_3)_4$, AcOH, CH_2Cl_2, rt; (2) Py, Py·SO_3, rt (14%).

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859–1881

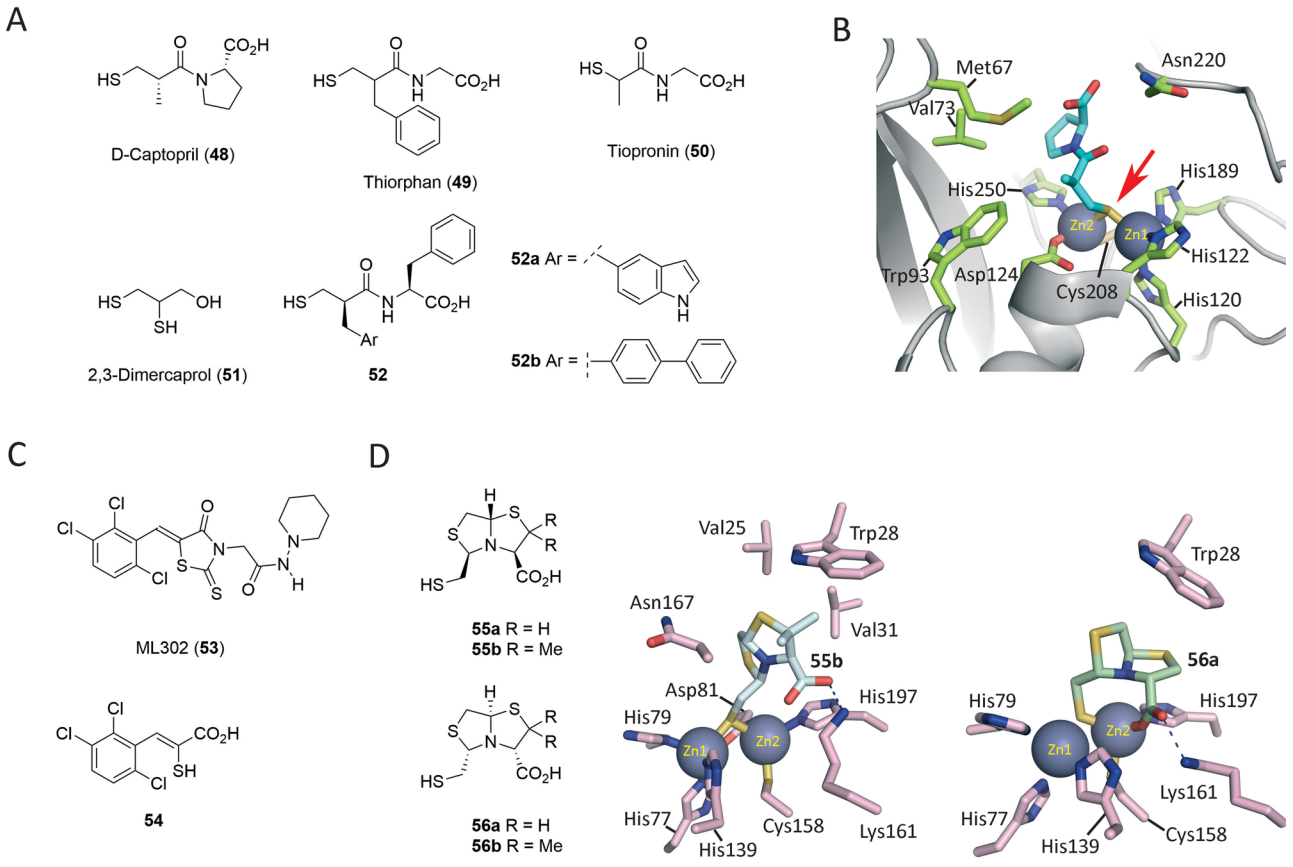


Figure 9. (A) Approved drugs (or their bioactive metabolites) containing a free thiol group and recently reported thiorpan analogs that inhibit the clinically relevant metallo-β-lactamases. (B) Crystal structure of NMD-1 in complex with L-captopril (PDB entry 4EXS, 2.4 Å). (C) Highly potent rhodamine and its bioactive metabolite with a broad-spectrum activity able to inhibit both serine- and metallo-β-lactamases as well as PBPs. (D) Reported bisthiazolidine inhibitors active against a wide and diverse type of class B enzymes and crystal structures of IMP-1 in complex with **55b** (PDB entry 5EWA, 2.3 Å) and **56a** (PDB entry 5EV8, 2.3 Å). Note how for **56a** the carboxylate group of the ligand is also involved in the coordination of the metal ion.

synthesized in five steps from 2-vinyloxirane (**41**) by palladium-catalyzed Trost asymmetric allylic alkylation as a key step. The methyl group is subsequently introduced by conjugate addition of methyl cuprate in **44**. Finally, the key carbamoyl group for the activity of the DBO inhibitors was incorporated by diastereoselective 1,2-reduction of **45** and subsequent Mitsunobu reaction with *N*-allyloxy-2-nitrobenzenesulfonamide. Although this synthetic scheme might be a handicap, given the excellent pharmacological properties of this compound, it is expected that new, shorter, and exciting synthetic strategies might be developed in the near future, along with a new generation of inhibitors with improved activities against the challenging carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamase enzymes.

Cases of resistance to the combination ceftazidime/avibactam have already been reported.[128−131] Recently, Reck et al.[132] described a novel avibactam analog, compound IID572 (**40**, BOS 572, Figure 7), capable of restoring the activity of piperacillin as an alternative to the piperacillin/tazobactam combination, which has little activity against extended spectrum serine β-lactamases or serine carbapenemases. In contrast to other DBO analogs, IID572 lacks antibacterial activity.

3.3. Thiol Derivatives. The thiol group is known to be a zinc chelator, and it is therefore not surprising that this moiety is commonly found in programs aimed at identifying novel inhibitors against class B β-lactamases.[133−135] The most revelant examples reported to date are summarized in Figure 9. Klingler et al.[136] screened 11 approved drugs or their bioactive metabolites containing a free thiol group, and they identified four drugs that inhibit the clinically relevant metallo-β-lactamases NDM-1, VIM-1, and IMP-7 (Figure 9A). Specifically, these inhibitors are captopril (**48**), which is an approved inhibitor of angiotensin-converting enzyme, thiorphan (**49**), which is the active metabolite of racecadotril, an antidiarrheal drug that acts as an enkephalinase inhibitor, tiopronin (**50**), which is employed in the treatment of severe homozygous cystinuria, and dimercaprol (**51**), which is used for arsenic, cadmium, and mercury poisoning. These compounds showed IC_{50} values in the low micromolar range for all tested metallo-β-lactamases, and they also had good synergy with imipenem. Remarkably, the usual dosage of these drugs was sufficient for the effective *in vitro* inhibition of these metallo-β-lactamases but not for restoration of the activity of imipinem. Moreover, as other chelating derivatives that are discussed in the following section, it is important to be aware of the possible unexpected toxic effects of these types of compounds associated with cross reactivity with human metalloenzymes, especially for not highly efficient inhibitors. As observed in the crystal structure of NDM-1 in complex with L-captopril (PDB entry 4EXS,[51] 2.4 Å), the thiolate group intercalates between the two Zn^{2+} ions and occupies the fourth

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

coordination site for each ion (Figure 9B).[137] This thiolate group replaces the hydroxide anion located between the two Zn^{2+} ions that triggers the enzyme-catalyzed hydrolytic reaction, and this is also observed in the crystal structure of the wild-type enzyme (PDB entry 5XP6, 0.95 Å).[138] The latter replacement is not observed in the crystal structure of NDM-1/tiopronin enzyme complex (PDB entry 5A5Z,[136] 2.4 Å). Instead, coordination with the Zn2 site is obtained. In all cases, the presence of a carboxylate group in the scaffold seems to be crucial for good inhibitory activity. Moreover, modifications made to the thiorpan scaffold to improve the binding interactions of the ligand with the hydrophobic domain of the active site allowed the identification of inhibitors **52a** and **52b**, which have IC_{50} values in the nanomolar range (Figure 9A).[139]

In a similar way to avibactam, rhodanines are compounds that have shown inhibitory activity against serine-β-lactamases (classes A and C) and antibiotic activity against PBPs (Figure 9C).[140−142] In an effort to find compounds with broad-spectrum activity that are able to inhibit both serine- and metallo-β-lactamases, as well as having good antibiotic activity, Spicer et al.[143] identified the rhodanine ML302 (**53**). This compound was discovered in a high-throughput screening against metallo-β-lactamase enzymes, and it is a novel dual VIM-2/IMP-1 inhibitor that exhibits efficacy in multiple clinical isolates. ML302 potentiates the antibiotic activity of imipenem in bacterial strains of *E. coli* BL21 harboring VIM-2 and IMP-1, as well as clinical isolates of *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* containing VIM-2, IMP-1, and NMD-1. ML302 proved to have a mixed uncompetitive/noncompetitive mode of action with K_i values of 183 nM and 930 nM against VIM-2 and IMP-1, respectively. Biochemical and crystallographic studies carried out by Brem et al.[144] on ML302 and diverse metallo-β-lactamases provided an insight into its mechanism of action and therapeutic potential. The authors found that ML302 undergoes hydrolysis (either enzyme- or buffer-mediated) to afford thioenolate **54**, which is the bioactive form of ML302. Compound **54**, which is generally more active than ML302, showed excellent synergy with its precursor in diverse metallo-β-lactamases such as VIM-2, VIM-1, SPM-1, IMP-1, NDM-1, and BcII. Considering that rhodamines can also inhibit other enzymes, such as aldose reductase, histone deacylases, and RNA polymerases, and their metabolites can also cause inhibition, the future therapeutic potential of this type of compound is probably questionable.

Inspired by the success of the aforementioned thiol-bearing carboxylate compounds, González et al.[145] identified bisthiazolidines **55** and **56** as new metallo-β-lactamase inhibitors that can restore the efficacy of imipenem (Figure 9D). These compounds retain some of the characteristics of the β-lactam compounds, which are good substrates for these enzymes. Specifically, they have a bicyclic structure with a bridging nitrogen atom and a carboxylate group in the α-position to the nitrogen atom. However, these compounds lack the carbonyl group necessary for their hydrolysis. In addition, they contain the thiol group necessary for coordination to the catalytic Zn^{2+} ion. Bisthiazolidines **55** and **56** proved to be very versatile inhibitors since they inhibit a wide and diverse range of class B enzymes, such as NDM-1, VIM-2, IMP-1, and BcII, all with values in the low micromolar range.[146] For most of the enzymes, the inhibitory capacity of the ligands is independent of the enantiomer used and the presence or absence of methyl groups in the scaffold. The resolution of diverse metallo-β-lactamases inhibited by these compounds provides an excellent understanding of their versatility, and this may inspire future designs (PDB entries 5EWA, 5EW0, 5EV8, 5EVB, 5EVD, 5EVK, and 4NQ6). These structures revealed that, as in the case of L-captopril, the thiolate group in **55** and **56** intercalates between the two Zn^{2+} ions and occupies the fourth coordination site for each ion. In addition, for ligand **56** the carboxylate group also coordinates to the catalytic metal, whereas for ligand **55** it establishes a strong electrostatic interaction with a lysine residue in the vicinity. The main advantages of this type of compound are the broad-spectrum activity against all class B enzymes and the simplicity of their synthesis. Future functionalization of the bisthiazolidine scaffold aimed at promoting extra binding interactions with the residues of the active site might increase their inhibition potency into the desirable nanomolar range. Also important will be to demonstrate the usefulness of this tiol derivatives *in vivo*.

3.4. Dicarboxylate Derivatives and Related Compounds. As for the thiol derivatives discussed in section 3.3, the capacity of the dicarboxylate derivatives to chelate metal ions have derived into the identification of inhibitors of diverse metallo-β-lactamase enzymes bearing this functional group. Thus, Chen et al.[147] used a fragment-based drug discovery approach and identified 2,6-dipicolinic acid (**57**) (Figure 10A). Further optimization of this scaffold led to the identification of compound **58** as a broad spectrum and potent inhibitor of the most clinically relevant metallo-β-lactamase enzymes, NDM-1, IMP-1, and VIM-2, with IC_{50} values in the low nanomolar range. Compound **58** was found to improve imipenem antibiotic activity in highly resistant clinical *E. coli* and *K. pneumoniae* strains harboring NMD-1. However, compound **58** may not be attractive for further development considering (i) it contains an aniline moiety that could have potential clastogenic and carcinogenic effects and (ii) 2,6-dipicolinic acid (**57**) and other associated derivatives also were shown to inhibit zinc-containing mammalian enzymes, such as dehydropeptidase and carboxypeptidases A and B, which may cause toxicity associated with this cross reactivity with human metalloenzymes.[148] Moreover, the 2-pyridinecarboxylate moiety seems to be responsible for the inhibitory capacity of this type of pyridine derivative since in the crystal CphA metallo-β-lactamase in complex with 2,4-pyridinedicarboxylic acid (**59**) (PDB entry 2GKL,[149] 1.86 Å), both the pyridine nitrogen atom and the carboxylate group at position 2 are coordinated to the catalytic Zn^{2+} ion. On the basis of this relevant structural feature, subsequent screening studies of nitrogen-containing heterocycles *ortho*-substituted with a carboxylate group led to the identification of the thiazole-4-carboxylic acid **60** (ANT431).[150] The crystal structure of VIM-2 in complex with ANT431 (PDB entry 6HF5, 1.8 Å) revealed that, as for pyridine **59**, both the carboxylate group and the thiazole nitrogen atom of the ligand are involved in the zinc metal coordination sphere (Zn2 site) (Figure 10B). This compound proved to be more potent and to have improved permeability into the bacterial periplasm than the aforementioned pyridine derivatives **57**−**59**. Moreover, ANT431 proved to enhance the efficacy of meropenem in an *E. coli* murine thigh infection model.[151]

On the basis of a cell-based screen of dimethylsulfoxide-disolved natural products extracts derived from environmental microorganisms active for inhibitors of the metallo-β-lactamase enzyme NDM-1, King et al.[152] identified aspergillomarasmine

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

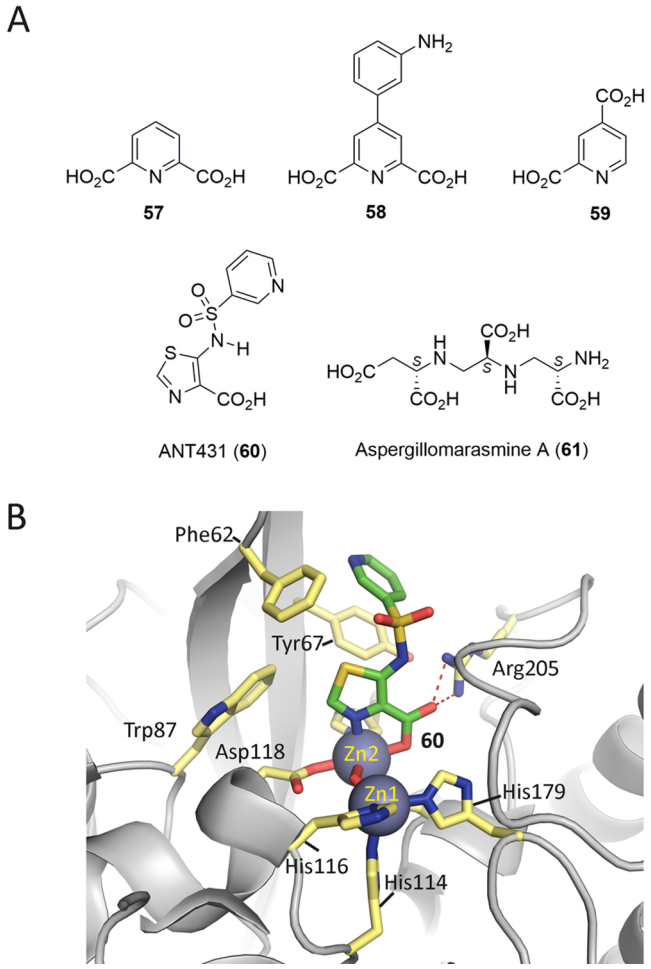
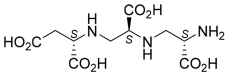
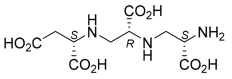
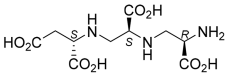
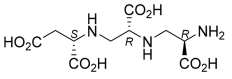
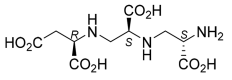


Figure 10. (A) Selected examples of dicarboxylate derivatives and related compounds. (B) Crystal structure of VIM-2 in complex with ANT431 (**60**) (PDB entry 6HF5, 1.8 Å). Note how the ligand is coordinated to one of the two catalytic Zn^{2+} ions.

A (**61**) (Figure 10A). This compound is a fungal natural product isolated from *Aspergillus versicolor* that proved to be a potent inhibitor of NDM-1 and VIM-2 enzymes and, to a lesser extent, IMP-7 (Figure 10A).[153] Aspergillomarasmine A fully restores the activity of meropenem in *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp., and *Pseudomonas* spp. harboring NDM-1 and VIM-2 enzymes, either *in vitro* and *in vivo* (Table 4). On the basis of equilibrium dialysis experiments and metal analysis with inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) studies, Bergstrom et al.[154] showed that aspergillomarasmine A deactivates the metallo-β-lactamase enzymes by a metal removal mechanism. Considering that the Zn^{2+} ion seems to bind tighter to the Zn1 site than the Zn2 site,[155] the authors suggested that aspergillomarasmine A preferentially would remove the catalytic ion from Zn2 site. The lower efficacy of this natural compound against IMP-7 is something still to be studied in more detail because no significant differences were identified in the mechanism of action among the three metallo-β-lactamases analyzed (NDM-1, VIM-2, and IMP-7).

The efficacy of aspergillomarasmine A against the most relevant metallo-β-lactamases has aroused great interest in recent years, both in the identification of novel analogs based on its chemical structure and in the development of efficient synthetic methods for its preparation.[156−158] Because of the latter, (i) the previously assigned stereochemistry (*SRR* configuration) was also corrected to the actual *SSS* one, (ii) the natural isomer proved to be the most potent inhibitor of all diastereoisomers synthesized, compounds **62**−**65**, either *in vitro* and *in vivo*, and (iii) changes in the stereochemistry also provide inhibitors with IC_{50} close to the parent compound (Table 4). Although the possible competition with human metalloenzymes is something to keep in mind in the inhibition of this type of β-lactamases, a more precise knowledge of the suggested metal removal mechanism might help to enter this compound, or derivatives thereof, into clinical development.

Table 4. IC_{50} Values of Meropenem in Combination with Aspergillomarasmine A and Some of Its Diasteroisomers against NDM-1

Compound	IC_{50} (μM)[158]
	9.3
Aspergillomarasmine A (**61**)	
	12.5
62	
	11.9
63	
	10.2
64	
	11.6
65	

4. PENICILLIN-BASED SULFONES

The penicillin-based sulfones are among the first β-lactamase inhibitors used in the clinic. These compounds arose after the discovery by Beecham Group (now part of GSK) in 1976 of clavulanic acid (**66**), a natural product that is now used in combination with penicillins such as amoxicillin (Figure 11A).[159−161] The irreversible inhibition mechanism of clavulanic acid inspired the synthesis of other mechanistically related compounds and led to the identification of the penicillin-based sulfones and the discovery of sulbactam (**67**, CP-45,899)[162] (Figures 11A and S2). After reaction with the enzyme, sulbactam gives rise to a sulfinate as a leaving group, which is absent in penicillins, and this also promotes extra strong electrostatic interactions with the side chain residues of the active site. Sulbactam, which is used in clinical practice in combination with ampicillin, cefoperazone or ceftriaxone, has some intrinsic antibacterial activity against *Acinetobacter* species and other pathogens.[163] This inhibitor is unfortunately ineffective against carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases. The subsequent modification of the sulbactam scaffold allowed the identification of tazobactam (**68**, YTR 830),[164] which is currently used in clinical practice in combination with ceftolozane or piperacillin.[165] Recently, Allecra Therapeutics developed a novel tazobactam derivative, enmetazobactam (**69**, AAI101), that in combination with cefepime is currently in phase III of clinical development for the treatment of

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

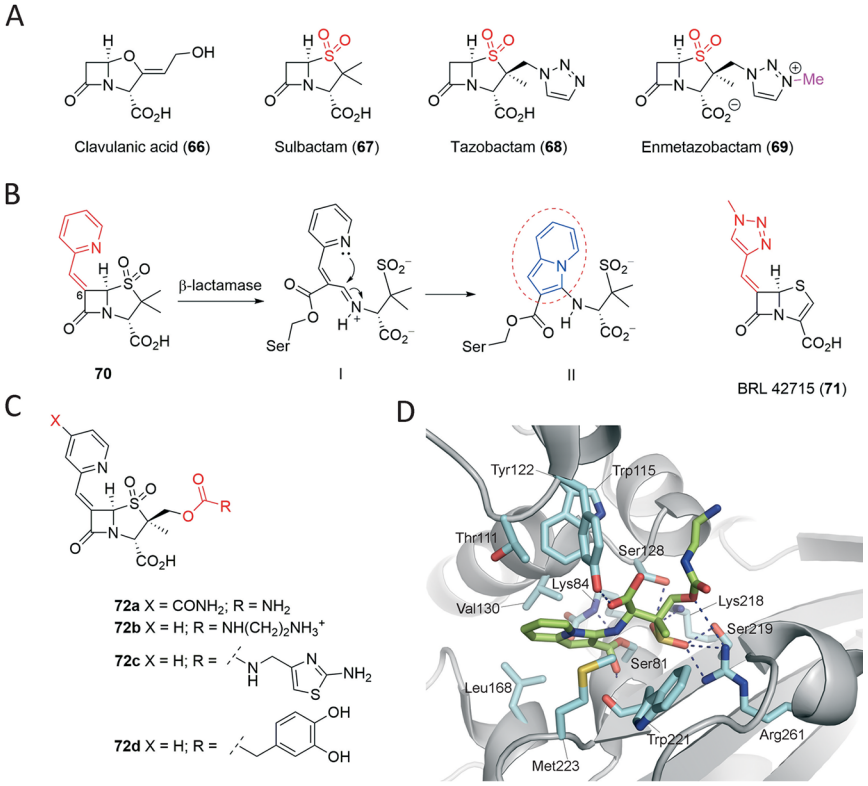


Figure 11. (A) Chemical structure of clavulanic acid (**66**), sulbactam (**67**), and tazobactam (**68**), which are the first β-lactamase inhibitors in clinical use, and enmetazobactam (**69**) in phase III clinical studies. (B) Covalent modification mechanism of 6-(2-pyridyl)alkylidene penicillin-based sulfone **70** and chemical structure of BRL 42715 (**71**). (C) Selected examples of potent 6-(2-pyridyl)alkylidene penicillin-based sulfones **72**. (D) Crystal structure of OXA-24/40 covalently modified by **72b** (PDB entry 3FZC, 2.0 Å).

patients with complicated urinary tract infections (Figure 11A).[166−168] The combination cefepime/enmetazobactam was demonstrated to be efficient against some *Enterobacteriaceae* expressing ESBLs and showed improved potency compared with the combination piperacillin/tazobactam.[169] Specifically, a fixed concentration of 8 μg mL^{-1} reduced the cefepime MIC$_{90}$ from >64 μg mL^{-1} and 16 μg mL^{-1} in *E. coli* and *K. pneumoniae* to 0.5 μg mL^{-1} and 1 μg mL^{-1}, respectively.[170] Enmetazobactam results from the incorporation of a methyl group at the terminal position of the 1,2,3-triazole moiety of tazobactam that provides a neutral compound with enhanced bacterial cell penetration properties. In addition, steady-state inactivation studies carried out with SHV-1, KPC-2, and CTX-M-15 revealed that enmetazobactam has a distinct mechanism of β-lactamase inhibition compared with tazobactam and that rate constants were more similar to those avibactam.[169]

The introduction of an arylmethylene moiety at the C6 position of the β-lactam has proven to be very interesting to afford complicated, and probably unusual, enzyme adducts and to achieve markedly improved efficacy. Thus, Chen et al.[171] demonstrated that the incorporation of a (2-pyridyl)methylene group at C6 in sulbactam, compound **70**, increases the inhibitory capacity against certain β-lactamases up to the low micromolar range due to the formation of an indolizine enzyme adduct II that is more resistant to hydrolysis than the usual aliphatic ones (Figure 11B). The formation of II occurs by the initial generation of the conjugated imine I resulting from nucleophilic attack of the catalytic serine to the β-lactam ring in **70**. The product subsequently undergoes an intramolecular nucleophilic attack by the pyridine nitrogen atom. Coleman et al.[172] found that the introduction of a [4-(1,2,3-triazolyl)]methylene group at the C6 position of a penem provides the most potent β-lactamase inhibitor ever identified, BRL 42715 (**71**) (Figure 11B).[173] This compound, which has no appreciable antibacterial activity with the exception of methicillin-sensitive staphylococci (MIC 1 mg mL^{-1}), is an extremely efficient inhibitor of all serine β-lactamase enzymes. At very low concentration ($\leq$0.25 μg mL^{-1}) BRL 42715 restores efficiently the antibiotic activity of amoxicillin in bacterial strains that harbor diverse β-lactamases. Unfortunately, besides its unique inhibitory efficacy, BRL 42715 (**71**) proved to be too unstable for further development since it is rapidly hydrolyzed by metallo-β-lactamases to give a dihydrothiazepine derivative.[174,175]

Despite the synthetic difficulty, the modification of the C3 pro-*S* methyl group and C6 position in the sulbactam core, compounds **72**, has undoubtedly proven to be the best approach to obtain inhibitors that are able to inhibit carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases, specifically OXA-23 and OXA-24/40 (Figure 11C).[176] Compound **72d** (LN-1-255) proved to be the most efficient of the series in recovering the imipenem and meropenem antibiotic activity against bacterial strains carrying OXA-24/40 from *A. baumannii*, with MIC values in both cases of 1 μg mL^{-1}, thus inhibiting completely the activity of this carbapenemase. Under the same conditions the combinations imipenem/tazobactam and meropenem/tazobactam give MIC values of 16 μg mL^{-1}. The catechol moiety in LN-1-255 seems to be responsible for the remarkable efficacy as it would facilitate internalization via bacterial iron uptake pathways. This compound has a K_i value of 700 nM against *A. baumannii* OXA-24/40. Moreover, LN-1-255 demonstrated excellent

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

microbiological synergy and inhibition kinetics parameters against diverse carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases in *A. baumannii*, including OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143, OXA-235, the chromosomally encoded OXA-51, and *K. pneumoniae* OXA-48, and a significantly higher activity than tazobactam and avibactam.[177,178] As revealed by the crystal structure of the OXA-24/40/**72b** enzyme adduct (PDB entry 3FZC, 2.0 Å), the flexible chain of the modified ligand is anchored in the active site by strong electrostatic and hydrogen bonding interactions between the sulfinate group and the carbamoyl group of the inhibitor and diverse polar residues within the pocket (Ser128, Lys218, Ser219, Ser128, Arg261) (Figure 11D).[176,179] The *in vivo* evaluation of the therapeutic efficacy of LN-1-255 in combination with imipenem, in an experimental murine pneumonia model caused by carbapenem-resistant *A. baumannii* transformants and clinical isolates carrying carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases, showed that this combination provides higher protection against pneumonia than the treatment with imipenem alone.[180] LN-1-255 causes decreases in the MIC values of imipenem of between 32- and 128-fold. Intramuscular treatment with imipenem/LN-1-255 (30/50 mg/kg) reduced the bacterial burden in the infection with the ATCC 17978-OXA-23, clinical isolates carrying OXA-23 strains, ATCC 17978-OXA-24/40, and clinical isolates carrying OXA-24/40 strains by 4, 1.7, 2.5, and 4.5 $\log_{10}$ CFU/g lung, respectively. Moreover, toxicity was not observed in treated mice.

5. MISCELLANEOUS

This section covers β-lactamase inhibitors that do not have the functional groups responsible for the inhibitory activity included in the previous sections. Lyu et al.[181] recently reported a massive virtual screening by docking against AmpC from *E. coli* from an ultralarge library of 99 million molecules. As a result of this huge effort, 44 promising candidates that had been synthesized and tested against this enzyme were selected. Five of these compounds showed inhibitory constants in the micromolar range and proved to be competitive reversible inhibitors of the enzyme. Final optimization of these hits allowed the identification of a nanomolar noncovalent inhibitor, namely, phenol **73**, which binds to the oxyanion hole of AmpC, as revealed by the AmpC/**73** complex crystal structure (PDB entry 6DPT, 1.79 Å) (Figure 12A).

On the other hand, Chen et al.[182] reported selenium derivatives **74** linked to a fluorescent probe (coumarin, rhodamine B) that were shown to be useful as chemical sensors for the *in vitro* and *in vivo* detection of metallo-β-lactamases (Figure 12B). These compounds cause a dual covalent modification of NDM-1 enzymes that results in the release of the probe to the media. This is achieved by nucleophilic ring opening of the selenium ring by the zinc-coordinated cysteine residue, as well as nucleophilic attack of the ε-amino group of a lysine residue of the active site.

6. CONCLUSIONS AND OUTLOOK

The development of inhibitors that are capable of blocking the main mechanism of bacterial resistance to β-lactam antibiotics in order to restore the efficacy of these life-saving drugs is an appealing area of research that is clearly expanding. This boom has been encouraged by the indisputable successes of the first inhibitor in clinical use, clavulanic acid, which is used in combination with amoxicillin and was discovered in the late

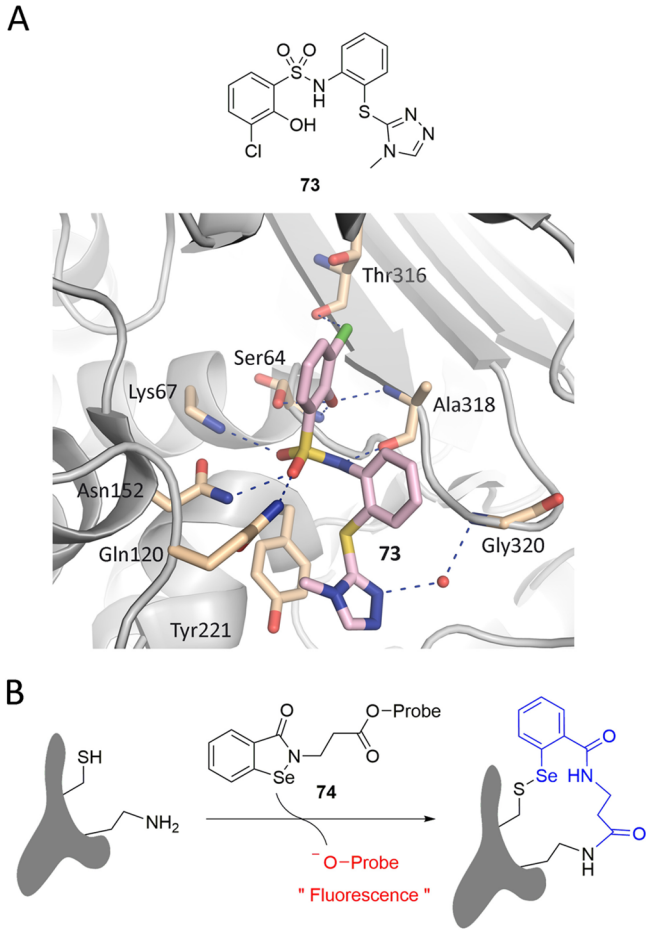


Figure 12. (A) Crystal structure of the AmpC/**73** enzyme complex (PDB entry 6DPT, 1.79 Å). (B) Irreversible inhibitors **74** for metallo-β-lactamase detection. Probe = coumarin or rhodamine B.

1970s, and by the effectiveness of many subsequent synthetic inhibitors, the design of which was inspired by its covalent mechanism of action. It is probably not realistic to think about developing a compound capable of blocking the wide variety of β-lactamases currently known, in particular given the relevant structural and mechanistic differences among them. However, some of the β-lactamase inhibitors discussed in this article are much closer than ever to achieving it. Thus, the boron-based compounds, in particular the cyclic boronate taniborbactam, represent the current hope against the most worrisome priority pathogens because when combined with cefepime, it proved to have a broad-spectrum of activity against a wide range of serine-β-lactamases, as well as relevant metallo-β-lactamases. Considering (i) the lack of therapeutic options against relevant metallo-β-lactamases despite the fact that they are widespread worldwide, (ii) the apparent absence of off-target effects associated with the potential interaction with human metalloenzymes, and (iii) the increasing number of pathogens coproducing both serine- and metallo-β-lactamases, the therapeutic potential of this type of cyclic boron-based compounds is huge.

After much effort devoted to expanding the spectrum of action of avibactam, a reference compound until not long ago, in particular to identify efficient inhibitors against certain carbapenem-hydrolyzing class D enzymes, which are widely found in *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, the therapeutic potential of the combination sulbactam/durlobactam for

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

infections caused by *A. baumannii* is a big step forward. The key to the success of durlobactam is their unique dual mechanism of action, i.e., "antibiotic + inhibitor of resistance", through which a single chemical entity has intrinsic *in vivo* antibacterial activity by disrupting an essential bacterial target (PBP2) and also inhibiting a wide range of β-lactamase enzymes. The discovery with durlobactam that the functionalization of the six-member ring of avibactam increases the spectrum of action of the DBOs inhibitors has been a revolution in the DBO field in the past few years. Good examples are the orally available prodrug of the DBO inhibitor ETX1317, ETX0282 in combination with cefpodoxime or CDP4.

However, work is still required on the design of small molecules that disable the hard to inhibit carbapenemases OXA-23 and OXA-24/40, which have an uncommon tunnel-like active site entrance and are widely dispersed in clinically relevant species such as *A. baumannii*. In the latter case, the penicillin-based sulfones functionalized in the C6 position and bearing a siderophore in the C3 pro-*S* methyl group, as compound LN-1-255, seem to be promising scaffolds for further development. If one considers (i) the extraordinary and always surprising ability of bacteria to generate ever more sophisticated defense mechanisms and (ii) as shown here, the challenging and expensive problem of the development a good inhibitor to block bacteria, it is possible that we may not win this race. However, we must strive to avoid a situation in which we return to the preantibiotic era. The results obtained to date with the combined therapy, as summarized in this article as "antibiotic + β-lactamase inhibitor", show that this is an excellent strategy identified by the pharmaceutical industry, and work in this area seems set to continue in the coming years.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279.

Figures S1 and S2 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: concepcion.gonzalez.bello@usc.es. Phone: +34 881 815726.

ORCID

Concepción González-Bello: 0000-0001-6439-553X

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Biographies

Concepción González-Bello obtained her Ph.D. in Chemistry at University of Santiago de Compostela (USC, Spain) in 1994. She did two predoctoral stays, one at the University of Gent (Belgium, 1991) with Prof. M. Vandewalle and the other at the Scripps Research Institute (U.S., 1992) with Prof. K. C. Nicolaou. After postdoctoral studies as a Research Associate at the University of Cambridge (UK) with Prof. C. Abell (1994−1996), she joined the USC as an Assistant Professor in 1996 and was promoted to Associate Professor in 2003. Since 2011, she has been one of the group leaders at the CiQUS. Her main research interest is to develop novel anti-infective drugs with new mechanisms of action as well as new β-lactamase inhibitors for combination therapy.

Diana Rodríguez obtained her degree in Chemistry at University of Santiago de Compostela in 2014 and her Master's degree at the same university in 2015. She is currently doing her final year Ph.D. studies under the supervision of Prof. González-Bello, in the synthesis of new irreversible inhibitors of β-lactamase enzymes for the treatment of multiresistant nosocomial infections.

Marina Pernas obtained her degree in Chemistry in 2013 and her Master's degree in 2014 from University of Santiago de Compostela. She is currently finishing her Ph.D. studies in the control of target and ligand conformation for the development of novel antibiotics in the González-Bellós group.

Ángela Rodríguez graduated in Chemistry in 2016 and obtained her Master's degree in Organic Chemistry in 2017 at University of Santiago de Compostela. She is doing her doctoral studies on novel approaches to face the challenge of antibiotics inefficiency to superbugs by disabling the master transcriptional factor LasR under the supervision of Prof. González-Bello.

Esther Colchón obtained her degree in Chemistry from the University of Salamanca in 2017 and then she moved to Santiago de Compostela to perform her Master's studies in Chemistry Research and Industrial Chemistry in 2018. Currently, she is a first year Ph.D. student in the González-Bellós group, carrying out the design and the synthesis of novel β-lactamase inhibitors of carbapenem-hydrolyzing class D enzymes.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competiveness (Grant SAF2016-75638-R), the Xunta de Galicia [Grant ED431B 2018/04 and Centro Singular De Investigación de Galicia Accreditation 2016−2019 (ED431G/09)], and the European Regional Development Fund (ERDF) is gratefully acknowledged. D.R. and M.P. thank the Xunta de Galicia, and A.R. acknowledges the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities for their respective predoctoral and FPI fellowships.

■ ABBREVIATIONS USED

OXA, oxacillinase; IMI, imipenem-hydrolyzing β-lactamases; VIM, Verona integron-encoded metallo-β-lactamase; NDM, New Delhi metallo-β-lactamase; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; DBO, 1,6-diazabicyclo[3,2,1]octane; PDB, Protein Data Bank

■ REFERENCES

(1) Gilbert, N. Four stories of antibacterial breakthroughs. *Nature* **2018**, *555*, S5−S7.

(2) Sommer, M. O. A.; Munck, C.; Toft-Kehler, R. V.; Andersson, D. I. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 689−696.

(3) Brown, E. D.; Wright, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature* **2016**, *529*, 336−343.

(4) Bengtsson-Palme, J.; Kristiansson, E.; Larsson, D. G. J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **2018**, *42*, fux053.

(5) Satyanarayana, M. The hunt for new antibiotics grows harder as resistance builds. *Chem. Eng. News* **2018**, *96*, 16−18.

(6) McKenna, M. Antibiotic resistance: the last resort. *Nature* **2013**, *499*, 394−396.

(7) Martinez, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technol.* **2014**, *11*, 33−39.

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

(8) Levin-Reisman, I.; Ronin, I.; Gefen, O.; Braniss, I.; Shoresh, N.; Balaban, N. Q. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science* **2017**, *355*, 826−830.
(9) Vikesland, P.; Garner, E.; Gupta, S.; Kang, S.; Maile-Moskowitz, A.; Zhu, N. Differential drivers of antimicrobial resistance across the world. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 916−924.
(10) Thayer, A. M. Antibiotics: will the bugs always win? *Chem. Eng. News* **2016**, *94*, 36−43.
(11) 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. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **2011**, *477*, 457−461.
(12) Wright, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 175−186.
(13) Theuretzbacher, U. Market watch: antibacterial innovation in european SMEs. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2016**, *15*, 812−813.
(14) Lewis, K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2013**, *12*, 371−387.
(15) https://www.pewtrusts.org/-/media/assets/2019/03/antibiotics-currently-in-global-clinical-development.pdf?la=en&hash=078238EF15FACD9753ED2C4EBAB58F16B664B59E (accessed July 15, 2019).
(16) WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. February 27, 2017. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1 (accessed July 15, 2019).
(17) Gifford, D. R.; Furió, V.; Papkou, A.; Vogwill, T.; Oliver, A.; MacLean, R. C. Identifying and exploiting genes that potentiate the evolution of antibiotic resistance. *Nat. Ecol. Evol.* **2018**, *2*, 1033−1039.
(18) Brown, D. Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? *Nat. Rev. Drug Discovery* **2015**, *14*, 821−832.
(19) Douafer, H.; Andrieu, V.; Phanstiel, O.; Brunel, J. M. Antibiotic adjuvants: make antibiotics great again! *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8665−8681.
(20) Chakradhar, S. Whaťs old is new: reconfiguring known antibiotics to fight drug resistance. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 1197−1198.
(21) Gill, E. E.; Franco, O. L.; Hancock, R. E. W. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *85*, 56−78.
(22) Kalan, L.; Wright, G. D. Antibiotic adjuvants: multicomponent anti-infective strategies. *Expert Rev. Mol. Med.* **2011**, *13*, e5.
(23) Farha, M. A.; Brown, E. D. Discovery of antibiotic adjuvants. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 120−122.
(24) Bush, K. Investigational agents for the treatment of Gram-negative bacterial infections: a reality check. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 509−511.
(25) Worthington, R. J.; Melander, C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 177−184.
(26) Wright, G. D. Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 862−871.
(27) Melander, R. J.; Melander, C. The challenge of overcoming antibiotic resistance: an adjuvant approach? *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3*, 559−563.
(28) Schillaci, D.; Spanô, V.; Parrino, B.; Carbone, A.; Montalbano, A.; Barraja, P.; Diana, P.; Cirrincione, G.; Cascioferro, S. Pharmaceutical approaches to target antibiotic resistance mechanisms. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 8268−8297.
(29) Tyers, M.; Wright, G. D. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 141−155.
(30) Docquier, J.-D.; Mangani, S. An update on β-lactamase inhibitor discovery and development. *Drug Resist. Updates* **2018**, *36*, 13−29.
(31) Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E. C.; Colenso, C. K.; Hirvonen, V. H. A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J. β-Lactamases and β-lactamase inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 3472−3500.
(32) Laws, M.; Shaaban, A.; Rahman, K. M. Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microb. Rev.* **2019**, *43*, 490−516.
(33) Khameneh, B.; Diab, R.; Ghazvini, K.; Fazly Bazzaz, B. S. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb. Pathog.* **2016**, *95*, 32−42.
(34) Crofts, T. S.; Wang, B.; Spivak, A.; Gianoulis, T. A.; Forsberg, K. J.; Gibson, M. K.; Johnsky, L. A.; Broomall, S. M.; Rosenzweig, C. N.; Skowronski, E. W.; Gibbons, H. S.; Sommer, M. O. A.; Dantas, G. Shared strategies for β-lactam catabolism in the soil microbiome. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 556−564.
(35) Schofield, C. J. Antibiotics as food for bacteria. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 752−753.
(36) Bush, K. Past and present perspectives on β-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01076-18.
(37) Drawz, S. M.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. New β-lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 1835−1846.
(38) Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. Three decades of β-lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 160−201.
(39) Bush, K.; Bradford, P. A. Interplay between β-lactamases and new β-lactamase inhibitors. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 295−306.
(40) Strynadka, N. C.; Adachi, H.; Jensen, S. E.; Johns, K.; Sielecki, A.; Betzel, C.; Sutoh, K.; James, M. N. Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in beta-lactam hydrolysis at 1.7 A resolution. *Nature* **1992**, *359*, 700−705.
(41) Walther-Rasmussen, J.; Høiby, N. Class A carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 470−482.
(42) Leonard, D. A.; Bonomo, R. A.; Powers, R. A. Class D β-lactamases: a re-appraisal after five decades. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2407−2415.
(43) 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. Molecular basis of selective inhibition and slow reversibility of avibactam against class D carbapenemases: a structure-guided study of OXA-24 and OXA-48. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 591−600.
(44) Meini, M. R.; Llarrull, L. I.; Vila, A. J. Overcoming differences: the catalytic mechanism of metallo-β-lactamases. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 3419−3432.
(45) Bebrone, C. Metallo-β-lactamases (Classification, Activity, Genetic Organization, Structure, Zinc Coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1686−1701.
(46) King, D. T.; Strynadka, N. C. Targeting metallo-beta-lactamase enzymes in antibiotic resistance. *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 1243−1263.
(47) Palzkill, T. Metallo-beta-lactamase structure and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, *1277*, 91−104.
(48) Feng, H.; Liu, X.; Wang, S.; Fleming, J.; Wang, D.-C.; Liu, W. The mechanism of NDM-1-catalyzed carbapenem hydrolysis is distinct from that of penicillin or cephalosporin hydrolysis. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 2242.
(49) Zhang, H.; Hao, Q. Crystal structure of NDM-1 reveals a common β-lactam hydrolysis mechanism. *FASEB J.* **2011**, *25*, 2574−2582.
(50) Kim, Y.; Cunningham, M. A.; Mire, J.; Tesar, C.; Sacchettini, J.; Joachimiak, A. NDM-1, the ultimate promiscuous enzyme: substrate recognition and catalytic mechanism. *FASEB J.* **2013**, *27*, 1917−1927.
(51) King, D. T.; Worrall, L. J.; Gruninger, R.; Strynadka, N. C. New delhi metallo-β-lactamase: structural insights into β-lactam recognition and inhibition. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11362−11365.
(52) Garber, K. A β-lactamase inhibitor revival provides new hope for old antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2015**, *14*, 445−447.
(53) Smoum, R.; Rubinstein, A.; Dembitsky, V. M.; Srebnik, M. Boron containing compounds as protease inhibitors. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4156−4220.

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

(54) Dobozy, O.; Mile, I.; Ferencz, I.; Csanyi, V. Effect of electrolytes on the activity and iodine sensitivity of penicillinase from *B. cereus*. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1971**, *6*, 97−105.
(55) Kiener, P. A.; Waley, S. G. Reversible inhibitors of penicillinases. *Biochem. J.* **1978**, *169*, 197−204.
(56) Beesley, T.; Gascoyne, N.; Knott-Hunziker, V.; Petursson, S.; Waley, S. G.; Jaurin, B.; Grundström, T. The inhibition of class C β-lactamases by boronic acids. *Biochem. J.* **1983**, *209*, 229−233.
(57) Martin, R.; Jones, J. B. Rational design and synthesis of a highly effective transition state analog inhibitor of the RTEM-1 β-lactamase. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8399−8402.
(58) Tondi, D.; Powers, R. A.; Caselli, E.; Negri, M. C.; Blázquez, J.; Costi, M. P.; Shoichet, B. K. Structure-based design and in-parallel synthesis of inhibitors of AmpC β-lactamase. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 593−610.
(59) Werner, J. P.; Mitchell, J. M.; Taracila, M. A.; Bonomo, R. A.; Powers, R. A. Exploring the potential of boronic acids as inhibitors of OXA-24/40 β-lactamase. *Protein Sci.* **2017**, *26*, 515−526.
(60) Rojas, L. J.; Taracila, M. A.; Papp-Wallace, K. M.; Bethel, C. R.; Caselli, E.; Romagnoli, C.; Winkler, M. L.; Spellberg, B.; Prati, F.; Bonomo, R. A. Boronic acid transition state inhibitors active against KPC and other class A β-lactamases: structure-activity relationships as a guide to inhibitor design. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 1751−1759.
(61) Strynadka, N. C.; Martin, R.; Jensen, S. E.; Gold, M.; Jones, J. B. Structure-based design of a potent transition state analogue for TEM-1 β-lactamase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1996**, *3*, 688−695.
(62) Ness, S.; Martin, R.; Kindler, A. M.; Paetzel, M.; Gold, M.; Jensen, S. E.; Jones, J. B.; Strynadka, N. C. Structure-based design guides the improved efficacy of deacylation transition state analogue inhibitors of TEM-1 β-lactamase. *Biochemistry* **2000**, *39*, 5312−5321.
(63) Morandi, F.; Caselli, E.; Morandi, S.; Focia, P. J.; Blázquez, J.; Shoichet, B. K.; Prati, F. Nanomolar inhibitors of AmpC beta-lactamase. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 685−695.
(64) Morandi, S.; Morandi, F.; Caselli, E.; Shoichet, B. K.; Prati, F. Structure-based optimization of cephalothin-analogue boronic acids as β-lactamase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1195−1205.
(65) Eidam, O.; Romagnoli, C.; Dalmasso, G.; Barelier, S.; Caselli, E.; Bonnet, R.; Shoichet, B. K.; Prati, F. Fragment-guided design of subnanomolar β-lactamase inhibitors active *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 17448−17453.
(66) London, N.; Miller, R. M.; Krishnan, S.; Uchida, K.; Irwin, J. J.; Eidam, O.; Gibold, L.; Cimermančič, P.; Bonnet, R.; Shoichet, B. K.; Taunton, J. Covalent docking of large libraries for the discovery of chemical probes. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1066−1072.
(67) Santucci, M.; Spyrakis, 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. Computational and biological profile of boronic acids for the detection of bacterial serine- and metallo-β-lactamase. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 17716.
(68) Cendron, L.; Quotadamo, A.; Maso, L.; Bellio, P.; Montanari, M.; Celenza, G.; Venturelli, A.; Costi, M. P.; Tondi, D. X-ray crystallography deciphers the activity of broad-spectrum boronic acid β-lactamase inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 650−655.
(69) Lomovskaya, O.; Sun, D.; Rubio-Aparicio, D.; Nelson, K.; Tsivkovski, R.; Griffith, D. C.; Dudley, M. N. Vaborbactam: spectrum of beta-lactamase inhibition and impact of resistance mechanisms on activity in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01443-17.
(70) Dhillon, S. Meropenem/vaborbactam: a review in complicated urinary tract infections. *Drugs* **2018**, *78*, 1259−1270.
(71) Krajnc, A.; Lang, P. A.; Panduwawala, T. D.; Brem, J.; Schofield, C. J. Will morphing boron-based inhibitors beat the β-lactamases? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *50*, 101−110.
(72) Goldstein, E. J.; Citron, D. M.; Tyrrell, K. L.; Merriam, C. V. *In vitro* activity of biapenem plus RPX7009, a carbapenem combined with a serine-β-lactamase inhibitor, against anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 2620−2630.
(73) Hecker, S. J.; Reddy, K. R.; Totrov, M.; Hirst, G. C.; Lomovskaya, O.; Griffith, D. C.; King, P.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Sabet, M.; Tarazi, Z.; Clifton, M. C.; Atkins, K.; Raymond, A.; Potts, K. T.; Abendroth, J.; Boyer, S. H.; Loutit, J. S.; Morgan, E. E.; Durso, S.; Dudley, M. N. Discovery of a cyclic boronic acid β-lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3682−3692.
(74) Bush, K. Proliferation and significance of clinically relevant β-lactamases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, *1277*, 84−90.
(75) 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. Structural basis of metallo-β-lactamase, serine-β-lactamase and penicillin-binding protein inhibition by cyclic boronates. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12406.
(76) 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. Cyclic boronates inhibit all classes of β-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02260-16.
(77) (a) 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. Cefepime/VNRX-5133 broad-spectrum activity is maintained against emerging KPC- and PDC-variants in multidrug-resistant *K. pneumonia* and *P. aeruginosa*. *Open Forum Infect. Dis.* **2018**, *5*, S419−S420. (b) Burns, C. J.; Daigle, D.; Li, B.; McGarry, D.; Pevear, D. C.; Trout, R. E. L. Beta-lactamase Inhibitors. US8912169B2, December 7, 2012.
(78) Krajnc, A.; Brem, J.; Hinchliffe, P.; Calvopiña, K.; Panduwawala, T. D.; Lang, P. A.; Kamps, J. J. A. G.; Tyrrell, J. M.; Widlake, E.; Saward, B. G.; Walsh, T. R.; Spencer, J.; Schofield, C. J. Bicyclic boronate VNRX-5133 inhibits metallo- and serine-β-lactamases. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8544−8556.
(79) Burns, C. J.; Trout, R.; Zulli, A.; Mesaros, E.; Jackson, R.; Boyd, S.; Liu, B.; McLaughlin, L.; Chatwin, C.; Hamrick, J.; Daigle, D.; Pevear, D. Discovery of VNRX-7145: a broad-spectrum orally bioavailable beta-lactamase inhibitor (BLI) for highly resistant bacterial infections ("superbugs"). *Abstracts of Papers*, 257th National Meeting & Exposition of the American Chemical Society, Orlando, FL, U.S., March 31−April 4, 2019; American Chemical Society: Washington, DC, 2019.
(80) Hamrick, J.; Chatwin, C.; John, K.; Burns, C.; Xerri, L.; Moeck, G.; Pevear, D. Oral ceftibuten/VNRX-7145 shows equivalent activity *in vitro* to IV therapeutics against MDR *Enterobacteriaceae*. *Abstracts of Papers*, 29th ECCMID, Amsterdam, The Netherlands, April 13−16, 2019; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2019.
(81) Castanheira, M.; Lindley, J.; Huynh, H.; Mendes, R. E.; Lomovskaya, O. Activity of novel β-lactamase inhibitor QPX7728 combined with β-lactam agents when tested against carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE) isolates. *Abstracts of Papers*, IDWeek 2019, Washington, USA, October 2−6, 2019.
(82) Lomovskaya, O.; Nelson, K.; Rubio-Aparicio, D. QPX7728: *in vitro* activity in combination with meropenem against carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). *Abstracts of Papers*, 29th ECCMID, Amsterdam, Netherlands, April 13−16, 2019;European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2019.
(83) McKinney, D. C.; Zhou, F.; Eyermann, C. J.; Ferguson, A. D.; Prince, D. B.; Breen, J.; Giacobbe, R. A.; Lahiri, S.; Verheijen, J. C. 4,5-Disubstituted 6-aryloxy-1,3-dihydrobenzo[c][1,2]oxaboroles are broad-spectrum serine β-lactamase inhibitors. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 310−316.
(84) Coleman, K. Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non- β-lactam β-lactamase inhibitors. *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, *14*, 550−555.
(85) Lampilas, M.; Aszodi, J.; Rowlands, D. A.; Fromentin, C. Azabicyclic Compounds, Preparation Thereof, and Use as Medicines, in Particular as Antibacterial Agents. Patent WO 2002010172, Aug 1, 2000.

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

(86) Aszodi, J.; Lampilas, M.; Musicki, B.; Rowlands, D. A.; Collette, P. Preparation of Fused-Ring Diazepines, Method of Preparation and Use as Anti-Bacterial Agents. WO 2002100860, Jun 8, 2001.
(87) Aszodi, J.; Lampilas, M.; Fromentin, C.; Rowlands, D. A. Novel Heterocyclic Compounds Active as Beta-lactamases Inhibitors. FR 2835186, Jan 28, 2002.
(88) Lampilas, M.; Musicki, B.; Klich, M.; Rowlands, D. A. New Benzo- or Heteroaromatic-Fused Azabicycloalkane Derivatives, Useful as Antibacterial Agents and Beta-lactamase Inhibitors. FR 2848210, Dec 6, 2002.
(89) Bonnefoy, A.; Dupuis-Hamelin, C.; Steier, V.; Delachaume, C.; Seys, C.; Stachyra, T.; Fairley, M.; Guitton, M.; Lampilas, M. *In vitro* activity of AVE1330A, an innovative broad-spectrum non-β-lactam β-lactamase inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 410−417.
(90) https://www.drugbank.ca/drugs/DB09060 (accesed July 15, 2019).
(91) Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. New β-lactamase inhibitors in the clinic. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2016**, *30*, 441−464.
(92) Lagacé-Wiens, P.; Walkty, A.; Karlowsky, J. A. Ceftazidime−avibactam: an evidence-based review of its pharmacology and potential use in the treatment of Gram-negative bacterial infections. *Core Evid* **2014**, *9*, 13−25.
(93) Papp-Wallace, K. M.; Zeiser, E. T.; Becka, S. A.; Park, S.; Wilson, B. M.; Winkler, M. L.; D'Souza, R.; Singh, I.; Sutton, G.; Fouts, D. E.; Chen, L.; Kreiswirth, B. N.; Ellis-Grosse, E. J.; Drusano, G. L.; Perlin, D. S.; Bonomo, R. A. Ceftazidime-avibactam in combination with fosfomycin: a novel therapeutic strategy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* **2019**, *220*, 666−676.
(94) Gordon, E. M.; Duncton, M. A. J.; Gallop, M. A. Orally absorbed derivatives of the β-lactamase inhibitor avibactam. Design of novel prodrugs of sulfate containing drugs. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 10340−10344.
(95) 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. Kinetics of avibactam inhibition against Class A, C, and D β-lactamases. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 27960−27971.
(96) Ledoussal, B.; Gourdel, M. E. Azabicyclic Compounds, Their Preparation and Their Use as Drugs, Including Beta-lactamase Inhibitors. FR 2930553, April 29, 2008.
(97) Ledoussal, B.; Gourdel, M. E. Azabicyclic Compounds, Preparation Thereof and Use of Same as Drugs, Especially Beta-lactamase Inhibitors. WO 2009133442, April 29, 2008.
(98) Patil, V. T.; Tadiparthi, R.; Birajdar, S.; Bhagwat, S. Nitrogen Containing Compounds and Their Use. WO 2013038330, Sep 13, 2011.
(99) Lampilas, M.; Rowlands, D. A.; Kebsi, A.; Ledoussal, B.; Pierres, C. Nitrogenous Heterocyclic Compounds, Preparation Thereof and Use Thereof as Antibacterial Medicaments. WO 2008142285, April 12, 2007.
(100) Lampilas, M.; Rowlands, D. A.; Ledoussal, B.; Gourdel, M.-E.; Renaud, E.; Pierres, C.; Kebsi, A. Novel Nitrogenous Heterocyclic Compounds, Preparation Thereof and Use Thereof as Antibacterial Medicaments. WO 2010038115, Oct 3, 2008.
(101) Levasseur, P.; Pace, J. L.; Coleman, K.; Lowther, J. Novel Combinations of Antibacterial Nitrogenous Heterocyclic Compounds with Other Antibacterial Compounds, and Use Thereof as Drugs. WO 2010041112, Oct 10, 2008.
(102) Ledoussal, B.; Gourdel, M.-E.; Renaud, E.; Pierres, C.; Kebsi, A. Nitrogenous Heterocyclic Compounds, Preparation Thereof, and Use Thereof as Antibacterial Agents. WO 2010041108, Oct 10, 2008.
(103) Patel, M. V.; Deshpande, P. K.; Bhawasar, S.; Bhagwat, S.; Jafri, M. A.; Mishra, A.; Pavase, L.; Gupta, S.; Kale, R.; Joshi, S. 1,6-Diazabicyclo[3,2,1]octan-7-one Derivatives and Their Use in the Treatment of Bacterial Infections. WO 2013030733, Aug 27, 2011.
(104) Bhagwat, S.; Deshpande, P. K.; Bhawasar, S.; Patil, V. J.; Tadiparthi, R.; Pawar, S. S.; Jadhav, S. B.; Dabhade, S. K.; Deshmukh, V. V.; Dhond, B.; Birajdar, S.; Shaikh, M. U.; Dekhane, D.; Patel, P. A. 1,6-Diazabicyclo[3,2,1]octan-7-one Derivatives and Their Use in the Treatment of Bacterial Infections. WO 2013030735, Aug 30, 2011.
(105) Abuhussain, S. S. A.; Avery, L. M.; Abdelraouf, K.; Nicolau, D. P. *In vivo* efficacy of humanized WCK 5222 (cefepime-zidebactam) exposures against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in the neutropenic thigh model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01931-18.
(106) Livermore, D. M.; Mushtaq, S.; Warner, M.; Vickers, A.; Woodford, N. *In vitro* activity of cefepime/zidebactam (WCK 5222) against Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 1373−1385.
(107) Thomson, K. S.; AbdelGhani, S.; Snyder, J. W.; Thomson, G. K. Activity of cefepime-zidebactam against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative pathogens. *Antibiotics* **2019**, *8*, 32.
(108) Moya, B.; Barcelo, I. M.; Bhagwat, S.; Patel, M.; Bou, G.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A.; Oliver, A. WCK 5107 (Zidebactam) and WCK 5153 are novel inhibitors of PBP2 showing potent "β-lactam enhancer" activity against *Pseudomonas aeruginosa*, including multidrug-resistant metallo-β-lactamase-producing high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02529-16.
(109) Powles, M. A.; Galgoci, A.; Misura, A.; Colwell, L.; Dingley, K. H.; Tang, W.; Wu, J.; Blizzard, T.; Motyl, M.; Young, K. In vivo efficacy of relebactam (MK-7655) in combination with imipenem-cilastatin in murine infection models. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02577-17.
(110) 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. Exploring the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of relebactam (MK-7655) in combination with imipenem in a hollow-fiber infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02323-17.
(111) Monogue, M. L.; Giovagnoli, S.; Bissantz, C.; Zampaloni, C.; Nicolau, D. P. *In vivo* efficacy of meropenem with a novel non-β-lactam-β-lactamase inhibitor, nacubactam, against Gram-negative organisms exhibiting various resistance mechanisms in a murine complicated urinary tract infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02596-17.
(112) Mushtaq, S.; Vickers, A.; Woodford, N.; Haldimann, A.; Livermore, D. M. Activity of nacubactam (RG6080/OP0595) combinations against MBL-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 953−960.
(113) King, A. M.; King, D. T.; French, S.; Brouillette, E.; Asli, A. J.; Alexander, A. N.; Vuckovic, M.; Maiti, S. N.; Parr, T. R., Jr.; Brown, E. D.; Malouin, F.; Strynadka, N. C. J.; Wright, G. D. Structural and kinetic characterization of diazabicyclooctanes as dual inhibitors of both serine-β-lactamases and penicillin binding proteins. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 864−868.
(114) Moya, B.; Barcelo, I. M.; Bhagwat, S.; Patel, M.; Bou, G.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A.; Oliver, A. Potent β-lactam enhancer activity of zidebactam and WCK 5153 against Acinetobacter baumannii, including carbapenemase-producing clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01238-17.
(115) Moya, B.; Barcelo, I. M.; Cabot, G.; Torrens, G.; Palwe, S.; Joshi, P.; Umarkar, K.; Takalkar, S.; Periasamy, H.; Bhagwat, S.; Patel, M.; Bou, G.; Oliver, A. In vitro and in vivo activities of β-lactams in combination with the novel β-lactam enhancers zidebactam and WCK 5153 against multidrug-resistant metallo-β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00128-19.
(116) Mushtaq, S.; Vickers, A.; Woodford, N.; Livermore, D. M. WCK 4234, a novel diazabicyclooctane potentiating carbapenems against *Enterobacteriaceae, Pseudomonas* and *Acinetobacter* with class A, C and D β-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 1688−1695.
(117) Papp-Wallace, K. M.; Nguyen, N. Q.; Jacobs, M. R.; Bethel, C. R.; Barnes, M. D.; Kumar, V.; Bajaksouzian, S.; Rudin, S. D.; Rather, P. N.; Bhavsar, S.; Ravikumar, T.; Deshpande, P. K.; Patil, V.; Yeole, R.; Bhagwat, S. S.; Patel, M. V.; van den Akker, F.; Bonomo, R. A. Strategic approaches to overcome resistance against gram-negative

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

pathogens using β-lactamase inhibitors and β-lactam enhancers: activity of three novel diazabicyclooctanes WCK 5153, zidebactam (WCK 5107), and WCK 4234. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 4067−4086.
(118) Ehmann, D. E.; Jahic, H.; Ross, P. L.; Gu, R.-F.; Hu, J.; Kern, G.; Walkup, G. K.; Fisher, S. L. Avibactam is a covalent, reversible, non-β-lactam β-lactamase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 11663−11668.
(119) King, D. T.; King, A. M.; Lal, S. M.; Wright, G. D.; Strynadka, N. C. Molecular mechanism of avibactam-mediated β-lactamase inhibition. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 175−184.
(120) Lahiri, S. D.; Mangani, S.; Durand-Reville, T.; Benvenuti, M.; De Luca, F.; Sanyal, G.; Docquier, J. D. Structural insight into potent broad-spectrum inhibition with reversible recyclization mechanism: avibactam in complex with CTX-M-15 and *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 2496−2505.
(121) Krishnan, N. P.; Nguyen, N. Q.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A.; van den Akker, F. Inhibition of *Klebsiella* β-lactamases (SHV-1 and KPC-2) by avibactam: a structural study. *PLoS One* **2015**, *10*, e0136813.
(122) Durand-Réville, T. F.; Guler, 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. ETX2514 is a broad-spectrum β-lactamase inhibitor for the treatment of drug-resistant Gram-negative bacteria including *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Microb.* **2017**, *2*, 17104.
(123) 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. Targeting multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: sulbactam and the diazabicyclooctenone β-lactamase inhibitor ETX2514 as a novel therapeutic agent. *mBio* **2019**, *10*, e00159-19.
(124) Shapiro, A. B.; Gao, N.; Jahic, H.; Carter, N. M.; Chen, A.; Miller, A. A. Reversibility of covalent, broad-spectrum serine β-lactamase inhibition by the diazabicyclooctenone ETX2514. *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3*, 833−844.
(125) Mcleod, S.; Moussa, S.; Huband, M.; Edah, Y.; Tommasi, R.; Mueller, J.; Miller, A. The novel beta-lactamase inhibitor ETX1317 effectively restores the activity of cefpodoxime against recent global *Enterobacteriaceae* isolates from urinary tract infections. *Abstracts of Papers*, 29th ECCMID, Amsterdam, Netherlands, April 13−16, 2019; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2019
(126) Barbion, J.; Caravano, A.; Chasset, S.; Chevreuil, F.; Lecointe, N.; Ledoussal, B.; Le Strat, F.; Richard, S.; Simon, C.; Vomscheid, S.; Brias, J.; Briet, S.; Faivre, F.; Le Fralliec, G.; Oliveira, C. Heterocyclic Compounds and Their Use in Preventing or Treating Bacterial Infections. WO 2016177862, May 7, 2015.
(127) Levy, N.; Bruneau, J.-M.; Le Rouzic, E.; Bonnard, D.; Le Strat, F.; Caravano, A.; Chevreuil, F.; Barbion, J.; Chasset, S.; Ledoussal, B.; Moreau, F.; Ruff, M. Structural basis for *E. coli* penicillin binding protein (PBP) 2 inhibition, a platform for drug design. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 4742−4754.
(128) Venditti, C.; Nisii, C.; Ballardini, M.; Meledandri, M.; Di Caro, A. Identification of L169P mutation in the omega loop of KPC-3 after a short course of ceftazidime/avibactam. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 2466−2467.
(129) Both, A.; Büttner, H.; Huang, J.; Perbandt, M.; Belmar Campos, C.; Christner, M.; Maurer, F. P.; Kluge, S.; König, C.; Aepfelbacher, M.; Wichmann, D.; Rohde, H. Emergence of ceftazidime/avibactam non-susceptibility in an MDR *Klebsiella pneumoniae* isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 2483−2488.
(130) Shields, R. K.; Potoski, B. A.; Haidar, G.; Hao, B.; Doi, Y.; Chen, L.; Press, E. G.; Kreiswirth, B. N.; Clancy, C. J.; Nguyen, M. H. Clinical outcomes, drug toxicity, and emergence of ceftazidime-avibactam resistance among patients treated for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *63*, 1615−1618.
(131) Giddins, M. J.; Macesic, N.; Annavajhala, M. K.; Stump, S.; Khan, S.; McConville, T. H.; Mehta, M.; Gomez-Simmonds, A.; Uhlemann, A. C. Successive emergence of ceftazidime-avibactam resistance through distinct genomic adaptations in bla_{KPC-2}-harboring *Klebsiella pneumoniae* sequence type 307 isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02101-17.
(132) 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. IID572: A new potentially best-in-class β-lactamase inhibitor. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 1045−1051.
(133) Liénard, B. M. R.; Garau, G.; Horsfall, L.; Karsisiotis, A. I.; Damblon, C.; Lassaux, P.; Papamicael, C.; Roberts, G. C. K.; Galleni, M.; Dideberg, O.; Frère, J.-M.; Schofield, C. J. Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo-β-lactamases by thiols. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2282−2294.
(134) Li, N.; Xu, Y.; Xia, Q.; Bai, C.; Wang, T.; Wang, L.; He, D.; Xie, N.; Li, L.; Wang, J.; Zhou, H.-G.; Xu, F.; Yang, C.; Zhang, Q.; Yin, Z.; Guo, Y.; Chen, Y. Simplified captopril analogues as NDM-1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 386−389.
(135) Wang, P.; Cheng, J.; Liu, C.-C.; Tang, K.; Xu, F.; Yu, Z.; Yu, B.; Chang, J. The development of new small-molecule inhibitors targeting bacterial metallo-β-lactamases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2018**, *18*, 834−843.
(136) Klingler, F. M.; Wichelhaus, T. A.; Frank, D.; Cuesta-Bernal, J.; El-Delik, J.; Müller, H. F.; Sjuts, H.; Göttig, S.; Koenigs, A.; Pos, K. M.; Pogoryelov, D.; Proschak, E. Approved drugs containing thiols as inhibitors of metallo-β-lactamases: strategy to combat multidrug-resistant bacteria. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3626−3630.
(137) Guo, Y.; Wang, J.; Niu, G.; Shui, W.; Sun, Y.; Zhou, H.; Zhang, Y.; Yang, C.; Lou, Z.; Rao, Z. A structural view of the antibiotic degradation enzyme NDM-1 from a superbug. *Protein Cell* **2011**, *2*, 384−394.
(138) Wang, R.; Lai, T. P.; Gao, P.; Zhang, H.; Ho, P. L.; Woo, P. C.; Ma, G.; Kao, R. Y.; Li, H.; Sun, H. Bismuth antimicrobial drugs serve as broad-spectrum metallo-β-lactamase inhibitors. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 439.
(139) Meng, Z.; Tang, M.-L.; Yu, L.; Liang, Y.; Han, J.; Zhang, C.; Hu, F.; Yu, J.-M.; Sun, X. Novel mercapto propionamide derivatives with potent New Delhi metallo-β-lactamase-1 inhibitory activity and low toxicity. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 903−916.
(140) Grant, E. B.; Guiadeen, D.; Baum, E. Z.; Foleno, B. D.; Jin, H.; Montenegro, D. A.; Nelson, E. A.; Bush, K.; Hlasta, D. J. The synthesis and SAR of rhodanines as novel class C β-lactamase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2179−2182.
(141) Zervosen, A.; Lu, W. P.; Chen, Z.; White, R. E.; Demuth, T. P., Jr.; Frère, J. M. Interactions between penicillin-binding proteins (PBPs) and two novel classes of PBP inhibitors, arylalkylidene rhodanines and arylalkylidene iminothiazolidin-4-ones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 961−969.
(142) Zervosen, A.; Sauvage, E.; Frère, J. M.; Charlier, P.; Luxen, A. Development of new drugs for an old target: the penicillin binding proteins. *Molecules* **2012**, *17*, 12478−12505.
(143) Spicer, T.; Minond, D.; Enogieru, I.; Saldanha, S. A.; Allais, C.; Liu, Q.; Mercer, B. A.; Roush, W. R.; Hodder, P. ML302, a Novel beta-lactamase (BLA) inhibitor. In *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]*; National Center for Biotechnology Information: Bethesda, MD, 2010; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143563/ (Updated May 13, 2014).
(144) Brem, J.; van Berkel, S. S.; Aik, W.; Rydzik, A. M.; Avison, M. B.; Pettinati, I.; Umland, K. D.; Kawamura, A.; Spencer, J.; Claridge, T. D.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J. Rhodanine hydrolysis leads to potent thioenolate mediated metallo-β-lactamase inhibition. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 1084−1090.
(145) González, M. M.; Kosmopoulou, M.; Mojica, M. F.; Castillo, V.; Hinchliffe, P.; Pettinati, I.; Brem, J.; Schofield, C. J.; Mahler, G.;

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

Bonomo, R. A.; Llarrull, L. I.; Spencer, J.; Vila, A. J. Bisthiazolidines: a substrate-mimicking scaffold as an inhibitor of the NDM-1 carbapenemase. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 544−554.
(146) Hinchliffe, P.; González, M. M.; Mojica, M. F.; González, J. M.; Castillo, V.; Saiz, C.; Kosmopoulou, M.; Tooke, C. L.; Llarrull, L. I.; Mahler, G.; Bonomo, R. A.; Vila, A. J.; Spencer, J. Cross-class metallo-β-lactamase inhibition by bisthiazolidines reveals multiple binding modes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E3745−E3754.
(147) Chen, A. Y.; Thomas, P. W.; Stewart, A. C.; Bergstrom, A.; Cheng, Z.; Miller, C.; Bethel, S. H.; Credille, C. V.; Riley, C. L.; Page, R. C.; Bonomo, R. A.; Crowder, M. W.; Tierney, D. L.; Fast, W.; Cohen, S.; Marshall, S. H. Dipicolinc acid derivatives as inhibitors of New Delhi metallo-β-lactamase-1. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7267−7283.
(148) Roll, D. M.; Yang, Y.; Wildey, M. J.; Bush, K.; Lee, M. D. Inhibition of metallo-β-lactamases by pyridine monothiocarboxylic acid analogs. *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 255−257.
(149) Horsfall, L. E.; Garau, G.; Lienard, B. M. R.; Dideberg, O.; Schofield, C. J.; Frere, J. M.; Galleni, M. Competitive inhibitors of the CphA metallo-β-lactamase from *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 2136−2142.
(150) Leiris, S.; Coelho, A.; Castandet, J.; Bayet, M.; Lozano, C.; Bougnon, J.; Bousquet, J.; Everett, M.; Lemonnier, M.; Sprynski, N.; Zalacain, M.; Pallin, T. D.; Cramp, M. C.; Jennings, N.; Raphy, G.; Jones, M. W.; Pattipati, R.; Shankar, B.; Sivasubrahmanyam, R.; Soodhagani, A. K.; Juventhala, R. R.; Pottabathini, N.; Pothukanuri, S.; Benvenuti, M.; Pozzi, C.; Mangani, S.; De Luca, F.; Cerboni, G.; Docquier, J.-D.; Davies, D. T. SAR studies leading to the identification of a novel series of metallo-β-lactamase inhibitors for the treatment of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections that display efficacy in an animal infection model. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 131−140.
(151) Everett, M.; Sprynski, N.; Coelho, A.; Castandet, J.; Bayet, M.; Bougnon, J.; Lozano, C.; Davies, D. T.; Leiris, S.; Zalacain, M.; Morrissey, I.; Magnet, S.; Holden, K.; Warn, P.; De Luca, F.; Docquier, J. D.; Lemonnier, M. Discovery of a novel metallo-β-lactamase inhibitor that potentiates meropenem activity against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e00074-18.
(152) King, A. M.; Reid-Yu, S. A.; Wang, W.; King, D. T.; De Pascale, G.; Strynadka, N. C.; Walsh, T. R.; Coombes, B. K.; Wright, G. D. Aspergillomarasmine A overcomes metallo-β-lactamase antibiotic resistance. *Nature* **2014**, *510*, 503−506.
(153) Dolgin, E. Combating antibiotic resistance from ground up. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 11642−11643.
(154) Bergstrom, A.; Katko, A.; Adkins, Z.; Hill, J.; Cheng, Z.; Burnett, M.; Yang, H.; Aitha, M.; Mehaffey, M. R.; Brodbelt, J. S.; Tehrani, K. H. M. E.; Martin, N. I.; Bonomo, R. A.; Page, R. C.; Tierney, D. L.; Fast, W.; Wright, G. D.; Crowder, M. W. Probing the interaction of aspergillomarasmine A with metallo-β-lactamases NDM-1, VIM-2, and IMP-7. *ACS Infect. Dis.* **2018**, *4*, 135−145.
(155) Thomas, P. W.; Zheng, M.; Wu, S.; Guo, H.; Liu, D.; Xu, D.; Fast, W. Characterization of purified New Dehli metallo-β-lacatamse-1. *Biochemistry* **2011**, *50*, 10102−10113.
(156) Koteva, K.; King, A. M.; Capretta, A.; Wright, G. D. Total synthesis and activity of the metallo-β-lactamase inhibitor aspergillomarasmine A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 2210−2212.
(157) Liao, D.; Yang, S.; Wang, J.; Zhang, J.; Hong, B.; Wu, F.; Lei, X. Total synthesis and structural reassignment of aspergillomarasmine A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 4291−4295.
(158) Albu, S. A.; Koteva, K.; King, A. M.; Al-Karmi, S.; Wright, G. D.; Capretta, A. Total synthesis of aspergillomarasmine A and related compounds: a sulfamidate approach enables exploration of structure-activity relationships. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 13259−13262.
(159) Reading, C.; Cole, M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from Streptomyces clavuligerus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 852−857.
(160) Brown, A. G. Clavulanic acid, a novel beta-lactamase inhibitor—a case study in drug discovery and development. *Drug Des. Delivery* **1986**, *1*, 1−21.
(161) Padayatti, P. S.; Helfand, M. S.; Totir, M. A.; Carey, M. P.; Carey, P. R.; Bonomo, R. A.; van den Akker, F. High resolution crystal structures of the trans-enamine intermediates formed by sulbactam and clavulanic acid and E166A SHV-1 β-lactamase. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 34900−34907.
(162) English, A. R.; Retsema, J. A.; Girard, A. E.; Lynch, J. E.; Barth, W. E. CP-45,899, a beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams: initial bacteriological characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1978**, *14*, 414−419.
(163) Shapiro, A. B. Kinetics of sulbactam hydrolysis by β-lactamases, and kinetics of β-lactamase inhibition by sulbactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01612-17.
(164) Micetich, R. G.; Maiti, S. N.; Spevak, P.; Hall, T. W.; Yamabe, S.; Ishida, N.; Tanaka, M.; Yamazaki, T.; Nakai, A.; Ogawa, K. Synthesis and beta-lactamase inhibitory properties of 2β-[(1,2,3-triazol-1-yl)methyl]-2α-methylpenam-3 α-carboxylic acid 1,1-dioxide and related triazolyl derivatives. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1469−1474.
(165) Aronoff, S. C.; Jacobs, M. R.; Johenning, S.; Yamabe, S. Comparative activities of the beta-lactamase inhibitors YTR 830, sodium clavulanate, and sulbactam combined with amoxicillin or ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1984**, *26*, 580−582.
(166) Palanisamy, S. U.; Paul-Satyaseela, M.; Narayanan, S.; Balasubramanian, G.; Appu, A.; Manickam, S.; Periasamy, H. Composés et Leur Utilisation. WO 2012070071, Nov 25, 2010.
(167) Crandon, J. L.; Nicolau, D. P. *In vitro* activity of cefepime/AAI101 and comparators against cefepime non-susceptible *Enterobacteriaceae*. *Pathogens* **2015**, *4*, 620−625.
(168) Crandon, J. L.; Nicolau, D. P. *In vivo* activities of simulated human doses of cefepime and cefepime-AAI101 against multidrug-resistant Gram-negative *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 2688−2694.
(169) 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. Beyond piperacillin-tazobactam: cefepime and AAI101 as a potent β-lactam-β-lactamase inhibitor combination. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00105-19.
(170) Morrissey, I.; Magnet, S.; Hawser, S.; Shapiro, S.; Knechtle, P. *In vitro* activity of cefepime-enmatazobactam against Gram-negative isolates collected from U.S. and European hospitals during 2014−2015. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00514-19.
(171) Chen, Y. L.; Chang, C. W.; Hedberg, K. Synthesis of a potent β-lactamase inhibitor-1,1-dioxo-6-(2-pyridyl)methylenepenicillanic acid and its reaction with sodium methoxide. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3449−3452.
(172) Coleman, K.; Griffin, D. R. J.; Page, J. W. J.; Upshon, P. A. *In vitro* evaluation of BRL 42715, a novel β-lactamase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 1580−1587.
(173) Osborne, N. F.; Broom, N. J. P.; Coulton, S.; Harbridge, J. B.; Harris, M. A.; Stirling-François, I.; Walker, G. A novel and stereocontrolled synthesis of (5*R*)-(*Z*)-6-(1-methyl-l,2,3-triazol-4-ylmethylene)penem-3-carboxylic acid, a potent broad spectrum β-lactamase Inhibitor. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 371−373.
(174) Michaux, C.; Charlier, P.; Frere, J.-M.; Wouters, J. Crystal structure of BRL 42715, C6-(N1-methyl-1,2,3-triazolylmethylene)-penem, in complex with *Enterobacter cloacae* 908R β-lactamase: evidence for a stereoselective mechanism from docking studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3262−3263.
(175) Matagne, A.; Ledent, P.; Monnaie, D.; Felici, A.; Jamin, M.; Raquet, X.; Galleni, M.; Klein, D.; François, I.; Frère, J.-M. Kinetic study of interaction between BRL 42715, beta-lactamases, and D-alanyl-D-alanine peptidases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 227−231.
(176) 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.; van den Akker, F.; Bonomo, R. A.; Romero, A.; Buynak, J. D. Design,

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

synthesis, and crystal structures of 6-alkylidene-2'-substituted penicillanic acid sulfones as potent inhibitors of *Acinetobacter baumannii* OXA-24 carbapenemase. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13320−13331.
(177) Vázquez-Ucha, J. C.; Maneiro, M.; Martínez-Guitián, M.; Buynak, J. D.; Bethel, C. R.; Bonomo, R. A.; Bou, G.; Poza, M.; González-Bello, C.; Beceiro, A. Activity of the β-lactamase inhibitor LN-1-255 against carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01172-17.
(178) Vallejo, J. A.; Martínez-Guitián, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; González-Bello, C.; Poza, M.; Buynak, J. D.; Bethel, C. R.; Bonomo, R. A.; Bou, G.; Beceiro, A. LN-1-255, a penicillanic acid sulfone able to inhibit the class D carbapenemase OXA-48. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 2171−2180.
(179) Pattanaik, P.; Bethel, C. R.; Hujer, A. M.; Hujer, K. M.; Distler, A. M.; Taracila, M. A.; Anderson, V. E.; Fritsche, T. R.; Jones, R. N.; Pagadala, S. R.; van den Akker, F.; Buynak, J. D.; Bonomo, R. A. Strategic design of an effective beta-lactamase inhibitor: LN-1-255, a 6-alkylidene-2'-substituted penicillin sulfone. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 945−953.
(180) Vázquez-Ucha, J. C.; Martínez-Guitián, M.; Maneiro, M.; Conde-Perez, K.; Álvarez-Fraga, L.; Torrens, G.; Oliver, A.; Buynak, J. D.; Bonomo, R. A.; Bou, G.; González-Bello, C.; Poza, M.; Beceiro, A. Therapeutic efficacy of LN-1-255 in combination with imipenem in severe infection caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01092-19.
(181) Lyu, J.; Wang, S.; Balius, T. E.; Singh, I.; Levit, A.; Moroz, Y. S.; O'Meara, M. J.; Che, T.; Algaa, E.; Tolmachova, K.; Tolmachev, A. A.; Shoichet, B. K.; Roth, B. L.; Irwin, J. J. Ultra-large library docking for discovering new chemotypes. *Nature* **2019**, *566*, 224−229.
(182) Chen, C.; Xiang, Y.; Yang, K.-W.; Zhang, Y.; Wang, W.-M.; Su, J.-P.; Ge, Y.; Liu, Y. A protein structure-guided covalent scaffold selectively targets the B1 and B2 subclass metallo-β-lactamases. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 4802−4805.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279
J. Med. Chem. 2020, 63, 1859−1881

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La resistencia bacteriana a múltiples fármacos es un problema de salud global. Este fenómeno ha acentuado la aparición de cepas bacterianas cada vez más resistentes, capaces de evadir la mayoría de los antibióticos disponibles. Es crucial desarrollar nuevas terapias para tratar infecciones bacterianas difíciles y potencialmente mortales. Esta tesis doctoral se enfoca en: (i) crear nuevos antibióticos adyuvantes que restauren la efectividad de los antibióticos en uso clínico, reduciendo el impacto de uno de los mecanismos de resistencia bacteriana más extendidos, la hidrólisis enzimática del anillo β-lactámico catalizada por las β-lactamasas; y (ii) desarrollar antibióticos con un mecanismo de acción innovador, mediante el desarrollo de inhibidores del quinto enzima de la ruta del ácido siquímico, la siquimato quinasa.