



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Síntesis química, evaluación de la bioactividad y estudios de modelado molecular de compuestos derivados del shikimato como inhibidores de la enzima Shikimato deshidrogenasa de *Escherichia coli*.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.C. Dulce Catalina Díaz Quiroz

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. José Adelfo Escalante Lozada  
[Instituto de Biotecnología-UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Enrique Rudiño Pinera  
[Instituto de Biotecnología-UNAM](#)  
Dr. Adrián Ochoa Leyva  
[Instituto de Biotecnología-UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Julio, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## Integrantes del jurado del examen de grado

**Dr. Iván Omar Romero Estudillo**

Cuerpo Académico de Síntesis Orgánica, Centro de Investigaciones Químicas (CIQ)- UAEM

**Dra. Verónica Rodríguez López**

Facultad de Farmacia, UAEM

**Dr. Ramón Garduño Juárez**

Área de Biofísica, Instituto de Ciencias Físicas, UNAM

**Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella**

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología (IBt)-UNAM

**Dr. Agustín López-Munguía Canales**

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología (IBt)-UNAM

Este trabajo fue realizado principalmente en las instalaciones del laboratorio de Vías Metabólicas, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, del Instituto de Biotecnología (IBt)-UNAM. La síntesis química de amidas derivadas del SA se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. José Mario Ordoñez Palacios, del Cuerpo Académico de Síntesis Orgánica, en el Centro de Investigaciones Químicas (CIQ)- UAEM. La purificación de la enzima EcSDH se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Enrique Rudiño Piñera, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, IBt-UNAM. Se agradece al Dr. Horacio Pérez Sánchez investigador principal del grupo "Bioinformatics and High Performance Computing (BIO-HPC)" de la Universidad Católica de Murcia por su apoyo en la realización de los ensayos de acople molecular.

La presente investigación contó con el financiamiento del proyecto CONACYT- Ciencia Básica 240519, Beca Nacional para Doctorado CONACYT y se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo para la asistencia a cursos, estancias y congresos.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su compañía constante en mi vida, por la bendición de su creación y la oportunidad maravillosa de existir.

A mis papas Araceli y Manuel, por ser siempre una fuente infinita de amor, refugio, apoyo y guía. Todo lo bueno que tengo y soy se los debo enteramente a ustedes.

A mis hermanos y sus familias, por su cariño y alegría.

A mi mamá Norma Díaz, porque siempre serás un amor especial para mí.

A los profesores e investigadores que me han formado, Maestra Carmen Teresa Ramírez, Dra. Magdalena García Fabila, Dr. Gabriel Reyes y Dra. Marta Susana Fernández Pacheco.

Al Dr. José Adelfo Escalante Lozada, por ser más que solo un tutor académico, un amigo, guía y papá en Cuernavaca.

A cada uno de los miembros de nuestro hermoso laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas, auxiliares (Aurelia González Guzmán y Manuel Saucedo Ramirez), técnicos, doctores y estudiantes. Especialmente a Yisus, Kary, Fa y JC. Ningún proyecto se hace completamente solo, gracias por las horas de discusión que enriquecieron este trabajo y las horas de charlas y risas que me enriquecieron a mí.

Al grupo de investigación del Dr. José Mario Ordoñez, por permitirme hacer un poco de lo mucho que ellos hacen en síntesis orgánica. En especial a los Dres. Migueleón, Furia, Cexy y Angelus, por su apoyo, guía, amistad y cariño.

## CONTENIDO GENERAL

Índice de figuras, esquemas, tablas y ecuaciones .....	7
Índice de compuestos .....	8
Lista de abreviaturas y símbolos.....	9
<b>RESUMEN.....</b>	<b>10</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
1.1 Agentes antimicrobianos y su impacto socioeconómico .....	12
1.2 Vía del Shikimato (SA) .....	13
1.3 Inhibidores de la vía del SA.....	14
1.4 Familia SA deshidrogenasa .....	15
1.5 Enzima SA deshidrogenasa tipo AroE (SDH) .....	17
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>19</b>
1.6 Inhibidores de la enzima SDH.....	19
1.6.1 Inhibición de enzimas SDH de diversos organismos empleando un mismo compuesto .....	23
<b>JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>Expresión y purificación de la enzima EcSDH .....</b>	<b>35</b>
1.6.2 Sistema de expresión de la enzima EcSDH.....	35
1.6.2.1 Construcción del vector pColdaroE.....	36
1.6.3 Purificación de la enzima EcSDH.....	37
1.6.3.1 Caracterización del método de purificación.....	39
<b>1.7 Síntesis química de Inhibidores de la enzima EcSDH .....</b>	<b>41</b>
1.7.1 Selección de compuestos basado en cribado virtual.....	41
1.7.2 Síntesis química de análogos del SA .....	42
1.7.2.1 Síntesis de monoamidas derivadas del SA (3a-3d).....	42
1.7.2.2 Síntesis de diamidas derivadas del SA (4a-4c).....	44
1.7.2.3 Síntesis total de compuestos blanco (3a-3d y 4a-4c).....	45
<b>1.8 Evaluación de la actividad inhibitoria de amidas derivadas del SA .....</b>	<b>46</b>
1.8.1 Inhibición enzimática de la enzima EcSDH .....	46
1.8.2 Actividad antibacterial contra <i>E. coli</i> JM101 .....	49
<b>1.9 Estudios de acople molecular.....</b>	<b>49</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>53</b>

## Índice de figuras, esquemas, tablas y ecuaciones

### FIGURAS

Figura 1 Resistencia de <i>E. coli</i> a cefalosporinas de 3ra generación .....	12
Figura 2 Vía del SA en <i>E. coli</i> .....	13
Figura 3 Aminoácidos conservados en miembros de la familia SA deshidrogenasa.....	15
Figura 4 Superposición de los miembros de la familia SA deshidrogenasa.....	15
Figura 5 Reacciones y funciones de miembros de la familia.....	16
Figura 6 Reacción catalizada por la enzima SDH.....	17
Figura 7 Estructura de la enzima EcSDH.....	17
Figura 8 Mecanismo químico para la reacción de las enzimas SDH.....	18
Figura 9 Estrategias para la obtención de inhibidores de la enzima SDH.....	19
Figura 10 Estrategia experimental.....	25
Figura 11 Diagrama metodológico para la construcción del vector pColdaroE.....	35
Figura 12 Construcción del plásmido pTOPOaroE.....	36
Figura 13 Subclonación del gen <i>aroE</i> en el plásmido pCold-I.....	37
Figura 14 Purificación de la enzima EcSDH-6His desde cromatografía de afinidad a níquel.....	38
Figura 15 Escisión de la cola de Histidinas con la proteasa Factor Xa.....	38
Figura 16 Cromatografía de exclusión molecular para purificación de la enzima EcSDH.....	39
Figura 17 Perfil de purificación de la enzima EcSDH.....	40
Figura 18 Gráficos de Lineweaver-Burk de la actividad de EcSDH en presencia de amidas.....	47
Figura 19 Modos de unión propuestos entre las amidas sintetizadas y EcSDH.....	50

### ESQUEMAS

Esquema 1 Análisis retrosintético para la síntesis de amidas derivadas del SA.....	42
Esquema 2 Síntesis total de amidas derivadas del SA.....	46

### TABLAS

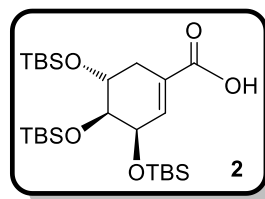
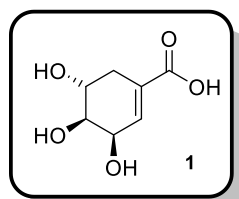
Tabla 1 Algunos inhibidores de la vía del SA.....	14
Tabla 2 Inhibidores de la enzima SDH de <i>P. sativum</i> análogos al SA.....	20
Tabla 3 Inhibidores de la enzima SDH de <i>P. sativum</i> análogos al DHS.....	20
Tabla 4 Inhibidores polifenólicos de la enzima SDH de <i>H. pylori</i> .....	21
Tabla 5 Inhibidores polifenólicos de la enzima SDH de <i>P. putida</i> .....	21
Tabla 6 Inhibidores de la enzima SDH de <i>S. aureus</i> con poca similitud estructural al SA.....	22
Tabla 7 Inhibidores "multi-target" e inhibidores selectivos de la enzima SDH de <i>H. pylori</i> .....	23
Tabla 8 Cepas y plásmidos empleados en este trabajo.....	26
Tabla 9 Secuencia de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	26
Tabla 10 Caracterización de los pasos de purificación de la enzima EcSDH.....	40
Tabla 11 Síntesis del ácido protegido <b>2</b> .....	43
Tabla 12 Ensayos para la síntesis del intermediario amida <b>3'</b> .....	43
Tabla 13 Síntesis del intermediario amida <b>3'</b> mediante la formación del cloruro de acilo.....	44
Tabla 14 Formación de la diamida protegida <b>4'</b> .....	45
Tabla 15 Variación de la relación estequiométrica del ácido <b>2</b> : 1,3-diaminopropano.....	45
Tabla 16 Parámetros cinéticos del efecto inhibitorio de amidas en la actividad de EcSDH.....	48
Tabla 17 Energías de interacción de los modos de unión entre amidas y la enzima EcSDH.....	51

### ECUACIONES

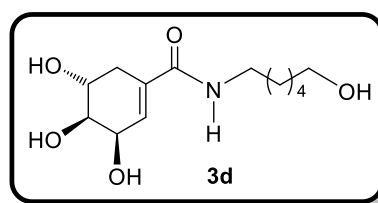
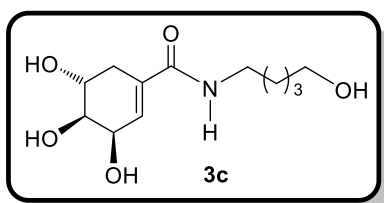
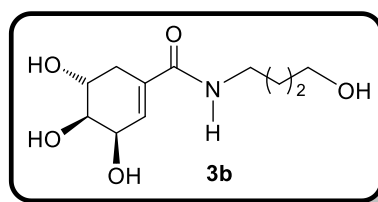
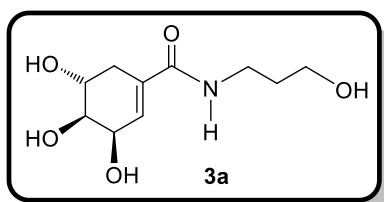
Ecuación 1 Cálculo de la actividad catalítica (U).....	30
Ecuación 2 Modelo de Inhibición Mixta.....	34
Ecuación 3 Determinación del IC <sub>50</sub> .....	34



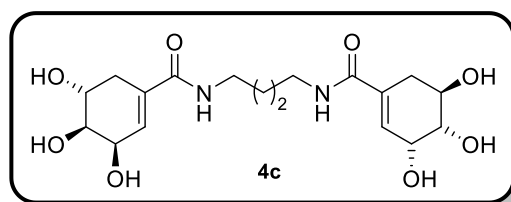
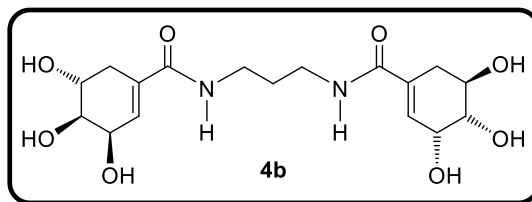
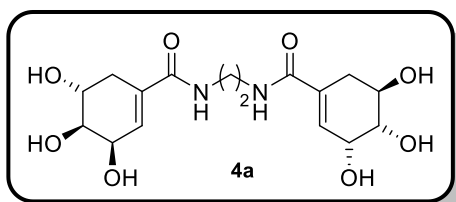
## Índice de compuestos



### MONOAMIDAS (3a-3d)



### DIAMIDAS (3a-3d)



## Lista de abreviaturas y símbolos

AcOEt	Acetato de etilo
Amp	Ampicilina
(COCl) <sub>2</sub>	Cloruro de oxalilo
DHS	Dehidroshikimato
DHQ	Dehidroquinato
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
D.O.	Densidad Óptica (medida a 600nm)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
E	Enzima
EcSDH	Enzima SDH de <i>Escherichia coli</i>
EcSDH- <sup>6</sup> His	Enzima EcSDH con cola de 6 Histidinas
Et <sub>2</sub> O	Éter etílico
GA	Galato
I	Inhibidor
IC <sub>50</sub>	Concentración de inhibidor que causa el 50% de inhibición
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
J	Constante de acoplamiento
Kan	Kanamicina
LB	Medio Luria-Bertani
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
MIC	Concentración Inhibitoria Mínima
NADP	β-nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NADPH + H <sup>+</sup>	NADP reducido
PCA	Protocatecuato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p.f.	Punto de fusión
QA	Quinato
S	Sustrato
SA	Shikimato
SDH	Enzima Shikimato deshidrogenasa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBDMSCI	Cloruro de <i>tert</i> -butil dimetil silano
THF	Tetrahidrofurano
kDa	Kilo Daltones (1000 Da= 1000 g/mol)
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono ( <sup>13</sup> C)
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno ( <sup>1</sup> H)
rpm	Revoluciones por minutos
pb	Pares de bases
K <sub>i</sub>	Constante de inhibición (complejo EI)
K <sub>i</sub>	Constante de inhibición (complejo ESI)
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
nm	Nanómetros
ΔG <sub>bind</sub>	Energía libre de Gibbs para la unión de I
[α] <sub>589</sub>	Rotación óptica a 589 nm
U	Actividad catalítica (μmol de sustrato/ minuto)

## RESUMEN

La vía del Shikimato (SA) es una ruta metabólica en común para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y otros metabolitos. Está presente en hongos, bacterias, plantas, algas y algunos endoparásitos *Apicomplexa*. La vía del SA es una ruta esencial ausente en mamíferos, por lo que, el desarrollo de inhibidores que actúen sobre las enzimas implicadas permitiría obtener agentes antimicrobianos y herbicidas de uso seguro para el ser humano. La enzima Shikimato deshidrogenasa (SDH) cataliza el cuarto paso de la vía del SA, correspondiente a la reducción reversible de Dehidroshikimato (DHS) a SA empleando NADPH como cofactor. Se ha reportado que el SA es un inhibidor mixto de la enzima SDH de *Escherichia coli* (EcSDH) ( $K_i = 160 \mu\text{M}$ ) (Dell & Frost 1993).

En el presente trabajo, se tomaron como referencia las estructuras químicas de inhibidores descritos para enzimas SDH, que posteriormente se modificaron substituyendo con núcleos de SA. El grupo de moléculas propuestas fue evaluado en función de su energía libre de unión ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) a la enzima EcSDH, mediante estudios de acople molecular ciego. Las moléculas con  $\Delta G_{\text{bind}}$  más negativos, solubles en agua y cuya síntesis química podría ser factible mostraron ser algunas amidas derivadas del SA. Considerando lo anterior, se exploró el reemplazo bioisostérico del grupo carbonilo en C-1 del SA sintetizando los derivados amida *N*-alquilados, a fin de desarrollar nuevos compuestos inhibidores de la enzima SDH. Para la obtención de monoamidas derivadas del SA, se emplearon como *N*-sustituyentes cadenas alifáticas lineales con un grupo hidroxilo terminal. En la síntesis de diamidas, dos moléculas de SA se anclaron mediante una cadena hidrocarbonada corta, que asemeja el caso de los inhibidores vainillina y curcumina, donde este último contiene dos núcleos similares a un inhibidor descrito (vainillina) resultando en un inhibidor más potente. Se evaluó la posible actividad inhibitoria de las amidas derivadas del SA mediante ensayos enzimáticos con EcSDH *in vitro*, y se determinó la actividad antibacterial contra *E. coli* JM101. Finalmente, se realizaron estudios de acople molecular como una aproximación para el entendimiento de relaciones estructura-función entre los compuestos sintetizados y la enzima EcSDH.

Todos los compuestos analizados mostraron ser inhibidores mixtos de la enzima EcSDH. Las monoamidas presentaron constantes de inhibición ( $K_i$ ) en el rango de 587-733  $\mu\text{M}$ . El inhibidor más débil corresponde a la monoamida **3a** que contiene una cadena de propanol ( $K_i = 733 \pm 67 \mu\text{M}$ ) comparado con el derivado hexanol **3d** ( $K_i = 587 \pm 49 \mu\text{M}$ ). De las moléculas evaluadas, las diamidas **4a-4c** fueron los inhibidores más activos ( $K_i = 400-458 \mu\text{M}$ ). Con base en los resultados, las variaciones estructurales entre los compuestos sintetizados dió lugar a dos potencias de inhibición, en que las monoamidas mostraron valores de  $IC_{50} = 829-953 \mu\text{M}$  y las diamidas  $IC_{50} = 588-652 \mu\text{M}$ . Las amidas derivadas del SA presentaron una baja actividad antibacterial contra *E. coli* JM101 ( $MIC_{(\text{Monoamidas})} = 1.8-2.2 \text{ mM}$  y  $MIC_{(\text{Diamidas})} = 1.2-1.3 \text{ mM}$ ) comparadas con el antibiótico de uso común Kanamicina .

Los estudios de acople molecular sugirieron que las monoamidas y diamidas derivadas del SA interaccionan mediante dos modos de unión diferentes con la enzima EcSDH. Las monoamidas podrían unirse al sitio activo de la enzima, orientando sus cadenas alifáticas hacia un parche hidrofílico en el interior de dicho sitio. En el caso de las diamidas, los estudios de modelado sugirieron que un núcleo de SA podría unirse al sitio activo de la enzima EcSDH, mientras que los grupos amida y el segundo núcleo de SA se unirían a una superficie hidrofílica en las inmediaciones del sitio de unión.

Las amidas sintetizadas mostraron una actividad inhibitoria débil contra EcSDH ( $K_i = 400-733 \mu\text{M}$ ) comparadas con la molécula base SA ( $K_i = 160 \mu\text{M}$ ) o el aldehído vainillina ( $K_i = 93 \mu\text{M}$ ), pero similares a los compuestos estructuralmente relacionados galato ( $K_i = 380 \mu\text{M}$ ) y protocatecuato ( $K_i = 750 \mu\text{M}$ ) reportados en *Pisum sativum* (Balinsky & Davies 1961). Se considera que el reemplazo bioisostérico del ácido carboxílico del SA por amidas *N*-substituidas resultó en inhibidores débiles como consecuencia de diferencias en la naturaleza electrónica (un anión en el carboxilato comparado con una amida neutral) que podrían afectar interacciones entre la proteína y el inhibidor, impedimentos estéricos en los derivados y/o diferentes modos de unión a la enzima, entre otros.

Hasta el presente trabajo, no existían reportes en la literatura donde se explore el potencial inhibitorio de compuestos derivados del SA como moléculas activas contra la enzima SDH. Si bien las moléculas sintetizadas mostraron ser inhibidores más débiles que el SA, constituyen andamios moleculares altamente funcionalizados que podrían ser modificados en el desarrollo de nuevos compuestos inhibidores de la enzima EcSDH.

## SUMMARY

Shikimate (SA) pathway is the common route utilized by fungi, bacteria, plants, algae, and certain *Apicomplexa* endoparasites for the biosynthesis of aromatic amino acids and other metabolites. As this essential pathway is absent in mammals, designing inhibitors against implied enzymes may lead to the development of antimicrobial and herbicidal agents harmless to humans. Shikimate dehydrogenase (SDH) catalyzes the fourth step in the SA pathway, meaning the reversible reduction of Dehydroshikimate (DHS) to SA employing NADPH as co-substrate. SA has proved to inhibit SDH enzyme of *Escherichia coli* (EcSDH) in a mixed-type manner ( $K_i = 160 \mu\text{M}$ ) (Dell & Frost 1993).

In the present work, we designed a set of SA harboring compounds inspired on the structures of previously reported SDH inhibitors. The proposed set of molecules were evaluated according to their free energy of binding ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) to the EcSDH enzyme on blind docking studies. The best ranked, soluble and chemically affordable molecules were amide derivatives of SA. We explored the bioisosteric replacement of the carbonyl C-1 group by synthesising *N*-alkylated amide derivatives of SA to test new compounds for SDH inhibitor discovery. In the preparation of SA monoamide derivatives, hydroxyl-ended linear alkyl chains of different lengths were used as *N*-substituents. As a continuation, diamides composed of two SA molecules were synthesised resembling the case of vanillin and curcumin, in which two nuclei of an identified inhibitor are linked by an aliphatic chain leading to inhibition enhancement. The derivatives were evaluated for *in vitro* EcSDH inhibition and antibacterial activity against *E. coli* JM101. Finally, molecular docking studies were performed for an understanding of structure-activity relationships.

All tested compounds showed to be mixed type inhibitors of the EcSDH enzyme. Monoamides displayed inhibition with  $K_i$  values in the 587-733  $\mu\text{M}$  range. The weakest inhibitor corresponded to that of the propanol moiety in the monoamide **3a** ( $K_i = 733 \pm 67 \mu\text{M}$ ) compared to the hexanol derivative **3d** ( $K_i = 587 \pm 49 \mu\text{M}$ ). Among the evaluated compounds, diamides **4a-4c** were the most active inhibitors ( $K_i = 400-458 \mu\text{M}$ ). According to our data, the structural variations of synthesised compounds resulted in two inhibition potencies,  $IC_{50} = 829-953 \mu\text{M}$  for monoamides and  $IC_{50} = 588-652 \mu\text{M}$  for diamides. All molecules displayed the same weak antibacterial activity against *E. coli* JM101 ( $\text{MIC}_{(\text{Monoamides})} = 1.8-2.2 \text{ mM}$  and  $\text{MIC}_{(\text{Diamides})} = 1.2-1.3 \text{ mM}$ ) compared to the kanamycin treated control.

Molecular modelling studies suggested two different binding modes of SA monoamide and diamide derivatives to the EcSDH enzyme. Monoamides may bind to the active site with their alkyl chains oriented towards a hydrophilic patch inside this site. In the case of diamides, modelling suggested that one SA moiety may bind to the active site of EcSDH whereas the amide groups and the second SA moiety anchors to a hydrophilic groove in the immediacy of the binding pocket.

Our SA amide derivatives showed weak inhibitory activity against EcSDH ( $K_i = 400-733 \mu\text{M}$ ) compared to the starting SA ( $K_i = 160 \mu\text{M}$ ) or the aldehyde vanillin ( $K_i = 93 \mu\text{M}$ ) but similar to the structure-related compounds gallate ( $K_i = 380 \mu\text{M}$ ) and protocatechuate ( $K_i = 750 \mu\text{M}$ ) tested in *Pisum sativum* (Balinsky & Davies 1961). We propose that the bioisosteric replacement of the carboxylic acid of SA for the *N*-substituted amides lead to weaker inhibitors because of either difference in the electronic nature (anion carboxylate vs. neutral amides) affecting protein-inhibitor interactions, steric hindrance of the derivatives and/or different binding modes to the enzyme, among others.

To the best of our knowledge, no previous studies have been reported on the possible inhibitory potential of SA derivatives as SDH inhibitors. Although the synthesised amides are weaker inhibitors compared to SA, these compounds represent useful chemical scaffolds that can be further modified for the development of novel SDH inhibitors with enhanced inhibitory activity.

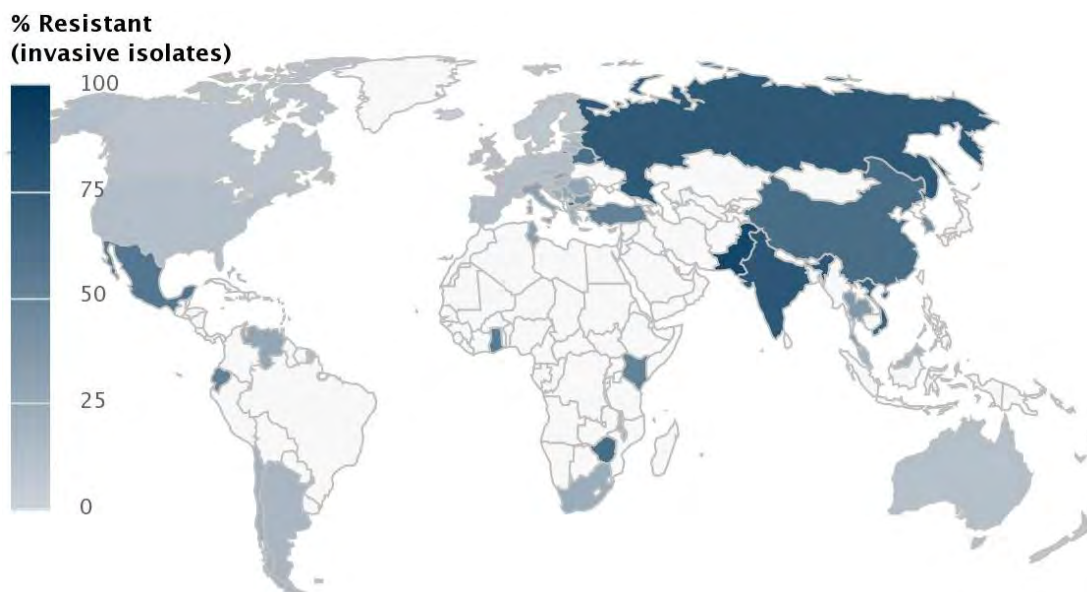
## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Agentes antimicrobianos y su impacto socioeconómico

Los agentes antimicrobianos son toda medicina que inhibe el crecimiento de un microorganismo o genera la muerte del mismo. Actúan inhibiendo la síntesis de componentes de membrana celular, síntesis de proteínas, replicación del DNA y síntesis de aminoácidos esenciales o ácido fólico (Kapoor et al. 2017). El uso indiscriminado de antimicrobianos ha acelerado el proceso natural de los microorganismos para desarrollar resistencia contra dichos medicamentos. La organización mundial de la salud publicó en 2017 una lista de microorganismos resistentes que deben ser considerados prioridad global en la búsqueda de nuevos antibióticos (World Health Organization 2017) considerando la tasa de mortalidad, prevalencia de resistencia durante los últimos 10 años, impacto económico en el sistema de salud y tratamientos antimicrobianos disponibles. Algunas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* están catalogadas como de prioridad crítica, tales como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Para estos organismos 5 de las 6 regiones del mundo han reportado más del 50 % de resistencia a carbapenemos y cefalosporinas de 3ra generación (Figura 1). Adicionalmente, bacterias resistentes a múltiples antibióticos (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, entre otras) están asociadas a una mayor mortalidad, mayor tiempo de estadía en hospitales e incremento en los costos al sistema de salud (Founou et al. 2017).

Se calcula que en Estados Unidos, cada año, más de 2 millones de personas se infectan con microorganismos resistentes a antibióticos, de las cuales 23 mil mueren, representando en su totalidad un costo anual al sistema de salud de aproximadamente \$ 20 billones de dólares (Kenneth et al. 2018). Se estima que, en caso de no desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos, para el año 2050 habrán muerto entre 11-444 millones de personas en el mundo debido a infecciones causadas por resistencia a antibióticos (Taylor et al. 2014). En este sentido, diversos esfuerzos de investigación están encaminados al desarrollo de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana, una de las aproximaciones empleadas es la identificación de moléculas que actúen como inhibidores de la síntesis de aminoácidos aromáticos, que sucede mediante la llamada vía del Shikimato.

Figura 1 Resistencia de *E. coli* a cefalosporinas de 3ra generación



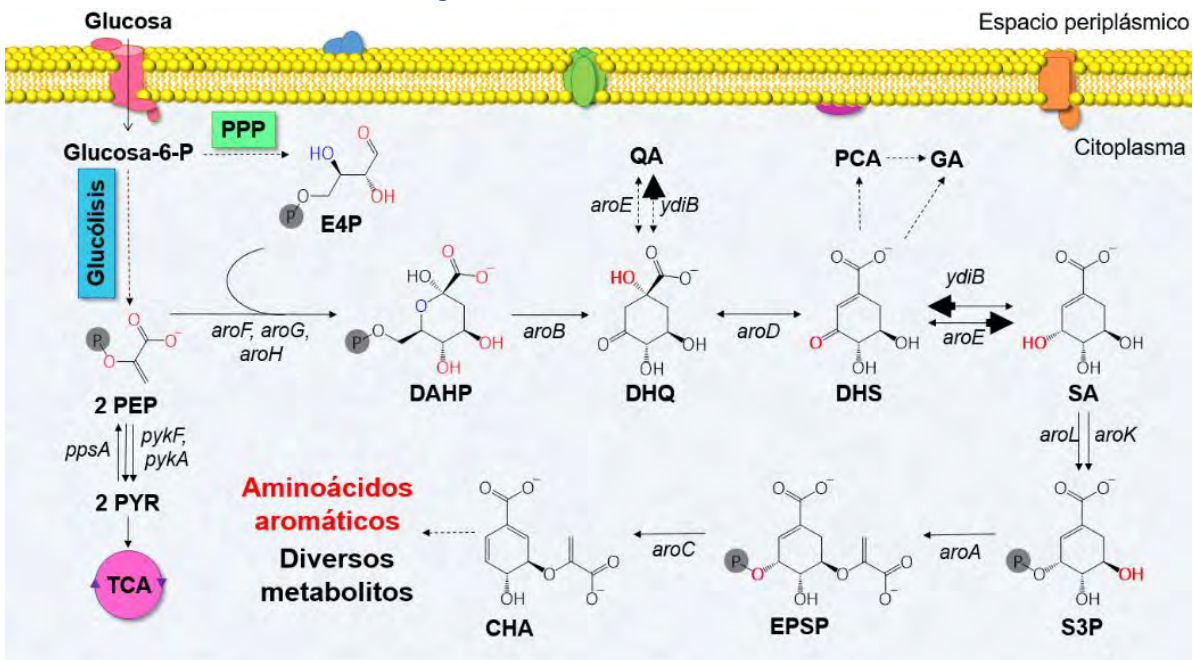
Se indica en color el porcentaje (%) de resistencia para los países mostrados, el color blanco indica países donde no se proporcionó información de ningún tipo (tomado de CDDEP 2017).

## 1.2 Vía del Shikimato (SA)

La vía del SA es una ruta común para la síntesis de aminoácidos aromáticos, ampliamente distribuida en los dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya*. Se encuentra presente en bacterias, hongos, levaduras, plantas, algas y algunos parásitos *Apicomplexa* aunque está ausente en mamíferos (Mir et al. 2015). La vía del SA es una ruta metabólica esencial ya que está involucrada en la producción de los bloques de construcción para síntesis de proteínas, moléculas acarreadoras de electrones tipo folato y ubiquinona, vitaminas E y K así como fenilpropanoides y alcaloides (Diaz Quiroz, Carmona, Bolivar, & Escalante, 2014; Maeda & Dudareva, 2012).

La vía del SA utiliza los intermediarios del metabolismo central de carbono eritrosa 4-fosfato (E4P) de la vía de las Pentosas Fosfato y fosfoenolpiruvato (PEP) de la Glucólisis, para tras siete pasos generar corismato (CHA) el último intermediario común en la síntesis de aminoácidos aromáticos (Figura 2) (Herrmann & Weaver 1999). La primera reacción de la vía implica la condensación de E4P con PEP produciendo 3-deoxi-D-arabinoheptuloso-7-fosfato (DAHP). *E. coli* tiene tres isoformas de la enzima DAHP sintasa: AroF, AroG, y AroH codificadas por los genes *aroF*, *aroG* y *aroH* respectivamente. Sobre la molécula de DAHP se efectúa un rearrreglo molecular transformándose en 3-dehidroquinato (DHQ) debido a la acción de la enzima DHQ sintasa (codificada por el gen *aroB*). Posteriormente se genera una doble ligadura en el DHQ obteniéndose 3-dehidroshikimato (DHS) en una reacción catalizada por la enzima DHQ deshidratasa (gen *aroD*). El cuarto paso de la vía es la oxidación de DHS a SA mediante la enzima SA deshidrogenasa, *E. coli* tiene dos isoformas de la enzima codificadas por los genes *aroE* y *ydiB*. En muchos organismos la enzima codificada por el gen *aroE* es la principal responsable de sintetizar SA y la generación de quinato (QA) se debe mayoritariamente a la acción de la enzima codificada por el gen *ydiB* (García et al. 2017). Adicionalmente, a partir de DHS se puede formar protocatecuato (PCA) y galato (GA) (Krämer et al. 2003). En el siguiente paso de la vía, el SA se fosforila a SA 3-fosfato (S3P) utilizando ATP y las isoenzimas SA quinazas I y II codificadas por los genes *aroK* y *aroL* respectivamente. Empleando una molécula de PEP se cataliza la conversión de S3P a 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) mediante la enzima EPSP sintasa (gen *aroA*). En el último paso de la vía se sintetiza CHA a partir de EPSP, utilizando la enzima CHA sintasa (gen *aroC*).

Figura 2 Vía del SA en *E. coli*



PPP= vía de las pentosas fosfato, PYR: piruvato, TCA= ciclo de los ácidos tricarboxílicos

En *E. coli* las enzimas DHQ sintasa, DHQ deshidratasa y SA deshidrogenasa se expresan de manera constitutiva mientras que las enzimas DAHP sintasa y SA quinasa II están sujetas a regulación transcripcional (Mir et al. 2015). También en *E. coli* la enzima DHQ sintasa se ha identificado como un paso limitante de la vía debido a problemas en la traducción (Juminaga et al. 2012). Finalmente la regulación de la vía por retro-inhibición se lleva a cabo en la enzima SA deshidrogenasa (*aroE*) efectuada por su producto SA (Dell & Frost 1993), y sobre las DAHP sintasas AroF, AroG, y AroH inhibidas por tirosina, fenilalanina y triptófano respectivamente (Light et al. 2012).

### 1.3 Inhibidores de la vía del SA

Las enzimas de la vía del SA se han identificado como blancos promisorios para el desarrollo de nuevos inhibidores enzimáticos debido a su importancia en la supervivencia celular, conocimiento de su bioquímica y biología estructural además de estar presentes en organismos con importancia clínica (Amer et al. 2008). En este sentido diversos esfuerzos de investigación están orientados al diseño y obtención de moléculas con posible actividad antibacteriana, fungicida, antiparasítica y herbicida de uso seguro para el ser humano (Singh et al. 1998).

Cada una de las siete enzimas de la vía del SA se han empleado en el desarrollo de inhibidores (Tabla 1) y se consideran igualmente útiles en la obtención de compuestos antimicrobianos y herbicidas. Diversos estudios han explorado la generación de agentes antibacterianos contra el organismo causante de tuberculosis *Mycobacterium tuberculosis* (Gordon et al. 2015), el responsable de enfermedades gastrointestinales *Helicobacter pylori* (Gonzalez-Bello 2016) o posibles agentes antiparasíticos contra *Toxoplasma gondii* (Roberts et al. 1998) involucrado en la toxoplasmosis. El desarrollo de inhibidores de enzimas de la vía del SA, ha permitido la obtención de antiparasitarios contra el organismo causante de malaria *Plasmodium falciparum* (Kappes et al. 2013), así como antibacterianos contra *E. coli* y *Staphylococcus aureus* (Davies et al. 1994). El caso más exitoso se presenta con el glifosato [N-(fosfonometil) glicina] el herbicida de mayor uso en el mundo desde la década de los 80's, comercializado como RoundUp® y Zero® (Steinrücken & Amrhein 1980; Bai & Ogbourne 2016).

Tabla 1 Algunos inhibidores de la vía del SA.

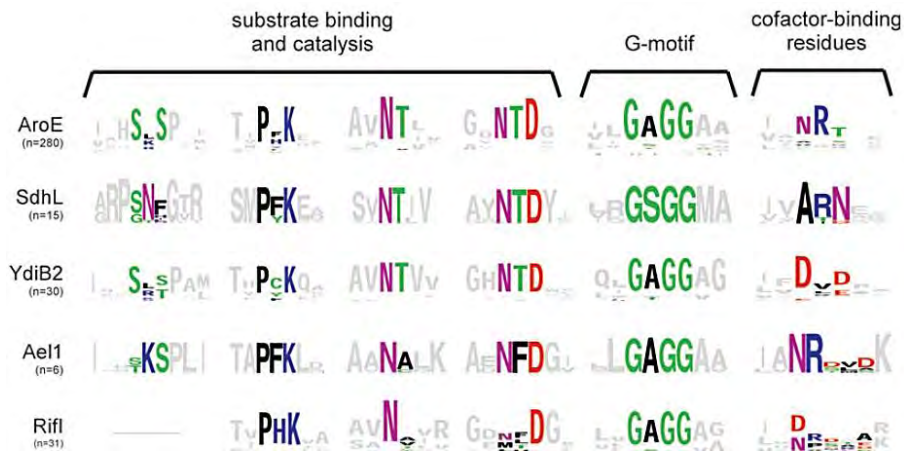
Enzima	Estrategia	Referencia
<b>DAHP sintasa</b>	Diseño racional de moléculas análogas al sustrato PEP o con grupos funcionales similares al producto DAHP	(Simpson & Davidson 1976; Balachandran et al. 2016)
<b>DHQ sintasa</b>	Diseño racional de moléculas análogas al producto DHQ. Estudios computacionales de la superposición de moléculas similares al DHQ.	(Montchamp & Frost 1997; Piehler et al. 1991)
<b>DHQ deshidratasa</b>	Diseño racional de compuestos análogos a intermediarios de la reacción. Uso de librerías de compuestos.	(Dias et al. 2011; Ratia et al. 2014)
<b>SA deshidrogenasa</b>	Diseño racional de moléculas análogas al sustrato DHS. Librería de compuestos.	(McCloskey et al. 1972; Peek et al. 2014)
<b>SA quinasa</b>	Librería de compuestos. Diseño racional de compuestos análogos al producto S3P basado en estudios de dinámica molecular.	(Simithy et al. 2014; Prado et al. 2016)
<b>EPSP sintasa</b>	Diseño racional de compuestos similares a sustratos, intermediarios y productos.	(Miller et al. 1994; Sikorski et al. 1993)
<b>CHA sintasa</b>	Diseño racional de compuestos similares a sustratos	(Balasubramanian et al. 1991)

### 1.4 Familia SA deshidrogenasa

La familia SA deshidrogenasa agrupa diversas enzimas óxido-reductasas dependientes de cofactores de nicotinamida, que actúan sobre moléculas similares al SA. Se conforma por 5 miembros denominados AroE, QDH, Rifl, SdhL y Ael1 asociados a funciones metabólicas distintas (Peek et al. 2013).

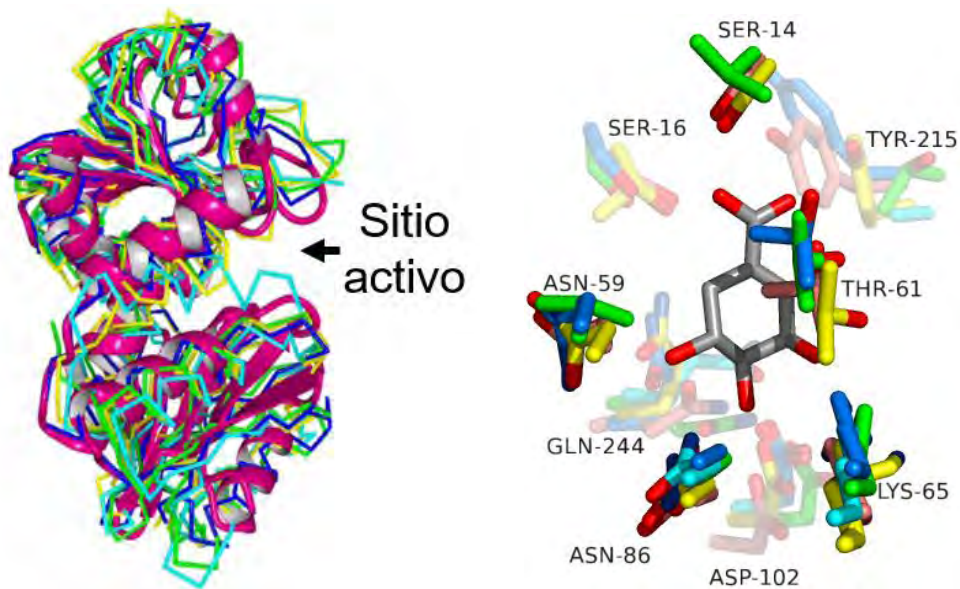
Los miembros de la familia SA deshidrogenasa presentan identidades de secuencia aminoacídica que varían del 20 al 50 %, conservando todos ellos la diada catalítica lisina-aspartato responsable de la actividad enzimática, así como diversos aminoácidos implicados en la unión de los sustratos y cofactores (Figura 3). Muestran un plegamiento tridimensional similar compuesto por dos dominios globulares entre los cuales se forma una cavidad donde se localiza el sitio activo (Figura 4 Izquierda). Entre los miembros existen variaciones en algunos aminoácidos importantes para la unión del sustrato (Figura 4 Derecha).

Figura 3 Aminoácidos conservados en miembros de la familia SA deshidrogenasa.



Se indica entre paréntesis el número de homólogos utilizados en el alineamiento de secuencia. (Singh et al. 2008)

Figura 4 Superposición de los miembros de la familia SA deshidrogenasa.

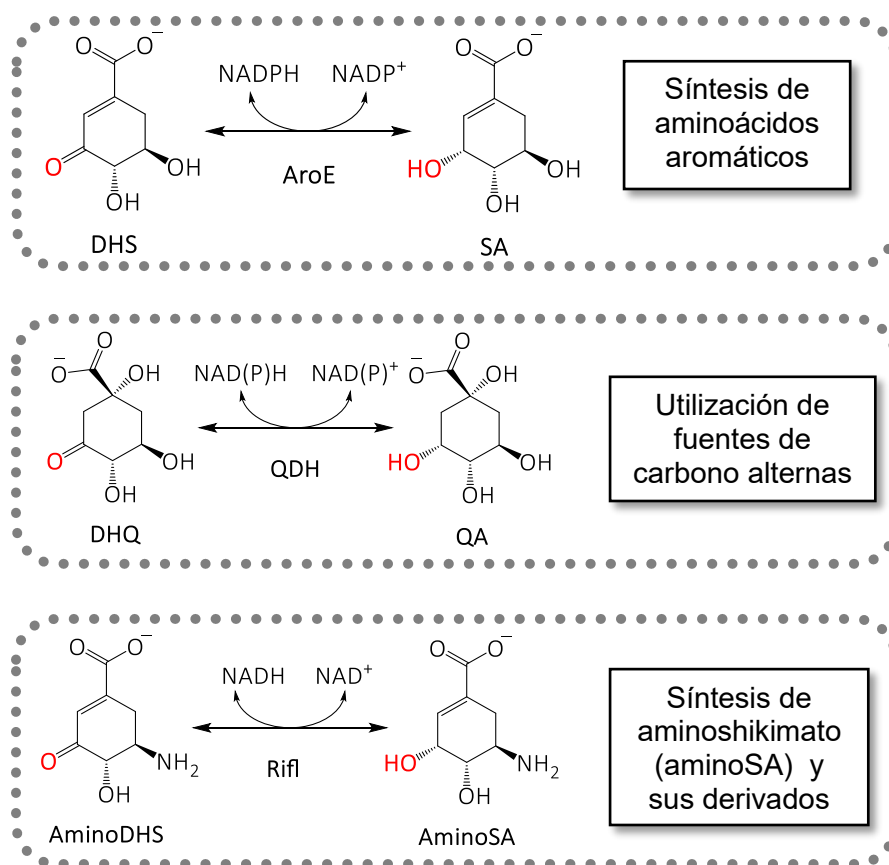


Izquierda= estructuras tridimensionales de miembros de la familia SA deshidrogenasa, representación de listones para AroE. Derecha= residuos de unión al sustrato mostrando la molécula de SA, numeración para AroE. AroE (rosa) y QDH (amarillo) de *E. coli*. Rifl (verde), SdhL (azul claro) y Ael (azul marino) de *Pseudomonas putida*.



Debido a variaciones en los aminoácidos del sitio activo y por lo tanto cambios en la geometría del mismo, los miembros de la familia SA deshidrogenasa exhiben una preferencia diferencial en el uso de sustratos y cofactores que se asocia a funciones bioquímicas distintas (Figura 5).

Figura 5 Reacciones y funciones de miembros de la familia.



La principal función de las enzimas AroE es la síntesis de SA, por lo que están implicadas en la producción de aminoácidos aromáticos, se ha reportado que estas enzimas también pueden catalizar en menor medida la producción de QA a partir de la reducción de DHQ, utilizando en ambos casos NADP como cofactor (García et al. 2017).

La actividad dominante de las enzimas tipo QDH es la de QA deshidrogenasa, dependiente de NAD y en menor medida NADP. YdiB es un miembro tipo QDH y junto con AroE representan las enzimas de la familia SA deshidrogenasa presentes en *E. coli*. La existencia de más de un tipo de enzima SA deshidrogenasa se ha asociado a algún vestigio de la capacidad de organismos ancestrales para utilizar fuentes de carbono alternas a la glucosa. Se sabe que las plantas tienen reservas de QA que utilizan como esqueletos para sintetizar aminoácidos aromáticos. Diversas bacterias y hongos también pueden catabolizar QA mediante la enzima QDH (Peek & Christendat 2015).

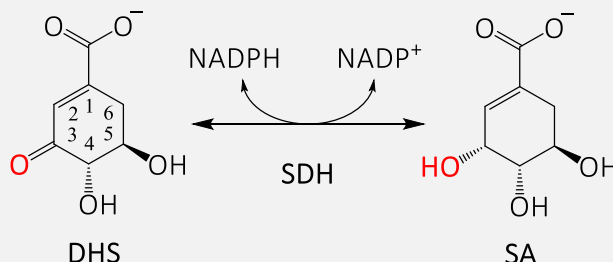
La primera enzima RifI se identificó en el organismo productor de rinfamicina B *Amycolatopsis mediterranei*, como parte de un grupo de genes asociados a la síntesis de antibióticos derivados del ácido 3-amino-5-hidroxibenzóico (AHBA). El AHBA se produce desde la vía del aminoshikimato en la cual se igualan algunas actividades enzimáticas de la vía del SA empleando intermediarios aminados. Las enzimas RifI muestran actividad tipo AroE y QDH sobre los análogos aminados (Floss et al. 2011).

La relevancia biológica de SdhL y Ael1 no es clara, tienen poca o ninguna actividad sobre el SA y QA por lo cual se ha sugerido que las enzimas están implicadas en metabolismos especializados (Kubota et al. 2013). En los miembros SdhL el cambio de residuos importantes para la unión del grupo carboxilo del sustrato (cambio de Y por A) y sus hidroxilos (cambio de S por G) comparados con otros integrantes de la familia SA deshidrogenasa serían los responsables de la baja actividad enzimática.

## 1.5 Enzima SA deshidrogenasa tipo AroE (SDH)

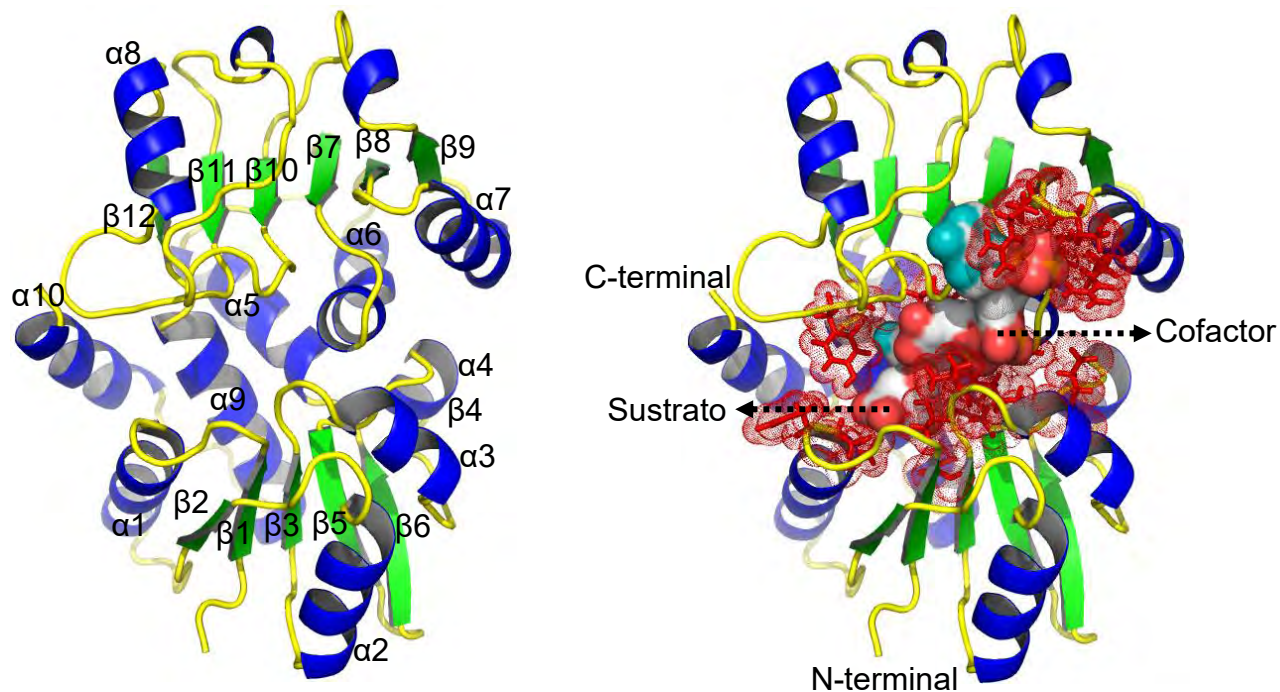
La enzima SDH (E.C. 1.1.1.25) está codificada por el gen *aroE* y participa en el cuarto paso de la vía del SA. Cataliza la reducción reversible del grupo carbonilo en C-3 del DHS para generar un grupo hidroxilo en la molécula de SA, utilizando NADP como cofactor (Figura 6).

Figura 6 Reacción catalizada por la enzima SDH



Michel y colaboradores reportaron por primera vez la estructura cristalina de la enzima SDH, particularmente la de *E. coli* en presencia de NADP<sup>+</sup> (EcSDH, PDB: 1NYT) (Michel et al. 2003). La enzima EcSDH está compuesta por dos dominios (Figura 7), el primero contiene los segmentos Met<sup>1</sup>-Thr<sup>101</sup> (β 1-6, α 1-4) y Gly<sup>237</sup>-Ser<sup>271</sup> (α 9, 10) mientras que el segundo comprende los aminoácidos Gly<sup>119</sup>-Asp<sup>236</sup> (β 7-12, α 6-8). Ambos dominios están conectados por la hélice α 5. El sitio activo de la enzima se encuentra en la hendidura generada entre los dominios, con el sitio de unión al sustrato delineado principalmente por aminoácidos del dominio N-terminal y el sitio de unión al cofactor localizado en el dominio C-terminal, que adopta un plegamiento de Rossmann.

Figura 7 Estructura de la enzima EcSDH.

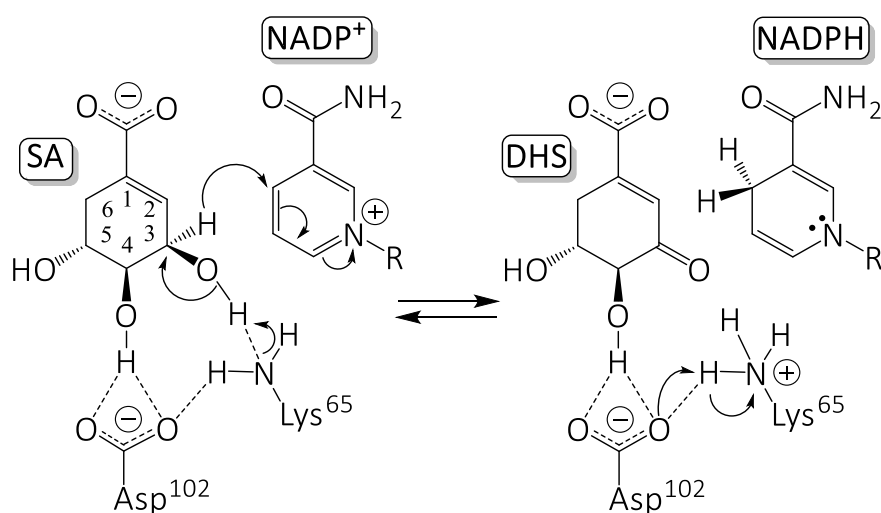


Izquierda: Estructura de EcSDH numerando los elementos de estructura secundaria (azul= hélices α, verde= hojas β, amarillo= conectores). Derecha: Modelo propuesto de la unión del sustrato y cofactor a la enzima, se resaltan en rojo algunos residuos del sitio catalítico. Basado en (Michel et al. 2003).

Hasta el año 2017 se han depositado en Protein Data Bank las estructuras cristalinas de 47 enzimas SDH pertenecientes a bacterias, eucariontes y arqueas. Dichas estructuras corresponden a la enzima en forma de apoenzima, complejo binario enzima-ligando o enzima-cofactor y complejo ternario.

Las enzimas SDH siguen un mecanismo catalítico concertado. En la oxidación del SA un residuo conservado de lisina actúa como base abstrayendo el protón del grupo hidroxilo en C3, con la concomitante transferencia de un ion hidruro a la cara Pro-R del anillo de nicotinamida del cofactor (Figura 8) (Gan et al. 2007). La lisina protonada forma una sal cuaternaria de amonio que se estabiliza por la presencia de un residuo invariante de aspartato. El ciclo catalítico termina con la transferencia de un protón desde la lisina al aspartato y de éste a una molécula de agua estructural para liberarse al medio. Diversos aminoácidos auxilian la unión y orientación del sustrato fijándolo en una conformación competente para la reacción. Los residuos conservados de S14, S16 y Y215 interactúan con el grupo carboxílico del SA y DHS, mientras que los hidroxilos en C4 y C5 de los sustratos se coordinan con los residuos invariantes T61, K65, R86, D102, Q244 (numeración para EcSDH) (Singh & Christendat 2006).

Figura 8 Mecanismo químico para la reacción de las enzimas SDH.



Mecanismo propuesto para la reacción de oxidación del SA. Residuos numerados para EcSDH. Basado en (Peek & Christendat 2015; Michel et al. 2003).

Estudios para elucidar el mecanismo cinético de la enzima SDH de *M. tuberculosis*, apuntan a un mecanismo bi-bi ordenado en que inicialmente se forma el complejo SDH-DHS y posteriormente SDH-DHS-NADPH (Fonseca et al. 2007). Recientemente, ensayos de velocidad inicial para la enzima SDH de *S. aureus* sugieren un mecanismo secuencial al azar (Avitia-Domínguez et al. 2014).

Las enzimas SDH alternan entre una conformación “abierta” y una “cerrada”, asociada al movimiento de los dominios generando un rearrreglo de la red de puentes de hidrógeno presente en la cavidad de la enzima. Se ha propuesto que la conformación cerrada sería la catalíticamente activa debido a que se establecería una mayor proximidad entre el sustrato y el cofactor. También se ha sugerido que los sustratos se pueden unir al enzima en cualquiera de las dos conformaciones, y que el cofactor se uniría al estado cerrado con mayor afinidad (Bagautdinov & Kunishima 2007).

En bacterias las enzimas SDH se encuentran en forma de monómeros y homodímeros. De forma general estas proteínas tienen alrededor de 275 aminoácidos con un peso molecular promedio de 30 kDa (EcSDH está compuesta de 272 aminoácidos). Las constantes cinéticas reportadas para enzimas SDH de diversos organismos muestran valores de  $K_{m, DHS} = 29-199 \mu M$  y  $k_{cat} = 50-329 s^{-1}$ .

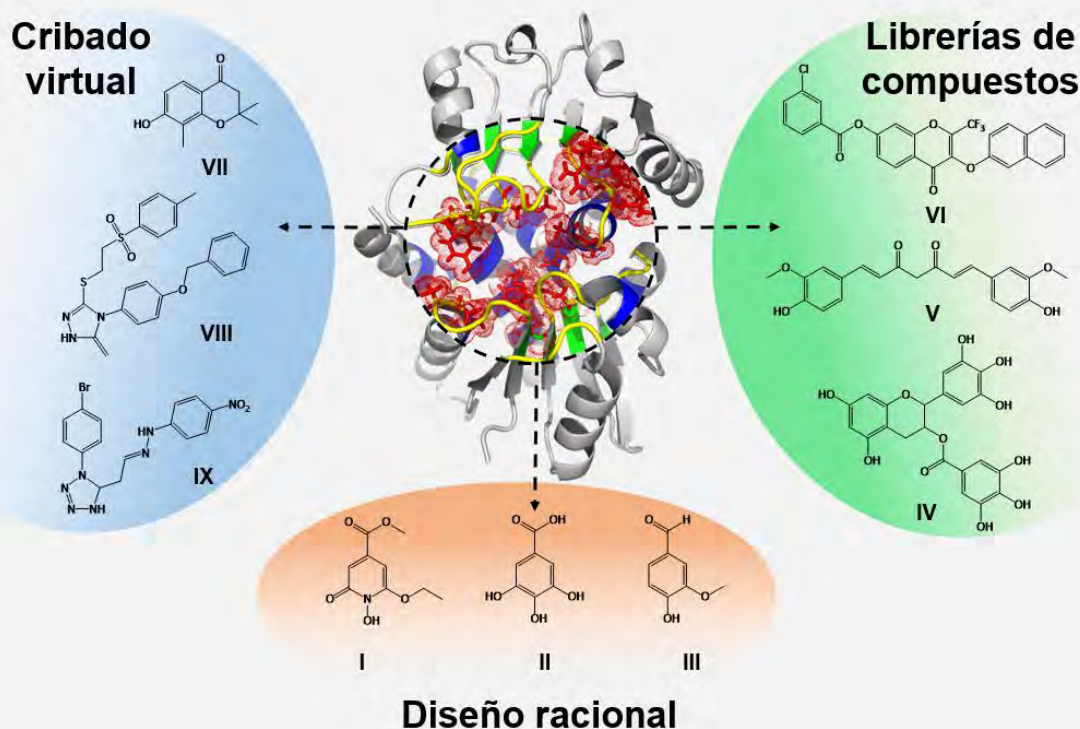
Se sabe que en bacterias las enzimas SDH son proteínas monofuncionales mientras que en plantas se encuentran fusionadas a la enzima DHQ deshidratasa, catalizando el tercer y cuarto paso de la vía del SA. En hongos, levaduras y parásitos *Apicomplexa* las enzimas SDH forman parte del complejo pentafuncional AROM en que se presentan las actividades enzimáticas de los pasos 2 a 6 de la vía del SA (Campbell et al. 2004).

## ANTECEDENTES

### 1.6 Inhibidores de la enzima SDH

Los primeros estudios para identificar inhibidores de la enzima SDH se realizaron mediante el diseño racional de estructuras análogas a los ligandos, con el fin de elucidar los requisitos de interacción entre el sustrato y el sitio activo de la enzima (Figura 9). Se han empleado librerías de compuestos como una aproximación no racional para la selección de moléculas (desde cientos o miles de sustancias) en la obtención de nuevos inhibidores, cuya estructura química puede no estar relacionada con los ligandos de la enzima. Recientemente, el cribado virtual y los mapas de interacción (site moiety maps) basados en el modelado electrónico del sitio catalítico, permiten el diseño y predicción *in silico* de moléculas con posible actividad inhibitoria. Adicionalmente se ha reportado que el SA es un inhibidor mixto ( $K_i = 160 \mu\text{M}$ ) de la enzima SDH de *E. coli* (Dell & Frost 1993).

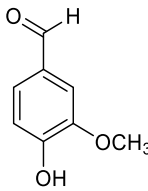
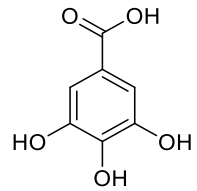
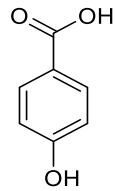
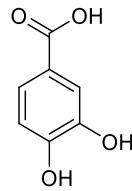
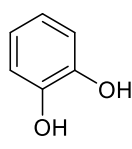
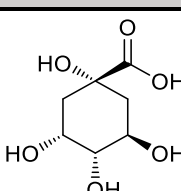
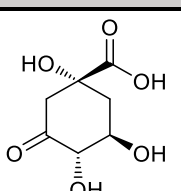
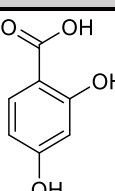
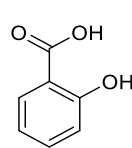
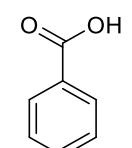
Figura 9 Estrategias para la obtención de inhibidores de la enzima SDH.



I: metil 6-etoxi-1-hidroxi-2-oxoisonicotincarboxilato, II: GA, III: vainillina, IV: epigalocatequin galato, V: curcumina, VI: butil 2-[[3-(2-naftiloxi)-4-oxo-2-(trifluorometil)-4H-cromen-7-il]oxi]propanoato, VII: 7-hidroxi-2,2,8-trimetil-2,3-dihidro-4H-cromen-4-ona, VIII: HTS02873, IX: NRB03174.

Con el objetivo de determinar los grupos implicados en la unión de los sustratos DHS y SA a la enzima SDH de guisantes (*Pisum sativum*), Balinsky y Davies analizaron diversos compuestos con estructura química similar a los ligandos en busca de inhibidores competitivos (Balinsky & Daviest 1961). Sus resultados mostraron que la presencia de un grupo carbonilo en la posición C1 y un hidroxilo en la posición C4 son los mayores determinantes para la unión de los sustratos a la enzima. Adicionalmente observaron que análogos substituidos en C2 y C6 exhibían menor o ningún efecto inhibitorio, debido posiblemente a impedimentos estéricos que disminuirían la unión de las moléculas a la enzima (Tabla 2). Lo anterior explicaría la falta de inhibición mostrada por el QA, un componente de la vía del SA estructuralmente parecido al SA.

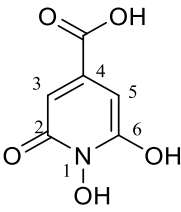
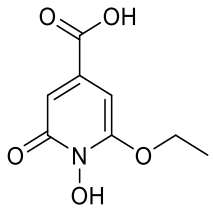
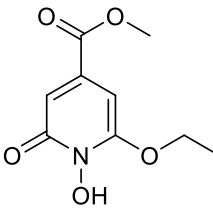
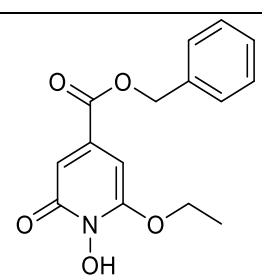
Tabla 2 Inhibidores de la enzima SDH de *P. sativum* análogos al SA.

Inhibidor	Vainillina	GA	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	PCA	Catecol
$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	93	380	740	750	1900
					
Sin inhibición	QA	Ácido dehidroquinico	Ácido 2,4-hidroxibenzoico	Ácido salicílico	Ácido benzoico
					

Inhibidores competitivos de SDH de *P. sativum* ( $K_m$ , (SA) = 170  $\mu\text{M}$ ) (Balinsky & Daviest 1961).

Baillie y colaboradores sintetizaron el ácido 1,6-dihidroxi-2-oxoisonicotico al considerar que el grupo carbonilo en C3 del DHS (tipo cetona) podía sustituirse por un carbonilo de amida, resultando en un análogo de DHS menos susceptible a reducción enzimática (McCloskey et al. 1972). Sus estudios mostraron la versatilidad en la identidad del grupo carbonilo de inhibidores análogos al sustrato, reportando moléculas tipo alquil éster (Tabla 3). Si bien ninguna de las moléculas sintetizadas mostró actividad herbicida contra diversas plantas (*P. sativum*, *Zea mays*, *Beta vulagris* y otras) el estudio sugiere la presencia de una cavidad hidrofóbica en el sitio activo, ya que algunos 6-O-alquil éteres derivados del ácido 1,6-dihidroxi-2-oxoisonicotico se unen con mayor afinidad a la enzima.

Tabla 3 Inhibidores de la enzima SDH de *P. sativum* análogos al DHS.

Inhibidor	Ácido 1,6-dihidroxi-2-oxoisonicotico	Eter 6-O- C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> del ácido	Metil éster del éter 6-O- C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Metil éster del éter C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> mNHCOCH <sub>2</sub> l
$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	120	100	280	350
				

Inhibidores competitivos de SDH de *P. sativum* (McCloskey et al. 1972).

A fin de identificar agentes antibacterianos contra *H. pylori*, Han y colaboradores partieron de una librería de 5000 compuestos para determinar el cambio en la actividad de la enzima SDH de dicho organismo (Han et al. 2006). De las cinco moléculas con mayor actividad contra la enzima SDH, los compuestos X, XI y XIV son inhibidores moderados del crecimiento de *H. pylori* (Tabla 4). Los inhibidores polifenólicos XII y XIII no disminuyen significativamente el crecimiento, esto podría deberse a la incapacidad de XII para atravesar la membrana celular o la poca solubilidad de XIII en el medio de cultivo.

Es interesante notar que el compuesto X (curcumina) contiene en su estructura dos anillos similares a la molécula de vainillina, un inhibidor de la enzima SDH de *P. sativum*.

Tabla 4 Inhibidores polifenólicos de la enzima SDH de *H. pylori*.

Inhibidor	X <sup>‡</sup>	XI <sup>‡</sup>	XII <sup>‡</sup>	XIII <sup>&amp;</sup>	XIV <sup>‡</sup>
$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	5.9	3.9	18.2	1.8	15.4
$\alpha K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	44.5	8.1	28.3	---	58.9
$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	15.4	3.9	13.4	2.9	3.5
MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	16	16	---	---	32

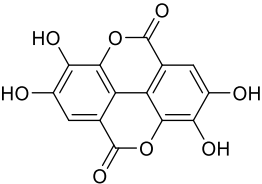
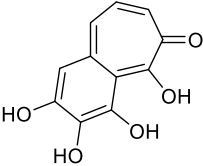
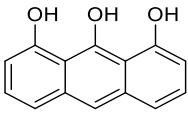
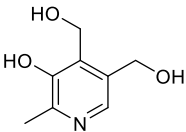
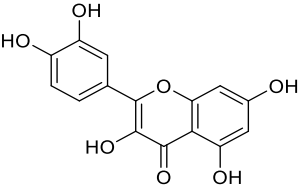
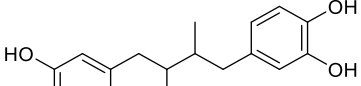
  

<sup>‡</sup> Inhibidor no competitivo, & Inhibidor competitivo. X= curcumina, XI= 3-(2-naftiloxi)-4-oxo-2-(trifluorometil)-4H-cromen-7-il 3-clorobenzoato, XII= butil 2-[[3(2-naftiloxi)-4-oxo-2-(trifluorometil)-4H-cromen-7-il]oxi]propanoato, XIII= 2-({2-[[2-((2,3-dimetilanilino)-2-oxoetil)sulfanil]-1,3-benzotiazol 6-il] amino)-2-oxoetil}sulfanil)-N-(2-naftil)acetamida y XIV= diacetato de maesaquinona (Han et al. 2006).

A partir de una librería de 5500 compuestos, Peek y colaboradores identificaron inhibidores de alta y mediana potencia contra SDH de *Pseudomonas putida* (Tabla 5) (Peek et al. 2014). Las moléculas con mayor actividad fueron los polifenoles EGCG (galato de epigalocatecol) y ECG (galato de epicatecol) que también inhibieron a la enzima bifuncional SDH-DHQ deshidratasa de *Arabidopsis thaliana*.

Tabla 5 Inhibidores polifenólicos de la enzima SDH de *P. putida*.

Inhibidor	EGCG	ECG	Epigalocatequin-3,5-digalato
Inhibición de SDH	>75 %	>75 %	~50 %
	<p><math>IC_{50}</math> (<i>P. putida</i>) = 3.0 <math>\mu\text{M}</math>  <math>IC_{50}</math> (<i>A. thaliana</i>) = 2.1 <math>\mu\text{M}</math></p>	<p><math>IC_{50}</math> (<i>P. putida</i>) = 3.7 <math>\mu\text{M}</math>  <math>IC_{50}</math> (<i>A. thaliana</i>) = 2.0 <math>\mu\text{M}</math></p>	

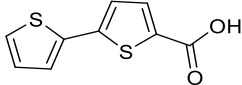
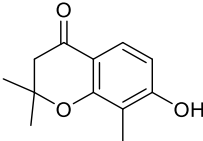
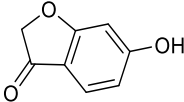
Inhibidor	Ácido elágico	Purpurogalina	Diantrol
Inhibición de SDH	~50 %	~50 %	~50 %
			
Inhibidor	Piridoxina	Quercetina	Ácido nordihidroguaiaretico
Inhibición de SDH	~25 %	~25 %	~25 %
			

Inhibición durante el screening de la librería usando 100  $\mu\text{M}$  de SA, 2 mM  $\text{NADP}^+$  y 2.5  $\mu\text{M}$  de cada compuesto (Peek et al. 2014).

Comparando la intensidad de inhibición y estructura química de los compuestos analizados el estudio de Peek propone que, la presencia simultánea del núcleo de GA y un esqueleto flavonoide se relaciona con moléculas inhibitoras, aunque dichos componentes probados individualmente no muestran actividad en las condiciones utilizadas. Si bien sólo el EGCG fue activo contra el crecimiento de *P. putida* ( $\text{MIC} = 500 \mu\text{M}$ ), se ha reportado que los polifenoles EGCG y ECG son inhibidores de diversas enzimas dependientes de  $\text{NAD(P)}$  como la ácido graso sintasa (Zhang & Rock 2004), escualeno epoxidasa (Abe et al. 2000) y glutamato deshidrogenasa (Li et al. 2011) entre otras.

Inhibidores de la enzima SDH estructuralmente poco relacionados con los sustratos también se han reportado en investigaciones que parten de análisis *in silico*. Avitia-Domínguez y colaboradores realizaron un cribado virtual de 1000 compuestos contra el sitio catalítico de la enzima SDH de *Staphylococcus aureus* (Avitia-Domínguez et al. 2014). En el estudio se caracterizó el efecto inhibitorio de las 100 moléculas que en la predicción de acople molecular arrojaron las mayores energías de unión. Los tres inhibidores más potentes sólo comparten la presencia de un grupo carbonilo y alguna funcionalidad para establecer puentes de hidrógeno con la enzima. (Tabla 6).

Tabla 6 Inhibidores de la enzima SDH de *S. aureus* con poca similitud estructural al SA.

Inhibidor	XV &	XVI &	XVII #
$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	9.53	19.76	58.3
$\alpha K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	---	---	1470
$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	122.94	343.43	142.9
			

& Inhibidor competitivo, # Inhibidor mixto. XV= ácido 2,2'-bitiofen-5-carboxílico, XVI= 7-hidroxi-2,2,8-trimetil-2,3-dihidro-4H-cromen-4 ona, XVII= 6-hidroxi-2,3 dihidrobenzo[b]furan-3-ona.

Con la idea de diseñar inhibidores que actúen simultáneamente sobre diversas enzimas, Hsu y colaboradores propusieron la estrategia PathSiMMap (pathway-based screening strategy) (Hsu et al. 2013). PathSiMMap consiste en tomar diferentes enzimas que reconozcan sustratos estructuralmente similares (por ejemplo, enzimas de una misma vía metabólica) y modelar los ambientes de unión, a fin de identificar las características electrónicas que lleven al diseño de una molécula activa en el conjunto de ambientes. El acoplamiento molecular de más de 300 mil compuestos con enzimas de la vía del SA permitió proponer los ambientes de unión que derivaron en el descubrimiento de inhibidores “multi-target”, algunos con  $IC_{50} < 10 \mu\text{M}$  para las enzimas SDH y SA quinasa de *H. pylori* (Tabla 7). A partir de ambientes de interacción únicos en la enzima SDH, diseñaron dos inhibidores selectivos para SDH con menor afinidad por SA quinasa (compuestos XXI y XXII), los cuales interaccionan con regiones diferentes al sitio de unión del sustrato y el cofactor.

Tabla 7 Inhibidores “multi-target” e inhibidores selectivos de la enzima SDH de *H. pylori*.

Inhibidor	XVIII	XIX	XX	XXI <sup>‡</sup>	XXII <sup>‡</sup>
$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) SDH	3.6	1.4	24.8	9.7	4.9
$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) SA quinasa	7.8	4.8	23.8	>100	>100

$IC_{50}$  empleando la enzima SDH o SA quinasa de *H. pylori*. <sup>‡</sup> Inhibidores selectivos de SDH. XVIII= NSC45174, XIX= NSC45611, XX= RH00037, XXI= NRB03174 y XXII= HTS02873 (Hsu et al. 2013).

### 1.6.1 Inhibición de enzimas SDH de diversos organismos empleando un mismo compuesto

Entre las enzimas SDH de los tres dominios existen identidades en secuencia aminoacídica del 30 al 50%, con los aminoácidos del sitio catalítico altamente conservados. La extrapolación del efecto inhibitorio que presenta una molécula sobre enzimas SDH de organismos diferentes, se ha reportado en algunos estudios mostrados en este apartado. La vainillina, GA y PC identificadas como inhibidores de la enzima SDH de *P. sativum* (Balinsky & Daviest 1961) también se han probado como inhibidores de la enzima de *Capsicum annuum* (Diaz & Merino 1997). En el trabajo de Baillie, los derivados del ácido 1,6-dihidroxi-2-oxoisonicotico fueron activos contra las enzimas SDH de las plantas *P. sativum* y *Elytrigia repens* (McCloskey et al. 1972). En el estudio de Peek, los inhibidores EGCG y ECG actúan sobre la enzima SDH bacteriana de *P. putida* y la enzima bifuncional de la planta *A. thaliana* (Peek et al. 2014).



## JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### JUSTIFICACIÓN

Las enzimas de la vía del SA son un blanco promisorio para el desarrollo de inhibidores con actividad antibacteriana, fungicida, antiparasítica y herbicida de uso seguro en seres humanos.

El SA es un inhibidor de la enzima SDH. La generación de bioisómeros derivados del SA permitiría explorar nuevos andamios moleculares para la obtención de compuestos antimicrobianos.

### HIPÓTESIS

Compuestos derivados del shikimato pueden actuar como inhibidores de la enzima Shikimato deshidrogenasa de *E. coli*.

### OBJETIVO GENERAL

Diseñar y sintetizar moléculas análogas al SA para evaluar su posible efecto inhibitorio sobre la enzima SDH *in vitro* y actividad antibacterial contra *E. coli*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Expresión y purificación de la enzima EcSDH.
- 2) Diseño de compuestos derivados del SA basados en inhibidores descritos, que puedan ser evaluados según su energía de unión ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) a la enzima EcSDH (ensayos de acople molecular ciego).
- 3) Síntesis orgánica y caracterización química de estructuras seleccionadas.
- 4) Ensayos enzimáticos para la determinación del posible efecto inhibitorio de las moléculas sintetizadas sobre la actividad de la enzima EcSDH y actividad antibacterial contra *E. coli* JM101.
- 5) Predicción de los modos de unión de los compuestos sintetizados a la enzima EcSDH.

## MATERIALES Y MÉTODOS

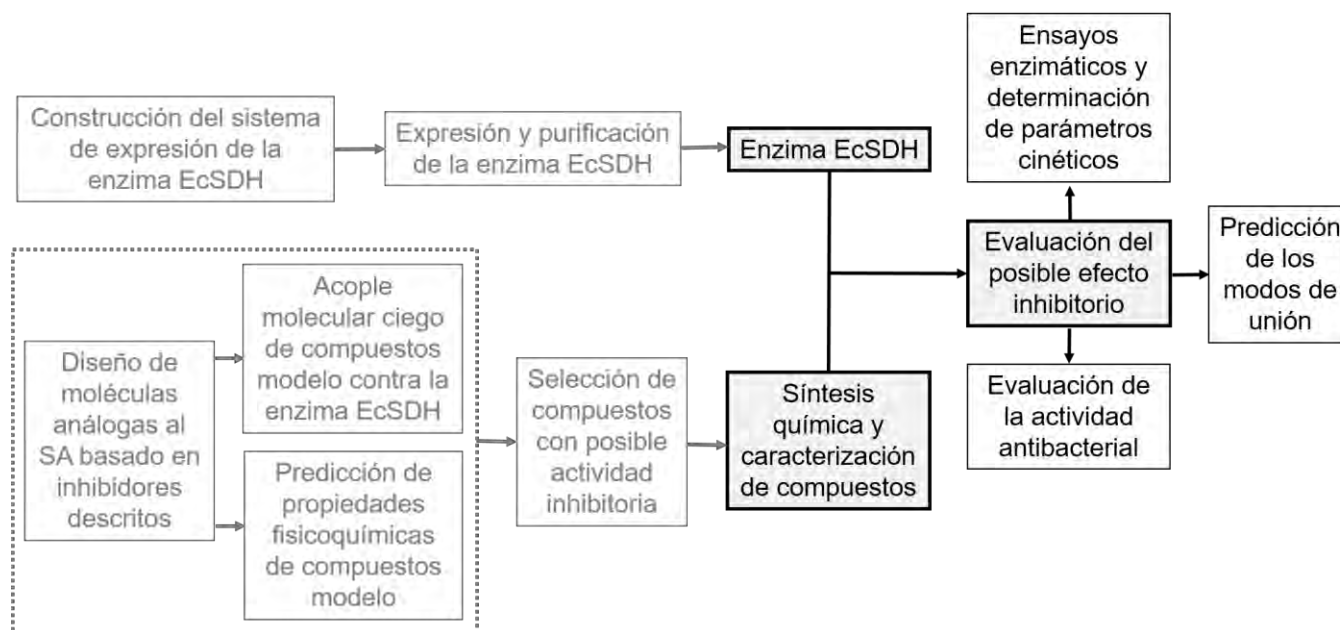
### ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Los pasos generales de la metodología empleada se presentan en la Figura 10. Primeramente se construyó un vector clonando al gen *aroE* que codifica para la enzima EcSDH, y una vez expresada la proteína se procedió a purificarla desde el extracto crudo.

Considerando las estructuras químicas de inhibidores descritos para enzimas SDH, se propusieron un grupo de moléculas substituyendo con núcleos de SA. El grupo de moléculas propuestas fue evaluado mediante estudios de acople molecular ciego contra la enzima EcSDH y para cada compuesto se predijo la solubilidad en agua. Se realizó la síntesis química de estructuras seleccionadas y se caracterizaron mediante estudios de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , IR-FT y MS.

Se evaluó la posible actividad inhibitoria de los compuestos derivados del SA mediante ensayos enzimáticos con EcSDH *in vitro*, y se determinó la actividad antibacterial contra *E. coli* JM101. Finalmente, se realizaron estudios de acople molecular como una aproximación para el entendimiento de relaciones estructura-función entre los compuestos sintetizados y la enzima EcSDH.

Figura 10 Estrategia experimental



### INFORMACIÓN GENERAL

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron con los equipos Nanodrop 2000c y Genesys 10S (Thermo Fisher Scientific). Para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó el Termociclador C1000 (Biorad). En la purificación de DNA se utilizó GeneJET Gel Extraction kit y GeneJET PCR Purification kit (Thermo Scientific). Todas las enzimas de restricción, fosfatasa, ligasa y Taq DNA polimerasa son de la marca Thermo Scientific. Los antibióticos se emplearon a concentraciones finales de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamicina (Km) y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina (Amp).

## Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y vectores utilizados en la expresión de la enzima EcSDH se enlistan en la Tabla 8. Los oligonucleótidos empleados en clonación y secuenciación se muestran en la Tabla 9.

Tabla 8 Cepas y plásmidos empleados en este trabajo

Cepa	Características relevantes	Referencia
<b>Construcción del sistema para la purificación de la enzima EcSDH</b>		
<i>E. coli</i> JM101	F' tra D36 proA <sup>+</sup> proB <sup>+</sup> laqI q lacZ ΔM15/supE thi Δ (lac-proAB) rpoS(33 am)	(Bolívar et al. 1977)
<i>E. coli</i> DH5α	F' φ80 lacZ ΔM15 Δ(lacZYA-argF) u169 recA1 endA1 hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA	(Woodcock et al. 1989)
<i>aroE</i> <sup>-</sup>	<i>E. coli</i> K12 BW25113 Δ <i>aroE</i> ::kan (JW3242)	(Baba et al. 2006)
<i>aroE</i> pCold <i>aroE</i>	<i>E. coli aroE</i> + pCold <i>aroE</i>	Este trabajo
Plásmidos	Características relevantes	Referencia
pCR-Blunt II-TOPO	pCR <sup>TM</sup> -Blunt II-TOPO <sup>TM</sup> [ 3.5 Kb, promotor <i>lac</i> , gen letal <i>ccdB</i> , Km <sup>R</sup> , Zn <sup>R</sup> , origen pUC]	Invitrogen
pTOPO <i>aroE</i>	pCR-Blunt II-TOPO, <i>aroE</i>	Este trabajo
pCold-I	pCold <sup>TM</sup> I DNA [ 4.4Kb, promotor <i>cspA</i> , región operadora <i>lac</i> , TEE, secuencia His-Tag, sitio de corte Factor Xa, Amp <sup>R</sup> , origen ColE1]	TAKARA Biosciences
pCold <i>aroE</i>	pCold-I, <i>aroE</i>	Este trabajo

Tabla 9 Secuencia de oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia de nucleótidos	Función
<b>Construcción del plásmido pCold-<i>aroE</i></b>		
<i>aroE</i> Fw	5' GGGAATTCCATATGGAACCTATGCTGTTTTTGG 3'	Amplificación del gen <i>aroE</i> . Sitio de <u>NdeI</u>
<i>aroE</i> Rv	5' GGTTGGGGATCCTCACGCGGACAATTCCTCCTG 3'	Amplificación del gen <i>aroE</i> . Sitio de <u>BamHI</u>
pCold-I Fw	5'ACGCCATATCGCCGAAAGG 3'	Secuenciación del inserto. 93 pb río arriba SCM
pCold-I Rv	5'GGCAGGGATCTTAGATTCTG 3'	Secuenciación del inserto. 73 pb río abajo del SCM

SCM: Sitio de Clonación Múltiple

## Técnicas generales de biología molecular

### *Extracción de DNA cromosomal por el método de ebullición*

El siguiente es un método rápido de obtención de DNA cromosomal, que, al ser general, resulta en una muestra con otras posibles impurezas. Se inocularon 3 mL de medio con antibiótico y el cultivo se incubó hasta saturación. 1 mL de la muestra se centrifugó a 13 krpm/ 2 min, retirando el sobrenadante con punta. El pellet se resuspendió en 200  $\mu$ L de agua desionizada y se procedió a la desnaturalización colocando en un baño de agua a ebullición durante 10 min. Los residuos celulares se separaron por centrifugación a 13 Krpm/ 2 min tomando 100  $\mu$ L del sobrenadante (conteniendo el DNA cromosomal) y diluyendo 1:10 para usarse como solución de trabajo. Las muestras finales se analizaron espectrofotométricamente para caracterizar su pureza (relación  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ ).

### *Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (miniprep)*

La extracción selectiva de DNA plasmídico se basa en la diferencia de solubilidad debido a la desnaturalización del DNA de alto peso molecular a pH básico (12.0-12.5) pero no del DNA plasmídico (Birnboim & Doly 1979). 1 mL de cultivo saturado se centrifugó a 13 Krpm/ 1 min, eliminando el sobrenadante por decantación. Las células se deshidrataron parcialmente en 1 mL de solución SET fría (sacarosa 20 %, Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.05 M, pH 8.0) y se centrifugó. El pellet se resuspendió en 150  $\mu$ L de SET y 5  $\mu$ L de ARNasa, la muestra se colocó en hielo 10 min. Posteriormente se neutralizó con 250  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M, pH 4.8 incubando 15 min en hielo. Se centrifugó a 13 Krpm/ 5 min recuperando el sobrenadante. Se precipitó el DNA plasmídico adicionando 650  $\mu$ L de isopropanol al sobrenadante y tras centrifugar se descartó el sobrenadante que contiene proteínas de bajo peso molecular y RNA. El pellet se lavó con 1 mL de etanol al 70 % y luego de centrifugar se descartó el sobrenadante. La pastilla se secó en vacío y resuspendió en 50  $\mu$ L de agua destilada.

### *Preparación de células electrocompetentes*

Las cepas a ser electrotransformadas se prepararon siguiendo la metodología de crecimiento en medio libre de sales (Sharma & Schimke 1996). 250  $\mu$ L de un cultivo saturado en YENB se adicionaron a 50 mL de YENB fresco. La muestra se incubó a 37 °C hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> = 0.5 - 0.9, tras lo cual se cosechó en hielo 15 min. En lo subsiguiente todas las soluciones, equipos y muestras se manejaron en frío. El cultivo se centrifugó a 8 Krpm/ 5 min/ 4 °C y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron con 5 mL de agua y se centrifugó, repitiendo el lavado dos veces. Al pellet se le adicionaron 2 mL de glicerol al 10%, se centrifugó y eliminó el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 250  $\mu$ L de glicerol al 10% para finalmente alicuotar y almacenar a -70 °C hasta su uso.

## Obtención de la enzima Shikimato deshidrogenasa de *E. coli* (EcSDH)

La enzima EcSDH se purificó a partir de la inserción del gen silvestre en el vector de clonación pCR-Blunt II-TOPO para subclonar en el plásmido de expresión pCold-I. La construcción pColdaroE codifica para la proteína EcSDH con una cola de 6 Histidinas (EcSDH-<sup>6</sup>His) en el extremo N-terminal la cual puede ser escindida por la proteasa Factor Xa. El vector pColdaroE se electrotransformó en una cepa de *E. coli* carente del gen *aroE* y la cepa se nombró *aroE*-pColdaroE.

Una vez expresada la proteína, se obtuvo el extracto celular y la enzima se purificó por cromatografía de afinidad a Níquel. Posteriormente se escindió la cola de Histidinas y la enzima digerida se purificó por cromatografía de afinidad a níquel. Se realizó un último paso de purificación por cromatografía de exclusión molecular previo al almacenamiento de la proteína.

## Construcción del plásmido pColdaroE

### Clonación del gen *aroE* silvestre en el vector pCR-Blunt-II-TOPO

Se extrajo DNA cromosomal de la cepa de *E. coli* JM101 y se amplificó el gen silvestre *aroE* empleando la enzima KAPA HiFi (Kapa Biosystems), los oligos *aroE* Fw y *aroE* Rv bajo las siguientes condiciones:

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	5 min
30	98	20 s
	64.4	15 s
	72	30 s
1	72	5 min

Se comprobó el tamaño del amplicón y se purificó la banda desde gel de agarosa. Para la clonación se empleó el sistema Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit (Invitrogen) mezclando 1 µL del producto de PCR purificado, 0.5 µL de solución salina 1.2 M, 1 µL de agua MQ y 0.5 µL del plásmido pCR-Blunt II-TOPO. La mezcla se incubó 20 min a temperatura ambiente, se detuvo la reacción en hielo y posteriormente se adicionaron 9 µL de agua MQ. 1 µL de la mezcla diluida se electrotransformó en células DH5α y la muestra recuperada se plaqueó en cajas LB Km incubando a 37 °C/ 12 h. A partir de colonias aisladas se inoculó medio líquido LB Km para extraer DNA plasmídico y realizar el screening. Se seleccionaron las clonas con el inserto del gen *aroE* en función de su perfil de restricción con la enzima BamHI y el vector se denominó pTOPOaroE.

### Subclonación del gen *aroE* en el vector de expresión pCold-I

Una vez obtenido el vector pTOPOaroE, se realizó la doble digestión con las enzimas de restricción BamHI y NdeI en buffer Tango 2X. El DNA plasmídico se digirió simultáneamente con las endonucleasas a 37 °C / 1 h y se procedió a la purificación desde gel de agarosa. El plásmido pCold-I se propagó en células DH5α y se extrajo por miniprep para digerir y purificar como se describió para el vector pTOPOaroE. El vector digerido se desfosforiló con fosfatasa alcalina (SAP) incubando a 37 °C / 30 min. Se inactivó la fosfatasa a 65 °C / 15 min y se retiró la proteína purificando con kit.

Para la ligación se partieron de 100 ng del vector digerido, siguiendo una relación 1:3 vector a inserto. La mezcla se colocó en hielo durante 12 h en presencia de la ligasa T4 tras lo cual se inactivó a 80 °C / 10 min. La ligación sin purificar se electrotransformó en células DH5α que se plaquearon en cajas de LB Amp incubando a 37 °C / 12 hrs. Desde colonias aisladas se purificó plásmido para realizar la selección de clonas en base al perfil de digestión con BamHI y tamaño de productos de PCR.

Para la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos de hibridación al vector pCold-I Fw y pCold-I Rv amplificando con la enzima Taq DNA polimerasa bajo las condiciones enlistadas debajo. Los mismos oligonucleótidos pCold-I Fw y pCold-I Rv se emplearon en la identificación y posterior secuenciación de insertos analizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La construcción se nombró pColdaroE y se mantuvo en células DH5α.

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	5 min
30	95	1 min
	58	1 min
	72	1 min 15 s
1	72	5 min

## Expresión y purificación de la enzima EcSDH

### Expresión de la proteína y obtención del extracto crudo

La cepa de *E.coli aroE*<sup>-</sup> se electrotransformó con el plásmido pColdaroE seleccionando transformantes en cajas de LB Amp Km. Se extrajo DNA plasmídico desde colonias aisladas y se comprobó el tamaño del vector por digestión con la enzima BamHI. La cepa se nombró aroE<sup>-</sup> pColdaroE. Partiendo de un cultivo saturado de la cepa aroE<sup>-</sup> pColdaroE en LB Amp Km, se inocularon 50 mL de medio fresco y la muestra se incubó a 37 °C / 300 rpm hasta una DO<sub>F</sub>= 3.5. El cultivo celular se utilizó para inocular 1 L de medio LB con antibióticos (DO<sub>I</sub>= 0.05) incubando a 37 °C / 200 rpm. Alcanzada una DO= 0.4, la muestra se incubó en hielo 30 min y se llevó a cabo la inducción con IPTG (concentración final 0.5 mM), tras lo cual se expresó la proteína a 14 °C / 200 rpm / 17 h. La muestra se centrifugó a 4 °C / 8000 rpm / 10 min y la pastilla celular se lavó con 20 mL de solución TBS 1X (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) centrifugando nuevamente. El pellet se resuspendió en 50 mL de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8.0) suplementado con lisozima (1mg/ mL) y se agitó en hielo 30 min. Se adicionó el inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a una concentración final de 1 mM y se procedió a la lisis celular por sonicación. Se empleó el equipo Ultrasonic Processor (Cole Parmer) en un esquema de seis ciclos de 20 s y 40 % de amplitud. El lisado celular se centrifugó a 4 °C / 13000 rpm / 30 min recuperando la fracción del sobrenadante que corresponde al extracto crudo.

### Cromatografía de afinidad a níquel

La purificación de la proteína EcSDH-<sup>6</sup>His desde el extracto crudo, se realizó empleando una columna de 1 mL HisTrap™ FF (GE Healthcare Life Sciences), se lavó con 10 volúmenes de agua MQ (1 volumen: 1 mL) y posteriormente se equilibró con 10 volúmenes de buffer de lisis. El extracto crudo se cargó a la columna utilizando el cromatógrafo de baja presión BioLogicLP (BioRad) a un flujo de 2 mL / min y se lavó la columna con buffer de lisis. Se eluyó la proteína en buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0 y diferentes concentraciones de Imidazol, retirando interacciones débiles con 15 volúmenes de Imidazol 20 mM. Se inyectaron secuencialmente 3 volúmenes de las soluciones 35, 75, 100, 150, 200 y 250 mM de Imidazol. Las fracciones eluidas se analizaron por electroforesis SDS-PAGE con tinción de Coomassie. Las muestras de EcSDH-<sup>6</sup>His recolectadas se almacenaron a 4°C.

### Escisión de la cola de Histidinas

Las muestras se concentraron y se hizo el cambio de buffer al de la proteasa Factor Xa (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 8.0) empleando filtros para centrifugación Amicon (Millipore Corporation) con peso molecular de corte de 10 kDa. Se aplicaron rondas de centrifugación a 4 °C / 4500 rpm / 15 min agregando 4.5 mL del buffer Factor Xa hasta completar 10 centrifugaciones. La subsecuente escisión de la cola de Histidinas con la proteasa Factor Xa (NEB BioLabs) se realizó a una concentración de 0.002 mg proteasa/ mL de muestra, incubando a 16 °C / 300 rpm / 48 h. Las reacciones se analizaron por SDS-PAGE para corroborar la digestión. Las muestras se concentraron y se cambió el buffer al del Factor Xa sin calcio (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0) con filtros Amicon de 30 kDa.

### Purificación de la proteína escindida y cromatografía de exclusión molecular

Se purificó la enzima EcSDH digerida de aquella en la que no se escindió la cola de Histidinas, mediante cromatografía de afinidad a Níquel. La muestra se eluyó con el buffer Factor Xa sin calcio a un flujo de 1 mL / min colectando el eluyente. La proteína purificada se concentró con filtros Amicon de 10 kDa en rondas de centrifugación a 4 °C / 4500 rpm / 15 min. Finalmente se realizó un paso de cromatografía de exclusión molecular empleando la columna 120 mL HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (GE Healthcare) acoplada al sistema Äkta-Pure (GE Healthcare). La muestra se eluyó con el buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5 a un flujo de 1 mL / min. Las fracciones del pico principal se dializaron en membranas de celulosa de 10 kDa (Sigma Aldrich) contra el buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, DTT 0.4 mM, EDTA 0.1 mM, glicerol 50 %, pH 7.5 previo almacenamiento a -70 °C.

### Caracterización del método de purificación

Se cuantificó proteína total (Bradford 1976) empleando Albúmina Sérica Bovina (NEB BioLabs) y el reactivo Quick Start Bradford protein assay (BioRad). Se determinó la actividad de SDH en la mezcla de reacción Tris-HCl 100 mM, NaCl 50 mM, SA 4 mM, NADP 2 mM, pH 9.0. A 495  $\mu\text{L}$  de la mezcla se le adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de muestra proveniente de los diferentes pasos de purificación y se monitoreó la reacción espectrofotométricamente a 340 nm durante 120 s y 25 °C. En los cálculos de actividad se utilizó el valor de coeficiente de extinción molar  $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6.18 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Una unidad de actividad catalítica (U) corresponde a la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato en 1 minuto de reacción ( ).

*Ecuación 1 Cálculo de la actividad catalítica (U)*

$$U = \left[ \frac{\frac{\Delta A}{\text{min}}}{(\epsilon_{\text{NADPH}})(1 \text{ cm})} \right] (\text{vol. de reacción en L})(1 \times 10^6)$$

## Síntesis química de compuestos derivados del shikimato

### Selección de compuestos basada en cribado virtual

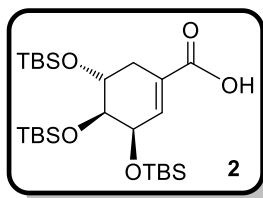
En los estudios de cribado virtual para la identificación de posibles moléculas a sintetizar, se empleó la estructura del cristal de la enzima EcSDH (PDB ID: 1NYT). La concordancia de la estructura se analizó con el Software WinCoot 0.7.2.1 (Emsley et al. 2010), trabajando con la cadena A del cristal. Se eliminaron moléculas de agua, sulfatos y DTV desde el archivo pdb. La proteína se modeló a pH 7.4 y se adicionaron átomos de hidrógeno utilizando la herramienta Protein Preparation Wizard del Software Schrödinger, suite 2014-3 (Schrödinger 2014). Se procedió a la minimización energética de la estructura empleando el servidor YASARA (Krieger & Vriend 2002). Las moléculas a utilizar como ligando se dibujaron en MarvinSketch (ChemAxon 2014), utilizando el módulo de cálculo de confórmeros para optimizar la geometría con el campo de fuerza MMFF9 (Halgren 1996). La predicción de solubilidad se realizó con el programa Molsoft (Molsoft 2015). Para modelar los acoplamiento moleculares y calcular su energía de unión, se utilizaron los servidores en línea SwissDock (A Grosdidier et al. 2011), Blind Docking Web Server (Sanchez-Linares et al. 2012) y Molecular Docking Server (Bikadi & Hazai 2009). Para SwissDock (<http://www.swissdock.ch/>) la predicción se realizó manteniendo los parámetros: 1) tipo de acoplamiento exacto y 2) permitir flexibilidad de cadenas laterales que se encuentren hasta 5 Å del ligando. Blind Docking Web Server (<http://bio-hpc.ucam.edu/achilles/>) se utilizó con los parámetros base y en Molecular Docking Server (<https://www.dockingserver.com/web>) se definieron 100 corridas por análisis, optimizando la geometría con el campo MMFF94 y las cargas con PM6 a pH 7.4. Se definió toda la proteína como región de interacción. Los modos de unión se visualizaron en PyMol (Schrödinger 2015).

### Información general

Todos los reactivos comerciales empleados son como mínimo de grado reactivo y se utilizaron sin purificar. El curso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina, empleando láminas recubiertas de gel de sílice (60 F<sub>254</sub>, Merck), visualizando con luz ultravioleta y soluciones de KMnO<sub>4</sub> o vainillina que posteriormente se calentaron para revelar. Los compuestos se purificaron por cromatografía en columna tipo Flash, siguiendo la técnica descrita por Still (Clark et al. 1978) utilizando sílica Flash 60® (230-400 mm, Merck). Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer-Johns y no están corregidos. Los espectros de RMN se obtuvieron con un equipo Varian MERCURY 200 a 200 MHz para <sup>13</sup>C y 400 MHz para <sup>1</sup>H, calibrando con los estándares internos de tetrametilsilano (TMS) y señal de solvente residual. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) están dadas en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales se indicaron con las siguientes abreviaturas: **s** para señal simple, **d** doble, **t** triple, **c** cuádruple, **q** quintuple, **m** múltiple,

empleando en ocasiones combinaciones de ellas. Los disolventes deuterados empleados fueron:  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{MeOH-D}_4$  y  $\text{D}_2\text{O}$ . Los análisis de masas de alta resolución (HRMS) se llevaron a cabo en un equipo de JEOL HRM Station JHRMS-700. Los espectros de Infra Rojo por Transformada de Fourier (IR-FT) se colectaron en el espectrofotómetro NICOLET 6700. Las rotaciones ópticas se determinaron empleando un Polarímetro Perkin Elmer 341 realizando las mediciones a  $20^\circ\text{C}$  y  $589\text{ nm}$ .

#### Preparación del Ácido (3R,4S,5R)-3,4,5-tri[(tert-butildimetilsilil)oxi]ciclohex-1-en carboxílico (**2**)



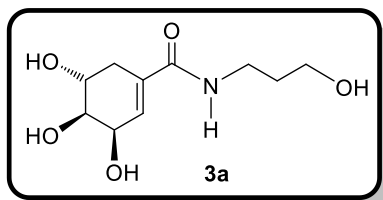
En un matraz redondo de 50 mL provisto de agitación magnética se colocó SA (**1**) (1.0 g, 5.74 mmol) y 4 mL de DMF anhidro, a la mezcla se le agregó imidazol (4.39 g, 64.48 mmol) disuelto en 4 mL de DMF y la mezcla se enfrió a  $0^\circ\text{C}$ . Posteriormente se añadió gota a gota una solución de TBDMSCl (8.65 g, 57.39 mmol) en 4 mL de DMF. La reacción se agitó a  $70^\circ\text{C}$  durante 20 h bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . El crudo de reacción se particionó en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{agua}$  (1:1, 20 mL) y se realizó la extracción líquido-líquido, lavando la fase acuosa con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

(3x, 15 mL). La fase orgánica se secó en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se concentró y se purificó por cromatografía en columna flash, Hexano/AcOEt (92:8) obteniéndose **2** como (2.52 g, 85%), p.f. =  $169\text{-}172^\circ\text{C}$ . IR (neto):  $\tilde{\nu} = 2929, 1690, 1256\text{ cm}^{-1}$ .  $[\alpha]_{\text{D}} = -85.7$  (c 1.0,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.05\text{-}0.08$  (m, 12H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ), 0.11 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ), 0.12 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ), 0.84 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.86 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.94 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 2.17 (dd,  $J = 17.8, 1.0\text{ Hz}$ , 1H, H-6), 2.58 (ddt,  $J = 17.8, 3.0, 3.0\text{ Hz}$ , 1H, H-6'), 3.74-3.78 (m, 1H, H-4), 3.98-4.02 (m, 1H, H-5), 4.62-4.66 (m, 1H, H-3), 6.82-6.85 (m, 1H, H-2) ppm. RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -4.7$  ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ),  $-4.6$  ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ),  $-4.5$  ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ),  $-4.2$  ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ), 18.1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 18.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 18.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 25.9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 29.4 (C-6), 68.4 (C-4), 70.0 (C-3), 72.6 (C-5), 126.7 (C-1), 143.3 (C-2), 172.9 (C=O) ppm. HRMS (FAB $^+$ ): calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{53}\text{O}_5\text{Si}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  517.3201; encontrado  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  517.4024.

#### Procedimiento general para la preparación de las monoamidas **3a-3d**

En un matraz redondo de 25 mL se disolvió **2** (0.25 g, 0.48 mmol) en 6 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco, se adicionó una gota de DMF seco y posteriormente se agregó cloruro de oxalilo (0.05 mL, 0.58 mmol) manteniendo en agitación a temperatura ambiente durante 3 h bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . El crudo de reacción se concentró, posteriormente se adicionaron 6 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco y se concentró nuevamente. El crudo se redisolvió en 6 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco, se adicionó el aminoalcohol correspondiente (4.73 mmol) y tras 5 min se agregó DIPEA (0.16 mL, 0.92 mmol), la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente 3 h bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . A la mezcla de reacción se le adicionaron 20 mL de AcOEt y se lavó con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (3x, 20 mL) posteriormente se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró. Sin purificación adicional, el crudo de reacción se colocó en un baño de hielo, se disolvió en THF seco (3 mL) y posteriormente TBAF (1.0 M en THF, 2.5 mL, 2.5 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla de reacción se pasó por una columna empacada con resina Dowex®50WX8 forma protonada malla 100-200, previamente acondicionada empleando agua como fase móvil. Las fracciones colectadas se concentraron y purificaron por cromatografía en columna con el sistema AcOEt/MeOH (9:1) obteniéndose los compuestos **3a-3d** como aceites transparentes.

#### Preparación de la (3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-N-(3-hidroxipropil)ciclohex-1-en-1-carboxamida (**3a**)

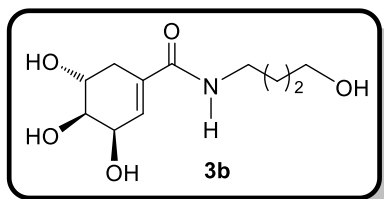


Siguiendo el procedimiento general para síntesis de monoamidas, se empleó 3-amino-1-propanol (0.36 mL, 4.73 mmol) obteniéndose el compuesto **3a** (0.07 g, 63%). IR (neto):  $\tilde{\nu} = 3303, 2931, 1661, 1606, 1061\text{ cm}^{-1}$ .  $[\alpha]_{\text{D}} = -84.9$  (c 1.0,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 1.74$  (quin,  $J = 6.6\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.15 (dd,  $J = 17.8, 6.2\text{ Hz}$ , 1H, H-6), 2.72 (dd,  $J = 17.8, 5.0\text{ Hz}$ , 1H, H-6'), 3.33 (t,  $J = 6.9\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.59 (t,  $J = 6.3\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.64 (dd,  $J = 7.8, 4.2\text{ Hz}$ , 1H, H-4), 3.98 (ddd,  $J =$

7.4, 5.8, 5.8 Hz, 1H, H-5), 4.34 (dd,  $J = 3.9, 3.9\text{ Hz}$ , 1H, H-3), 6.39-6.42 (m, 1H, H-2) ppm. RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 32.3$  (C-6), 33.3 ( $\text{CH}_2$ ), 38.0 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 61.0 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 68.0 (C-4), 68.4 (C-5), 73.2 (C-3), 133.0 (C-2), 134.3 (C-1), 171.0 (C=O) ppm. HRMS (FAB $^+$ ): calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  232.1185; encontrado  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  232.1239.

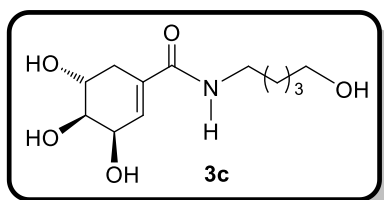


### Preparación de la (3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-N-(4-hidroxibutil)ciclohex-1-en-1-carboxamida (**3b**)



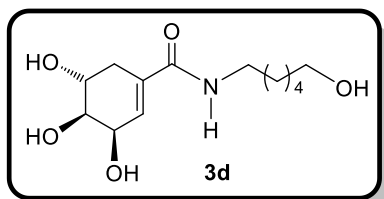
Se siguió el procedimiento general utilizando 4-amino-1-butanol (0.44 mL, 4.73 mmol) obteniéndose **3b** (0.08 g, 69%). **IR** (neto):  $\tilde{\nu}$  = 3321, 2929, 1662, 1607, 1060  $\text{cm}^{-1}$ .  $[\alpha]_D = -87.6$  (c 1.0,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). **RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 1.50-1.64 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.15 (dd,  $J$  = 17.8, 6.2 Hz, 1H, H-6), 2.73 (dd,  $J$  = 17.8, 5.1 Hz, 1H, H-6'), 3.25 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.56 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.63 (dd,  $J$  = 7.8, 4.2 Hz, 1H, H-4), 3.98 (ddd,  $J$  = 7.7, 5.9, 5.9 Hz, 1H, H-5), 4.34 (dd,  $J$  = 4.0, 4.0 Hz, 1H, H-3), 6.38-6.41 (m, 1H, H-2) ppm. **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 27.1 ( $\text{CH}_2$ ), 31.1 (C6), 32.4 ( $\text{CH}_2$ ), 40.6 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 62.7 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 67.5 (C-4), 68.4 (C-5), 73.3 (C-3), 132.6 (C-2), 134.4 (C-1), 170.5 (C=O) ppm. **HRMS** (FAB<sup>+</sup>): calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  246.1341; encontrado  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  246.1334.

### Preparación de la (3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-N-(5-hidroxipentil)ciclohex-1-en-1-carboxamida (**3c**)



Se siguió el procedimiento general descrito utilizando 5-amino-1-pentanol (0.52 mL, 4.73 mmol) obteniéndose **3c** (0.087 g, 70%). **IR** (neto):  $\tilde{\nu}$  = 3343, 2949, 1674, 1015  $\text{cm}^{-1}$ .  $[\alpha]_D = -90.1$  (c 1.0,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). **RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 1.34-1.43 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.51-1.61 (quin,  $J$  = 6.9 Hz, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.15 (dd,  $J$  = 17.7, 6.1 Hz, 1H, H-6), 2.73 (dd,  $J$  = 17.7, 5.0 Hz, 1H, H-6'), 3.24 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.55 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.63 (dd,  $J$  = 7.8, 4.1 Hz, 1H, H-4), 3.98 (ddd,  $J$  = 7.1, 5.8, 5.8 Hz, 1H, H-5), 4.34 (dd,  $J$  = 4.0, 4.0 Hz, 1H, H-3), 6.36-6.43 (m, 1H, H-2) ppm. **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 24.4 ( $\text{CH}_2$ ), 30.4 (C6), 32.3 ( $\text{CH}_2$ ), 33.4 ( $\text{CH}_2$ ), 40.7 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 63.0 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 68.0 (C-4), 68.4 (C-5), 73.2 (C-3), 132.6 (C-2), 134.4 (C-1), 170.5 (C=O) ppm. **HRMS** (FAB<sup>+</sup>): calculado para  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  260.1498; encontrado  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  260.1490.

### Preparación de la (3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-N-(6-hidroxihexil)ciclohex-1-en-1-carboxamida (**3d**)



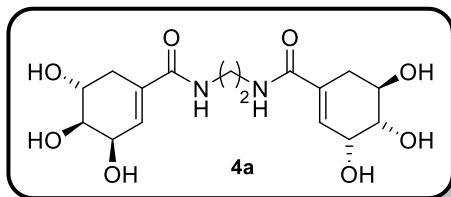
Siguiendo el procedimiento general, se puso a reaccionar 6-amino-1-hexanol (0.60 mL, 4.73 mmol) obteniéndose **3d** (0.078 g, 60%). **IR** (neto):  $\tilde{\nu}$  = 3303, 2931, 1661, 1606, 1061  $\text{cm}^{-1}$ .  $[\alpha]_D = -92.3$  (c 1.0,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). **RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 1.32-1.42 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1.49-1.59 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.15 (dd,  $J$  = 17.8, 6.2 Hz, 1H, H-6), 2.73 (dd,  $J$  = 17.8, 5.1 Hz, 1H, H-6'), 3.23 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.54 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.63 (dd,  $J$  = 7.8, 4.2 Hz, 1H, H-4), 3.95-4.01 (m, 1H, H-5), 4.34 (dd,  $J$  = 4.0, 4.0 Hz, 1H, H-3), 6.37-6.40 (m, 1H, H-2) ppm. **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 27.0 ( $\text{CH}_2$ ), 28.0 ( $\text{CH}_2$ ), 31.0 (C6), 32.3 ( $\text{CH}_2$ ), 34.0 ( $\text{CH}_2$ ), 41.0 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 63.0 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 68.0 (C-4), 68.4 (C-5), 73.2 (C-3), 133.0 (C-2), 134.4 (C-1), 171.0 (C=O) ppm. **HRMS** (FAB<sup>+</sup>): calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  274.1654; encontrado  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  274.1645.

### Procedimiento general para la preparación de las diamidas **4a-4c**

En un matraz redondo se disolvió **2** (0.25 g, 0.48 mmol) en 6 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco, se adicionó una gota de DMF seco y posteriormente se agregó cloruro de oxalilo (0.05 mL, 0.58 mmol) manteniendo en agitación a temperatura ambiente durante 3 h bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . El crudo de reacción se concentró y se adicionaron 6 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco y se concentró nuevamente. Posteriormente se añadieron 1.5 mL de  $\text{Et}_2\text{O}$  y la diamina de interés (2.4 mmol), tras 5 min se agregaron 0.1 mL de una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 12 h bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . A la mezcla de reacción se le adicionaron 20 mL de  $\text{AcOEt}$  y se lavó la fase orgánica con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (3x, 20 mL) posteriormente se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró. La desprotección del compuesto se llevó a cabo sin purificación. El crudo de reacción se colocó en hielo, se adicionó THF seco (3 mL) y posteriormente TBAF (1.0 M en THF, 3.8 mL, 3.8 mmol), agitando a temperatura ambiente por 12 h. La mezcla de reacción se pasó por una columna empacada con resina Dowex®50WX8 forma protonada malla 100-200 previamente acondicionada, empleando agua como fase móvil. Las fracciones colectadas se concentraron y se purificaron por HPLC empleando una columna Synergy Hydro C18 4  $\mu\text{m}$  (4.6 x 150 mm, Phenomenex) y fase móvil MeOH/ Agua (TFA 0.1%) 97:3 a un flujo de 0.5 mL/min.

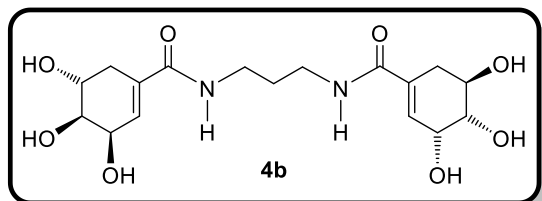
Se utilizó un detector de arreglo de diodos a 280 nm, los picos cromatográfico se recolectaron y concentraron obteniéndose los compuestos **4a-4c** como aceites levemente amarillos.

*Preparación de (3R,3'R,4S,4'S,5R,5'R)-N,N',(etan-1,2-diil)bis(3,4,5-trihidroxiciclohex-1-en-1-carboxamida) (4a)*



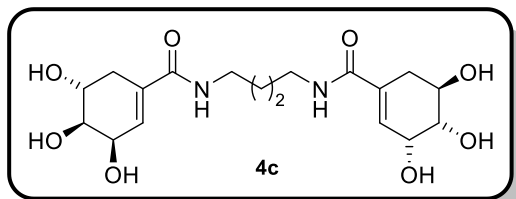
Con base en el procedimiento general para la preparación de diamidas, se utilizó etilendiamina (0.16 mL, 2.4 mmol) en la síntesis del compuesto **4a** (0.034 g, 38%). **IR** (neto):  $\tilde{\nu}$  = 3286, 2916, 1662, 1608, 1541, 1061  $\text{cm}^{-1}$ .  $[\alpha]_D = -115.3$  (c 1.0,  $\text{H}_2\text{O}$ ). **RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 2.21 (dd,  $J$  = 17.7, 7.1 Hz, 2H, H-6), 2.73 (dd,  $J$  = 17.7, 5.3 Hz, 2H, H-6'), 3.44 (s, 4H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.74 (dd,  $J$  = 8.7, 4.3 Hz, 2H, H-4), 3.99-4.06 (m, 2H, H-5), 4.42 (dd,  $J$  = 4.2, 4.2 Hz, 2H, H-3), 6.36-6.40 (m, 2H, H-2) ppm. **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 31.0 (C6), 39.0 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 66.0 (C-4), 66.2 (C-5), 71.2 (C-3), 131.0 (C-2), 133.0 (C-1), 170.3 (C=O) ppm. **HRMS** (FAB<sup>+</sup>): calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  373.1611; encontrado  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  373.1579.

*Preparación de (3R,3'R,4S,4'S,5R,5'R)-N,N',(propan-1,3-diil)bis(3,4,5-trihidroxiciclohex-1-en-1-carboxamida) (4b)*



Si siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de diaminas, utilizando 1,3-diaminopropano (0.2 mL, 2.4 mmol) se obtuvo **4b** (0.041 g, 44%). **IR** (neto):  $\tilde{\nu}$  = 3297, 2921, 1662, 1609, 1541, 1063  $\text{cm}^{-1}$ .  $[\alpha]_D = -99.7$  (c 1.0,  $\text{H}_2\text{O}$ ). **RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 1.78 (quin,  $J$  = 6.7 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.22 (dddd,  $J$  = 17.6, 7.1, 2.1, 1.4 Hz, 2H, H-6), 2.74 (dd,  $J$  = 17.6, 5.4 Hz, 2H, H-6'), 3.30 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 4H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.74 (dd,  $J$  = 8.7, 4.3 Hz, 2H, H-4), 3.99-4.05 (m, 2H, H-5), 4.42 (dd,  $J$  = 4.3, 4.3 Hz, 2H, H-3), 6.39-6.42 (m, 2H, H-2) ppm. **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 28.0 ( $\text{CH}_2$ ), 31.0 (C6), 37.0 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 66.0 (C-4), 66.3 (C-5), 71.4 (C-3), 131.0 (C-2), 133.1 (C-1), 170.1 (C=O) ppm. **HRMS** (FAB<sup>+</sup>): calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  387.1767; encontrado  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  387.1771.

*Preparación de (3R,3'R,4S,4'S,5R,5'R)-N,N',(butan-1,4-diil)bis(3,4,5-trihidroxiciclohex-1-en-1-carboxamida) (4c)*



Se siguió el procedimiento general para la preparación de diaminas empleando 1,4-diaminobutano (0.24 mL, 2.4 mmol) obteniéndose **4c** (0.039 g, 41%). **IR** (neto):  $\tilde{\nu}$  = 3289, 2922, 1661, 1608, 1541, 1062  $\text{cm}^{-1}$ .  $[\alpha]_D = -98.9$  (c 1.0,  $\text{H}_2\text{O}$ ). **RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 1.51-1.60 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.22 (dd,  $J$  = 17.6, 7.0 Hz, 2H, H-6), 2.74 (dd,  $J$  = 17.6, 5.2 Hz, 2H, H-6'), 3.24-3.30 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.74 (dd,  $J$  = 8.7, 4.3 Hz, 2H, H-4), 3.99-4.07 (m, 2H, H-5), 4.42 (dd,  $J$  = 4.1, 4.1 Hz, 2H, H-3), 6.38-6.42 (m, 2H, H-2) ppm. **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 24.3 ( $\text{CH}_2$ ), 30.0 (C6), 38.0 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 64.4 (C-4), 65.0 (C-5), 70.1 (C-3), 129.3 (C-2), 132.0 (C-1), 169.0 (C=O) ppm. **HRMS** (FAB<sup>+</sup>): calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  401.1924; encontrado  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  401.1902.

## Ensayos de Inhibición enzimática

La actividad enzimática de EcSDH se determinó a 25 °C siguiendo la reacción a 340 nm. La enzima purificada y almacenada a -70 °C (200 U/mL) se diluyó 1:100 en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM, pH 7.5 previo a su uso. La reacción se inició adicionando 2  $\mu\text{L}$  de enzima EcSDH diluida a 180  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción y se monitoreó durante los primeros 2 min. En los ensayos de inhibición se empleó como anfolito  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM, pH 7.5; la concentración de NADPH se fijó a 0.21 mM, las concentraciones del sustrato DHS se variaron entre 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM y los compuestos sintetizados se emplearon en 0, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM. Los experimentos se realizaron por triplicado. Para determinar el tipo de inhibición se construyeron gráficos de Lineweaver-Burk. Los parámetros cinéticos velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ )

constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y constantes de inhibición ( $K_i$  y  $K_i$ ) se calcularon siguiendo un modelo de inhibición mixta empleando la Ecuación 2 (Alimoradi et al. 2017; Segel 1993).

#### Ecuación 2 Modelo de Inhibición Mixta

$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Donde  $I$  representa la concentración del inhibidor,  $K_i$  es la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor y  $K_i$  la constante de disociación del complejo enzima-sustrato-inhibidor. Los datos se procesaron por regresión no lineal (OriginLab). Las constantes de disociación se relacionaron al valor  $IC_{50}$  utilizando la Ecuación 3 (Cheng & Prusoff 1973). Donde  $IC_{50}$  representa la concentración de inhibidor que produce 50% de inhibición enzimática. Se delimitó  $[DHS] = 125 \mu M$  ( $K_{m, DHS} = 92.29 \pm 2.70 \mu M$ ).

#### Ecuación 3 Determinación del $IC_{50}$

$$IC_{50} = \frac{K_m + [S]}{\left(\frac{K_m}{K_i}\right) + \left(\frac{[S]}{K_i}\right)}$$

## Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC)

Con el objetivo de determinar la posible actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados sobre el crecimiento de la cepa de *E. coli* JM101 se llevó a cabo la determinación de la MIC por el método de microdilución (Andrews 2001). Bajo condiciones de esterilidad, se prepararon soluciones stock a 10.24 mg/mL de las monoamidas **3a-3d** y diamidas **4a-4c** en agua desionizada estéril. Con las anteriores se hicieron diluciones seriales para obtener un gradiente de concentración a 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 mg/L en medio LB o medio M9 con y sin DMSO 1.6 % (v/v). Desde un cultivo saturado de la cepa *E. coli* JM101 en medio LB, se inocularon 50 mL de medio fresco ( $DO_i = 0.05$ ) incubando a 37 °C / 300 rpm / 2 h ( $DO_F = 0.50$ ). Se tomaron 50  $\mu L$  de la muestra y se diluyeron hasta 100 mL con medio LB para obtener aproximadamente  $2 \times 10^5$  CFU/mL. La cuenta bacteriana se comprobó plaqueando 100  $\mu L$  de diluciones 1:100 y 1:1000 en cajas de LB. El mismo procedimiento se realizó empleando el medio M9. A placas de 96 pozos se agregaron 75  $\mu L$  de las diluciones de amidas y un volumen igual de inóculo a  $2 \times 10^5$  CFU/mL resultando en un gradiente final de 4-512 mg/L de compuestos sintetizados y  $1 \times 10^5$  CFU/mL en medio con 0.8 % (v/v) de DMSO. Se incluyeron como controles un pozo sin inóculo, uno sin amidas y uno con Km. Las placas se incubaron a 37 °C / 100 rpm / 16 h y la lectura ( $DO_F$ ) del inóculo sin amidas se consideró el 100% de crecimiento bacteriano. El valor MIC es la concentración mínima de compuesto en la cual no se presenta crecimiento bacteriano. Los experimentos se realizaron por duplicado.

## Estudios de acople molecular

Las estructuras de los compuestos sintetizados y la cadena A del cristal 1NYT se prepararon como se describió en los estudios de cribado virtual. Se realizó un primer acople entre la proteína minimizada y el cofactor NADPH comparando el modo de unión predichos contra el reportado en la literatura (Michel et al. 2003). El complejo proteína-cofactor se utilizó como templado para la predicción de los modos de unión de amidas sintetizadas en estudios de acople multiligando, mediante el servidor Molecular Docking (<https://www.dockingserver.com/web>). Una caja alrededor del sitio catalítico se delimitó como la zona de simulación y se realizaron 255 corridas. Se analizó la población de confórmeros mediante el software Spartan'16 (Wavefunction, Inc.), calculando la distribución de confórmeros empleando el campo de fuerza MMFF. Los confórmeros con energías relativas mayores a 10 kJ/mol se eliminaron y la población se recalculó analizando la geometría en equilibrio con el modelo de funcionales de la densidad  $\omega B97X-D/6-31G^*$ .

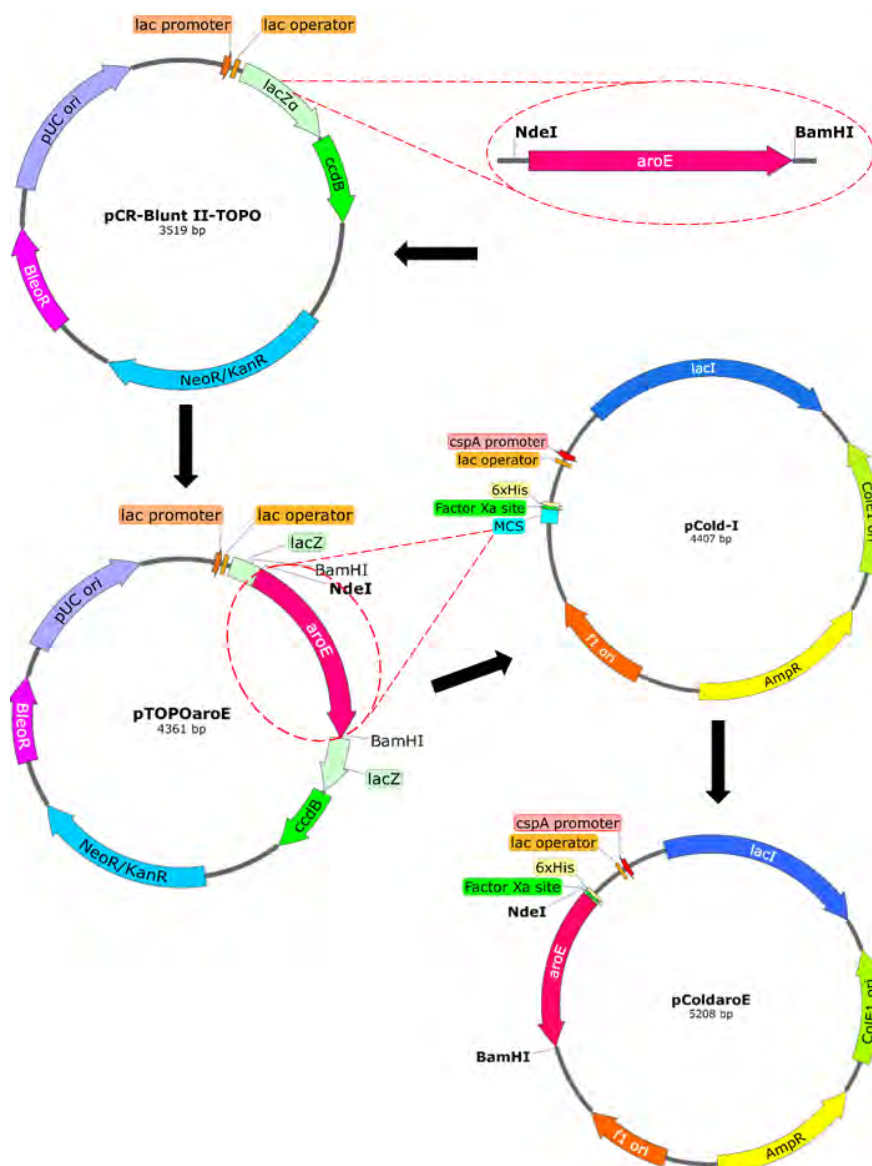
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Expresión y purificación de la enzima EcSDH

#### 1.6.2 Sistema de expresión de la enzima EcSDH

El gen *aroE* silvestre de *E. coli* se clonó en el vector PCR-Blunt II-TOPO obteniendo al plásmido pTOPO*aroE*. La clonación en PCR-Blunt II-TOPO se realizó previniendo la utilización de diferentes plásmidos de expresión. Partiendo del plásmido pTOPO*aroE* se escindió el inserto por digestión con las enzimas de restricción BamHI y NdeI y se subclonó el gen en el vector de expresión pCold-I, para obtener la construcción pCold*aroE* (Figura 11). El plásmido pCold*aroE* codifica para la proteína EcSDH con una cola de 6 Histidinas (EcSDH-<sup>6</sup>His) en el extremo N-terminal, la cual puede ser escindida por la proteasa Factor Xa.

Figura 11 Diagrama metodológico para la construcción del vector pCold*aroE*.



Se indican con flechas los pasos seguidos en la construcción del vector pCold*aroE*, las líneas punteadas muestran los sitios de clonación y subclonación del gen *aroE*.

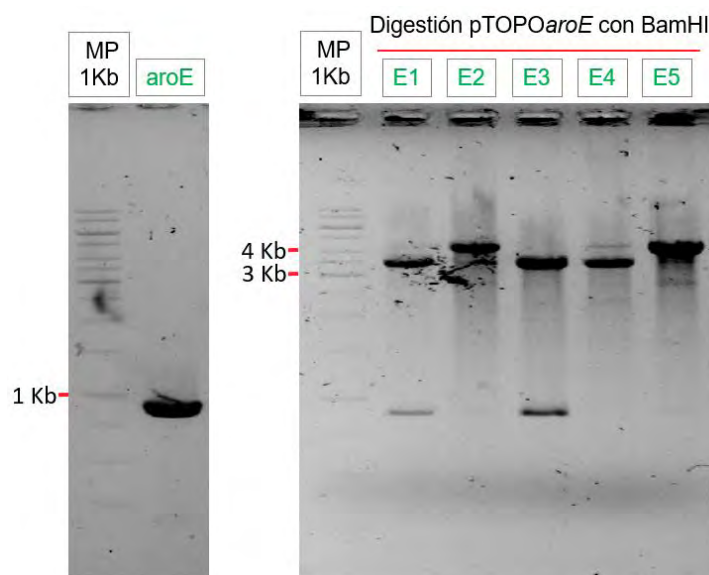
El vector pCold-I es un derivado del plásmido pUC118 con origen de replicación ColE1, casete de resistencia a ampicilina y gen del represor LacI. El inserto se encuentra bajo control del promotor *cspA* de *E. coli*. El gen *cspA* codifica para la proteína A de respuesta a choque por frío. Ríto abajo del promotor se localiza el operador *lac* que debido a la expresión constitutiva del represor LacI impide la expresión del inserto a menos que se induzca la respuesta por choque frío y también se adicione IPTG. Seguido del operador se encuentra la secuencia 5'-UTR de *cspA* y un elemento potenciador de la traducción (Etchegaray & Inouye 1999). Finalmente, una cola de 6 Histidinas y un sitio de reconocimiento a la proteasa Factor Xa se localizan previos al sitio de clonación múltiple (MCS).

Los sistemas de expresión empleados para la purificación de la enzima EcSDH incluyen al vector pTB361 en que la expresión se encuentra bajo control del promotor T7 (Maclean et al. 2000), el plásmido pGEX-4T-I que codifica una cola de Glutación S transferasa (Jancauskas 2006) y el vector pT4 en que se expresa una cola de Histidinas (García-Guevara et al. 2017). Se ha reportado la mejora en la estabilidad y solubilidad de enzimas cuando éstas se sobreexpresan a bajas temperaturas (Shirano & Shibata 1990), en este sentido, la utilización del vector pCold-I ha mostrado ser más eficiente para la expresión de una variedad de proteínas comparado con el vector pET14 que contiene al promotor T7 (Qing et al. 2004).

### 1.6.2.1 Construcción del vector pColdaroE

El gen *aroE* fue amplificado por PCR utilizando los oligos *aroE* Fw y *aroE* Rv, que contienen sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción NdeI y BamHI respectivamente. El amplicón obtenido mostró un tamaño inferior a 1 kb en concordancia con el tamaño esperado de 845 pb (Figura 12 Derecha). Tras la clonación en el vector pCR-Blunt II-TOPO se seleccionaron 5 colonias para comprobar la inserción mediante digestión con la enzima BamHI. De las clonas analizadas 2 fueron positivas y el resto corresponden al tamaño del plásmido vacío (Figura 12 Izquierda), lo que contrasta con la presencia del gen letal *ccdB* en el vector. Se seleccionó la clona E2 y el plásmido fue nombrado pTOPOaroE.

Figura 12 Construcción del plásmido pTOPOaroE.

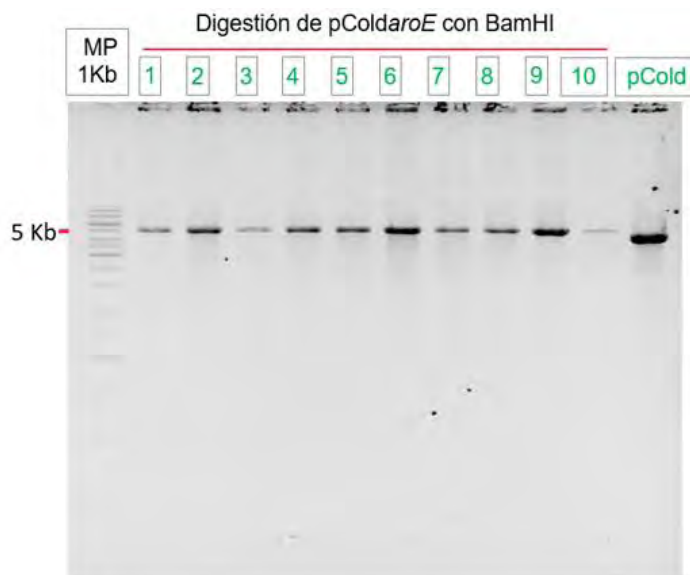


Electroforesis en gel de agarosa. Izquierda: amplificación del gen *aroE* (845 pb). Derecha: Comprobación de clonación en pCR-Blunt II-TOPO por digestión con BamHI (plásmido vacío: 3519 pb, con inserto: 4364 pb).

A partir del plásmido pTOPOaroE se subclonó el inserto en el vector de expresión pCold-I, escindiendo el gen *aroE* con las enzimas de restricción BamHI y NdeI. Las clonas analizadas mostraron una banda en 5 kb similar al tamaño esperado para la ligación (5214 pb) (Figura 13). Se secuenciaron los insertos de 3 clonas al azar y en todos los casos se identificó 100 % de identidad en secuencia con

el gen *aroE*. El plásmido construido fue nombrado pColdaroE y se electrotransformó en una cepa de *E. coli* carente del gen *aroE* (*E. coli* K12,  $\Delta$ *aroE*::Kan<sup>R</sup> (Baba et al. 2006)), obteniendo la cepa *aroE*<sup>-</sup> pColdaroE. Reportes en la literatura muestran que la expresión en plásmido del gen *aroE* utilizando la cepa de *E. coli* K12  $\Delta$ *aroE*, produce mayor cantidad de enzima EcSDH comparada con la expresión en *E. coli* K12 nativa (Anton & Coggins 1988; Maclean et al. 2000).

Figura 13 Subclonación del gen *aroE* en el plásmido pCold-I.



Electroforesis en gel de agarosa. Comprobación de subclonación por digestión con BamHI (plásmido vacío: 4407 pb, con inserto: 5214 pb).

### 1.6.3 Purificación de la enzima EcSDH

La proteína EcSDH-<sup>6</sup>His se expresó desde la cepa *aroE*<sup>-</sup> pColdaroE y se procedió a su purificación. El primer paso de purificación consistió en una cromatografía de afinidad a Níquel y posteriormente se realizó la proteólisis con la enzima Factor Xa. La proteína EcSDH sin cola de Histidinas se recuperó en una segunda cromatografía de afinidad a Níquel y las fracciones escindidas se purificaron por cromatografía de exclusión molecular para su almacenamiento.

Inicialmente se intentó la purificación de EcSDH-<sup>6</sup>His por cromatografía de afinidad a Níquel empleando buffer de fosfatos como se ha reportado en la literatura (García-Guevara et al. 2017). El paso siguiente consistió en escindir la cola de Histidinas con la proteasa Factor Xa que requiere de calcio para su actividad (Waugh 2011), esto llevó a la formación de la sal insoluble fosfato de calcio. Se decidió utilizar buffer de Tris-HCl en la purificación por cromatografía de afinidad y las fracciones del gradiente de Imidazol se analizaron por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) con tinción de Coomassie (Figura 14). En el rango de 20 a 250 mM de Imidazol (enriquecido al usar 75 mM) se observó una banda mayoritaria entre 25 y 35 kDa en concordancia con el peso esperado para la enzima EcSDH-<sup>6</sup>His (31.5 kDa). Tras la cromatografía de afinidad a Níquel no se obtuvo una muestra completamente pura, ya que se observaron bandas de poca intensidad con pesos moleculares inferiores y mayores al de EcSDH-<sup>6</sup>His. La unión inespecífica de proteínas al usar columnas de Níquel se ha atribuido a la presencia de proteínas con residuos adyacentes de Histidinas o al establecimiento de interacciones hidrofóbicas inespecíficas entre proteínas contaminantes y la matriz de purificación (Bornhorst & Falke 2000).

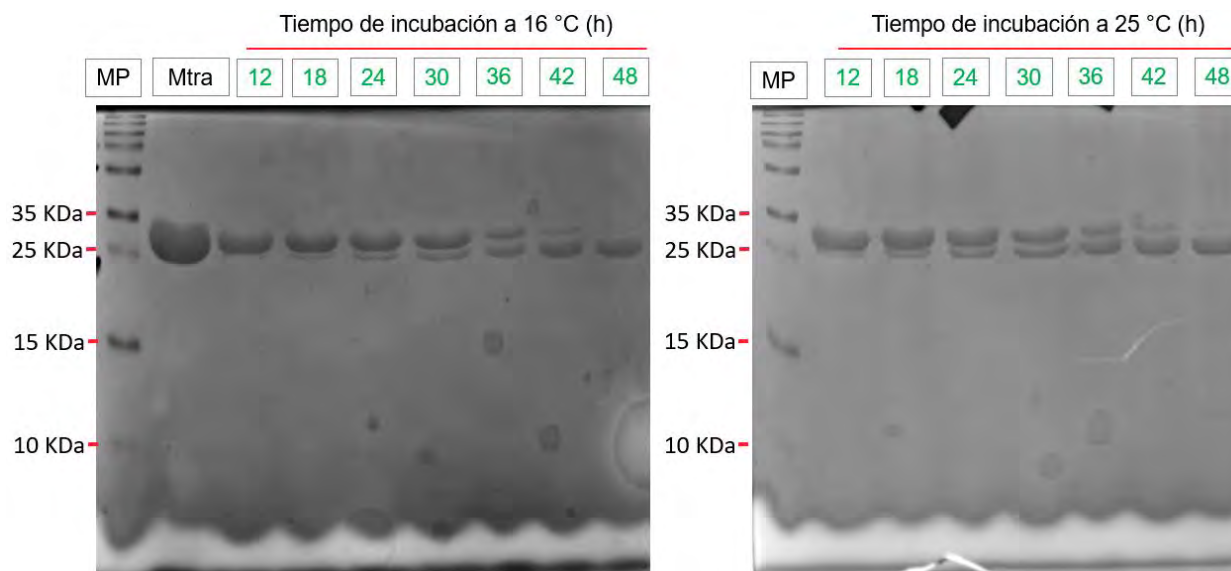
Figura 14 Purificación de la enzima EcSDH-6His desde cromatografía de afinidad a níquel.



Perfil de elución de la cromatografía de afinidad analizado por SDS-PAGE. MP: marcador de peso 10-250 kDa, E. crudo: extracto crudo. Con números se indica la concentración (mM) de Imidazol. Peso EcSDH-<sup>6</sup>His: 31.5 kDa.

Se escindió la cola de Histidinas de la proteína EcSDH-<sup>6</sup>His empleando la proteasa Factor Xa. Al emplear la proteasa Factor Xa se sugiere un rango de uso entre 4-37 °C, sin embargo estudios del efecto de la temperatura en la actividad de la enzima mostraron que el aumento entre 4-22 °C está asociado al corte inespecífico por la proteasa (Dian et al. 2002). Considerando lo anterior, exploramos dos temperaturas de proteólisis siguiendo la reacción durante 48 h a 16 °C y 300 rpm o 25 °C sin agitación (Figura 15).

Figura 15 Escisión de la cola de Histidinas con la proteasa Factor Xa.



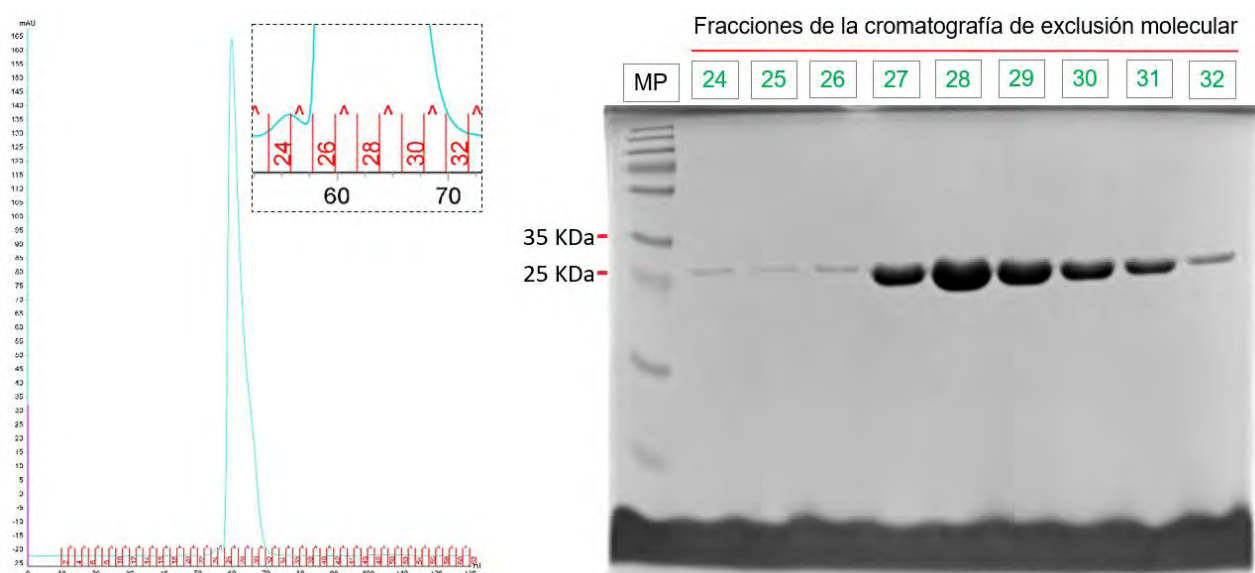
Perfiles de digestión analizados por SDS-PAGE. Izquierda: 16 °C y 300 rpm. Derecha= 25 °C sin agitación. MP: marcador de peso 10-250 kDa, Mtra: fracción tras purificación por cromatografía de afinidad (tiempo 0). Se indica con números el tiempo de incubación (h). Peso de EcSDH-<sup>6</sup>His: 31.5 kDa y EcSDH: = 29.7 kDa.

La evaluación por SDS-PAGE mostró la aparición paulatina de una banda con menor peso molecular y la desaparición de la señal original ambas en el rango de 25-35 kDa (EcSDH-<sup>6</sup>His pesa 31.5 kDa y tras el corte 29.7 kDa). No se percibió un cambio importante entre incubar a 16 °C o 25 °C debido posiblemente a la falta de agitación en el experimento a 25 °C. Bajo las dos temperaturas analizadas, tras 48 h de reacción aún había proteína con cola de Histidinas, pero se decidió terminar los experimentos ya que se comenzaron a observar bandas con pesos menores a 15 kDa, indicativo de escisión inespecífica. Se ha reportado que haciendo uso de la proteasa Factor Xa diversas proteínas se degradan debido al corte inespecífico de la enzima cuando se emplean tiempos de reacción variados (desde 4 h hasta 5 días)(Jenny et al. 2003).

Finalizada la proteólisis, se cambió el buffer de las muestras a un medio sin calcio mediante centrifugación con tubos Amicon de 30 kDa. Este paso permitió retirar los fragmentos de proteína degradada y eliminar el calcio de la muestra, esto último debido a que el ion Ca<sup>2+</sup> forma complejos de coordinación con la Histidina interfiriendo en la cromatografía de afinidad a Níquel (Kimple et al. 2013).

La proteína EcSDH se purificó de la fracción no escindida empleando una segunda cromatografía de afinidad a Níquel, recuperando el eluyente al pasar buffer sin imidazol. Tras concentrar, la muestra se analizó por cromatografía de exclusión molecular. El cromatograma mostró un pico minoritario comprendido por las fracciones 24 y 25 y uno mayoritario de 26-32 (Figura 16). Al analizar por SDS-PAGE cada fracción presentó una banda entre 25 y 35 kDa con actividad de SA deshidrogenasa.

Figura 16 Cromatografía de exclusión molecular para purificación de la enzima EcSDH.



Izquierda: cromatograma de la muestra, el inserto es una ampliación de los picos observados. Derecha: SDS-PAGE de las fracciones recuperadas, MP: marcador de peso 10-250 kDa. Peso esperado de EcSDH= 29.7 kDa.

Las fracciones 26-32 de la cromatografía de exclusión se mezclaron en una sola muestra que se dializó contra buffer con glicerol al 50% (v/v) y se almacenó a -70 °C hasta su utilización. La enzima EcSDH es estable para su almacenamiento a -20 °C y -70 °C empleando buffers con glicerol al 50 % (v/v) (Maclean et al. 2000; Dell & Frost 1993), y se sabe que el glicerol es un agente que previene la agregación y desnaturalización de proteínas (Gekko & Timasheff 1981; Vagenende et al. 2009).

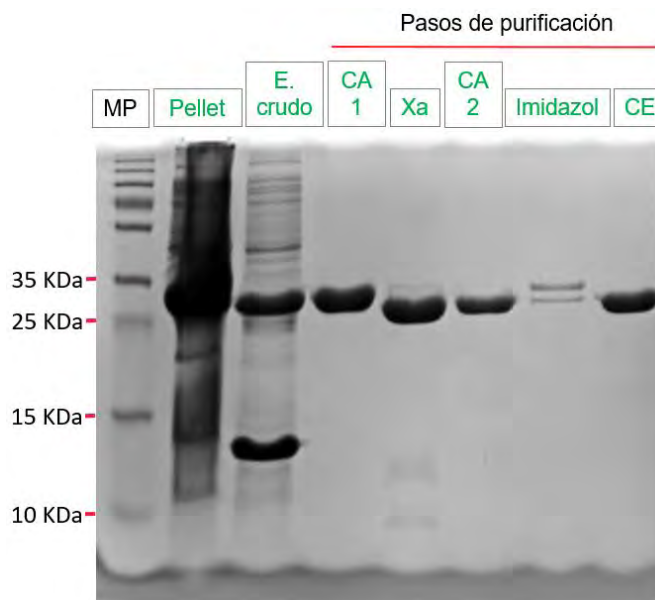
### 1.6.3.1 Caracterización del método de purificación

Ya que la proteína EcSDH se utilizará en ensayos de inhibición enzimática, desarrollamos una metodología para obtener a la enzima libre de la cola de Histidinas. El perfil de purificación a cada paso de la metodología se muestra en la Figura 17. En resumen, desde la cepa *aroE*-pCold<sup>aroE</sup> se expresó la proteína EcSDH-<sup>6</sup>His (31.5 kDa), que se recuperó del extracto crudo (E. crudo) mediante cromatografía



de afinidad a Níquel (CA 1). Tras el cambio de buffer, se escindió la cola de Histidinas empleando la proteasa Factor Xa (Xa) durante 48 h a 16 °C y 300 rpm, obteniéndose una banda de menor peso molecular correspondiente a EcSDH (29.7 kDa) y bandas por debajo de 15 kDa. La enzima EcSDH se purificó en una segunda cromatografía de afinidad a Níquel (CA 2) en que al saturar la columna con Imidazol 200 mM (Imidazol) aún se observó proteína EcSDH-<sup>6</sup>His. Finalmente, se realizó un paso de cromatografía de exclusión molecular (CE) y diálisis previo almacenamiento a -70 °C.

Figura 17 Perfil de purificación de la enzima EcSDH.



Muestras de cada paso de purificación analizadas por SDS-PAGE. MP: marcador de peso 10-250 kDa, Pellet: paquete celular tras sonicación. Abreviaturas descritas en el texto.

A fin de caracterizar los diferentes pasos de purificación se determinó la actividad específica de las muestras, siguiendo la actividad de SA deshidrogenasa bajo condiciones reportadas en la literatura (Chaudhuri et al. 1987) y concentración de proteína total (Tabla 10).

Tabla 10 Caracterización de los pasos de purificación de la enzima EcSDH

Paso	[Proteína] <sub>T</sub> (mg)	Actividad específica (U/ mg)	Factor de purificación
Extracto crudo	76 ± 1.2	480 ± 17	1.000
Cromatografía de afinidad 1	13 ± 0.7	691 ± 8	1.439
Tras factor Xa	11 ± 0.3	724 ± 5	1.508
Cromatografía de afinidad 2	9 ± 0.9	769 ± 7	1.602
Cromatografía de exclusión	8 ± 0.3	753 ± 4	1.568
Diálisis	7 ± 0.6	738 ± 6	1.537

Comparación de Actividad específica y Proteína total indicando la Desviación Estándar entre triplicados. 1U= sustrato (μmol) convertido por unidad de tiempo (min). Purificación partiendo de 1.6652 g de bacterias

Los resultados mostraron un aumento gradual de la actividad específica a cada paso de la purificación, siendo la primera cromatografía de afinidad a Níquel el paso que más contribuyó a la eliminación de proteínas contaminantes. Dado que en la reacción con el Factor Xa se obtuvo enzima EcSDH, trazas de EcSDH-<sup>6</sup>His y proteína degradada, fue hasta la segunda cromatografía de afinidad a Níquel que se recuperó una muestra de EcSDH pura con actividad específica de  $769 \pm 7$  U/mg.

La actividad específica reportada para EcSDH es de 860 U/mg (Chaudhuri et al. 1987) en una metodología que parte de 20 g de bacterias para obtener 10.5 mg de enzima. En el presente trabajo partimos de 1.67 g de bacterias y obtuvimos 7 mg de enzima EcSDH con actividad de  $738 \pm 6$  U/mg. La purificación desarrollada por Chaudhuri utiliza una cepa de *E.coli*  $\Delta$ aroE transformada con el vector pKK223-3 con el gen *aroE* clonado, e incluye precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , cromatografía de intercambio iónico, exclusión molecular y cromatografía de afinidad. A pesar de que se han utilizado métodos más sencillos para la obtención de la enzima EcSDH, no hay otros valores reportados de actividad específica.

## 1.7 Síntesis química de Inhibidores de la enzima EcSDH

### 1.7.1 Selección de compuestos basado en cribado virtual

Considerando que el SA es un inhibidor de la enzima EcSDH y el precedente en la literatura de otras moléculas inhibitoras de la enzima SDH de diversos organismos, se propusieron estructuras modelo que incluyeran al núcleo del SA inmiscuido en la estructura general de los inhibidores descritos. Se exploró adicionalmente el remplazo del grupo carbonilo del ácido carboxílico presente en el SA por bioisómeros tipo amida, éster o aldehído. También se propusieron estructuras con modificaciones en los sustituyentes de C3 el cual diferencia a los sustratos DHS y SA. El grupo de 50 compuestos se analizó en MolSoft para la predicción de solubilidad y posteriormente se utilizó en estudios de acople molecular ciego contra la enzima EcSDH (los resultados se presentan en Anexos).

En los estudios de acople molecular ciego se utilizaron tres servidores: SwissDock, Molecular Docking Server y Blind Docking Server. SwissDock está basado en el software EADock DSS (Aurelien Grosdidier et al. 2011) en el cual los modos de unión entre el ligando y la proteína se evalúan empleando el campo de fuerza CHARMM22 (Brooks et al. 2009) y se analizan los efectos del solvente con el modelo de solvatación FACTS. Molecular Docking Server está basado en el software AutoDock 4 (Huey et al. 2007) realizando mejoras en el cálculo de cargas parciales en el ligando y la proteína al incorporar el método de mecánica cuántica semi-empírica PM6 (Stewart 2009). Blind Docking Server utiliza una versión modificada de AutoDock Vina (Trott & Olson 2010), la siguiente generación de AutoDock 4, con la limitante de modelar ligandos que presenten máximo 12 grados de libertad.

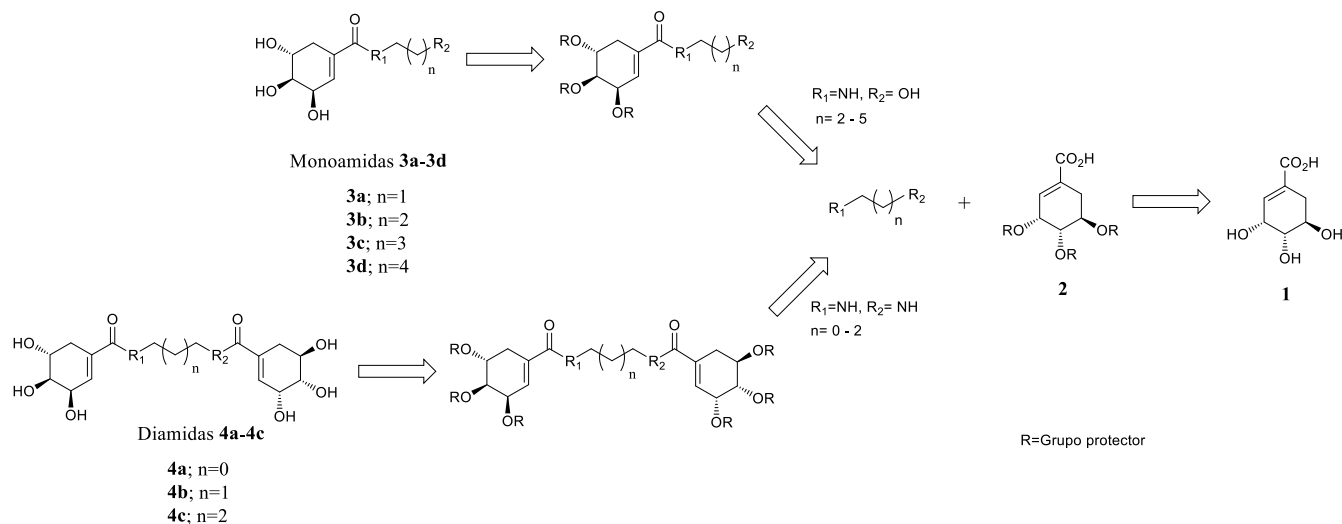
Para validar los estudios de acople molecular se determinó el parámetro cinético  $K_m$  de los sustratos DHS ( $K_m = 92.29 \pm 2.70$   $\mu\text{M}$ ) y SA ( $K_m = 114.47 \pm 6.23$   $\mu\text{M}$ ) corroborando que los modos de unión estuvieran en concordancia con lo reportado en la literatura. No se han descrito inhibidores de la enzima EcSDH, como una segunda aunque menos exacta validación, se incluyeron inhibidores competitivos de enzimas SDH de diversos organismos con  $K_i > K_m$  y  $K_i < K_m$ . Debido a la limitante de los grados de libertad permitidos en los ligandos, el conjunto de moléculas analizado con Blind Docking Server es menor al de los otros dos servidores.

En general los resultados obtenidos con los estudios de acople molecular mostraron una tendencia en que las estructuras con mayor energía de unión a la enzima ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) corresponden a estructuras de tres o más anillos, seguidos de estructuras con dos anillos, un anillo acoplado a cadenas hidrocarbonadas y finalmente estructuras de un anillo modificado en carbonos centrales. Entre los servidores empleados, la predicción con SwissDock mostró la mayor correlación con la potencia de inhibidores reportados. Se tomaron sólo las primeras 20 moléculas con  $\Delta G_{\text{bind}}$  más negativos de los tres servidores. Los compuestos que mejor se unirían a la enzima fueron núcleos polifenólicos y derivados aromáticos cuya modificación química sería compleja. Continuando hacia posiciones inferiores se encontraron moléculas que tendrían poca solubilidad en agua o impedimento estérico a considerar en la síntesis química. Considerando las moléculas que presentaron mayor afinidad a la enzima EcSDH, solubles en agua y cuya síntesis orgánica sea factible, se propuso llevar a cabo la preparación de monoamidas derivadas del SA N-substituidas con aminoalcoholes lineales y diamidas compuestas por dos moléculas de SA anclados por una cadena alifática.

### 1.7.2 Síntesis química de análogos del SA

Para la síntesis divergente de las monoamidas (**3a-3d**) y diamidas (**4a-4c**) derivadas del SA (**1**) se propuso el siguiente análisis retrosintético; a partir de **1** el primer paso puede consistir en la protección de los grupos hidroxilo obteniendo el intermediario **2** (Esquema 1). Teniendo la funcionalidad del ácido carboxílico se puede proceder al acoplamiento con diferentes nucleófilos de nitrógeno. Las monoamidas pueden sintetizarse a partir de aminoalcoholes de cadena lineal y las diamidas desde diaminas de cadena corta. El último paso implicaría la desprotección de los grupos hidroxilo para obtener los compuestos deseados.

Esquema 1 Análisis retrosintético para la síntesis de amidas derivadas del SA.

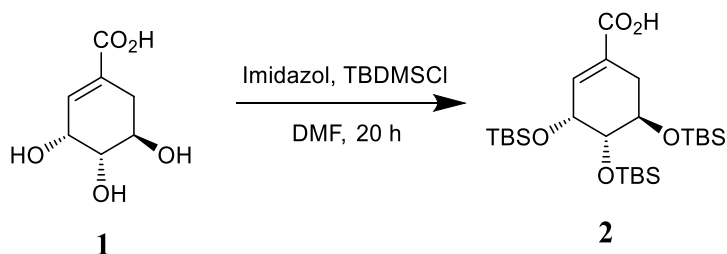


#### 1.7.2.1 Síntesis de monoamidas derivadas del SA (**3a-3d**)

De acuerdo con el análisis retrosintético mostrado en el Esquema 1, se preparó un intermediario derivado de **1** cuyos grupos hidroxilo están protegidos. Inicialmente, se intentó la protección con trimetilsilano, sin embargo, en la purificación por cromatografía flash o destilación al vacío no se obtuvo el compuesto deseado.

Empleando un silano más voluminoso como el cloruro de tert-butildimetilsilano (TBDMSCl), se ha reportado la protección de grupos hidroxilo en compuestos estructuralmente parecidos a **1** (Sánchez-Abella et al. 2009). Considerando lo anterior, se llevó a cabo la reacción del ácido **1** con TBDMSCl. Se utilizó una relación molar 1:11:10 del compuesto **1**, imidazol y TBDMSCl respectivamente, en presencia de DMF bajo condiciones anhidras a 55 °C durante 20 h, obteniéndose **2** con un rendimiento químico del 56 % (ensayo 1, Tabla 11). Con la finalidad de mejorar el rendimiento químico en la obtención de **2**, se decidió incrementar la temperatura de reacción a 70 °C, obteniéndose el compuesto deseado con un rendimiento químico del 85%. En un intento por disminuir la cantidad de reactivos utilizados, se llevó a cabo la reacción a 70 °C empleando una relación molar 1:6:5 del compuesto **1**, imidazol y TBDMSCl respectivamente, obteniéndose los éteres de tert-butildimetilsililo con un rendimiento químico del 67%.

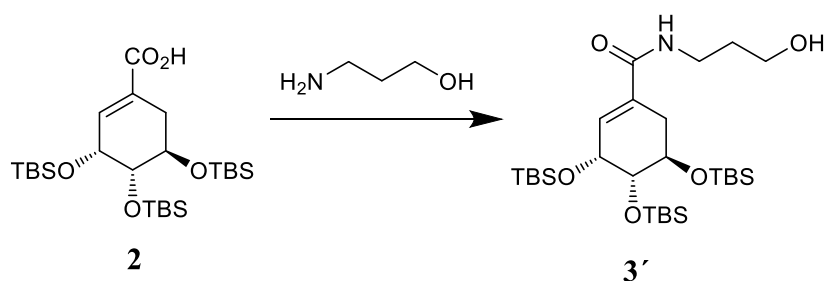
Tabla 11 Síntesis del ácido protegido 2.



Ensayo	Imidazol: TBDMSCI (mol:mol)	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)
1	11:10	55	56
<b>2</b>	<b>11:10</b>	<b>70</b>	<b>85</b>
3	6:5	70	67

Una vez obtenido el ácido protegido **2**, se estudió la formación del intermediario amida **3'** utilizando 3-amino-1-propanol (Tabla 12). Los acoplamientos se realizaron con metodologías generales de formación de amidas, mediadas por la formación de anhídridos de ácido (ensayo 1), intermediarios O-acilisourea (ensayo 2) y cloruros de acilo (ensayo 3). En la reacción del ácido **2** con isobutilcloroforniato  $i\text{-BuOC(O)Cl}$  y  $N$ -metilmorfolina (NMM) empleando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como disolvente, no se detectó la formación de la amida **3'**. Lo anterior podría deberse a que, en lugar de formarse la amida, se hubiese formado el anhídrido simétrico del ácido **2**. Por otra parte, la reacción de **2** con dicitclohexilcarbodiimida (DCC) en presencia de  $\text{Et}_3\text{N}$  permitió la obtención de **3'** con rendimientos químicos del 22%. Tomando en cuenta que un cloruro de acilo es una especie química con mayor reactividad que el intermediario O-acilisourea, se decidió llevar a cabo la preparación de **3'** empleado cloruro de oxalilo  $(\text{COCl})_2$ . Así, la reacción del cloruro de acilo de **2** con 3-amino-1-propanol y DIPEA en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como disolvente, proporcionó a la amida **3'** con un rendimiento químico del 72%.

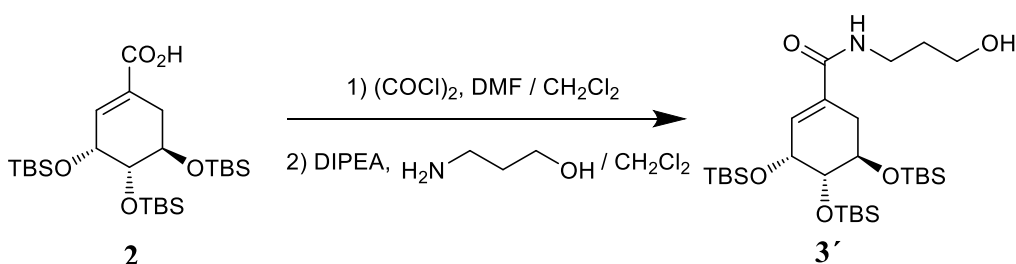
Tabla 12 Ensayos para la síntesis del intermediario amida 3'.



Ensayo	Condiciones	Temperatura, tiempo	2: aminoalcohol (mol:mol)	Rendimiento (%)
1	$i\text{-BuOC(O)Cl}$ , NMM, $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0 a 25 °C, 24 h	1:1	No hubo reacción
2	DCC, $\text{Et}_3\text{N}$	25 °C, 24 h	1:1	22
<b>3</b>	<b>1) <math>(\text{COCl})_2</math>, DMF, <math>\text{CH}_2\text{Cl}_2</math> 2) aminoalcohol, DIPEA, <math>\text{CH}_2\text{Cl}_2</math></b>	<b>1) 25 °C, 1 h 2) 25°C, 1 h</b>	<b>1:10</b>	<b>72</b>

Dado que, el mayor rendimiento químico para la obtención de **3'** se logró mediante la formación del cloruro de acilo, se optimizaron las condiciones de reacción según se muestra en la Tabla 13. Para la preparación del cloruro de acilo, inicialmente se utilizaron 3 equivalentes de  $(\text{COCl})_2$  por cada mol de **2** (ensayo 1). En un esfuerzo por disminuir la cantidad de reactivos empleados en la reacción, se llevó a cabo la preparación del cloruro de acilo utilizando 1.2 equivalentes de  $(\text{COCl})_2$  (ensayo 2). Los rendimientos químicos del ensayo 1 y 2 fueron del 72 y 47% respectivamente, para propiciar la formación del cloruro de acilo sin tener que aumentar el número de equivalentes de  $(\text{COCl})_2$  se decidió extender el tiempo de reacción (ensayos 3 y 4) obteniéndose el compuesto **3'** con un rendimiento del 80% al utilizar 3 h de reacción. Debido a éste resultado, se decidió aumentar también el tiempo de reacción del paso de acoplamiento, que inicialmente fue de 1 h y se llevó durante 3 h, con lo que se mejoró el rendimiento a 87% (ensayo 5). Finalmente, empleando los tiempos de reacción del ensayo 5, se probó disminuir la relación estequiométrica del ácido **2**:aminoalcohol, modificando la condición original 1:10 para utilizar 1:5 con lo que el rendimiento disminuyó hasta el 68%.

Tabla 13 Síntesis del intermediario amida **3'** mediante la formación del cloruro de acilo.

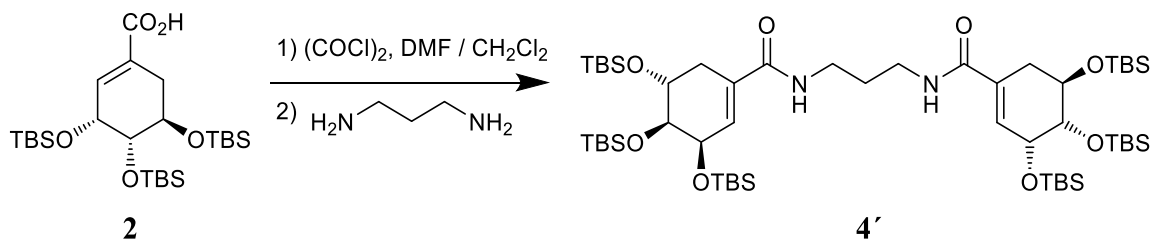


Ensayo	Formación del cloruro de acilo	Acoplamiento	2: Aminoalcohol (mol:mol)	$(\text{COCl})_2$ (eq)	Rendimiento (%)
1	1 h	1 h	1:10	3	72
2	1 h	1 h	1:10	1.2	47
3	2 h	1 h	1:10	1.2	73
4	3 h	1 h	1:10	1.2	80
<b>5</b>	<b>3 h</b>	<b>3 h</b>	<b>1:10</b>	<b>1.2</b>	<b>87</b>
6	3 h	3 h	1:5	1.2	68

### 1.7.2.2 Síntesis de diamidas derivadas del SA (4a-4c)

Para la síntesis de diamidas se partió del compuesto 1,3-diaminopropano, empleando las condiciones de reacción optimizadas en la obtención del intermediario **3'**. Se utilizó una relación estequiométrica 3:1 del intermediario protegido **2** y diamina respectivamente. Primeramente se llevó a cabo la formación del cloruro de acilo de **2** y este crudo de reacción se utilizó en el acoplamiento con la diamina. Para neutralizar el ácido producido durante la reacción de acoplamiento, se probaron las bases DIPEA y  $\text{NaHCO}_3$  en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como disolvente, obteniendo **4'** con rendimientos químicos del 19 y 21% respectivamente (Tabla 14). Ya que el mejor rendimiento se obtuvo al utilizar  $\text{NaHCO}_3$  se exploró un solvente diferente al  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , empleando  $\text{Et}_2\text{O}$  para la reacción de acoplamiento (modificado de (Sumiyoshi et al. 2003)) se obtuvo **4'** con un rendimiento del 54 %. Finalmente se modificó la temperatura de reacción del paso de acoplamiento a  $0^\circ\text{C}$ , con lo cual el rendimiento disminuyó hasta 32%.

Tabla 14 Formación de la diamida protegida 4'



Ensayo	Acoplamiento	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)
1	DIPEA, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	25	19
2	NaHCO <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	25	21
3	<b>NaHCO<sub>3</sub>, Et<sub>2</sub>O</b>	<b>25</b>	<b>54</b>
4	NaHCO <sub>3</sub> , Et <sub>2</sub> O	0	32

Para la formación del cloruro de acilo se empleó (COCl)<sub>2</sub> (1.2 eq), 25 °C, 3 h. En todos los ensayos se utilizó para el acoplamiento una relación estequiométrica 3:1 del ácido **2**: 1,3-diaminopropano.

Una vez estandarizadas las condiciones de reacción para la obtención de la diamida **4'**, se intentó la síntesis de la monoamida correspondiente, con este objetivo se varió la relación estequiométrica del compuesto protegido **2** y 1,3-diaminopropano. No se detectó la formación de la monoamida pero sí se observó la síntesis de la diamida. Conforme se aumentan los moles de 1,3-diaminopropano en la reacción, se mejoró el rendimiento químico en la preparación de **4'**, obteniendo un rendimiento del 78 % al utilizar una relación estequiométrica 1:5 del compuestos protegido **2** y diamina respectivamente (Tabla 15). Esto podría deberse a que en la reacción de acoplamiento se utilizó como sustrato el crudo de reacción de la formación del cloruro de acilo, por lo cual la diamina podría estar actuando como base en presencia del HCl del medio.

Tabla 15 Variación de la relación estequiométrica del ácido **2**: 1,3-diaminopropano

Ensayo	<b>2</b> : diamina (mol:mol)	Rendimiento (%)
1	3:1	54
2	1:1	64
3	1:5	78

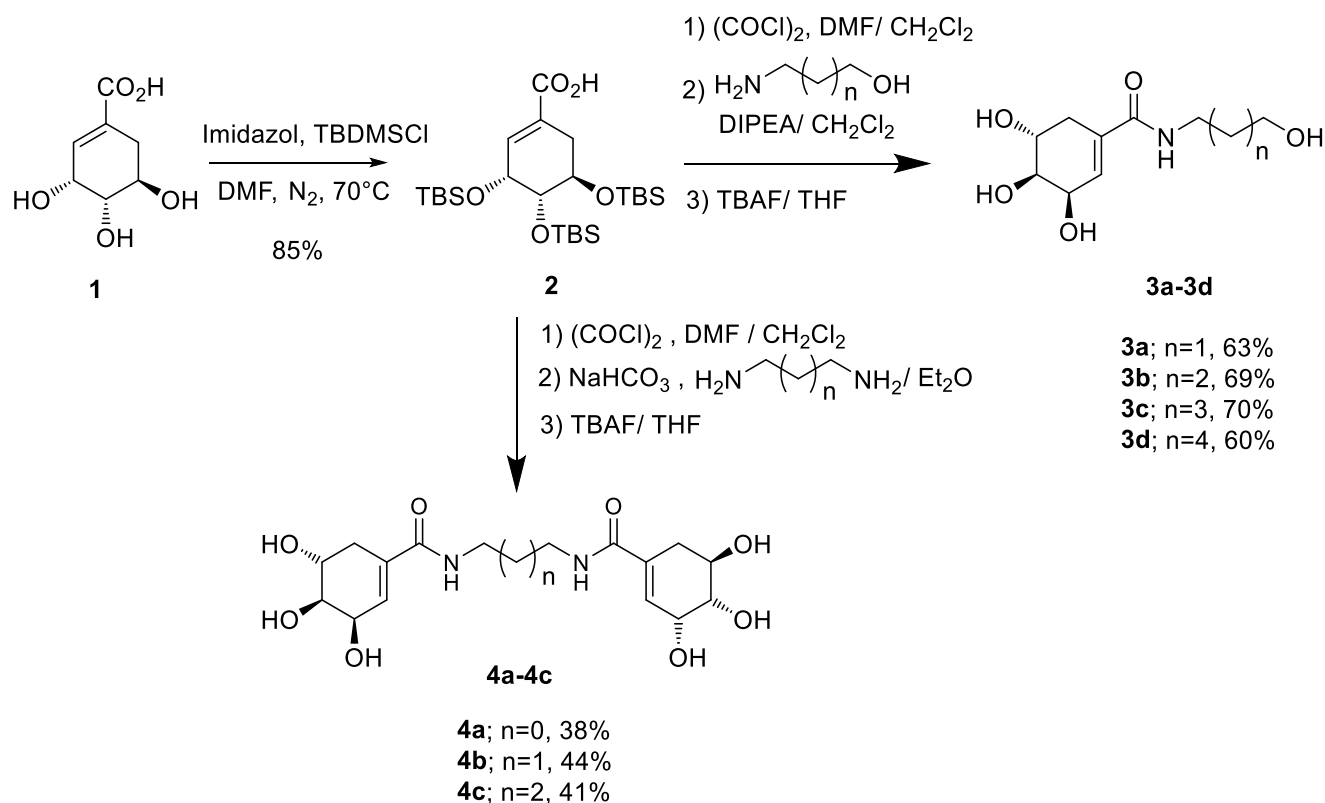
Para la formación del cloruro de acilo se empleó (COCl)<sub>2</sub> (1.2 eq), 25 °C, 3 h. Acople NaHCO<sub>3</sub>, Et<sub>2</sub>O, 25 °C, 12 h.

### 1.7.2.3 Síntesis total de compuestos blanco (**3a-3d** y **4a-4c**)

Las amidas derivadas del SA se sintetizaron a partir de la materia prima comercial SA (**1**) como se muestra en el Esquema 2. La reacción de **1** con TBDMSCl en presencia de imidazol y DMF permitió la obtención de **2**. La protección de los grupos hidroxilos en C-3, C-4 y C-5 mostró un rendimiento del 85% cercano al reportado para moléculas similares (Sánchez-Abella et al. 2009). Se preparó el cloruro de acilo desde el ácido carboxílico **2** por tratamiento con (COCl)<sub>2</sub>. Posteriormente se sintetizaron las

monoamidas empleando una hidroxilamina apropiada en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Ramkumar et al. 2014). Finalmente, se llevó a cabo la desprotección sin previa purificación, utilizando fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en tetrahidrofurano (THF) para obtener las monoamidas **3a-3d** con rendimientos del 60-70% en concordancia con lo observado para compuestos similares (Sánchez-Abella et al. 2007).

### Esquema 2 Síntesis total de amidas derivadas del SA



Las diamidas **4a-4c** se sintetizaron a partir del intermediario protegido **2**. Se preparó el cloruro de acilo de **2** y se adicionó la diamina correspondiente en presencia de  $\text{Et}_2\text{O}$  y  $\text{NaHCO}_3$ , obteniéndose las diamidas *O*-protegidas (Sumiyoshi et al. 2003). Los grupos sililo se removieron mediante reacción con TBAF en THF produciendo las diamidas **4a-4c** con rendimientos químicos del 38-44 %.

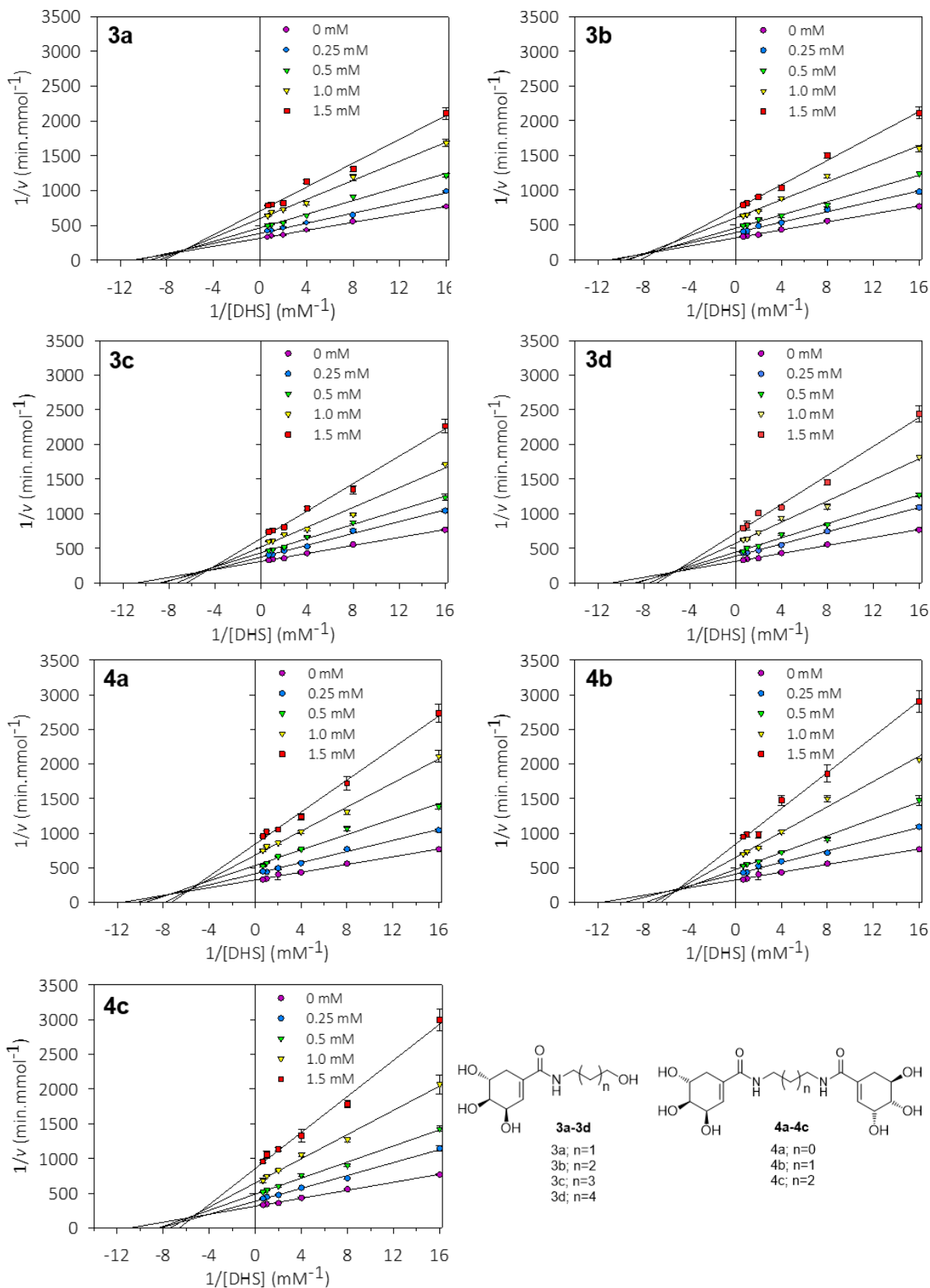
La ruta sintética planteada permitió la preparación de monoamidas con rendimientos globales de 51-60% y diamidas con 32-35%. La caracterización química mediante RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , IR-FT y MS de los compuestos sintetizados se presenta en Anexos.

## 1.8 Evaluación de la actividad inhibitoria de amidas derivadas del SA

### 1.8.1 Inhibición enzimática de la enzima EcSDH

El efecto inhibitorio de las monoaminas **3a-3d** y diaminas **4a-4c** derivadas del SA, se determinó empleando la enzima purificada EcSDH a pH 7.4. A fin de caracterizar la actividad enzimática de la reacción biológicamente más importante (síntesis de aminoácidos) se empleó DHS como sustrato. La actividad de la enzima EcSDH se determinó en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos sintetizados (0, 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 mM) y se construyeron gráficos de Lineweaver-Burk del inverso de la velocidad ( $1/v$ ) contra inverso de la concentración de sustrato  $1/[S]$  (Figura 18).

Figura 18 Gráficos de Lineweaver-Burk de la actividad de EcSDH en presencia de amidas.



Para cada gráfico se indica en la parte superior izquierda la identidad del compuesto sintetizado (monoamidas **3a-3d** y diaminas **4a-4c**) y su concentración (mM) en cada familia de rectas. Se emplearon concentraciones de DHS= 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 mM. Promedio de 3 experimentos.



Las gráficas del doble recíproco para todos los compuestos muestran un patrón de líneas intersectantes en el segundo cuadrante, lo que sugiere que las amidas sintetizadas son inhibidores del tipo mixto con respecto al DHS. Los resultados se analizaron por regresión no lineal ajustando a los diferentes modelos de inhibición, los mejores ajustes se obtuvieron para el modelo de inhibición mixta. El mecanismo que describe la inhibición mixta implica que el inhibidor puede unirse a la enzima cuando ésta se encuentra en forma libre (E) o formando el complejo enzima-sustrato (ES), pero exhibiendo diferentes afinidades por uno u otro estado de la enzima. Los parámetros cinéticos velocidad máxima ( $V_{max}$ ), constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y constantes de inhibición ( $K_i$  y  $K_i'$ ) se calcularon mediante la ecuación general de inhibición mixta:

$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i'}\right)}$$

Donde I representa la concentración del inhibidor,  $K_i$  es la constante de disociación del complejo binario enzima-inhibidor y  $K_i'$  la constante de disociación del complejo ternario enzima-sustrato- inhibidor (Alimoradi et al. 2017; Segel 1993). Las diferentes constantes de disociación ( $K_m$ ,  $K_i$  y  $K_i'$ ) se relacionaron al valor  $IC_{50}$  utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff:

$$IC_{50} = \frac{K_m + [S]}{\left(\frac{K_m}{K_i}\right) + \left(\frac{[S]}{K_i'}\right)}$$

Donde  $IC_{50}$  representa la concentración de inhibidor que produce 50% de inhibición enzimática (Cheng & Prusoff 1973). No hay inhibidores reportados de la enzima EcSDH, como control de la evaluación cinética se determinó la  $K_m$  para el sustrato DHS obteniendo un valor de  $92.29 \pm 2.70 \mu\text{M}$  similar al reportado de  $72 \mu\text{M}$  (Dell & Frost 1993). Los parámetros cinéticos se muestran en la Tabla 16, es interesante notar que para todos los compuestos analizados  $K_i < K_i'$  indicando que el inhibidor se une con mayor afinidad a la enzima libre comparada con el complejo ES. Si bien las monoamidas (**3a-3d**) mostraron una magnitud similar de inhibición ( $K_i = 587-733 \mu\text{M}$ ), pareciera que la inhibición aumenta progresivamente al aumentar la longitud de la cadena del aminoalcohol, de tal manera que el inhibidor más débil corresponde al compuesto con la cadena de propanol **3a** ( $K_i = 733 \pm 67 \mu\text{M}$ ) comparado con el derivado del hexanol **3d** ( $K_i = 587 \pm 49 \mu\text{M}$ ). De las moléculas evaluadas, las diamidas **4a-4c** fueron los inhibidores más activos ( $K_i = 400-458 \mu\text{M}$ ). El efecto inhibitorio similar en magnitud que presentaron las diamidas sugiere la participación importante del segundo núcleo de SA presente en las moléculas

Tabla 16 Parámetros cinéticos del efecto inhibitorio de amidas en la actividad de EcSDH.

Compuesto	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i'$ ( $\mu\text{M}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>3a</b>	$733 \pm 67$	$1214 \pm 58$	$949 \pm 33$
<b>3b</b>	$717 \pm 71$	$1145 \pm 130$	$882 \pm 54$
<b>3c</b>	$642 \pm 34$	$1483 \pm 91$	$953 \pm 10$
<b>3d</b>	$587 \pm 49$	$1188 \pm 26$	$829 \pm 49$
<b>4a</b>	$416 \pm 69$	$831 \pm 12$	$588 \pm 55$
<b>4b</b>	$400 \pm 50$	$896 \pm 72$	$589 \pm 56$
<b>4c</b>	$458 \pm 81$	$945 \pm 13$	$652 \pm 65$

Se indica la desviación estándar del promedio de 3 experimentos.

De acuerdo con los datos, las variaciones estructurales en los compuestos sintetizados resultaron en dos grupos de inhibidores con potencias de  $IC_{50}$  = 829-953  $\mu$ M para monoamidas e  $IC_{50}$  = 588-652  $\mu$ M para diamidas. Esto podría sugerir que cada grupo de amidas se une de forma diferente a la enzima EcSDH. Los derivados amídicos del SA mostraron inhibición débil contra EcSDH ( $K_i$  = 400-737  $\mu$ M) comparado con la materia de partida SA ( $K_i$  = 160  $\mu$ M) o el aldehído vainillina ( $K_i$  = 93  $\mu$ M), aunque similar a los compuestos aromáticos GA ( $K_i$  = 380  $\mu$ M) y PCA ( $K_i$  = 750  $\mu$ M) analizados en *P. sativum* (Balinsky & Davies 1961).

Se considera que el reemplazo bioisotérico del ácido carboxílico del SA por amidas N-substituidas resultó en inhibidores débiles como consecuencia de diferencias en la naturaleza electrónica (un anión en el carboxilato comparado con una amida neutral) que podrían afectar interacciones entre la proteína y el inhibidor, impedimentos estéricos en los derivados y/o diferentes modos de unión a la enzima, entre otros.

### 1.8.2 Actividad antibacterial contra *E. coli* JM101

Se evaluó la posible actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados **3a-4c** en el crecimiento de *E. coli* JM101. La concentración inhibitoria mínima (MIC) se determinó por duplicado en medio rico Luria-Bertani (LB) y medio mineral M9, con y sin dimetilsulfóxido como coadyuvante (DMSO, 0.8 % (v/v)). En todos los casos se observó un valor de MIC = 512 mg/L para las moléculas analizadas.

Las amidas derivadas del SA presentaron una actividad antibacterial débil, con valores de MIC para monoamidas entre 1.8-2.2 mM y para diamidas 1.2-1.3 mM, que contrasta con la observación de dos potencias de inhibición ( $IC_{50}$ ) en los ensayos enzimáticos.

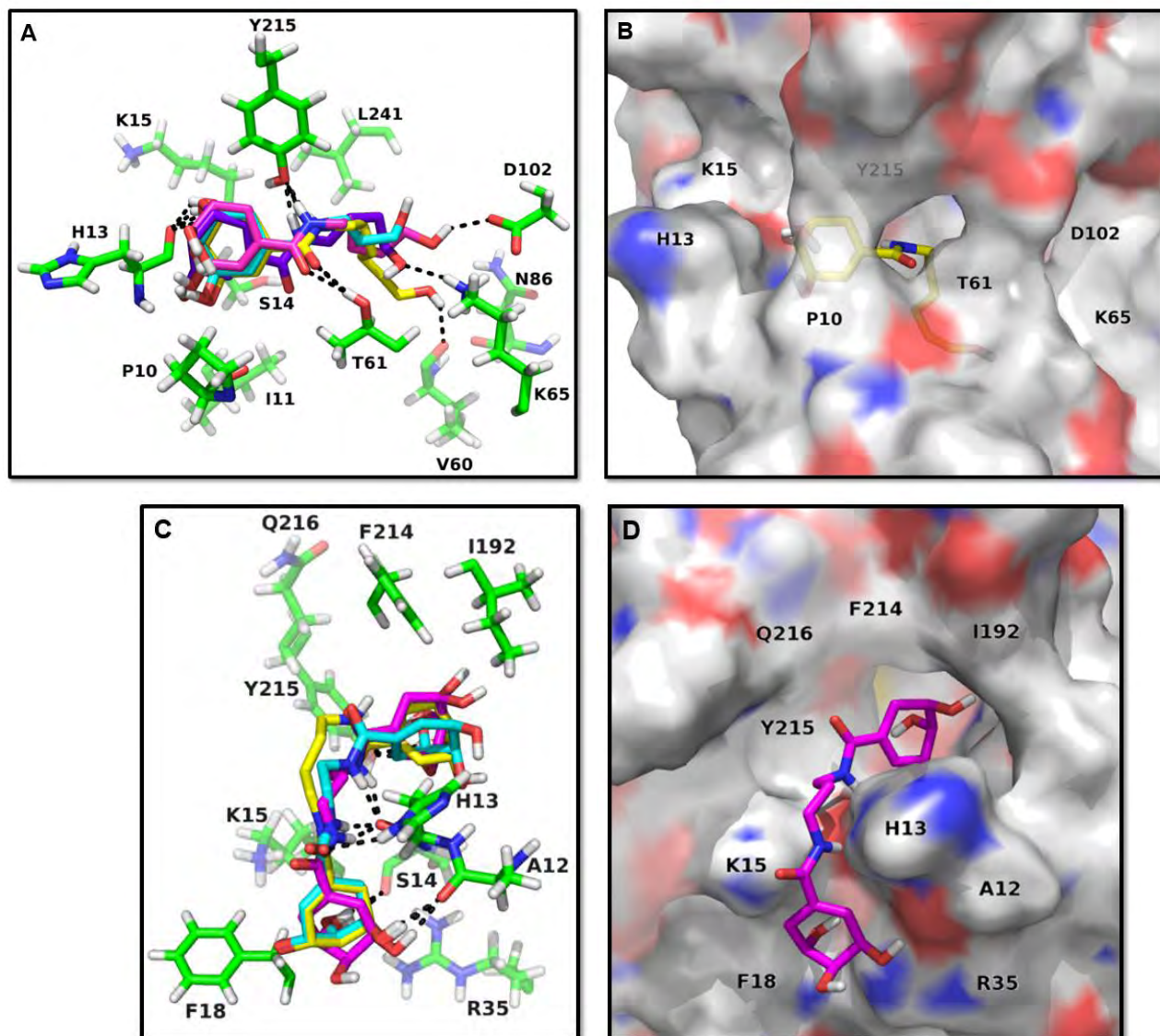
Se ha reportado que la bacteria *E. coli* posee al menos un transportador de SA codificado por el gen *shyA* (Whipp et al. 1998), además de la maquinaria de transporte para diamidas (Prabhala et al. 2014; Harder et al. 2008) y amidas N-alquiladas (Payne 1974). Adicionalmente otras estructuras con anillos de seis miembros polihidroxilados se han identificado como inhibidores activos contra el crecimiento de bacterias Gram-negativas (Peek et al. 2014; Han et al. 2006). Considerando estas observaciones y a pesar de que las estructuras sintetizadas en este trabajo contienen modificaciones estructurales, pareciera poco probable que los valores de MIC observados se deban a un transporte ineficiente de los compuestos a través de la célula (se requeriría comprobación experimental).

## 1.9 Estudios de acople molecular

A fin de explorar los modos de unión de los inhibidores a la enzima EcSDH, se modeló el acople de las amidas con el sitio activo de la enzima. Tomando en cuenta que para todas las amidas sintetizadas  $K_i < K_j$  (Tabla 16) se determinaron los modos de unión empleando la enzima sin DHS (Figura 19).

La predicción sugiere que, en las monoamidas **3a-3d** la cadena alifática se orienta hacia una zona hidrofílica (que comprende la diada catalítica K65-D102) en el interior del sitio activo, y con excepción de la molécula **3a** se establece un puente de hidrógeno vía el hidroxilo de dicha cadena y aminoácidos de la zona hidrofílica. El estudio de acople plantea la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo amida y los aminoácidos conservados Y215 y T61, así como entre un grupo hidroxilo del núcleo de SA y el esqueleto peptídico de H13. El incremento en la longitud de la cadena hidrocarbonada, delimita la posibilidad de interacción entre las monoamidas y aminoácidos del sitio catalítico para establecer puentes de hidrógeno. Los inhibidores **3a** y **3b** establecen 3 puentes de hidrógeno con la enzima EcSDH mientras que **3c** y **3d** interactúan mediante 4 puentes de hidrógeno. Lo anterior se refleja en una mayor energía intramolecular ligando-proteína al comparar **3a** (-6.61 kcal/mol) y **3d** (-8.18 kcal/mol) como se muestra en la Tabla 17. Adicionalmente, el aumento en la longitud de la cadena hidrocarbonada está asociado a un incremento gradual de la superficie de interacción ligando-proteína (651.41 Å<sup>2</sup> para **3a** y 723.59 Å<sup>2</sup> para **3d**).

Figura 19 Modos de unión propuestos entre las amidas sintetizadas y EcSDH.



Panel A: Interacciones entre EcSDH y monoamidas (**3a**: azul, **3b**: morado, **3c**: rosa y **3d**: amarillo). Panel C: Interacciones entre EcSDH y diamidas (**4a**: azul, **4b**: morado y **4c**: amarillo). Panel B y D representación de superficie para la unión de amidas **3d** y **4b** respectivamente. Los aminoácidos más involucrados se presentan en código de una letra y se muestran en verde. Los puentes de Hidrógeno se representan con líneas punteadas.

El modelamiento sugiere que, en los compuestos **4a-4c** un núcleo de SA se une al sitio activo de la enzima y el segundo núcleo interacciona con una superficie hidrofílica en la inmediación del sitio de unión, en concordancia con el tipo de inhibición mostrado por las diamidas. Al interior del sitio catalítico, los grupos hidroxilos del SA establecen puentes de hidrógeno con la cadena lateral de Y215. El grupo amida forma puentes de hidrógeno con H13, y en la inmediación del sitio de unión los grupos hidroxilo del segundo núcleo de SA interaccionan con el esqueleto peptídico de S14 y A12, mediante puentes de hidrógeno. Para las diamidas **4a-4c** no hay una correlación lineal entre la longitud de la cadena que une los anillos de SA y la energía intramolecular ligando-proteína.

Tabla 17 Energías de interacción de los modos de unión entre amidas y la enzima EcSDH.

Compuesto	Energía de vdW+ Hbond+ desolvatación (kcal/mol)	Energía electrostática (kcal/mol)	Energía intramolecular (kcal/mol)	Superficie de interacción (Å <sup>2</sup> )
<b>3a</b>	-6.49	-0.12	-6.61	651.41
<b>3b</b>	-6.90	-0.25	-7.15	671.32
<b>3c</b>	-7.60	-0.31	-7.91	710.39
<b>3d</b>	-8.13	-0.05	-8.18	723.59
<b>4a</b>	-9.15	-0.11	-9.26	871.42
<b>4b</b>	-9.23	-0.16	-9.39	884.58
<b>4c</b>	-8.74	-0.11	-8.85	909.61

Abreviaciones vdW: van der Waals, Hbond: puente de hidrógeno

Cada diamida sintetizada tiene 8 grupos que pueden actuar como donadores de puentes de hidrógeno y 8 grupos aceptores de puentes de hidrógeno, mientras que en las monoamidas estos valores corresponden a 5 y 5 respectivamente. Por lo que, las diamidas podrían establecer mayor número de interacciones con la proteína en comparación con las monoamidas. En este sentido, los valores de energía intramolecular para los modos de unión de monoamidas están en el intervalo de -6.61 a -8.18 kcal/mol y para diamidas entre -8.85 a -9.39 kcal/mol. Adicionalmente la superficie de interacción con la enzima EcSDH es menor en las monoamidas **3a- 3b** (651.41 - 723.59 Å<sup>2</sup>) que en las diamidas **4a-4c** (871.42 - 909.61 Å<sup>2</sup>). Estos resultados están en concordancia con la tendencia encontrada experimentalmente, la cual apunta a que las diamidas son mejores inhibidores de la enzima EcSDH en comparación con las monoamidas.

Los estudios de acople molecular sugirieron que los mayores determinantes para la unión de las amidas sintetizadas a la enzima EcSDH son el grupo amida y los grupos hidroxilos presentes en el SA o en las cadenas alifáticas de los aminoalcoholes. En la zona hidrofílica identificada al interior de la enzima, las monoamidas presentaron interacción con los residuos N86, D102, Y215, V60 y T61. Por otra parte, un núcleo de SA en las diamidas interacciona con la superficie hidrofílica presente en la inmediación del sitio de unión, que se compone del esqueleto peptídico de A12, H13, S14 y la cadena lateral de R35. Estas observaciones resaltan dos sitios potenciales de interacción para la unión de moléculas polares como derivados polihidroxilados no voluminosos, que puedan ser explorados en el desarrollo de compuestos con actividad inhibitoria mejorada. Adicionalmente, estudios de validación por dinámica molecular permitirían estudiar la estabilidad del complejo inhibidor-enzima en función del tiempo, y el cambio o no en los modos de unión que podrían presentar los inhibidores (Chen 2015).

## CONCLUSIONES

Basados en los resultados de cribado virtual, diseñamos y describimos un método fácil para la síntesis de amidas derivadas del SA, desde materias primas simples comercialmente disponibles. La ruta sintética planteada permite la preparación de monoamidas **3a-3d** con rendimientos globales de 51-60 % y diamidas **4a-4c** con 32-35 %.

Todos los compuestos sintetizados son inhibidores del tipo mixto empleando DHS como sustrato. Las diamidas **4a-4c** son inhibidores de la enzima EcSDH con mayor actividad ( $K_i = 400-458 \mu\text{M}$ ) que las monoamidas **3a-3d** ( $K_i = 587-733 \mu\text{M}$ ). Entre los compuestos evaluados, las moléculas más activas fueron los derivados diamida de 2 y 3 carbonos en la cadena alifática, mostrando valores de  $IC_{50} = 588$  y  $589 \mu\text{M}$ , respectivamente.

Las moléculas sintetizadas mostraron ser inhibidores del crecimiento de *E. coli* JM101 débiles, presentando valores de MIC para monoamidas entre 1.8-2.2 mM y para diamidas entre 1.2-1.3 mM.

Los estudios de acople molecular sugieren que las monoamidas y diamidas interaccionan mediante dos modos de unión diferentes con el sitio activo de la enzima EcSDH, adquiriendo conformaciones que se alejarían de la geometría de equilibrio.

Para los compuestos sintetizados, el reemplazo bioisostérico de la funcionalidad de ácido carboxílico presente en el SA por amidas *N*-sustituidas da lugar a inhibidores débiles. Este resultado podría deberse a diferencias en la naturaleza electrónica (un anión en el carboxilato comparado con una amida neutral) que podría afectar interacciones entre la proteína y el inhibidor, impedimentos estéricos en los derivados y/o diferentes modos de unión a la enzima, entre otros

Hasta la actualidad, no existen estudios en la literatura donde se explore el potencial inhibitorio de compuestos derivados del SA como moléculas activas contra la enzima SDH. Si bien las moléculas sintetizadas mostraron ser inhibidores más débiles que el SA, constituyen andamios moleculares altamente funcionalizables para el desarrollo de nuevos compuestos inhibitorios contra la enzima EcSDH.

## PERSPECTIVAS

Entre las enzimas SDH de los tres dominios existen identidades en secuencia aminoacídica del 30 al 50%. Evaluar los compuestos sintetizados en enzimas SDH de diversos organismos, o contra el crecimiento de microorganismos diferentes a *E. coli*, permitiría caracterizar el espectro de inhibición de las amidas obtenidas.

En la modificación de los compuestos sintetizados para obtener inhibidores más activos, se podrían preparar amidas derivadas del SA que incluyan sustituyentes polares no voluminosos, haciendo uso del conocimiento adquirido tras el estudio de acople molecular y el esquema sintético desarrollado.

Una aproximación para la obtención de inhibidores más potentes que los derivados del SA, podría ser utilizar una molécula base diferente al SA, partiendo de inhibidores reportados con mayor potencia que el SA. Adicionalmente se podrían explorar bioisómeros diferentes al tipo amida en el diseño y obtención de moléculas con actividad inhibitoria.

Ampliar el repertorio de moléculas analizadas por acople molecular, mediante el cribado virtual contra librerías de compuestos, permitiría identificar nuevas plantillas moleculares para la obtención de inhibidores de la enzima SDH. Adicionalmente estos estudios deberían validarse por simulaciones de dinámica molecular.

## BIBLIOGRAFIA

- Abe, I. et al., 2000. Green tea polyphenols: novel and potent inhibitors of squalene epoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(3), pp.767–771.
- Alimoradi, N. et al., 2017. Diethylalkylsulfonamido ( 4- methoxyphenyl ) methyl phosphonate / phosphonic acid derivatives act as acid phosphatase inhibitors: synthesis accompanied by experimental and molecular modeling assessments. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), pp.20–28.
- Amer, F.A., El-behedy, E.M. & Mohtady, H.A., 2008. New targets for antibacterial agents. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3(3), pp.46–57.
- Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48 Suppl 1, pp.5–16.
- Anton, I.A. & Coggins, J.R., 1988. Sequencing and overexpression of the *Escherichia coli aroE* gene encoding shikimate dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 249, pp.319–326.
- Avitia-Domínguez, C. et al., 2014. Inhibition and biochemical characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* shikimate dehydrogenase: an in silico and kinetic study. *Molecules*, 19(4), pp.4491–509.
- Baba, T. et al., 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2, p.2006.0008.
- Bagautdinov, B. & Kunishima, N., 2007. Crystal structures of shikimate dehydrogenase AroE from *Thermus thermophilus* HB8 and its cofactor and substrate complexes: insights into the enzymatic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 373(2), pp.424–438.
- Bai, S.H. & Ogbourne, S.M., 2016. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, pp.18988–19001.
- Balachandran, N. et al., 2016. Potent inhibition of 3-deoxy-d-arabinoheptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase by DAHP oxime, a phosphate group mimic. *Biochemistry*, 55(48), pp.6617–6629.
- Balasubramanian, S. et al., 1991. Inhibition of chorismate synthase by (6R)- and (6S)-6-fluoro-5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate. *Journal of the American Chemical Society*, 113(23), pp.8945–8946.
- Balinsky, B.Y.D. & Daviest, D.D., 1961. Aromatic biosynthesis in higher plants. *Biochemical Journal*, 80(2), pp.300–304.
- Balinsky, D. & Davies, D.D., 1961. c. 2. Mode of attachment of shikimic acid and dehydroshikimic acid to dehydroshikimic reductase. *Biochemical Journal*, 80(2), pp.296–300.
- Bikadi, Z. & Hazai, E., 2009. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. *Journal of Chemoinformatics*, 1(15), pp.1–16.
- Birnboim, H.C. & Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), pp.1513–1523.
- Bolivar, F. et al., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2, pp.95–113.
- Bornhorst, J.A. & Falke, J.J., 2000. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology*, 326, pp.245–254.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Brooks, B.R. et al., 2009. CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10), pp.1545–1614.
- Campbell, S. a. A. et al., 2004. A complete shikimate pathway in *Toxoplasma gondii*: an ancient eukaryotic innovation. *International Journal for Parasitology*, 34(1), pp.5–13.
- CDDEP, 2017. Resistance Map. *The center for disease dynamics, economics and policy*. Available at: <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php> [Accessed May 8, 2018].
- Chaudhuri, S., Anton, I.A. & Coggins, J.R., 1987. Shikimate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Methods in enzymology*, 142, pp.315–320.
- ChemAxon, 2014. Marvin 14.9.22.0. (<http://www.chemaxon.com>).
- Chen, Y., 2015. Beware of docking! *Trends Pharmacol Sci*, 36(2), pp.78–95.
- Cheng, Y.-C. & Prusoff, W.H., 1973. Relationship between the inhibition constant and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*, 22, pp.3099–3108.
- Clark, W. et al., 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *The*

- Journal of Organic Chemistry*, 43, pp.2923–2925.
- Davies, G.M. et al., 1994. (6S)-6-Fluoroshikimic Acid, an antibacterial agent acting on the aromatic biosynthetic pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(2), pp.403–406.
- Dell, K.A. & Frost, J.W., 1993. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 115(24), pp.11581–11589.
- Dian, C. et al., 2002. Overcoming protein instability problems during fusion protein cleavage. *Life Science News*, 10.
- Dias, M.V.B. et al., 2011. Structural investigation of inhibitor designs targeting 3-dehydroquinate dehydratase from the shikimate pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Biochemical Journal*, 436(3), pp.729–739.
- Diaz, J. & Merino, F., 1997. Shikimate dehydrogenase from pepper (*Capsicum annuum*) seedlings. Purification and properties. *Physiologia Plantarum*, 100(1), pp.147–152.
- Diaz Quiroz, D.C. et al., 2014. Current perspectives on applications of shikimic and aminoshikimic acids in pharmaceutical chemistry. *Research and Reports in Medicinal Chemistry*, 4, pp.35–46.
- Emsley, P. et al., 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66, pp.486–501.
- Etchegaray, J.P. & Inouye, M., 1999. Translational enhancement by an element downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(15), pp.10079–10085.
- Floss, H.G., Yu, T.-W. & Arakawa, K., 2011. The biosynthesis of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the precursor of mC7N units in ansamycin and mitomycin antibiotics: a review. *Journal of Antibiotics*, 64(1), pp.35–44.
- Fonseca, I.O. et al., 2007. Kinetic and chemical mechanisms of shikimate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 457(2), pp.123–133.
- Founou, R.C., Founou, L.L. & Essack, S.Y., 2017. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 12(12), pp.1–18.
- Gan, J. et al., 2007. Structural and biochemical analyses of shikimate dehydrogenase AroE from *Aquifex aeolicus*: implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry*, 46(33), pp.9513–9522.
- García-Guevara, F. et al., 2017. Cofactor specificity switch in Shikimate dehydrogenase by rational design and consensus engineering. *Protein Engineering, Design and Selection*, 30(8), pp.533–541.
- Garcia, S. et al., 2017. The role of the *ydiB* gene, which encodes quinate/shikimate dehydrogenase, in the production of quinic, dehydroshikimic and shikimic acids in a PTS- strain of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 27(1), pp.11–21.
- Gekko, K. & Timasheff, S.N., 1981. Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*, 20(16), pp.4667–4676.
- Gonzalez-Bello, C., 2016. Inhibition of shikimate kinase and type II dehydroquinase for antibiotic discovery: structure-based design and simulation studies. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(9), pp.960–977.
- Gordon, S. et al., 2015. Selective *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase inhibitors as potential antibacterials. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 7, pp.9–20.
- Grosdidier, A., Zoete, V. & Michielin, O., 2011. Fast docking using the CHARMM force field with EADock DSS. *Journal of Computational Chemistry*, 32(10), pp.2149–2159.
- Grosdidier, A., Zoete, V. & Michielin, O., 2011. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Research*, 39, pp.270–277.
- Halgren, T.A., 1996. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, 17, pp.490–519.
- Han, C. et al., 2006. Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from *Helicobacter pylori*. *The FEBS Journal*, 273(20), pp.4682–4692.
- Harder, D. et al., 2008. DtpB ( YhiP ) and DtpA ( TppB , YdgR ) are prototypical proton-dependent peptide transporters of *Escherichia coli*. *FEBS Journal*, 275, pp.3290–3298.
- Herrmann, K.M. & Weaver, L.M., 1999. The Shikimate Pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, pp.473–503.
- Hsu, K.-C. et al., 2013. Pathway-based screening strategy for multitarget inhibitors of diverse proteins in metabolic pathways. *PLoS Computational Biology*, 9(7), pp. 1-14.
- Huey, R. et al., 2007. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, 28(6), pp.1145–1152.
- Jancauskas, J., 2006. *Strategies for improving synthesis of 3-dehydroshikimic acid and shikimic acid from d-glucose*. Michigan State University. A thesis for the degree of Master of Science. Department of Chemistry.
- Jenny, R.J., Mann, K.G. & Lundblad, R.L., 2003. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins

- with thrombin and factor Xa. *Protein Expression and Purification*, 31(1), pp.1–11.
- Juminaga, D. et al., 2012. Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), pp.89–98.
- Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A., 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians. *J Anesthesiol Clin Pharmacol*, 33(3), pp.300–305.
- Kappes, B. et al., 2013. The shikimate pathway in apicomplexan parasites: implications for drug development. *Frontiers in Bioscience*, 18(3), pp.944–969.
- Kenneth, T., Joski, P. & Johnston, K., 2018. Antibiotic-resistant infection treatment costs have doubled since 2002, now exceeding \$2 billion annually. *Health Affairs*, 37(4), pp.662–669.
- Kimple, M.E., Brill, A.L. & Pasker, R.L., 2013. Overview of affinity tags for protein purification. *Current Protocols in Protein Science*, 73, p.Unit-9.9.
- Krämer, M. et al., 2003. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metabolic Engineering*, 5(4), pp.277–283.
- Krieger, E. & Vriend, G., 2002. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA — a self-parameterizing force field. *Proteins*, 47(3), pp.393–402.
- Kubota, T. et al., 2013. Characterization of shikimate dehydrogenase homologues of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(18), pp.8139–8149.
- Li, C. et al., 2011. Green tea polyphenols control dysregulated glutamate dehydrogenase in transgenic mice by hijacking the ADP activation site. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(39), pp.34164–34174.
- Light, S.H. et al., 2012. Structural analysis of a 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase with an N-terminal chorismate mutase-like regulatory domain. *Protein Science*, 21(6), pp.887–895.
- Maclean, J. et al., 2000. Crystallization and preliminary X-ray analysis of shikimate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica*, 56(4), pp.512–515.
- Maeda, H. & Dudareva, N., 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63, pp.73–105.
- Martínez, J.A., Bolívar, F. & Escalante, A., 2015. Shikimic acid production in *Escherichia coli*: from classical metabolic engineering strategies to omics applied to improve its production. *Frontiers in Biotechnology and Bioengineering*, 3(145), pp.1–16.
- McCloskey, P. et al., 1972. Inhibitors of shikimate dehydrogenase as potential herbicides. *Pesticide Science Sci.*, 3, pp.113–120.
- Michel, G. et al., 2003. Structures of shikimate dehydrogenase AroE and its paralog YdiB: A common structural framework for different activities. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), pp.19463–19472.
- Miller, M.J. et al., 1994. EPSP synthase inhibitor design IV. New aromatic substrate analogs and symmetrical inhibitors containing novel 3-phosphate mimics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 4(21), pp.2605–2608.
- Mir, R., Jallu, S. & Singh, T.P., 2015. The shikimate pathway: review of amino acid sequence, function and three-dimensional structures of the enzymes. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(2), pp.172–189.
- Molsoft, 2015. <http://www.molsoft.com/>.
- Montchamp, J.-L. & Frost, J.W., 1997. Cyclohexenyl and cyclohexylidene inhibitors of 3-dehydroquinate synthase: active site interactions relevant to enzyme mechanism and inhibitor design. *Journal of the American Chemical Society*, 119(33), pp.7645–7653.
- Payne, J.W., 1974. Peptide transport in *Escherichia coli*: permease specificity towards terminal amino group substituents. *Journal of General Microbiology*, 80, pp.269–276.
- Peek, J. et al., 2013. Insights into the function of Rfl2: structural and biochemical investigation of a new shikimate dehydrogenase family protein. *Biochimica et Biophysica Acta- Proteins and Proteomics*, 1834(2), pp.516–523.
- Peek, J. & Christendat, D., 2015. The shikimate dehydrogenase family: functional diversity within a conserved structural and mechanistic framework. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 566, pp.85–99.
- Peek, J., Shi, T. & Christendat, D., 2014. Identification of novel polyphenolic inhibitors of shikimate dehydrogenase (AroE). *Journal of Biomolecular Screening*, 19(7), pp.1090–1098.
- Piehlér, L.T. et al., 1991. Predicting inhibition of dehydroquinate synthase. *Tetrahedron*, 47(14), pp.2423–2432.
- Prabhala, B.K. et al., 2014. New insights into the substrate specificities of proton-coupled oligopeptide transporters from *E. coli* by a pH sensitive assay. *FEBS Letters*, 588(4), pp.560–565.
- Prado, V. et al., 2016. Targeting the motion of shikimate kinase: development of competitive inhibitors that stabilize an inactive open conformation of the enzyme. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(11), pp.5471–5487.
- Qing, G. et al., 2004. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22, pp.877–882.



- Ramkumar, N., Raghavendra, M.S. & Nagarajan, R., 2014. Friedel – crafts cyclodehydration approach toward the synthesis of ellipticine and 9-methoxyellipticine. *SYNLETT*, 25, pp.2791–2793.
- Ratia, K. et al., 2014. Discovery of selective inhibitors of the *Clostridium difficile* dehydroquinase dehydratase. *PLoS ONE*, 9(2), p.e89356.
- Roberts, F. et al., 1998. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature*, 393(6687), pp.801–805.
- Sánchez-Abella, L. et al., 2009. Synthesis, conformational analysis, and biological evaluation of 19-nor-vitamin D<sub>3</sub> analogues with A-ring modifications. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, pp.6158–6162.
- Sánchez-Abella, L. et al., 2007. Synthesis and biological evaluation of new 6-s cis locked 1,2,25-trihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, pp.4193–4202.
- Sanchez-Linares, I. et al., 2012. High-throughput parallel blind virtual screening using BINDSURF. *BMC bioinformatics*, 13, p.S13.
- Schrödinger, 2014. Maestro, versión 9.9.
- Schrödinger, L., 2015. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.
- Segel, I.H., 1993. *Enzyme Kinetics: Behaviour and Analysis of Rapid Equilibria and Steady-State Equilibria.*, New York: John Wiley and Sons.
- Sharma, R.C. & Schimke, R.T., 1996. Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *BioTechniques*, 20(1), pp.42–44.
- Shirano, Y. & Shibata, D., 1990. Low temperature cultivation of *Escherichia coli* carrying a rice lipoxygenase L-2 cDNA produces a soluble and active enzyme at a high level. *FEBS Letters*, 271(1–2), pp.128–130.
- Sikorski, J.A. et al., 1993. EPSP synthase: the design and synthesis of bisubstrate inhibitors incorporating novel 3-phosphate mimics. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 76(1–4), pp.115–118.
- Simithy, J. et al., 2014. Identification of shikimate kinase inhibitors among anti-*Mycobacterium tuberculosis* compounds by LC-MS. *Tuberculosis*, 94(2), pp.152–158.
- Simpson, R.J. & Davidson, B.E., 1976. Studies on 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthetase (phe) from *Escherichia coli* K12. 2. Kinetic properties. *European Journal of Biochemistry*, 70(2), pp.501–507.
- Singh, G., Jiang, S. & Singh, G., 1998. Chemical synthesis of shikimic acid and its analogues. *Tetrahedron*, 54(449), pp.4697–4753.
- Singh, S. et al., 2008. A phylogenomic analysis of the shikimate dehydrogenases reveals broadscale functional diversification and identifies one functionally distinct subclass. *Molecular Biology and Evolution*, 25(10), pp.2221–2232.
- Singh, S. & Christendat, D., 2006. Structure of *Arabidopsis* dehydroquinase dehydratase-shikimate dehydrogenase and implications for metabolic channeling in the shikimate pathway. *Biochemistry*, 45(25), pp.7787–7796.
- Steinrücken, H.C. & Amrhein, N., 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 94, pp.1207–1212.
- Stewart, J.J.P., 2009. Application of the PM6 method to modeling proteins. *Journal of Molecular Modeling*, 15(7), pp.765–805.
- Sumiyoshi, T. et al., 2003. Molecular Assembly of C<sub>2</sub>-Symmetric Bis-(2S)-2-methyldodecanoylamides of  $\alpha$ -Alkylidenediamines into Coiled Coil and Twisted Ribbon Aggregates. *Journal of the American Chemical Society*, 125, pp.12137–12142.
- Taylor, J. et al., 2014. *Estimating the economic costs of antimicrobial resistance: model and results*,
- Trott, O. & Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), pp.455–461.
- Vagenende, V., Yap, M.G.S. & Trout, B.L., 2009. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*, 48(46), pp.11084–11096.
- Waugh, D.S., 2011. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expression and Purification*, 80(2), pp.283–293.
- Whipp, M. J., Camakaris, H. & Pittard, A. J., 1998. Cloning and analysis of the *shiA* gene, which encodes the shikimate transport system of *Escherichia coli* K-12. *Gene*, 209(1–2), pp.185–192.
- Woodcock, D.M. et al., 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research*, 17, pp.3469–3478.
- World Health Organization, 2017. *Global priority list of antibiotic-resistance bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*,
- Zhang, Y.-M. & Rock, C.O., 2004. Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(30), pp.30994–31001.

## ANEXOS

### ÍNDICE

#### Síntesis química de compuestos derivados del shikimato

*Predicción de solubilidad de compuestos modelo*

*Cribado virtual de estructuras modelo contra la enzima EcSDH*

*Caracterización química de amidas derivadas del SA*

Espectros de  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , IR-FT y Masas de **2**

Espectros de  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , IR-FT y Masas de **3a**

Espectros de  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , IR-FT y Masas de **3b**

Espectros de  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , IR-FT y Masas de **3c**

Espectros de  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , IR-FT y Masas de **3d**

Espectros de  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , IR-FT y Masas de **4a**

Espectros de  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , IR-FT y Masas de **4b**

Espectros de  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , IR-FT y Masas de **4c**

#### Estudios de acople molecular

*Modos de unión de las amidas sintetizadas al sitio catalítico de EcSDH*

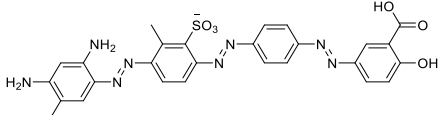
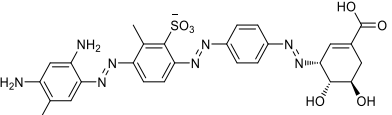
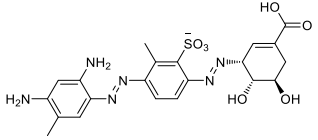
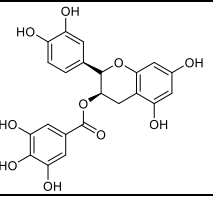
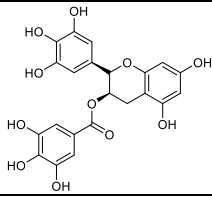
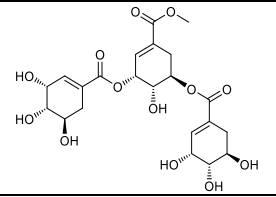
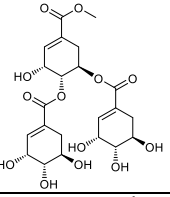
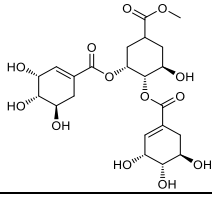
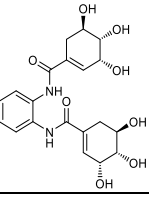
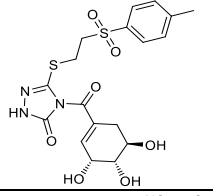
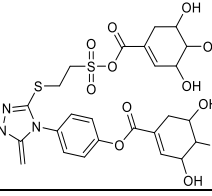
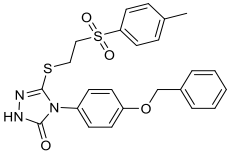
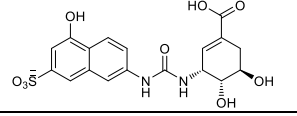
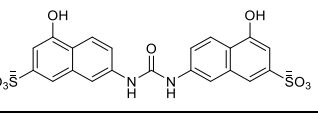
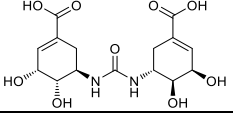
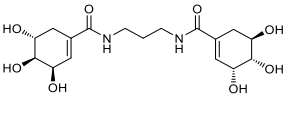
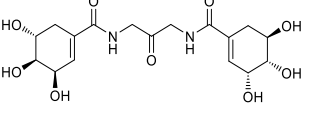
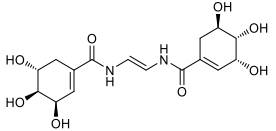
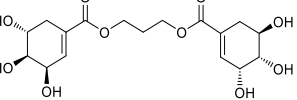
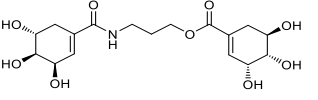
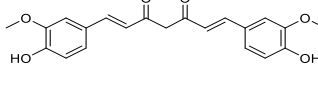
*Modos de unión del SA e inhibidor competitivo vainillina a la enzima EcSDH*

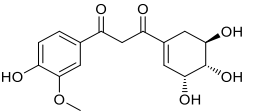
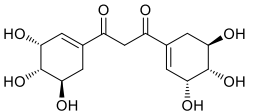
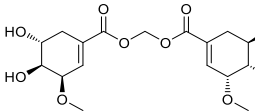
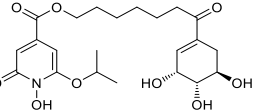
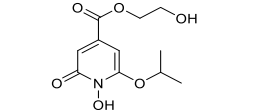
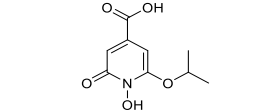
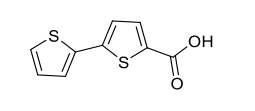
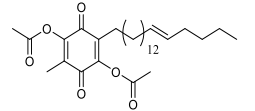
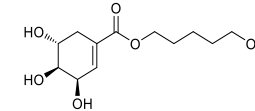
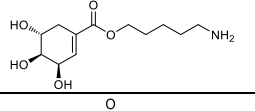
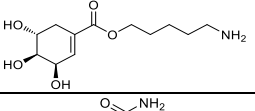
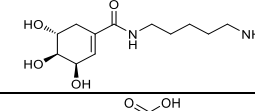
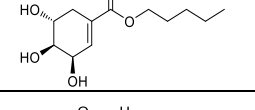
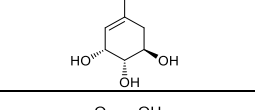
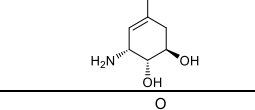
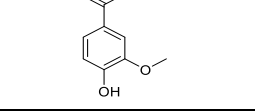
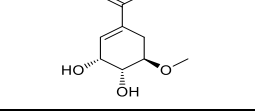
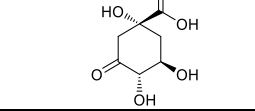
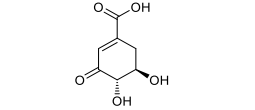
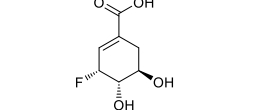
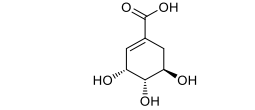
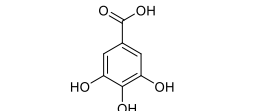
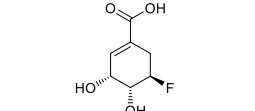
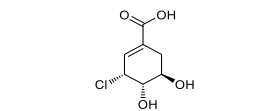
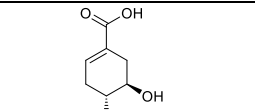
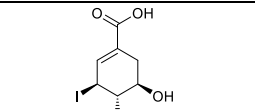
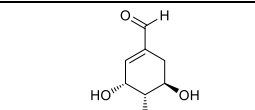
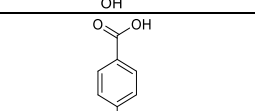
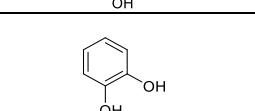
*Análisis de conformeros en equilibrio contra el modelado en acople molecular*

#### Artículo publicado

## Síntesis química de compuestos derivados del shikimato

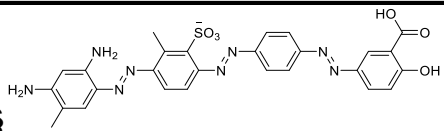
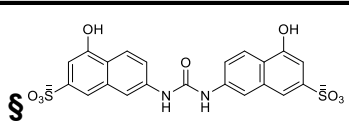
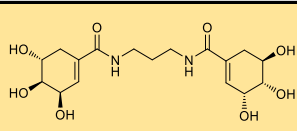
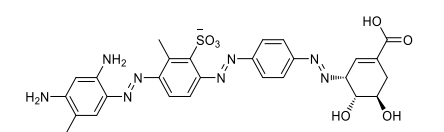
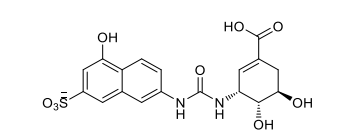
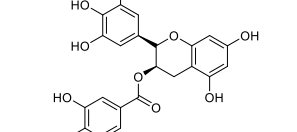
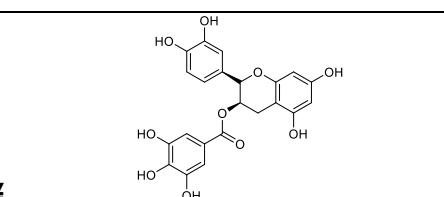
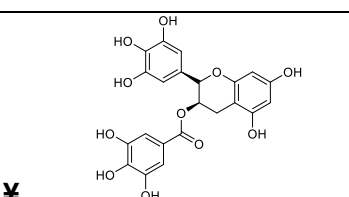
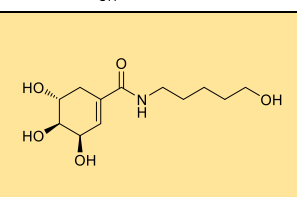
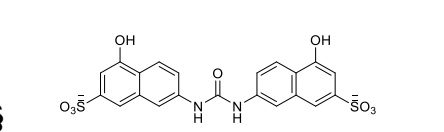
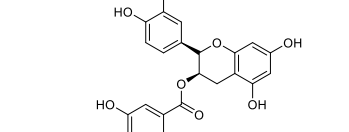
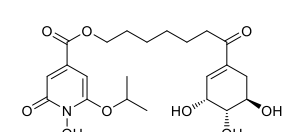
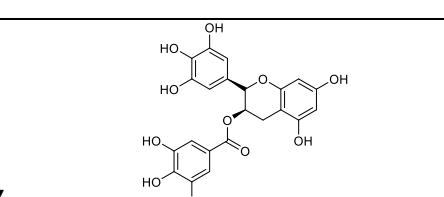
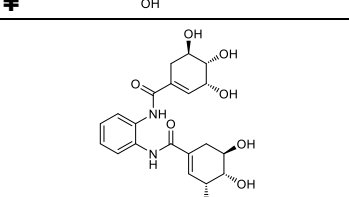
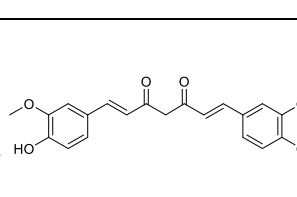
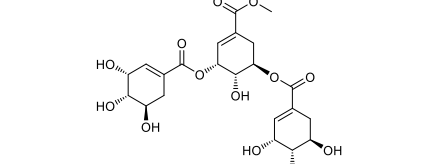
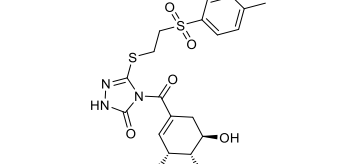
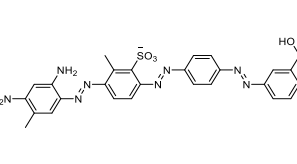
### Predicción de solubilidad de compuestos modelo

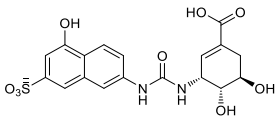
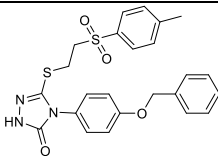
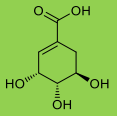
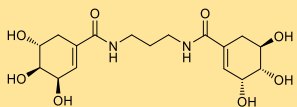
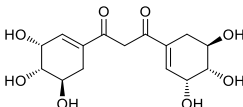
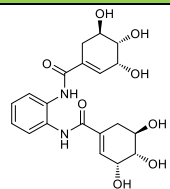
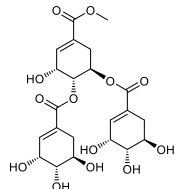
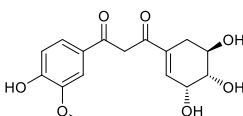
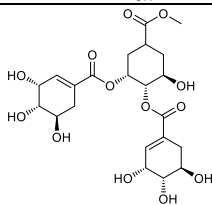
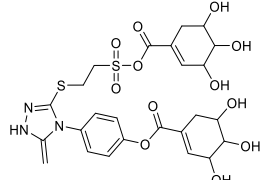
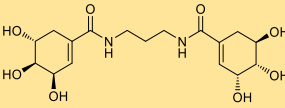
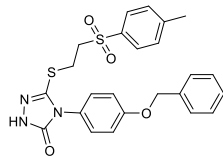
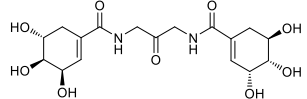
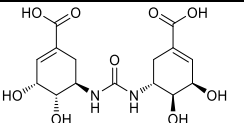
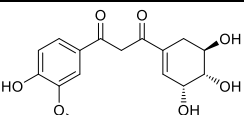
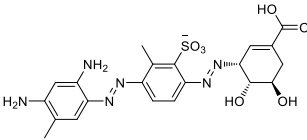
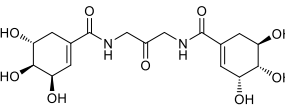
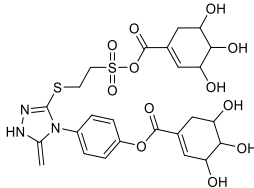
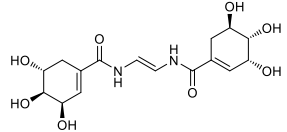
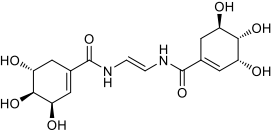
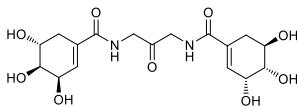
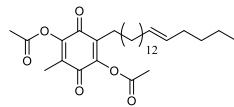
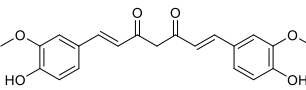
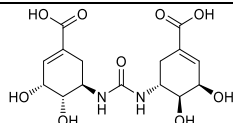
Estructura	LogP/LogS	Estructura	LogP/LogS	Estructura	LogP/LogS
	<b>6.95</b> -10.64		<b>4.74</b> -9.33		<b>1.97</b> -5.82
	<b>2.96</b> -4.34		<b>2.58</b> -3.76		-3.17 -1.71
	-3.17 -2.09		-3.17 -2.09		-2.50 -3.06
	-0.87 -3.72		-2.17 -3.38		<b>4.67</b> -5.89
	-0.39 -2.77		<b>1.49</b> -4.42		-2.27 -1.11
	-3.74 -0.84		-4.75 -1.72		-4.12 -1.53
	-2.23 -1.21		-2.98 -1.03		<b>3.41</b> -4.34

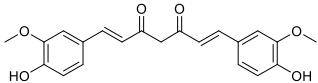
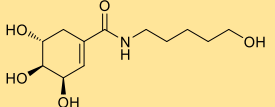
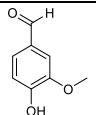
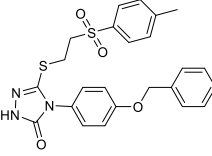
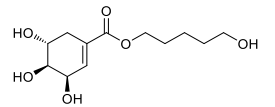
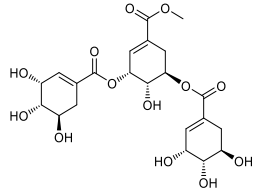
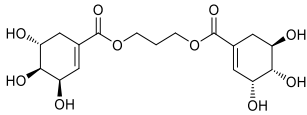
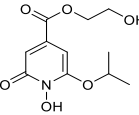
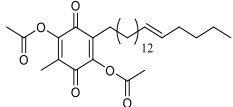
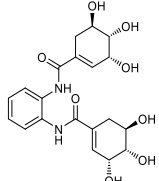
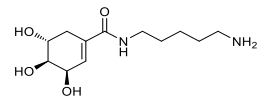

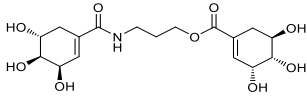
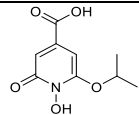
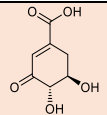
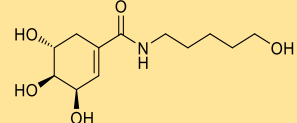
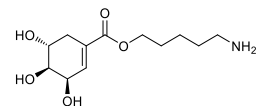
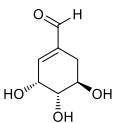
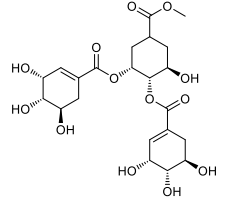
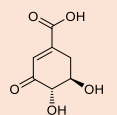
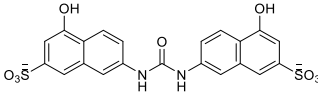
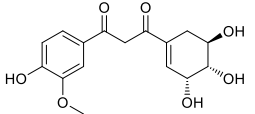
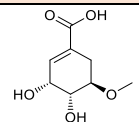
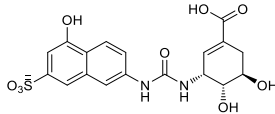
	-0.91 -1.67		-3.71 -0.36		-1.82 -0.33
	3.05 -3.70		0.18 -1.04		0.52 -1.34
	3.32 -2.80		7.84 -7.43		-0.41 -1.11
	-1.01 -1.38		-1.01 -1.38		-1.77 -1.20
	0.75 -2.23		-2.29 -0.61		-2.02 -0.28
	1.36 -1.61		-1.01 0.03		-2.73 -0.17
	-1.47 -0.44		-0.38 -0.95		-1.53 -0.43
	0.55 -0.80		-0.38 -0.95		-0.60 -0.63
	-0.19 -0.69		-0.34 -1.18		-1.44 -0.76
	1.30 -1.47		1.22 -1.13		

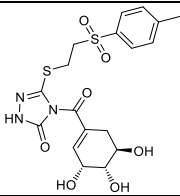
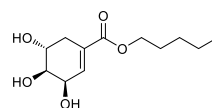
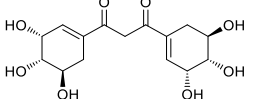
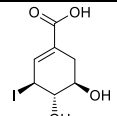
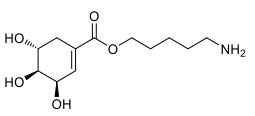
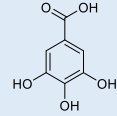
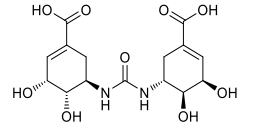
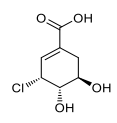
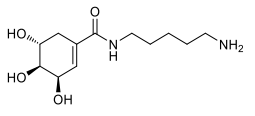
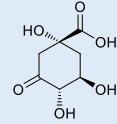
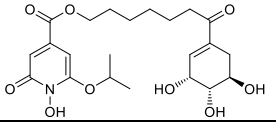
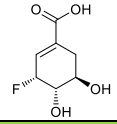
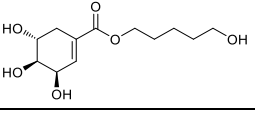
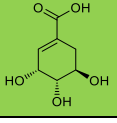
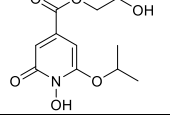
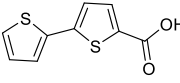
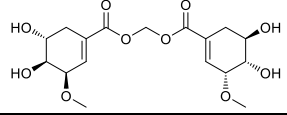
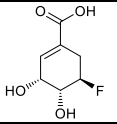
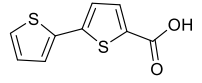
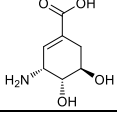
LogP= coeficiente de partición octanol: agua, más positivos más insolubles (rojo), 5 es insoluble. LogS= solubilidad en agua (Log (mol/L)). Molsoft.

## Cribado virtual de estructuras modelo contra la enzima EcSDH

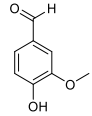
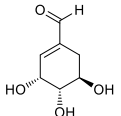
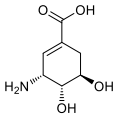
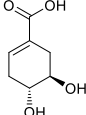
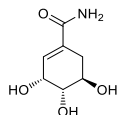
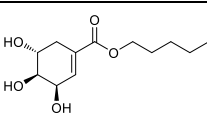
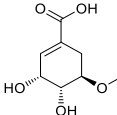
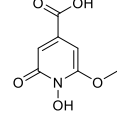
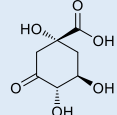
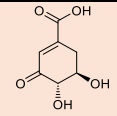
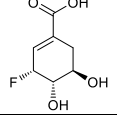
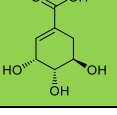
Rank	SwissDock		Blind Docking Server		Molecular Docking Server	
	Estructura	$\Delta G_{\text{unión}} / \text{FullFitness}$	Estructura	$\Delta G_{\text{unión}} / \text{Frecuencia}$	Estructura	$\Delta G_{\text{unión}} / \text{Frecuencia}$
1	 §	-11.16 / -1182.77	 §	-9.90 / 67		-8.79 / 1
2		-11.10 / -1179.55		-9.60 / 58	 ¥	-6.71 / 1
3	 ¥	-10.98 / -1264.34	 ¥	-8.80 / 62		-5.71 / 3
4	 §	-10.83 / -1255.41	 ¥	-8.70 / 55		-5.63 / 1
5	 ¥	-10.78 / -1302.04		-8.60 / 67	 &	-5.58 / 1
6		-10.73 / -1234.56		-8.40 / 67	 §	-5.42 / 1

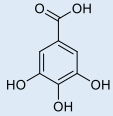
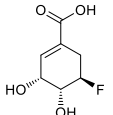
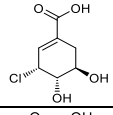
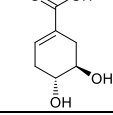
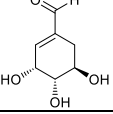
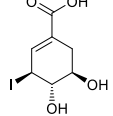
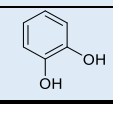
7		-10.51 / -1231.07	§ 	-8.30/ 72	SA 	-5.13 / 34
8		-10.31 / -1252.88		-7.80 / 82		-5.01 / 1
9		-9.96 / -1271.62		-7.70 / 84		-4.98 / 2
10		-9.75 / -1201.39		-7.70 / 65	§ 	-4.91 / 3
11		-9.41 / -1272.68		-7.70 / 64		-4.65 / 1
12		-9.33 / -1273.32		-7.60 / 62		-4.43/1
13		-9.28 / -1294.09		-7.50 / 84		-4.29 / 1
14	& 	-9.27 / -1220.92	& 	-7.40 / 81		-4.14 / 1

15	<b>&amp;</b>		-9.25 / -1289.41		-6.80 / 105		-3.77 / 21
16	<b>§</b>		-9.13 / -1256.28		-6.80 / 104		-3.75 / 1
17			-9.11 / -1293.30		-6.80 / 98	<b>&amp;</b> 	-3.71 / 1
18			-8.98 / -1273.15		-6.60 / 102	<b>Φ</b> 	-3.60 / 11
19			-8.97 / -1277.13	<b>ε</b> 	-6.50 / 104	<b>DHS</b> 	-3.52 / 18
20			-8.95 / -1276.91		-6.50 / 101		-3.51 / 5
21			-8.92 / -1246.09	<b>DHS</b> 	-6.20 / 115	<b>§</b> 	-2.90 / 1
22			-8.89 / -1281.79		-6.20 / 113		-1.98 / 1

23		-8.76 / -1272.38		-6.20 / 109	
24		-8.69 / -1224.5		-6.20 / 105	
25		-8.66 / -1296.26	$\Phi$ 	-6.00 / 115	
26		-8.36 / -1231.75		-6.00 / 109	
27		-8.30 / -1271.28	$\Phi$ 	-6.00 / 108	
28		-8.15 / -1261.97		-5.90 / 113	
29		-8.04 / -1285.21	<b>SA</b> 	-5.90 / 111	
30		-7.92 / -1296.82	$\boxtimes$ 	-5.90 / 105	
31		-7.83 / -1285.76		-5.80 / 117	
32	$\boxtimes$ 	-7.79 / -1245.12		-5.80 / 107	



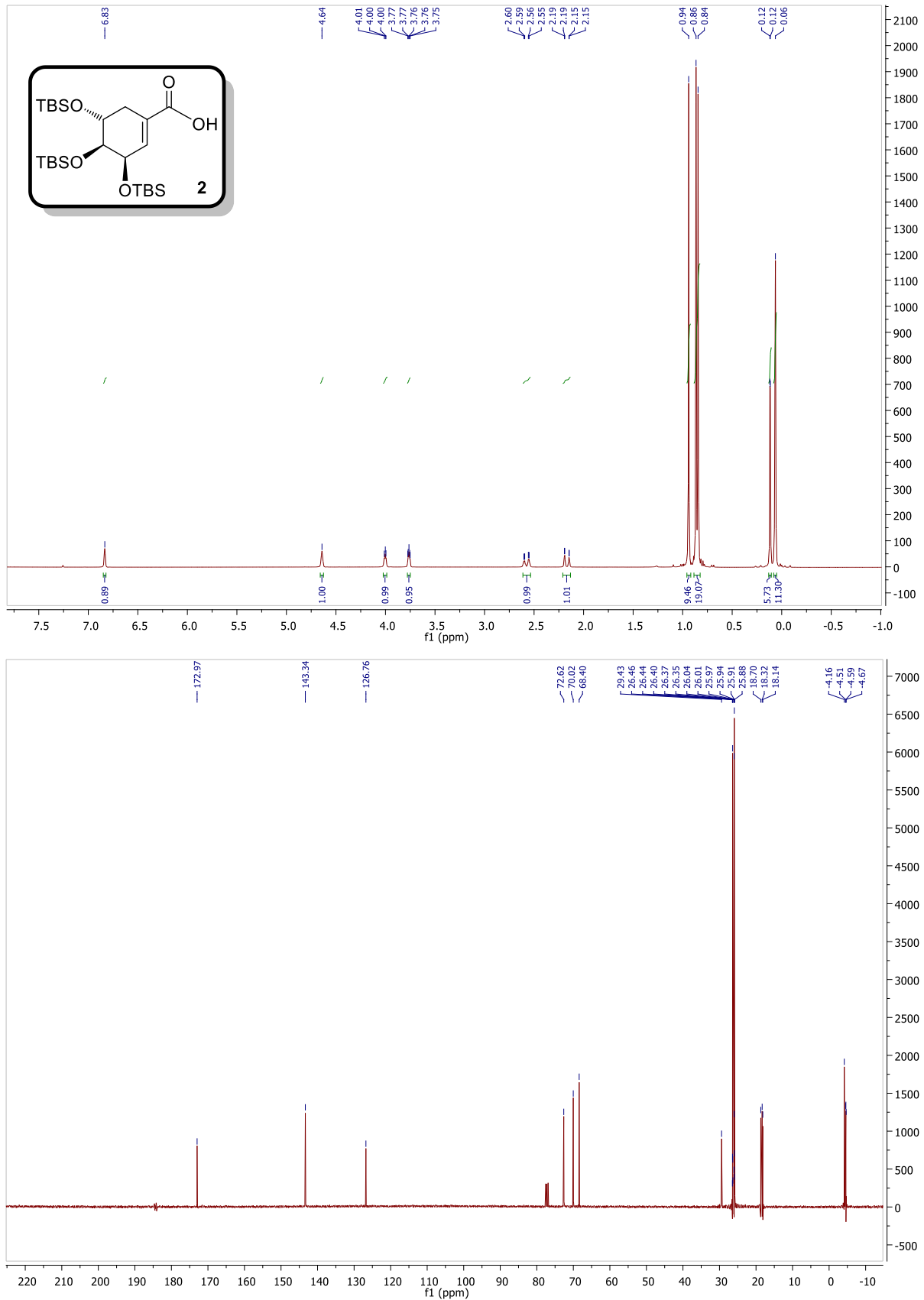
33	$\Phi$		-7.68 / -1252.98		-5.70 / 115		
34			-7.61 / -1265.39		-5.70 / 114		
35			-7.57 / -1284.06	$\Phi$	-5.60 / 114		
36			-7.52 / -1298.36	$\Phi$	-5.50 / 117		
37			-7.50 / -1265.28	$\Phi$	-4.60 / 127		
38	$\epsilon$		-7.44 / -1286.06				
39	$\Phi$		-7.12 / -1264.77				
40	DHS		-7.10 / -1201.78				
41			-6.87 / -1271.39				
42	SA		-6.74 / -1258.46				

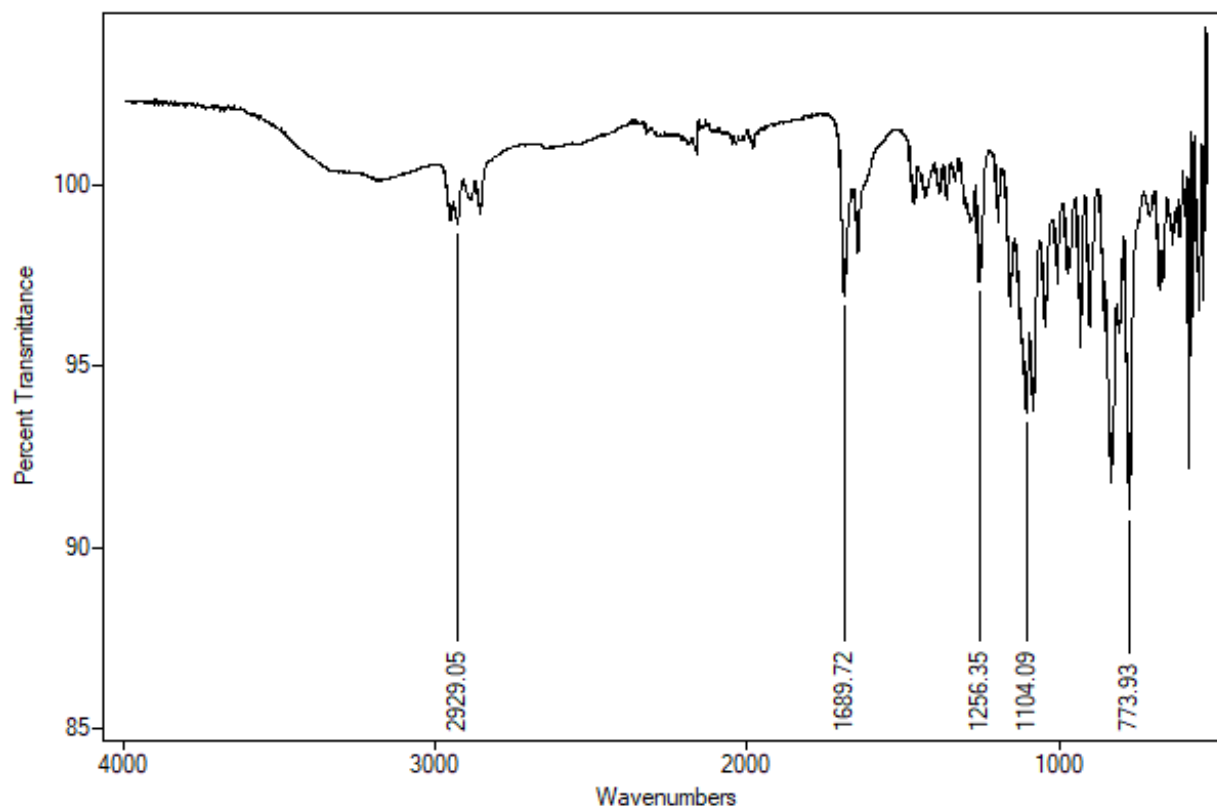
43	$\Phi$		-6.73 / -1275.26			
44			-6.71 / -1282.37			
45			-6.70 / -1301.26			
46			-6.58 / -1297.47			
47			-6.34 / -1270.87			
48			-6.20 / -1279.49			
49	$\Phi$		-6.11 / -1274.96			
50	$\Phi$		-5.86 / -1265.37			

$\Phi$  Inhibidores competitivos de la enzima SDH de *P. sativum* análogos al SA,  $\epsilon$  Inhibidores competitivos de la enzima SDH de *P. sativum* análogos al DHS, & Inhibidores polifenólicos de la enzima SDH de *H. pylori*,  $\ast$  Inhibidores polifenólicos de la enzima SDH de *P. putida*,  $\text{m}$  Inhibidores de la enzima SDH de *S. aureus* o *H. pylori* identificados mediante análisis *in silico*.

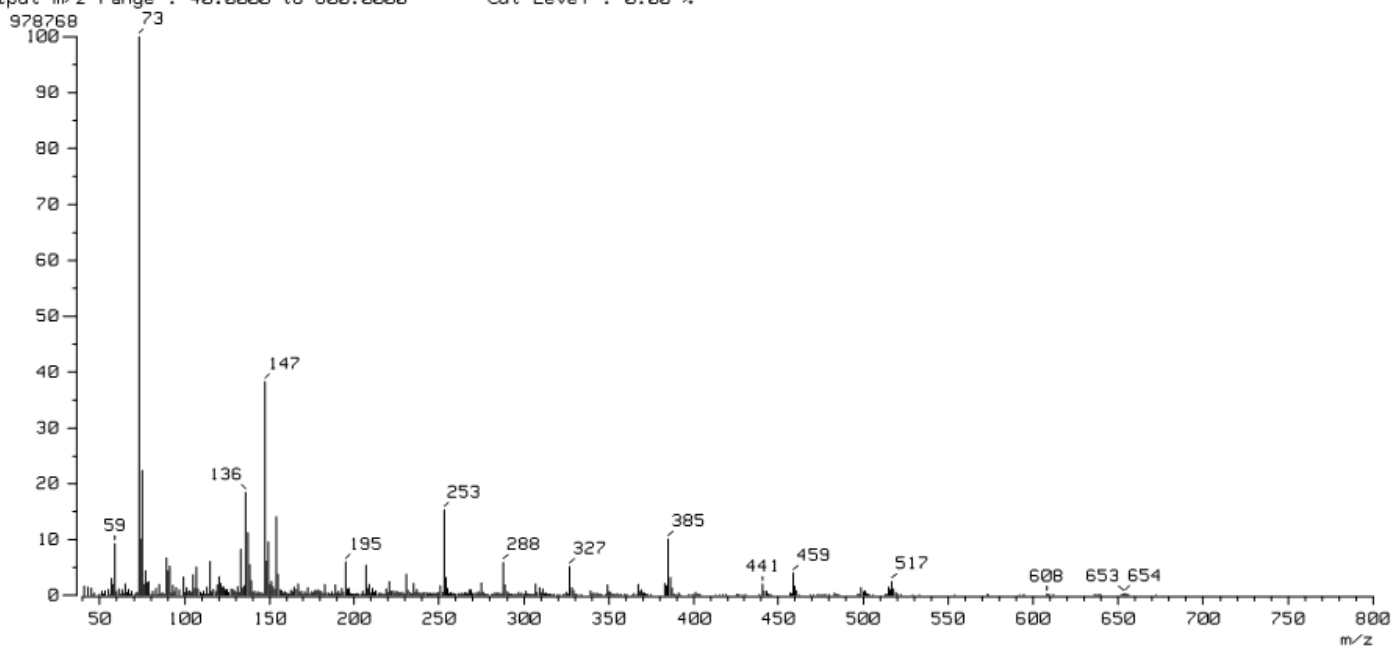
Se resalta en color naranja= posibles moléculas a sintetizar, rosa= DHS, verde= SA y azul= moléculas con  $K_i > K_m$  para SDH de *P. sativum*.

## Caracterización química de amidas derivadas del SA

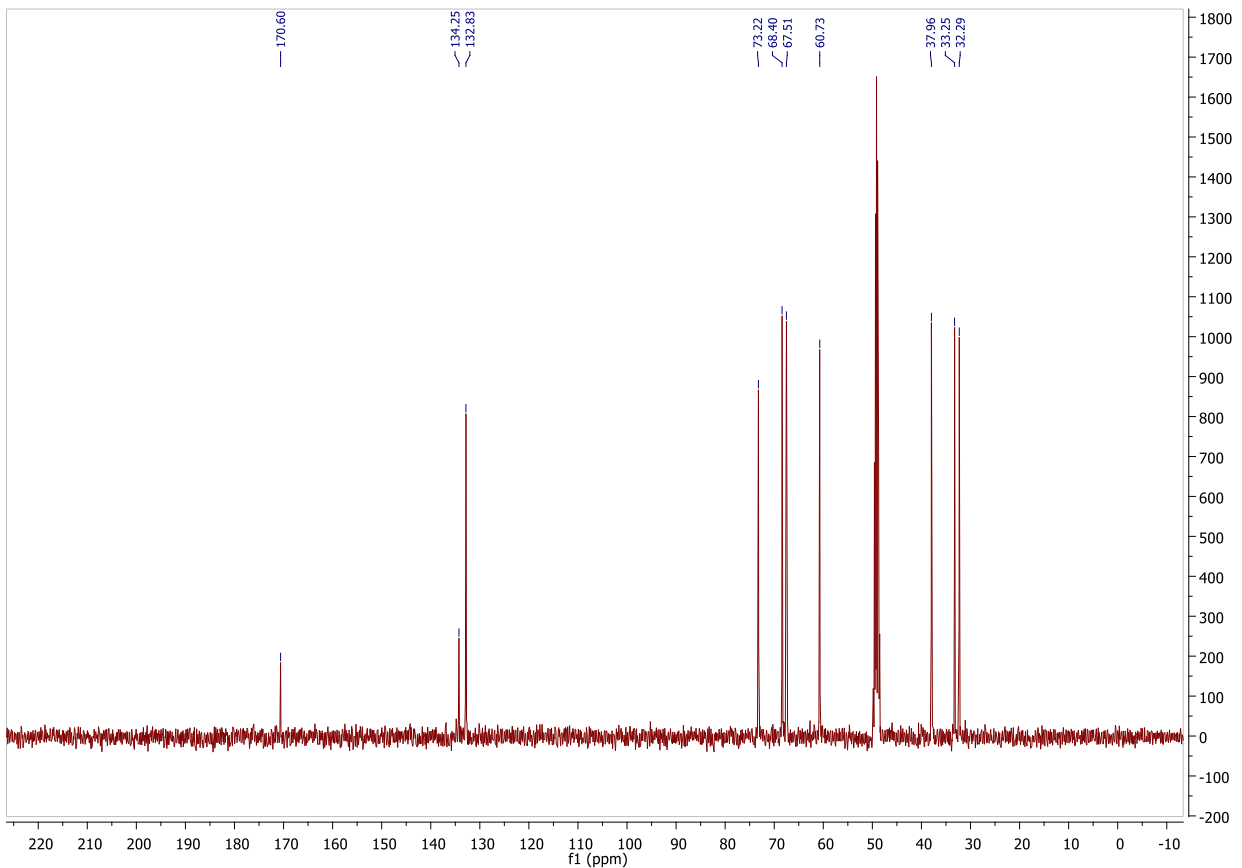
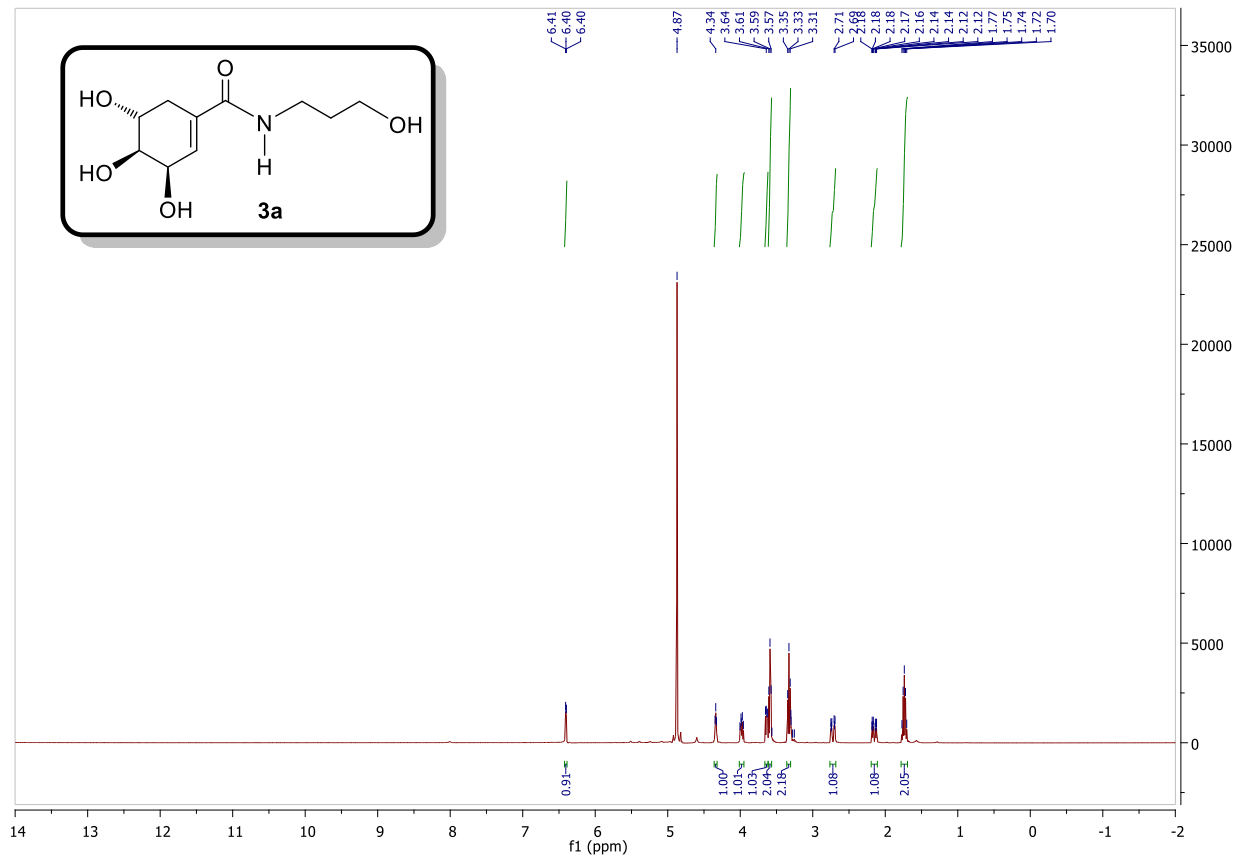
Espectros de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del ácido protegido **2**.



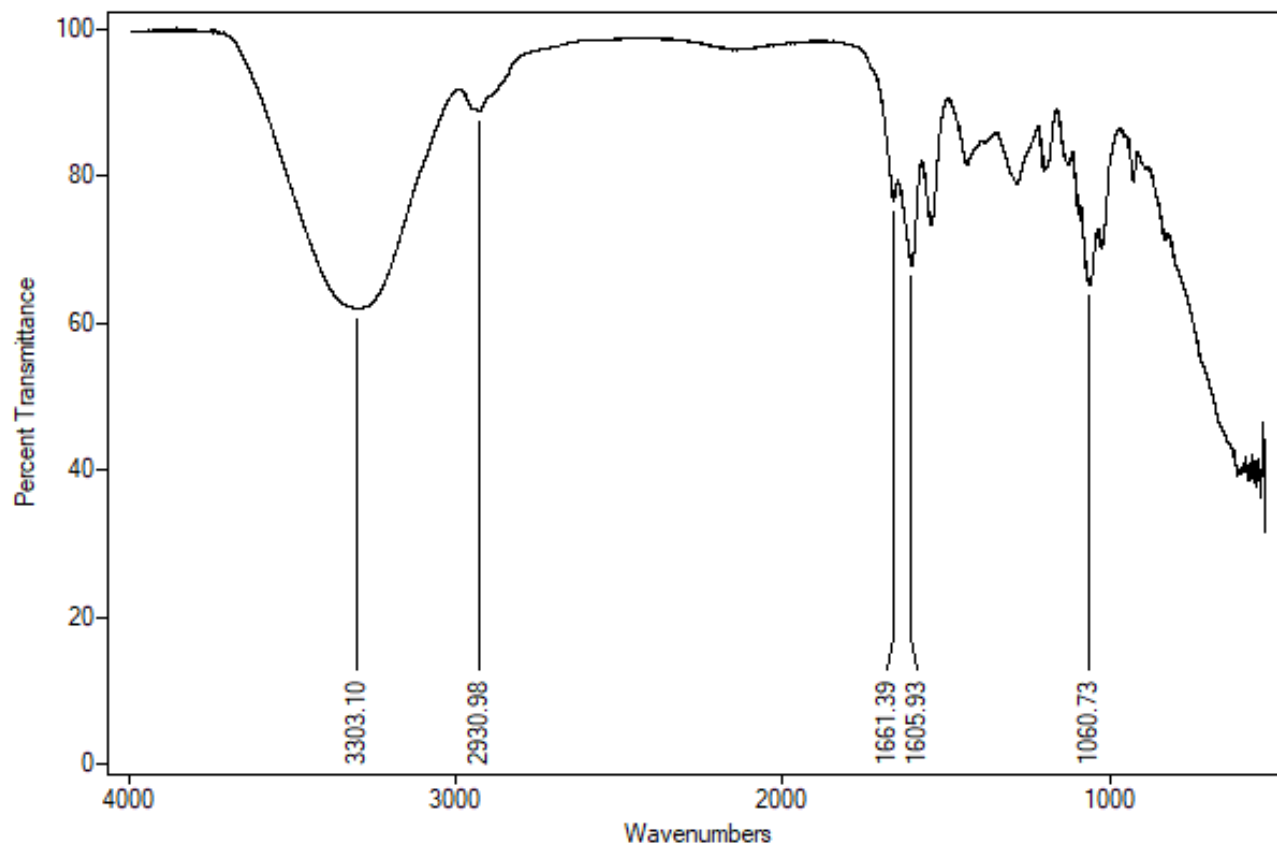
[ Mass Spectrum ]  
 Date : 24-Aug-2015 09:49  
 Data : MOP111 Operator name Ing.Victoria Labastida G  
 Sample: PFG044  
 Note : Dr.Mario Ordonez/Catalina Centro de Investigaciones Quimicas UREM  
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+  
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
 RT : 0.00 min Scan# : (1,2)  
 BP : m/z 73.0000 Int. : 93.34  
 Output m/z range : 40.0000 to 800.0000 Cut Level : 0.00 %



Espectros de IR-FT y HRMS del ácido protegido 2.

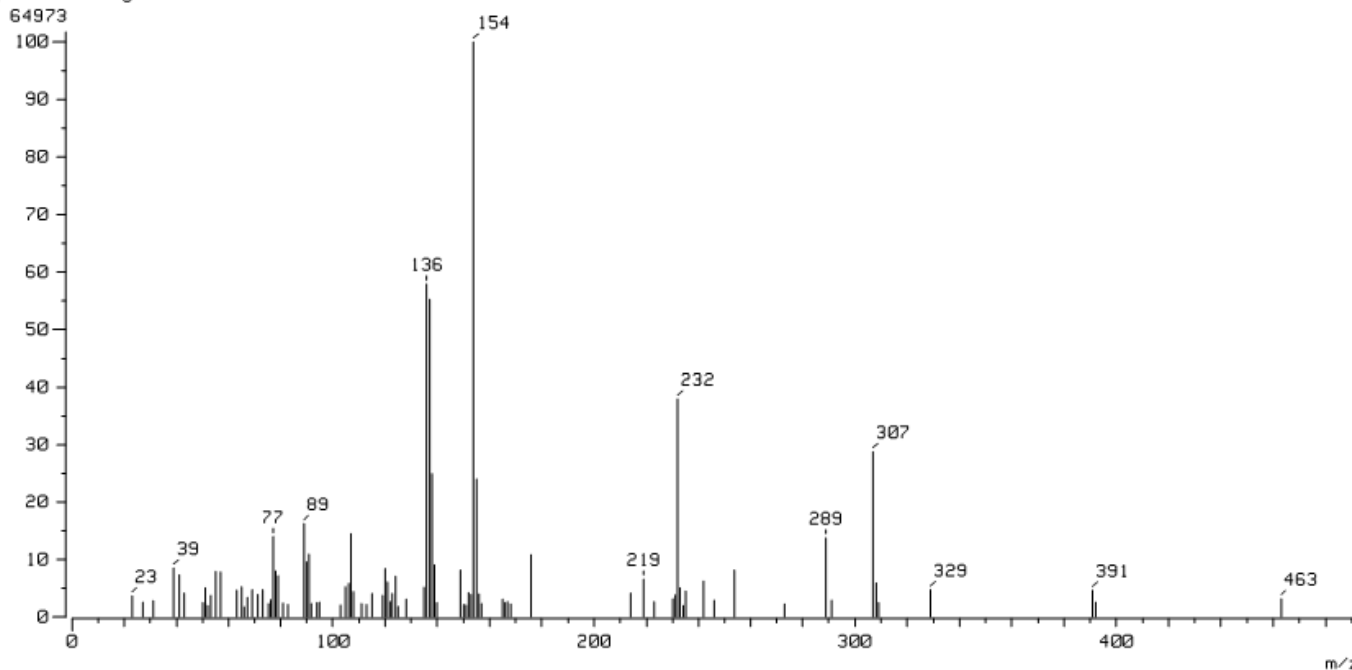


Espectros de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) y <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la monoamida **3a**.

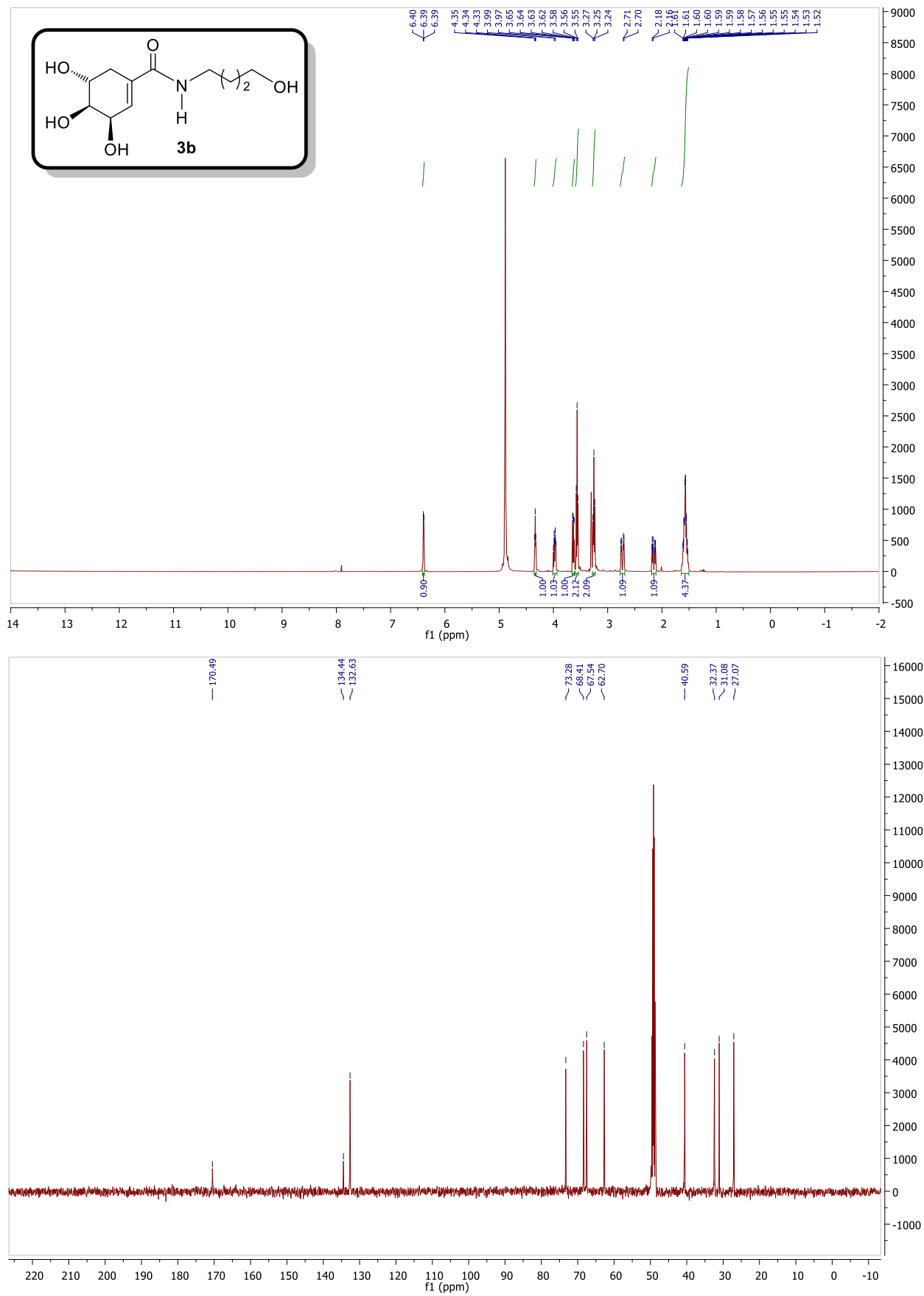


[ Mass Spectrum ]

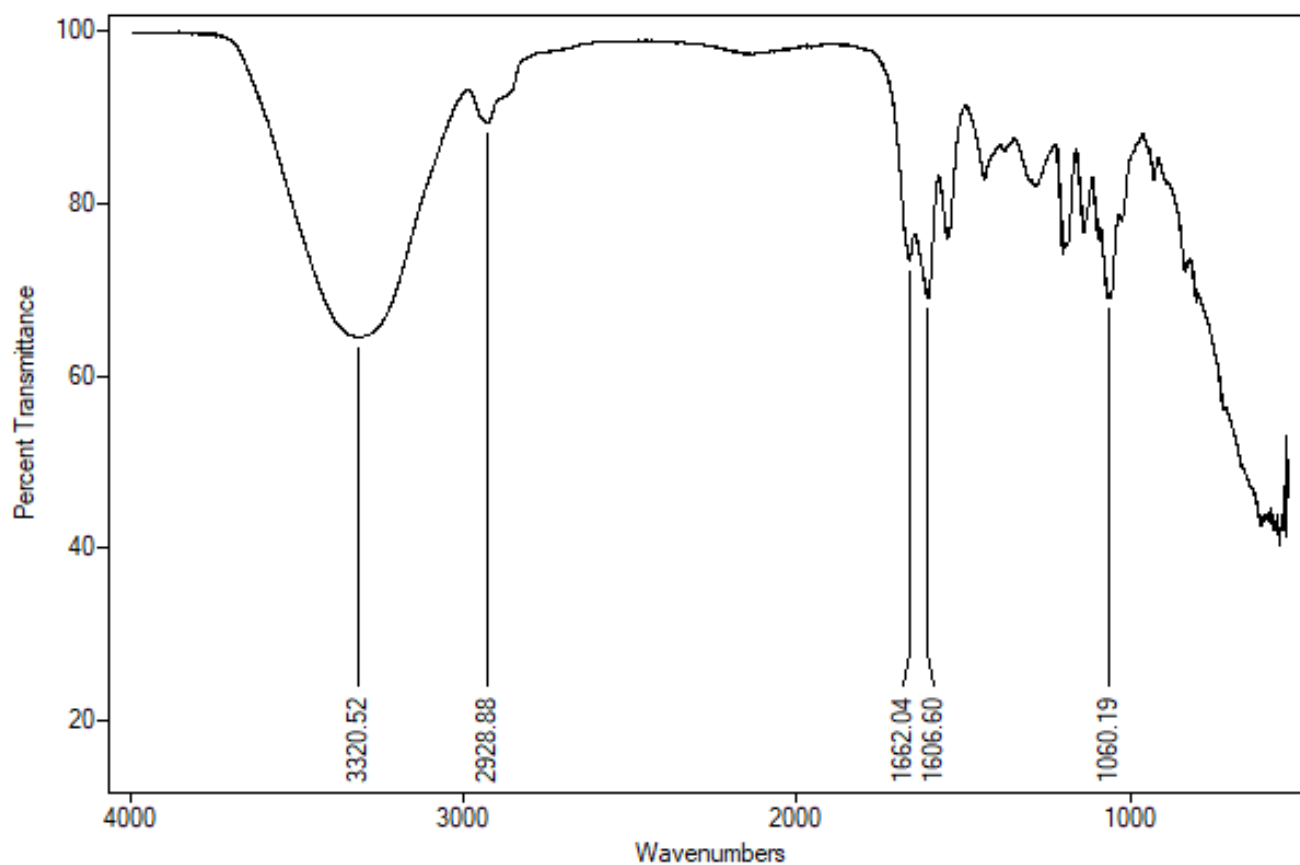
Data : MOP143 Date : 20-Nov-2015 11:49  
 Sample: PA6072 Operator name: Gabriela Vargas Instrument: MS  
 Note : Dr.Mario Ordonez/Dulce Centro de Investigaciones Quimicas UREM  
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+  
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
 RT : 0.33 min Scan# : 3  
 BP : m/z 154.0000 Int. : 6.09  
 Output m/z range : 0.0000 to 492.5816 Cut Level : 0.00 %



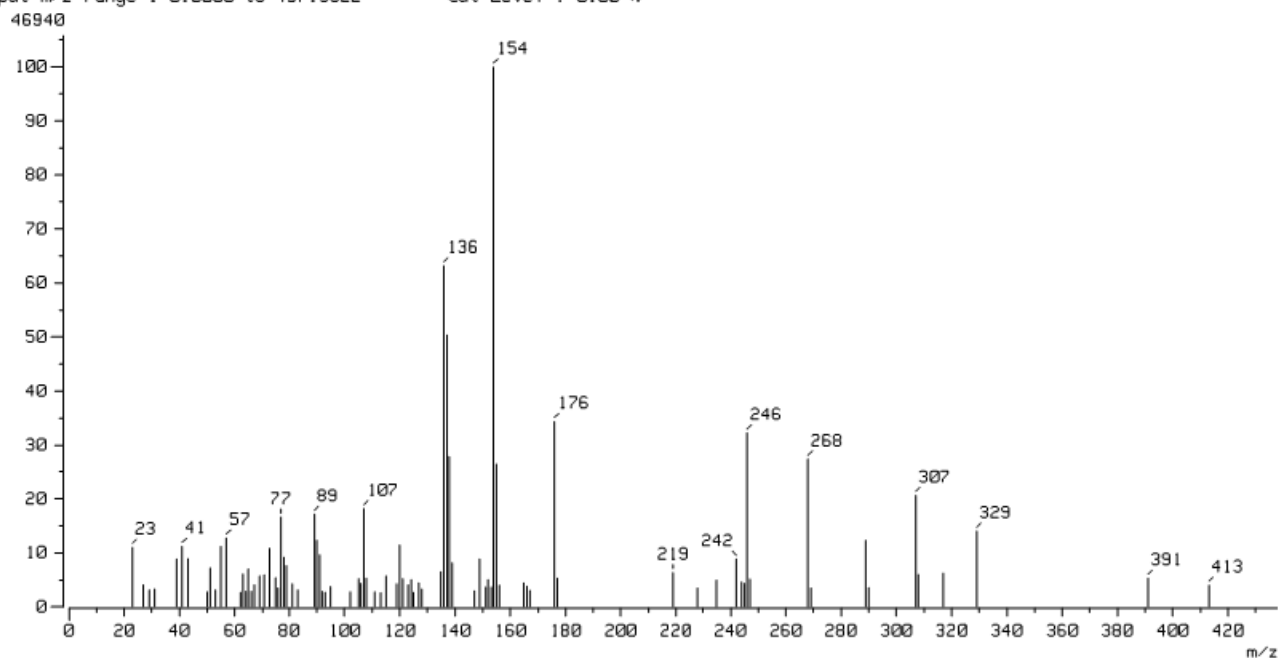
Espectros de IR-FT y HRMS de la monoamida **3a**.



Espectros de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) y <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la monoamida **3b**.

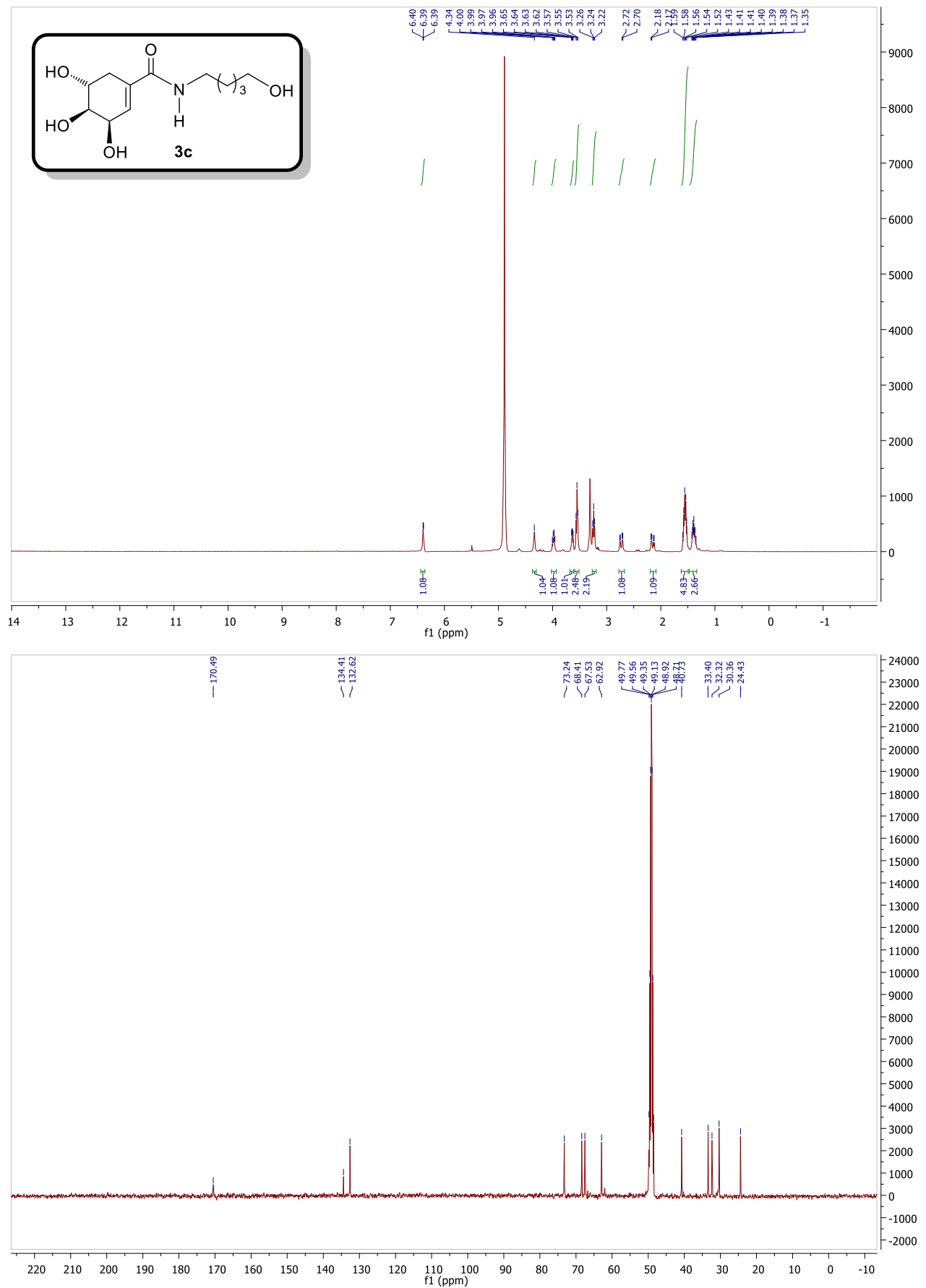


[ Mass Spectrum ]  
 Data : MOP141 Date : 20-Nov-2015 11:39  
 Sample: PR6073 Operator name: Gabriela Vargas Instrument: MS  
 Note : Dr.Mario Ordonez/Dulce Centro de Investigaciones Quimicas UREM  
 Inlet : Direct Ion Mode : FFB+  
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
 RT : 0.33 min Scan# : 3  
 BP : m/z 154.0000 Int. : 4.23  
 Output m/z range : 0.0000 to 437.9822 Cut Level : 0.00 %

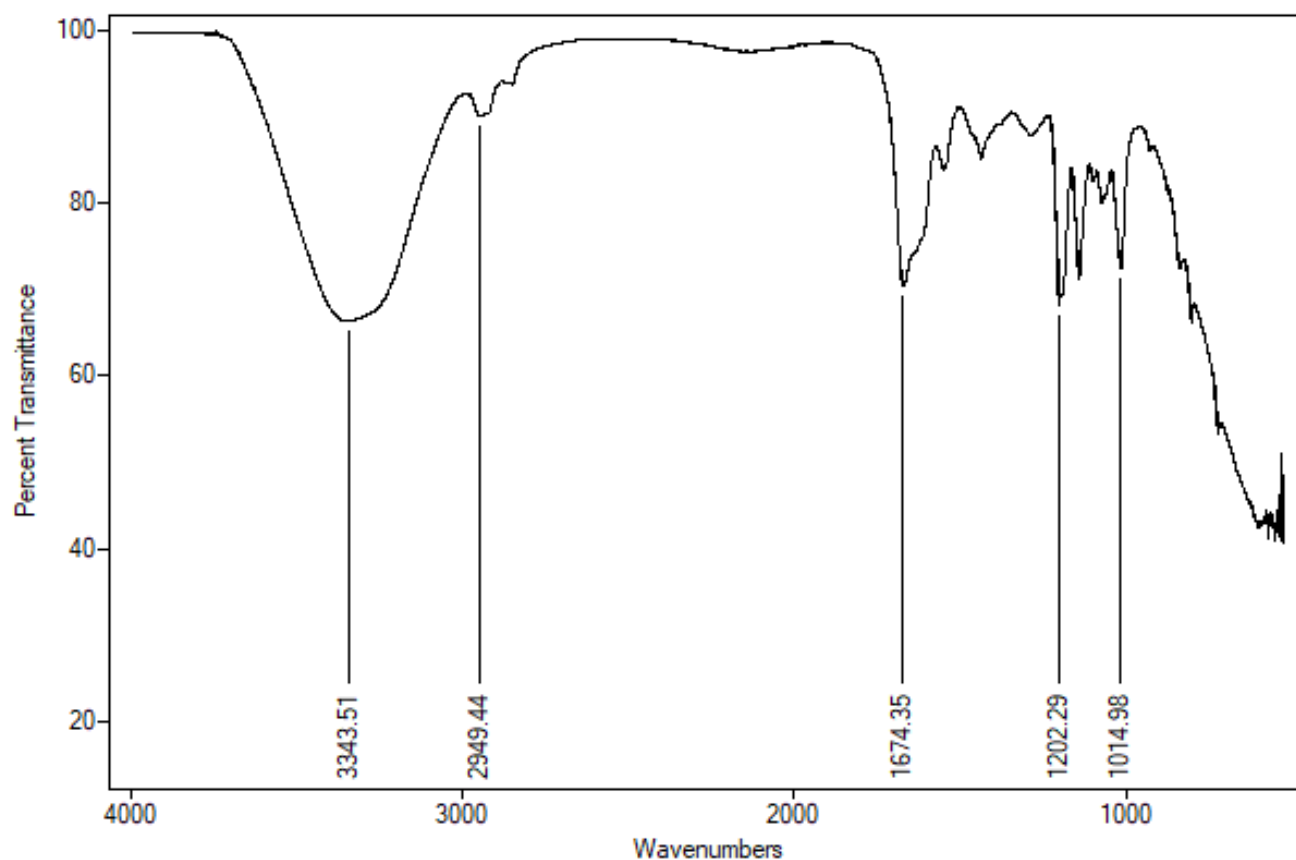


Espectros de IR-FT y HRMS de la monoamida **3b**.

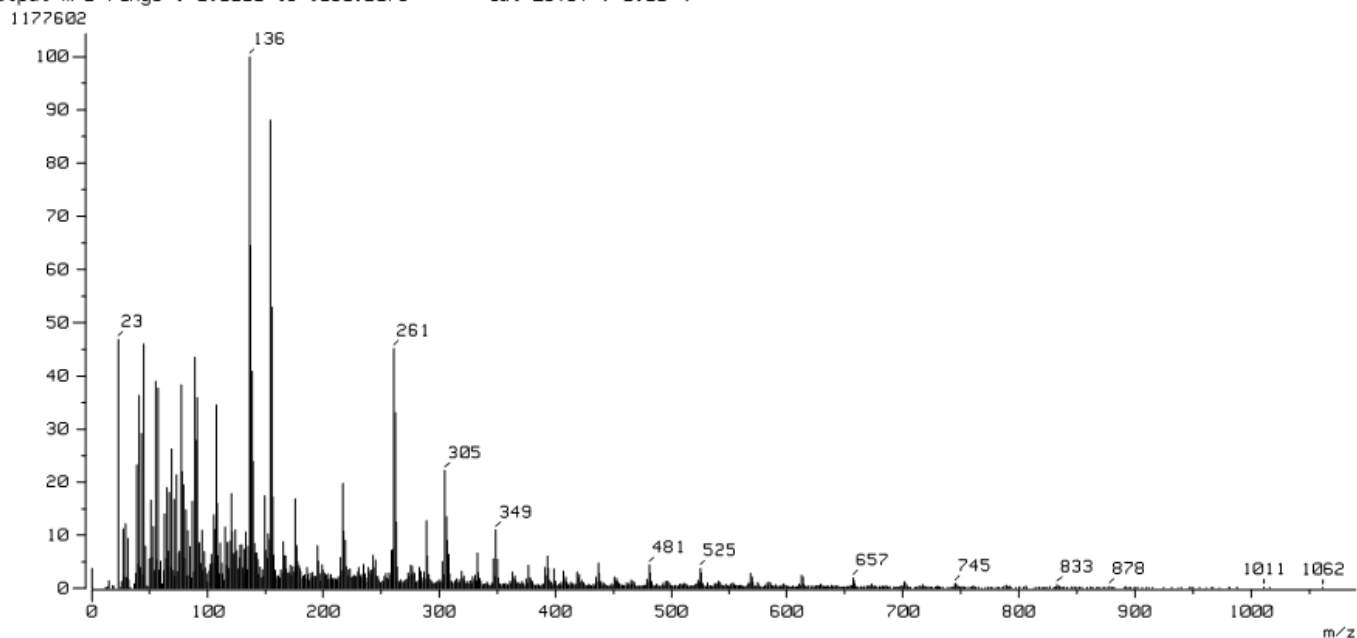




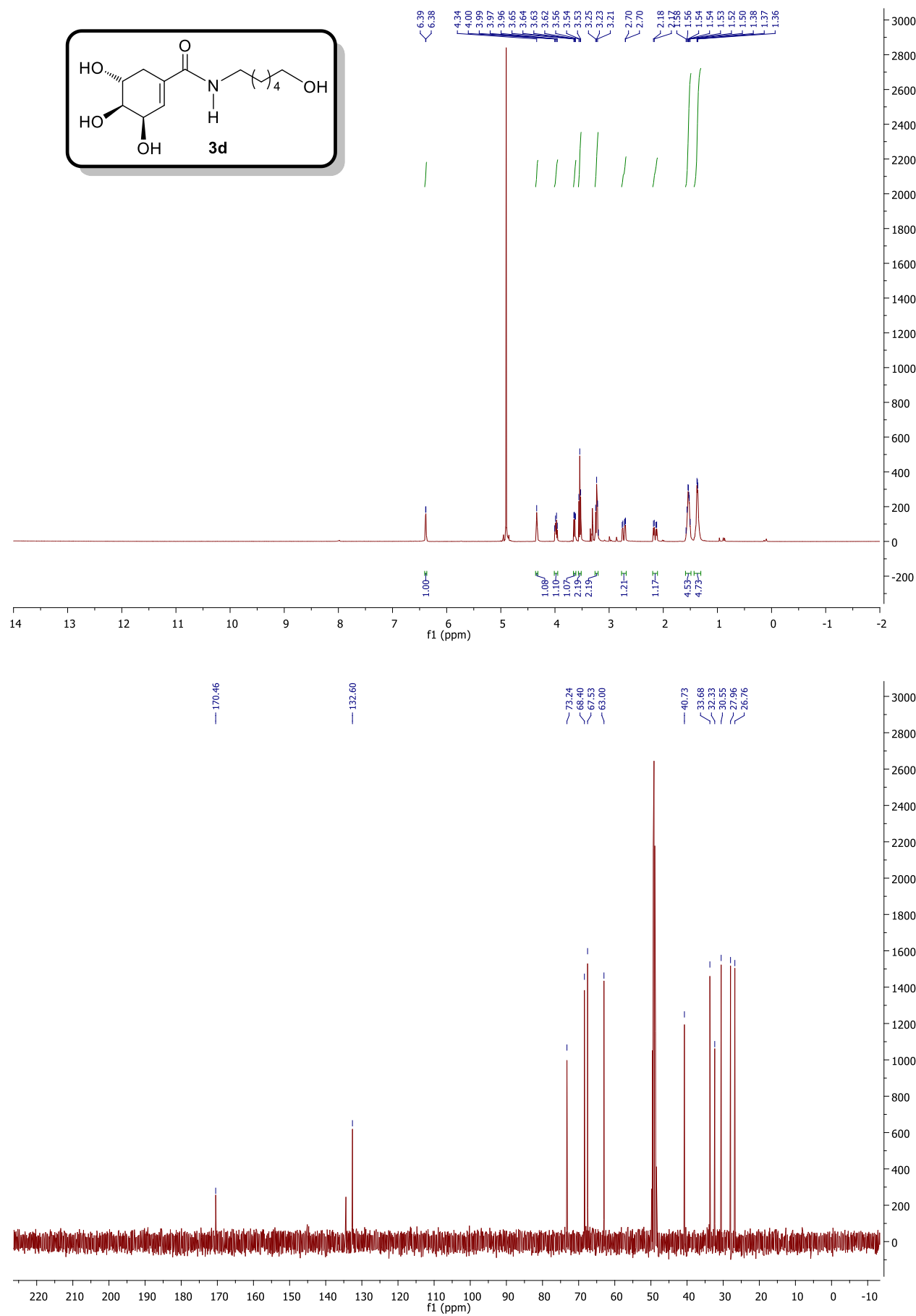
Espectros de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) y <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la monoamida **3c**.

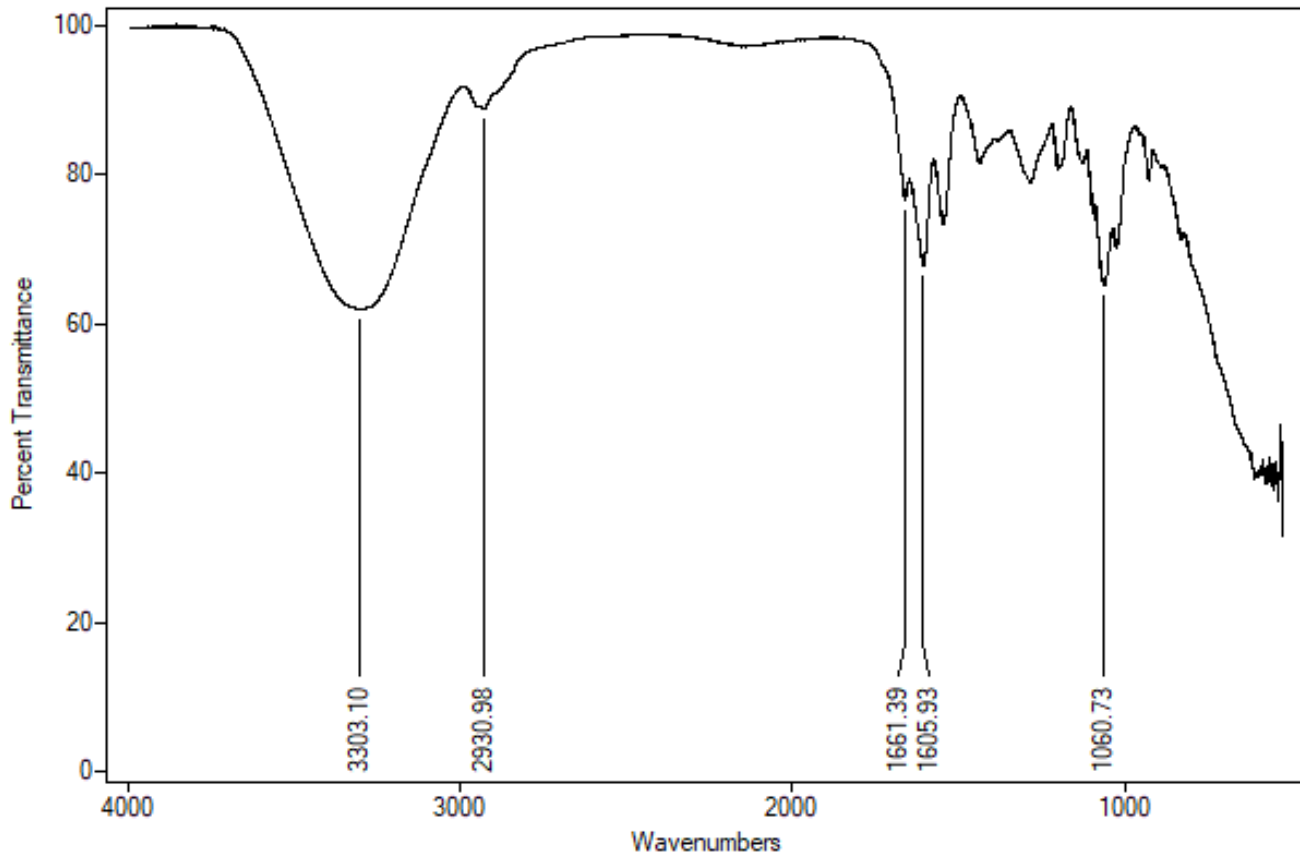


[ Mass Spectrum ]  
 Data : MOP033 Date : 27-Jan-2016 09:42  
 Sample: PAG092B Operator name Gabriela Vargas Instrument: MStation JMS-  
 Note : Dr.Mario Ordonez/Dulce Centro de Investigaciones Quimicas UREM  
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+  
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
 RT : 0.61 min Scan# : 3  
 BP : m/z 136.0000 Int. : 107.64  
 Output m/z range : 0.0000 to 1090.2076 Cut Level : 0.00 %



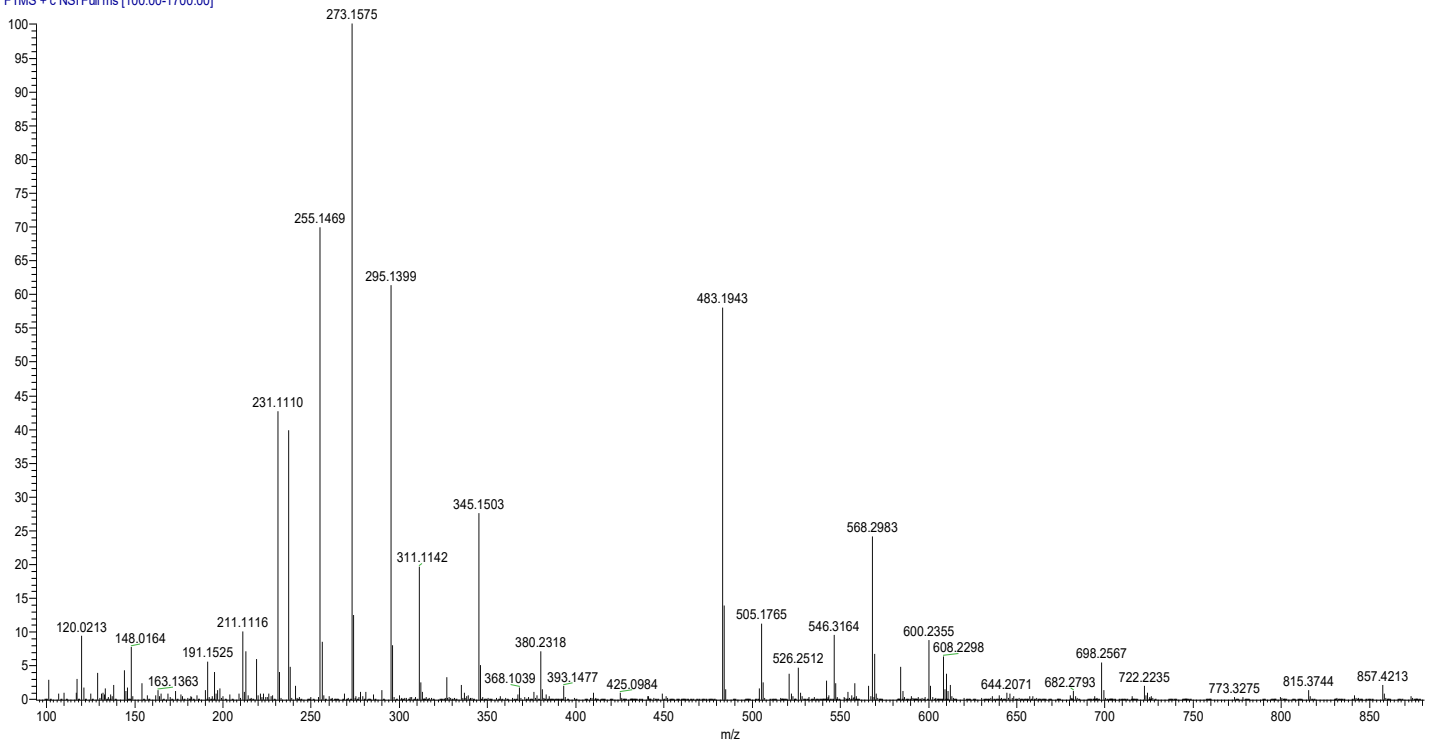
Espectros de IR-FT y HRMS de la monoamida **3c**.

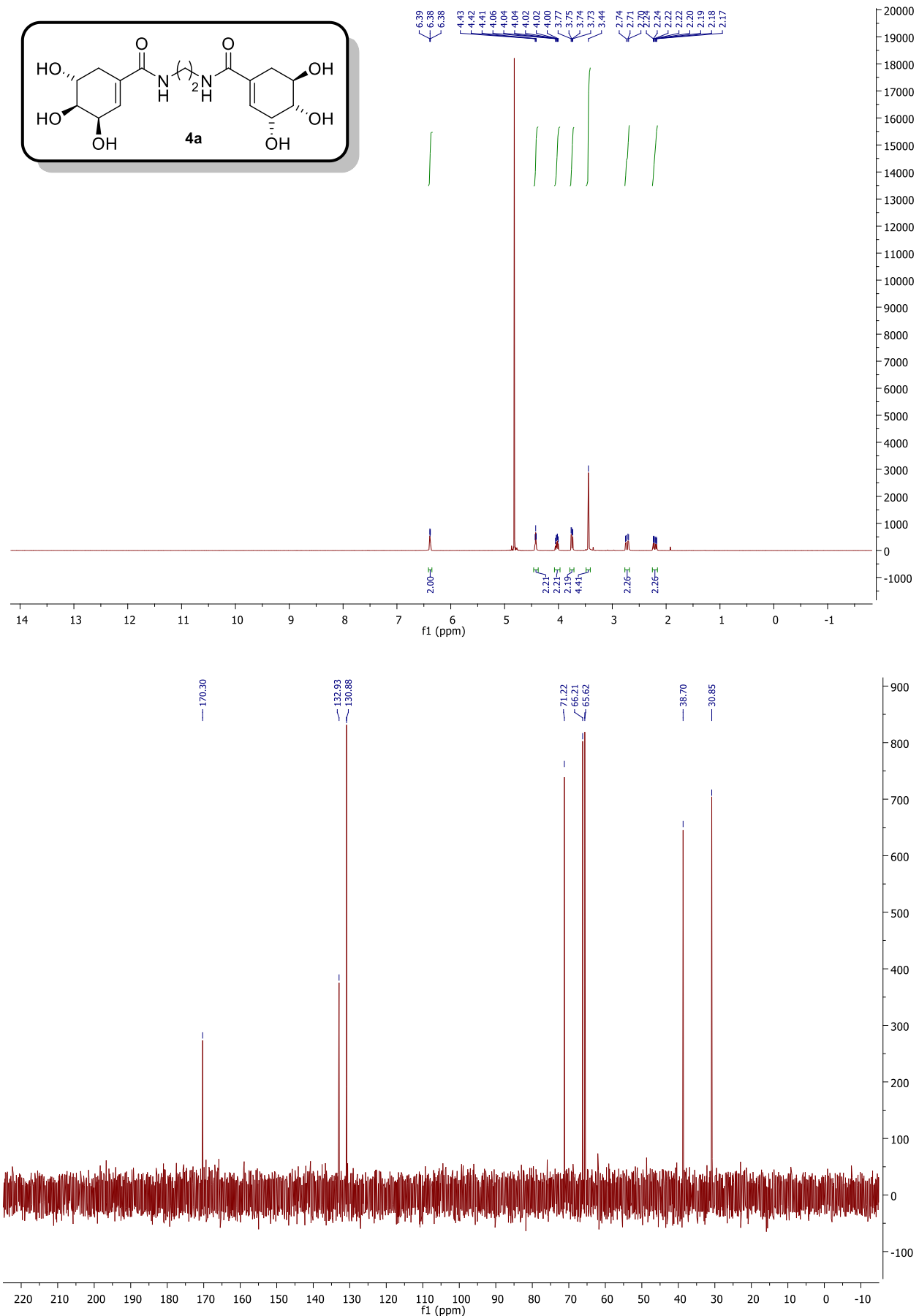
Espectros de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la monoamida **3d**.



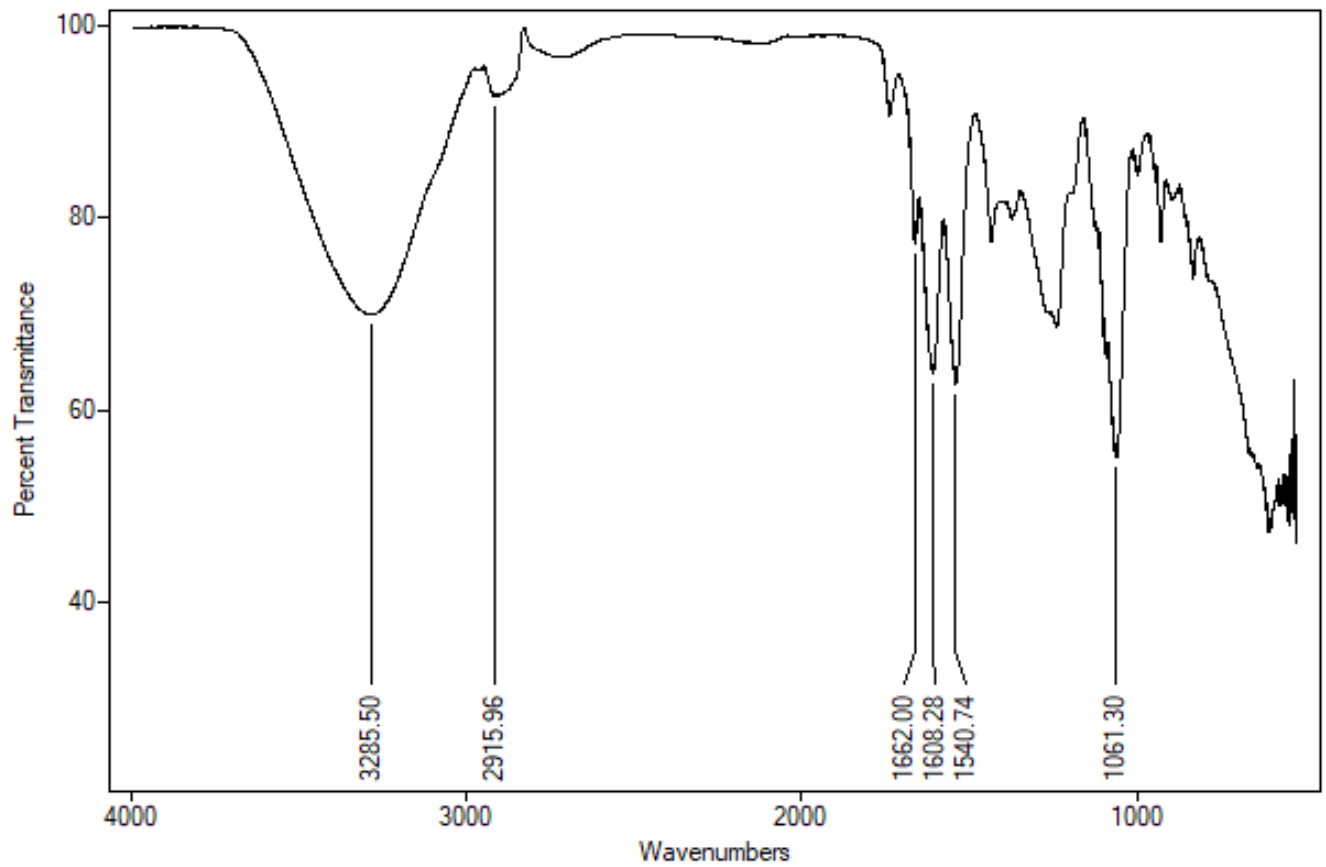
G:\82-2016Dulce\_XT\_00001\_M\_

09/21/16 11:20:22

82-2016Dulce XT 00001 M #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 1.01E6  
T: FTMS + c NSI Full ms [100.00-1700.00]Espectros de IR-FT y HRMS de la monoamida **3d**.

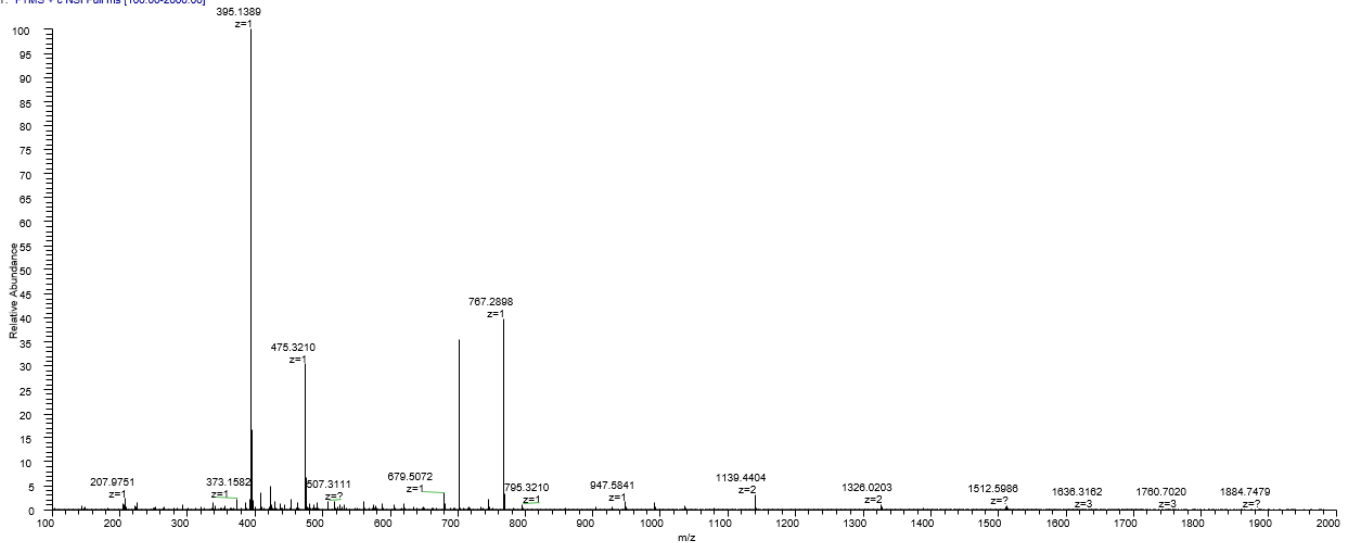


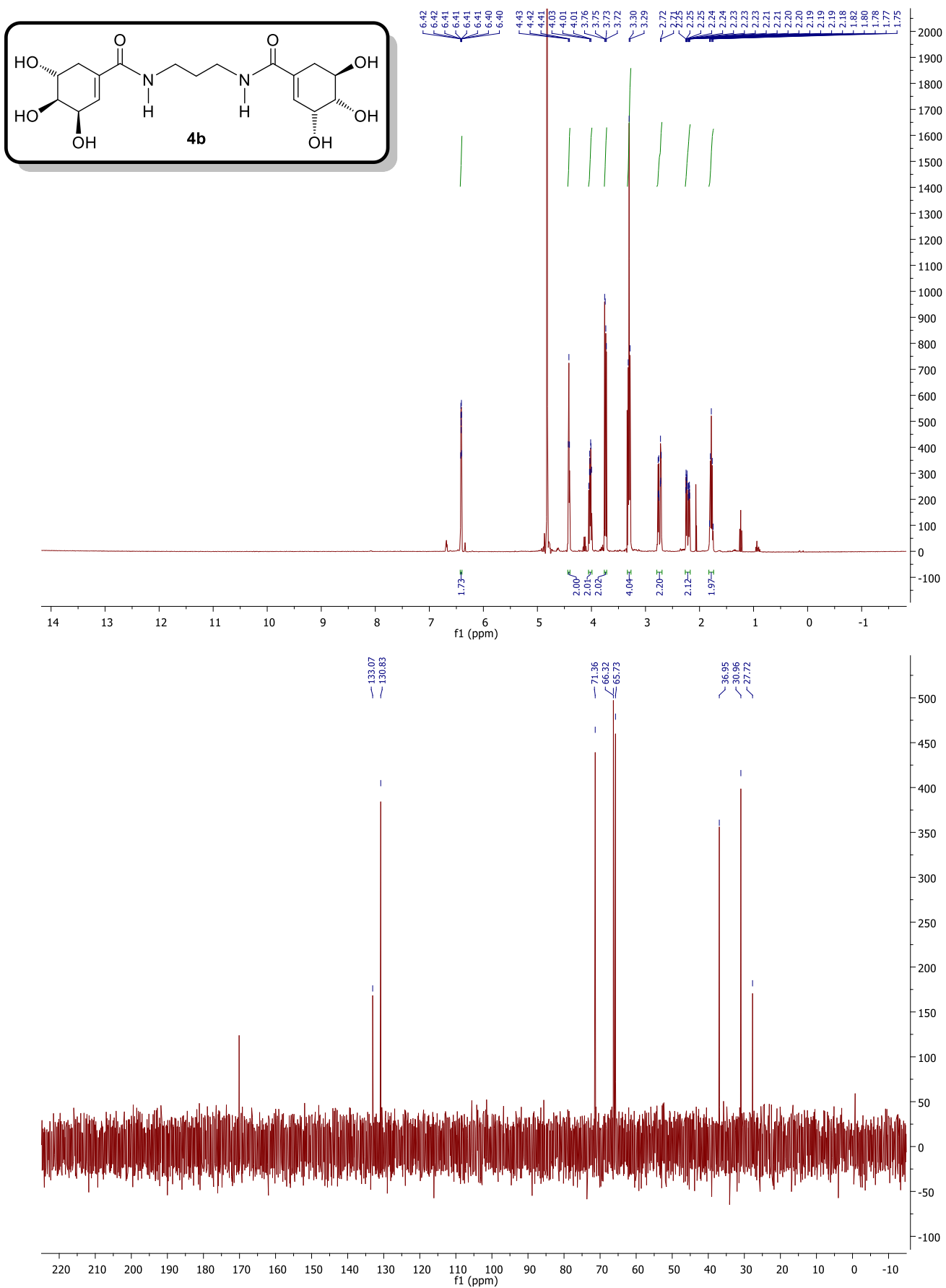
Espectros de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de la diamida **4a**.



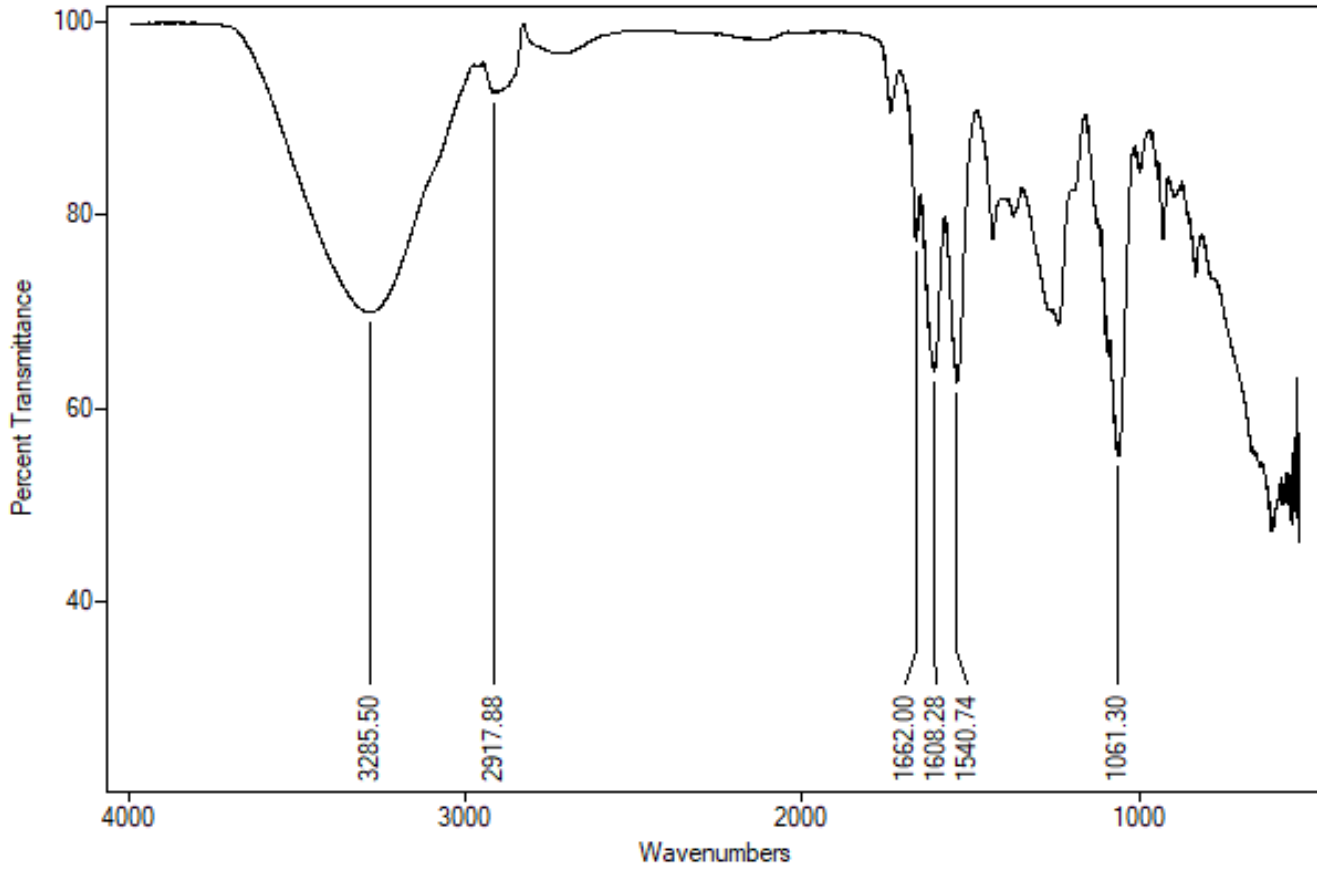
10/07/16 09:35:01

89-2016Adelfo-1 #137-143 RT: 3.72-3.89 AV: 7 NL: 7.05E8  
T: FTMS + c NSI Full ms [100.00-2000.00]

Espectros de IR-FT y HRMS de la diamida **4a**.



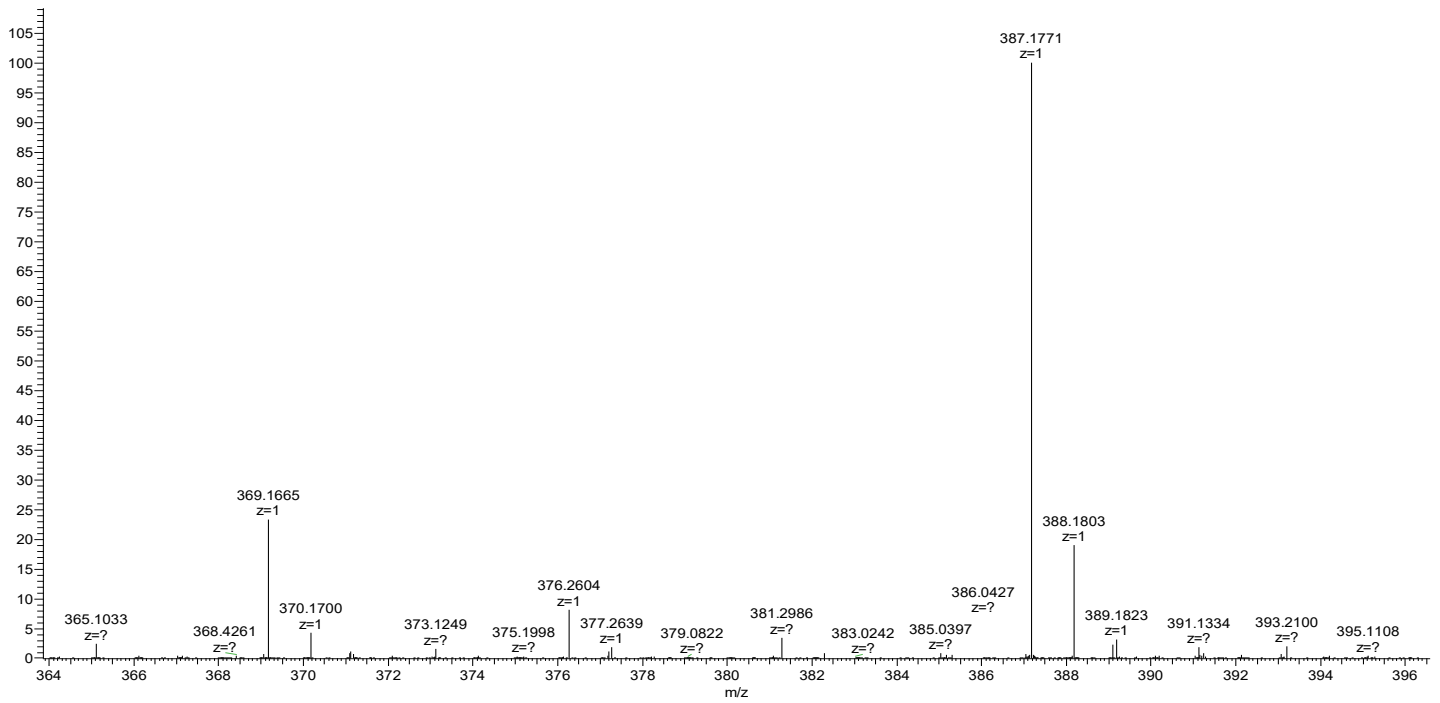
Espectros de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de la diamida **4b**.



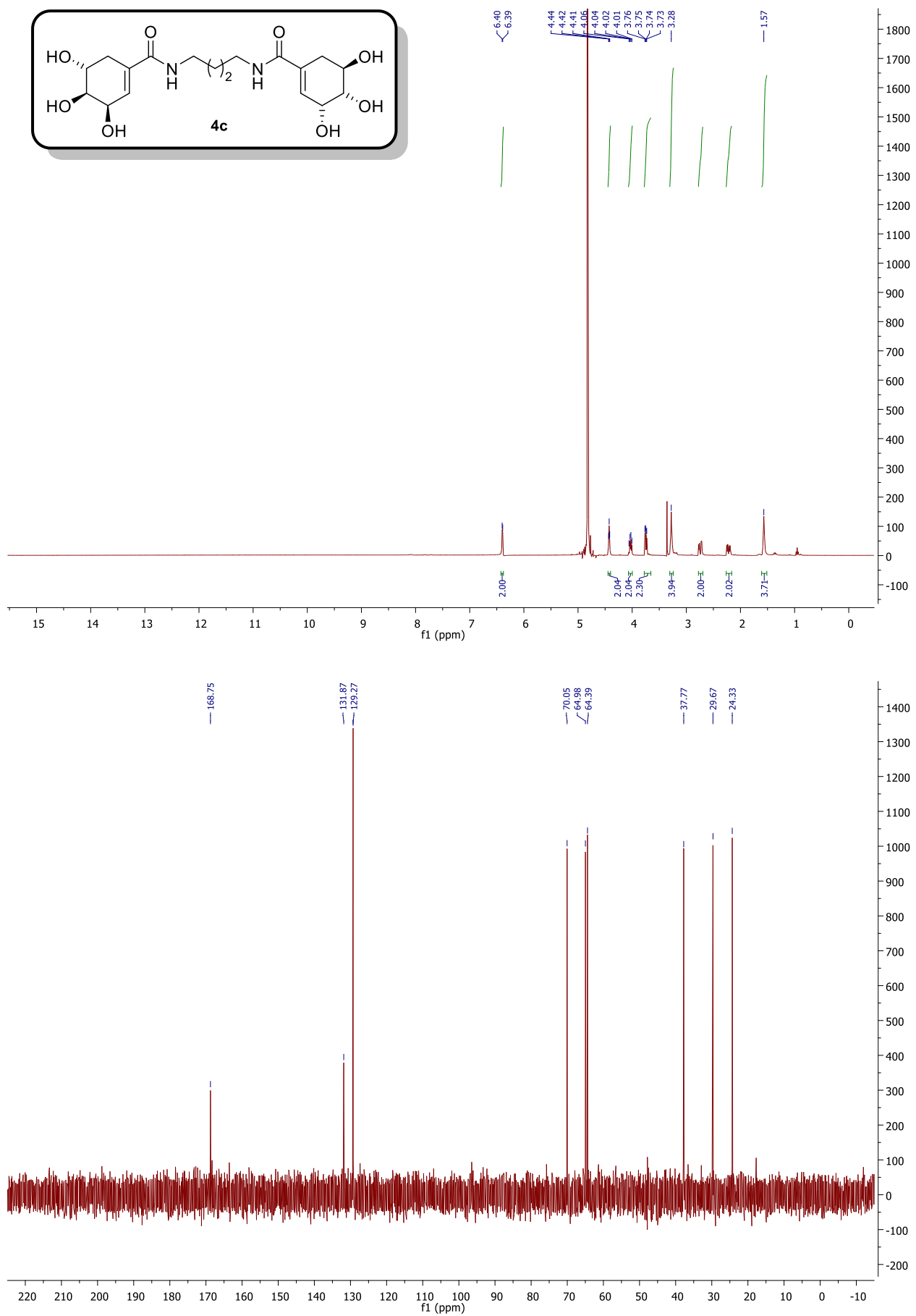
C:\Users\...41-2017\41-2017Adelfo

05/24/17 10:12:40

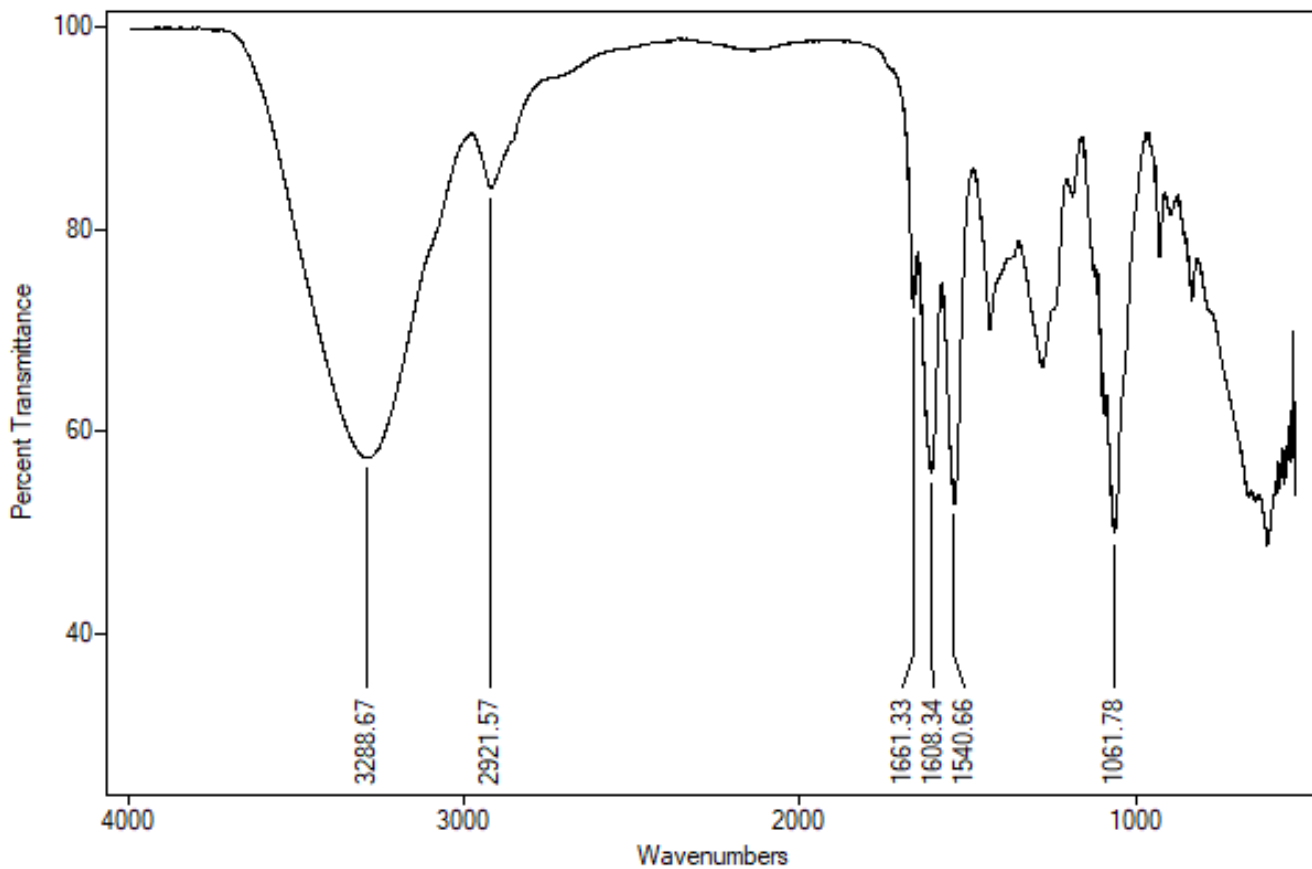
41-2017Adelfo #451-536 RT: 3.74-4.35 AV: 86 NL: 1.92E5  
 T: FTMS + c NSI Full ms [150.00-2000.00]

Espectros de IR-FT y HRMS de la diamida **4b**.



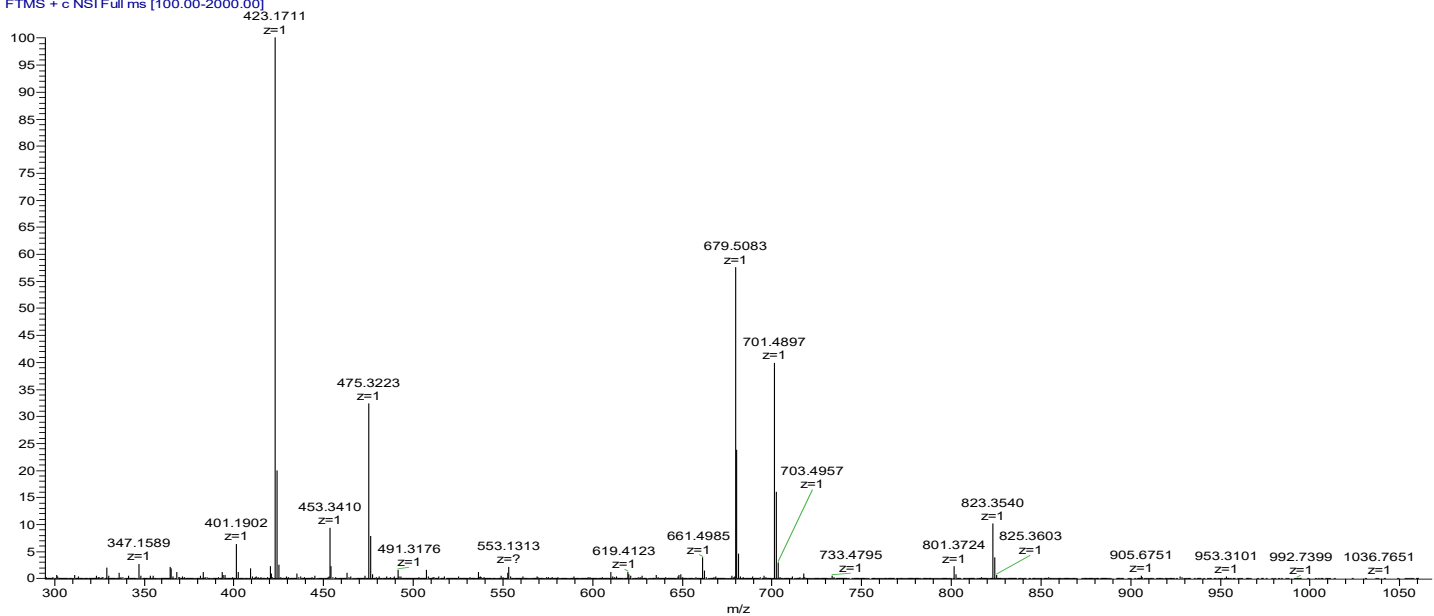


Espectros de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de la diamida **4c**.

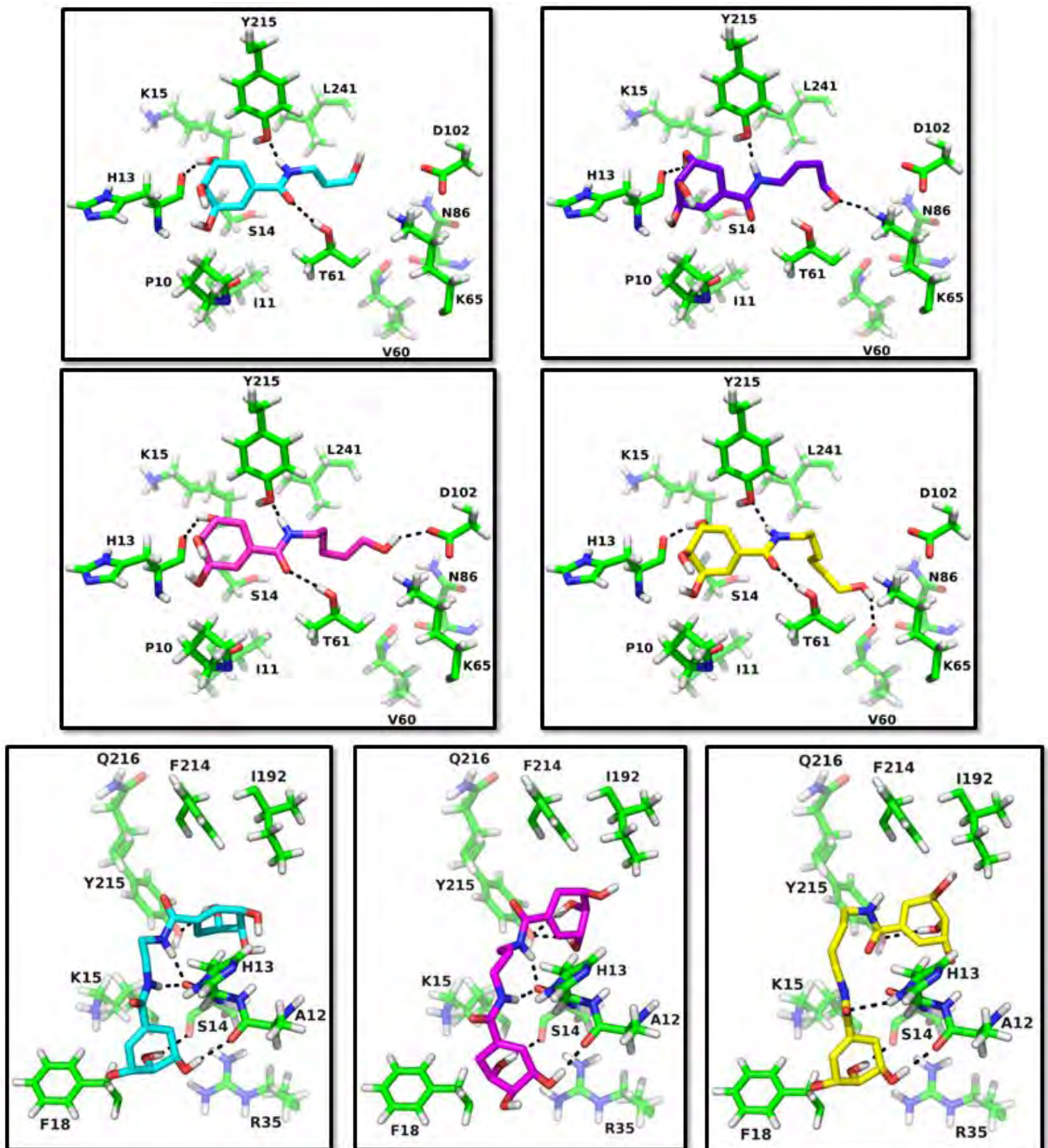


G:\89-2016Adelfo-2-DIM04-re

10/07/16 10:55:27

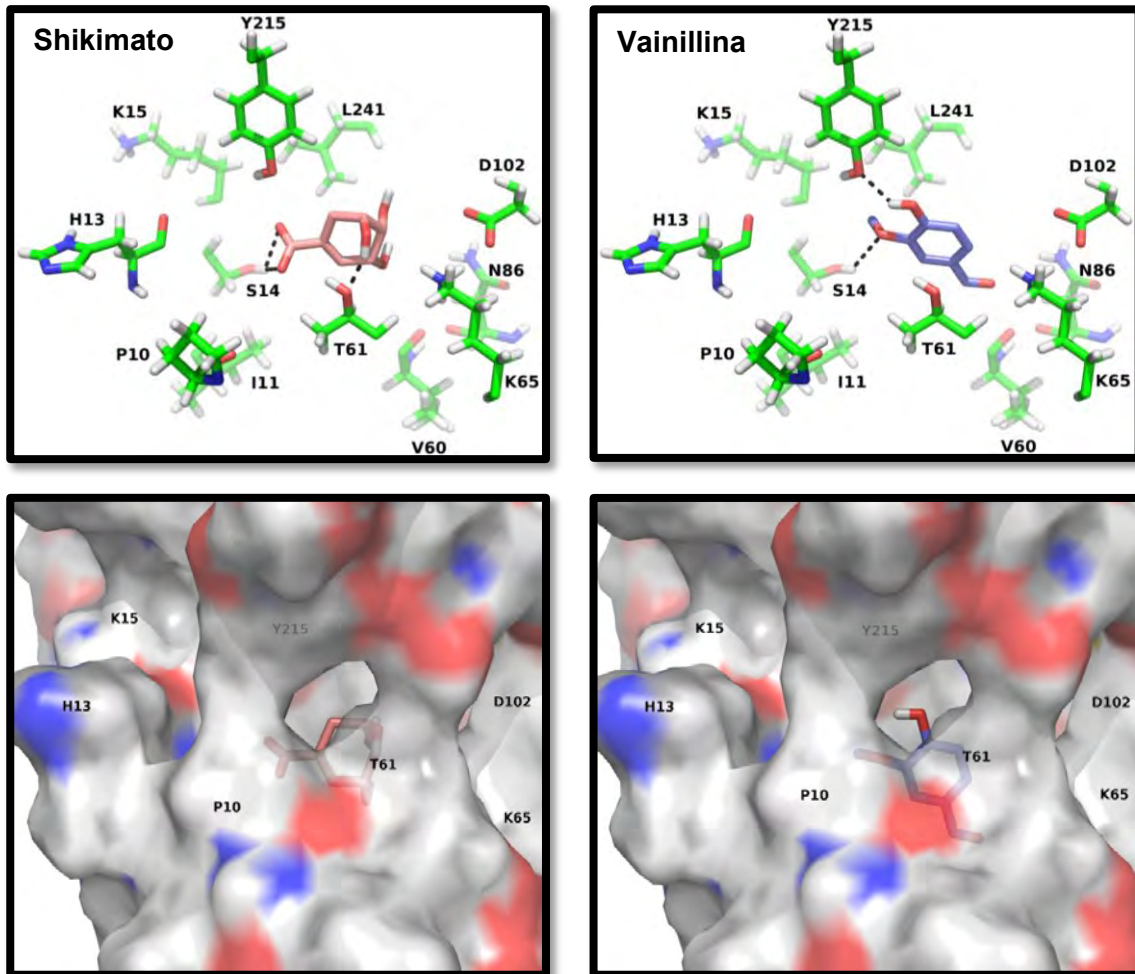
89-2016Adelfo-2-DIM04-re #43-47 RT: 1.26-1.38 AV: 5 NL: 4.41E5  
T: FTMS + c NSI Full ms [100.00-2000.00]Espectros de IR-FT y HRMS de la diamida **4c**.

## Estudios de acople molecular

*Modos de unión de las amidas sintetizadas al sitio catalítico de EcSDH*

Superior monoamidas **3a**= azul, **3b**= morado, **3c**= rosa y **3d**= amarillo. Inferior diamidas **4a**= azul, **4b**= morado y **4c**= amarillo. Los residuos más involucrados se presentan en código de una letra y se muestran en verde. Los puentes de Hidrógeno se representan como líneas negras punteadas.

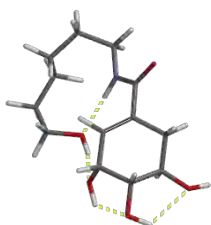
## Modos de unión del SA e inhibidor competitivo vainillina a la enzima EcSDH



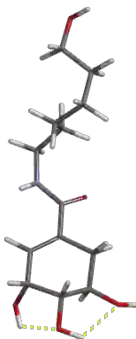
Izquierda= Interacción del SA (rosa) con el sitio activo de EcSDH. Centro= Interacción de Vainillina (morado). Derecha= Interacción de la monoamida **3d** (amarillo). Superior= Modelos de interacción, Inferior= Modelos de superficie. Los residuos más involucrados se presentan en código de una letra y se muestran en verde. Los puentes de Hidrógeno se representan como líneas negras punteadas.

### Análisis de conforméros en equilibrio contra el modelado en acople molecular

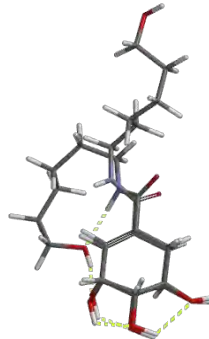
**A.-** Conforméromo de menor energía



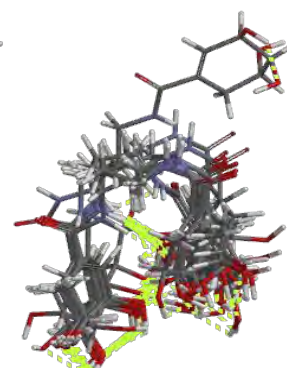
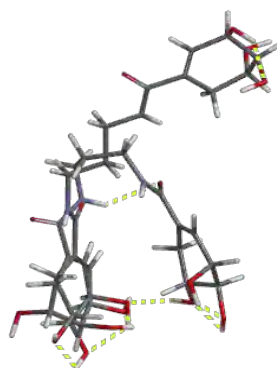
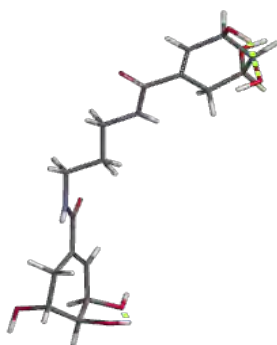
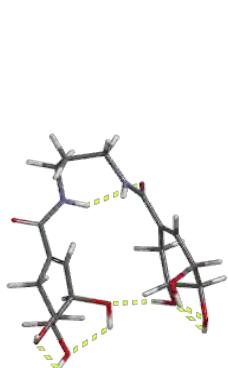
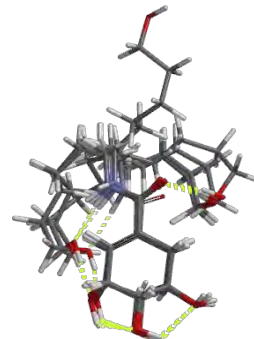
**B.-** Conforméromo del acople molecular



Superposición de **A** y **B**



Superposición de **B** y la librería de conforméromos



Superior= monoamida **3d** . Inferior= diamida **4b**. Se indican los esqueletos hidrocarbonados (gris), átomos de oxígeno (rojo) y nitrógeno (azúl). Los puentes de Hidrógeno se representan como líneas punteadas amarillas.



## Synthesis, biological activity and molecular modelling studies of shikimic acid derivatives as inhibitors of the shikimate dehydrogenase enzyme of *Escherichia coli*

Dulce Catalina Díaz-Quiroz, César Salvador Cardona-Félix, José Luis Viveros-Ceballos, Miguel Angel Reyes-González, Franciso Bolívar, Mario Ordoñez & Adelfo Escalante

To cite this article: Dulce Catalina Díaz-Quiroz, César Salvador Cardona-Félix, José Luis Viveros-Ceballos, Miguel Angel Reyes-González, Franciso Bolívar, Mario Ordoñez & Adelfo Escalante (2018) Synthesis, biological activity and molecular modelling studies of shikimic acid derivatives as inhibitors of the shikimate dehydrogenase enzyme of *Escherichia coli*, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33:1, 397-404, DOI: [10.1080/14756366.2017.1422125](https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1422125)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1422125>



© 2018 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



[View supplementary material](#)



Published online: 24 Jan 2018.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 504



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

RESEARCH PAPER



## Synthesis, biological activity and molecular modelling studies of shikimic acid derivatives as inhibitors of the shikimate dehydrogenase enzyme of *Escherichia coli*

Dulce Catalina Díaz-Quiroz<sup>a</sup>, César Salvador Cardona-Félix<sup>a,b</sup>, José Luis Viveros-Ceballos<sup>c</sup>, Miguel Angel Reyes-González<sup>c</sup>, Franciso Bolívar<sup>a</sup>, Mario Ordoñez<sup>c</sup> and Adelfo Escalante<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México; <sup>b</sup>CONACyT – Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, México; <sup>c</sup>Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México

### ABSTRACT

Shikimic acid (SA) pathway is the common route used by bacteria, plants, fungi, algae, and certain Apicomplexa parasites for the biosynthesis of aromatic amino acids and other secondary metabolites. As this essential pathway is absent in mammals designing inhibitors against implied enzymes may lead to the development of antimicrobial and herbicidal agents harmless to humans. Shikimate dehydrogenase (SDH) is the fourth enzyme of the SA pathway. In this contribution, a series of SA amide derivatives were synthesised and evaluated for *in vitro* SDH inhibition and antibacterial activity against *Escherichia coli*. All tested compounds showed to be mixed type inhibitors; diamide derivatives displayed more inhibitory activity than synthesised monoamides. Among the evaluated compounds, molecules called **4a** and **4b** were the most active derivatives with IC<sub>50</sub> 588 and 589 μM, respectively. Molecular modelling studies suggested two different binding modes of monoamide and diamide derivatives to the SDH enzyme of *E. coli*.

### ARTICLE HISTORY

Received 30 October 2017  
Revised 22 December 2017  
Accepted 23 December 2017

### KEYWORDS

Shikimate dehydrogenase; enzyme inhibition; *Escherichia coli*; shikimic acid; amide derivative synthesis; molecular docking

### Introduction

The shikimic acid (SA) pathway is the common route for aromatic amino acid biosynthesis existing in bacteria, fungi, yeasts, plants, algae and certain Apicomplexa parasites but it is absent in mammals<sup>1</sup>. This pathway is essential as is involved in the generation of structural blocks for protein synthesis, vitamins and electron-carrier compounds such as cofactors and quinones<sup>2–4</sup>. In recent years, enzymes of the SA pathway have been recognised as new prominent targets for enzyme inhibition discover because of their roles in microbial cell survival, understood biochemistry and presence in the clinically relevant spectrum of species<sup>5</sup>. In this sense, much effort has been made to the design of molecules that might act as antibacterial, fungicidal, antiparasitic and herbicidal agents harmless to humans.



Targeting the SA pathway has led to drug development of antibacterial agents for critical pathogenic bacteria such as the tuberculosis responsible agent *Mycobacterium tuberculosis*<sup>6</sup> and *Helicobacter pylori*<sup>7</sup> a primary causative factor for gastrointestinal illnesses. The anti-parasitic against the malaria parasite *Plasmodium falciparum*<sup>8</sup> and toxoplasmosis parasite *Toxoplasma gondii*<sup>9</sup>, as well as one of the most widely used herbicide during the past three decades glyphosate [N-(phosphonomethyl) glycine] the active ingredient in RoundUp<sup>®</sup>, Zero<sup>®</sup> and Tumbleweed<sup>®</sup><sup>10,11</sup>.


Shikimate dehydrogenase (SDH, E.C. 1.1.1.25), the fourth enzyme in the SA pathway catalyses the reversible reduction of 3-dehydroshikimate (DHS) to SA using NADPH as co-substrate. SDH is a member of an oxide-reductase family whose crystallographic

structure in several organisms have been determined either in the apoenzyme form or binary and ternary complexes<sup>12</sup>. The shared three-dimensional fold consists of two  $\alpha/\beta$  domains linked by a pair of  $\alpha$ -helices, the substrate-binding site is mainly delineated by residues from the N-terminal domain whereas the cofactor binding site is comprising in the C-terminal domain that adopts a Rossmann fold. Functional and structural studies on SDH enzymes opened a platform for the development of SDH inhibitors as few reports exist compared to other enzymes of the SA pathway.

First attempts to identify SDH inhibitors were based on the elucidation of interaction requirements for substrate binding to the active site of the enzyme. To determine the binding mode of SA and DHS to the *Pisum sativum* SDH enzyme, Balinsky and Davies analysed several substrate similar compounds for competitive inhibition<sup>13</sup>. Both a carbonyl group in the C1 position and a hydroxyl group corresponding to the 4-OH position were identified as significant determinants for ligand binding. The aldehyde vanillin proved to be a potent competitive inhibitor ( $K_i$ , SA = 93 μM) by the observations of Baillie et al. for the non-specific nature of the C-1 carbonyl group in inhibitors which they tested as alkyl and aryl esters<sup>14</sup>.

High throughput screening provides a non-rational approach for the identification of new chemical scaffolds with inhibitory activity. Using a library of 5000 compounds Han et al. identified five novel SDH inhibitors of *H. pylori*. Interestingly curcumin showed to be a non-competitive inhibitor ( $K_i$ , SA = 6 μM) with moderate *in vitro* antibacterial activity (MIC = 16 μg/ml)<sup>15</sup>. By employing a similar screening strategy, other phenolic compounds

**CONTACT** Adelfo Escalante  [adelfo@ibt.unam.mx](mailto:adelfo@ibt.unam.mx)  Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, México

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2018 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

as epigallocatechin gallate were identified as inhibitors of SDH of *Pseudomonas putida* ( $IC_{50} = 3 \mu\text{M}$ )<sup>16</sup>. Most recently, virtual screening and site-moiety maps that rely on binding environment modelling led to the identification of SDH inhibitors with  $IC_{50}$  values around  $100 \mu\text{M}$  (competitive)<sup>17</sup> and  $2 \mu\text{M}$  (non-specified)<sup>18</sup>.

SA has probed to inhibit SDH enzyme of *Escherichia coli* (EcSDH) ( $K_i = 160 \mu\text{M}$ )<sup>19</sup>. Taking into account the previous observation that inhibitors carbonyl C-1 group can correspond to that of an aldehyde, ester or carboxylic acid, in this contribution we explored the carbonyl nature by synthesising amides harbouring compounds to test new derivatives for SDH inhibitor discovery. Based on this hypothesis, an amide group was introduced to evaluate the bioisosteric replacement in which the carboxylate moiety of SA that harbours hydrogen bonds accepting groups was changed to the amide that can either donate and accept hydrogen bonds. We also assessed the possible inhibitory activity of SA derivative amides by hydroxyl ended linear alkyl chains of different lengths used as N-substituents. As a continuation, diamides composed of two SA molecules were synthesised based on the structure of vanillin and curcumin in which two nuclei of an identified inhibitor are linked by an aliphatic chain leading to inhibition enhancement. Enzyme kinetic studies for inhibition-type identification and antibacterial activity were also assessed. Finally, molecular docking was performed for an understanding of structure-activity relationships.

## Experimental

### Chemistry

#### Materials and methods

All commercial materials were used as received unless otherwise noted. Flash chromatography was performed on 230–400 mesh Silica Flash 60<sup>®</sup>. Thin layer chromatography was performed on pre-coated TLC sheets of silica gel (60 F<sub>254</sub>, Merck) and the plates were visualised by UV-light and iodine vapours or vanillin-sulphuric acid followed by heating. Melting points were determined with a Fisher–Johns apparatus and are uncorrected. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Varian instrument (400 MHz for <sup>1</sup>H) using the TMS and the residual solvent signal as internal standards; chemical shifts ( $\delta$ ) are expressed in parts per million (ppm) and coupling constants ( $J$ ) in Hertz. High-resolution FAB<sup>+</sup> mass spectra (HRMS) were obtained on a JEOL MStation MS-700.

#### (3R,4S,5R)-3,4,5-tri[(tert-butyl dimethylsilyl)oxy]cyclohex-1-enecarboxylic acid (2)

To a solution of (-)-shikimic acid **1** (1.0 g, 5.74 mmol) in anhydrous dimethylformamide (DMF) (12 ml) was added imidazole (4.4 g, 64.5 mmol) and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (8.7 g, 57.4 mmol). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 20 h under nitrogen atmosphere. Then 10 ml of H<sub>2</sub>O were added and the reaction mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 15 ml). The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography using Hex:AcOEt (92:8) as eluent, obtaining (2.52 g, 85% yield) of **2** as a white solid. M.p. 169–172 °C. IR (neat):  $\tilde{\nu} = 2929, 1690, 1256 \text{ cm}^{-1}$ . [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -85.7 (c 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.07$  (s, 12H, CH<sub>3</sub>Si), 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si), 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si), 0.84 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.86 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.94 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 2.17 (dd,  $J = 17.8, 1.0 \text{ Hz}$ , 1H, H-6), 2.58 (ddt,  $J = 17.8, 3.0, 3.0 \text{ Hz}$ , 1H, H-6'), 3.74–3.78 (m, 1H, H-4), 3.98–4.02 (m, 1H, H-5), 4.62–4.66 (m, 1H, H-3), 6.82–6.85 (m, 1H, H-2) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = -4.7$  (CH<sub>3</sub>Si), -4.6 (CH<sub>3</sub>Si), -4.5 (CH<sub>3</sub>Si),

-4.2 (CH<sub>3</sub>Si), 18.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.4 (C-6), 68.4 (C-4), 70.0 (C-3), 72.6 (C-5), 126.7 (C-1), 143.3 (C-2), 172.9 (C=O) ppm. HRMS (FAB<sup>+</sup>): calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>53</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  517.3201; found for [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  517.4024.

#### Synthesis of monoamides (3a–3d)

To a solution of **2** (250 mg, 0.5 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 ml), oxalyl chloride (1.2 eq) and one drop of DMF were added slowly, and the reaction was stirred at room temperature for 3.0 h under nitrogen atmosphere. Then, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the formed acid chloride was slowly added to a solution containing the appropriate hydroxylamine (10 eq) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (2 eq) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h under nitrogen atmosphere. After completion of the reaction, H<sub>2</sub>O (20 ml) was added and extracted with AcOEt (30 ml). The organic layer was washed with a saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (3 × 20 ml), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Tetrabutylammonium fluoride (TBAF) (1.0 M in tetrahydrofuran (THF), 5 eq) was added dropwise to a solution of this crude in THF (3 ml) at 0 °C and the reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was passed through Dowex<sup>®</sup> 50WX8 (H<sup>+</sup>) column and eluted with H<sub>2</sub>O. The collected fractions were combined, concentrated and subjected to flash chromatography using AcOEt:MeOH (90:10) as eluent, obtaining the titled compounds **3a–3d** as clear oils.

#### (3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxy-N-(3-hydroxypropyl)cyclohex-1-ene-1-carboxamide (3a)

70 mg, 63% yield. IR (neat):  $\tilde{\nu} = 3303, 2931, 1661, 1606, 1061 \text{ cm}^{-1}$ . [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -84.9 (c 1.0, CH<sub>3</sub>OH). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 1.74$  (quint,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>), 2.15 (dd,  $J = 17.8, 6.2 \text{ Hz}$ , 1H, H-6), 2.72 (dd,  $J = 17.8, 5.0 \text{ Hz}$ , 1H, H-6'), 3.33 (t,  $J = 6.9 \text{ Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.59 (t,  $J = 6.3 \text{ Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.64 (dd,  $J = 7.8, 4.2 \text{ Hz}$ , 1H, H-4), 3.98 (ddd,  $J = 7.4, 5.8, 5.8 \text{ Hz}$ , 1H, H-5), 4.34 (dd,  $J = 3.9, 3.9 \text{ Hz}$ , 1H, H-3), 6.39–6.42 (m, 1H, H-2) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 32.3$  (C-6), 33.3 (CH<sub>2</sub>), 38.0 (CH<sub>2</sub>N), 61.0 (CH<sub>2</sub>O), 68.0 (C-4), 68.4 (C-5), 73.2 (C-3), 133.0 (C-2), 134.3 (C-1), 171.0 (C=O) ppm. HRMS (FAB<sup>+</sup>): calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  232.1185; found for [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  232.1239.

#### (3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxy-N-(4-hydroxybutyl)cyclohex-1-ene-1-carboxamide (3b)

80 mg, 69% yield. IR (neat):  $\tilde{\nu} = 3321, 2929, 1662, 1607, 1060 \text{ cm}^{-1}$ . [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -87.6 (c 1.0, CH<sub>3</sub>OH). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 1.50$ –1.64 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.15 (dd,  $J = 17.8, 6.2 \text{ Hz}$ , 1H, H-6), 2.73 (dd,  $J = 17.8, 5.1 \text{ Hz}$ , 1H, H-6'), 3.25 (t,  $J = 6.7 \text{ Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.56 (t,  $J = 5.8 \text{ Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.63 (dd,  $J = 7.8, 4.2 \text{ Hz}$ , 1H, H-4), 3.98 (ddd,  $J = 7.7, 5.9, 5.9 \text{ Hz}$ , 1H, H-5), 4.34 (dd,  $J = 4.0, 4.0 \text{ Hz}$ , 1H, H-3), 6.38–6.41 (m, 1H, H-2) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 27.1$  (CH<sub>2</sub>), 31.1 (C6), 32.4 (CH<sub>2</sub>), 40.6 (CH<sub>2</sub>N), 62.7 (CH<sub>2</sub>O), 67.5 (C-4), 68.4 (C-5), 73.3 (C-3), 132.6 (C-2), 134.4 (C-1), 170.5 (C=O) ppm. HRMS (FAB<sup>+</sup>): calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  246.1341; found for [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  246.1334.

#### (3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxy-N-(5-hydroxypentyl)cyclohex-1-ene-1-carboxamide (3c)

90 mg, 70% yield. IR (neat):  $\tilde{\nu} = 3343, 2949, 1674, 1015 \text{ cm}^{-1}$ . [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -90.1 (c 1.0, CH<sub>3</sub>OH). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):



$\delta = 1.34\text{--}1.43$  (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.51–1.61 (quin,  $J = 6.9$  Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.15 (dd,  $J = 17.7$ , 6.1 Hz, 1H, H-6), 2.73 (dd,  $J = 17.7$ , 5.0 Hz, 1H, H-6), 3.24 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.55 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.63 (dd,  $J = 7.8$ , 4.1 Hz, 1H, H-4), 3.98 (ddd,  $J = 7.1$ , 5.8, 5.8 Hz, 1H, H-5), 4.34 (dd,  $J = 4.0$ , 4.0 Hz, 1H, H-3), 6.36–6.43 (m, 1H, H-2) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 24.4$  (CH<sub>2</sub>), 30.4 (C6), 32.3 (CH<sub>2</sub>), 33.4 (CH<sub>2</sub>), 40.7 (CH<sub>2</sub>N), 63.0 (CH<sub>2</sub>O), 68.0 (C-4), 68.4 (C-5), 73.2 (C-3), 132.6 (C-2), 134.4 (C-1), 170.5 (C=O) ppm. HRMS (FAB<sup>+</sup>): calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  260.1498; found for [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  260.1490.

**(3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxy-N-(6-hydroxyhexyl)cyclohex-1-ene-1-carboxamide (3d)**

80 mg, 60% yield. IR (neat):  $\tilde{\nu} = 3303$ , 2931, 1661, 1606, 1061 cm<sup>-1</sup>.  $[\alpha]_D = -92.3$  (c 1.0, CH<sub>3</sub>OH). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 1.32\text{--}1.42$  (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1.49–1.59 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.15 (dd,  $J = 17.8$ , 6.2 Hz, 1H, H-6), 2.73 (dd,  $J = 17.8$ , 5.1 Hz, 1H, H-6), 3.23 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.54 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.63 (dd,  $J = 7.8$ , 4.2 Hz, 1H, H-4), 3.95–4.01 (m, 1H, H-5), 4.34 (dd,  $J = 4.0$ , 4.0 Hz, 1H, H-3), 6.37–6.40 (m, 1H, H-2) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 27.0$  (CH<sub>2</sub>), 28.0 (CH<sub>2</sub>), 31.0 (C6), 32.3 (CH<sub>2</sub>), 34.0 (CH<sub>2</sub>), 41.0 (CH<sub>2</sub>N), 63.0 (CH<sub>2</sub>O), 68.0 (C-4), 68.4 (C-5), 73.2 (C-3), 133.0 (C-2), 134.4 (C-1), 171.0 (C=O) ppm. HRMS (FAB<sup>+</sup>): calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  274.1654; found for [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  274.1645.

**Synthesis of diamides (4a–4c)**

To a solution of **2** (0.25 g, 0.48 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 ml), oxalyl chloride (1.2 eq) and one drop of DMF were added slowly, and the reaction was stirred at room temperature for 3.0 h under nitrogen atmosphere. Then the solvent was evaporated under reduced pressure, and the formed acid chloride was slowly added to a solution containing the appropriate diamine (5 eq), saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (0.1 ml) and Et<sub>2</sub>O (1.5 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h under nitrogen atmosphere. After completion of the reaction, AcOEt (20 ml) was added, and the organic layer was washed with a saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (3 × 20 ml), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. TBAF (1.0 M in THF, 10 eq) was added dropwise to a solution of this crude in THF (3 ml) at 0 °C, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was passed through Dowex<sup>®</sup> 50WX8 (H<sup>+</sup>) column and eluted with H<sub>2</sub>O. The collected fractions were combined, concentrated and subjected to HPLC purification using a 4.6 × 150 mm Synergy Hydro C18 4 μm column and a mixture of MeOH/H<sub>2</sub>O (97:3), trifluoroacetic acid 0.1% as eluent at a flow rate of 0.5 ml/min. The process was monitored (diode array detector) at 280 nm. The chromatographic peaks were collected and concentrated, obtaining the titled compounds **4a–4c** as clear yellow oils.

**(3R,3'R,4S,4'S,5R,5'R)-N,N'-(ethane-1,2-diyl)bis(3,4,5-trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxamide) (4a)**

34 mg, 38% yield. IR (neat):  $\tilde{\nu} = 3286$ , 2916, 1662, 1608, 1541, 1061 cm<sup>-1</sup>.  $[\alpha]_D = -115.3$  (c 1.0, H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 2.21$  (dd,  $J = 17.7$ , 7.1 Hz, 2H, H-6), 2.73 (dd,  $J = 17.7$ , 5.3 Hz, 2H, H-6), 3.44 (s, 4H, CH<sub>2</sub>N), 3.74 (dd,  $J = 8.7$ , 4.3 Hz, 2H, H-4), 3.99–4.06 (m, 2H, H-5), 4.42 (dd,  $J = 4.2$ , 4.2 Hz, 2H, H-3), 6.36–6.40 (m, 2H, H-2) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 31.0$  (C6), 39.0 (CH<sub>2</sub>N), 66.0 (C-4), 66.2 (C-5), 71.2 (C-3), 131.0 (C-2), 133.0 (C-1), 170.3 (C=O) ppm. HRMS (FAB<sup>+</sup>): calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  373.1611; found for [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  373.1579.

**(3R,3'R,4S,4'S,5R,5'R)-N,N'-(propane-1,3-diyl)bis(3,4,5-trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxamide) (4b)**

41 mg, 44% yield. IR (neat):  $\tilde{\nu} = 3297$ , 2921, 1662, 1609, 1541, 1063 cm<sup>-1</sup>.  $[\alpha]_D = -99.7$  (c 1.0, H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 1.78$  (quin,  $J = 6.7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.22 (dddd,  $J = 17.6$ , 7.1, 2.1, 1.4 Hz, 2H, H-6), 2.74 (dd,  $J = 17.6$ , 5.4 Hz, 2H, H-6), 3.30 (t,  $J = 6.7$  Hz, 4H, CH<sub>2</sub>N), 3.74 (dd,  $J = 8.7$ , 4.3 Hz, 2H, H-4), 3.99–4.05 (m, 2H, H-5), 4.42 (dd,  $J = 4.3$ , 4.3 Hz, 2H, H-3), 6.39–6.42 (m, 2H, H-2) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 28.0$  (CH<sub>2</sub>), 31.0 (C6), 37.0 (CH<sub>2</sub>N), 66.0 (C-4), 66.3 (C-5), 71.4 (C-3), 131.0 (C-2), 133.1 (C-1), 170.1 (C=O) ppm. HRMS (FAB<sup>+</sup>): calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  387.1767; found for [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  387.1771.

**(3R,3'R,4S,4'S,5R,5'R)-N,N'-(butane-1,4-diyl)bis(3,4,5-trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxamide) (4c)**

39 mg, 41% yield. IR (neat):  $\tilde{\nu} = 3289$ , 2922, 1661, 1608, 1541, 1062 cm<sup>-1</sup>.  $[\alpha]_D = -98.9$  (c 1.0, H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 1.51\text{--}1.60$  (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.22 (dd,  $J = 17.6$ , 7.0 Hz, 2H, H-6), 2.74 (dd,  $J = 17.6$ , 5.2 Hz, 2H, H-6), 3.24–3.30 (m, 4H, CH<sub>2</sub>N), 3.74 (dd,  $J = 8.7$ , 4.3 Hz, 2H, H-4), 3.99–4.07 (m, 2H, H-5), 4.42 (dd,  $J = 4.1$ , 4.1 Hz, 2H, H-3), 6.38–6.42 (m, 2H, H-2) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 24.3$  (CH<sub>2</sub>), 30.0 (C6), 38.0 (CH<sub>2</sub>N), 64.4 (C-4), 65.0 (C-5), 70.1 (C-3), 129.3 (C-2), 132.0 (C-1), 169.0 (C=O) ppm. HRMS (FAB<sup>+</sup>): calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  401.1924; found for [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  401.1902.

**Enzyme kinetics**

**Cloning of Escherichia coli aroE gene**

Amplification of *aroE* gene from *E. coli* strain JM101<sup>20</sup> was carried out using the pair of PCR primers 5'-GGGAATCCATATGGAAACC TATGCTGTTTTGG-3' (forward) and 5'-GGTTGGGATCCTCACGCG GACAATTCCTCTG-3' (reverse) in which the restriction sites for *Nde* I and *Bam* H I respectively, are underlined. The PCR product was digested (Thermo Scientific, Waltman, MA) and ligated using the Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). For protein overproduction, the gene was subcloned into plasmid pCold-I (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) containing a 6-Histidine tag at its N-terminus that can be removed by factor Xa protease; the resulting plasmid was called pCold-EcSDH. *E. coli*  $\Delta$ aroE::Kan<sup>R</sup> (JW3242) from the Keio collection<sup>21</sup> was transformed with pCold-EcSDH, and the clone was sequenced using local facilities (Unidad de Síntesis y Secuenciación-IBT, UNAM).

**Enzyme expression and purification**

Transformed bacteria were used to inoculate 50 ml of Luria-Bertani (LB) media supplemented with ampicillin (100 μg/ml) and kanamycin (30 μg/ml). Cultures were incubated at 37 °C at 300 rpm until it reached an optical density (OD<sub>600nm</sub>) of 3.5, then 1 l of LB was inoculated in a Fernbach flask. Cells were grown at 37 °C and shaken at 200 rpm until the OD<sub>600nm</sub> reached 0.4 afterwards the culture was maintained at 15 °C for 30 min, and expression was induced with 0.5 mM of isopropyl thiogalactoside. The culture was allowed to grow with shaking for additional 17 h at 14 °C.

Cells were harvested by centrifugation at 8000 rpm for 10 min, washed with 20 ml of TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) and resuspended in 50 ml of lysis buffer A (Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0) mixed with 1 mg/ml of lysozyme (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). After 30 min of incubation on ice,

the mixture was added with protease inhibitor PMSF (Sigma-Aldrich) to a final concentration of 1 mM. Cells were lysed by sonication using Sonics Vibra Cell (Cole-Parmer Instruments, Vernon Hills, IL) at an amplitude of 40% for 5 min. The lysate was centrifugated at 13,000 rpm for 30 min at 4 °C, and the supernatant containing His6-tagged EcSDH was loaded onto a 1 ml Ni<sup>2+</sup> chelating HisTrap FF column (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) previously equilibrated with 10 volumes of lysis buffer containing 20 mM imidazole. The protein was eluted with an increasing gradient of imidazole (20–250 mM) in lysis buffer at a flow rate of 2 ml/min and analysed by SDS-PAGE with Coomassie staining.

Fractions containing His6-tagged EcSDH were concentrated and dialysed against 10 volumes of cleavage buffer B (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 8.0) in an Amicon centrifugal filter device with a 10 kDa cut-off (Millipore Corporation, Billerica, MA). Subsequent tag cleavage with factor Xa protease (NEB Biolabs, Beverly, MA) was performed at a concentration of 0.002 mg/ml of fraction volume, and the reaction was shaken at 16 °C for 48 h. A second affinity column in buffer C (Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5) was employed to recover EcSDH and cleavage of the tag from the enzyme was verified by SDS-PAGE. Pooled EcSDH was concentrated as previously described and further purified by loading onto a 120 ml HiLoad 16/600 Superdex 75 pg column (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) coupled to an Äkta-Pure system (GE Healthcare) eluting with buffer C at a flow rate of 1 ml/min. Fractions corresponding to the largest peak were dialysed against buffer D (Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, DTT 0.4 mM, EDTA 0.1 mM, glycerol 50%, pH 7.5) before storage at –70 °C. Purification, dialysis and concentration procedures were performed at 4 °C. The Bradford method<sup>22</sup> was used to determine the protein concentration using bovine serum albumin as standard.

#### Enzymatic activity assay

The enzymatic activity of EcSDH was assayed at 25 °C by monitoring the oxidation of NADPH at 340 nm ( $\epsilon = 6.18 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). All assays were performed in a Genesys 10S UV-vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). The reaction mix contained (final volume 200  $\mu\text{l}$ ) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM pH 7.5, NADPH 0.21 mM, DHS, synthesised molecules and diluted enzyme. Stored enzyme stocks (200 U/ml) were diluted 1:100 in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM pH 7.5 before use. The reaction was initiated by addition of 2  $\mu\text{l}$  of the diluted EcSDH enzyme and absorbance was measured within 2 min. During assays NADPH concentration was fixed at 0.21 mM, DHS concentrations were 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 and 1.5 mM and concentrations of amides were 0, 0.25, 0.5, 1 and 1.5 mM. Experiments were performed in triplicate.

To determine the inhibition mode Lineweaver–Burk plots of the inverse of velocities (1/ $v$ ) versus the inverse of substrate concentration 1/[S] were obtained. The Michaelis–Menten constant ( $K_m$ ), maximum velocity ( $V_{\text{max}}$ ) and inhibition constants ( $K_i$  and  $K_j$ ) were analysed using Equation (1)<sup>22,23</sup>. Where  $I$  represent the inhibitor concentration,  $K_i$  is defined as the dissociation constant for the enzyme-substrate-inhibitor complex and  $K_j$  as the dissociation constant for the enzyme-inhibitor complex. Kinetic data were processed by nonlinear regression using the Origin software (OriginLab, Northampton, MA).

Dissociation constants were related to  $IC_{50}$  values following the Cheng–Prusoff Equation (2)<sup>24</sup>. Where  $IC_{50}$  represents the concentration of inhibitor producing 50% of enzyme inhibition. The determined  $K_m$  of DHS was  $92.29 \pm 2.70 \mu\text{M}$ , and 125  $\mu\text{M}$  of DHS

was delimited as the substrate concentration [S]:

$$v = \frac{V_{\text{max}} [S]}{[S](1 + [I]/K_i) + K_m(1 + [I]/K_i)} \quad (1)$$

$$IC_{50} = \frac{K_m + [S]}{(K_m/K_i) + ([S]/K_i)} \quad (2)$$

#### Minimal inhibitory concentration (MIC) determination

The broth microdilution method<sup>25</sup> was used to determine the MIC of synthesised molecules against *E. coli* strain JM101. Cells were grown to exponential phase in LB media ( $OD_{600\text{nm}} \sim 0.5$ ) and the cultures were diluted to a concentration of  $2 \times 10^5$  colony-forming units/ml. The 96-well plates containing 75  $\mu\text{l}$  of LB media and synthesised compounds were inoculated with 75  $\mu\text{l}$  of the bacterial suspension and shaken at 37 °C for 16 h. Compounds were tested in a range of doubling concentrations between 4 and 512 mg/l with a final dimethylsulphoxide concentration of 0.8% (v/v). LB media supplemented with kanamycin was used as a positive control, and the  $OD_{600\text{nm}}$  of the DMSO-treated control was taken as representative of 100% bacterial growth. The MIC was defined as the lowest concentration of compound that completely inhibited bacterial growth. Experiments were performed in duplicate.

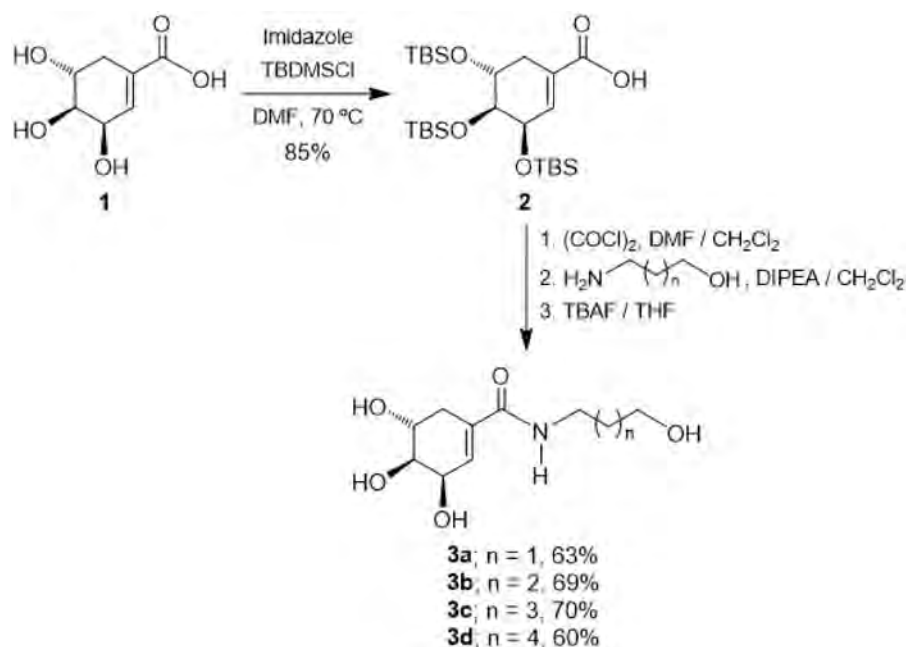
#### Molecular docking studies

The crystal structure of EcSDH enzyme (chain A) was taken from the Protein Data Bank (PDB code: 1NYT). After removing water molecules and heteroatoms, the protein was prepared at a pH 7.4 and hydrogen atoms were added using *Protein Preparation Wizard*<sup>26</sup> from the Schrödinger Software, suite 2014-3<sup>27</sup>. Energy minimisation on the enzyme was performed with YASARA<sup>28</sup>. Synthesised compounds were built and geometry optimised (MMFF94 force field) via the Molecular Docking Server<sup>29</sup>. A first docking was performed using the minimised protein structure, and the cofactor NADPH + H<sup>+</sup> and position of the ligand was checked against that reported in the literature<sup>30</sup>. In a second step, the protein with the docked cofactor was used as a target to dock the synthesised compounds. Docking of the ligands were carried out using the Molecular Docking Server with default settings. A box around the binding pocket of the enzyme was delimited as the simulation zone. Two hundred and fifty-five runs were employed in docking calculations. Interactions were analysed and molecular models were built in PyMol<sup>31</sup>.

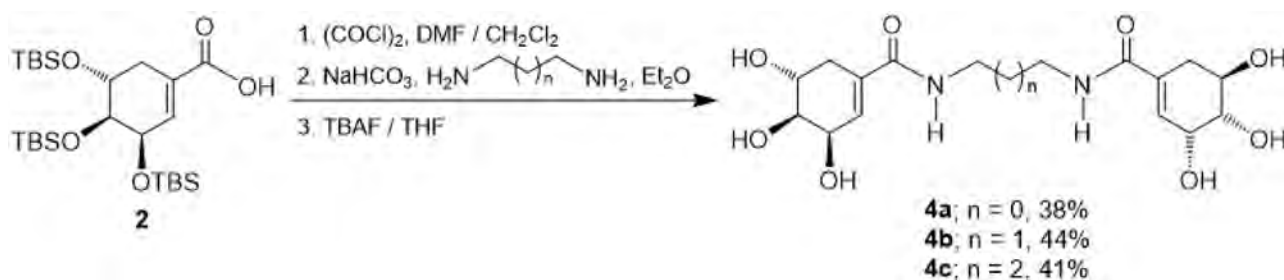
## Results and discussion

### Chemistry

The synthesis of target monoamides **3a–3d** was achieved by a convenient procedure starting from the commercially available (-)-shikimic acid **1** as shown in Scheme 1. Thus, in the first step (-)-shikimic acid **1** was reacted with *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) in the presence of imidazole in DMF solution at 70 °C, obtaining the compound **2** with selective protection of the hydroxyl groups at C-3, C-4 and C-5 as *tert*-butyldimethylsilyl ethers in 85% yield<sup>32</sup>. Then, the acid function in the silylated derivative **2** was transformed into the corresponding acid chloride by treatment with oxalyl chloride in DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, which by amidation with the appropriate hydroxylamine in the presence of DIPEA as a base in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub><sup>33</sup> followed by treatment with TBAF in THF, afforded the desired monoamides **3a–3d** in 60–70% yield<sup>34</sup>.



**Scheme 1.** Synthesis of monoamides **3a–d**.



**Scheme 2.** Synthesis of diamides **4a–c**.

On the other hand, diamides **4a–4c** which incorporates two units of SA were prepared through a slightly different procedure, as depicted in [Scheme 2](#). Thus, the *O*-protected SA **2** was reacted with oxalyl chloride in DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the intermediate acid chloride was treated with the corresponding diamine in Et<sub>2</sub>O in the presence of sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>)<sup>35</sup>. Finally, the silyl group removal was performed by reaction with TBAF in THF, obtaining the diamides **4a–4c** in 38–44% yield.

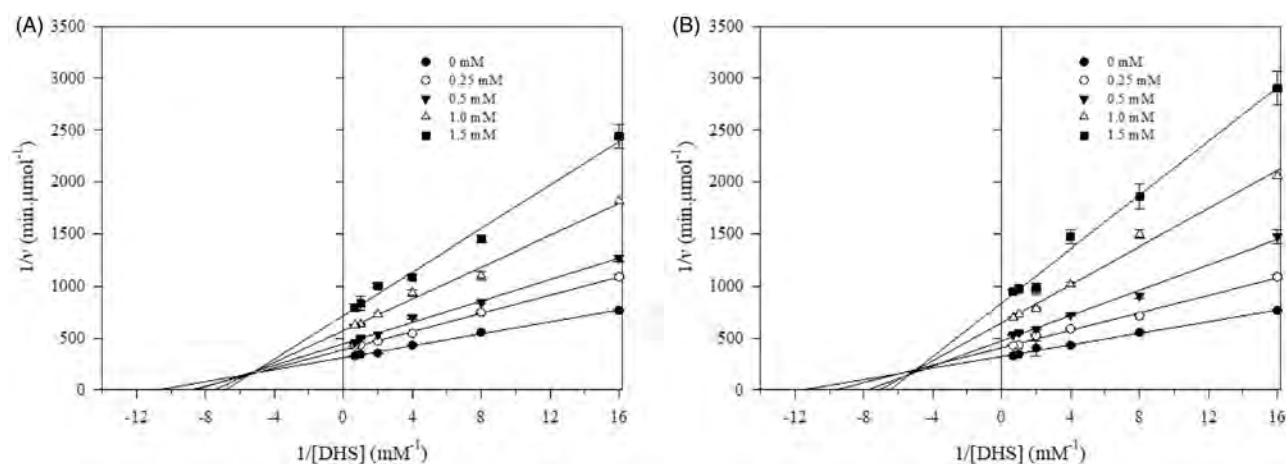
## Biological activity

### Enzyme inhibition assays

The inhibitory effect of SA amide-derivatives was tested against EcSDH at pH 7.4. To characterise the enzymatic activity for its more biological meaningful reaction, the enzyme was assayed in the direction of SA formation, for this DHS was used as the substrate. The activity of EcSDH enzyme was determined in the presence of different concentrations of synthesised compounds, and Lineweaver–Burk plots of  $(1/v)$  versus  $1/[S]$  were obtained. Representative inhibition plots of amides are shown in [Figure 1](#). The double reciprocal plots of all tested compounds showed a family of the second quadrant intersecting lines indicative of mixed type inhibition concerning DHS<sup>36</sup>. The mechanism underlying mixed type inhibition implies that inhibitor may bind to the ligand-free and ligand bounded enzyme but exhibit different affinities for one state or the other. To characterise the kinetic

parameters, data were analysed using [Equation \(1\)](#). The inhibition constants ( $K_i$  and  $K_i'$ ) are summarised in [Table 1](#). For every synthesised amide  $K_i < K_i'$  indicating a stronger affinity for the substrate free instead of bounded substrate enzyme. Monoamides displayed inhibition with  $K_i$  values in the 587–733  $\mu\text{M}$  range ([Table 1](#)). Despite the similar magnitude of inhibition, it appears that inhibition activity smoothly increases with increase in the alkyl chain length. The weakest inhibitor is corresponding to that of the propanol moiety in **3a** ( $K_i = 733 \pm 67 \mu\text{M}$ ) compared to the hexanol derivative **3d** ( $K_i = 587 \pm 49 \mu\text{M}$ ). Among the evaluated compounds, diamides were the most active inhibitors ( $K_i = 400–458 \mu\text{M}$ ) ([Table 1](#)). The similar inhibitory effect of diamides may arise with strong participation of the extra SA substituent. According to our results, the structural variations of synthesised compounds resulted in two inhibition potencies,  $IC_{50} = 829–953 \mu\text{M}$  for monoamides and  $IC_{50} = 588–652 \mu\text{M}$  for diamides. This behaviour may suggest two different binding modes to the enzyme.

Our amide SA derivatives showed weak inhibitory activity against EcSDH ( $K_i = 400–737 \mu\text{M}$ ) compared to the starting SA ( $K_i = 160 \mu\text{M}$ ) or the aldehyde vanillin ( $K_i = 93 \mu\text{M}$ ) but similar to the related aromatic compounds gallic acid ( $K_i = 380 \mu\text{M}$ ) and protocatechuic acid ( $K_i = 750 \mu\text{M}$ ) tested in *P. sativum*<sup>13</sup>. We propose that the bioisosteric replacement of the carboxylic acid of SA for the *N*-substituted amides lead to weaker inhibitors which could be the result of either differences in electronic distribution (anion carboxylate versus neutral amides), geometry and steric hindrance of the derivatives and/or different binding modes to the enzyme.



**Figure 1.** Lineweaver–Burk plots for inhibitory activity of mono and di amides against EcSDH. Lineweaver–Burk plots of EcSDH activity in the presence of (A) **3d** and (B) **4b**. Substrate DHS concentrations were 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 and 1.5 mM, respectively. The data represent the average of three experiments.

**Table 1.** Kinetic data and MIC values for the inhibitory effects of synthesised compounds.

Compound No.	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_j$ ( $\mu\text{M}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	MIC (mg/l)
<b>Mon3</b>	733 $\pm$ 67	1214 $\pm$ 58	949 $\pm$ 33	512
<b>Mon4</b>	717 $\pm$ 71	1145 $\pm$ 130	882 $\pm$ 54	512
<b>Mon5</b>	642 $\pm$ 34	1483 $\pm$ 91	953 $\pm$ 10	512
<b>Mon6</b>	587 $\pm$ 49	1188 $\pm$ 26	829 $\pm$ 49	512
<b>Dim2</b>	416 $\pm$ 69	831 $\pm$ 12	588 $\pm$ 55	512
<b>Dim3</b>	400 $\pm$ 50	896 $\pm$ 72	589 $\pm$ 56	512
<b>Dim4</b>	458 $\pm$ 81	945 $\pm$ 13	652 $\pm$ 65	512

#### Antibacterial activity of synthesised compounds

The compounds **3a–4c** were evaluated for growth inhibition of *E. coli* JM101. Although two groups of  $IC_{50}$  values were obtained in kinetic experiments, all molecules displayed the same weak antibacterial activity (MIC = 512 mg/l, Table 1). It has been reported that *E. coli* possess at least one SA transporter<sup>37</sup>, as well as the machinery for transport of diamides<sup>38,39</sup> and N-alkylated amides<sup>40</sup>. Also other polyhydroxylated six ring seemingly structures have been identified as SDH inhibitors active against Gram-negative bacterial growth<sup>41,42</sup>. Considering this observation and although our SA-derivatives bear structural modifications, it seems not possible that MIC values are due to negligible permeation of the cell.

#### Docking studies

Molecular docking studies were performed to rationalise the inhibitory activity of synthesised compounds by predicting their interactions with the active site of EcSDH enzyme. Taking into account that for all tested amides  $K_i < K_j$  the molecular binding modes to DHS-free enzyme were simulated. Analysis of monoamides predicted that they could all bind to the active site in a similar fashion. Interactions originate from the hydroxyl ended alkyl chain, amide group and SA moiety (Figure 2(A,B)). Interestingly, the alkyl chain orients towards a hydrophilic patch inside the active site. Except for **3a**, all monoamides form one hydrogen bond between the hydroxyl group of their aliphatic chains and an amino acid of the hydrophilic patch. The amide group is held in place by hydrogen bonding of the N-H and C=O groups to the side chain of the conserved Y215 and the backbone of T61, respectively. Also, a hydrogen bond is formed between the hydroxyl group (C3) of the SA moiety and the backbone of H13. In the case of compounds **4a–4c** modelling suggested that one SA moiety binds to the active site of EcSDH whereas the amide groups and the second SA moiety anchors to a hydrophilic groove

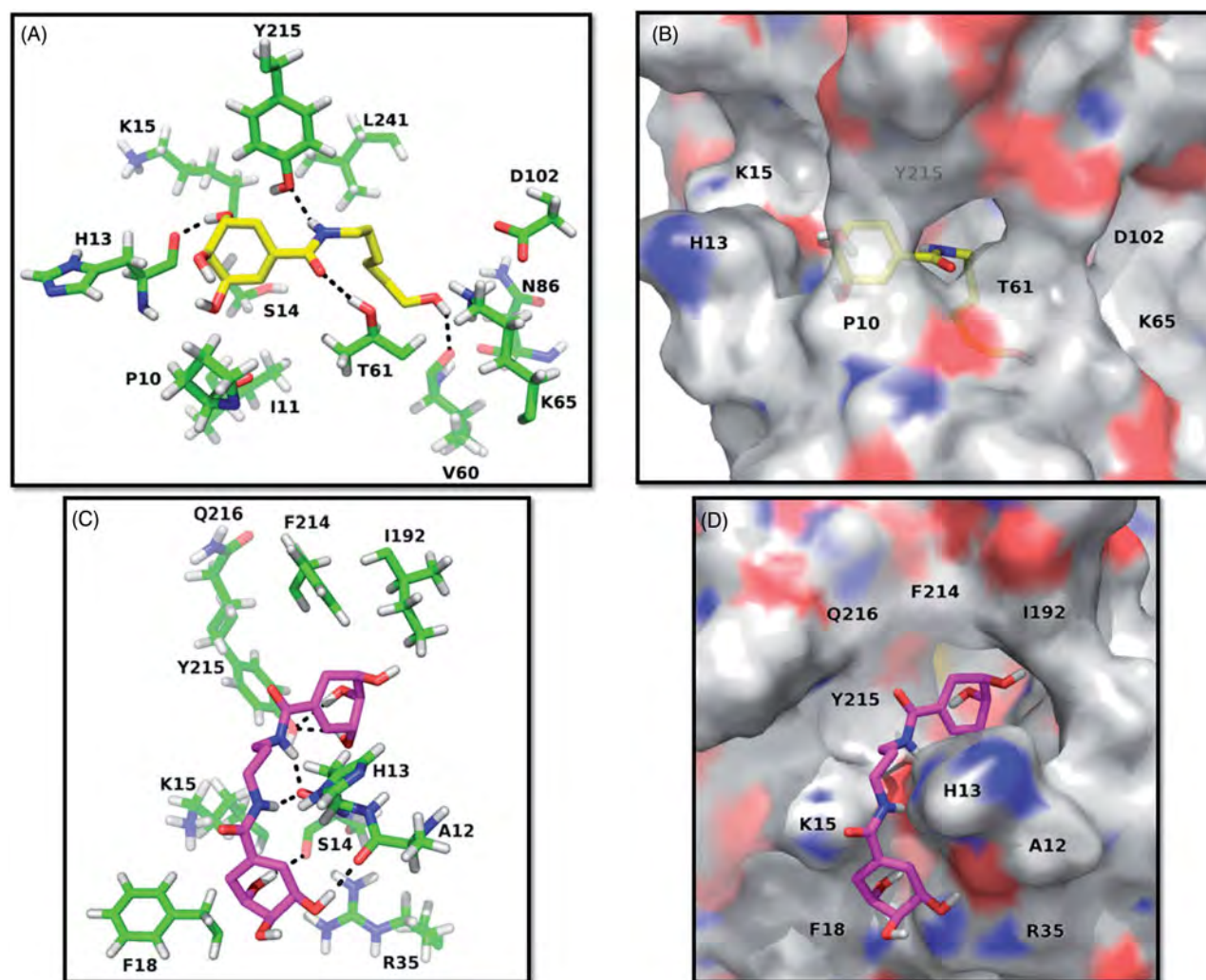
in the immediacy of the binding pocket (Figure 2(C,D)), which is in good agreement with the observed inhibition modes. Inside the active site, the side chain of Y215 and hydroxyl groups of the SA moiety form hydrogen bonds. Furthermore, the amide groups create hydrogen bonds with H13. Finally, in the vicinity of the binding pocket hydroxyl groups of the SA nucleus interact with the backbones of S14 and A12 via hydrogen bonding. All described hydrogen bonds were in the 1.8–2.4 Å range of distance.

The docking studies suggest that major determinants for binding of synthesised amides are the hydroxyl groups of SA moieties or N-alkylated chains and the amide groups. A hydrophilic patch in the active site of EcSDH was identified, it comprises the catalytic dyad K65-D102<sup>12</sup> responsible for enzyme activity, as well as the side chains of N86, D102, Y215 and the backbone of V60 and T61. A hydrophilic groove in the immediacy of the binding pocket is composed of the backbones of A12, H13, S14 and the side chain of R35. These observations highlight two potential points of interaction for binding of polar molecules as polyhydroxylated non-bulky derivatives that can be explored in the development of compounds with inhibitory activity.

Bioisosteric replacement of the carboxylate moiety for SA amide derivatives lead to weaker inhibitors than the starting acid. Molecular modelling studies suggested that although sharing interactions with amino acids S14, T61 and Y215 the synthesised compounds bind to somewhat more superficial subsites in the EcSDH enzyme compared to SA. The prediction suggested that SA binds deeply inside the catalytic pocket and protein crystal structures of SDH enzymes with SA (PDB code= 3PHH, 3PHI and 3DOO) showed a similar buried binding. This subsite may be strongly related to catalytic activity as the competitive inhibitor vanillin is predicted to position there as well (Figure 3S).

#### Conclusions

We have described a facile method for the preparation of amide derivatives of SA from simple available starting materials. In the present study, synthesised compounds **3a–4c** were evaluated for their *in vitro* EcSDH inhibition and antibacterial activity against *E. coli* JM101. Diamide derivatives proved to be stronger inhibitors of EcSDH enzyme than monoamides. The most active compounds were molecules **4a** and **4b** with  $IC_{50}$  588 and 589  $\mu\text{M}$ , respectively. Enzyme kinetic analysis showed that all tested compounds are mixed type inhibitors. Molecular modelling studies of compounds **3a–4c** suggested two different binding modes of monoamide and



**Figure 2.** Predicted binding modes of mono and di amides to EcSDH. (A, C) Three-dimensional representations of EcSDH in complex with **3d** (yellow carbons) and **4b** (magenta carbons). The most involved residues are labelled and shown as green carbons. Hydrogen bonds are represented as black dashed lines. (B, D) Surface and stick representations of the proposed binding modes of synthesised amides.

diamide compounds to the EcSDH active site. To the best of our knowledge, no previous studies have been reported on the possible inhibitory potential of SA derivatives as SDH inhibitors. These inhibitors represent useful chemical scaffolds that can be further modified for the development of novel SDH inhibitors with enhanced inhibitory activity.

### Acknowledgements

The authors thank Harim Lechuga-Eduardo and Jaime R. Porrás-Domínguez for their technical support and advice.

### Disclosure statement

The authors declare no conflicts of interest.

### Funding

This study was supported by CONACYT Ciencia Básica project 240519 and projects 181816 and 248868. CSCF is thankful to the Postdoctoral fellowship from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) of the Universidad Nacional

Autónoma de México (UNAM) and Grant 247842 PDCPN201401 (CONACYT – México).

### References

- Mir R, Jallu S, Singh TP. The shikimate pathway: review of amino acid sequence, function and three-dimensional structures of the enzymes. *Crit Rev Microbiol* 2015;41: 172–89.
- Maeda H, Dudareva N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2012;63:73–105.
- Díaz Quiroz DC, Carmona SB, Bolívar F, Escalante A. Current perspectives on applications of shikimic and aminoshikimic acids in pharmaceutical chemistry. *Res Rep Med Chem* 2014;4:35–46.
- Martínez JA, Bolívar F, Escalante A. Shikimic acid production in *Escherichia coli*: from classical metabolic engineering strategies to omics applied to improve its production. *Front Bioeng Biotechnol* 2015;3:145.
- Amer FA, El-behedy EM, Mohtady HA. New targets for antibacterial agents. *Biotechnol Mol Biol Rev* 2008;3: 46–57.

6. Gordon S, Simithy J, Goodwin D. Selective *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase inhibitors as potential antibacterials. *Perspect Medicin Chem* 2015;7:9–20.
7. Gonzalez-Bello C. Inhibition of shikimate kinase and type II dehydroquinase for antibiotic discovery: structure-based design and simulation studies. *Curr Top Med Chem* 2016;16:960–77.
8. Derrer B, Macheroux P, Kappes B. The shikimate pathway in apicomplexan parasites: implications for drug development. *Front Biosci* 2013;18:944.
9. Roberts F, Roberts CW, Johnson JJ, et al. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature* 1998;393:801.
10. Steinrücken HC, Amrhein N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;94:1207–12.
11. Bai SH, Ogbourne SM. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016;23:18988–9001.
12. Peek J, Christendat D. The shikimate dehydrogenase family: functional diversity within a conserved structural and mechanistic framework. *Arch Biochem Biophys* 2015;566:85–99.
13. Balinsky D, Davies DD. Aromatic biosynthesis in higher plants. 2. Mode of attachment of shikimic acid and dehydroshikimic acid to dehydroshikimic reductase. *Biochem J* 1961;80:296–300.
14. Baillie AC, Corbett JR, Dowsett JR, McCloskey P. Inhibitors of shikimate dehydrogenase as potential herbicides. *Pestic Sci* 1972;3:113–20.
15. Han C, Wang L, Yu K, et al. Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from *Helicobacter pylori*. *FEBS J* 2006;273:4682–92.
16. Peek J, Shi T, Christendat D. Identification of novel polyphenolic inhibitors of shikimate dehydrogenase (AroE). *J Biomol Screen* 2014;19:1090–8.
17. Avitia-Domínguez C, Sierra-Campos E, Salas-Pacheco J, et al. Inhibition and biochemical characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* shikimate dehydrogenase: an *in silico* and kinetic study. *Molecules* 2014;19:4491–509.
18. Hsu K-C, Cheng W-C, Chen Y-F, et al. Pathway-based screening strategy for multitarget inhibitors of diverse proteins in metabolic pathways. *PLoS Comput Biol* 2013;9:e1003127.
19. Dell KA, Frost JW. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *J Am Chem Soc* 1993;115:11581–9.
20. Flores N, Flores S, Escalante A, et al. Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metab Eng* 2005;7:70–87.
21. Baba T, Ara T, Hasegawa M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2006;2:2006.0008.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitative microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
23. Alimoradi N, Ashrafi-kooshk MR, Shahlaei M, et al. Diethylalkylsulfonamido (4-methoxyphenyl)methyl phosphonate/phosphonic acid derivatives act as acid phosphatase inhibitors: synthesis accompanied by experimental and molecular modeling assessments. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017;32:20–8.
24. Cheng Y-C, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973;22:3099–108.
25. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 2001;48(suppl 1):5.
26. Sastry GM, Adzhigirey M, Sherman W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J Comput Aided Mol Des* 2013;27:221–34.
27. Schrödinger. Maestro. LLC, New York, NY; 2014.
28. Krieger E, Koraimann G, Vriend G. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA – a self-parameterizing force field. *Proteins* 2002;47:393–402.
29. Bikadi Z, Hazai E. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. *J Cheminform* 2009;1:1–16.
30. Michel G, Roszak AW, Sauvé V, et al. Structures of shikimate dehydrogenase AroE and its paralog YdiB: a common structural framework for different activities. *J Biol Chem* 2003;278:19463–72.
31. Schrödinger L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. 2015.
32. Sánchez-Abella L, Fernández S, Verstuyl A, et al. Synthesis, conformational analysis, and biological evaluation of 19-nor-vitamin D<sub>3</sub> analogues with A-ring modifications. *J Med Chem* 2009;52:6158–62.
33. Ramkumar N, Raghavendra MS, Nagarajan R. Friedel–Crafts cyclodehydration approach toward the synthesis of ellipticine and 9-methoxyellipticine. *SYNLETT* 2014;25:2791–3.
34. Sánchez-Abella L, Fernández S, Verstuyl A, et al. Synthesis and biological evaluation of new 6-s-cis locked 1,2,25-trihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analogues. *Bioorg Med Chem* 2007;15:4193–202.
35. Sumiyoshi T, Nishimura K, Nakano M, et al. Molecular assembly of C<sub>2</sub>-symmetric  $\alpha$ ,  $\omega$ -alkyldenediamines into coiled coil and twisted ribbon aggregates. *JACS* 2003;125:12137–42.
36. Segel IH. Enzyme kinetics: behaviour and analysis of rapid equilibria and steady-state equilibria. New York: John Wiley and Sons; 1993.
37. Whipp MJ, Camakaris H, Pittard AJ. Cloning and analysis of the shiA gene, which encodes the shikimate transport system of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 1998;209:185–92.
38. Prabhala BK, Aduri NG, Jensen JM, et al. New insights into the substrate specificities of proton-coupled oligopeptide transporters from *E. coli* by a pH sensitive assay. *FEBS Lett* 2014;588:560–5.
39. Harder D, Stolz J, Casagrande F, et al. DtpB (YhiP) and DtpA (TppB, YdgR) are prototypical proton-dependent peptide transporters of *Escherichia coli*. *FEBS J* 2008;275:3290–8.
40. Payne JW. Peptide transport in *Escherichia coli*: permease specificity towards terminal amino group substituents. *J Gen Microbiol* 1974;80:269–76.