



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Aislamiento y síntesis parcial de análogos de duclauxina: evidencias teórico-experimentales de su interacción con la proteína tirosina fosfatasa 1B (*hPTP1B*<sub>1-400</sub>)**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. Enrique Aguilar Ramírez

TUTOR

Dr. José Alberto Rivera Chávez  
Instituto de Química

CD.MX., JULIO 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Aislamiento y síntesis parcial de análogos de duclauxina: evidencias teórico-experimentales de su interacción con la proteína tirosina fosfatasa 1B (*hPTP1B*<sub>1-400</sub>)**

**TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**Q.F.B. Enrique Aguilar Ramírez**



Ciudad de México, julio de 2021

## **JURADO ASIGNADO**

<b>PRESIDENTE:</b>	Dr. Francisco Hernández Luis
<b>VOCAL:</b>	Dra. Karina Martínez Mayorga
<b>VOCAL:</b>	Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa
<b>VOCAL:</b>	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
<b>SECRETARIO:</b>	Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez

### **Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:**

**Laboratorio 2-6, Departamento de Productos Naturales,  
Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México**

---

Q.F.B. Enrique Aguilar Ramírez  
Sustentante

---

Dr. José Alberto Rivera Chávez  
Tutor

## SIMPOSIO

**Exploring the metabolomic potential of *Talaromyces* sp. using OSMAC strategy and molecular networking.** Póster. Aguilar-Ramírez Enrique, Rivera-Chávez José. Simposio Virtual 2020 del Instituto de Química (4 de diciembre, 2020).

## ARTÍCULOS

Jiménez-Arreola Brenda S., Aguilar-Ramírez Enrique, Cano-Sánchez Patricia, Morales-Jiménez Jesús, González-Andrade Martín, Medina-Franco José L., y Rivera-Chávez José, 2020. **Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B1-400: Insights into mechanistic kinetics from in vitro and in silico studies.** Bioorganic Chemistry. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103893

Rivera-Chávez José, Bustos-Brito Celia, Aguilar-Ramírez Enrique, Martínez-Otero Diego, Rosales-Vázquez Luis D., Dorazco González Alejandro y Cano-Sánchez Patricia, 2020. **Hydroxy-neo-clerodanes and 5,10-seco-neo-clerodanes from *Salvia decora*.** Journal of Natural Products. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.0c00313

## AGRADECIMIENTOS

- A la **Universidad Nacional Autónoma de México** que, por medio de su Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, me permitió formarme académica y profesionalmente.
- Al **Dr. José Rivera Chávez**, por el compromiso, esmero y pasión dedicados a este proyecto; por la instrucción y las herramientas brindadas que enriquecieron sustancialmente mi formación. Y, sobre todo, por las interminables y valiosísimas enseñanzas de toda clase compartidas.
- Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (CVU 809192) y por el financiamiento autorizado a través del proyecto Ciencia de Frontera CF-2019-263977.
- A la **Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC, LANCAD-UNAM-DGTIC-374)** de la UNAM, por la asignación de recursos computacionales para la realización de los cálculos de dinámica molecular.
- A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)** por el financiamiento aportado para el desarrollo de este trabajo por medio del programa **UNAM-PAPIIT IA203220**.
- A la **Dra. Celia Bustos-Brito** y a la **Dra. Beatriz Quiroz-García** del Instituto de Química por los análisis espectroscópicos.
- Al **Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN)** por la colección de los datos espectroscópicos.
- Al **Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC)** por la adquisición de los datos espectrométricos.
- Al **Dra. María del Carmen García-González**, al **M. en C. Everardo Tapia Mendoza** del Instituto de Química por los análisis espectrométricos.
- Al **Dr. Nicholas H. Oberlies** por la adquisición de espectros de masas.
- Al **Dr. Alejandro Dorazco González**, por proveer los equipos para la obtención de espectros de UV y fluorescencia.
- A la **Dra. Patricia Cano Sánchez**, por la expresión/purificación de la *h*PTP1B<sub>1-400</sub>.
- A la **Dra. Martha Lydia Macías Ruvalcaba**, por proveer el equipo para la lectura de los ensayos enzimáticos.
- A los miembros del jurado que sugirieron correcciones del trabajo.
- A mis compañeros y amigos que contribuyeron con sus atinadas observaciones para corregir este trabajo. En particular a la M. en C. Karol Carrillo Jaimes y al M. en C. Ulises González Martínez.
- Y especialmente a mi familia, por su cariño y apoyo incondicional. Muchas gracias.

## DEDICATORIAS

*A mis padres.*

*“Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para cambiar lo que somos”*

Eduardo Galeano

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	IV
LISTA DE FIGURAS .....	VII
LISTA DE TABLAS .....	IX
LISTA DE CUADROS .....	X
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. ANTECEDENTES .....	6
2.1 Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B): Generalidades .....	6
2.2 Implicaciones de la PTP1B en el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas: Obesidad, diabetes mellitus y cáncer .....	8
2.2.1 Diabetes mellitus .....	8
2.2.2 Obesidad .....	8
2.2.3 Cáncer .....	9
2.3 Inhibidores de PTP1B .....	9
2.4 Inhibidores de PTP1B de cadena completa .....	17
2.5 Estrategia OSMAC .....	18
2.6 GNPS y metabolómica .....	20
2.7 Síntesis parcial como estrategia para incrementar el espacio químico de productos naturales .....	23
3. HIPÓTESIS .....	27
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	28
5. PARTE EXPERIMENTAL .....	31
5.1 Obtención de los extractos orgánicos .....	31
5.1.1 Preparación de cultivo semilla .....	31
5.1.2 Cultivo en mediana escala .....	31
5.1.3 Extracción de medios sólidos .....	31
5.2 Análisis cromatográficos .....	33
5.3 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas .....	33
5.4 Estudio químico de <i>Talaromyces</i> sp. IQ-313 .....	34
5.4.1 Análisis de redes moleculares .....	34
5.4.2 Análisis de componentes principales (PCA) .....	35
5.5 Purificación de productos biosintéticos generados por fermentación mixta .....	36

5.5.1 Fraccionamiento de co-cultivo IQ-313/IQ-043 .....	36
5.5.2 Aislamiento, purificación e identificación de 01002-93-3 (5) y 01002-93-4 (6).....	37
5.6 Síntesis parcial de análogos de duclauxina .....	39
5.7 Purificación de derivados semisintéticos de duclauxina (1).....	40
5.7.1 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-107-1 (7) y 01002-107-2 (8) .....	40
5.7.2 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-117-1 (9).....	41
5.7.3 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-114-1 (10).....	42
5.7.4 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-118-3 (11).....	43
5.7.5 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-125-1 (12).....	44
5.7.6 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-135-1 (13).....	45
5.7.7 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-124-1 (14).....	45
5.7.8 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-134-1 (15).....	46
5.7.9 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de talaromycesona B (2) .....	47
5.8 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto inhibitorio de compuestos puros sobre hPTP1B <sub>1-400</sub> .....	48
5.9 Ensayos de interacción ligante-proteína por apagamiento de la fluorescencia intrínseca de hPTP1B <sub>1-400</sub> .....	49
5.10 Estudios de acoplamiento molecular .....	50
5.10.1 Predicción de la estructura 3D de hPTP1B <sub>1-400</sub> .....	50
5.10.2 Preparación de proteínas y ligandos para estudios de acoplamiento molecular .....	50
5.10.3 Acoplamiento molecular y validación.....	51
5.11 Cálculos de dinámica molecular .....	51
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
6.1 Estrategia general seguida para la generación de análogos de duclauxina .....	52
6.1.1 Exploración del potencial biosintético de <i>Talaromyces</i> sp. IQ-313 como productor de fenalenosas dimericas tipo duclauxina (1).....	52
6.2 Estudio químico de la fermentación mixta <i>Talaromyces</i> sp. IQ-313/ <i>Aspergillus</i> sp. IQ-043. .....	60
6.2.1 Elucidación estructural de los productos 5 y 6.....	61
6.3 Síntesis parcial de análogos de duclauxina (1).....	63
6.3.1 Modelado por homología de la estructura terciaria de hPTP1B <sub>1-400</sub> .....	63
6.3.2 Estudios de acoplamiento molecular de derivados semisintéticos de duclauxina (1) frente a hPTP1B <sub>1-400</sub> .....	64
6.3.3 Elucidación estructural de los productos 8 y 9.....	67
6.3.4 Elucidación estructural de los productos 9-11 .....	69
6.3.5 Elucidación estructural de los productos 12-15 .....	73

6.3.6 Obtención de talaromycesona B ( <b>2</b> ) a partir de duclauxina ( <b>1</b> ) .....	75
6.4 Evaluación de la inhibición de la actividad enzimática de <i>h</i> PTP1B <sub>1-400</sub> . .....	77
6.5 Ensayos de unión entre productos obtenidos y <i>h</i> PTP1B <sub>1-400</sub> .....	81
6.6 Relación estructura actividad.....	85
6.7 Modelado biomolecular.....	86
7. CONCLUSIONES .....	88
8. PERSPECTIVAS .....	89
9. REFERENCIAS .....	90
10. ANEXO I .....	100
11. PUBLICACIONES.....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviatura	Significado
$\Delta$	Error de masa teórica respecto a masa experimental
$\Delta G$	Energía libre de Gibbs
%	Por ciento
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{m}$	Micrometros
$\mu\text{o}$	Microorganismo
A	Absorbancia
Å	Angström
ADMETox	Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación, Toxicidad
ADT	AutoDockTools
Asp	Aspartato
BGCs	Clústeres de Genes Biosintéticos
C	Carbono
C/N	Carbono/Nitrógeno
calcd.	Calculada
$\text{CDCl}_3$	Cloroformo deuterado
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Diclorometano
$\text{CI}_{50}$	Concentración inhibitoria media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
EM-SQ-TOF	Espectrometría de masas por cuadrupolo simple y tiempo de vuelo
cLogP	Coefficiente de reparto
CPD	Caldo papa dextrosa
CV	Volumen de columna
d	Señal doble
DART	Análisis directo en tiempo real
DCE	Dicroísmo Circular Electrónico
dd	Señal doble de dobles
ddd	Señal doble de doble de dobles
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTII	Diabetes mellitus tipo 2
dq	Señal doble de cuarteto
dt	Señal doble de triple
DTT	Ditiotreitol
EM-AR	Espectrometría de masas de alta resolución
EM-AR-DART	Espectrometría de masas de alta resolución modalidad de ionización DART

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
EM-AR-AJS	Espectrometría de masas de alta resolución modalidad de ionización <i>Jet Stream Technology</i>
EM-AR-ESI	Espectrometría de masas de alta resolución modalidad de ionización <i>electrospray</i>
F	Intensidad de fluorescencia
FBMN	<i>Feature Based Molecular Networking</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramos
Gln	Glutamina
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
H	<i>Hidrógeno</i>
HMBC	Conectividad heteronuclear a enlaces múltiples
<i>h</i> PTP1B <sup>1-400</sup>	PTP1B de cadena completa de humano
HSQC	Correlación cuántica única heteronuclear
IR	Receptor de insulina
IRS	Substratos del receptor de insulina
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kcal	Kilocaloría
<i>K<sub>d</sub></i>	Constante de disociación
<i>K<sub>i</sub></i>	Constante de inhibición
<i>K<sub>m</sub></i>	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
LANCIC	Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural
LGA	Algoritmo Genético Lamarckiano
L-Phe-es-et	Éster etílico de fenilalanina
Lys	Lisina
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MeCN	Acetonitrilo
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
m	Señal multiplete
mg	Miligramos
MHz	Mega Hertz
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
nm	Nanómetro
OAc	Grupo acetato

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
OSMAC	<i>One Strain Many Compounds</i>
PC	Componente principal
PCA	Análisis de Componentes Principales
PDA	Agar papa dextrosa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Phe	Fenilalanina
pNPP	Fosfato de <i>p</i> -nitrofenilo
PNs	Productos naturales
ppm	Partes por millón
PTKs	Proteínas cinasas de tirosina
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
PTPs	Proteínas tirosina fosfatasas
pTyr	Fosfotirosina
q	Cuarteto
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
rpm	Revoluciones por minuto
s	Señal simple
sa	Singulete ancho
t	Señal triple
TEA	Trietilamina
TM	<i>Registered Trademark</i>
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
Trp	Triptófano
UPLC	Cromatografía de Líquidos de ultra eficiencia
UV	Espectroscopía de ultravioleta
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima
δ	Desplazamiento químico
δ <sub>C</sub>	Desplazamiento químico de carbono
δ <sub>H</sub>	Desplazamiento químico de hidrógeno
λ	Longitud de onda

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo enzimático de hidrólisis de pTyr catalizado por PTP1B. ....	7
<b>Figura 2.</b> Estructura terciaria de <i>h</i> PTP1B <sub>1-400</sub> generada a partir de un modelo por homología. ....	7
<b>Figura 3.</b> Productos naturales y de semisíntesis obtenidos de <i>Aspergillus terreus</i> IQ-046, con actividad inhibitoria sobre <i>h</i> PTP1B <sub>1-400</sub> . ....	19
<b>Figura 4.</b> Protocolo general de creación de redes moleculares en GNPS. Tomado y editado de: Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. ....	22
<b>Figura 5.</b> Ejemplos exitosos de moléculas empleadas en la terapéutica que se han obtenido por semisíntesis. ....	24
<b>Figura 6.</b> Artemisinina y derivados semisintéticos. ....	25
<b>Figura 7.</b> El inmunosupresor fingolimod y el antifúngico caspogfungina. ....	26
<b>Figura 8.</b> Cromatograma de análisis por CLAE de los extractos de los cultivos axénicos de IQ-313, IQ-043, IQ-046 e IQ-053, así como de los co-cultivos IQ-313/IQ-043 ( <b>A</b> ), IQ-313/IQ-046 ( <b>B</b> ) e IQ-313/IQ-053 ( <b>C</b> ). ....	36
<b>Figura 9.</b> Cromatograma de análisis por CLAE de las fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto del co-cultivo IQ-313/IQ-043. ....	37
<b>Figura 10.</b> Cromatograma del fraccionamiento de 01002-87-6, del cual se aislaron los productos 01002-93-3 ( <b>5</b> ) y 01002-93-4 ( <b>6</b> ). ....	38
<b>Figura 11.</b> Cromatogramas de duclauxina ( <b>1</b> ) y productos de reacciones de semisíntesis con los aminoácidos y aminas primarias seleccionadas para escalamiento. ....	39
<b>Figura 12.</b> Cromatograma de la purificación de 01002-107-1 ( <b>7</b> ) y 01002-107-2 ( <b>8</b> ). ....	40
<b>Figura 13.</b> Cromatograma de la purificación de 01002-117-1 ( <b>9</b> ). ....	41
<b>Figura 14.</b> Cromatograma de la purificación de 01002-114-1 ( <b>10</b> ). ....	42
<b>Figura 15.</b> Cromatograma de la purificación de 01002-118-3 ( <b>11</b> ). ....	43
<b>Figura 16.</b> Cromatograma de la purificación de 01002-125-1 ( <b>12</b> ). ....	44
<b>Figura 17.</b> Cromatograma de la purificación de 01002-135-1 ( <b>13</b> ). ....	45
<b>Figura 18.</b> Cromatograma de la purificación de 01002-124-1 ( <b>14</b> ). ....	46
<b>Figura 19.</b> Cromatograma de la purificación de 01002-134-1 ( <b>15</b> ). ....	47
<b>Figura 20.</b> Cromatograma de la purificación de talaromycesona B ( <b>2</b> ). ....	48
<b>Figura 21.</b> Análisis de componentes principales que ubica al extracto de IQ-313 en presencia de EDTA (1000 $\mu$ M), del ion $\text{Co}^{2+}$ (1000 $\mu$ M) y $\text{CaCl}_2$ (1 mM) en coordenadas distintas al resto de los experimentos. ....	54
<b>Figura 22.</b> Análisis de componentes principales que ubica al extracto de IQ-313_ <i>K. pneumoniae</i> y al extracto del experimento IQ-313 en presencia de 5% de DMSO en coordenadas distintas al resto de los experimentos. ....	55

<b>Figura 23.</b> Análisis de componentes principales que ubica al extracto de fermentación mixta IQ-313/IQ-043 y IQ-313/IQ-046 en coordenadas distintas al resto de los experimentos.....	55
<b>Figura 24.</b> Espacio químico observado en experimentos de fermentación mixta entre IQ-313 ( <i>Talaromyces</i> sp.) e IQ-043 ( <i>Aspergillus</i> sp.).....	57
<b>Figura 25.</b> Derreplicación de compuestos presentes en extracto de <i>Talaromyces</i> sp. (rojo claro) y de co-cultivo <i>Talaromyces</i> sp.- <i>Aspergillus</i> sp.....	57
<b>Figura 26.</b> Distinción de compuestos isobáricos y agrupamiento con análogos por análisis clásico. ....	59
<b>Figura 27.</b> Distinción de compuestos isobáricos y agrupamiento con análogos por análisis FBMN. ....	59
<b>Figura 28.</b> Red molecular completa del análisis de los experimentos <i>Talaromyces</i> sp. IQ-313, <i>Aspergillus</i> sp. IQ-043 y fermentación mixta generada por análisis FBMN. ....	60
<b>Figura 29.</b> Modelos generados por homología para la proteína <i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub> a través de la plataforma I-TASSER.....	64
<b>Figura 30.</b> Acoplamiento molecular del sustrato pNPP con el modelo generado por homología para <i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub> .....	65
<b>Figura 31.</b> Estudios de acoplamiento molecular de fenalenonas diméricas de origen natural y moléculas candidato para semisíntesis. ....	66
<b>Figura 32.</b> Fenalenonas diméricas de origen natural y semisintético estudiadas por acoplamiento molecular con <i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub> . ....	66
<b>Figura 33.</b> Hidrólisis de pNPP, catalizada por <i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub> .....	78
<b>Figura 34.</b> Unión predicha por acoplamiento molecular de las fenalenonas estudiadas que fueron más activas y las que fueron menos activas. ....	79
<b>Figura 35.</b> Curvas de concentración-respuesta para la inhibición de las fenalenonas evaluadas por triplicado, contra la actividad enzimática de <i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub> . ....	79
<b>Figura 36.</b> Espectros de fluorescencia y curvas de titulación de <i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub> con concentraciones crecientes de las fenalenonas <b>1-15</b> .....	82
<b>Figura 37.</b> Representación del espacio químico de análogos de duclauxina ( <b>1</b> ) de origen natural y semisintéticos y su actividad biológica como inhibidores de la enzima <i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub> . ....	86
<b>Figura 38.</b> <b>A)</b> Perfil RMSD del estado basal de <i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub> , <i>hPTP1B</i> <sub>1-300</sub> , y <i>hPTP1B</i> <sub>301-400</sub> . RMSD de <b>1</b> - <i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub> , <b>1</b> - <i>hPTP1B</i> <sub>1-300</sub> , y <b>1</b> - <i>hPTP1B</i> <sub>301-400</sub> . RMSD de <b>4</b> - <i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub> , <b>4</b> - <i>hPTP1B</i> <sub>1-300</sub> , y <b>4</b> - <i>hPTP1B</i> <sub>301-400</sub> . RMSD de <b>ácido ursólico</b> - <i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub> , <b>ácido ursólico</b> - <i>hPTP1B</i> <sub>1-300</sub> , y <b>ácido ursólico</b> - <i>hPTP1B</i> <sub>301-400</sub> . El RMSD de los átomos del esqueleto de la conformación equilibrada (0ns) se presentan en función del tiempo. <b>B)</b> Raíz cuadrada del promedio de las fluctuaciones (RMSF) de los valores para los átomos del esqueleto mostrados como función del número de residuo. ....	87

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Metabolitos secundarios de origen fúngico con actividad inhibitoria sobre PTP1B.....	11
<b>Tabla 2.</b> Diseño de experimentos OSMAC. ....	32
<b>Tabla 3.</b> Clasificación taxonómica de cepas fúngicas.....	33
<b>Tabla 4.</b> Valores $CI_{50}$ de las fenalenonas estudiadas. ....	78
<b>Tabla 5.</b> Constante de disociación ( $K_d$ ) y coeficiente de correlación cuadrático ( $R^2$ ) de la bondad de ajuste del modelo. ....	82

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Datos espectroscópicos para los productos <b>5</b> y <b>6</b> adquiridos en $\text{CDCl}_3$ ( $^1\text{H}$ 700 MHz, $^{13}\text{C}$ 175 MHz). .....	62
<b>Cuadro 2.</b> Datos espectroscópicos de los compuestos <b>7</b> y <b>8</b> adquiridos en $\text{CDCl}_3$ ( $^1\text{H}$ 400 MHz). .....	68
<b>Cuadro 3.</b> Datos espectroscópicos del compuesto 01002-117-1 ( <b>9</b> ) adquiridos en MeOD ( $^1\text{H}$ 400 MHz, $^{13}\text{C}$ 100 MHz). .....	70
<b>Cuadro 4.</b> Datos espectroscópicos del compuesto 01002-114-1 ( <b>10</b> ) adquiridos en $\text{CDCl}_3$ ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125MHz). .....	71
<b>Cuadro 5.</b> Datos espectroscópicos del compuesto 01002-118-3 ( <b>11</b> ) adquiridos en $\text{CDCl}_3$ ( $^1\text{H}$ 400 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz). .....	72
<b>Cuadro 6.</b> Datos espectroscópicos para los compuestos <b>12</b> y <b>14</b> adquiridos en $\text{CDCl}_3$ ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz). .....	74
<b>Cuadro 7.</b> Datos espectroscópicos para los compuestos <b>13</b> y <b>15</b> adquiridos en $\text{CDCl}_3$ ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz). .....	76
<b>Cuadro 8.</b> Datos espectroscópicos del compuesto 01002-113-2 ( <b>2</b> ) adquiridos en MeOD ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 126 MHz). .....	77

## RESUMEN

Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) desempeñan un papel importante en la señalización celular y están implicadas en una variedad de enfermedades humanas. Como miembro de las PTPs, la PTP1B actúa como el principal regulador negativo de las vías de señalización de insulina y leptina. Por lo tanto, se le considera un blanco molecular prometedor para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 (DMTII) y obesidad. Además, existe evidencia que indica que PTP1B está asociada con algunos tipos de cáncer, desórdenes autoinmunes y enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, el desarrollo de inhibidores potentes y específicos de PTP1B sigue siendo un desafío, debido a lo altamente conservado que se encuentra el sitio activo de esta proteína, al uso de estructuras truncadas (PTP1B<sub>1-300</sub>) en los ensayos *in silico* o *in vitro* -con lo que se pierde información valiosa sobre la selectividad y mecanismos de inhibición- y a las propiedades fisicoquímicas de muchos candidatos potentes que los vuelven poco apropiados para su biodisponibilidad.

En la búsqueda de mejores y nuevos inhibidores, en este trabajo se describe el modelado por homología de la PTP1B de cadena completa de humano (*h*PTP1B<sub>1-400</sub>), la aplicación de la estrategia “*One Strain Many Compounds*” (OSMAC) en conjunción con el empleo de la plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) para el descubrimiento de nuevas moléculas, así como el aislamiento y elucidación de 11 fenalenonas diméricas obtenidas por fermentación mixta (*Talaromyces* sp./*Aspergillus* sp.) o por semisíntesis a partir de duclauxina (**1**) (modulador alostérico de *h*PTP1B<sub>1-400</sub>). Asimismo, se presenta un análisis de componentes principales (PCA) de los espectros de masas asociados a experimentos OSMAC a través del software MZmine2. Por otro lado, se describe la síntesis parcial en un solo paso de talaromycesona B (**2**, considerado hasta ahora un producto natural) a partir de duclauxina.

Adicionalmente, se estudiaron las propiedades inhibitorias (*in vitro* e *in silico*) de todos los compuestos aislados (**1-15**) sobre *h*PTP1B<sub>1-400</sub>, determinándose para aquellos que fueron capaces de inhibir a la enzima, una concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>), cuyos valores cayeron en el rango de 2.7 a 37.9  $\mu$ M. De igual modo, se calcularon las constantes de disociación ( $K_d$ ) de todos los compuestos aislados, así como las de cuatro inhibidores de *h*PTP1B<sub>1-400</sub> previamente reportados (duclauxina (**1**), talaromycesona B (**2**) xenoclauxina (**3**) y bacilisporina G (**4**)) mediante experimentos de apagamiento de fluorescencia intrínseca de la proteína y cuyos valores se ubicaron entre 0.7 y 21.3  $\mu$ M.

Por último, se estudió la interacción de duclauxina (**1**) y bacilisporina G (**4**) y ácido ursólico (un control positivo) con *h*PTP1B<sub>1-400</sub> mediante simulaciones biomoleculares. Y a partir de los resultados experimentales de inhibición y unión a *h*PTP1B<sub>1-400</sub>, así como los de predicción de unión por acoplamiento molecular, se describe la relación estructura-actividad de las 15 fenalenonas diméricas (**1-15**) obtenidas en este trabajo.

## ABSTRACT

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) play an important role in cell signaling and are involved in a variety of human diseases. As a member of PTPs, PTP1B acts as the main negative regulator of insulin and leptin signaling pathways. Therefore, it is considered a promising molecular target to treat type 2 diabetes mellitus and obesity. Besides, there is evidence indicating that PTP1B is associated with some kinds of cancer, autoimmune disorders, and cardiovascular diseases. However, the development of potent and specific inhibitors of PTP1B remains a challenge, mainly due to the high degree of structural conservation in the active site of the protein, the use of truncated structures (PTP1B<sub>1-300</sub>) in both, *in silico* or *in vitro* screening assays –in which valuable information is missed- and the physicochemical properties of many potent candidates that turn them slight suitable for its bioavailability.

In an attempt to discover new and better inhibitors of PTP1B, in this work, the generation of a homologated model for the full length PTP1B (*h*PTP1B<sub>1-400</sub>), the application of “One Strain Many Compounds” (OSMAC), and mixed fermentation strategies, organized and analyzed with the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) platform, and principal components analysis, and the use of semisynthetic methodologies for generating *h*PTP1B<sub>1-400</sub> inhibitors based on duclauxin (**1**) are described. Altogether, this approach led to the isolation and structure elucidation of 11 dimeric phenalenones (**6-15**). Remarkably, partial synthesis allowed us to obtain talaromycesone B (**2**, considered a natural product until now) from duclauxin (**1**).

Additionally, the inhibitory properties (*in vitro* and *in silico*) against *h*PTP1B<sub>1-400</sub> of all compounds (**1-15**) were studied. The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) for those compounds able to inhibit the phosphatase activity of the enzyme was determined and ranged from 2.7 to 37.9  $\mu$ M. Similarly, the dissociation constants ( $K_d$ ) for all compounds, including four previously isolated phenalenones (duclauxin (**1**), talaromycesone B (**2**), xenoclauxin (**3**), and bacillisporin G (**4**)) were determined by quenching fluorescence experiments, the  $K_d$  values ranged from 0.7 to 21.3  $\mu$ M.

Finally, the interaction between duclauxin (**1**), bacillisporin G (**4**), and ursolic acid with *h*PTP1B<sub>1-400</sub> was studied by biomolecular simulations. Complementary, several molecular descriptors calculated using DataWarrior software, together with IC<sub>50</sub>,  $K_d$ , and molecular docking predicted  $K_i$  values for phenalenones **1-15**, were used to establish a structure-activity relationship.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales (PNs) son considerados un gran recurso para el desarrollo de fármacos novedosos, debido a su diversidad química, su complejidad estructural y su selectividad biológica. Se estima que existen reportados aproximadamente 300,000 productos naturales. De estos, sólo alrededor del 1% se le ha reportado su actividad biológica.<sup>1</sup> Por otro lado, de 1981 al 2019, globalmente se aprobaron 1394 moléculas pequeñas para su uso como agentes terapéuticos, de las cuales, 441 (≈ 32%) son productos naturales o derivados de estos. Y si se consideran los productos de síntesis que contienen un farmacóforo de producto natural, esta cifra se eleva a 713, constituyendo así alrededor de 51% de las moléculas aprobadas que se deben a la productividad en el campo de los productos naturales.<sup>2</sup>

En particular, los microorganismos fúngicos como fuente de productos naturales han cobrado cada vez mayor importancia a nivel industrial, por la ventaja de que se pueden manipular en procesos de fermentación a gran escala y varios de sus productos poseen un valor alto en el mercado; algunos ejemplos notables son: la pravastatina (≈ \$3.6 billones/ año), la amoxicilina (≈ \$11.7 billones/ año), la ciclosporina (≈ \$1.4 billones/ año) y fingolimod (≈ \$1 billón/ año)<sup>3,4</sup>. Además, se estima que existen entre 1.5 y 5.1 millones de hongos<sup>5</sup> y de este reino se conocen cerca de 20,000 compuestos,<sup>1</sup> incluyendo algunos tan populares como: la penicilina (antibiótico), la griseofulvina (antifúngico), las estatinas (antiparasitarios, antifúngicos y antihipercolesterolémicos), la fumagilina (antifúngico empleado en microsporidiasis), la psilocibina (alucinógeno), y las aflatoxinas (micotoxinas).<sup>3,6</sup>

Los métodos tradicionales para el descubrimiento de productos naturales microbianos involucran la colección y el cultivo de cepas, la obtención de un extracto orgánico, el aislamiento biodirigido de compuestos y la elucidación estructural de estos mismos. Desafortunadamente, este enfoque frecuentemente conduce a una alta tasa de redescubrimientos, como lo han señalado los programas de secuenciación completa del genoma que demuestran que el potencial biosintético de los microorganismos ha sido enormemente desaprovechado, ya que el número de genes que codifican para enzimas biosintéticas en varios hongos, supera significativamente a los metabolitos secundarios caracterizados en esos organismos.<sup>7</sup>

Bajo condiciones estándar de cultivo de laboratorio, sólo se expresa un grupo de genes que codifican para algunas vías biosintéticas y, por lo tanto, apenas se produce una minoría del potencial de estructuras químicas.<sup>7</sup> Esto ha traído como consecuencia que las compañías farmacéuticas hayan disminuido significativamente sus actividades en el descubrimiento de productos naturales.<sup>8</sup> No obstante, un estudio reciente demostró que de 1,500 compuestos aislados de hongos entre 1993 y 2001, más de la mitad exhibió actividad antibacteriana, antifúngica o antitumoral.<sup>9</sup>

La mayoría de los metabolitos secundarios están codificados en clústeres de genes biosintéticos (BGCs); cada clúster contiene comúnmente la mayoría de (o todos) los genes que participan en la producción de un metabolito secundario dado.<sup>10</sup> La transcripción y activación epigenética de BGCs se debe a los estímulos ambientales y es dependiente de la etapa de desarrollo del hongo productor.<sup>9</sup> Para acceder a esta reserva de estructuras potencialmente bioactivas, su biosíntesis debe ser inducida. La variación de las condiciones de cultivo, que ha recibido el término “*One strain many compounds*” (OSMAC), ha sido considerada la estrategia más simple y efectiva para lograr este objetivo. Ejemplos exitosos usando la estrategia OSMAC incluyen variaciones en el medio de cultivo, co-cultivo con otros microorganismos, incorporación de modificadores epigenéticos o precursores biosintéticos.<sup>11,12</sup>

Por otra parte, el campo de los productos naturales está atravesando por un periodo de rápida innovación, motivado principalmente por los avances tecnológicos y el desarrollo de nuevas herramientas para la caracterización de mezclas de productos naturales. Recientemente, la aplicación de metodologías multi-informativas que integran métodos químicos, biológicos y bioinformáticos han cobrado un gran interés y lo más importante, han ampliado nuestro horizonte en la diversidad, distribución y funciones de los productos naturales.<sup>13</sup>

Últimamente, ha habido un gran interés en aplicar la metabolómica no dirigida para retratar simultáneamente los múltiples componentes presentes en una mezcla, comúnmente a través de la aplicación de análisis cromatográficos acoplados a métodos espectroscópicos (IR, UV, RMN) o espectrométricos (MS). La herramienta estadística empleada con mayor frecuencia en el análisis de datos metabolómicos es el análisis de componentes principales (PCA), en el cual un conjunto de datos es proyectado sobre una serie de variables latentes, las cuales son mapeadas en un espacio de dos dimensiones. La agrupación de objetos se discierne por su co-varianza, la cual es analizada por la proximidad de un objeto con otro en el puntaje gráfico de PCA.<sup>14</sup>

Otra herramienta que ha facilitado la identificación de compuestos es la plataforma “*Global Natural Products Social Molecular Networking*” (GNPS), que provee la capacidad de almacenar, analizar y diseminar el conocimiento de espectros MS/MS con la implementación de funciones de dereplicación y dereplicación variable, mediante el alineamiento de espectros MS/MS. Con esto, es posible identificar compuestos depositados en las bases de datos y/o establecer similitudes estructurales entre compuestos presentes en un extracto con los reportados en las bases de datos, visualizando estas relaciones como redes moleculares, en las cuales se representa cada espectro como un nodo y los alineamientos entre espectros como conexiones entre ellos.<sup>15</sup>

Por otro lado, como se ha documentado en la literatura, la PTP1B ha ganado interés desde el punto de vista farmacológico, puesto que es un blanco terapéutico emergente en el tratamiento de la diabetes y el cáncer.<sup>16</sup> A la fecha, se han descubierto

más de 300 inhibidores de PTP1B de cadena trunca de origen natural, de los cuales, más de 120 provienen de microorganismos fúngicos, poniendo de manifiesto la riqueza que encierra este nicho ecológico en el contexto del descubrimiento de inhibidores de PTP1B. Sin embargo, este potencial puede explotarse aún más, si se aprovechan a los productos naturales como punto de partida para el diseño y síntesis de análogos que optimicen su actividad farmacológica.<sup>17</sup> Como enfoque vital para la identificación de compuestos líder, el cribado virtual ha sido también activamente aplicado a la identificación de inhibidores novedosos de PTP1B.<sup>18</sup>

## 2. ANTECEDENTES

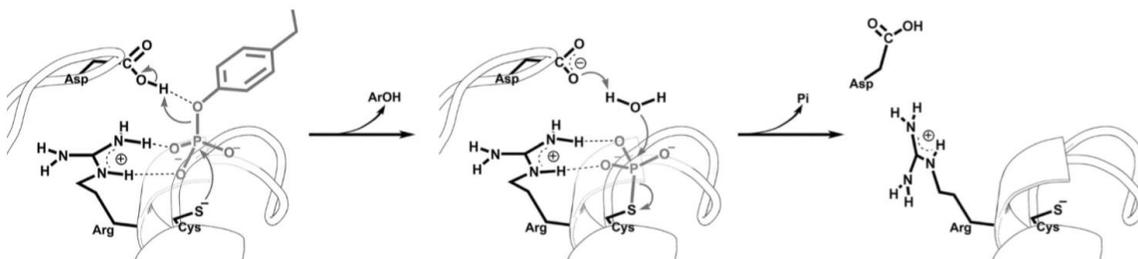
### 2.1 Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B): Generalidades

Las PTPs son enzimas que catalizan la desfosforilación de residuos de tirosina de proteínas. En humanos, existen más de un centenar que pueden funcionar ya sea como moduladores negativos o positivos en varias vías de transducción de señales. Dentro de esta familia de proteínas, la PTP1B ha sido, sin duda, la más estudiada, ya que participa como un regulador negativo de las vías de señalización de insulina y leptina. Esta proteína se localiza en la cara citoplasmática del retículo endoplásmico y se expresa ubicuamente.<sup>19</sup> La PTP1B de cadena completa se compone de 435 aminoácidos y constituye la principal forma celular (aunque variantes de menos residuos han sido comúnmente utilizadas en los ensayos bioquímicos enfocados en el descubrimiento de inhibidores).<sup>20</sup> Dependiendo del tipo de sustrato y diversidad funcional, las proteínas fosfatasas se dividen en 3 subfamilias. Entre la familia de PTPs humanas, se han caracterizado y estudiado extensivamente 107 genes. Convencionalmente, las PTPs se dividen principalmente con base en estructuras, especificidades, actividades de regulación y catalíticas. La primera subfamilia se segmenta en 17 tipo receptores y 21 no receptores. PTP1B pertenece a la clase de los receptores de la primera subfamilia.<sup>21</sup>

En la PTP1B los residuos 177-185 forman parte de un asa flexible conocida como asa WPD. Estudios cristalográficos han demostrado que la PTP1B puede existir en dos conformaciones en la nativa, la forma sin ligando, el asa WPD se encuentra en conformación abierta, y la cavidad de unión es de fácil acceso para el sustrato. Después de la unión al sustrato, el asa WPD se cierra sobre el sitio activo, formando una unión ajustada al sustrato. El cierre del asa WPD es esencial para el mecanismo catalítico de PTP1B. Se cree que los inhibidores alostéricos actúan estableciendo una conformación que excluye el cierre del asa WPD.<sup>20</sup> Los motivos clave del sitio activo (residuos 214-221) son el asa PTP, un segmento altamente conservado que contiene a la cisteína 215. En este residuo, el sulfhidrilo existe como ion tiolato y actúa como nucleófilo para atacar a la fosfotirosina (pTyr, sustrato) para formar un intermediario covalente del tipo tiol-fosfato. La arginina 221 y la lisina 120, por otra parte, juegan un papel importante en mantener a la estructura de PTP1B catalíticamente activa, ya que forman enlaces de hidrógeno o puentes salinos con los residuos de aminoácido involucrados en la catálisis. Adicionalmente, en la hidrólisis del grupo fosfato participa un residuo de aspartato (181), que además ayuda a conservar la flexibilidad del asa WPD (**Figura 1**).<sup>20</sup>

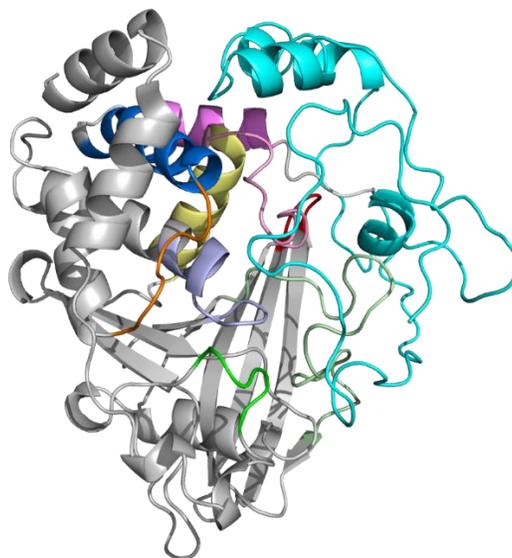
La hidrólisis del grupo fosfato del motivo pTyr se lleva a cabo en dos pasos, en el primero, la cadena lateral del residuo de aspartato 181 actúa como un ácido para protonar al sustrato. Después, en un segundo paso actúa como una base que escinde un átomo de hidrógeno a partir de una molécula de agua para generar el anión hidroxilo responsable de la hidrólisis del intermediario de reacción tiofosforil-enzima (**Figura 1**).

Esta hidrólisis se ve favorecida por el  $pK_a$  bajo del grupo tiol de la cisteína 215, que la convierte en un mejor grupo saliente.<sup>22,23</sup> Estudios recientes de dinámica molecular demostraron que el estado de protonación del aspartato 181 no sólo se requiere en el primer paso de catálisis, sino que también es crítico para la estabilidad conformacional del complejo PTP1B-pTyr.<sup>20</sup>



**Figura 1.** Mecanismo enzimático de hidrólisis de pTyr catalizado por PTP1B.

Adicionalmente, la proteína de cadena completa (1-400 aminoácidos) alberga dos sitios alostéricos, el primero ubicado a aproximadamente 20 Å del sitio catalítico en la unión de las hélices  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -6 y  $\alpha$ -7,<sup>24</sup> y el segundo situado en la región desordenada del dominio C-terminal de la proteína (residuos 301-400) (**Figura 2**).<sup>25</sup> Estos sitios han sido poco explotados como posibles bolsillos de reconocimiento de moléculas pequeñas que pudieran modular la actividad fosfatasa de la enzima.



**Figura 2.** Estructura terciaria de *hPTP1B*<sub>1-400</sub> generada a partir de un modelo por homología.

## **2.2 Implicaciones de la PTP1B en el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas: Obesidad, diabetes mellitus y cáncer**

### *2.2.1 Diabetes mellitus*

La Diabetes mellitus (DM), caracterizada por niveles altos de glucosa, es el desorden metabólico más serio y prevalente en todo el mundo y sus complicaciones pueden disminuir significativamente la calidad de vida y contribuir a la muerte prematura de las personas que la padecen.<sup>22</sup> En 2019, se estimó que 463 millones de personas sufrían diabetes y se proyectó que este número alcanzará 578 millones para el 2030 y 700 millones para el 2045. En México, actualmente hay alrededor de 12.8 millones de diabéticos y se prevé que la cifra aumente a 17.2 y 22.3 millones para el 2030 y 2045, respectivamente.<sup>26</sup> La resistencia a la insulina es un factor fisiopatológico predominante en la DM tipo 2 (DMTII) y representa alrededor del 90% de los casos a nivel global. En este tipo de diabetes (DMTII) prevalecen los niveles de insulina, sin embargo, la absorción de glucosa disminuye, mientras que el proceso de gluconeogénesis aumenta en los tejidos sensibles a la hormona.

La insulina es una hormona que desempeña un papel esencial para mantener la homeostasis de glucosa y la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. El receptor de insulina (IR) es un receptor prototipo de las proteínas cinasas de tirosina (PTKs) y está compuesto de dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ). La unión de insulina al IR induce un cambio conformacional que resulta en la activación del dominio cinasa en la porción citoplasmática de la subunidad  $\beta$ . Así, la subunidad  $\beta$  sufre autofosforilación de al menos seis residuos de tirosina dentro de tres regiones distintas. El IR activado lleva a cabo la fosforilación de varias proteínas sustrato río abajo, incluyendo los sustratos del receptor de insulina (IRS) 1-4 y otras proteínas adaptadoras (Gab1 y Shc) que median el efecto biológico de la insulina. Las proteínas IRS, a través de una serie de efectores intermediarios, conectan al IR con sus acciones finales, por ejemplo, la traslocación de los transportadores de glucosa GLUT-4, del citoplasma a la membrana plasmática. Estos transportadores permiten la absorción de glucosa y la síntesis de glucógeno.<sup>27-31</sup>

Puesto que la terminación de la señalización de insulina requiere la desfosforilación del IR y sus moléculas efectoras río abajo, la desregulación de PTP1B, ya sea por un incremento en su actividad o expresión, puede atenuar la señalización de insulina, resultando en resistencia a la hormona.<sup>27</sup>

### *2.2.2 Obesidad*

Por otro lado, la obesidad se define médicamente como un estado de masa corporal aumentada (en específico, tejido adiposo) de magnitud suficiente para producir consecuencias adversas a la salud (incluso, contribuye a la patogénesis de DMTII). La

vida sedentaria y la ingesta de alimentos con alto contenido de grasa han contribuido al incremento rápido de gente con sobrepeso en los países en vías de desarrollo. La forma más prevalente de obesidad vista hoy en día, se asocia con un exceso de leptina sérica en pacientes que portan genes normales que codifican para leptina y su receptor.<sup>27</sup>

La leptina es una hormona relacionada con la familia de citocinas, sintetizada y secretada principalmente por los adipocitos de tejido adiposo blanco.<sup>27,32</sup> Actúa sobre los receptores del hipotálamo para regular la masa corporal y el gasto energético. El papel primario de esta hormona es aumentar la tolerancia a dietas basadas en el consumo de grasas y mantener la homeostasis de ácidos grasos, tales como el almacenamiento de lípidos versus ingesta de alimentos y conservación energética.<sup>27,33</sup> La unión de leptina con su receptor lleva a la fosforilación de la cinasa Janus 2 (JAK2) que además activa a JAK/señal transductora y activadora de la transcripción (STAT). La activación de STAT3 a través de la fosforilación de JAK2 induce la translocación de STAT3 al núcleo. STAT3 a su vez induce respuestas genéticas que reducen la transcripción de acetil-coenzima A carboxilasa, reduciendo la síntesis de malonil CoA, la síntesis de ácidos grasos y promoviendo su oxidación.<sup>34</sup> La PTP1B se encuentra también involucrada en la regulación negativa de las vías de señalización de leptina mediante la desfosforilación de moléculas señalizadoras río arriba.<sup>32</sup>

### *2.2.3 Cáncer*

La fosforilación de proteínas, mediada por cinasas, es una modificación postraduccional reversible que lleva a la activación de vías transductoras de señales involucradas en procesos biológicos celulares, como el crecimiento, la proliferación, el metabolismo, la diferenciación y la muerte celular. La activación no controlada de esas vías resulta en el crecimiento y proliferación celular anormal que conducen a tumorigénesis. En estos procesos participan activamente proteínas tirosinas cinasas (PTKs) y PTPs. En la aparición y desarrollo de tumores, las PTPs pueden clasificarse de modo general en dos grupos: PTPs supresoras de tumor o PTPs oncogénicas (que promueven el desarrollo de tumores). La expresión de éstas últimas se encuentra elevada aberrantemente en varios cánceres humanos. En relación a PTP1B, ésta funciona como promotor de tumores en cáncer ovárico, gástrico, de próstata, de pecho, colorrectal, de pulmón y carcinoma hepatocelular.<sup>35-39</sup> En este sentido, las PTPs oncogénicas (incluyendo la PTP1B), emergen como blancos moleculares atractivos para el desarrollo de terapias dirigidas para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

## **2.3 Inhibidores de PTP1B**

Debido a las implicaciones de la PTP1B en el desarrollo de diversas enfermedades crónico-degenerativas, la búsqueda de inhibidores de esta enzima se ha vuelto una tarea primordial, especialmente en los últimos años. Sin embargo, debido a la

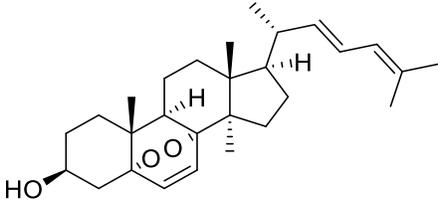
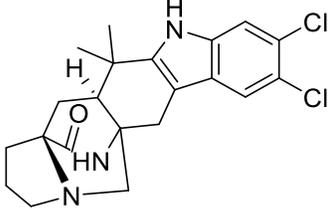
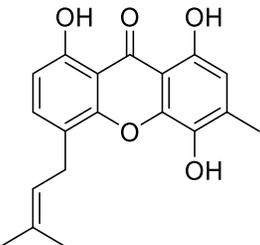
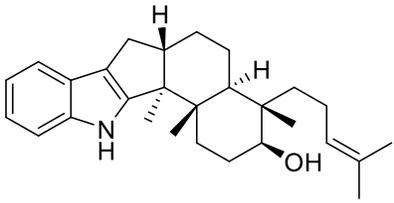
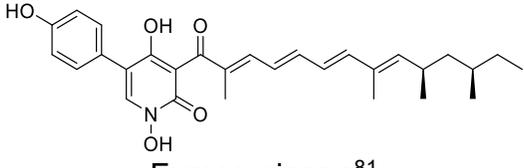
elevada homología de PTP1B con otras PTPs y la baja biodisponibilidad de diversos candidatos potentes, sólo ertiprotafib, trodusquemina y el inhibidor JTT-551 han llegado a fases clínicas en la etapa de desarrollo, etapas en las que fueron descontinuados debido su falta de eficacia, selectividad y a los efectos secundarios asociados con su administración. Por ello, la búsqueda de moléculas que sean capaces de inhibir selectivamente esta enzima es imperativa. A la fecha se han reportado una gran cantidad (>300) de inhibidores de modelos truncos de esta biomacromolécula (PTP1B<sub>1-297</sub>, PTP1B<sub>1-300</sub>, PTP1B<sub>1-321</sub>), incluyendo aquellos que se unen al sitio catalítico en una forma similar o distinta a la de sus sustratos naturales y moléculas que interaccionan en uno de los dos sitios alostéricos reportados para la proteína.<sup>21,22</sup>

Los inhibidores alostéricos pueden bloquear a la PTP1B en su conformación abierta y previenen su conversión a la conformación cerrada, la cual es esencial para la catálisis del sustrato. El cierre de asa WPD, en parte, es el resultado de una serie extensiva de interacciones de enlaces de hidrógeno entre las hélices  $\alpha 7$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 6$ . Los inhibidores alostéricos bloquean estas interacciones colocándose ellos mismos entre estas hélices. Estudios de dinámica molecular han demostrado que la hélice  $\alpha 7$  limita el movimiento de la hélice  $\alpha 3$  y facilita la dinámica del asa WPD.<sup>22,24,40-46</sup>

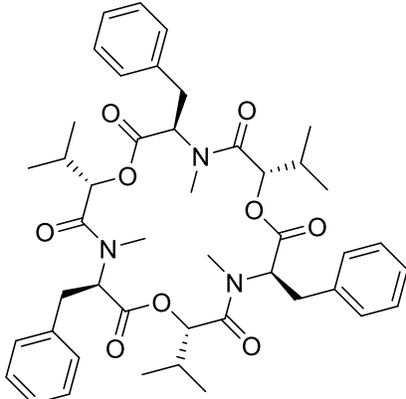
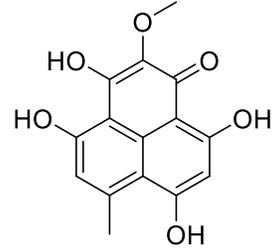
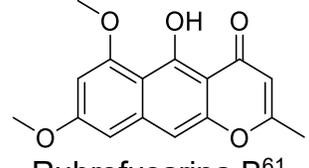
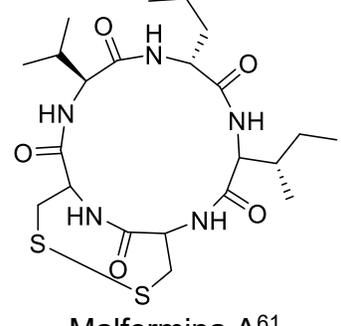
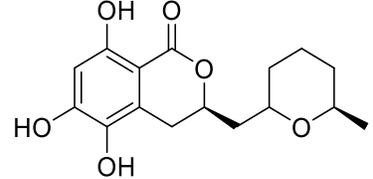
En este sentido, las moléculas de origen natural aisladas de plantas y microorganismos han contribuido significativamente en el número de posibles inhibidores de esta enzima. En especial los hongos microscópicos, que han aportado más de 120 moléculas con esta actividad (**Tabla 1**).<sup>38,47-105</sup>

Los microorganismos fúngicos producen un arsenal de moléculas orgánicas pequeñas, incluyendo policétidos, terpenoides, alcaloides, meroterpenoides y péptidos no ribosomales, por tan solo mencionar algunos. La amplia diversidad estructural mostrada por los metabolitos fúngicos se refleja en sus múltiples actividades farmacológicas.<sup>106</sup> Estudios recientes demuestran que en general estos productos presentan una elevada complejidad estructural, medida por el número de centros estereogénicos, baja hidrofobicidad y el alto contenido de anillos aromáticos. Además, presentan propiedades fisicoquímicas similares a las de fármacos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA), compuestos en pruebas clínicas y *screening*, son altamente específicos contra blancos moleculares y son menos tóxicos, comparados con librerías de compuestos obtenidos por síntesis orgánica.<sup>107</sup>

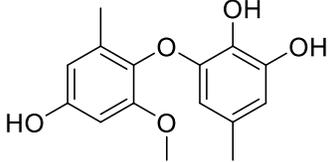
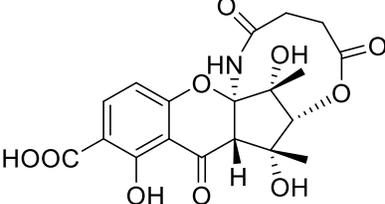
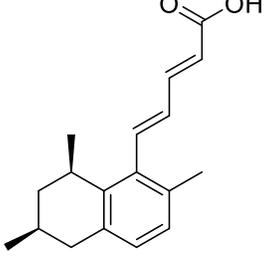
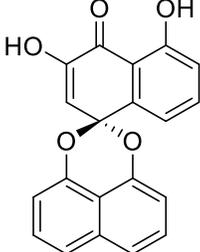
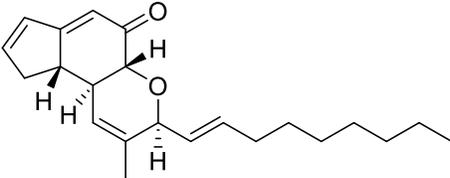
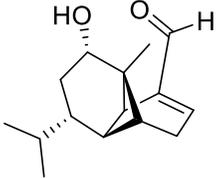
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios de origen fúngico con actividad inhibitoria sobre PTP1B.

<b>Metabolitos secundarios inhibidores de PTP1B</b>		
<b>Género de <math>\mu</math></b>	<b>Metabolitos activos</b>	<b>CI<sub>50</sub></b>
<i>Aspergillus gorakhpurensis</i> F07ZB1707	 <p>Aspergoraquina A<sup>108</sup></p>	0.6 $\mu$ M
<i>Malbranchea circinata</i>	 <p>Malbranqueamida<sup>74</sup></p>	14.5 $\mu$ M
<i>Malbranchea circinata</i>	 <p>4-Isoprenilravenelina<sup>74</sup></p>	13.9 $\mu$ M
<i>Penicillium</i> sp. KFD28	 <p>Emindola SB</p>	0.7 $\mu$ M
<i>Isaria fumosorosea</i>	 <p>Fumosorinona<sup>81</sup></p>	14.0 $\mu$ M

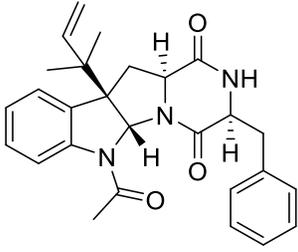
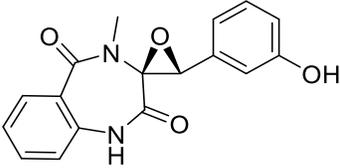
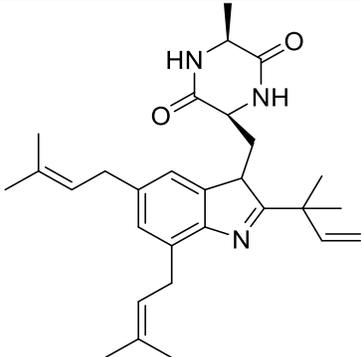
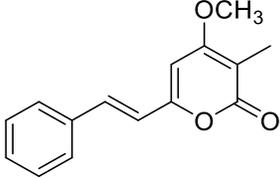
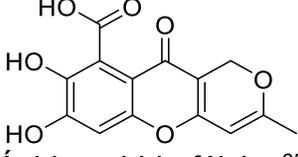
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios de origen fúngico con actividad inhibitoria sobre PTP1B (**continuación**).

Género de $\mu$	Metabolitos activos	Cl <sub>50</sub>
<i>Isaria fumosorosea</i>	 <p style="text-align: center;">Bauverecin<sup>68</sup></p>	0.59 $\mu$ M
<i>Aspergillus</i> sp. SF-59-29	 <p style="text-align: center;">Funalenona<sup>61</sup></p>	6.1 $\mu$ M
<i>Aspergillus</i> sp. SF-59-29	 <p style="text-align: center;">Rubrofusarina B<sup>61</sup></p>	6.5 $\mu$ M
<i>Aspergillus</i> sp. SF-59-29	 <p style="text-align: center;">Malformina A<sup>61</sup></p>	5.2 $\mu$ M
<i>Aspergillus sydowii</i>	 <p style="text-align: center;">Asperentina B<sup>56</sup></p>	2.1 $\mu$ M

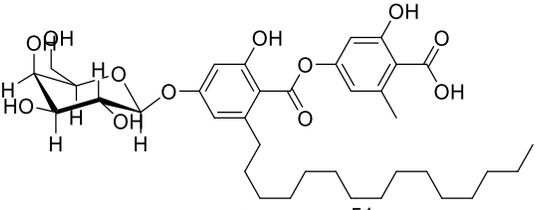
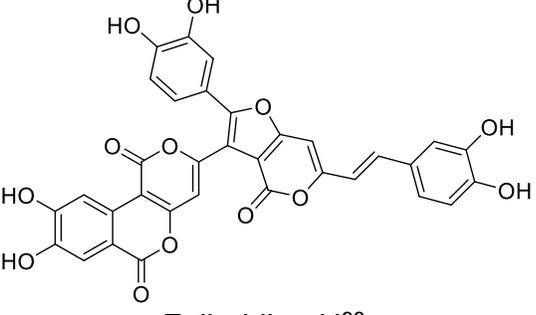
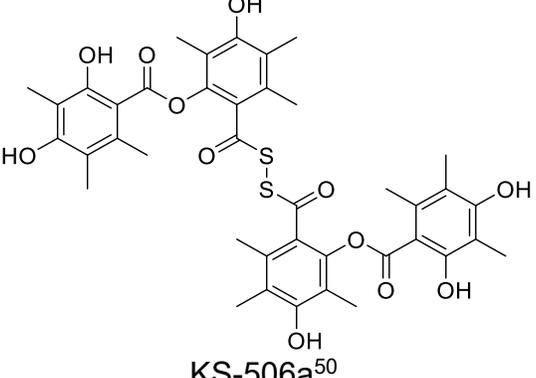
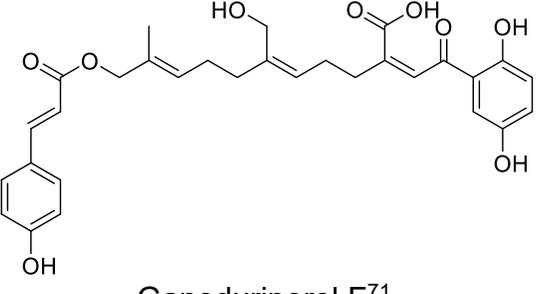
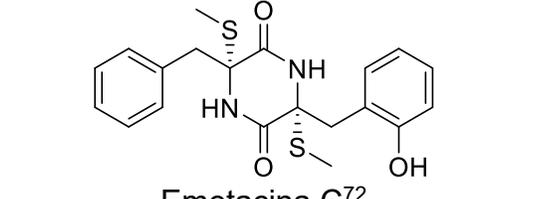
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios de origen fúngico con actividad inhibitoria sobre PTP1B (**continuación**).

<b>Género de <math>\mu</math></b>	<b>Metabolitos activos</b>	<b>Cl<sub>50</sub></b>
<i>Phoma</i> sp. TPU1222	 <p>1-metoxi-3,5'-dimetil-2,3'-oxibifenil-5,1',2'-triol<sup>54</sup></p>	13.0 $\mu$ M
<i>Cordyceps gracilioides</i>	 <p>Cryptosporioptida A<sup>99</sup></p>	17.3 $\mu$ M
<i>Penicillium</i> sp. (SF-6013)	 <p>Ácido tanzawaico A<sup>101</sup></p>	8.2 $\mu$ M
<i>Guignardia</i> sp. KcF8	 <p>Guignardina C<sup>102</sup></p>	25.7 $\mu$ M
<i>Isaria tenuipes</i>	 <p>Penostatina C<sup>63</sup></p>	0.4 $\mu$ M
<i>Postia</i> sp.	 <p>Postinina A<sup>88</sup></p>	6.8 $\mu$ M

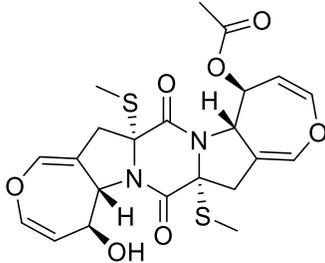
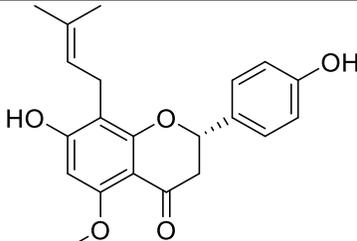
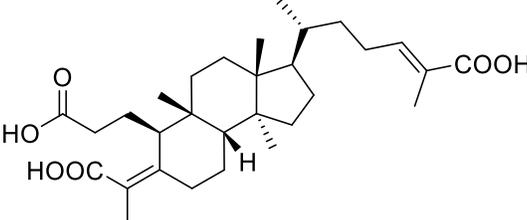
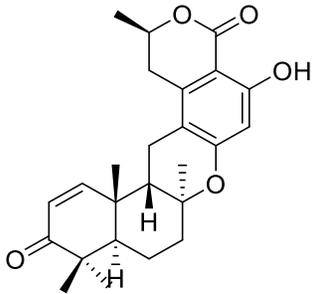
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios de origen fúngico con actividad inhibitoria sobre PTP1B (**continuación**).

<b>Género de <math>\mu</math></b>	<b>Metabolitos activos</b>	<b>Cl<sub>50</sub></b>
<i>Penicillium</i> sp. SF-5203	 <p>Frutigenina A<sup>67</sup></p>	10.7 $\mu$ M
<i>Penicillium</i> sp. SF-5203	 <p>Cyclopenol<sup>67</sup></p>	30.0 $\mu$ M
<i>Eurotium</i> sp. SF-5130	 <p>Equinulina<sup>67</sup></p>	29.4 $\mu$ M
<i>Penicillium</i> sp. JF-55	 <p>Penstirilpirona<sup>65</sup></p>	5.3 $\mu$ M
<i>Penicillium</i> sp. JF-55	 <p>Ácido anhidrofúlvico<sup>65</sup></p>	1.9 $\mu$ M

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios de origen fúngico con actividad inhibitoria sobre PTP1B (**continuación**).

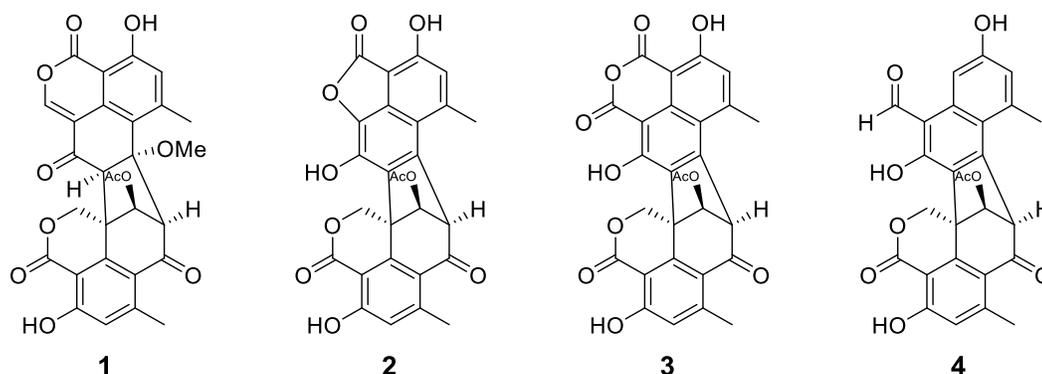
Género de $\mu$	Metabolitos activos	CI <sub>50</sub>
<p><i>Cosmospora</i> sp. SF-5060</p>	 <p>Acuastatina A<sup>51</sup></p>	0.2 $\mu$ M
<p><i>Phellinus igniarius</i></p>	 <p>Feligrina H<sup>98</sup></p>	3.1 $\mu$ M
<p><i>Micromucor ramannianus</i> var. <i>angulisporus</i> CRM000232</p>	 <p>KS-506a<sup>50</sup></p>	4.9 $\mu$ M
<p><i>Ganoderma ahmadii</i></p>	 <p>Ganoduriporol F<sup>71</sup></p>	17 $\mu$ M
<p><i>Aspergillus terreus</i></p>	 <p>Emetacina C<sup>72</sup></p>	12.3 $\mu$ M

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios de origen fúngico con actividad inhibitoria sobre PTP1B (**continuación**).

<b>Género de <math>\mu</math></b>	<b>Metabolitos activos</b>	<b>CI<sub>50</sub></b>
<i>Aspergillus terreus</i>	 <p>Alternarosina A<sup>72</sup></p>	24.3 $\mu$ M
<i>Cladosporium</i> sp.	 <p>(2S)-7,4'-dihidroxi-5-metoxi-8-(<math>\gamma</math>, <math>\gamma</math>-dimetilalil)-flavanona<sup>57</sup></p>	11.0 $\mu$ M
<i>Russula lepida</i>	 <p>Ácido (24E)-3,4-Secocucurbita-4,24-dieno-3,26,29-trioico<sup>94</sup></p>	0.4 $\mu$ M
<i>Penicillium verruculosum</i>	 <p>Verruculida A<sup>85</sup></p>	8.4 $\mu$ M

## 2.4 Inhibidores de PTP1B de cadena completa

Recientemente, como parte de un programa multidisciplinario enfocado en el descubrimiento de moduladores alostéricos de la proteína tirosina fosfatasa humana 1B (*h*PTP1B<sub>1-400</sub>) a partir de fuentes naturales, en nuestro grupo de trabajo se expresó la proteína *h*PTP1B<sub>1-400</sub> (70 mg/L), en *Escherichia coli* (Rosetta, (DE3) PLysS™) y se desarrolló un método espectrofotométrico para evaluar la actividad como inhibidores de esta proteína de extractos orgánicos y compuesto puros de origen fúngico. De manera simultánea, se aislaron y cultivaron diversos hongos microscópicos asociados a hormigueros. Los extractos se evaluaron *in vitro* frente a la *h*PTP1B<sub>1-400</sub>. El extracto de la especie fúngica identificada como *Talaromyces* sp. IQ-313 se seleccionó para su posterior estudio químico con base en su potente actividad biológica (84% de inhibición de la actividad de *h*PTP1B<sub>1-400</sub> a 20 ppm). El fraccionamiento del extracto orgánico, empleando diferentes métodos cromatográficos, condujo al aislamiento de las fenalenonas diméricas: duclauxina (**1**), talaromycesosna B (**2**), xenoclauxina (**3**) y bacilisporina G (**4**).



Las fenalenonas **1-4** inhibieron la actividad enzimática de la *h*PTP1B<sub>1-400</sub> de manera dependiente de la concentración con valores de  $CI_{50}$  de 12.7, 82.1, 21.8, y 13.4  $\mu$ M, respectivamente, indicando que pequeñas diferencias en la estructura de los productos impactan significativamente sobre la actividad de la enzima. Los compuestos **1**, **3** y **4** fueron tan activos como el ácido ursólico (26.6  $\mu$ M, control positivo), mientras que el compuesto **2** fue tres veces menos potente (**Tabla 4**).

Finalmente, con el propósito de obtener mayor información sobre la naturaleza de la interacción de duclauxina (**1**) con la *h*PTP1B<sub>1-400</sub>, se realizaron estudios de cinética enzimática. Los resultados de estos estudios indicaron que el compuesto **1** se comporta como un inhibidor reversible de tipo mixto, ya que concentraciones crecientes del producto resultan en incrementos en la  $K_M$  y un decremento en la  $V_{max}$ . Los valores calculados de  $K_i$  y  $\alpha$  fueron  $11.5 \pm 1.9 \mu$ M y 3.3, respectivamente. Estos datos sugirieron que el compuesto **1** se une tanto al complejo proteína-sustrato como a la proteína libre.

En este caso particular ( $\alpha > 1$ ), **1** se une con mayor afinidad a la proteína libre que al complejo, disminuyendo la afinidad por el sustrato.

Otros ejemplos de inhibidores de esta proteína de cadena completa son los derivados de butirolactona I (una  $\gamma$ -lactona), los cuales se aislaron de la especie fúngica *Aspergillus terreus* IQ-046, también como parte de un proyecto multidisciplinario que busca descubrir inhibidores no competitivos de *hPTP1B*<sub>1-400</sub>. En dicho trabajo, se realizó la semisíntesis y el aislamiento de una serie de compuestos de la misma clase estructural que butirolactona I a través de reacciones de un solo paso, con lo cual, se determinaron los valores  $CI_{50}$  de ocho compuestos (**Figura 3**), que oscilan entre 35 y más de 450  $\mu$ M, demostrando con un PCA, que pequeñas diferencias en la estructura tienen un impacto significativo sobre su actividad inhibitoria.<sup>109</sup>

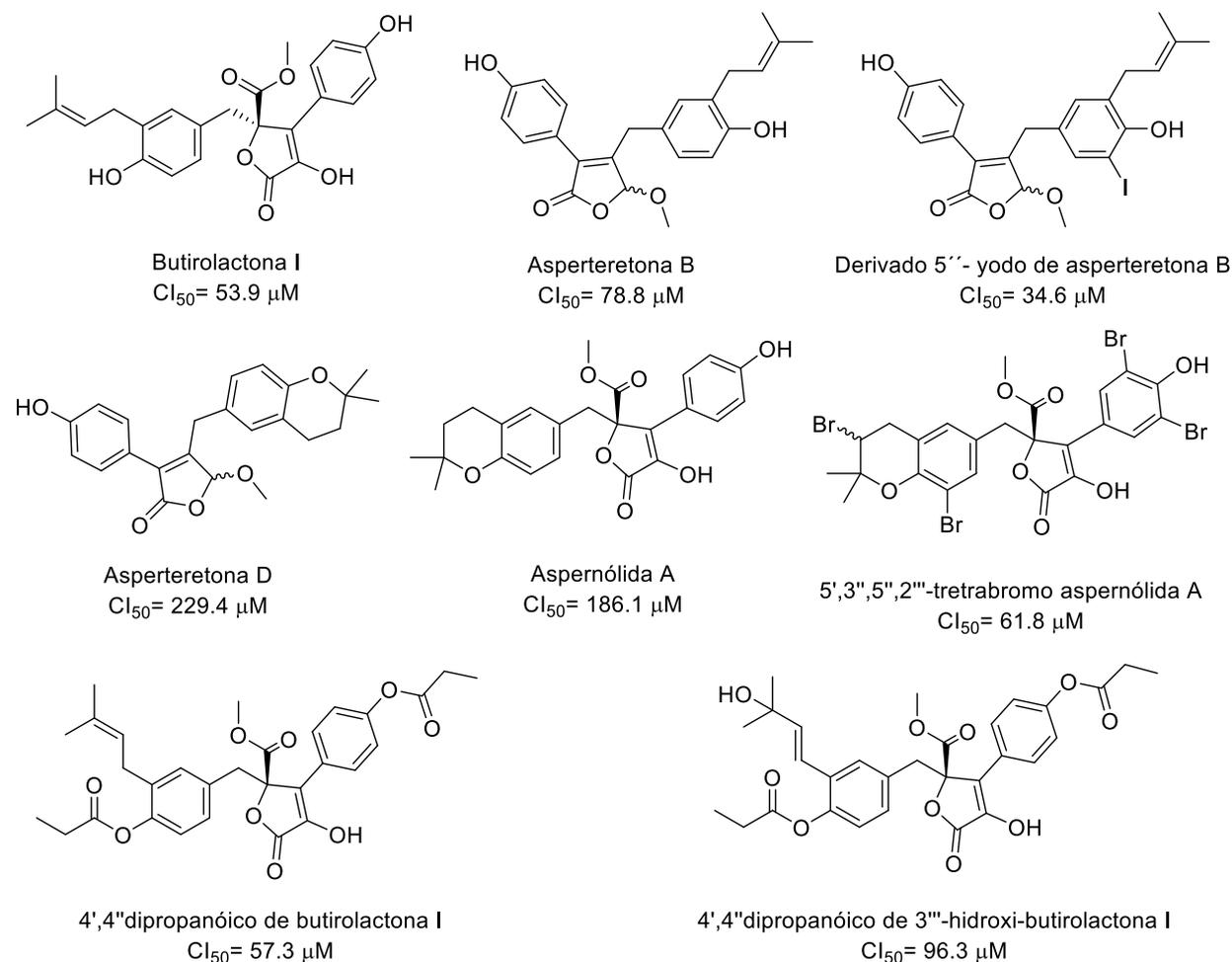
Así mismo, en el citado trabajo se realizaron estudios de acoplamiento molecular sobre butirolactona I y sus derivados, cuyos resultados sugirieron que algunas de estas moléculas se comportan como moduladores alostéricos. En particular, los experimentos de apagamiento de la fluorescencia efectuados para butirolactona I con los que se determinó su afinidad por *hPTP1B*<sub>1-400</sub>, reforzaron la hipótesis de que esta familia de moléculas inhibe a la proteína de forma alostérica. Finalmente, con estos resultados, se contribuyó a detectar algunas de las características moleculares importantes que impactan y mejoran la actividad inhibitoria sobre *hPTP1B*<sub>1-400</sub>.

## 2.5 Estrategia OSMAC

Hoy en día, la tasa de descubrimientos de metabolitos secundarios microbianos novedosos está disminuyendo y la posibilidad de redescubrir compuestos conocidos es más alta que antes.<sup>11</sup> Se han descrito diversos métodos en la literatura que buscan hacerle frente a este problema, tales como: la química combinatoria, el cribado de alto rendimiento de diferentes fuentes biológicas y los enfoques recombinantes.<sup>110</sup> Sin embargo, la mayoría de estos enfoques pueden ser desarrollados sólo por la industria farmacéutica o compañías biotecnológicas con un respaldo financiero sólido, dejando relegada esta actividad a la investigación académica. En ese contexto, ha nacido la estrategia “*One Strain Many Compound*” (OSMAC), término acuñado por Zeeck y colaboradores, la cual consiste en alterar sistemáticamente los parámetros de cultivo de microorganismos de forma práctica, con el fin de incrementar el número de metabolitos secundarios disponibles de una fuente microbiana.<sup>110</sup>

Desde los primeros días de la ciencia de la fermentación, se ha sabido que la selección de parámetros del medio de cultivo es crítica para el número de metabolitos secundarios producidos por un microorganismo. Incluso pequeños cambios en el medio de cultivo pueden impactar tanto en la cantidad que se biosintetiza de un compuesto determinado, como en el perfil metabólico de un organismo. Esto se explica en términos

de la expresión de clústeres de genes biosintéticos que se encuentran silenciados en condiciones estándar de fermentación.<sup>7,11</sup>



**Figura 3.** Productos naturales y de semisíntesis obtenidos de *Aspergillus terreus* IQ-046, con actividad inhibitoria sobre *hPTP1B*<sub>1-400</sub>.

Algunos ejemplos de variaciones de parámetros del medio de cultivo incluyen el tipo de fuente de carbono o nitrógeno, que influyen sobre el metabolismo secundario microbiano; la salinidad, temperatura y presión, que imponen un estado termodinámico, gobernando así algunas características físicas (e. g. presión osmótica) y la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo y crecimiento microbiano; la interacción con iones metálicos, que pueden causar reacciones en las células o procesos que impactan en la conservación de la energía; pH, que afecta la actividad de las enzimas metabólicas y la carga superficial de la membrana (la naturaleza y permeabilidad de la membrana pueden cambiar la rapidez de utilización del sustrato); la concentración de oxígeno, puede afectar las reacciones bioquímicas y activar diferentes grupos de BGCs; el estatus de fermentación (líquido, estático o dinámico) puede impactar sobre el contacto

microorganismo-nutrientes, la disponibilidad de oxígeno, y por lo tanto, la activación de BGCs funcionales por adición de inhibidores enzimáticos.<sup>11</sup>

Por otra parte, se ha reportado que el co-cultivo de dos o más especies usualmente tiene efectos positivos por el aumento de la producción de compuestos conocidos o la acumulación de compuestos crípticos que no son detectados en cultivo axénico. Esto podría ser resultado de la producción de enzimas que activan precursores metabólicos o de que otra cepa pudiera inducir modificaciones epigenéticas en la cepa productora.<sup>11</sup>

Otra estrategia útil comprende el uso de modificadores epigenéticos: la metilación del DNA de la región promotora de un gen cambia la estructura de la cromatina y previene la unión de factores de transcripción específicos, suprimiendo la transcripción genética. De modo que el uso de inhibidores de DNA metil transferasa hace posible la expresión de genes en dicha región. Por otro lado, la acetilación o desacetilación de histonas afecta su unión al DNA; la introducción de un grupo acetil a los residuos de lisina N-terminal de histona, podrían incrementar la atracción electrostática y el impedimento estérico entre histona y DNA, lo cual facilita la despolimerización del DNA y la unión de factores de transcripción. Así, el empleo de inhibidores de histona deacetilasa facilitaría la expresión de los genes que se ubiquen en esta región.<sup>11</sup>

Asimismo, existen otras enzimas microbianas que desempeñan papeles importantes en la regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios, tales como las monooxigenasas y la hidroxilasa. Algunos compuestos pueden suprimir la actividad de enzimas relacionadas en las vías biosintéticas y promover el progreso de otras vías metabólicas. Al respecto, se han reportado algunos compuestos que pueden inhibir selectivamente a estas enzimas, tales como: metirapona, triclasol, jaspakuinolida y DMSO.<sup>11</sup>

## **2.6 GNPS y metabolómica**

La metabolómica, comprende el estudio exhaustivo de todos los metabolitos presentes en un sistema biológico. Estos estudios se clasifican en dos: dirigidos y no dirigidos. Los primeros se centran en la identificación y cuantificación de metabolitos conocidos en una muestra, mientras que en los no dirigidos se realiza el análisis simultáneo de una gran cantidad de metabolitos.<sup>111,112</sup> Las técnicas más utilizadas para el análisis de muestras para estudios de metabolómica son la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS). Sin embargo, por su versatilidad, los métodos que combinan cromatografía de líquidos con MS son los más utilizados. La estrategia metodológica para estudios de metabolómica inicia con una pregunta biológica, seguida de un diseño experimental, la colecta de las muestras y la extracción de metabolitos. Posteriormente, en una segunda etapa se realiza el experimento,

adquisición y procesamiento de datos y el análisis estadístico. Finalmente, se establece la identidad de algunos metabolitos para dar una interpretación biológica.

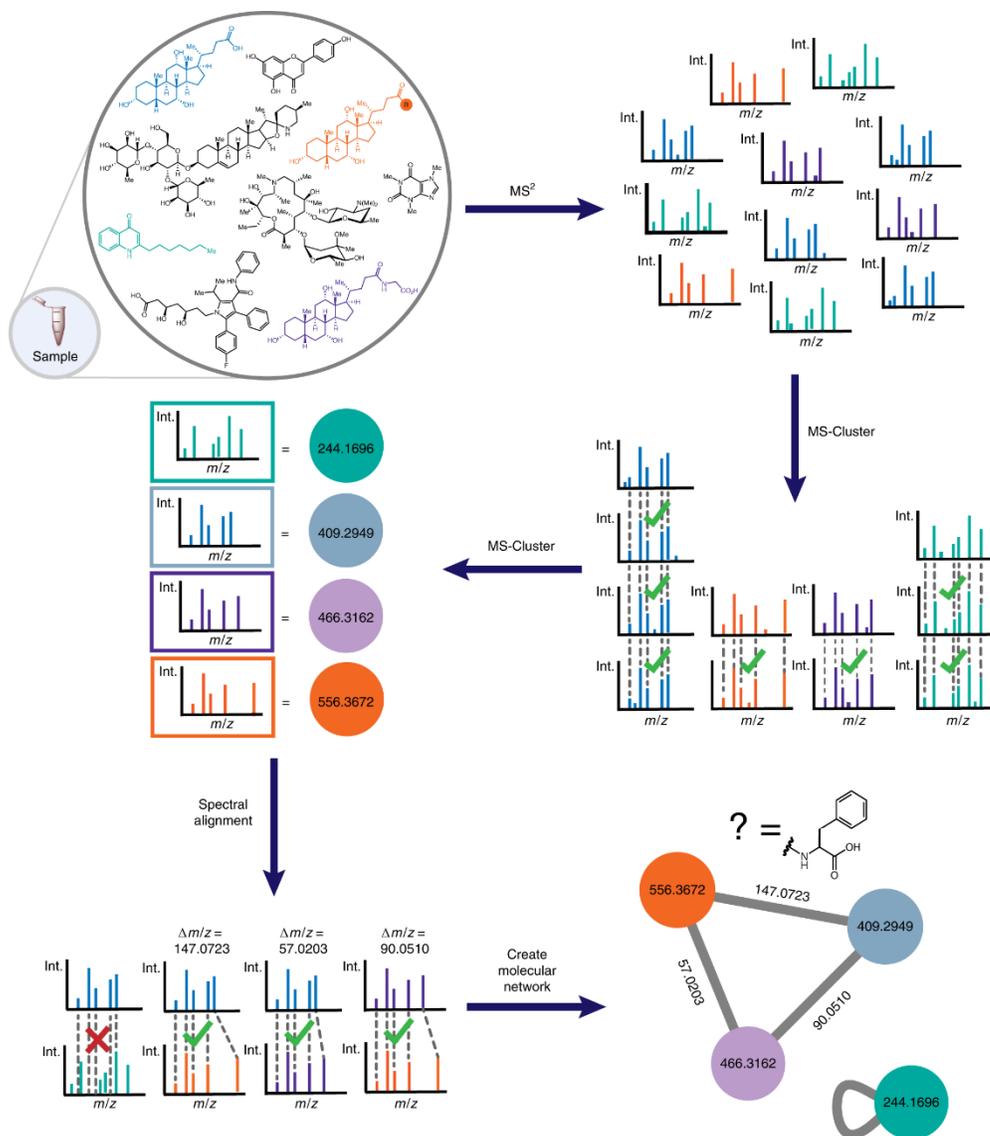
En conjunto con el desarrollo de técnicas de metabolómica, genómica y métodos quimiométricos, se han podido establecer los perfiles metabólicos de mezclas complejas de productos naturales, pero la caracterización inequívoca de los constituyentes continúa siendo una tarea difícil. Para subsanar este problema, diferentes grupos de investigación han planteado la construcción de redes moleculares que permitan conectar los componentes de una mezcla con base en sus características estructurales ya sea a través de análisis de masas (GNPS) o RMN (MADByTE).<sup>15,113,114</sup> Este tipo de estudios en conjunto con información derivada de ensayos de actividad biológica pueden contribuir significativamente al descubrimiento de entidades químicas previamente no identificadas o aisladas de una especie en particular.

En particular, los análisis de redes moleculares basados en espectrometría de masas se introdujeron por primera vez en 2012, para visualizar y mapear el espacio químico producido por un conjunto de microorganismos,<sup>115</sup> además de permitir la elucidación estructural de algunas entidades químicas.<sup>116</sup> La construcción de redes moleculares se basa en el alineamiento por pares de un conjunto de datos (generalmente espectros de masas y patrones de fragmentación) utilizando diferentes algoritmos matemáticos. En este sentido, en 2016 se hizo pública la plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), un servidor de acceso libre que alinea espectros de masas no sólo por su similitud sino basados en los patrones de fragmentación de un pico de interés, para generar redes moleculares basadas en esta información. La plataforma se construyó bajo la premisa de que compuestos similares generan espectros de fragmentación ( $MS^2$ ) similares.

Además, GNPS es una plataforma para el recaudo, almacenamiento e intercambio de datos espectrales que los usuarios deseen compartir y también funciona como un sistema de anotación de espectros de compuestos (basado en tres categorías de acuerdo con la experiencia de los usuarios) que permiten la identificación putativa de algunas sustancias presentes en muestras complejas.

El protocolo general para la creación de redes moleculares en GNPS inicia con la obtención de espectros de masas/masas ( $MS^2$ ) para todas las moléculas ionizadas de la muestra. Subsecuentemente, los espectros de masas se alinean en conjuntos con base en su similitud. Los espectros de masas idénticos se integran en un solo nodo o un grupo consenso. Posteriormente los espectros se alinean permitiendo una búsqueda por similitud incluso cuando los iones padres no son idénticos. Así, moléculas con estructuras similares generan espectros de  $MS^2$  similares y generan nodos distintos que se conectan en una red por líneas que indican el grado de similitud de los espectros alineados. Finalmente, cada nodo se compara contra una biblioteca de espectros de fragmentación para moléculas anotadas, para asignar una identidad putativa a los nodos de la red. En la **Figura 4** se muestran un nodo azul con una relación  $m/z$  409.2949, un nodo morado

$m/z$  446.3162 con identidad conocida (colato y ácido glicochólico) y un nodo naranja con identidad desconocida y un desplazamiento de 147.0723 unidades de  $m/z$ , en comparación con el colato. La diferencia coincide con la masa de un residuo de fenilalanina, en este sentido, se puede predecir que la molécula desconocida es el conjugado de ácido cólico con este aminoácido. El nodo en color turquesa ( $m/z$  244.1696) unido con una línea con el mimo representa una molécula única en el extracto, sin congéneres relacionados.<sup>117</sup>



**Figura 4.** Protocolo general de creación de redes moleculares en GNPS. Tomado y editado de: Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS.

## 2.7 Síntesis parcial como estrategia para incrementar el espacio químico de productos naturales

Los productos naturales y sus derivados semisintéticos han sido y continuarán siendo la fuente principal para el descubrimiento de prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos. Estas moléculas son extremadamente diversas y se distinguen de compuestos sintéticos por su elevado número de centros estereogénicos, complejidad química, número de heteroátomos, la cantidad de carbonos  $sp^3$  y, sobre todo, por la gran variedad de esqueletos carbonados que generalmente son poco accesibles en laboratorios de síntesis orgánica. La camptotecina, el taxol, vincristina, vinblastina, penicilinas, cefalosporinas, macrólidas, tetraciclina, aminoglucósidos, miglitol, acarbose, lovastatina y morfina son algunos ejemplos de moléculas de origen natural que han dado origen a fármacos utilizados en la terapéutica contemporánea para el tratamiento del cáncer, infecciones bacterianas, diabetes, enfermedades relacionadas con el sistema cardiovascular y dolor. De acuerdo con el último reporte publicado por Newman y Cragg en 2020, alrededor del 51% de los fármacos aprobados por la FDA entre 1981 y 2019 tienen su origen en productos naturales o algún derivado.<sup>2,118</sup>

Desde un punto de vista conservador, la naturaleza ha provisto a la humanidad con un amplio abanico de esqueletos carbonados que pueden ser utilizados para el tratamiento de ciertos padecimientos, sin embargo, las moléculas aisladas y caracterizadas de fuentes naturales tienen una función ecológica distinta y no siempre cumplen con las características adecuadas para ser incorporadas como fármacos. No obstante, estas moléculas han servido de inspiración para el desarrollo de un gran número de estrategias sintéticas que han permitido acceder a un sinnúmero de entidades químicas y medicamentos. En general, existen distintos factores que limitan el uso *per se* de los productos naturales en el cuidado de la salud humana, algunos de los más relevantes están asociados con sus malas o nulas propiedades de absorción, distribución, metabolismo, eliminación, toxicidad (propiedades ADMETox), selectividad y problemas regulatorios que impiden la obtención de patentes. Por lo tanto, la semisíntesis es la herramienta de primera elección para incrementar la diversidad estructural y mejorar sus propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas, cuando la obtención de análogo se complica por métodos naturales (estrategia OSMAC).<sup>11,107</sup>

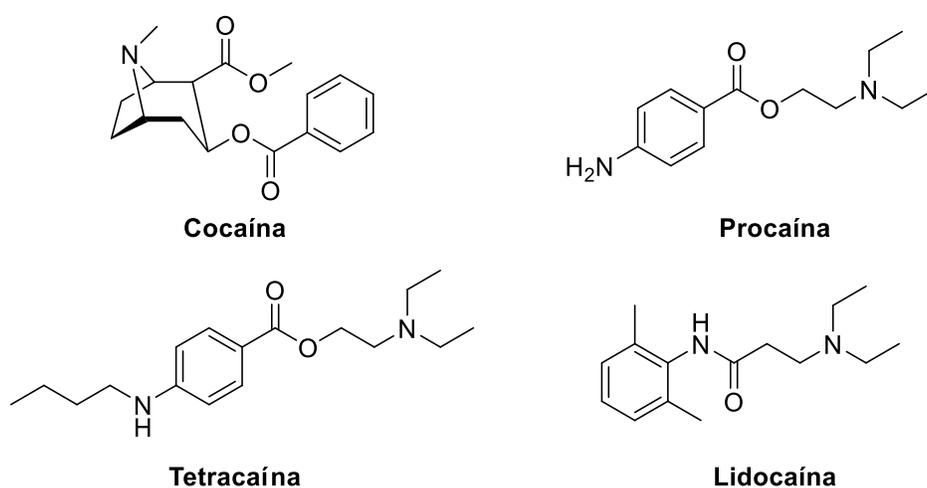
Las modificaciones más comunes en esqueletos de productos naturales incluyen aquellas dirigidas a aumentar la lipofilia de la molécula inicial a través de la incorporación de fragmentos que incrementen esta propiedad. Otras estrategias que han contribuido de manera importante a la solución de estos problemas se basan en la incorporación de halógenos e incluso la reducción de la complejidad estructural de tan sofisticadas entidades químicas, a través de la eliminación de fragmentos innecesarios para su bioactividad.

En general, las estrategias semisintéticas inician con la selección de una molécula bioactiva, posteriormente, se realizan modificaciones simples en los esqueletos y se

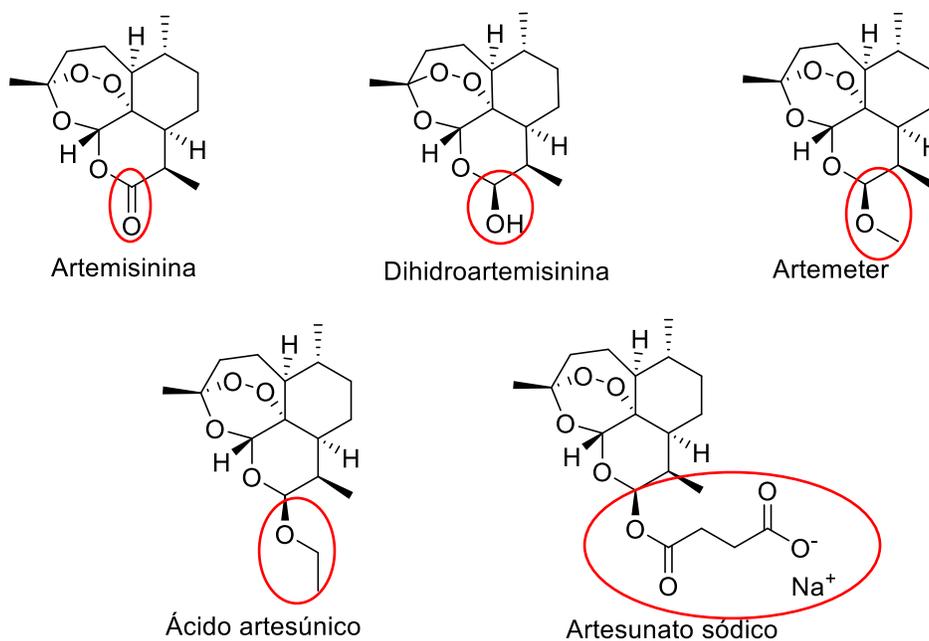
evalúan nuevamente las propiedades biológicas para determinar el impacto de las modificaciones realizadas. En los últimos años este paso se ha mancomunado con estudios computacionales (acoplamiento molecular), mismos que han permitido dirigir la obtención de moléculas con mejores propiedades farmacológicas, disminuyendo significativamente los costos en la obtención de la molécula líder.<sup>119</sup>

Un ejemplo relevante derivado de la reducción estructural que resultó en una historia de éxito es la semisíntesis de derivados de cocaína, una molécula empleada como anestésico local en ojos y cirugías nasales que presenta problemas de adicción, vasoconstricción intensa y riegos cardiovasculares potenciales, que tras varias modificaciones (reducción en complejidad) dio origen a los anestésicos procaína, tetracaína y lidocaína (**Figura 5**).

Otro caso notable en el que la semisíntesis se ha aplicado con éxito, es el de la artemisinina (también referida como Qinghaosu), un producto natural de estructura química compleja (se compone de un núcleo tetracíclico que soporta un puente endoperóxido) aislado de *Artemisia annua* en 1972 y empleado hoy en día con éxito para el tratamiento de la malaria. A causa de la resistencia generada por el parásito causante de esta enfermedad a algunos fármacos antimaláricos, ha nacido el interés de desarrollar derivados semisintéticos de artemisinina, algunos de los cuales ya forman parte de la primera línea de opciones de tratamiento contra la malaria; por ejemplo, la dihidroartemisinina (arteminol), artemeter, arteether, ácido artesúnic y artesunato sódico (**Figura 6**). Inspirados por el potencial antimalárico de artemisinina y sus derivados, algunos compuestos sintéticos basados en peróxidos se encuentran ahora en diferentes etapas de desarrollo pre-clínico para el tratamiento de la malaria.<sup>120</sup>



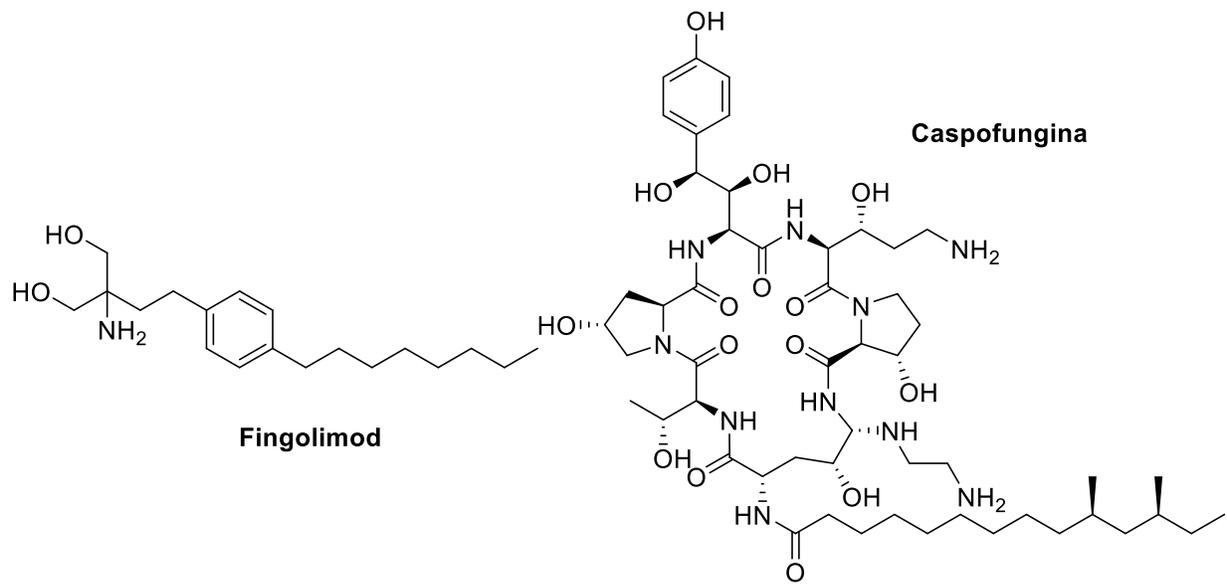
**Figura 5.** Ejemplos exitosos de moléculas empleadas en la terapéutica que se han obtenido por semisíntesis.



**Figura 6.** Artemisinina y derivados semisintéticos.

En el campo de los productos naturales de origen fúngico, el acetato de caspofungina y el fingolimod son sin duda, los ejemplos a destacar. Estas dos moléculas resultaron de la reducción de la complejidad estructural de productos naturales, en el primer caso el derivado semisintético se emplea como antifúngico mientras que el segundo dio origen al primer tratamiento oral para la esclerosis múltiple (**Figura 7**).

La caspofungina (CANCIDAS<sup>®</sup>) se ha convertido en el número uno de fármacos antifúngicos intravenosos a lo largo del mundo y ha salvado decenas de miles de personas. Su descubrimiento se origina del reconocimiento de la actividad antifúngica de pneumocandina B<sub>0</sub>, un producto natural obtenido del hongo *Glarea lozoyensis*, a partir de lo cual se implementarían una serie de esfuerzos enfocados en modificar el núcleo del péptido para encontrar un análogo con mejores propiedades fisicoquímicas, farmacológicas y de actividad antifúngica.<sup>121</sup> El resultado de este desarrollo, se condensaría en la producción comercial de caspofungina. Por otro lado, el progenitor de fingolimod, miriocina (ISP-I) se descubrió del hongo *Isaria sinclairii* en 1972. Al día de hoy, fingolimod se ha desempeñado con una eficacia sin precedentes y en conjunción con su disponibilidad oral, se ha convertido en un componente importante en el arsenal para el combate de la esclerosis múltiple.<sup>122</sup>



**Figura 7.** El inmunosupresor fingolimod y el antifúngico caspofungina.

### 3. HIPÓTESIS

La estrategia OSMAC y el uso de semisíntesis, guiadas por herramientas computacionales, permitirán generar variaciones estructurales de fenalenonas diméricas basadas en duclauxina (**1**) con actividad como inhibidores de la proteína *h*PTP1B de cadena completa.

## 4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las proteínas tirosina cinasas, las PTPs y sus sustratos correspondientes están integrados en elaboradas redes de transducción de señales que son esenciales para la regulación de una gran variedad de funciones celulares. La operación defectuosa o inapropiada de estas redes lleva a una fosforilación de tirosina aberrante, lo cual contribuye al desarrollo de muchas enfermedades, incluyendo diabetes mellitus, obesidad, cánceres, enfermedades cardiovasculares y desórdenes autoinmunes.

Globalmente, alrededor de 463 millones de personas son afectadas por la diabetes DMTII en todo el mundo (12.8 en México) y se estima que este número incremente a 700 millones para el 2045 (22.3 en México).<sup>2,3</sup> Actualmente, la DMTII es considerada la segunda causa de muerte en México.<sup>4</sup> Este padecimiento y la obesidad están asociados con resistencia a la insulina y la leptina. Existe abundante evidencia genética y bioquímica que indica que la PTP1B es el principal regulador tanto de la señalización de insulina como de leptina y que una disminución en la actividad de esta enzima incrementa la acción de ambas hormonas y, al mismo tiempo, previene la obesidad y diabetes.<sup>1</sup>

Por lo tanto, agentes farmacológicos que inhiban la actividad de PTP1B podrían ser capaces de aumentar y prolongar la acción de la insulina y leptina, sirviendo como terapéuticos en el tratamiento de DTII y obesidad.<sup>5</sup> Así mismo, se ha reconocido el papel de PTP1B como promotor de tumores en algunos tipos de cáncer (gástrico, de próstata, colorrectal, de pulmón y de pecho). Se le ha asociado también con enfermedades cardiovasculares y desórdenes autoinmunes.<sup>6,7</sup> Por lo cual, queda de manifiesto que la PTP1B es un blanco molecular validado en el tratamiento de DMTII, obesidad y algunos tipos de cáncer.

Sin embargo, debido a que todas las PTPs comparten un alto grado de conservación en el sitio activo, el diseño de inhibidores con alta afinidad y selectividad sobre PTP1B supone un desafío.<sup>8</sup> Además, los sitios activos de las PTPs han evolucionado para acomodar a las tirosinas fosfatadas -las cuales contienen dos cargas negativas a pH fisiológico, por lo que la mayoría de los candidatos inhibidores que se dirigen al sitio activo poseen una alta densidad de carga que los vuelve pocos permeables; esto es, con baja biodisponibilidad.

Por otro lado, aunque los ensayos enzimáticos *in vitro* son relativamente simples, los ensayos son sensibles a interferencias de inhibidores no específicos: algunos compuestos promiscuos inhiben a la enzima por la formación de agregados que la envuelven; además, la oxidación o alquilación del residuo catalítico de cisteína (215) es un mecanismo común de inhibición, incluso en presencia de DTT.<sup>5</sup> Adicionalmente, los programas enfocados en el descubrimiento de inhibidores de esta proteína generalmente emplean modelos truncos de PTP1B, conduciendo a la pérdida de información valiosa en relación al modo de inhibición y selectividad de los ligantes. Hasta ahora, sólo tres moléculas (ertiprotafib, trodusquemina y JTT-551) han llegado a los ensayos clínicos y

fueron finalmente discontinuadas debido a su eficacia insuficiente y efectos secundarios no deseados.

Por otro lado, los productos naturales han servido como una fuente valiosa para la identificación de compuestos líderes y el descubrimiento de fármacos. Numerosos ejemplos de productos naturales, incluyendo ácidos grasos, compuestos fenólicos, terpenoides, esteroides y alcaloides se han reconocido como inhibidores potentes de modelos truncanos de PTP1B. En particular, cabe mencionar el reconocimiento de duclauxina (**1**) (una fenalenona dimérica aislada de la especie fúngica *Talaromyces* sp. IQ-313) y algunos derivados como moduladores alostéricos de la proteína de cadena completa (*h*PTP1B<sub>1-400</sub>)<sup>9</sup>

En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo principal optimizar la búsqueda de moléculas inhibitoras de PTP1B basadas en duclauxina (**1**) a partir de cultivos en distintas condiciones de fermentación del microorganismo *Talaromyces* sp. IQ-313, o empleando estrategias de semisíntesis. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Cultivar al hongo *Talaromyces* sp. IQ-313 en mediana escala, con el fin de obtener sus productos biosintéticos en cantidades apropiadas bajo condiciones estándar y poder así realizar adecuadamente su caracterización química y biológica.
- Emplear la estrategia OSMAC para enriquecer la variedad estructural de los productos metabólicos producidos por *Talaromyces* sp. IQ-313.
- Obtener los extractos orgánicos de los cultivos axénicos (bajo distintas condiciones de fermentación) y mixtos de *Talaromyces* sp. IQ-313.
- Generar redes moleculares (construidas con espectros de masas) que evidencien las condiciones de cultivo que originan mayor diversidad de metabolitos secundarios en *Talaromyces* sp. IQ-313.
- Realizar un análisis de componentes principales (PCA) que permita discriminar las condiciones de cultivo en las que se obtienen una mayor diversidad y/o rendimiento de metabolitos secundarios.
- Aislar y realizar la elucidación estructural de los metabolitos secundarios producidos por *Talaromyces* sp. IQ-313 bajo las diferentes condiciones de cultivo mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Evaluar el efecto inhibitorio de los compuestos puros aislados y caracterizados sobre la *h*PTP1B<sub>1-400</sub>.
- Generar un modelo por homología para la estructura terciaria de *h*PTP1B<sub>1-400</sub> empleando el servidor I-TASSER y la secuencia completa de la proteína.
- Determinar el probable sitio de unión de las fenalenonas diméricas aisladas a partir de *Talaromyces* sp. IQ-313 en la estructura terciaria de *h*PTP1B<sub>1-400</sub> generada por homología.

- Estudiar las interacciones de por lo menos dos fenalenonas diméricas con *hPTP1B*<sub>1-400</sub> mediante simulaciones de dinámica molecular.
- Sintetizar los inhibidores de *hPTP1B*<sub>1-400</sub> basados en duclauxina (**1**) más prometedores predichos por estudios de acoplamiento molecular.
- Evaluar el efecto inhibitorio de los derivados semisintéticos sobre la *hPTP1B*<sub>1-400</sub>.
- Determinar la magnitud de unión de los productos aislados y semisintetizados sobre *hPTP1B*<sub>1-400</sub> empleando estudios de apagamiento de la fluorescencia intrínseca.
- Crear un modelo que relacione los descriptores moleculares de los compuestos aislados y semisintetizados con las propiedades biológicas determinadas por los ensayos de inhibición y de unión a *hPTP1B*<sub>1-400</sub>.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Obtención de los extractos orgánicos

#### 5.1.1 Preparación de cultivo semilla

A partir de un cultivo del hongo *Talaromyces* sp. IQ-313 crecido en agar papa-dextrosa (PDA), se tomaron tres porciones (el tamaño de inóculo se estandarizó con un horador del número 5) y se transfirieron a tubos cónicos para centrifuga (Falcon®) con 10 mL de medio caldo papa-dextrosa (CPD) o medio CPD suplementado con los aditivos indicados en la **Tabla 2**. La fermentación mixta hongo-hongo consistió de la siembra de tres porciones de cada cepa fúngica, mientras que los co-cultivos hongo-bacteria se prepararon con la inoculación de tres porciones de *Talaromyces* sp. y 200 µL de cultivo bacteriano (con crecimiento previo de 24 horas a 37°C en 10 mL de medio líquido Müeller-Hinton). Todos los experimentos OSMAC se montaron desde el comienzo de la preparación del cultivo semilla, con excepción de los co-cultivos bacteria-hongo, en los cuales la siembra de bacterias se realizó 48 horas después de haber inoculado a *Talaromyces* sp. IQ-313. Todos los cultivos semilla de hongos (axénicos o de fermentación mixta) se dejaron crecer durante una semana y los bacterianos durante 5 días, en agitación a alrededor de 80 rpm.

#### 5.1.2 Cultivo en mediana escala

Con cada uno de los cultivos semilla, se inoculó un matraz con 10 g de Cheerios® o 12 g de arroz. Los experimentos se dejaron fermentar durante tres semanas, a temperatura ambiente con ciclos naturales de luz y oscuridad, en las combinaciones que se muestran en la **Tabla 2**. Previamente, las cepas fúngicas empleadas en los experimentos de fermentación mixta fueron identificadas en las categorías taxonómicas que se indican en la **Tabla 3**.

#### 5.1.3 Extracción de medios sólidos

A cada matraz con crecimiento fúngico, bacteriano o ambos, se añadieron 60 mL de 1:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH. Después cada una de las muestras se fragmentó con una espátula, se agitaron en una parrilla de agitación magnética (por dos horas) y se maceraron (~ 24h) a temperatura ambiente. Las muestras se filtraron al vacío sobre papel filtro y el remanente sólido se lavó con 90 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Al filtrado se le añadieron 75 mL de agua destilada. Las soluciones bifásicas se agitaron en una parrilla de agitación magnética durante 10-15 minutos y posteriormente se transfirieron a un embudo de separación. Las fases orgánicas se recogieron en matraces de bola y se evaporaron hasta sequedad. Se

descartaron las fases acuosas. Después, los extractos orgánicos se reconstituyeron en 100 mL de 1:1 MeOH/MeCN y 100 mL de hexanos. Las soluciones bifásicas se transfirieron a un embudo de separación. Las fases orgánicas se recogieron en matraces de bola y se evaporaron hasta sequedad. Se descartaron las fases hexánicas. Por último, todos los extractos generados se pesaron y analizaron por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

**Tabla 2.** Diseño de experimentos OSMAC.

Cepa(s)	Experimento	Medio de cultivo
IQ-313	Cultivo axénico, control	Cheerios®
IQ-313	CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	Cheerios®
IQ-313	CaCl <sub>2</sub> (1 M)	Cheerios®
IQ-313	EDTA (1000 µM)	Cheerios®
IQ-313	EDTA (100 µM)	Cheerios®
IQ-313	Co (1000 µM)	Cheerios®
IQ-313	Zn (1000 µM)	Cheerios®
IQ-313	Cu (1000 µM)	Cheerios®
IQ-313	Ni (1000 µM)	Cheerios®
IQ-313	Fe (1000 µM)	Cheerios®
IQ-043	Cultivo axénico, blanco	Cheerios®
IQ-046	Cultivo axénico, blanco	Cheerios®
IQ-053	Cultivo axénico, blanco	Cheerios®
IQ-313/IQ-043	Fermentación mixta	Cheerios®
IQ-313/IQ-046	Fermentación mixta	Cheerios®
IQ-313/IQ-053	Fermentación mixta	Cheerios®
IQ-313	Cultivo axénico, control	Arroz
MRSA	Cultivo axénico, blanco	Arroz
<i>Enterococcus faecium</i>	Cultivo axénico, blanco	Arroz
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Cultivo axénico, blanco	Arroz
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultivo axénico, blanco	Arroz
IQ-313/MRSA	Fermentación mixta	Arroz
IQ-313/ <i>E. faecium</i>	Fermentación mixta	Arroz
IQ-313/ <i>A. baumannii</i>	Fermentación mixta	Arroz
IQ-313/ <i>P. aeruginosa</i>	Fermentación mixta	Arroz
IQ-313/DMSO (5%)	Fermentación mixta	Arroz

\*MRSA= *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

\*Los experimentos de fermentación mixta de arroz se realizaron por triplicado.

**Tabla 3.** Clasificación taxonómica de cepas fúngicas.

Clase	Orden	Familia	Género	IQ
Eurotiocyetes	Eurotiales	Trichomaceae	<i>Talaromyces</i>	313
		Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	043
				046
				053

## 5.2 Análisis cromatográficos

Los análisis de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizaron en un cromatógrafo Waters® equipado con un detector UV de arreglo de fotodiodos (PDA-2998) acoplado a un detector de dispersión de luz tras evaporación (ELSD-2424). Los análisis se llevaron a cabo empleando una columna Phenomenex® (C<sub>18</sub>, 5 µm, 4.6 × 250 mm) y los aislamientos de los compuestos en una columna semipreparativa Phenomenex® (C<sub>18</sub>, 5 µm, 10.0 × 250 mm). Como fase móvil se usaron distintos gradientes de elución de agua acidificada (al 0.1% con ácido fórmico) con CH<sub>3</sub>CN. Las corridas analíticas se realizaron inyectando 10 µL de muestra a una concentración de 5 mg/mL y empleando un automuestreador (Waters 2707) a un flujo de 1 mL/min. Los fraccionamientos semipreparativos se hicieron usando el mismo equipo acoplado a un colector de fracciones (WFCIII), configurado para coleccionar fracciones de 2.3 mL a un flujo de 4.6 mL/min. Todos los cromatogramas se registraron a una longitud de onda de 254 nm. Los datos se adquirieron y procesaron usando el software Empower, versión 3.0 (Waters®). Los análisis cromatográficos tipo FLASH se efectuaron en columnas empacadas con una fase estacionaria C<sub>18</sub>, empleando como fase móvil gradientes de agua acidificada (al 0.1% con ácido fórmico) con CH<sub>3</sub>CN, a un flujo de 20 mL/min. Se colectaron fracciones de 50 mL. Tras evaporación del disolvente todas las fracciones se analizaron por CLAE.

## 5.3 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los espectros de RMN se registraron en alguno de los siguientes equipos: Bruker Ascend III 700 a 700 (<sup>1</sup>H) y 175 (<sup>13</sup>C) MHz; Bruker Avance III a 500 (<sup>1</sup>H) y 125 (<sup>13</sup>C) MHz; Bruker Avance III a 400 (<sup>1</sup>H) y 100 (<sup>13</sup>C) MHz, utilizando CDCl<sub>3</sub> o CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> como disolvente. Los desplazamientos químicos se registraron en ppm (δ). Los espectros de masas se obtuvieron por la técnica de análisis directo en tiempo real (DART) en un espectrómetro de masas Jeol JMS-T100LC AccuTOF y/o por Jet Stream Technology empleando un equipo Q-TOF (modelo G6530BA).

## 5.4 Estudio químico de *Talaromyces* sp. IQ-313

### 5.4.1 Análisis de redes moleculares

Los experimentos de co-cultivo de los aislamientos IQ-313/IQ-043 en Cheerios® y el co-cultivo IQ-313/*P. aeruginosa* en arroz y en Cheerios®, generados para la construcción de redes moleculares en la plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) se analizaron por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-EM-AR-ESI-MS/MS) en una columna BEH C<sub>18</sub> (Waters® Corp., MA, EEUU; 1.7 µm, 2.1 × 100 mm) empleando un gradiente lineal, iniciando con 15 % de MeCN y 85 % de ácido fórmico al 0.1 % en agua, hasta 100 % de MeCN en 8 min, manteniendo la composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 min. El control del equipo y análisis de datos se realizó con el software Xcalibur. El registro de los espectros se realizó en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, UNCG, Carolina del Norte, EUA. El análisis de datos para redes moleculares comenzó con la conversión de los archivos raw en .mzML usando el software MS Convert (incluido en la paquetería de ProteoWizard), aplicando simultáneamente la operación “*Peak Picking*” para hacer centroides a los datos. Asimismo, se generó un archivo de metadata para ubicar el origen de cada experimento. Posteriormente, se realizó un análisis clásico en la plataforma GNPS, configurando los siguientes parámetros:

- Tolerancia de la masa del ion molecular precursor = 2.0 Da
- Tolerancia de la masa de fragmentos iónicos = 0.5 Da
- Puntuación mínima del coseno = 0.7
- Fragmentos mínimos identificados = 6
- Número máximo de nodos conectados = 100
- Tamaño mínimo de los clústeres = 2
- Puntuación del umbral = 0.7
- Máxima diferencia en masa para la búsqueda de análogos = 100 Da

Con el fin de hacer un análisis más fino para distinguir isómeros, se realizó el análisis *Feature Based Molecular Networking*, el cual requirió el procesamiento de espectros MS/MS en el software MZmine, versión 2.53. Éste comenzó con la detección de masas, fijando un umbral de ruido para MS<sup>1</sup> de 1.0×10<sup>5</sup> y para MS<sup>2</sup> de 1.0×10<sup>3</sup>, empleando el algoritmo *Centroid*. Posteriormente, se construyó un cromatograma con el algoritmo *Chromatogram Builder*, estableciendo que para que un ion sea reconocido, debe tener una altura mínima de 3.0×10<sup>3</sup>, aparecer durante al menos 0.01 min, con una tolerancia de ± 10.0 ppm. Después, se hizo una deconvolución del cromatograma empleando el algoritmo *Baseline-cut-off*, fijando una altura mínima de pico de 1.0×10<sup>6</sup> y

una línea base de  $1.0 \times 10^5$  con un rango de duración de 0.0-10.0 min, emparejando  $MS^1$  con  $MS^2$  con una diferencia máxima de 0.01 Da y 0.2 min. Enseguida, se hizo un agrupamiento de isótopos, con una tolerancia de  $\pm 5.0$  ppm, una tolerancia de 0.2 min y máxima carga de tres. Finalmente, se hizo un alineamiento de las características cromatográficas con el algoritmo *Joint aligner*, con una tolerancia de  $\pm 5.0$  ppm, un puntaje de 75 para  $m/z$  y de 25 para el tiempo de retención. Finalmente, los datos fueron exportados en dos formatos .csv y .mgf, los cuales se subieron a GNPS para la construcción de redes moleculares, junto con el archivo de metadata. Todas las redes moleculares se visualizaron en Cytoscape.

#### 5.4.2 Análisis de componentes principales (PCA)

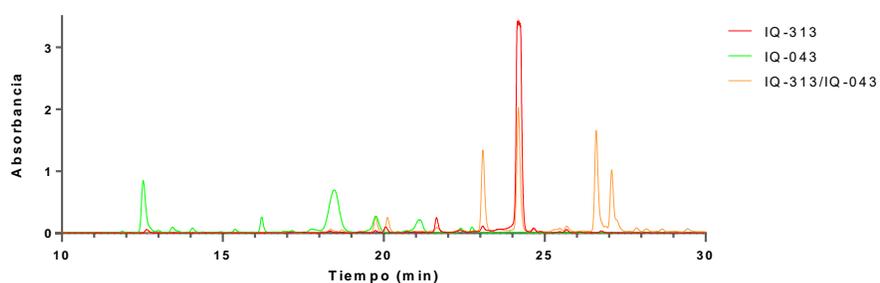
Los experimentos OSMAC se realizaron por triplicado y se analizaron por cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas por cuadrupolo simple y tiempo de vuelo (CLAE-EM-SQ-TOF). La separación cromatográfica se realizó en una columna  $C_{18}$  (3  $\mu$ m, 2  $\times$  75 mm), empleando un gradiente lineal iniciando con 15 % de MeCN y 85 % de ácido fórmico al 0.1 % en agua, hasta 100 % de MeCN en 8 min, manteniendo la composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.1 min. Se estableció un flujo de 0.4 mL/min y un retraso de 3.0 min entre las inyecciones. El control del equipo se realizó con el software MassHunter<sup>®</sup>. El registro de los espectros se realizó en el Laboratorio Nacional para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC). El análisis requirió el procesamiento de espectros MS en el software MZmine, versión 2.53. Éste comenzó con la detección de masas, fijando un umbral de ruido para  $MS^1$  de  $1.0 \times 10^4$  empleando el algoritmo *Centroid*. Posteriormente, se construyó un cromatograma con el algoritmo *ADAP Chromatogram Builder*, estableciendo mínimo cuatro scans en un grupo con un umbral mínimo de intensidad de  $1.0 \times 10^4$ , para picos que tengan como mínimo una altura de  $3.0 \times 10^4$ , con tolerancia de  $\pm 5.0$  ppm. Después, se hizo una deconvolución del cromatograma empleando el algoritmo *Baseline-cut-off*, fijando una altura mínima de pico de  $3.0 \times 10^4$  y una línea base de  $1.0 \times 10^4$  con un rango de duración de 0.0-3.0 min. Enseguida, se hizo un agrupamiento de isótopos, con una tolerancia de 0.001  $m/z$  o  $\pm 5.0$  ppm, una tolerancia de 0.2 min y máxima carga de tres. Posteriormente se hizo un alineamiento de las características cromatográficas con el algoritmo *Joint aligner*, con una tolerancia de  $\pm 5.0$  ppm, un puntaje de 75 para  $m/z$  y de 25 para el tiempo de retención. Finalmente, se definieron los parámetros y sus respectivos valores para efectuar el PCA, seleccionando la altura de pico para la construcción de un gráfico de dos componentes. Las coordenadas de los componentes se procesaron en Prism 6.0.

## 5.5 Purificación de productos biosintéticos generados por fermentación mixta

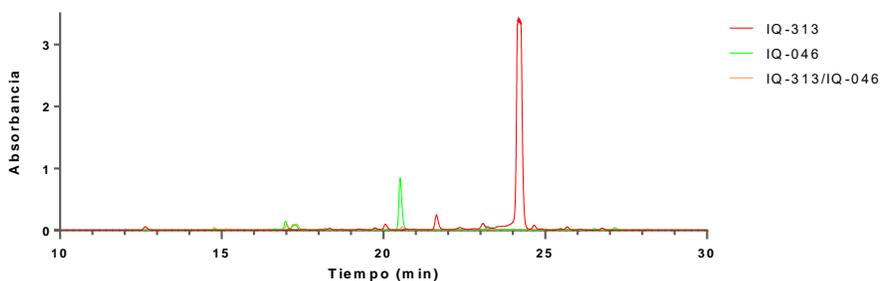
### 5.5.1 Fraccionamiento de co-cultivo IQ-313/IQ-043

La selección de los extractos orgánicos para análisis químico se realizó considerando las diferencias cromatográficas entre los perfiles de las distintas condiciones de cultivo y la fermentación axénica de la especie *Talaromyces* sp. IQ-313. Así, se seleccionó el extracto obtenido de la fermentación mixta IQ-313/IQ-043 para el aislamiento de compuestos que no se observaron en los cultivos axénicos (IQ-313 e IQ-043) (**Figura 8**).

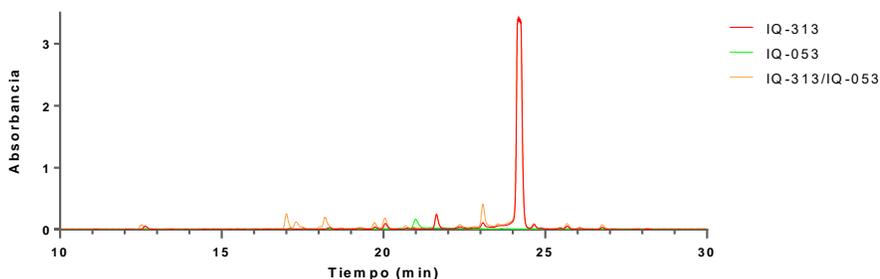
**A**



**B**

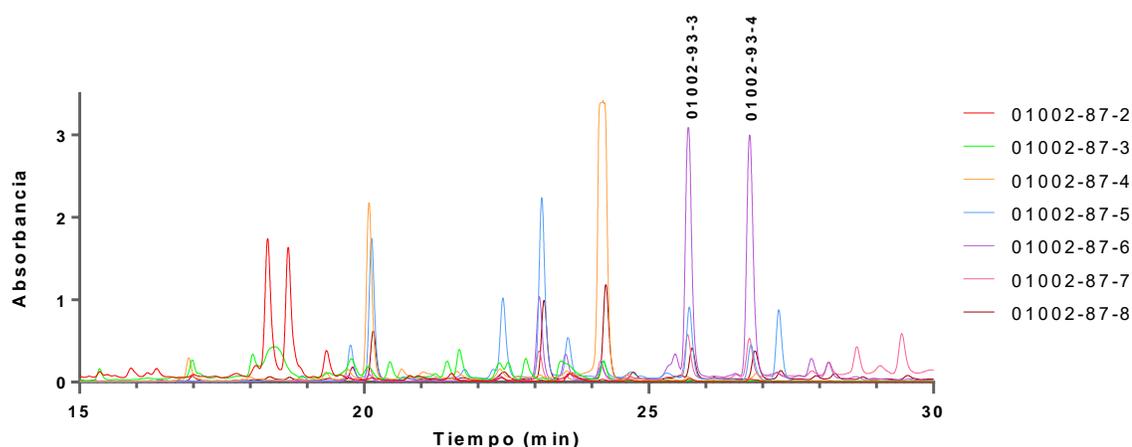


**C**



**Figura 8.** Cromatograma de análisis por CLAE de los extractos de los cultivos axénicos de IQ-313, IQ-043, IQ-046 e IQ-053, así como de los co-cultivos IQ-313/IQ-043 (**A**), IQ-313/IQ-046 (**B**) e IQ-313/IQ-053 (**C**).

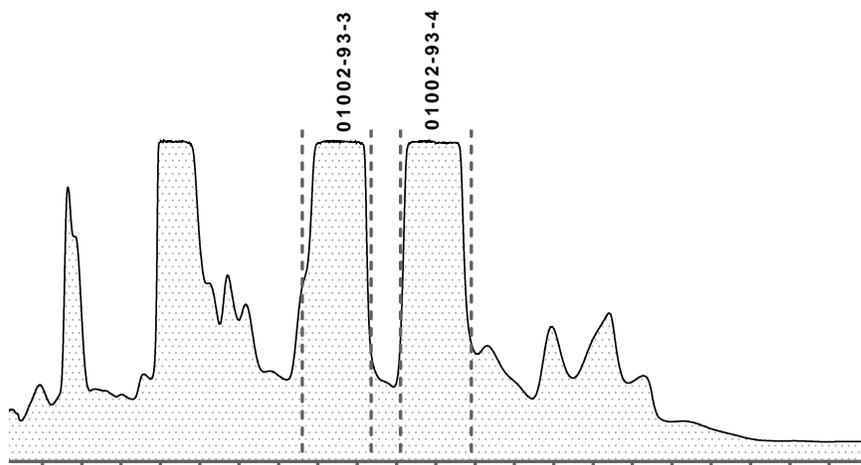
El extracto orgánico seco (246 mg) del cocultivo IQ-313/IQ-043 se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante cromatografía tipo FLASH de fase reversa, empleando una columna C<sub>18</sub> (CV = 26.4 mL) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico): 20% de MeCN durante 4.5 minutos, un gradiente de 20%→100% de MeCN durante 30 minutos y 100% de MeCN durante 5 minutos. Se empleó un flujo de 20.0 mL/min y se colectaron fracciones de 50 mL. De este fraccionamiento se obtuvieron ocho fracciones primarias (01002-87-1,2,3,4,5,6,7,8), las cuales se analizaron mediante CLAE (**Figura 9**).



**Figura 9.** Cromatograma de análisis por CLAE de las fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto del co-cultivo IQ-313/IQ-043.

### 5.5.2 Aislamiento, purificación e identificación de 01002-93-3 (**5**) y 01002-93-4 (**6**)

La resolución de la fracción 01002-87-6 (22.9 mg) se realizó por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 10**), utilizando una columna Phenomenex® (C<sub>18</sub>) como fase estacionaria y un método isocrático de MeCN/0.1% ácido fórmico acuoso (60:40, 25 minutos). Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de 01002-93-3 (**5**, 3.8 mg;  $t_R$  11.0 min) y 01002-93-4 (**6**, 3.3 mg;  $t_R$  13.3 min), los cuales se identificaron como bacilisporina F (**5**) y 1-*epi*-bacilisporina F (**6**), respectivamente, por comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos con los reportados en la literatura.<sup>123</sup>



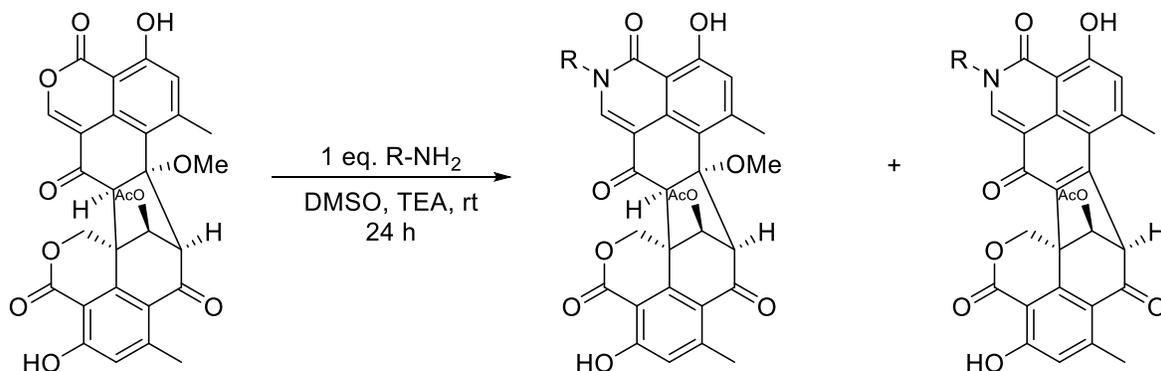
**Figura 10.** Cromatograma del fraccionamiento de 01002-87-6, del cual se aislaron los productos 01002-93-3 (**5**) y 01002-93-4 (**6**).

**Bacilosporina F (5):** Sólido amarillo, RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 2.04 (3H, s, CH<sub>3</sub>COOR), 2.60 (3H, s, H-10'), 3.01 (3H, s, H-10), 3.74 (3H, s, CH<sub>3</sub>OR), 4.96 (1H, d, *J* = 12.4 Hz, H-1'β), 5.03 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, H-1'α), 5.80 (1H, s, H-9'), 6.57 (1H, s, H-1), 6.83 (1H, s, H-5'), 6.94 (1H, s, H-5), 7.43 (1H, s, OH-9), 11.58 (1H, s, OH-4'), 11.87 (1H, s, OH-4); RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 21.0 (CH<sub>3</sub>COOR), 24.1 (C-10'), 25.5 (C-10), 49.3 (C-9'a), 56.7 (CH<sub>3</sub>OR), 62.1 (C-8'), 69.6 (C-1'), 85.7 (C-9'), 97.1 (C-3a), 100.2 (C-1), 103.3 (C-3'a), 109.1 (C-9a), 117.3 (C-6'a), 119.6 (C-6a), 120.9 (C-5), 121.7 (C-5'), 130.8 (C-8), 131.6 (C-3b), 139.6 (C-7), 146.2 (C-3'b), 146.7 (C-6), 150.2 (C-9), 154.8 (C-6'), 164.2 (C-4), 165.0 (C-4'), 167.6 (C-3'), 168.1 (C-3), 170.3 (CH<sub>3</sub>COOR), 190.2 (C-7') [**Figuras Al-5-Al-8**]. EM-AR-AJS *m/z*: 547.1248 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>29</sub>H<sub>23</sub>O<sub>11</sub>, 547.1240, +1.5 ppm).

**1-epi-Bacilosporina F (6):** Sólido café, RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 2.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>COOR), 2.59 (3H, s, H-10'), 3.00 (3H, s, H-10), 3.80 (3H, s, CH<sub>3</sub>OR), 4.95 (1H, d, *J* = 12.5 Hz, H-1'β), 5.11 (1H, d, *J* = 12.4 Hz, H-1'α), 5.80 (1H, s, H-9'), 6.50 (1H, s, H-1), 6.82 (1H, s, H-5'), 6.94 (1H, s, H-5), 7.56 (1H, s, OH-9), 11.60 (1H, s, OH-4'), 11.86 (1H, s, OH-4); RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 21.0 (CH<sub>3</sub>COOR), 24.1 (C-10'), 25.5 (C-10), 49.3 (C-9'a), 56.9 (CH<sub>3</sub>OR), 62.0 (C-8'), 69.4 (C-1'), 85.8 (C-9'), 97.2 (C-3a), 100.4 (C-1), 103.2 (C-3'a), 109.1 (C-9a), 117.2 (C-6'a), 119.6 (C-6a), 120.9 (C-5), 121.6 (C-5'), 130.7 (C-8), 131.7 (C-3b), 139.5 (C-7), 146.5 (C-3'b), 146.6 (C-6), 150.1 (C-9), 154.7 (C-6'), 164.1 (C-4), 165.0 (C-4'), 167.6 (C-3'), 168.0 (C-3), 170.3 (CH<sub>3</sub>COOR), 190.3 (C-7') [**Figuras Al-9-Al-12**]. EM-AR-AJS *m/z*: 547.1260 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>29</sub>H<sub>23</sub>O<sub>11</sub>, 547.1240, +3.7 ppm).

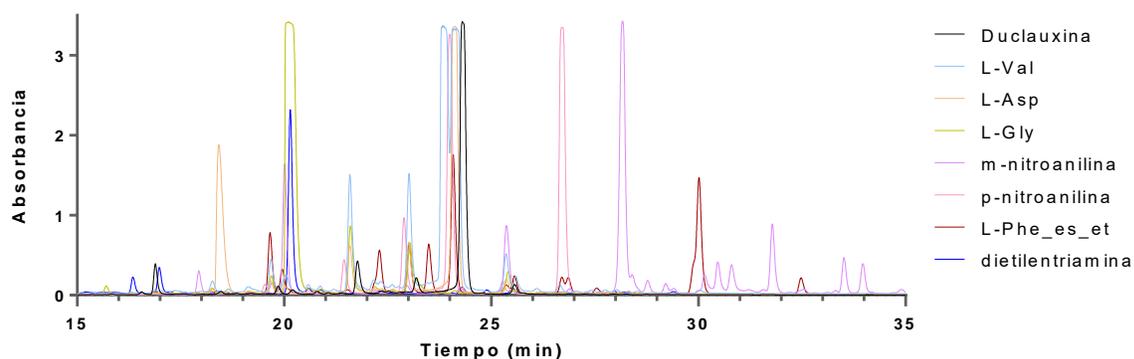
## 5.6 Síntesis parcial de análogos de duclauxina (1)

Cantidades variables de duclauxina (1) ( $\approx 85\%$  de pureza, determinada mediante un método cromatográfico) contenida en extracto de co-cultivo IQ-313/*Staphylococcus aureus* se hicieron reaccionar en DMSO, a temperatura ambiente y en agitación magnética durante  $\sim 24$  horas, con un equivalente de diversos aminoácidos y aminas primarias de acuerdo con el **Esquema 1**.



**Esquema 1.** Estrategia sintética para la obtención de híbridos de duclauxina (1).

Las reacciones se analizaron por CLAE (**Figura 11**) y se seleccionaron para escalamiento aquellas que mostraron mejores rendimientos y cuyos productos esperados fueron previamente priorizados por estudios de acoplamiento molecular.

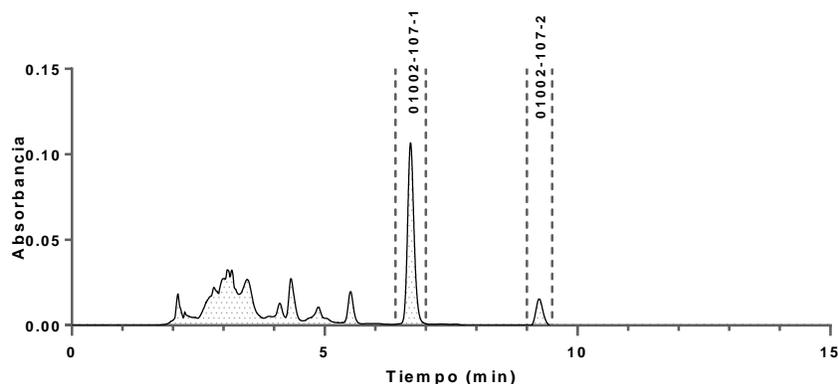


**Figura 11.** Cromatogramas de duclauxina y productos de reacciones de semisíntesis con los aminoácidos y aminas primarias seleccionadas para escalamiento.

## 5.7 Purificación de derivados semisintéticos de duclauxina (1).

### 5.7.1 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-107-1 (7) y 01002-107-2 (8)

Aproximadamente 5 mg de duclauxina (1) se hicieron reaccionar con 1.8 mg del éster etílico de L-fenilalanina (L-Phe-es-et) en DMSO a temperatura ambiente y en agitación magnética durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 12**), haciendo una inyección de 200  $\mu$ L, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex<sup>®</sup> (C<sub>18</sub>) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico): un gradiente de 80%→100% de MeCN durante 10 minutos y 100% de MeCN durante 5 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de 01002-107-1 (7, 0.4 mg;  $t_R$  6.5 min) y 01002-107-2 (8, 0.2 mg;  $t_R$  8.4 min).



**Figura 12.** Cromatograma de la purificación de 01002-107-1 (7) y 01002-107-2 (8).

01002-107-1 (7): Sólido color crema, RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  (ppm): 1.25 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-2'''), 2.06 (3H, s, H-10), 2.22 (3H, s, CH<sub>3</sub>COOR), 2.70 (3H, s, H-10'), 2.93 (3H, s, CH<sub>3</sub>OR), 3.12 (1H, dd,  $J = 14.5, 9.1$  Hz, H-3'' $\beta$ ), 3.54 (1H, dd,  $J = 14.5, 6.7$  Hz, H-3'' $\alpha$ ), 3.97 (1H, s, H-8), 4.14 (1H, s, H-8'), 4.26 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz, H-1'''), 4.77 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz, H-1' $\beta$ ), 5.10 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz, H-1' $\alpha$ ), 5.17 (1H, s, H-9'), 5.71 (1H, dd,  $J = 9.1, 6.6$  Hz, H-2''), 6.51 (1H, s, H-5), 6.74 (1H, s, H-5'), 7-10-7.23 (5H, m, H-5'', H-6'', H-7''), 7.82 (1H, s, H-1), 11.67 (1H, s, OH-4), 12.05 (1H, s, OH-4') [**Figuras A1-13-A1-14**]. EM-AR-DART  $m/z$ : 722.2263 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>40</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>12</sub>, 722.2238, +3.5 ppm).

01002-107-2 (8): Sólido color amarillo, RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  (ppm): 1.23 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-2'''), 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>COOR), 2.59 (3H, s, H-10'), 2.96 (3H, s, H-10), 3.33 (1H, dd,  $J = 14.5, 10.9$  Hz, H-3'' $\beta$ ), 3.75 (1H, dd,  $J = 14.5, 5.5$  Hz, H-3'' $\alpha$ ), 4.22 (2H, q,  $J = 7.2$  Hz, H-1'''), 4.80 (1H, d,  $J = 12.3$  Hz, H-1' $\beta$ ), 4.89 (1H, d,  $J = 1.1$  Hz, H-

8'), 5.03 (1H, d,  $J = 12.3$  Hz, H-1'α), 5.71 (1H, d,  $J = 1.1$  Hz, H-9'), 5.84 (1H, dd,  $J = 10.9, 5.6$  Hz, H-2''), 6.79 (1H, s, H-5), 6.85 (1H, s, H-5'), 7.18 (5H, m, H-5'', H-6'', H-7''), 8.57 (1H, s, H-1), 12.04 (1H, s, OH-4), 12.55 (1H, s, OH-4') [Figuras AI-15-AI-16]. EM-AR-AJS  $m/z$ : 690.1978 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>39</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>11</sub>, 690.1975, +0.4 ppm).

### 5.7.2 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-117-1 (9)

Aproximadamente 14.9 mg de duclauxina (1) se hicieron reaccionar con 5.3 mg de L-aspartato (L-Asp) en DMSO a temperatura ambiente y en agitación magnética durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (Figura 13), haciendo una inyección de 160 μL, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (C<sub>18</sub>) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico): un gradiente de 50%→90% de MeCN durante 20 minutos y 100% de MeCN durante 5 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de 01002-117-1 (9, 6.2 mg;  $t_R$  5.0 min), el cual se identificó como talauxina D (9), un producto de semisíntesis reportado por Karuso y colaboradores.<sup>124</sup>

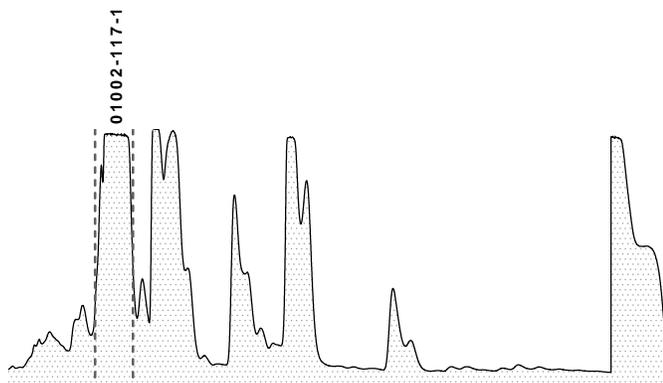


Figura 13. Cromatograma de la purificación de 01002-117-1 (9).

Talauxina D (9): Sólido amarillo, RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) δ<sub>H</sub> (ppm): 1.99 (3H, s, H-10), 2.20 (3H, s, CH<sub>3</sub>COOR), 2.69 (3H, s, H-10'), 2.90 (1H, dd,  $J = 17.6, 7.7$  Hz, H-3''β), 2.97 (3H, s, CH<sub>3</sub>OR), 3.36 (1H, dd,  $J = 17.6, 5.5$  Hz, H-3'α), 4.02 (1H, s, H-8), 4.12 (1H, s, H-8'), 4.92 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz, H-1'β), 5.14 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz, H-1'α), 5.18 (1H, s, H-9'), 5.36 (1H, dd,  $J = 7.7, 5.5$  Hz, H-2''), 6.55 (1H, s, H-5), 6.75 (1H, s, H-5'), 7.96 (1H, s, H-1); RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD) δ<sub>C</sub> (ppm): 20.8 (CH<sub>3</sub>COOR), 22.1 (C-10'), 22.3 (C-10), 35.6 (C-3'α), 51.9 (CH<sub>3</sub>OR), 52.7 (C-9'a), 60.5 (C-2''), 65.3 (C-8), 69.3 (C-8'), 72.6 (C-1'α), 80.6 (C-9'), 89.8 (C-7), 106.4 (C-3a), 108.2 (C-3'a), 112.6 (C-9a), 118.2 (C-6'a), 118.9 (C-5), 121.6 (C-5'), 122.6 (C-6a), 136.3 (C-1), 138.3 (C-3b), 144.7 (C-3'b), 150.4 (C-6'), 152.3 (C-6), 162.8 (C-4'), 165.7 (C-4), 166.4 (C-3), 168.8 (C-3'), 171.2 (C-

4''), 171.4 ( $\text{CH}_3\text{COOR}$ ), 173.4 (C-1''), 193.0 (C-7'), 195.5 (C-9) [Figuras AI-17-A20]. EM-AR-AJS  $m/z$ : 662.1528  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd. para  $\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{NO}_{14}$ , 662.1510, +2.7 ppm).

### 5.7.3 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-114-1 (**10**)

Aproximadamente 16 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con 2.9 mg de L-glicina (L-Gly) en DMSO a temperatura ambiente y en agitación magnética durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (Figura 14), haciendo una inyección de 170  $\mu\text{L}$ , utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex<sup>®</sup> ( $\text{C}_{18}$ ) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico): un gradiente de 50%→90% de MeCN durante 20 minutos y 100% de MeCN durante 5 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de 01002-114-1 (**10**, 6.3 mg;  $t_R$  6.6 min), el cual se identificó como talauxina G (**10**), un producto de semisíntesis reportado por Karuso y colaboradores,<sup>124</sup> caracterizado por espectrometría de masas de alta resolución, pero nunca aislado.

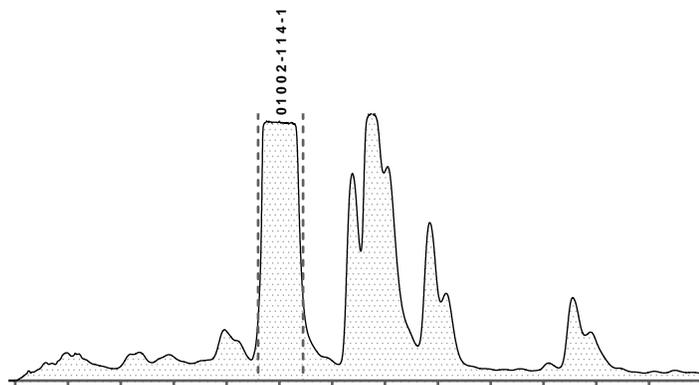


Figura 14. Cromatograma de la purificación de 01002-114-1 (**10**).

Talaxina G (**10**): Sólido amarillo pálido, RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_H$  (ppm): 2.03 (3H, s, H-10), 2.23 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{COOR}$ ), 2.71 (3H, s, H-10'), 2.94 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{OR}$ ), 3.99 (1H, s, H-8), 4.15 (1H, s, H-8'), 4.58 (1H, d,  $J = 17.3$  Hz, H-2'' $\beta$ ), 4.80 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz, H-1' $\beta$ ), 4.85 (1H, d,  $J = 17.3$  Hz, H-2'' $\alpha$ ), 5.10 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz, H-1' $\alpha$ ), 5.21 (1H, s, H-9'), 6.52 (1H, s, H-5), 6.77 (1H, s, H-5'), 7.79 (1H, s, H-1), 11.97 (1H, s, OH-4'); ); RMN- $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_C$  (ppm): 21.2 ( $\text{CH}_3\text{COOR}$ ), 22.1 (C-10'), 22.6 (C-10), 49.4 (C-2''), 51.6 (C-9'a), 51.7 ( $\text{CH}_3\text{OR}$ ), 64.1 (C-8), 67.9 (C-8'), 71.6 (C-1'), 78.8 (C-9'), 88.6 (C-7), 104.7 (C-3a), 107.0 (C-3'a), 111.8 (C-9a), 116.9 (C-6'a), 118.7 (C-5'), 121.2 (C-5), 121.6 (C-6a), 134.8 (C-1), 136.6 (C-3b), 142.8 (C-3'b), 149.6 (C-6'), 152.0 (C-6), 161.6 (C-4'), 164.3 (C-4), 165.1 (C-3), 167.7 (C-3'), 169.9 ( $\text{CH}_3\text{COOR}$ ), 169.9 (C-1''),

191.2 (C-7'), 194.6 (C-9) [Figuras AI-21-A24]. EM-AR-AJS  $m/z$ : 604.1469 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>31</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>12</sub>, 604.1455, +2.3 ppm).

#### 5.7.4 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-118-3 (11)

Aproximadamente 16.2 mg de duclauxina (1) se hicieron reaccionar con 3.6 mg de L-valina (L-Val) en DMSO a temperatura ambiente y en agitación magnética durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (Figura 15), haciendo una inyección de 200  $\mu$ L, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex<sup>®</sup> (C<sub>18</sub>) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico): un gradiente no lineal (curva 9) de 50%→55% de MeCN durante 30 minutos y 100% de MeCN durante 5 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de 01002-118-3 (11, 2.1 mg;  $t_R$  16.0 min), el cual se identificó como talauxina V (11), un producto de semisíntesis reportado por Karuso y colaboradores.<sup>124</sup>

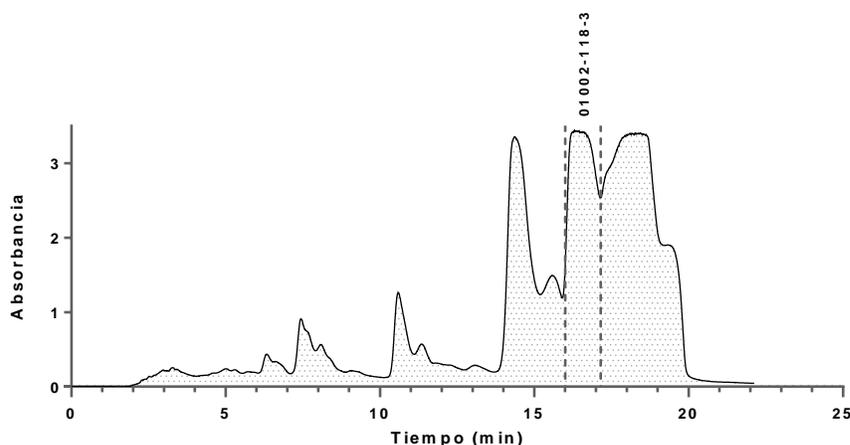


Figura 15. Cromatograma de la purificación de 01002-118-3 (11).

Talauxina V (11): Sólido blanco, RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  (ppm): 0.80 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-4''), 1.15 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-4'''), 2.05 (3H, s, H-10), 2.23 (3H, s, CH<sub>3</sub>COOR), 2.46 (1H, dq,  $J = 9.7, 6.6$  Hz, H-3''), 2.71 (3H, s, H-10'), 2.98 (3H, s, CH<sub>3</sub>OR), 4.00 (1H, s, H-8), 4.14 (1H, s, H-8'), 4.78 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz, H-1'β), 5.10 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz, H-1'α), 5.17 (1H, d,  $J = 9.8$  Hz, H-2''), 5.20 (1H, s, H-9'), 6.48 (1H, s, H-5), 6.79 (1H, s, H-5'), 7.79 (1H, s, H-1), 12.14 (1H, s, OH-4'); RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  (ppm): 18.9 (C-4''), 19.8 (C-4'''), 21.1 (CH<sub>3</sub>COOR), 22.0 (C-10'), 22.6 (C-10), 30.2 (C-3''), 51.8 (C-9'a), 51.9 (CH<sub>3</sub>OR), 62.6 (C-2''), 64.0 (C-8), 68.0 (C-8'), 71.4 (C-1'), 78.7 (C-9'), 88.6 (C-7), 105.2 (C-3a), 106.8 (C-3'a), 111.5 (C-9a), 116.7 (C-6a), 118.6 (C-5'), 121.1 (C-5), 121.7 (C-6a), 134.2 (C-1), 134.4 (C-3b), 143.1 (C-3'b), 149.5 (C-6'), 151.9 (C-6), 161.8 (C-4'), 163.8 (C-4), 165.2 (C-3), 167.2 (C-3'), 169.8 (CH<sub>3</sub>COOR), 191.1 (C-

7'), 194.2 (C-9), 194.3 (C-1'') [Figuras Al-25-A28]. EM-AR-DART  $m/z$ : 646.1896 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>12</sub>, 646.1925, -4.5 ppm).

### 5.7.5 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-125-1 (12)

Aproximadamente 18.0 mg de duclauxina (1) se hicieron reaccionar con un exceso de 1,4-nitroanilina en DMSO a temperatura ambiente y en agitación magnética durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (Figura 16), haciendo dos inyecciones de 100  $\mu$ L, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (C<sub>18</sub>) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico): un gradiente de 40%→100% de MeCN durante 20 minutos y 100% de MeCN durante 5 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de 01002-125-1 (12, 10.0 mg;  $t_R$  15.7 min).

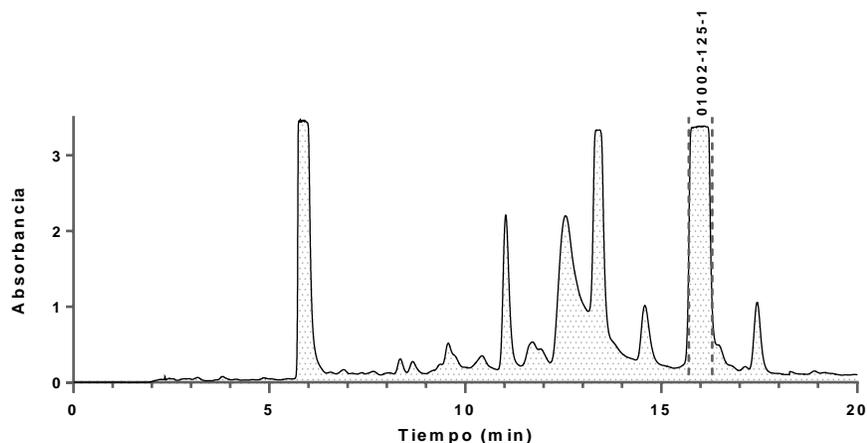
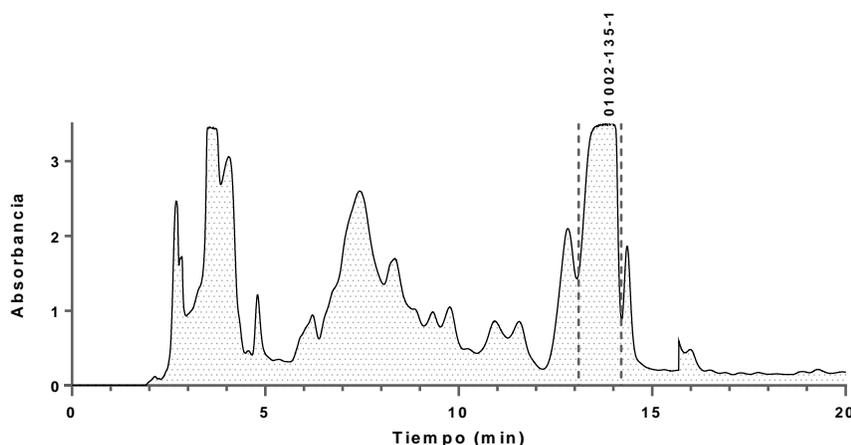


Figura 16. Cromatograma de la purificación de 01002-125-1 (12).

01002-125-1 (12): Sólido blanco, RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  (ppm): 2.10 (3H, s, H-10), 2.24 (3H, s, CH<sub>3</sub>COOR), 2.74 (3H, s, H-10'), 3.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>OR), 4.04 (1H, s, H-8), 4.17 (1H, s, H-8'), 4.82 (1H, d,  $J$  = 12.1 Hz, H-1' $\beta$ ), 5.10 (1H, d,  $J$  = 12.1 Hz, H-1' $\alpha$ ), 5.25 (1H, s, H-9'), 6.62 (1H, s, H-5), 6.85 (1H, s, H-5'), 7.49 (2H, d,  $J$  = 4.8 Hz, H-2''), 7.64 (1H, s, H-1), 8.42 (2H, d,  $J$  = 4.8 Hz, H-3''), 11.75 (1H, s, OH-4), 11.91 (1H, s, OH-4'); RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  (ppm): 21.1 (CH<sub>3</sub>COOR), 22.1 (C-10'), 22.6 (C-10), 51.8 (C-9'a), 51.9 (CH<sub>3</sub>OR), 64.1 (C-8), 68.0 (C-8'), 71.5 (C-1'), 78.6 (C-9'), 88.9 (C-7), 105.2 (C-3a), 107.1 (C-3'a), 113.0 (C-9a), 117.5 (C-6'a), 119.6 (C-5'), 120.8 (C-5), 121.9 (C-6a), 125.3 (C-2''), 127.9 (C-3''), 133.9 (C-1), 134.5 (C-3b), 143.0 (C-3'b), 143.4 (C-1''), 148.0 (C-4''), 150.2 (C-6'), 152.4 (C-6), 162.1 (C-4'), 164.3 (C-4), 164.6 (C-3), 167.6 (C-3'), 169.7 (CH<sub>3</sub>COOR), 191.0 (C-7'), 194.2 (C-9) [Figuras Al-29-A-32]. EM-AR-DART  $m/z$ : 667.1586 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>, 667.1564, +3.3 ppm).

### 5.7.6 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-135-1 (**13**)

Aproximadamente 16.0 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con un exceso de 1,4-nitroanilina y 10  $\mu\text{L}$  de trietilamina (TEA) en DMSO a temperatura ambiente y en agitación magnética durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 17**), haciendo dos inyecciones de 100  $\mu\text{L}$ , utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex<sup>®</sup> ( $\text{C}_{18}$ ) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico): un gradiente de 60%→100% de MeCN durante 30 minutos y 100% de MeCN durante 5 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de 01002-135-1 (**13**, 3.5 mg;  $t_{\text{R}}$  13.1 min).

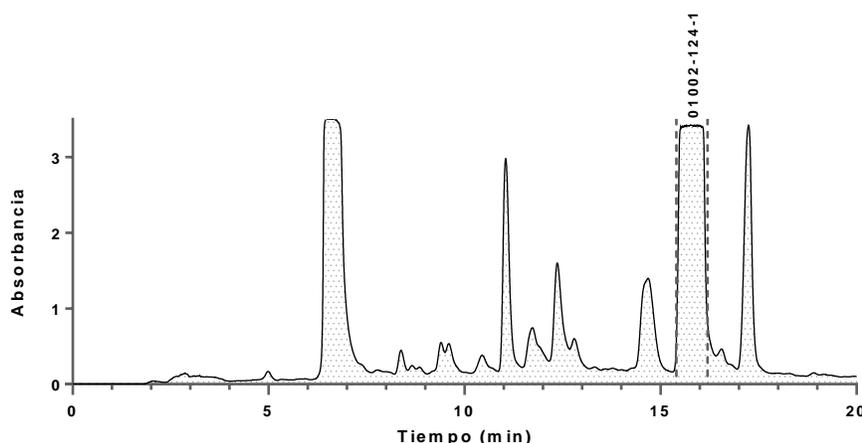


**Figura 17.** Cromatograma de la purificación de 01002-135-1 (**13**).

01002-135-1 (**13**): Sólido naranja, RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 2.10 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{COOR}$ ), 2.60 (3H, s, H-10'), 3.03 (3H, s, H-10), 4.82 (1H, d,  $J = 12.4$  Hz, H-1' $\beta$ ), 4.95 (1H, s, H-8'), 5.02 (1H, d,  $J = 12.4$  Hz, H-1' $\alpha$ ), 5.75 (1H, s, H-9'), 6.79 (1H, s, H-5), 6.97 (1H, s, H-5'), 7.64 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2''), 8.44 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3''), 8.60 (1H, s, H-1), 12.01 (1H, s, OH-4), 12.42 (1H, s, OH-4'); RMN- $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 21.0 ( $\text{CH}_3\text{COOR}$ ), 24.0 (C-10'), 25.6 (C-10), 48.3 (C-9'a), 63.6 (C-8'), 68.4 (C-1'), 84.6 (C-9'), 104.3 (C-3'a), 108.9 (C-3a), 115.1 (C-9a), 115.5 (C-6a), 116.8 (C-6'a), 119.7 (C-5), 121.2 (C-5'), 125.3 (C-2''), 127.7 (C-3''), 135.4 (C-3b), 139.2 (C-8), 141.3 (C-4'), 143.4 (C-1''), 146.0 (C-1), 148.2 (C-3'b), 150.2 (C-6), 152.9 (C-7), 153.9 (C-6'), 164.7 (C-4'), 164.9 (C-4), 165.1 (C-3), 167.6 (C-3'), 170.2 ( $\text{CH}_3\text{COOR}$ ), 177.8 (C-9), 189.5 (C-7') [**Figuras AI-33-A-35**]. EM-AR-AJS  $m/z$ : 635.1315 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (calcd. para  $\text{C}_{34}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_{11}$ , 635.1302, +2.0 ppm).

### 5.7.7 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-124-1 (**14**)

Aproximadamente 18.0 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con un exceso de 1,3-nitroanilina en DMSO a temperatura ambiente y en agitación magnética durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 18**), haciendo dos inyecciones de 100  $\mu$ L, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex<sup>®</sup> (C<sub>18</sub>) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico): un gradiente de 40%→100% de MeCN durante 20 minutos y 100% de MeCN durante 5 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de 01002-124-1 (**14**, 10.0 mg;  $t_R$  15.4 min).

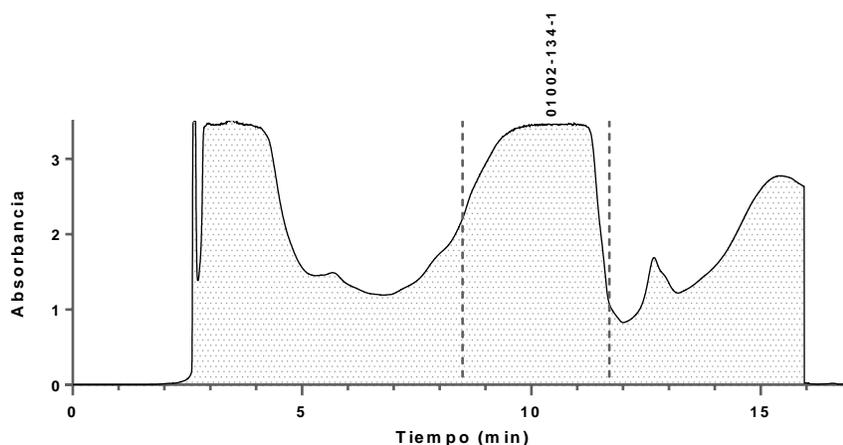


**Figura 18.** Cromatograma de la purificación de 01002-124-1 (**14**).

01002-124-1 (**14**): Sólido blanco-amarillo, RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  (ppm): 2.11 (3H, s, H-10), 2.24 (3H, s, CH<sub>3</sub>COOR), 2.74 (3H, s, H-10'), 3.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>OR), 4.04 (1H, s, H-8), 4.17 (1H, s, H-8'), 4.81 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz, H-1' $\beta$ ), 5.09 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz, H-1' $\alpha$ ), 5.25 (1H, s, H-9'), 6.64 (1H, s, H-5), 6.84 (1H, s, H-5'), 7.61 (1H, ddd,  $J = 8.0, 2.1, 1.0$  Hz, H-4''), 7.66 (1H, s, H-1), 7.77 (1H, t,  $J = 8.1$  Hz, H-5''), 8.22 (1H, t,  $J = 2.1$  Hz, H-2''), 8.39 (1H, ddd,  $J = 8.4, 2.2, 1.0$  Hz), 11.74 (1H, s, OH-4), 11.90 (1H, s, OH-4'); RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  (ppm): 21.1 (CH<sub>3</sub>COOR), 22.1 (C-10'), 22.6 (C-10), 51.8 (C-9'a), 51.9 (CH<sub>3</sub>OR), 64.1 (C-8), 68.0 (C-8'), 71.5 (C-1'), 78.6 (C-9'), 88.9 (C-7), 105.2 (C-3a), 107.1 (C-3'a), 113.0 (C-9a), 117.5 (C-6'a), 119.5 (C-5'), 120.8 (C-5), 121.9 (C-6a), 122.4 (C-2''), 124.5 (C-6''), 131.0 (C-1), 132.6 (C-4''), 134.1 (C-3''), 134.6 (C-3b), 139.1 (C-5''), 143.0 (C-3'b), 148.9 (C-1''), 150.2 (C-6'), 152.3 (C-6), 162.1 (C-4'), 164.4 (C-4), 164.7 (C-3), 167.6 (C-3'), 169.7 (CH<sub>3</sub>COOR), 191.1 (C-7'), 194.2 (C-9) [**Figuras AI-36-A-39**]. EM-AR-DART  $m/z$ : 667.1583 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>, 667.1564, +2.8 ppm).

#### 5.8.8 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de 01002-134-1 (**15**)

Aproximadamente 16.0 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con un exceso de 1,3-nitroanilina y 10  $\mu\text{L}$  de trietilamina (TEA) en DMSO a temperatura ambiente y en agitación magnética durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semi-preparativa (**Figura 19**), haciendo una inyección de 200  $\mu\text{L}$ , utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex<sup>®</sup> (C<sub>18</sub>) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico): un gradiente de 60%→100% de MeCN durante 30 minutos y 100% de MeCN durante 5 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de 01002-134-1 (**15**, 4.2 mg;  $t_R$  8.5 min).

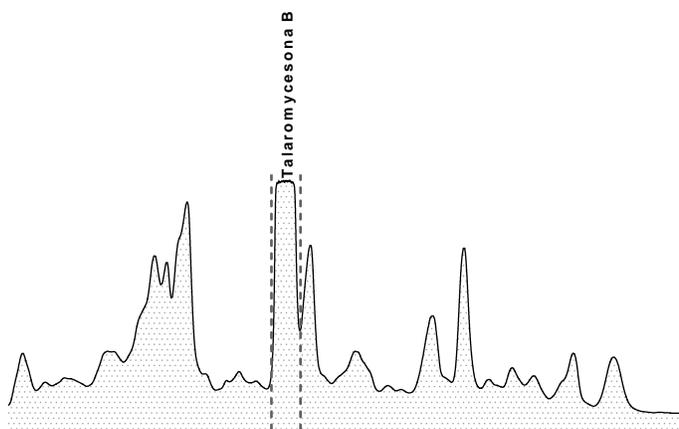


**Figura 19.** Cromatograma de la purificación de 01002-134-1 (**15**).

01002-134-1 (**15**): Sólido naranja, RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  (ppm): 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>COOR), 2.60 (3H, s, H-10'), 3.03 (3H, s, H-10), 4.82 (1H, d,  $J = 12.3$  Hz, H-1' $\beta$ ), 4.95 (1H, s, H-8'), 5.03 (1H, d,  $J = 12.4$  Hz, H-1' $\alpha$ ), 5.75 (1H, s, H-9'), 6.80 (1H, s, H-5), 6.97 (1H, s, H-5'), 7.76 (1H, dt,  $J = 8.0, 1.9$  Hz, H-4''), 7.80 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-5''), 8.35 (1H, t,  $J = 1.9$  Hz, H-2''), 8.42 (1H, dt,  $J = 7.8, 1.9$  Hz, H-6''), 8.62 (1H, s, H-1), 12.02 (1H, s, OH-4), 12.42 (1H, s, OH-4'); RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  (ppm): 21.0 (CH<sub>3</sub>COOR), 24.1 (C-10'), 25.6 (C-10), 48.3 (C-9'a), 63.6 (C-8'), 68.4 (C-1'), 84.6 (C-9'), 104.3 (C-3'a), 108.9 (C-3a), 115.1 (C-9a), 115.5 (C-6a), 116.8 (C-6'a), 119.7 (C-5), 121.2 (C-5'), 122.2 (C-2''), 124.8 (C-4''), 131.0 (C-5''), 132.4 (C-6''), 135.5 (C-3b), 139.2 (C-3''), 139.2 (C-1''), 141.5 (C-8), 146.0 (C-1), 148.9 (C-3'b), 150.1 (C-6), 152.9 (C-7), 153.9 (C-6'), 164.8 (C-4'), 164.9 (C-4), 165.1 (C-3), 167.6 (C-3'), 170.2 (CH<sub>3</sub>COOR), 177.8 (C-9), 189.5 (C-7') [**Figuras A1-40-A-42**]. EM-AR-AJS  $m/z$ : 635.1299 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>34</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>, 635.1302, -0.5 ppm).

#### 5.7.9 Semisíntesis, aislamiento, purificación e identificación de talaromycesona B (**2**)

Aproximadamente 30.0 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con 30  $\mu$ L de dietilentriamina en DMSO a 60°C en reflujo durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE (**Figura 20**) en modalidad semipreparativa, haciendo dos inyecciones de 100  $\mu$ L, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (C<sub>18</sub>) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico): un gradiente de 30%→80% de MeCN durante 30 minutos y 100% de MeCN durante 5 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de 01002-113-2 (5.1 mg;  $t_R$  16.0 min), el cual se identificó como talaromycesona B (**2**) por comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos con los reportados en la literatura.<sup>125</sup>



**Figura 20.** Cromatograma de la purificación de talaromycesona B (**2**).

Talaromycesona B (**2**): Sólido blanco-café, RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD)  $\delta_H$  (ppm): 2.03 (3H, s, CH<sub>3</sub>COOR), 2.54 (3H, s, H-10'), 2.91 (3H, s, H-10), 4.80 (1H, d,  $J = 1.04$  Hz, H-8'), 5.04 (1H, d,  $J = 12.4$  Hz, H-1' $\beta$ ), 5.16 (1H, d,  $J = 12.4$  Hz, H-1' $\alpha$ ), 5.85 (1H, sa, H-9'), 6.76 (1H, s, H-5'), 6.86 (1H, s, H-5); RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, MeOD)  $\delta_C$  (ppm): 20.6 (CH<sub>3</sub>COOR), 22.6 (C-10), 23.9 (C-10'), 50.2 (C-9'a), 62.2 (C-8'), 70.5 (C-1'), 88.2 (C-9'), 100.4 (C-3a), 104.8 (C-3'a), 117.5 (C-6a), 118.0 (C-6'a), 121.4 (C-5), 121.5 (C-5'), 132.7 (C-7), 133.5 (C-3b), 133.7 (C-9a), 136.6 (C-8), 137.4 (C-9), 148.1 (C-6), 148.2 (C-3'b), 154.6 (C-6'), 160.7 (C-4), 165.5 (C-4'), 167.2 (C-3), 169.4 (C-3'), 171.9 (CH<sub>3</sub>COOR), 192.5 (C-7') [**Figuras AI-1-A-4**]. EM-AR-AJS  $m/z$ : 503.0997 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>27</sub>H<sub>19</sub>O<sub>10</sub>, 503.0978, +3.8 ppm).

## 5.8 Evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio de compuestos puros sobre hPTP1B<sub>1-400</sub>.

El efecto de los compuestos puros sobre la actividad de la proteína fosfatasa de tirosina 1B de 400 aminoácidos de humano (*hPTP1B*<sub>1-400</sub>) se evaluó espectrofotométricamente en cajas de 96 pozos con un lector de placas Thermo Scientific® Multiskan FC ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) a 37°C. Para los ensayos se usó una solución de enzima *hPTP1B*<sub>1-400</sub> 3  $\mu\text{M}$  y una solución de sustrato (*p*-NPP) 3 mM en solución amortiguadora 50 mM HEPES, pH 6.8, 100 mM NaCl y 1.5 mM DTT. Para cada compuesto puro se prepararon soluciones stock en DMSO (1 mM). Subsecuentemente, alícuotas de 0, 2, 4, 6, 8 y 10  $\mu\text{L}$  (por triplicado) se incubaron por 10 minutos con 5  $\mu\text{L}$  de una solución enzimática de *hPTP1B*<sub>1-400</sub> (3  $\mu\text{M}$ ) en un volumen total de 90  $\mu\text{L}$ . Posterior a la incubación producto puro-enzima, se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución de sustrato y se registró la primera lectura de absorbancia ( $t = 0 \text{ min}$ ). Después, la mezcla de reacción se incubó por un periodo de 20 minutos a 37°C. Al término de este tiempo, se tomó una segunda lectura de absorbancia ( $t = 20 \text{ min}$ ). Para el control del equipo, así como para la adquisición, el manejo y manipulación de datos, se utilizó el software SkanIt, versión 5.0. El porcentaje de inhibición enzimática se calculó tomando en cuenta la corrección por la absorbancia del blanco (enzima sin inhibidor) de acuerdo con la **Ecuación 1** y se usó duclauxina como control positivo.

$$\% \text{Inhibición } hPTP1B_{1-400} = \left(1 - \frac{A_{405t}}{A_{405c}}\right) \times 100$$

### Ecuación 1

donde  $A_{405t}$  representa la absorbancia corregida de los compuestos puros ( $A_{405t_{final}} - A_{405t_{inicial}}$ ) y  $A_{405c}$  la absorbancia del blanco corregida ( $A_{405c_{final}} - A_{405c_{inicial}}$ ). La concentración de compuesto puro necesaria para inhibir el 50% de la actividad enzimática ( $CI_{50}$ ) se calculó mediante una regresión no lineal, empleando la ecuación de unión específica con coeficiente de Hill en el software GraphPad Prism 6.0.

## 5.9 Ensayos de interacción ligante-proteína por apagamiento de la fluorescencia intrínseca de *hPTP1B*<sub>1-400</sub>

Los espectros de fluorescencia de cada compuesto puro analizado se registraron en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Agilent®) a temperatura ambiente. El control del equipo y la adquisición de datos se realizó a través del software Scan, versión 1.2. La excitación de la proteína (0.5  $\mu\text{M}$ ), incubada en solución amortiguadora (50 mM HEPES, pH 6.8, 100 mM NaCl, 1.5 mM DTT) se realizó a 280 nm y el espectro de emisión se registró en un intervalo de 300-500 nm. El efecto de filtro interno debido a la absorción de los compuestos evaluados en las longitudes de onda de excitación y emisión se corrigió mediante el tratamiento de los datos de fluorescencia con la **Ecuación 2**, donde  $F_{cor}$  y  $F_{obs}$  son las intensidades de fluorescencia corregidas y medidas, respectivamente y  $A_{ex}$  y  $A_{em}$  son las diferencias de valores de absorbancia de

las muestras después de la adición del ligando en las longitudes de onda de excitación (280 nm) y de emisión (300-500 nm), respectivamente.

$$F_{cor} = F_{obs} 10^{\frac{(A_{ex} + A_{em})}{2}}$$

**Ecuación 2**

El grado de saturación de *h*PTP1B<sub>1-400</sub> con los compuestos evaluados y la  $K_d$  para los complejos ligando-*h*PTP1B<sub>1-400</sub> se calculó mediante una regresión no lineal, empleando la **Ecuación 3**, en donde  $F$  es la fluorescencia medida,  $F_0$  y  $F_c$  son la fluorescencia en ausencia del ligando y la proteína completamente saturada, respectivamente,  $[P]_t$  y  $[L]_t$  representan a la concentración total de proteína y la concentración total de ligando y  $K_d$  es la constante de disociación.

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} = \frac{[P]_t + [L]_t + k_d - \sqrt{([P]_t + [L]_t + k_d)^2 - 4[P]_t[L]_t}}{2[P]_t}$$

**Ecuación 3**

## 5.10 Estudios de acoplamiento molecular

### 5.10.1 Predicción de la estructura 3D de *h*PTP1B<sub>1-400</sub>

La estructura tridimensional de la *h*PTP1B<sub>1-400</sub> en formato .pdb se generó usando el servidor I-TASSER (<https://zhanglab.dcmdb.med.umich.edu/I-TASSER/>), una paquetería diseñada para el modelado de estructuras proteicas mediante simulaciones de comparación y ensamblaje iterativas y anotación de funciones basada en estructura. El protocolo I-TASSER se divide en cuatro etapas: comparación, ensamblaje de estructura, selección de modelo y afinamiento y anotación funcional basada en estructura. La precisión del modelo se midió usando C-score.

### 5.10.2 Preparación de proteínas y ligandos para estudios de acoplamiento molecular

Las coordenadas de la estructura proteica fueron tomadas del modelo homologado de *h*PTP1B<sub>1-400</sub>, al cual se le asignaron hidrógenos polares y cargas (de Kollman), usando AutoDockTools (ADT) 1.5.6. Los archivos se guardaron en formato .pdbqt para su uso en las interfaces AutoGrid 4.0 y AutoDock 4.0 (<http://autodock.scripps.edu/>). Todos los compuestos estudiados se construyeron y optimizaron en el software Spartan 10 en un método semiempírico, empleando un campo de fuerza AM1. Después, los ligandos se prepararon con la adición de hidrógenos no polares y la asignación de cargas atómicas de Gasteiger-Marsilli, en el programa Autodock 4.0, usando la interfaz gráfica ADT 1.5.6.

### 5.10.3 Acoplamiento molecular y validación.

La predicción de conformaciones accesibles por los ligandos se realizó en el programa AutoDock 4.0, empleando un algoritmo Genético Lamarckiano (LGA). Inicialmente, los protocolos de docking se validaron para garantizar la veracidad de los datos, para ello se usó pNPP como sonda de prueba para certificar las simulaciones generadas para *hPTP1B*<sub>1-400</sub>. Posteriormente, se realizó un estudio de acoplamiento molecular ciego para cada ligando en una región de búsqueda (grid) de 126 × 126 × 126 puntos centrados en la proteína con 0.5 Å de separación entre estos. Todas las simulaciones se realizaron con un LGA y 100 corridas. Los resultados se analizaron utilizando la interfaz ADT 1.5.6 (análisis por agrupamiento) y PyMOL 2.4.0.

### 5.11 Cálculos de dinámica molecular

Todas las simulaciones se ejecutaron en el software Amber 16 de dinámicas moleculares, empleando el campo de fuerza *ff14SB*. Las coordenadas del modelo homologado generado para *hPTP1B*<sub>1-400</sub>, así como las coordenadas de los ligandos obtenidos de estudios de acoplamiento molecular con este modelo se procesaron con Antechamber, con el objetivo de generar las topologías apropiadas para el módulo LEaP. Subsecuentemente, se usó el módulo LEaP para reducir, neutralizar (mediante la adición aleatoria de 11 Na<sup>+</sup> contraiones) e incorporar al sistema en una caja octahédrica truncada llena de agua con un segmento en cada lado de 10 Å, usando el modelo de solvatación TIP3BOX. Las simulaciones se corrieron bajo condiciones de frontera periódicas. El sistema (complejo proteína-ligante y disolvente) se relajó empleando un gradiente conjugado de minimización seguido de calentamiento NVT y equilibrio NPT usando dinámicas Langeviniana. La producción de las dinámicas moleculares se corrió durante 50 ns a 300 K. Los marcos se guardaron a intervalos de 4 ps para análisis subsecuentes. Los análisis RMSD y RMSF fueron conducidos con CPPTRAJ en la trayectoria.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo se desarrolló como parte de un proyecto de investigación que se propone optimizar la estructura de fenalenonas diméricas que sean capaces de inhibir, de manera específica y potente, la actividad enzimática de *hPTP1B*<sub>1-400</sub>. El estudio inició con la obtención de un conjunto de microorganismos a partir de una muestra de suelo de montículo de hormiguero colectada junto al río de la región Atlalco, que pertenece a Xochiatipan (municipio de la huasteca hidalguense). Subsecuentemente, los microorganismos se cultivaron en diferentes medios de cultivo (arroz y Cheerios®) para determinar las mejores condiciones para la biosíntesis de metabolitos secundarios. Tras la fermentación se prepararon los extractos orgánicos y se evaluó su actividad como inhibidores de la enzima *hPTPB*<sub>1-400</sub>. Siguiendo este procedimiento, se seleccionó el cultivo en Cheerios® de la especie fúngica IQ-313 para su estudio químico, tomando en cuenta su potencial inhibitorio. Este aislamiento se caracterizó mediante métodos moleculares como *Talaromyces* sp.

El estudio químico biodirigido de la cepa IQ-313 permitió el aislamiento de cuatro fenalenonas diméricas, caracterizadas como duclauxina (**1**), talaromycesosna B (**2**) xenoclauxina (**3**) y bacillisporina G (**4**), por comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los reportados en la literatura.<sup>16</sup> Todos los productos se evaluaron como inhibidores de *hPTP1B*<sub>1-400</sub> y en algunos casos se estableció el mecanismo y constante de inhibición ( $K_i$ ) mediante estudios de cinética enzimática. El hallazgo de duclauxina (**1**) como inhibidor de la enzima *hPTP1B*<sub>1-400</sub> motivó la búsqueda de análogos biosintéticos y semisintéticos de este metabolito; en este sentido, en este trabajo se aplicaron estrategias de manipulación de las condiciones de cultivo del microorganismo (*One Strain Many Compounds*, OSMAC) y de síntesis parcial (dirigidas por estudios de acoplamiento molecular) para incrementar el espacio químico y mejorar las propiedades biológicas de inhibición. La aplicación de esta estrategia permitió generar información valiosa sobre el metabolismo del microorganismo *Talaromyces* sp. IQ-313, la reactividad química de duclauxina (**1**) y las propiedades químico-biológicas de fenalenonas diméricas como ligantes inhibidores de *hPTP1B*<sub>1-400</sub>.

### 6.1 Estrategia general seguida para la generación de análogos de duclauxina

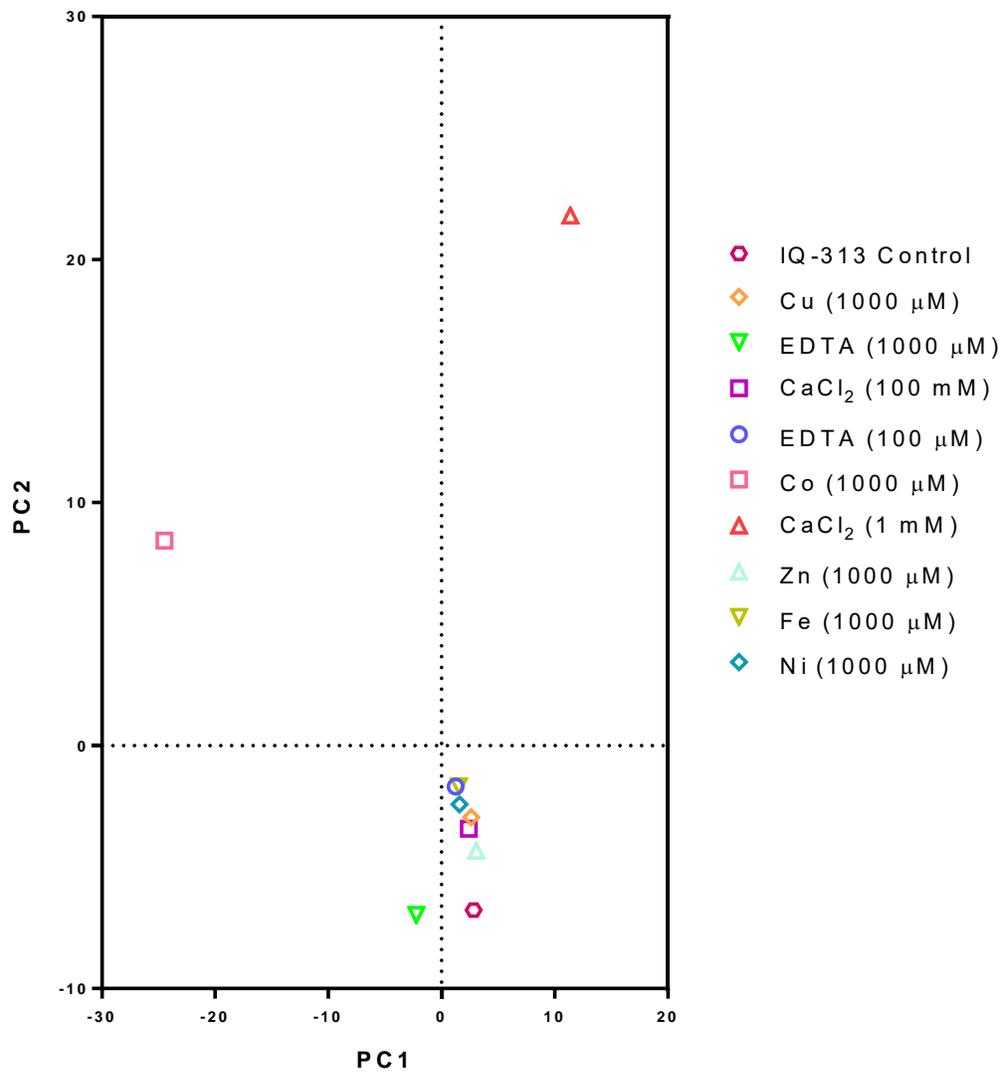
#### 6.1.1 Exploración del potencial biosintético de *Talaromyces* sp. IQ-313 como productor de fenalenonas dimericas tipo duclauxina (**1**)

La metodología OSMAC ha demostrado ser una herramienta sencilla y poderosa para explorar con detalle el metaboloma de microorganismos (bacterias y hongos microscópicos), al activar la expresión de clústeres biosintéticos silenciados que con frecuencia conducen al descubrimiento de nuevas entidades químicas.

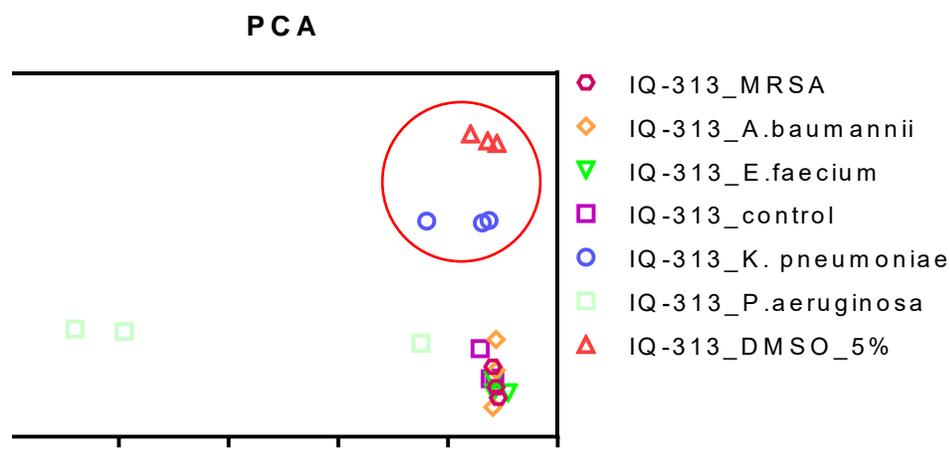
Esta estrategia consiste en modificar la composición del medio de crecimiento de un microorganismo, ya sea por cambios en el contenido de C/N, pH, temperatura, salinidad, concentración de iones metálicos, oxigenación, iluminación, la adición de inhibidores enzimáticos, modificadores epigenéticos, precursores biosintéticos, o por el cultivo con otras especies. De acuerdo con Pan y colaboradores (2019),<sup>11</sup> hasta 2018 se habían reportado aproximadamente 500 nuevas entidades químicas aisladas de bacterias y hongos cultivados en condiciones diferentes a las estándar.

En este contexto, para explorar el potencial biosintético del aislamiento IQ-313 como productor de análogos de duclauxina (**1**), el microorganismo se cultivó bajo distintas condiciones, tanto en fermentación axénica (modificando la concentración de iones metálicos, por adición de sales o agentes quelantes o por adición de modificadores epigenéticos) como mixta (co-cultivos con bacterias y microorganismos fúngicos), de acuerdo con lo indicado en la **Tabla 2** de la sección 5.1.

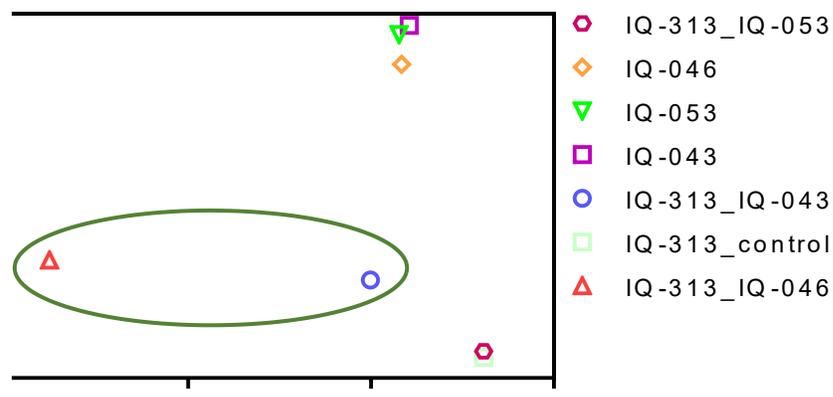
Todos los extractos generados del cultivo de IQ-313 fermentado en diferentes condiciones se analizaron por cromatografía de líquidos o cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas y los datos obtenidos se analizaron visualmente, por PCA o a través de la plataforma GNPS para generar redes moleculares. El análisis por PCA de los extractos obtenidos de la fermentación de IQ-313 con distintos metales de transición y agentes quelantes, permitió descartar los extractos generados del cultivo con  $\text{Cu}^{2+}$ , EDTA (100  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CaCl}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ), Zn,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , ya que no se observaron diferencias significativas en los perfiles metabólicos con respecto al cultivo axénico de *Talaromyces* sp. IQ-313 (**Figura 21**). De la misma manera, el análisis de componentes principales de las fermentaciones mixtas de *Talaromyces* sp. IQ-313 con distintas cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *E. faecium*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) y DMSO, permitió seleccionar el extracto obtenido de la fermentación mixta con *K. pneumoniae* y en presencia de DMSO para su estudio químico, ya que se localizan en coordenadas distintas al resto de los cultivos (**Figura 22**). El resto de los co-cultivos se descartaron por su similitud con el perfil metabólico de la cepa fúngica en cultivo axénico. Si bien, el cultivo con *P.aeruginosa* presenta un perfil metabólico distinto al del cultivo axénico de *Talaromyces* sp. IQ-313, esta diferencia se atribuye al perfil metabólico de la cepa bacteriana, que después de 21 días de fermentación inhibió el crecimiento de la cepa fúngica. Por último, el PCA hecho para los experimentos de fermentación mixta hongo-hongo, seleccionó a los co-cultivos IQ-313/IQ-043 y IQ-313/IQ-046 como los de mayores diferencias en su perfil metabólico respecto al resto de los cultivos, respaldando lo observado por análisis CLAE-UV (**Figura 23**).



**Figura 21.** Análisis de componentes principales que ubica al extracto de IQ-313 en presencia de EDTA (1000 μM), del ion Co (1000 μM) y CaCl<sub>2</sub> (1 mM) en coordenadas distintas al resto de los experimentos.



**Figura 22.** Análisis de componentes principales que ubica al extracto de IQ-313\_ *K. pneumoniae* y al extracto del experimento IQ-313 en presencia de 5% de DMSO en coordenadas distintas al resto de los experimentos.



**Figura 23.** Análisis de componentes principales que ubica al extracto de fermentación mixta IQ-313/IQ-043 y IQ-313/IQ-046 en coordenadas distintas al resto de los experimentos.

## 6.2 Redes moleculares generadas en GNPS

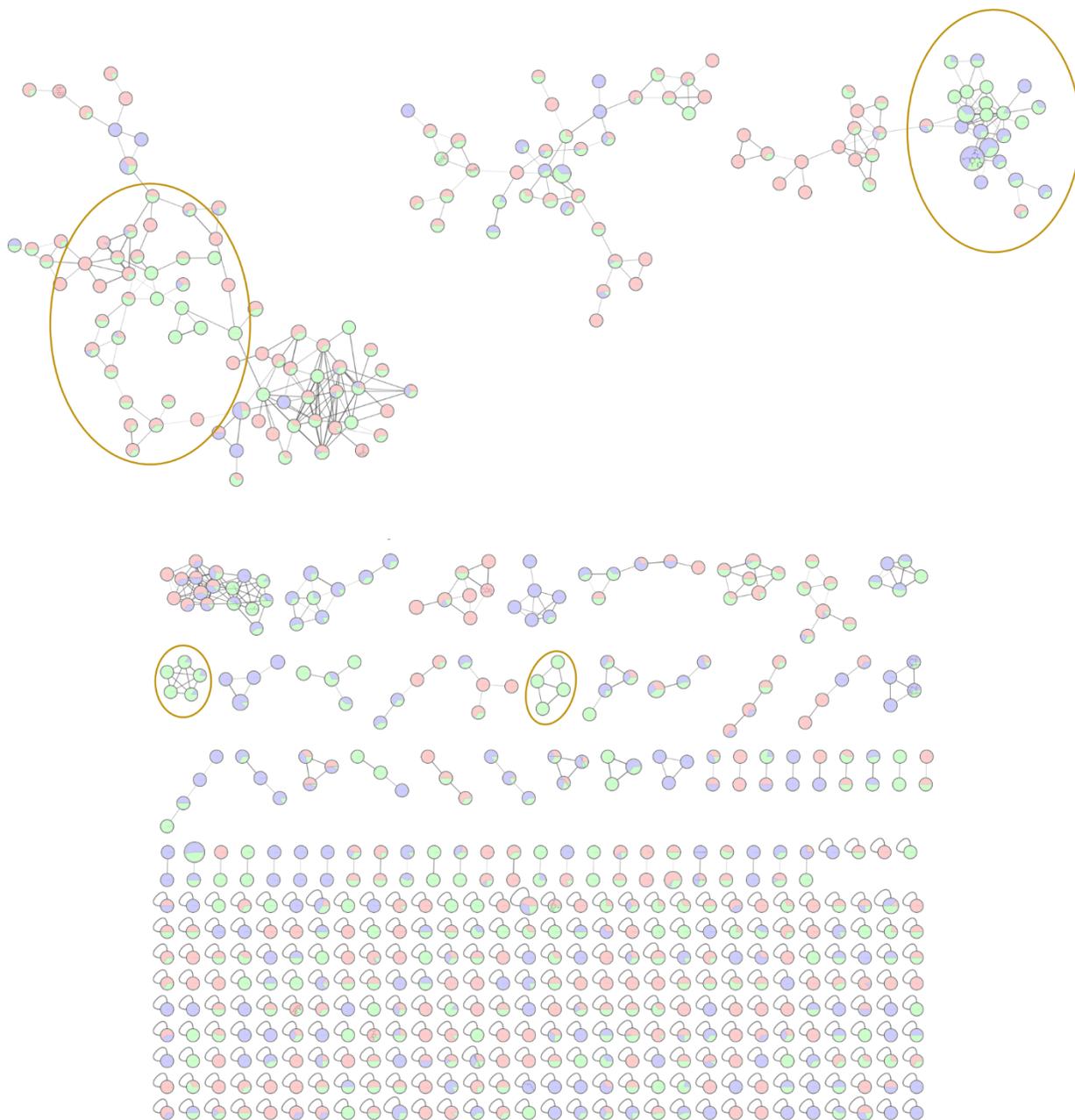
A partir de los criterios de rendimiento y de PCA, se seleccionó al experimento de fermentación mixta *Talaromyces* sp. IQ-313-*Aspergillus* sp. IQ-043 para un estudio químico más profundo. Para ello, el extracto se analizó en la plataforma GNPS, primero en la modalidad de Análisis Clásico con el objetivo de explorar con mayor detalle el espacio químico y posteriormente en la modalidad de análisis avanzado de redes moleculares basadas en características (FBMN) con el fin de descartar artefactos y distinguir isómeros. En las redes moleculares que a continuación se presentan (**Figuras**

24-27), los nodos representan espectros MS/MS que se conectan basándose en su similitud espectral (coseno > 0.7). Los tamaños de los nodos indican la abundancia estimada a partir del conteo espectral.<sup>15</sup>

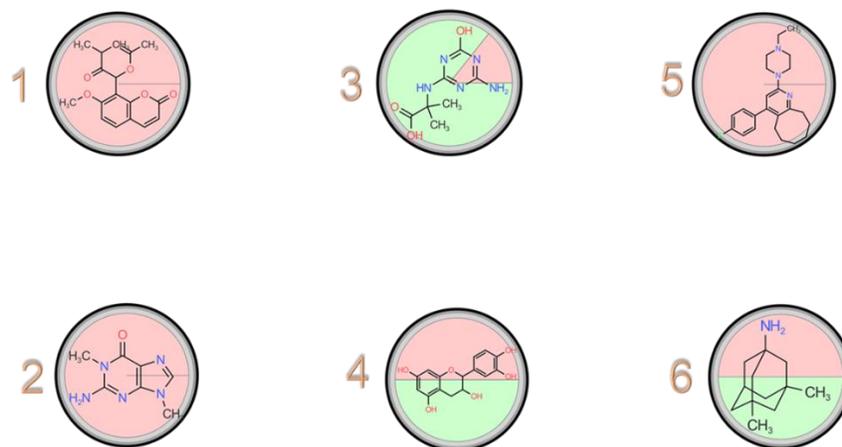
En las redes moleculares generadas por análisis clásico (**Figura 24**) se observó la presencia de grupos de nodos que pertenecen exclusivamente al experimento de fermentación mixta (nodos color verde) y no de cultivos axénicos, lo cual indica que, en esta condición, alguno de los dos hongos involucrados produce metabolitos secundarios en cantidades detectables por espectrometría de masas, probablemente a causa de la activación de BGCs que en cultivo axénico se encontrarían silenciados. Además, algunos nodos de co-cultivo muestran conexiones con los nodos de cultivo axénico (rojo claro y azul, asociados a IQ-313 e IQ-043, respectivamente), lo cual da cuenta de la probable relación estructural que guardan estos grupos de metabolitos secundarios.

Asimismo, la comparación de los espectros de masas con las bases de datos de GNPS permitió identificar diversos compuestos (probables análogos de los depositados en las bases de datos) que IQ-313 produce en condiciones de cultivo axénico (**Figuras 25-1, 2, 5**), o tanto en fermentación mixta como axénica (**Figuras 25-3, 4, 6**). Incluso, se observó que uno de estos metabolitos secundarios se produce en mayor cantidad en condición de fermentación mixta: ácido 2-[(6-amino-4-oxo-1H-1,3,5-triazin-2-il)amino]-2-matrilpropanoico (**Figura 25-3**), cuya abundancia relativa se puede apreciar por el área que ocupa cada color en el nodo.

Cabe destacar la identificación hecha de uno de los análogos del compuesto blonasenina (**Figura 25-5**), con un puntaje del coseno de 0.87, que se encuentra presente en cultivo axénico de *Talaromyces* sp. IQ-313, ya que dicho compuesto (también conocido bajo el nombre comercial de Lonasen<sup>®</sup>) se aprobó en Japón en el 2008 para su uso como antipsicótico (atípico) de segunda generación.<sup>126,127</sup> Del mismo modo, con un puntaje del coseno de 0.85, se identificó un análogo de memantina (**Figura 25-6**), fármaco aprobado por la FDA en 2013 (también conocido por el nombre de Namenda<sup>®</sup>) para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que actúa como antagonista del receptor N-metil-D-aspartato.<sup>128,129</sup>



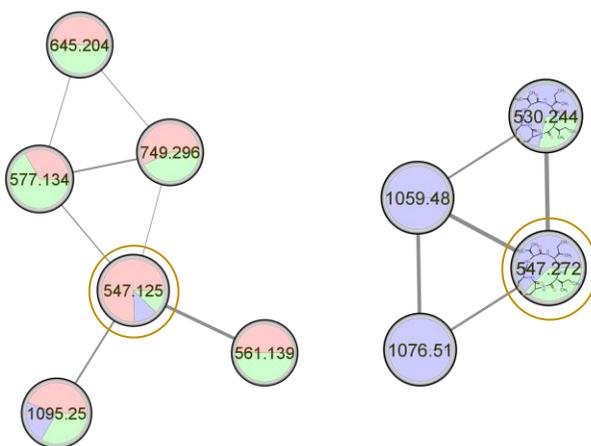
**Figura 24.** Espacio químico observado en experimentos de fermentación mixta entre IQ-313 (*Talaromyces* sp.) e IQ-043 (*Aspergillus* sp.). Los nodos en color rojo claro corresponden a extracto de IQ-313, los azules al extracto de IQ-043 y los verdes al extracto de co-cultivo *Talaromyces* sp.-*Aspergillus* sp.



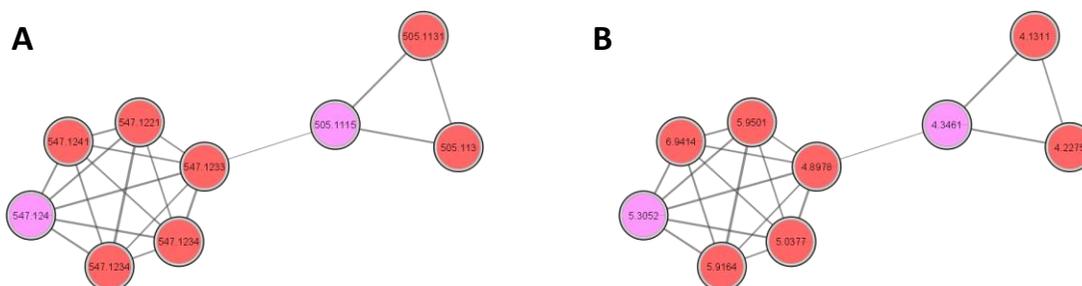
**Figura 25.** Derreplicación de compuestos presentes en extracto de *Talaromyces* sp. (rojo claro) y de co-cultivo *Talaromyces* sp.-*Aspergillus* sp. a partir del alineamiento de espectros de masas en tándem con aquellos depositados en las bases de datos de la plataforma GNPS.

Por otro lado, por análisis clásico se identificaron supuestos análogos de duclauxina (**1**) ( $m/z$  de ion precursor = 547.1240), que además se lograron distinguir, por el patrón de fragmentación de los análogos de un péptido producido por IQ-043 *Aspergillus* sp. que tiene la misma masa (**Figura 27**). No obstante, para hacer un análisis más fino y descartar la existencia de artefactos (generados por los distintos picos de fragmentación de un mismo ion precursor) y discernir entre isómeros, se generó una red molecular basada en análisis FBMN<sup>114</sup> (**Figura 27**), en la cual se identificó la presencia de al menos dos compuestos que se producen exclusivamente en fermentación mixta: uno que es análogo estructural de dulauxina (**1**) y de hecho es isobárico respecto a esta misma (pero eluye en un tiempo de retención distinto) y otro que tiene 42 unidades menos respecto al anterior, probablemente a causa de la pérdida del grupo acetato.

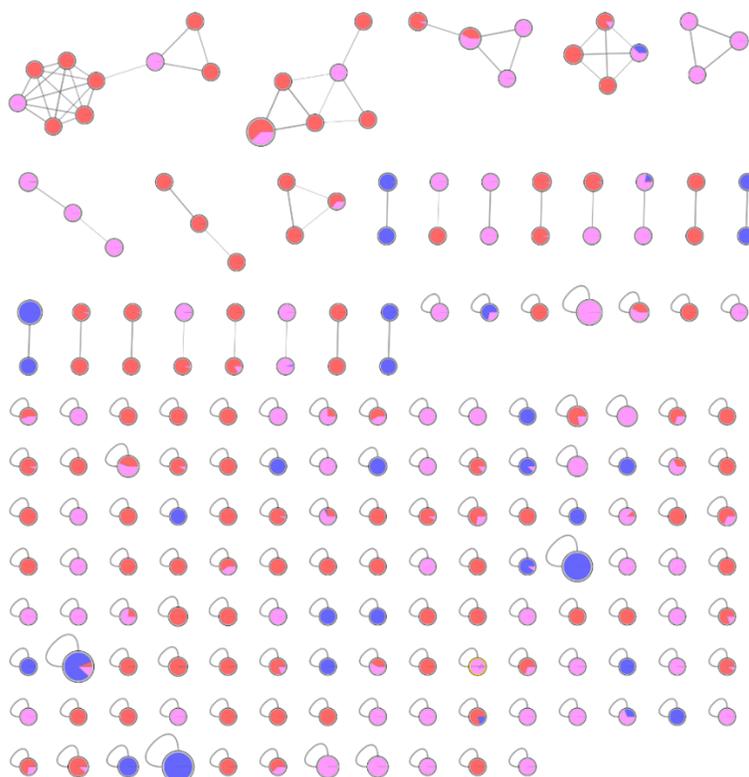
Adicionalmente y en comparación con el análisis clásico, con el análisis FBMN se hallaron más compuestos (como grupos de análogos pertenecientes a una misma clase química o como nodos aislados), que se produjeron únicamente bajo fermentación mixta (**Figura 28**) y cuya abundancia relativa se estimó a partir del área del pico (estimación más precisa que la del conteo espectral y calculada a partir del procesamiento de espectros en MZmine2<sup>114,130</sup>) y se representó en proporción al tamaño del nodo, constatando la utilidad de emplear a la estrategia OSMAC como herramienta para explotar el potencial biosintético de los microorganismos fúngicos.



**Figura 26.** Distinción de compuestos isobáricos y agrupamiento con análogos en análisis clásico. Los nodos color rojo claro corresponden a extracto de IQ-313, los morados a extracto de IQ-043 y los verdes a co-cultivo de IQ-313/IQ-043. Al centro del nodo se muestra la masa del ion precursor y estructura molecular hallada por alineamiento en las bases de datos (si aplica).



**Figura 27.** Distinción de compuestos isobáricos, por análisis FBMN, que se conectan por similitudes en su patrón de fragmentación (se agrupan como probables análogos), pero se distinguen por la forma del pico en el cromatograma y tiempos de retención. En los nodos de la primera red se muestra la masa del ion precursor (**A**) y en la segunda se muestra el tiempo de retención (**B**). Los nodos de color rojo y rosa corresponden con IQ-313 y co-cultivo IQ-313/IQ-043, respectivamente.

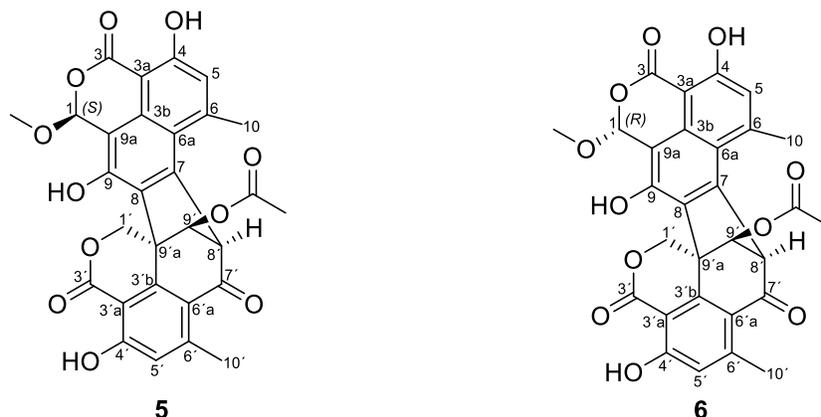


**Figura 28.** Red molecular completa del análisis de los experimentos *Talaromyces* sp. IQ-313 (nodos rojos), *Aspergillus* sp. IQ-043 (nodos azules) y fermentación mixta (nodos rosas) de IQ-313/IQ-043, generada por análisis FBMN.

## 6.2 Estudio químico de la fermentación mixta *Talaromyces* sp. IQ-313/*Aspergillus* sp. IQ-043

Con base en los resultados obtenidos del análisis de redes moleculares para la fermentación mixta de *Talaromyces* sp. IQ-313/*Aspergillus* sp. IQ-043, se seleccionó este extracto para separar los posibles análogos de duclauxina (**1**) detectados. El fraccionamiento dirigido por análisis de los perfiles cromatográficos de las distintas fracciones generadas, condujo al aislamiento de dos fenalenonas diméricas caracterizadas como bacillisporina F (**5**) y 1-*epi*-bacillisporina F (**6**). La caracterización de los compuestos aislados se realizó a través del uso de técnicas espectroscópicas (RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC) y espectrométricas (EM-AR-DART y EM-AR-AJS). La comparación de datos espectroscópicos con aquellos reportados en la literatura confirmó la estructura de los productos aislados. Las bacillisporina F (**5**) y 1-*epi*-bacillisporina F (**6**) son similares en estructura a duclauxina (**1**), difiriendo únicamente en la incorporación de un grupo metoxilo en C-1, la pérdida del grupo metoxilo en C-7 y la tautomerización de la cetona en C-9 al enol correspondiente.

### 6.2.1 Elucidación estructural de los productos 5 y 6



El compuesto **5** se aisló como un sólido amarillo. La fórmula molecular se determinó por espectrometría de masas de alta resolución como  $C_{29}H_{22}O_{11}$  (EM-AR-AJS,  $m/z$  547.1248 calcd. para  $C_{29}H_{23}O_{11}$ , 547.1235,  $\Delta = +2.4$  ppm), indicando un índice de deficiencia de hidrógenos de 19. El análisis de RMN de  $^1H$  en  $CDCl_3$  indicó la presencia de tres protones fenólicos [ $\delta_H$  11.87 (OH-4), 11.58 (OH-4') y 7.43 (OH-9)], cuatro metilos, un metileno, cinco metinos (dos  $sp^2$  y tres  $sp^3$ ) (**Cuadro 1**). Por otra parte, el espectro de RMN- $^{13}C$  identificó 29 átomos de carbono, incluyendo 20 carbonos cuaternarios  $sp^2$  y nueve  $sp^3$  (**Cuadro 1**), en concordancia con la fórmula molecular calculada. Estos datos corresponden con los reportados en la literatura para la bacillisporina F (**5**).<sup>123</sup> Por su parte, el compuesto **6** se aisló como un sólido café. Su fórmula molecular se determinó por EM-AR-AJS como  $C_{29}H_{22}O_{11}$ , indicando un índice de insaturación de 19 (EM-AR-AJS,  $m/z$  547.1260 calcd. para  $C_{29}H_{23}O_{11}$ , 547.1235,  $\Delta = +4.6$  ppm). Los datos de resonancia magnética de protón mostraron como única diferencia entre **5** y **6**, el desplazamiento químico del grupo metoxilo en  $CDCl_3$  ( $\delta_H$  3.74 en **5** contra 3.80 en **6**) así como el metino en C-1 ( $\delta_H$  6.57 en **5** y 6.50 en **6**) (**Cuadro 1**). Esta información permitió determinar que el compuesto **6** es el epímero de la bacillisporina F, identificado como 1-*epi*-bacillisporina F en la literatura<sup>123</sup>.

Las bacillisporinas F (**5** y **6**) se aislaron previamente de la fermentación en arroz de *Talaromyces stipitatus*. En este trabajo se determinó la configuración absoluta de ambos epímeros en C-1 usando métodos computacionales, incluyendo cálculos de dicroísmo circular electrónico (DCE) y desplazamientos químicos de  $^1H$  y análisis estadístico DP4. Adicionalmente, en este estudio se evaluó el potencial antimicrobiano de bacillisporina F (**5**), sin embargo, el producto no mostró actividad significativa.<sup>123</sup> En este trabajo de investigación las bacillisporinas no se detectaron en el cultivo axénico de *Talaromyces* sp. IQ-313, indicando que estos productos son el resultados de la activación de un posible gen biosintético, la participación de alguna enzima producida por la cepa *Aspergillus* sp. IQ-043 o por la acción como catalizador de algún metabolito secundario

de IQ-043 que promueva la adición del grupo metoxilo en la posición C-1. Cabe destacar que los epímeros de bacillisporina F (**5** y **6**) se pueden generar por la adición de MeOH en C-1 por la cara *Si* o *Re* del doble enlace en presencia de una base. Por ello, es necesario comprobar si estas moléculas se pueden considerar productos naturales o en realidad son productos generados durante el proceso de fermentación o de aislamiento.

**Cuadro 1.** Datos espectroscópicos para los productos **5** y **6** adquiridos en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H 700 MHz, <sup>13</sup>C 175 MHz).

Posición	<b>5</b>		<b>6</b>	
	$\delta_c$	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)
1	100.2	6.57, s	100.4	6.50, s
3	168.1		168.0	
3a	97.1		97.2	
3b	131.6		131.6	
4	164.2		164.1	
5	120.9	6.94, s	120.9	6.94, s
6	146.7		146.6	
6a	119.6		119.6	
7	139.6		139.5	
8	130.8		130.7	
9	150.2		150.1	
9a	109.1		109.1	
10	25.5	3.01, s	25.5	3.00, s
OH-4		11.87, s		11.86, s
OH-9		7.43, s		7.56, s
OCH <sub>3</sub>	56.7	3.74, s	56.9	3.80, s
1'α	69.6	5.03, d (10.5)	69.4	5.11, d (12.4)
1'β		4.96, d (12.4)		4.95 (12.5)
3'	167.6		167.6	
3'a	103.3		103.2	
3'b	146.2		146.5	
4'	165.0		165.0	
5'	121.7	6.83, s	121.6	6.82, s
6'	154.8		154.7	
6'a	117.3		117.2	
7'	190.2		190.3	
8'	62.1	5.06, s	62.0	5.08, s
9'	85.7	5.80, s	85.8	5.80, s
9'a	49.3		49.3	
10'	24.1	2.60, s	24.1	2.59, s
OAc	170.3		170.3	
OAc	21.0	2.04, s	21.0	2.06, s
OH-4'		11.58, s		11.60, s

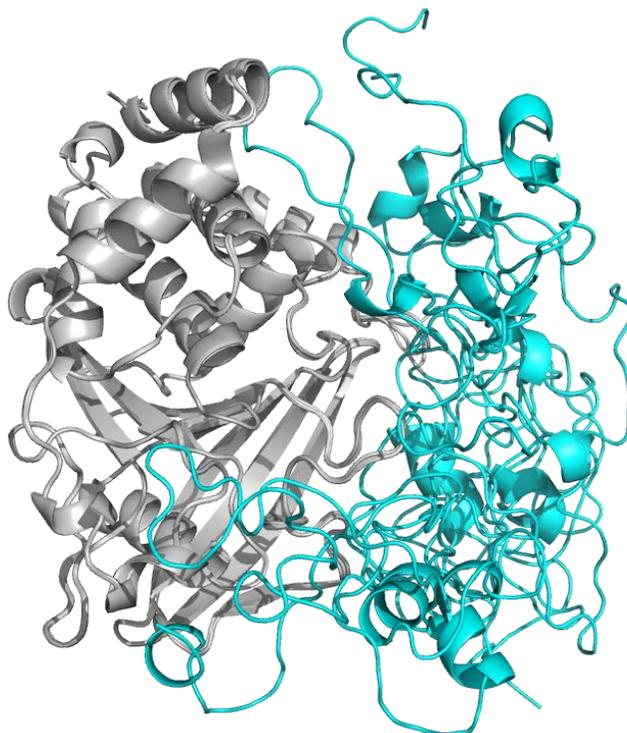
Desplazamientos químicos ( $\delta$  en ppm).

### 6.3 Síntesis parcial de análogos de duclauxina (1)

Si bien el cultivo de *Talaromyces* sp. IQ-313 bajo diferentes condiciones de fermentación condujo a la obtención de dos fenalenonas diméricas (**5** y **6**) previamente no detectadas en el cultivo axénico del microorganismo, el procedimiento consume cuantiosos recursos humanos. Por ello, para incrementar el espacio químico de fenalenonas diméricas basadas en duclauxina (**1**), se abordó una estrategia de semisíntesis (reacciones de un paso) dirigida por estudios de acoplamiento molecular con un modelo homologado para la proteína hPTP1B<sub>1-400</sub>.

#### 6.3.1 Modelado por homología de la estructura terciaria de hPTP1B<sub>1-400</sub>

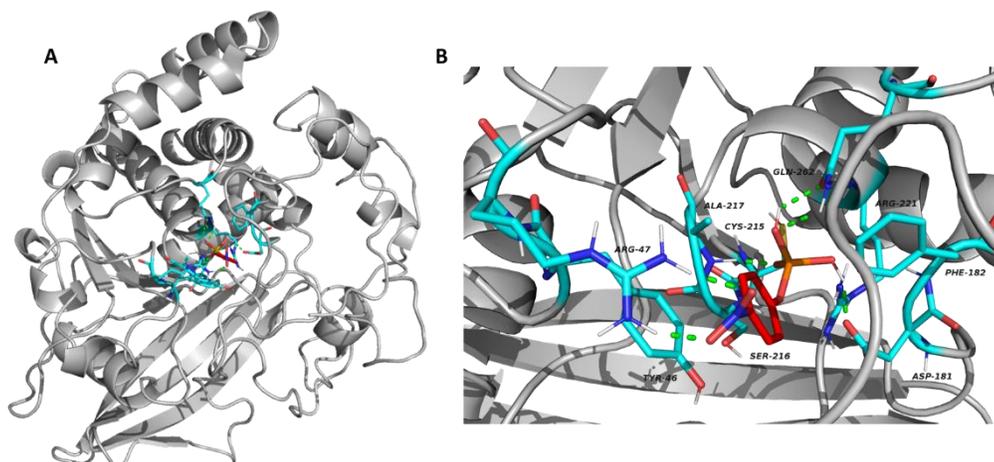
Hasta diciembre de 2020 se habían reportado el *Protein Data Bank* (PDB) alrededor de 260 PTP1Bs de diferentes longitudes que van de 297 hasta 321 aminoácidos; sin embargo, hasta el momento no existe una estructura cristalográfica de la estructura completa (hPTP1B<sub>1-400</sub>). Una de las razones principales es que la región del dominio C-terminal (segmento no catalítico, residuos 300-393) se encuentra altamente desestructurada. Con el propósito de obtener información sobre la estructura de la proteína y dirigir la síntesis parcial de análogos de duclauxina (**1**) que inhiban a la proteína, se construyó un modelo por homología usando el servidor I-TASSER.<sup>131-133</sup> Esta plataforma permite construir modelos 3D para estructuras proteicas sin reportes cristalográficos en el PDB. El modelo 3D de hPTP1B<sub>1-400</sub> se ensambló usando nueve estructuras tipo con identidades mayores al 99 %. Siguiendo el protocolo de I-TASSER el servidor generó cinco modelos (**Figura 29**). La precisión de los modelos se midió empleando la puntuación C (valor de confianza del modelo) que fluctuaron entre -2.19 y -2.88. Adicionalmente, la estereoquímica de cada modelo se revisó con el servidor PROCHECK.<sup>134,135</sup> Los resultados de este análisis permitieron seleccionar el modelo 1 (valor de C -2.19) como el más apropiado para continuar con los estudios moleculares de interacción ligante-proteína, ya que 99.7% de los aminoácidos de la proteína se ubicaron en las regiones favorecidas y permitidas del gráfico de Ramachandran. Estos valores son comparables con estructuras cristalográficas, por lo tanto, el modelo generado tiene la calidad apropiada para ser usado en análisis posteriores.



**Figura 29.** Modelos generados por homología para la proteína  $hPTP1B_{1-400}$  a través de la plataforma I-TASSER.

### 6.3.2 Estudios de acoplamiento molecular de derivados semisintéticos de duclauxina (**1**) frente a $hPTP1B_{1-400}$

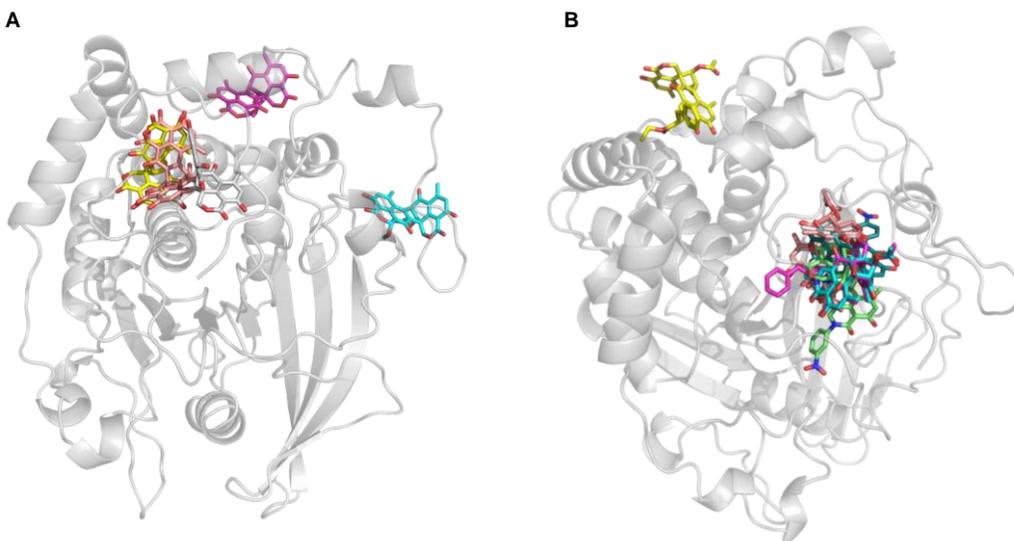
Con el propósito de guiar la síntesis parcial de análogos de duclauxina (**1**) con propiedades inhibitorias sobre  $hPTP1B_{1-400}$ , se realizaron estudios de acoplamiento molecular. Antes de realizar cualquier cálculo con las estructuras de los análogos propuestos, el protocolo de acoplamiento se validó a través de la predicción del sitio de unión del sustrato (fosfato de *p*-nitrofenilo, pNPP) usado en los ensayos de inhibición de esta proteína. Los resultados de esta validación indicaron que el software empleado para realizar las predicciones (AutoDock) y el protocolo predicen satisfactoriamente el sitio de unión de los ligantes, ya que pNPP se une en el sitio catalítico de la enzima en una conformación apropiada para la hidrólisis del grupo fosfato (**Figura 30**).



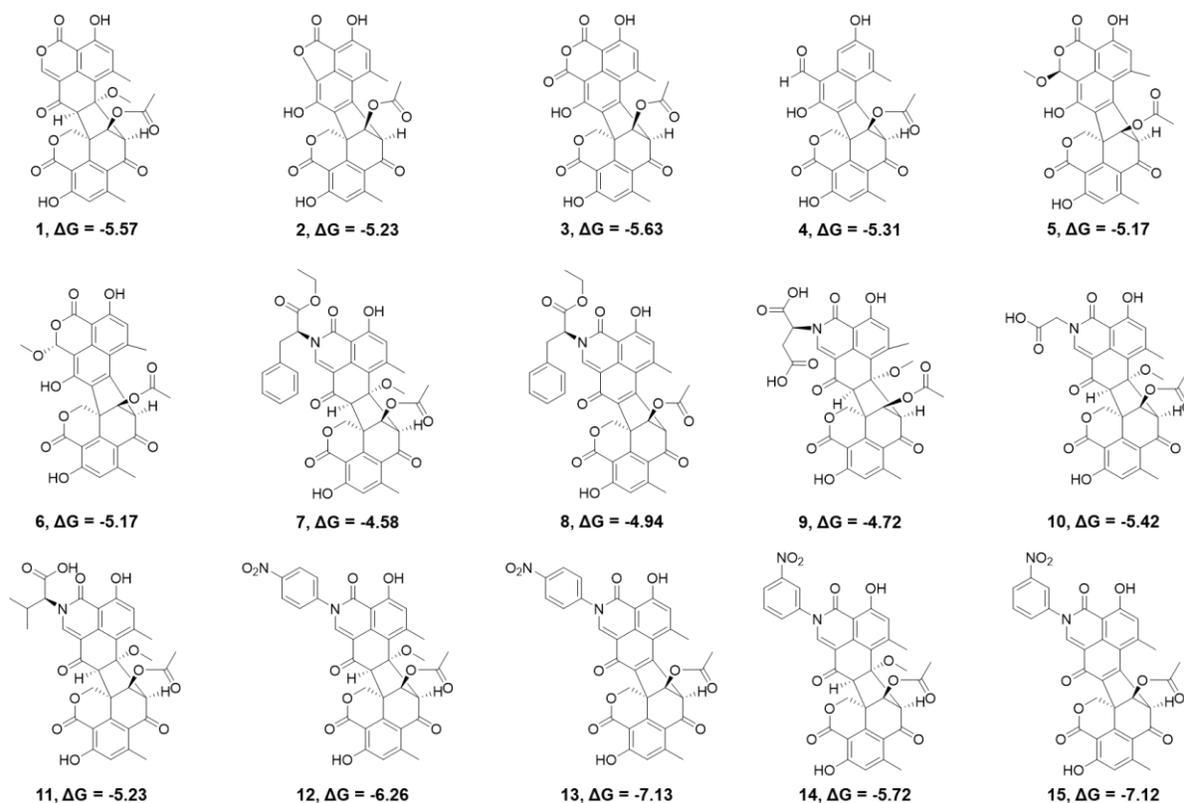
**Figura 30.** **A)** Acoplamiento molecular del sustrato pNPP con el modelo generado por homología para *hPTP1B*<sub>1-400</sub>. **B)** Sitio de unión predicho por AutoDock 4.0 para el pNPP. La figura muestra la participación de los residuos cisteína 215, aspartato 181 y arginina 221 en la interacción del sustrato con la enzima.

Una vez validado el protocolo de acoplamiento molecular, se propusieron una serie de posibles ligantes de *hPTP1B*<sub>1-400</sub> y se realizaron estudios de acoplamiento molecular (**Figura 31**). Los resultados de estas predicciones indicaron que, en su mayoría, tanto las fenalenonas de origen natural como los posibles derivados semisintéticos, con excepción de las bacillisporinas F (**5** y **6**) y **7**, se unen en la región desordenada de la proteína (dominio C-terminal), a través de interacciones de van der Waals y por la formación de enlaces de hidrógeno con distintos residuos. Este modo de unión sugiere que este conjunto de moléculas puede inhibir la actividad fosfatasa de *hPTP1B*<sub>1-400</sub> a través de un mecanismo de modulación alostérico que modifique la conformación y dinámica de las asas PTP y WPD en el sitio catalítico de la enzima. Por otra parte, el sitio de unión predicho para los productos **5** y **7** se localizó en la interfaz de las hélices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha 7$ , uno de los sitios alostéricos reportados para la proteína de cadena trunca (1-321 aminoácidos). En general, las predicciones de los estudios de acoplamiento molecular de *hPTP1B*<sub>1-400</sub> con fenalenonas diméricas sugieren que estos compuestos pueden inhibir selectivamente la actividad fosfatasa de la enzima de cadena completa. Con base en estas consideraciones, se realizó la síntesis parcial de los productos **7-15** (**Figura 32**), a través del acoplamiento (libre de metales) de aminas primarias con el producto **1**, en dimetilsulfóxido (DMSO) como medio de reacción (**Esquema 1**). Para la formación de los compuestos desmetoxilados (**8**, **13** y **15**) en el medio de reacción se incorporó trietilamina (TEA) para favorecer la formación de los productos. Cabe destacar que todas las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, con excepción de la formación de talaromycesona B (**2**) a partir de duclauxina (**1**), en la cual la mezcla de reacción se calentó a 60 °C. La caracterización estructural de los derivados semisintéticos se realizó

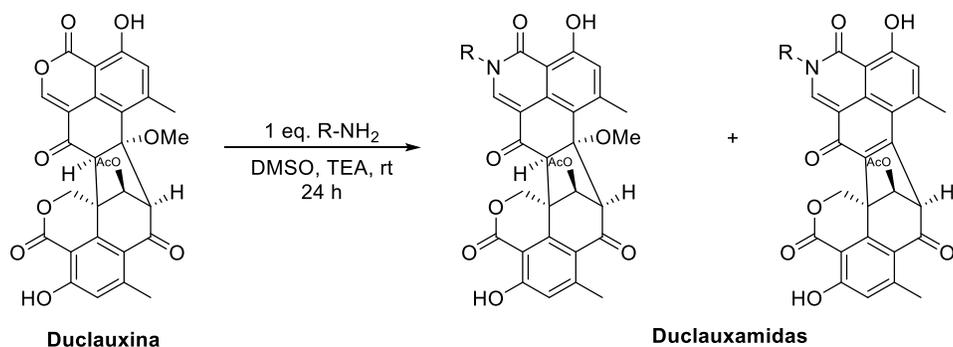
empleando un conjunto de métodos espectroscópicos (RMN) y espectrométricos (EM-AR).



**Figura 31.** Estudios de acoplamiento molecular de fenalenonas diméricas de origen natural (A) y moléculas candidato para semisíntesis (B).



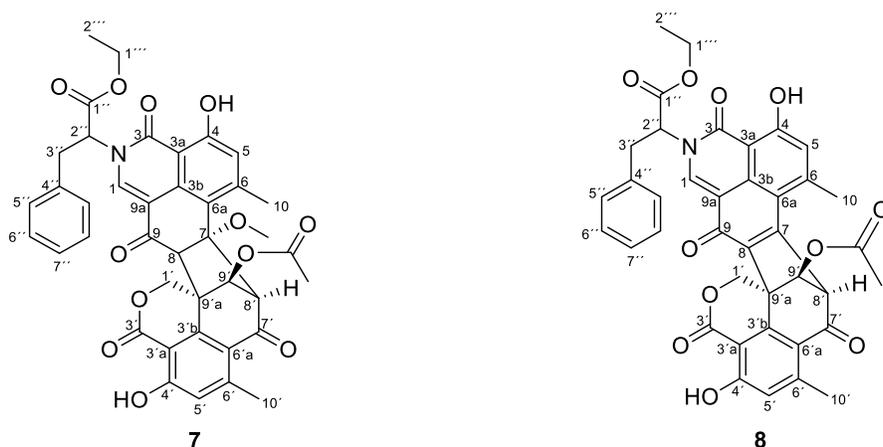
**Figura 32.** Fenalenonas diméricas de origen natural y semisintético estudiadas por acoplamiento molecular con *h*PTP1B<sub>1-400</sub>. Los valores de  $\Delta G$  están dados en kcal/mol.



**Esquema 1.** Estrategia sintética para la obtención de híbridos de duclauxina (**1**).

### 6.3.3 Elucidación estructural de los productos **8** y **9**

El compuesto **7** se aisló como un sólido color crema. Su fórmula molecular se determinó por EM-AR-DART como  $C_{40}H_{35}NO_{12}$ , indicando un índice de insaturación de 24. Las señales de resonancia  $^1H$  y  $^{13}C$  de **7** y **1** fueron muy similares en lo que respecta al esqueleto base de duclauxina (**1**), destacando como diferencias apreciables las señales que corresponden al éster etílico de L-fenilalanina, por ejemplo, los protones diastereotópicos del carbono C-3'' en  $\delta_H$  3.54 ( $J = 14.5, 6.7$  Hz) y 3.12 ( $J = 14.5, 9.1$  Hz) que muestran acoplamiento entre sí y con el protón alfa al carbonilo localizado en C-2'', el cual se observa como una señal doble en  $\delta_H$  5.71 (9.1, 6.6 Hz). De igual modo, se observan las señales del etilo como un sistema  $A_2B_3$  en  $\delta_H$  4.26 y 1.25 (7.1 Hz), mientras que en la región aromática se observa un conjunto de señales que integran para cinco en  $\delta_H$  7.10-7.23 (**Cuadro 2**). Es importante mencionar que para esta muestra no fue posible registrar un espectro de carbono 13 adecuado, debido a la falta de muestra. Sin embargo, el espectro de RMN- $^1H$  en conjunto con las masas de alta resolución confirman la estructura del producto.



El producto **8** se aisló como un sólido color amarillo. La fórmula molecular se determinó por EM-AR-AJS como  $C_{39}H_{31}NO_{11}$ , indicando un índice de insaturación de 25. Las señales de resonancia  $^1H$  y  $^{13}C$  de **7** y **8** fueron muy similares, con excepción de los

desplazamientos de H-8' y H-9' que aparecieron en campo más alto ( $\delta_H$  4.89 y 5.71) por la introducción de un doble enlace entre C-8 y C-9, así como la ausencia de señales asociadas a H-8 y al metoxilo de la posición C-7 (observadas en **7**) (**Cuadro 2**). Es importante mencionar que para esta muestra no fue posible registrar un espectro de  $^{13}\text{C}$  adecuado, debido al bajo rendimiento de la reacción. Sin embargo, el espectro de RMN- $^1\text{H}$  en conjunto con el espectro de masas de alta resolución confirman la estructura del producto.

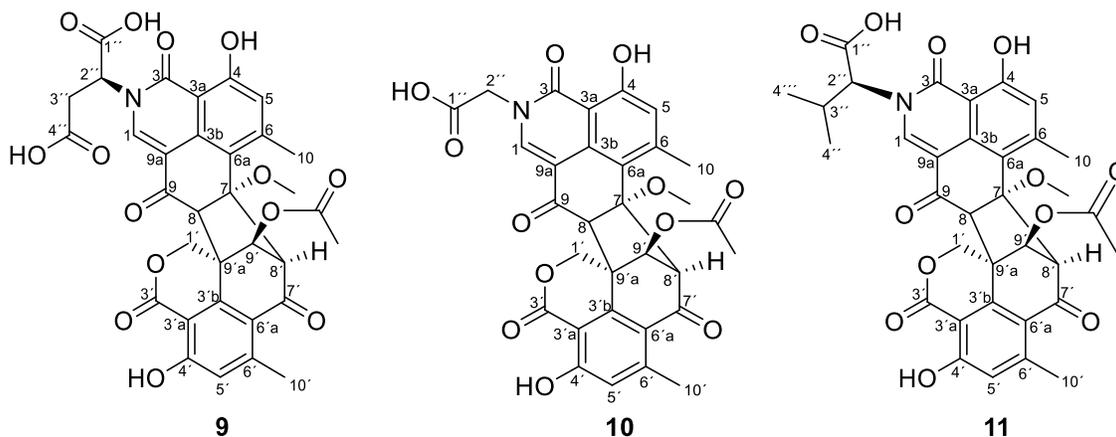
**Cuadro 2.** Datos espectroscópicos de los compuestos **7** y **8** adquiridos en  $\text{CDCl}_3$  ( $^1\text{H}$  400 MHz).

	<b>7</b>	<b>8</b>
Posición	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)
1	7.82, s	8.57, s
3		
3a		
3b		
4		
5	6.51, s	6.79, s
6		
6a		
7		
8	3.97, s	
9		
9a		
10	2.06, s	2.96, s
OH-4	11.67, s	12.04, s
OCH <sub>3</sub>	2.93, s	
1' $\alpha$	5.10, d (12.2)	5.03, d (12.3)
1' $\beta$	4.77, d (12.1)	4.80, d (12.3)
3'		
3'a		
3'b		
4'		
5'	6.74, s	6.85, s
6'		
6'a		
7'		
8'	4.14, s	4.89, d (1.1)
9'	5.17, s	5.71, d (1.1)
9'a		
10'	2.70, s	2.59, s
OAc	2.22, s	2.08, s
OH-4'	12.05, s	12.55, s
1''		
2''	5.71, dd (9.1, 6.6)	5.84, dd (10.9, 5.6)
3'' $\alpha$	3.54, dd (14.5, 6.7)	3.75, dd (14.5, 5.5)
3'' $\beta$	3.12, dd (14.5, 9.1)	3.33, dd (14.5, 10.9)
4''		
5''	7.10-7.23, m	7.18, m
6''	7.10-7.23, m	7.18, m
7''	7.10-7.23, m	7.18, m
1'''	4.26, q (7.1)	4.22, q (7.2)
2'''	1.25, t (7.1)	1.23, t (7.1)

Desplazamientos químicos ( $\delta$  en ppm).

### 6.3.4 Elucidación estructural de los productos 9-11

El compuesto **9** se aisló como un sólido amarillo. La fórmula molecular se determinó por EM-AR-AJS como  $C_{33}H_{27}NO_{14}$ , indicando un índice de insaturación de 21 ( $m/z$  662.1528, calcd. para  $C_{33}H_{28}NO_{14}$ , 662.1504,  $\Delta = +3.6$  ppm). Las señales de resonancia de  $^1H$  y  $^{13}C$  de **9** fueron muy similares a los registrados para duclauxina (**1**), destacando como diferencias principales las señales que corresponden a la incorporación del residuo de aspartato. Estas señales incluyen el acoplamiento de dos protones diastereotópicos del carbono C-3'' en  $\delta_H$  2.90 y 3.36 ( $J=17.6$  Hz) y la señal dd asignada al protón H-2'' en  $\delta_H$  5.36 que muestra acoplamiento con los protones unidos a C-3'' (**Cuadro 3**). En el caso del espectro de  $^{13}C$  se observa la presencia de cuatro señales extra con respecto a la estructura base, dos que corresponden a ácidos carboxílicos en  $\delta_C$  173.4 y 171.2 ppm para C-1'' y C-4'' y dos asignadas a los carbonos C-2'' y C-3'' en  $\delta_C$  60.5 y 35.6 ppm, respectivamente.



El compuesto **10** se aisló como un sólido amarillo pálido. Su fórmula molecular se estableció como  $C_{31}H_{25}NO_{12}$  con base en los resultados obtenidos por EM-AR-AJS. Estos datos indicaron que la molécula tiene un índice de deficiencia de hidrógenos de 20 ( $m/z$  604.1469, calcd. para  $C_{31}H_{26}NO_{12}$ , 604.1449,  $\Delta = +3.2$  ppm). En el espectro de RMN- $^1H$ , la señal simple a campo bajo en  $\delta_H$  11.97 se asignó al fenol quelatado del carbono C-4', que se une mediante enlace de hidrógeno al oxígeno del carbonilo vecino (C-3'). También se observaron dos protones aromáticos en  $\delta_H$  6.52 (H-5) y 6.77 (H-5'). Una señal simple en 5.21 (H-9') que presentó correlación en el espectro de HMBC con el carbono del carbonilo en  $\delta_C$  169.9 ( $-COOCH_3$ ), sugiriendo que este hidrógeno se encuentra unido a un carbono base de oxígeno que soporta un grupo acetato. Por otro lado, las dos señales dobles en  $\delta_H$  5.10 y 4.80 ( $J = 12.1$  Hz de un sistema AB) confirmaron la presencia de un grupo  $-CH_2O-$ . Además, en el espectro de RMN- $^1H$  se observan dos señales simples que integran para tres en  $\delta_H$  2.03 (H-10) y 2.71 (H-10'), indicando la presencia de dos grupos metilo unidos a un anillo aromático. El grupo acetato en la molécula se confirmó por la

presencia de una señal fina que integra para tres en  $\delta_H$  2.23 (3H, s), misma que mostró correlación en el espectro de HMBC con el carbonilo en  $\delta_C$  169.9. También, los datos de RMN- $^{13}C$  en conjunto con el espectro de HSQC identificaron cuatro metilos, dos metilenos, seis metinos, 17 carbonos  $sp^2$  totalmente sustituidos y dos carbonos cuaternarios  $sp^3$ . La presencia de dos señales dobles ( $\delta_H$  4.85 y 4.58) con constante de acoplamiento  $J = 17.3$  Hz, se asignaron a los protones diastereotópicos del metino de glicina (**Cuadro 4**). La comparación del espectro de RMN de duclauxina (**1**) y las bacilsporinas (**5** y **6**) con el producto de semisíntesis **10**, reveló que el reemplazo de un átomo de oxígeno por uno de N, ocurre sin la modificación del esqueleto de carbono original.

**Cuadro 3.** Datos espectroscópicos del compuesto 01002-117-1 (**9**) adquiridos en MeOD ( $^1H$  400 MHz,  $^{13}C$  100 MHz).

Posición	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)
1	136.3	7.96, s
3	166.4	
3a	106.4	
3b	138.3	
4	165.7	
5	118.9	6.55, s
6	152.3	
6a	122.6	
7	89.8	
8	65.3	4.02, s
9	195.5	
9a	112.6	
10	22.3	1.99, s
OCH <sub>3</sub>	51.9	2.97, s
1' $\alpha$	72.6	5.14, d (12.1)
1' $\beta$		4.92, d (12.2)
3'	168.8	
3'a	108.2	
3'b	144.7	
4'	162.8	
5'	121.6	6.75, s
6'	150.4	
6'a	118.2	
7'	193.0	
8'	69.3	4.12, s
9'	80.6	5.18, s
9'a	52.7	
10'	22.1	2.69, s
OAc	171.4	
OAc	20.8	2.20, s
1''	173.4	
2''	60.5	5.36, dd (7.7, 5.5)
3'' $\alpha$	35.6	3.36, dd (17.6, 5.5)
3'' $\beta$		2.90, dd (17.6, 7.7)
4''	171.2	

Desplazamientos químicos ( $\delta$  en ppm).

**Cuadro 4.** Datos espectroscópicos del compuesto 01002-114-1 (**10**) adquiridos en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125MHz).

Posición	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> , mult. (J en Hz)
1	134.8	7.79, s
3	165.1	
3a	104.7	
3b	136.6	
4	164.3	
5	121.2	6.52, s
6	152.0	
6a	121.6	
7	88.6	
8	64.1	3.99, s
9	194.6	
9a	111.8	
10	22.6	2.03, s
OCH <sub>3</sub>	51.7	2.94, s
1'α	71.6	5.10, d (12.1)
1'β		4.80, d (12.1)
3'	167.7	
3'a	107.0	
3'b	142.8	
4'	161.6	
5'	118.7	6.77, s
6'	149.6	
6'a	116.9	
7'	191.2	
8'	67.9	4.15, s
9'	78.8	5.21, s
9'a	51.6	
10'	22.1	2.71, s
OAc	169.9	
OAc	21.2	2.23, s
OH-4'		11.97, s
1''	169.9	
2''α	49.4	4.85, d (17.3)
2''β		4.58, d (17.3)

Desplazamientos químicos (δ en ppm).

El compuesto **11** se aisló como un sólido blanco. La fórmula molecular se determinó por EM-AR-DART como C<sub>34</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>12</sub>, indicando un índice de insaturación de 20 (*m/z* 646.1819, calcd. para C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>12</sub>, 646.1919, Δ = -3.6 ppm). Las señales de resonancia de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de **11** presentaron características similares a las registradas para **10** en lo que respecta al esqueleto base de duclauxamida, destacando como diferencias principales las señales que corresponden al reemplazo de glicina por valina: por ejemplo, las señales dobles de cada metilo del aminoácido acoplado con H-3'' en δ<sub>H</sub> 0.80 (*J* = 6.7 Hz) y 1.15 (*J* = 6.5 Hz), la señal del protón alfa al carbonilo que se acopla con H-3'' en δ<sub>H</sub> 5.17 (*J* = 9.8 Hz) y la señal dq del metino H-3'' en δ<sub>H</sub> 2.46 (*J* = 9.7, 6.6) (**Cuadro 5**).

**Cuadro 5.** Datos espectroscópicos del compuesto 01002-118-3 (**11**) adquiridos en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz).

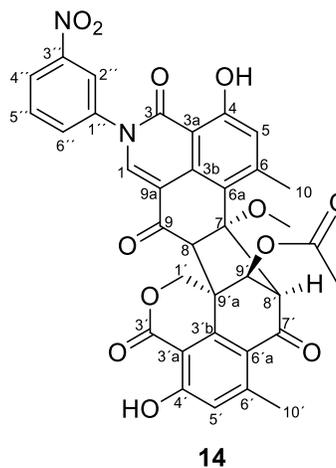
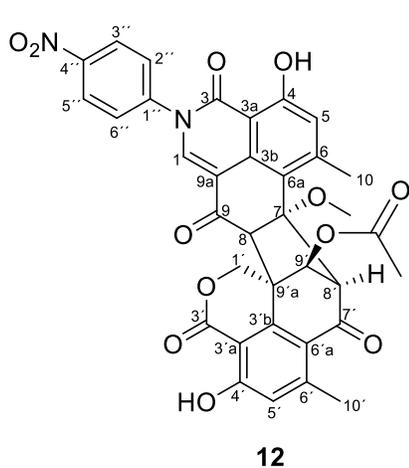
Posición	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> , mult. (J en Hz)
1	134.2	7.79, s
3	165.2	
3a	105.2	
3b	134.4	
4	163.8	
5	121.1	6.48, s
6	151.9	
6a	121.7	
7	88.6	
8	64.0	4.00, s
9	194.2	
9a	111.5	
10	22.6	2.05, s
OCH <sub>3</sub>	51.9	2.98, s
1'α	71.4	5.10, d (12.2)
1'β		4.78, d (12.2)
3'	167.2	
3'a	106.8	
3'b	143.1	
4'	161.8	
5'	118.6	6.79, s
6'	149.5	
6'a	116.7	
7'	191.1	
8'	68.0	4.14, s
9'	78.7	5.20, s
9'a	51.8	
10'	22.0	2.71, s
OAc	169.8	
OAc	21.1	2.23, s
OH-4'		12.14, s
1''	194.3	
2''	62.6	5.17, d (9.8)
3''	30.2	2.46, dq (9.7, 6.6)
4''	18.9	0.80, d (6.7)
4'''	19.8	1.15, d (6.5)

Desplazamientos químicos (δ en ppm).

### 6.3.5 Elucidación estructural de los productos 12-15

El compuesto 01002-125-1 (**12**) se aisló como un sólido blanco. Su fórmula molecular se determinó por EM-AR-DART como  $C_{35}H_{26}N_2O_{12}$ , indicando un índice de insaturación de 24 ( $m/z$  667.1583, calcd. para  $C_{35}H_{27}N_2O_{12}$ , 667.1559,  $\Delta = +3.7$  ppm). Las señales de resonancia  $^1H$  y  $^{13}C$  de 01002-124-1 y 01002-114-1 fueron muy similares en lo que respecta al esqueleto base de duclauxamida, destacando como diferencias principales las señales que corresponden al reemplazo de glicina por 1,4-nitroanilina, que son características de un anillo aromático *p*-sustituido: dos dobletes en  $\delta_H$  8.42 y 7.49 que se acoplan entre sí ( $J = 8.4$  Hz) e integra cada uno para 2H (**Cuadro 6**).

El compuesto 01002-124-1 (**14**) se aisló como un sólido blanco-amarillo. La fórmula molecular se determinó por EM-AR-DART como  $C_{35}H_{26}N_2O_{12}$ , indicando un índice de insaturación de 24 ( $m/z$  667.1586, calcd. para  $C_{35}H_{27}N_2O_{12}$ , 667.1559,  $\Delta = +4.1$  ppm). Las señales de resonancia  $^1H$  y  $^{13}C$  de 12 y 14 fueron muy similares en lo que respecta al esqueleto base, destacando como diferencias principales las señales que corresponden al reemplazo de 1,4-nitroanilina por 1,3-nitroanilina, que son características de un anillo aromático *m*-sustituido, por ejemplo, una señal triple asignada a H-2'' en  $\delta_H$  8.22 que se acopla a dos protones en orientación meta ( $J = 2.1$  Hz) y una señal triple (H-5'') en  $\delta_H$  7.77 que se acopla con dos protones en orientación orto ( $J = 8.1$  Hz). Asimismo, se reconoce una señal del tipo doble de dobles de dobles (ddd) atribuible a H-6'' en  $\delta_H$  8.39 con acoplamiento con protones en orientación, orto y meta ( $J = 8.4, 2.2, 1.0$ ) y un ddd (H-4'') en  $\delta_H$  7.61 con acoplamientos orto y meta ( $J = 8.0, 2.1$  Hz) (**Cuadro 6**).

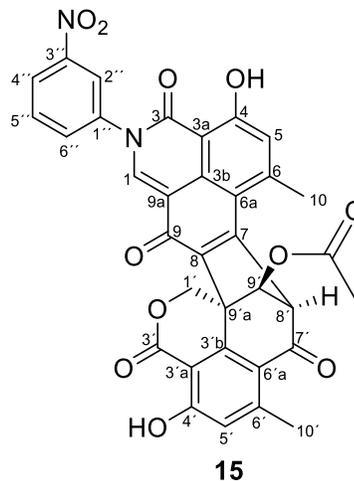
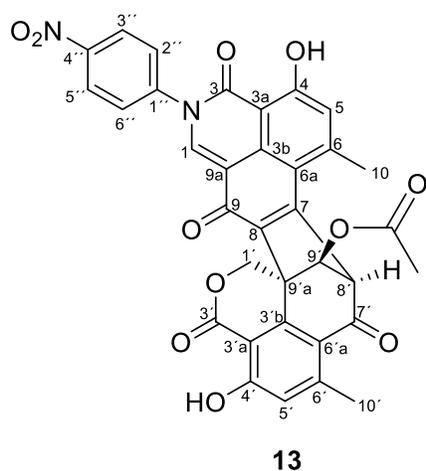


**Cuadro 6.** Datos espectroscópicos para los compuestos **12** y **14** adquiridos en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz).

Posición	<b>12</b>		<b>14</b>	
	$\delta_c$	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)
1	133.9	7.64, s	131.0	7.66, s
3	164.6		164.7	
3a	105.2		105.2	
3b	134.5		134.6	
4	164.3		164.4	
5	120.8	6.62, s	120.8	6.64, s
6	152.4		152.3	
6a	121.9		121.9	
7	88.9		88.9	
8	64.1	4.04, s	64.1	4.04, s
9	194.2		194.2	
9a	113.0		113.0	
10	22.6	2.10, s	22.6	2.11, s
OH-4		11.75, s		11.74, s
OCH <sub>3</sub>	51.9	3.01, s	51.9	3.01, s
1'α	71.5	5.10, d (12.1)	71.5	5.09, d (12.2)
1'β		4.82, d (12.1)		4.81, d (12.1)
3'	167.6		167.6	
3'a	107.1		107.1	
3'b	143.0		143.0	
4'	162.1		162.1	
5'	119.6	6.85, s	119.5	6.84, s
6'	150.2		150.2	
6'a	117.5		117.5	
7'	191.0		191.1	
8'	68.0	4.17, s	68.0	4.17, s
9'	78.6	5.25, s	78.6	5.25, s
9'a	51.8		51.8	
10'	22.1	2.74, s	22.1	2.74, s
OAc	169.7		169.7	
OAc	21.1	2.24, s	21.1	2.24, s
OH-4'		11.91, s		11.90, s
1''	143.4		148.9	
2''	125.3	7.49, d (4.8)	122.4	8.22, t (2.1)
3''	127.9	8.42, d (4.8)	134.1	
4''	148.0		132.6	7.61, ddd (8.0, 2.1, 1.0)
5''	127.9	8.42, d (4.8)	139.1	7.77, t (8.1)
6''	125.3	7.49, d (4.8)	124.5	8.39, ddd (8.4, 2.2, 1.0)

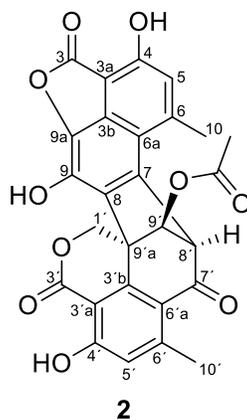
Desplazamientos químicos ( $\delta$  en ppm).

Los compuestos **13** y **15** se aislaron como sólidos naranjas. Su fórmula molecular se determinó por EM-AR-AJS como C<sub>34</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>, indicando un índice de deficiencia de hidrógenos de 25. Las señales de resonancia de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C entre los pares **12**, **13** y **14**, **15** fueron muy similares, con excepción de los desplazamientos tanto de hidrógeno como de carbono de las posiciones 7 y 8. Por ejemplo, en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H desaparecen las señales asignadas al protón H-8 y al metoxilo en C-7, esto como resultado de la formación de un doble enlace entre C-8 y C-9, carbonos que a su vez se desplazan a campos bajos (**Cuadro 7**) por la formación de un enlace doble entre ellos.



### 6.3.6 Obtención de *talaromycesona B* (**2**) a partir de *duclauxina* (**1**)

El compuesto **2** se aisló como un sólido blanco-café. La fórmula molecular se determinó por EM-AR-AJS como  $C_{27}H_{18}O_{10}$ , indicando un índice de insaturación de 19. Las señales de resonancia  $^1H$  y  $^{13}C$  de 01002-113-2 (**2**) coincidieron con lo reportado en la literatura para *talaromycesona B*<sup>123</sup>, con excepción de aquellas que corresponden con los metilos aromáticos. Con base en el análisis de las correlaciones HMBC, en las que se observa que la señal en  $\delta_H$  2.54 presenta un ligero acoplamiento con  $\delta_C$  193.0 y además, C-6'a ( $\delta_C$  118.00) muestra acoplamiento tanto con  $\delta_H$  2.54 como con  $\delta_H$  6.76 (H-5'), se propone la reasignación de  $\delta_H$  2.54 a H-10' y la de  $\delta_H$  2.91 a H-10. Reforzando esta evidencia, en el espectro HMBC se observa un acoplamiento de C-6a ( $\delta_C$  117.46) con  $\delta_H$  2.91 (H-10) y 6.86 (H-5) (**Cuadro 8**).



**Cuadro 7.** Datos espectroscópicos para los compuestos **13** y **15** adquiridos en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz).

Posición	<b>13</b>		<b>15</b>	
	$\delta_c$	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)
1	146.0	8.60, s	146.0	8.62, s
3	165.1		165.1	
3a	108.9		108.9	
3b	135.4		135.5	
4	164.9		164.9	
5	119.7	6.79, s	119.7	6.80, s
6	150.2		150.1	
6a	115.5		115.5	
7	152.9		152.9	
8	139.2		141.5	
9	177.8		177.8	
9a	115.1		115.1	
10	25.6	3.03	25.6	3.03, s
OH-4		12.01		12.02, s
1' $\alpha$	68.4	5.02, d (12.4)	68.4	5.03, d (12.4)
1' $\beta$		4.82, d (12.4)		4.82, d (12.3)
3'	167.6		167.6	
3'a	104.3		104.3	
3'b	148.2		148.9	
4'	164.7		164.8	
5'	121.2	6.97, s	121.2	6.97, s
6'	153.9		153.9	
6'a	116.8		116.8	
7'	189.5		189.5	
8'	63.6	4.95, s	63.6	4.95, s
9'	84.6	5.75, s	84.6	5.75, s
9'a	48.3		48.3	
10'	24.0	2.60, s	24.1	2.60, s
OAc	170.2		170.2	
OAc	21.0	2.10, s	21.0	2.10, s
OH-4'		12.42, s		12.42, s
1''	143.4		139.2	
2''	125.3	7.64, d (8.4)	122.2	8.35, t (1.9)
3''	127.7	8.44, d (8.4)	139.2	
4''	141.3		124.8	7.76, dt (8.0, 1.9)
5''	127.7	8.44, d (8.4)	131.0	7.80, t (8.0)
6''	125.3	7.64, d (8.4)	132.4	8.42, dt (7.8, 1.9)

Desplazamientos químicos ( $\delta$  en ppm).

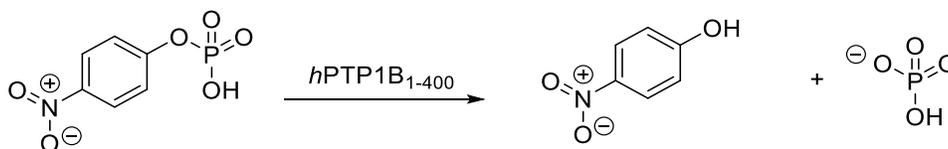
**Cuadro 8.** Datos espectroscópicos del compuesto 01002-113-2 (**2**) adquiridos en MeOD ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz).

sPosición	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)
3	167.2	
3a	100.4	
3b	133.5	
4	160.7	
5	121.4	6.86, s
6	148.1	
6a	117.5	
7	132.7	
8	136.6	
9	137.4	
9a	133.7	
10	22.6	2.91, s
1' $\alpha$	70.5	5.16, d (12.4)
1' $\beta$		5.04, d (12.4)
3'	169.4	
3'a	104.8	
3'b	148.2	
4'	165.5	
5'	121.5	6.76, s
6'	154.6	
6'a	118.0	
7'	192.5	
8'	62.2	4,80, d (1.04)
9'	88.2	5.85, sa
9'a	50.2	
10'	23.9	2.54, s
OAc	171.9	
OAc	20.6	2.03, s

Desplazamientos químicos ( $\delta$  en ppm).

#### 6.4 Evaluación de la inhibición de la actividad enzimática de *hPTP1B*<sub>1-400</sub>.

En estudios previos se determinó que las fenalenonas diméricas basadas en duclauxina (**1-4**) inhiben la actividad fosfatasa de la enzima *hPTP1B*<sub>1-400</sub> de manera dependiente de la concentración, con valores de  $\text{CI}_{50}$  que rondan los 12-90  $\mu\text{M}$ , indicando que pequeñas diferencias en su estructura tienen un impacto en la actividad inhibitoria.<sup>16</sup> Con el propósito de encontrar mejores inhibidores de esta proteína, en este estudio se describe la obtención de 11 derivados de fenalenona dimérica (seis de los cuales son entidades químicas nuevas), empleando, por un lado, una estrategia OSMAC aplicada sobre *Talaromyces* sp. IQ-313 y por otro, procesos de semisíntesis. Para determinar el potencial de las moléculas obtenidas en este trabajo como inhibidores de *hPTP1B*<sub>1-400</sub>, así como el impacto de las modificaciones estructurales en el esqueleto de duclauxina (**1**) descritas previamente, se evaluó su actividad inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ) empleando un método espectrofotométrico que utiliza *p*NPP como sustrato (**Figura 33**).

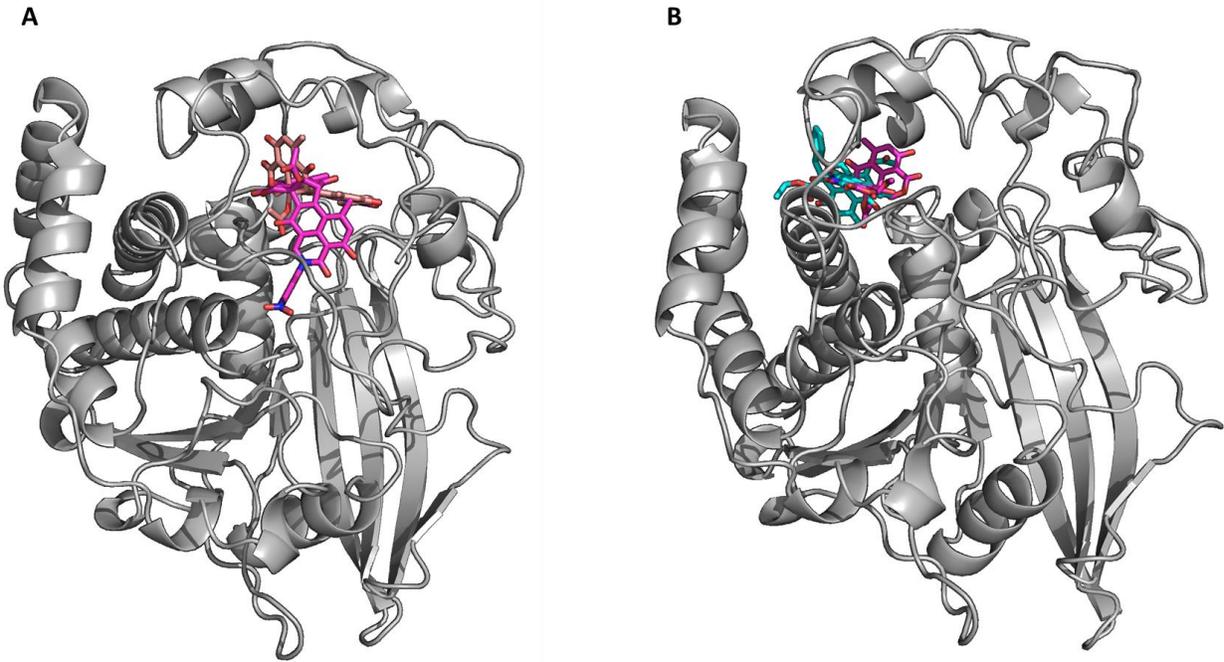


**Figura 33.** Hidrólisis d pNPP, catalizada por *hPTP1B*<sub>1-400</sub>.

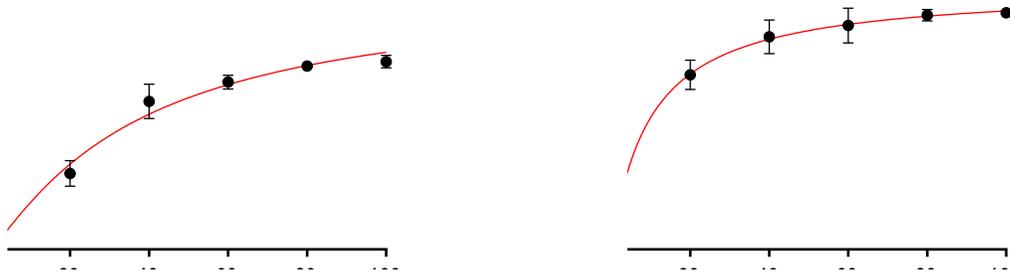
Como se puede observar en la **Tabla 4** (valores de  $Cl_{50}$  para cada una de las moléculas evaluadas, **Figuras 34 y 35**), las modificaciones estructurales propuestas en el esqueleto de duclauxina (**1**) tienen un impacto significativo en su actividad como inhibidores de *hPTP1B*<sub>1-400</sub>. Por ejemplo, los productos **6, 12, 13, 14 y 15**, presentan mejor actividad que la sustancia de partida, siendo el compuesto **13** cinco veces más activo. Mientras que las moléculas **5, 8, 9, 10 y 11** disminuyeron su actividad e incluso, en algunos casos, esta propiedad biológica se vio completamente abatida. Estos datos soportan nuestra hipótesis de que pequeñas modificaciones en la estructura de **1** contribuyen a mejorar la actividad biológica. Los cambios observados en los valores de  $Cl_{50}$  se pueden explicar en función de las interacciones moleculares de los ligantes evaluados con *hPTP1B*<sub>1-400</sub>. Por ejemplo, las estructuras que presentaron mayor actividad se unen en una región cercana al sitio alostérico de la enzima, mientras que los ligandos con menor actividad se unen en un bolsillo conformado por los aminoácidos Lys279, Asp284, Phe 327 y Gln290. Interesantemente, de los resultados de actividad biológica del conjunto de moléculas obtenidas de la fermentación mixta de *Talaromyces* sp. IQ-313 con *Aspergillus* sp. IQ-043, resulta evidente el papel que juega la distribución espacial de los sustituyentes en la molécula, ya que el cambio de orientación ( $\alpha$  o  $\beta$ ) del grupo metoxilo en la posición C-1, impacta significativamente ( $\sim 4$  veces) las propiedades inhibitorias de las sustancias, de 37.9  $\mu\text{M}$  en el epímero con configuración *S* a 9.9 en el estereoisómero con configuración *R* en C-1.

**Tabla 4.** Valores  $Cl_{50}$  de las fenalenonas estudiadas.

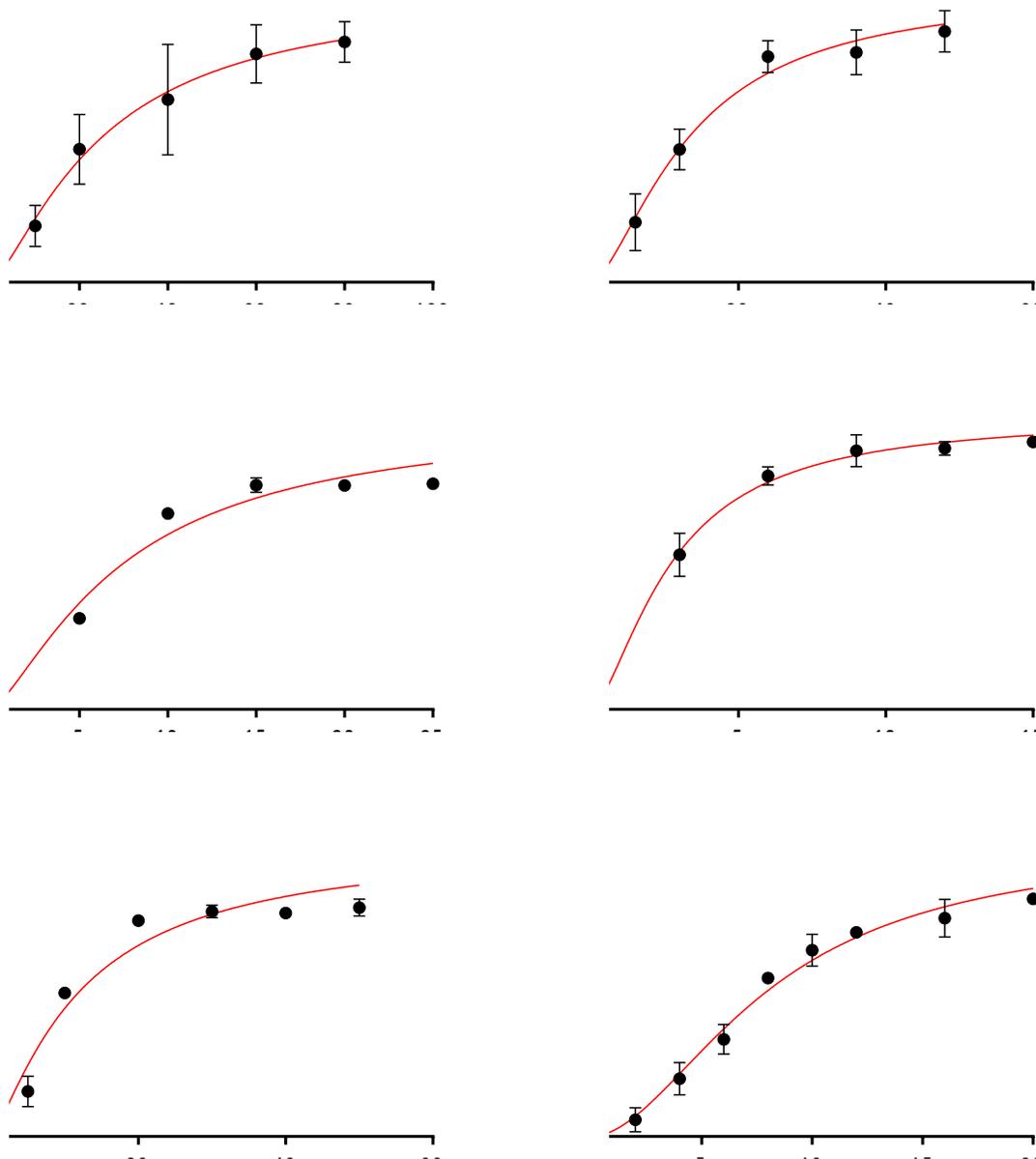
Compuesto	$Cl_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Duclauxina ( <b>1</b> )	12.7
Talaromycesona B ( <b>2</b> )	82.1
Xenoclauxina ( <b>3</b> )	21.8
Bacilisorina G ( <b>4</b> )	13.5
01002-93-3 ( <b>5</b> )	37.9 $\pm$ 1.9
01002-93-4 ( <b>6</b> )	9.9 $\pm$ 1.7
01002-107-1 ( <b>7</b> )	No se evaluó
01002-107-2 ( <b>8</b> )	25.5 $\pm$ 2.4
01002-117-1 ( <b>9</b> )	> 100
01002-114-1 ( <b>10</b> )	13.5 $\pm$ 0.9
01002-118-3 ( <b>11</b> )	> 100
01002-125-1 ( <b>12</b> )	7.5 $\pm$ 0.5
01002-135-1 ( <b>13</b> )	2.7 $\pm$ 0.2
01002-124-1 ( <b>14</b> )	12.2 $\pm$ 0.9
01002-134-1 ( <b>15</b> )	8.0 $\pm$ 0.2



**Figura 34.** Unión predicha por acoplamiento molecular de las fenolenonas estudiadas que fueron más activas -compuestos **13** y **15** (**A**) y las que fueron menos activas -compuestos **5** y **8** (**B**).



**Figura 35.** Curvas de concentración-respuesta para la inhibición de las fenolenonas evaluadas por triplicado, contra la actividad enzimática de *hPTP1B1-400*.



**Figura 35.** Curvas de concentración-respuesta para la inhibición de las fenalenonas evaluadas por triplicado, contra la actividad enzimática de *hPTP1B<sub>1-400</sub>*. **(continuación).**

Es importante mencionar que el producto **13** representa el inhibidor más potente de *hPTP1B<sub>1-400</sub>* reportado a la fecha. Otros ejemplos de inhibidores de esta proteína contemplan a la butirolactona I (un producto natural de origen fúngico) y algunos derivados semisintéticos con valores de  $CI_{50}$  en el rango de 35-250  $\mu$ M.

## 6.5 Ensayos de unión entre productos obtenidos y *h*PTP1B<sub>1-400</sub>

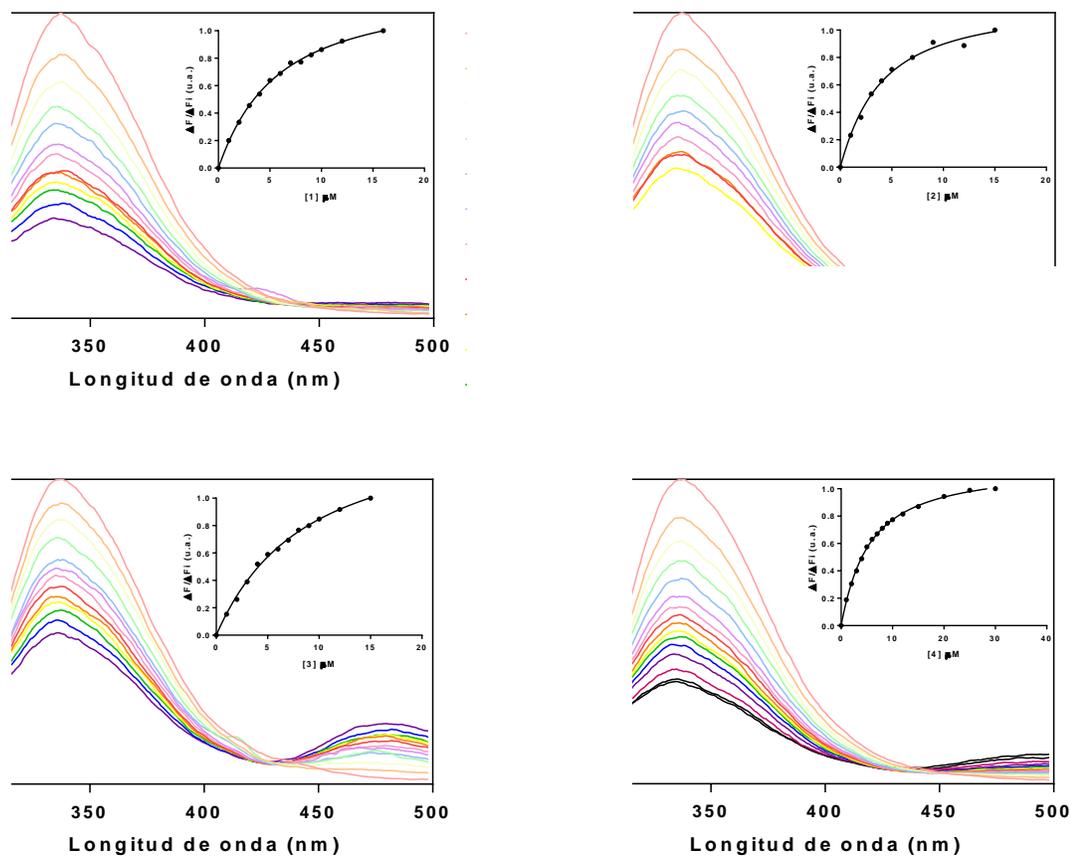
Para determinar la afinidad de este conjunto de moléculas con *h*PTP1B<sub>1-400</sub> se determinaron las constantes de disociación ( $K_d$ ) para cada complejo mediante estudios de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la proteína. En estos experimentos, los residuos de triptófano (Trp) de la estructura proteica se excitan a 280 nm y sus espectros de emisión se registran entre 300 y 500 nm. Generalmente, los cambios en la intensidad de fluorescencia se asocian con variaciones en los microambientes que rodean a los residuos de Trp, mismos que están directamente relacionados con alteraciones conformacionales derivadas de la unión de los ligandos con la proteína.

Para el conjunto de moléculas ensayadas se registró el espectro inicial de fluorescencia de la proteína en ausencia del ligante, posteriormente, se registraron los cambios en la emisión de fluorescencia tras la adición de concentraciones crecientes de la sustancia de prueba. Cabe destacar que en todos los casos se corrigió el efecto de filtro interno asociado a la absorción de los ligantes en las longitudes de onda de excitación y emisión. De los gráficos mostrados en la **Figura 36** se puede inferir que los productos de origen natural apagan significativamente la fluorescencia intrínseca de la proteína hasta en un 70%, indicando que la unión de estas sustancias altera de manera importante la conformación de la proteína, probablemente por su unión en la región desordenada de la enzima, localizada en el dominio C-terminal.

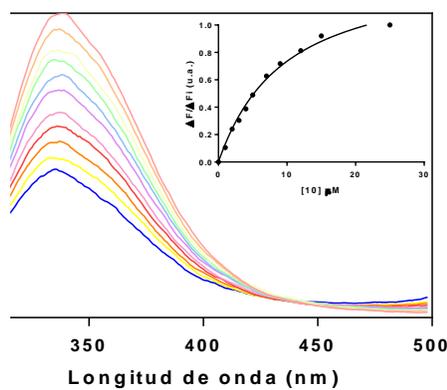
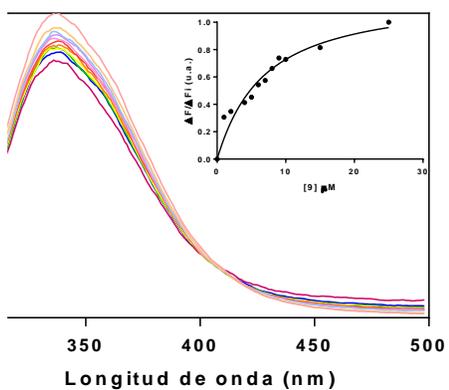
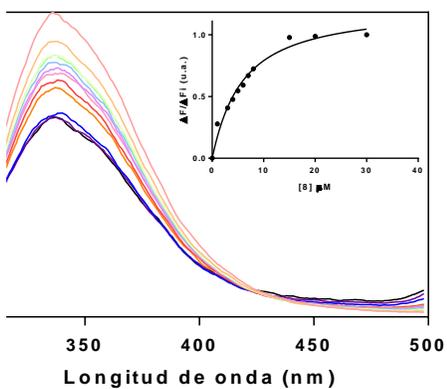
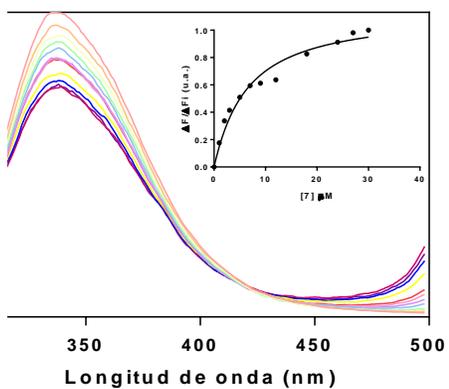
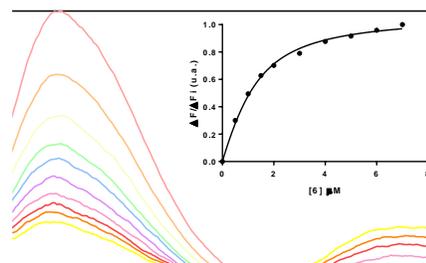
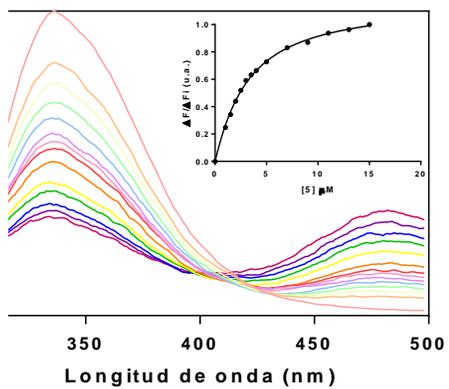
Respecto a los productos de semisíntesis, se observa aquellos que contienen un aminoácido exhiben menor afinidad, especialmente el compuesto **9**, indicando la influencia que pudiera estar ejerciendo la carga de la cadena lateral del residuo de aspartato. Sin embargo, los que contienen un grupo aromático (**7** y **8**), mostraron una mayor afinidad por la proteína, respecto al resto de su congénere. Por otra parte, los derivados que contienen a los isómeros de nitroanilina como sustituyente (**12-15**) fueron los que mostraron, en general, mayor afinidad por *h*PTP1B<sub>1-400</sub>, en concordancia con los resultados de inhibición enzimática y las predicciones de acoplamiento molecular (**Figura 36**).

**Tabla 5.** Constante de disociación ( $K_d$ ) y coeficiente de correlación cuadrático ( $R^2$ ) de la bondad de ajuste del modelo.

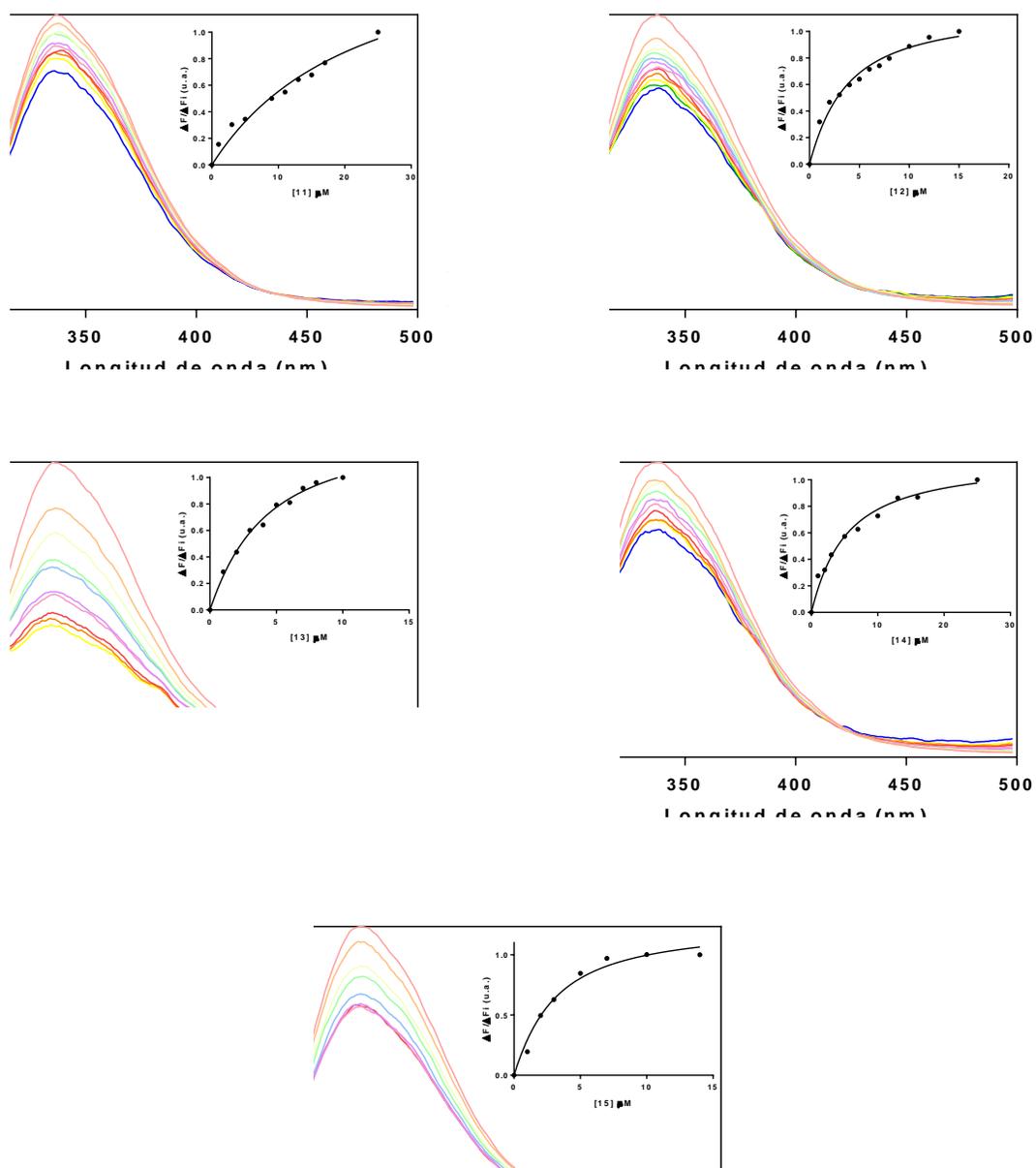
Compuesto	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	$R^2$
Duclauxina (1)	$5.0 \pm 0.2$	0.9988
Talaromycesona B (2)	$3.3 \pm 0.4$	0.9930
Xenoclauxina (3)	$7.8 \pm 0.5$	0.9980
Bacilispantina G (4)	$4.8 \pm 0.1$	0.9993
01002-93-3 (5)	$2.6 \pm 0.1$	0.9984
01002-93-4 (6)	$0.7 \pm 0.1$	0.9964
01002-107-1 (7)	$5.8 \pm 1.1$	0.9709
01002-107-1 (8)	$5.2 \pm 0.8$	0.9777
01002-117-1 (9)	$6.1 \pm 1.4$	0.9462
01002-114-1 (10)	$4.6 \pm 0.7$	0.9844
01002-118-3 (11)	$2.4 \pm 0.5$	0.9812
01002-125-1 (12)	$3.1 \pm 0.5$	0.9781
01002-135-1 (13)	$3.5 \pm 0.4$	0.9934
01002-124-1 (14)	$4.6 \pm 0.7$	0.9844
01002-134-1 (15)	$2.4 \pm 0.5$	0.9812



**Figura 36.** Espectros de fluorescencia y curvas de titulación de  $h\text{PTP1B}_{1-400}$  con concentraciones crecientes de las fenalenonas 1-15.



**Figura 36.** Espectros de fluorescencia y curvas de titulación de *hPTP1B*<sub>1-400</sub> con concentraciones crecientes de las fenolenonas 1-15. (continuación).

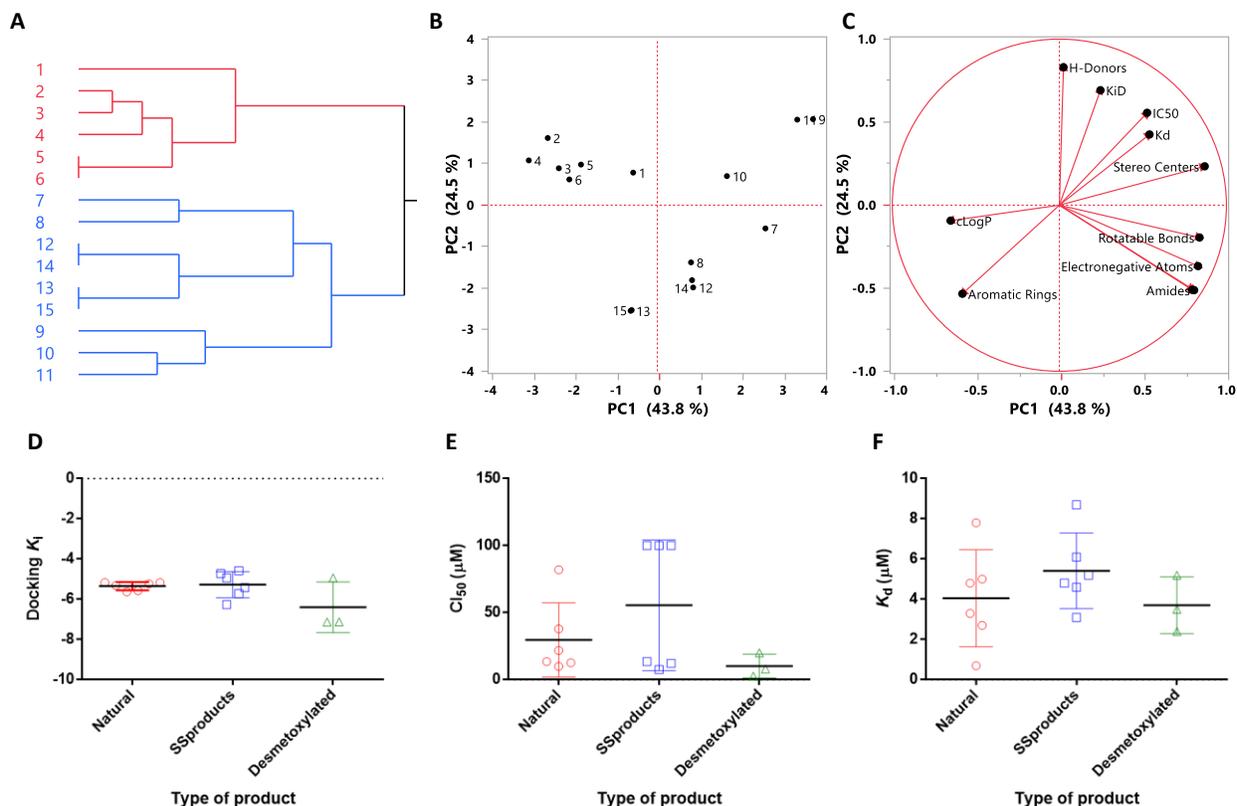


**Figura 36.** Espectros de fluorescencia y curvas de titulación de *hPTP1B*<sub>1-400</sub> con concentraciones crecientes de las fenalenonas 1-15. (continuación).

## 6.6 Relación estructura actividad

Para indagar en la relación estructura-actividad del conjunto de moléculas semisintetizadas (**7-15**) y los productos naturales aislados (**1-6**), se realizó un análisis independiente de las medias de  $K_i$  ( $\mu\text{M}$ ) calculadas,  $K_d$  ( $\mu\text{M}$ ) y  $Cl_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ), así como un análisis jerárquico y de componentes principales para clasificar las moléculas con base en su estructura química (descriptores moleculares: donadores de puentes de hidrógeno, número de centros quirales, oxígenos ácidos, enlaces rotables, átomos electronegativos, área total superficial, número de amidas, número de anillos aromáticos y  $c\text{LogP}$ ) y propiedades biológicas ( $Cl_{50}$ ,  $K_i$ ,  $K_d$ ) (**Figuras 37 A-C**). El análisis jerárquico (**Figura 37A**) congregó las moléculas en tres grupos distintos, i) productos naturales (**1-6**), ii) productos de semisíntesis con aminoácidos alifáticos y polares (**9-11**) y iii) híbridos de duclauxina (**1**) con aminoácidos aromáticos o anilinas (**7, 8, 12-15**). Por otra parte, el análisis de componentes principales corroboró el agrupamiento de las moléculas en tres conjuntos (**Figura 37B**). Adicionalmente, los componentes principales uno y dos (PC1 y PC2) explicaron el 89.2% de la covarianza observada en los datos, siendo el  $c\text{LogP}$ , el número de anillos aromáticos, el área total superficial, el número de amidas, átomos electronegativos, enlaces rotables, oxígenos ácidos, estereocentros, la  $Cl_{50}$ , y  $K_d$  las variables que tienen mayor impacto en el PC1. En contraste, el número de donadores de enlaces de hidrógeno, anillos aromáticos y la  $K_i$  son las variables con mayor contribución al PC2 (**Figura 37C**).

Adicionalmente, el análisis de medias de los valores de  $Cl_{50}$ ,  $K_i$ ,  $K_d$  permitió detectar que las moléculas en las cuales se elimina el grupo metoxilo de la posición C-7' y se extiende la conjugación (**8, 13 y 15**), son en promedio más activas y afines que sus análogos directos (**7, 12 y 14**), que los productos naturales (**1-6**) y los híbridos de duclauxina (**1**) con aminoácidos (SSProducts, **7, 9-11**) (**Figuras 37D-37F**). Este incremento en la inhibición y afinidad se puede explicar en función del incremento en la rigidez y coplanaridad de las moléculas, que impactan directamente sobre su interacción con el blanco molecular.

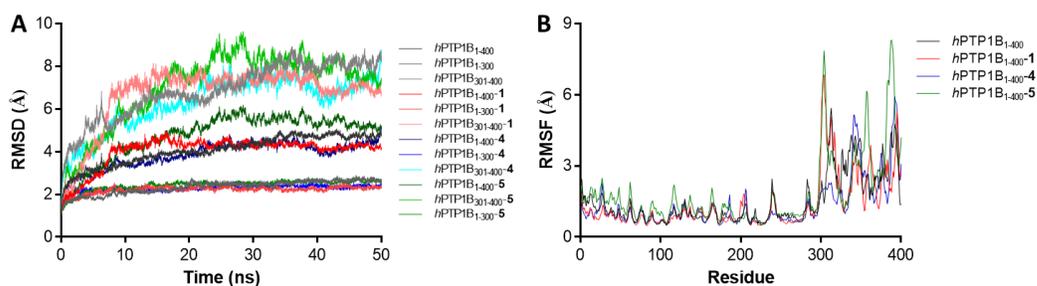


**Figura 37.** Representación del espacio químico de análogos de duclauxina (**1**) de origen natural y semisintéticos y su actividad biológica como inhibidores de la enzima  $hPTP1B_{1-400}$ . **A y B**) Agrupamiento jerárquico y de componentes principales basados en descriptores moleculares y parámetros de actividad biológica para análogos de duclauxina (**1**) de origen natural y semisintéticos. **C**) Grafica de cargas y su contribución a los componentes principales uno y dos. **D-F**) análisis independiente de las medias de  $K_i$  ( $\mu\text{M}$ ) calculadas,  $K_d$  ( $\mu\text{M}$ ) y  $CI_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) para análogos de duclauxina (**1**) de origen natural y semisintéticos.

## 6.7 Modelado biomolecular

Para obtener mayor información sobre el desorden del dominio C-terminal y de los complejos **1**- $hPTP1B_{1-400}$ , **4**- $hPTP1B_{1-400}$  y un control positivo- $hPTP1B_{1-400}$  (ácido ursólico), se realizaron estudios de dinámica molecular. Los resultados preliminares mostraron que los residuos 1-300 de la proteína libre son estables, con un RMSD de 2.3 Å, sin embargo, el RMSD para los residuos 301-400 fue en promedio de 6.8 Å. Cabe destacar que el sistema fue estable a través de los 50 ns de la simulación. En el caso de los complejos, los resultados fueron similares para ambas regiones (1-300 y 301-400 aminoácidos) (**Figura 38**).

El análisis de la desviación cuadrática media de la fluctuación (RMSF, por sus siglas en inglés), de los residuos involucrados en el sitio catalítico, alostérico y el dominio C-terminal de la  $hPTP1B_{1-400}$  y de los complejos **1**- $hPTP1B_{1-400}$ , **4**- $hPTP1B_{1-400}$  y **ácido ursólico**- $hPTP1B_{1-400}$ , indicó que los productos **1** y **4** disminuyen la flexibilidad de los aminoácidos en estos sitios, mientras que el ácido ursólico aumenta la flexibilidad.



**Figura 38.** A) Perfil RMSD del estado basal de hPTP1B<sub>1-400</sub>, hPTP1B<sub>1-300</sub>, y hPTP1B<sub>301-400</sub> (distintos tonos de gris). RMSD de **1**-hPTP1B<sub>1-400</sub>, **1**-hPTP1B<sub>1-300</sub>, y **1**-hPTP1B<sub>301-400</sub> (rojo y rosa). RMSD de **4**-hPTP1B<sub>1-400</sub>, **4**-hPTP1B<sub>1-300</sub>, y **4**-hPTP1B<sub>301-400</sub> (diferentes tonos de azul). RMSD de **ácido ursólico**-hPTP1B<sub>1-400</sub>, **ácido ursólico**-hPTP1B<sub>1-300</sub>, y **ácido ursólico**-hPTP1B<sub>301-400</sub> (diferentes tonos de verde). El RMSD de los átomos del esqueleto de la conformación equilibrada (0ns) se presentan en función del tiempo. B) Raíz cuadrada del promedio de las fluctuaciones (RMSF) de los valores para los átomos del esqueleto mostrados como función del número de residuo. Los valores RMSF para hPTP1B<sub>1-400</sub>, **1**-hPTP1B<sub>1-400</sub>, **4**-hPTP1B<sub>1-400</sub>, **ácido ursólico**-hPTP1B<sub>1-400</sub>, se muestran en negro, rojo, azul y verde, respectivamente.

## 7. CONCLUSIONES

- La aplicación de la estrategia OSMAC condujo al aislamiento de bacilistorina F (**5**) y 1-*epi*-bacilistorina F (**6**), dos productos biosintéticos de *Talaromyces* sp. que no genera en condiciones estándar de cultivo.
- El uso de herramientas de metabolómica para el análisis de espectros de masas (MZmine y GNPS), permitió determinar que someter a *Talaromyces* sp. IQ-313 a fermentación en presencia de CaCl<sub>2</sub>, Co<sup>2+</sup>, EDTA y DMSO, en concentraciones apropiadas, modifica su perfil metabólico.
- El co-cultivo de *Talaromyces* sp. IQ-313 en presencia del hongo *Aspergillus* sp. por un lado, y la bacteria *Klebsiella pneumoniae* por otro, se puede aprovechar como estrategia para explotar su potencial biosintético.
- La aplicación de herramientas bioinformáticas de dereplicación y comparación de espectros de masas (en particular GNPS con la generación de redes moleculares) permitieron identificar en el extracto de *Talaromyces* sp. IQ-313 una serie de compuestos análogos con los reportados en las bases de datos; dos de estos, empleados como fármacos. Este mismo enfoque, permitió apreciar el grado en el que se modifica el espacio químico del hongo cuando se le somete a condiciones de fermentación mixta.
- Se generó un modelo por homología de la proteína PTP1B humana de cadena completa que permitirá descifrar, mediante estudios computacionales, sus modos de interacción con potenciales inhibidores.
- Se logró la síntesis parcial y el aislamiento de nueve análogos de duclauxina, incluyendo seis moléculas sin reportes previos en la literatura (**10-15**).
- Se caracterizó la estructura de 11 fenalenonas diméricas por métodos espectroscópicos y espectralométricos.
- Se obtuvo talaromycesona B (**2**) (previamente considerada un producto natural) a partir de duclauxina (**1**), por medio de un proceso de síntesis parcial de un solo paso.
- Se determinó la actividad inhibitoria contra *h*PTP1B<sub>1-400</sub> de 11 fenalenonas diméricas, cuyos valores CI<sub>50</sub> cayeron entre 2.7 y 37.9 μM, así como la afinidad que tienen por esta misma proteína, de 15 fenalenonas, con valores K<sub>d</sub> que van de 0.7 a 21.3 μM.
- Mediante estudios de acoplamiento molecular, se priorizaron los productos de semisíntesis y se predijeron los probables sitios de unión de las fenalenonas aisladas.
- Con los parámetros biológicos de actividad (CI<sub>50</sub>), unión (ΔG calculada y K<sub>d</sub> experimental) y algunos descriptores químicos se estableció una relación estructura-actividad de las moléculas estudiadas, mediante la aplicación de análisis de componentes principales (PCA) y análisis jerárquico.

- A partir de los estudios de dinámica molecular, se determinó que los compuestos **1** y **4** disminuyen la flexibilidad de los aminoácidos en el sitio catalítico, alostérico y el dominio C-terminal de la *hPTP1B*<sub>1-400</sub>.

## 8. PERSPECTIVAS

- Expandir el espacio químico de las fenalenonas diméricas a través de semisíntesis y empleando como reactivos diversas aminas primarias.
- Evaluar las propiedades biodinámicas de un conjunto más diverso de fenalenonas diméricas.
- Estudiar los metabolitos que biosintetiza *Talaromyces* sp. IQ-313 en presencia de *Aspergillus* sp. IQ-046, *Klebsiella pneumoniae*, Co, EDTA, CaCl<sub>2</sub> y DMSO.

## 9. REFERENCIAS

1. Chassagne F, Cabanac G, Hubert G, David B, Marti G. The landscape of natural product diversity and their pharmacological relevance from a focus on the Dictionary of Natural Products ®. *Phytochemistry Reviews*. 2019;18(3):601-622. doi:10.1007/s11101-019-09606-2
2. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. Published online 2019. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01285
3. Hyde KD, Xu J, Rapior S, et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*. 2019;97(1):1-136. doi:10.1007/s13225-019-00430-9
4. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. Published online 2017. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b01085
5. Ungi THEF, Species M. Meredith Blackwell 2. 2011;98(3):426-438. doi:10.3732/ajb.1000298
6. Keller NP. Translating biosynthetic gene clusters into fungal armor and weaponry. *Nature Chemical Biology*. 2015;11(9):671-677. doi:10.1038/nchembio.1897
7. Scherlach K, Hertweck C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. Published online 2009:1753-1760. doi:10.1039/b821578b
8. Baker DD, Chu M, Oza U, Rajgarhia V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Product Reports*. 2007;24(6):1225-1244. doi:10.1039/b602241n
9. Keller NP. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*. 2019;17(3):167-180. doi:10.1038/s41579-018-0121-1
10. Rokas A, Mead ME, Steenwyk JL, Raja HA, Oberlies NH. Biosynthetic gene clusters and the evolution of fungal chemodiversity. *Natural Product Reports*. 2020;37(7):868-878. doi:10.1039/c9np00045c
11. Pan R, Bai X, Chen J, Zhang H, Wang H. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10(FEB):1-20. doi:10.3389/fmicb.2019.00294
12. Gamaleldin NM, Bakeer W, Sayed AM, Shamikh YI. Exploration of Chemical Diversity and Antitrypanosomal Activity of Some Red Sea-Derived Actinomycetes Using the OSMAC Approach Supported by LC-MS-Based Metabolomics and Molecular Modelling. 2020;1:1-16.
13. Singh AL, Aniebok V, Balunas MJ, et al. The Natural Products Atlas: An Open Access Knowledge Base for Microbial Natural Products Discovery. Published online 2019. doi:10.1021/acscentsci.9b00806
14. Kellogg JJ, Todd DA, Egan JM, et al. Biochemometrics for Natural Products Research: Comparison of Data Analysis Approaches and Application to Identification of Bioactive Compounds. *Journal of Natural Products*. 2016;79(2):376-386. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01014

15. Wang M, Carver JJ, Phelan V v., et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*. 2016;34(8):828-837. doi:10.1038/nbt.3597
16. Jiménez-Arreola BS, Aguilar-Ramírez E, Cano-Sánchez P, et al. Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B1-400: Insights into mechanistic kinetics from in vitro and in silico studies. *Bioorganic Chemistry*. 2020;101(April):103893. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103893
17. Majhi S, Das D. Chemical derivatization of natural products: Semisynthesis and pharmacological aspects- A decade update. *Tetrahedron*. 2021;78:131801. doi:10.1016/j.tet.2020.131801
18. Identification of natural products as selective PTP1B inhibitors via virtual screening..pdf.
19. Zhang S, Zhang ZY. PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug Discovery Today*. 2007;12(9-10):373-381. doi:10.1016/j.drudis.2007.03.011
20. Caroline S, Kamerlin L, Rucker R, Boresch S. A molecular dynamics study of WPD-loop flexibility in PTP1B. 2007;356:1011-1016. doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.093
21. Sharma B, Xie L, Yang F, Wang W, Zhou Q. European Journal of Medicinal Chemistry Recent advance on PTP1B inhibitors and their biomedical applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020;199:112376. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112376
22. Qian S, Zhang M, He Y, Wang W. Medicinal Chemistry. Published online 2016.
23. Crean RM, Biler M, van der Kamp MW, Hengge AC, Kamerlin SCL. Loop Dynamics and Enzyme Catalysis in Protein Tyrosine Phosphatases. *Journal of the American Chemical Society*. Published online 2021. doi:10.1021/jacs.0c11806
24. Wiesmann C, Barr KJ, Kung J, et al. Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2004;11(8):730-737. doi:10.1038/nsmb803
25. Krishnan N, Koveal D, Miller DH, et al. Targeting the disordered C terminus of PTP1B with an allosteric inhibitor. *Nature Chemical Biology*. 2014;10(7):558-566. doi:10.1038/nchembio.1528
26. Atlas IDFD. *Idf Diabetes Atlas*. Ninth.; 2019. <https://idf.org/>
27. Zhang ZY, Lee SY. PTP1B inhibitors as potential therapeutics in the treatment of type 2 diabetes and obesity. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2003;12(2):223-233. doi:10.1517/13543784.12.2.223
28. Hussain H, Green IR, Abbas G, Adekenov SM, Ali I. Expert Opinion on Therapeutic Patents Protein tyrosine phosphatase 1B ( PTP1B ) inhibitors as potential anti-diabetes agents : patent review ( 2015-2018 ). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2019;29(9):689-702. doi:10.1080/13543776.2019.1655542
29. Julien SG, Tremblay ML. *Insulin Receptor PTP. PTP1B*. Vol 2. Second Edi. Elsevier Inc.; 2010. doi:10.1016/B978-0-12-374145-5.00099-1
30. Figueiredo A, Leal EC, Carvalho E. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibition as a potential therapeutic target for chronic wounds in diabetes. *Pharmacological Research*. 2020;159(May):104977. doi:10.1016/j.phrs.2020.104977

31. Ezzat SM, el Bishbishy MH, Habtemariam S, et al. Looking at marine-derived bioactive molecules as upcoming anti-diabetic agents: A special emphasis on PTP1B inhibitors. *Molecules*. 2018;23(12). doi:10.3390/molecules23123334
32. Cho H. *Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) And Obesity*. Vol 91. 1st ed. Elsevier Inc.; 2013. doi:10.1016/B978-0-12-407766-9.00017-1
33. Goldstein BJ. Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): a novel therapeutic target for type 2 diabetes mellitus, obesity and related states of insulin resistance. *Current drug targets Immune, endocrine and metabolic disorders*. 2001;1(3):265-275. doi:10.2174/1568008013341163
34. Verma M, Gupta SJ, Chaudhary A, Garg VK. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors as antidiabetic agents – A brief review. *Bioorganic Chemistry*. 2017;70:267-283. doi:10.1016/j.bioorg.2016.12.004
35. Bollu LR, Mazumdar A, Savage MI, Brown PH. Molecular pathways: Targeting protein tyrosine phosphatases in cancer. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(9):2136-2142. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0934
36. Xu Q, Wu N, Li X, et al. Inhibition of PTP1B blocks pancreatic cancer progression by targeting the PKM2 / AMPK / mTOC1 pathway. Published online 2019. doi:10.1038/s41419-019-2073-4
37. Lessard L, Stuiblé M, Tremblay ML. The two faces of PTP1B in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2010;1804(3):613-619. doi:10.1016/j.bbapap.2009.09.018
38. Kostrzewa T, Styszko J, Gorska-ponikowska M, Sledzinski T, Kuban-jankowska A. Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase PTP1B With Anticancer Potential. 2019;3384:3379-3384. doi:10.21873/anticancer.13481
39. Jonathan Posner and Bradley S. Peterson JAR. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*. 2008;23(1):1-7. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.004.PTP1B
40. Tanchuk VY, Tanin VO, Vovk AI. Analysis of conformational flexibility of loop 110-120 of protein tyrosine phosphatase 1B. *Ukrain'skyi Biokhimichnyi Zhurnal*. 2013;85(5):73-80. doi:10.15407/ubj85.05.073
41. Cui W, Cheng YH, Geng LL, Liang DS, Hou TJ, Ji MJ. Unraveling the allosteric inhibition mechanism of PTP1B by free energy calculation based on umbrella sampling. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013;53(5):1157-1167. doi:10.1021/ci300526u
42. Shinde RN, Sobhia ME. Binding and discerning interactions of PTP1B allosteric inhibitors: Novel insights from molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2013;45:98-110. doi:10.1016/j.jmgm.2013.08.001
43. Tiganis T. PTP1B and TCPTP - Nonredundant phosphatases in insulin signaling and glucose homeostasis. *FEBS Journal*. 2013;280(2):445-458. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08563.x
44. Baskaran SK, Goswami N, Selvaraj S, Muthusamy VS, Lakshmi BS. Molecular dynamics approach to probe the allosteric inhibition of PTP1B by chlorogenic and cichoric acid. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2012;52(8):2004-2012. doi:10.1021/ci200581g

45. Shinde RN, Elizabeth Sobhia M. Geometrical criteria for characterizing open and closed states of WPD-loop in PTP1B. *Journal of Molecular Structure*. 2012;1017:79-83. doi:10.1016/j.molstruc.2012.03.001
46. Li S, Zhang J, Lu S, et al. The Mechanism of allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *PLoS ONE*. 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0097668
47. Gong J, Chen C, Mo S, et al. Fusaresters A-E, new  $\gamma$ -pyrone-containing polyketides from fungus: *Fusarium* sp. Hungcl and structure revision of fusariumin D. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 2019;17(22):5526-5532. doi:10.1039/c9ob00534j
48. Zhou Y, Li YH, Yu HB, Liu XY, Lu XL, Jiao BH. Furanone derivative and sesquiterpene from Antarctic marine-derived fungus *Penicillium* sp. S-1-18. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2018;20(12):1108-1115. doi:10.1080/10286020.2017.1385604
49. Cho KH, Sohn JH, Oh H. Isolation and structure determination of a new diketopiperazine dimer from marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SF-5280. *Natural Product Research*. 2018;32(2):214-221. doi:10.1080/14786419.2017.1346642
50. Ahn JS. as a Zygomycete *Micromucor*. *Notes*. 2004;57(8).
51. Seo C, Sohn JH, Oh H, Kim BY, Ahn JS. Isolation of the protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory metabolite from the marine-derived fungus *Cosmospora* sp. SF-5060. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2009;19(21):6095-6097. doi:10.1016/j.bmcl.2009.09.025
52. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, et al. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2016;38(1):42-49. doi:10.1111/ijlh.12426
53. Huo C, Lu X, Zheng Z, et al. Azaphilones with protein tyrosine phosphatase inhibitory activity isolated from the fungus *Aspergillus deflectus*. *Phytochemistry*. 2020;170(October 2019):112224. doi:10.1016/j.phytochem.2019.112224
54. Sumilat DA, Yamazaki H, Kanno SI, Saito R, Watanabe Y, Namikoshi M. Biphenyl ether derivatives with protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity from the freshwater fungus *Phoma* sp. *Journal of Antibiotics*. 2017;70(3):331-333. doi:10.1038/ja.2016.147
55. Yamazaki H, Ukai K, Namikoshi M. Asperdichrome, an unusual dimer of tetrahydroxanthone through an ether bond, with protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity, from the Okinawan freshwater *Aspergillus* sp. TPU1343. *Tetrahedron Letters*. 2016;57(7):732-735. doi:10.1016/j.tetlet.2015.12.111
56. Wiese J, Aldemir H, Schmaljohann R, Gulder TAM, Imhoff JF, Kerr R. Asperentin B, a new inhibitor of the protein tyrosine phosphatase 1B. *Marine Drugs*. 2017;15(6):1-8. doi:10.3390/md15060191
57. Rotinsulu H, Yamazaki H, Sugai S, et al. Cladosporamide A, a new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor, produced by an Indonesian marine sponge-derived *Cladosporium* sp. *Journal of Natural Medicines*. 2018;72(3):779-783. doi:10.1007/s11418-018-1193-y
58. Park JS, Quang TH, Yoon CS, Kim HJ, Sohn JH, Oh H. Furanoaustinol and 7-acetoxydehydroaustinol: New meroterpenoids from a marine-derived fungal strain

- Penicillium sp. SF-5497. *Journal of Antibiotics*. 2018;71(6):557-563. doi:10.1038/s41429-018-0034-2
59. Zang Y, Gong YH, Li XW, et al. Canescenes A-E: Aromatic polyketide dimers with PTP1B inhibitory activity from *Penicillium canescens*. *Organic Chemistry Frontiers*. 2019;6(18):3274-3281. doi:10.1039/c9qo00820a
  60. Kong FD, Zhang RS, Ma QY, et al. Chrodriamanins O–S from the fungus *Penicillium* sp. SCS-KFD09 isolated from a marine worm, *Sipunculus nudus*. *Fitoterapia*. 2017;122(July):1-6. doi:10.1016/j.fitote.2017.08.002
  61. Kim DC, Minh Ha T, Sohn JH, Yim JH, Oh H. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from a marine-derived fungal strain *aspergillus* sp. SF-5929. *Natural Product Research*. 2020;34(5):675-682. doi:10.1080/14786419.2018.1499629
  62. Maarisit W, Yamazaki H, Kanno S ichi, Tomizawa A, Lee JS, Namikoshi M. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory properties of seco-cucurbitane triterpenes obtained from fruiting bodies of *Russula lepida*. *Journal of Natural Medicines*. 2017;71(1):334-337. doi:10.1007/s11418-016-1061-6
  63. Chen YP, Yang CG, Wei PY, et al. Penostatin derivatives, a novel kind of protein phosphatase 1B inhibitors isolated from solid cultures of the entomogenous fungus *Isaria tenuipes*. *Molecules*. 2014;19(2):1663-1671. doi:10.3390/molecules19021663
  64. Han W, Cai J, Zhong W, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors from the deep-sea fungus *Penicillium chrysogenum* SCSIO 07007. *Bioorganic Chemistry*. 2020;96(January):103646. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103646
  65. Lee DS, Jang JH, Ko W, et al. PTP1B inhibitory and anti-inflammatory effects of secondary metabolites isolated from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. JF-55. *Marine Drugs*. 2013;11(4):1409-1426. doi:10.3390/md11041409
  66. Han W, Cai J, Zhong W, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors from the deep-sea fungus *Penicillium chrysogenum* SCSIO 07007. *Bioorganic Chemistry*. 2020;96(January). doi:10.1016/j.bioorg.2020.103646
  67. Sohn JH, Lee YR, Lee DS, Kim YC, Oh H. PTP1B inhibitory secondary metabolites from marine-derived fungal strains *penicillium* spp. And *Eurotium* sp. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013;23(9):1206-1211. doi:10.4014/jmb.1303.03078
  68. Zhang J, Meng LL, Wei JJ, et al. PTP1B inhibitors from the entomogenous fungi *isaria fumosorosea*. *Molecules*. 2017;22(12):3-7. doi:10.3390/molecules22122058
  69. Park JS, Quang TH, Thi Thanh Ngan N, Sohn JH, Oh H. New preaustinoids from a marine-derived fungal strain *Penicillium* sp. SF-5497 and their inhibitory effects against PTP1B activity. *Journal of Antibiotics*. 2019;72(8):629-633. doi:10.1038/s41429-019-0187-7
  70. Tao QQ, Ma K, Bao L, et al. New sesquiterpenoids from the edible mushroom *Pleurotus cystidiosus* and their inhibitory activity against  $\alpha$ -glucosidase and PTP1B. *Fitoterapia*. 2016;111:29-35. doi:10.1016/j.fitote.2016.04.007
  71. Guo J, Kong F, Ma Q, et al. Meroterpenoids With Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activities From the Fruiting Bodies of *Ganoderma ahmadii*. *Frontiers in Chemistry*. 2020;8(April):1-8. doi:10.3389/fchem.2020.00279
  72. Zhang X, Guan H, Wang C. 3 , 4-Dihydroisocoumarin Derivatives from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus terreus*. :5-14.

73. Huang FX, Yang WZ, Ye F, et al. Microbial transformation of ursolic acid by *Syncephalastrum racemosum* (Cohn) Schroter AS 3.264. *Phytochemistry*. 2012;82:56-60. doi:10.1016/j.phytochem.2012.06.020
74. Rangel-Grimaldo M, Macías-Rubalcava ML, González-Andrade M, Raja H, Figueroa M, Mata R.  $\alpha$ -Glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors from *Malbranchea circinata*. *Journal of Natural Products*. 2020;83(3):675-683. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01108
75. Kong FD, Fan P, Zhou LM, et al. Peneperenes A-D, Four Indole Terpenoids with Potent Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitory Activity from the Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. KFD28. *Organic Letters*. 2019;21(12):4864-4867. doi:10.1021/acs.orglett.9b01751
76. Zhao JY, Wang XJ, Liu Z, et al. Nonadride and Spirocyclic Anhydride Derivatives from the Plant Endophytic Fungus *Talaromyces purpurogenus*. *Journal of Natural Products*. 2019;82(11):2953-2962. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b00210
77. Kim MY, Sohn JH, Jang JH, Ahn JS, Oh H. Two new botcinin derivatives encountered in the studies of secondary metabolites from the marine-derived fungus *Botryotinia* sp. SF-5275. *Journal of Antibiotics*. 2012;65(3):161-164. doi:10.1038/ja.2011.133
78. Han X, Li P, Luo X, Qiao D, Tang X, Li G. Two new compounds from the marine sponge derived fungus *Penicillium chrysogenum*. *Natural Product Research*. 2020;34(20):2926-2930. doi:10.1080/14786419.2019.1598994
79. Wen CN, Chen HP, Zhao ZZ, et al. Two new  $\gamma$ -lactones from the cultures of basidiomycete *Lenzites betulinus*. *Phytochemistry Letters*. 2017;20:9-12. doi:10.1016/j.phytol.2017.03.004
80. Gao W bin, Han LP, Xie FX, et al. A New Polyketide-Derived Metabolite with PTP1B Inhibitory Activity from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis neglecta*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2019;55(6):1056-1058. doi:10.1007/s10600-019-02892-4
81. Chen ZM, Fan QY, Chen HP, Li ZH, Feng T, Liu JK. A novel C25 sterol peroxide from the endophytic fungus *Phoma* sp. EA-122. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. 2015;70(3-4):93-96. doi:10.1515/znc-2014-4217
82. Xu XY, Zhang XY, He F, Peng J, Nong XH, Qi SH. Two new compounds from gorgonian-associated fungus *aspergillus* sp. *Natural Product Communications*. 2013;8(8):1069-1070. doi:10.1177/1934578x1300800808
83. ANEPIG~1.PDF.
84. Sumilat DA, Yamazaki H, Endo K, et al. A new biphenyl ether derivative produced by Indonesian ascidian-derived *Penicillium albobiverticillium*. *Journal of Natural Medicines*. 2017;71(4):776-779. doi:10.1007/s11418-017-1094-5
85. Yamazaki H, Nakayama W, Takahashi O, et al. Verruculides A and B, two new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from an Indonesian ascidian-derived *Penicillium verruculosum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2015;25(16):3087-3090. doi:10.1016/j.bmcl.2015.06.026
86. Sun J, Xu J, Wang S, et al. A new cerebroside from *cordyceps militaris* with anti-PTP1B activity. *Fitoterapia*. 2019;138(3999):104342. doi:10.1016/j.fitote.2019.104342
87. Rangel-Grimaldo M, Macías-Rubalcava ML, González-Andrade M, Raja H, Figueroa M, Mata R.  $\alpha$ -Glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B

- Inhibitors from *Malbranchea circinata*. *Journal of Natural Products*. 2020;83(3):675-683. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01108
88. Fan QY, Dong ZJ, Li ZH, et al. Two new ylangene-type sesquiterpenoids from cultures of the fungus *Postia* sp. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2014;16(3):254-258. doi:10.1080/10286020.2013.866947
  89. Ha TM, Kim DC, Sohn JH, Yim JH, Oh H. Anti-inflammatory and protein tyrosine phosphatase 1b inhibitory metabolites from the antarctic marine-derived fungal strain *penicillium glabrum* sf-7123. *Marine Drugs*. 2020;18(5):1-15. doi:10.3390/md18050247
  90. Sun W, Zhuang C, Li X, et al. Varic acid analogues from fungus as PTP1B inhibitors: Biological evaluation and structure–activity relationships. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2017;27(15):3382-3385. doi:10.1016/j.bmcl.2017.06.001
  91. Teng BS, Wang CD, Yang HJ, et al. A protein tyrosine phosphatase 1B activity inhibitor from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst and its hypoglycemic potency on streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(12):6492-6500. doi:10.1021/jf200527y
  92. Liu L, Zhang J, Chen C, Teng J, Wang C, Luo D. Structure and biosynthesis of fumosorinone, a new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor firstly isolated from the entomogenous fungus *Isaria fumosorosea*. *Fungal Genetics and Biology*. 2015;81:191-200. doi:10.1016/j.fgb.2015.03.009
  93. Gubiani JR, Wijeratne EMK, Shi T, et al. An epigenetic modifier induces production of (10'S)-verruculide B, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases by *Phoma* sp. nov. LG0217, a fungal endophyte of *Parkinsonia microphylla*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2017;25(6):1860-1866. doi:10.1016/j.bmc.2017.01.048
  94. Lee JS, Maarisit W, Abdjul DB, et al. Structures and biological activities of triterpenes and sesquiterpenes obtained from *Russula lepida*. *Phytochemistry*. 2016;127:63-68. doi:10.1016/j.phytochem.2016.03.014
  95. Han W, Cai J, Zhong W, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors from the deep-sea fungus *Penicillium chrysogenum* SCSIO 07007. *Bioorganic Chemistry*. 2020;96:1-38. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103646
  96. Rotinsulu H, Yamazaki H, Miura T, et al. A 2,4'-linked tetrahydroxanthone dimer with protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity from the Okinawan freshwater *Aspergillus* sp. *Journal of Antibiotics*. 2017;70(9):967-969. doi:10.1038/ja.2017.72
  97. Yamazaki H, Saito R, Takahashi O, et al. Trichoketides A and B, two new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the marine-derived fungus *Trichoderma* sp. *Journal of Antibiotics*. 2015;68(10):628-632. doi:10.1038/ja.2015.44
  98. Wang Y, Shang XY, Wang SJ, et al. Structures, biogenesis, and biological activities of pyrano[4,3-c] isochromen-4-one derivatives from the fungus *Phellinus igniarius*. *Journal of Natural Products*. 2007;70(2):296-299. doi:10.1021/np060476h
  99. Wei PY, Liu LX, Liu T, Chen C, Luo DQ, Shi BZ. Three new pigment protein tyrosine phosphatases inhibitors from the insect parasite fungus *Cordyceps gracilioides*: Terreusinone A, pinophilin C and cryptosporioptide A. *Molecules*. 2015;20(4):5825-5834. doi:10.3390/molecules20045825

100. Pan D, Wang L, Hu B, Zhou P. Structural characterization and bioactivity evaluation of an acidic proteoglycan extract from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies for PTP1B inhibition and anti-diabetes. *Biopolymers*. 2014;101(6):613-623. doi:10.1002/bip.22426
101. Quang TH, Ngan NTT, Ko W, et al. Tanzawaic acid derivatives from a marine isolate of *Penicillium* sp. (SF-6013) with anti-inflammatory and PTP1B inhibitory activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2014;24(24):5787-5791. doi:10.1016/j.bmcl.2014.10.035
102. Ai W, Wei X, Lin X, et al. Guignardins A-F, spirodioxynaphthalenes from the endophytic fungus *Guignardia* sp. KcF8 as a new class of PTP1B and SIRT1 inhibitors. *Tetrahedron*. 2014;70(35):5806-5814. doi:10.1016/j.tet.2014.06.041
103. Zhou LM, Kong FD, Fan P, et al. Indole-Diterpenoids with Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitory Activities from the Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. KFD28. *Journal of Natural Products*. 2019;82(9):2638-2644. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b00620
104. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, et al. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2016;38(1):42-49. doi:10.1111/ijlh.12426
105. Díaz-Rojas M, Raja H, González-Andrade M, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the fungus *Malbranchea albolutea*. *Phytochemistry*. 2021;184(November 2020). doi:10.1016/j.phytochem.2021.112664
106. Schueffler A, Anke T. Fungal natural products in research and development. *Natural Product Reports*. 2014;31(10):1425-1448. doi:10.1039/c4np00060a
107. Koch G. Medicinal Chemistry. *Chimia*. 2017;71(10):643. doi:10.2307/j.ctvnwc0d0.18
108. Ji Y, Zhou Q, Liu G, et al. New protein tyrosine phosphatase inhibitors from fungus *Aspergillus gorakhpurensis* F07ZB1707. *RSC Advances*. 2021;11(17):10144-10153. doi:10.1039/d1ra00788b
109. Rivera-Chávez J, Coporo-Blancas D, Morales-Jiménez J. One-step partial synthesis of (±)-asperteretone B and related hPTP1B1–400 inhibitors from butyrolactone I. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2020;28(24). doi:10.1016/j.bmc.2020.115817
110. Bode HB, Bethe B, Hefs R, Zeeck A. Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. Published online 2002:619-627.
111. Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition. CLSI document M07-A9. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2018;32(2):18.
112. Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Ransom HW. LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems*. 2012;8(2):470-481. doi:10.1039/c1mb05350g
113. Egan JM, Santen A van, Liu DY, Lington RG. Development of an NMR-Based Platform for the Direct Structural Annotation of Complex Natural Products Mixtures. Published online 2020. doi:10.1021/acs.jnatprod.0c01076

114. Nothias LF, Petras D, Schmid R, et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods*. 2020;17(9):905-908. doi:10.1038/s41592-020-0933-6
115. Watrous J, Roach P, Alexandrov T, et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(26):1743-1752. doi:10.1073/pnas.1203689109
116. Fox Ramos AE, Evanno L, Poupon E, Champy P, Beniddir MA. Natural products targeting strategies involving molecular networking: Different manners, one goal. *Natural Product Reports*. 2019;36(7):960-980. doi:10.1039/c9np00006b
117. Aron AT, Gentry EC, McPhail KL, et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature Protocols*. 2020;15(6):1954-1991. doi:10.1038/s41596-020-0317-5
118. Guo Z. The modification of natural products for medical use. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2017;7(2):119-136. doi:10.1016/j.apsb.2016.06.003
119. Chen J, Li W, Yao H, Xu J. Insights into drug discovery from natural products through structural modification. *Fitoterapia*. 2015;103:231-241. doi:10.1016/j.fitote.2015.04.012
120. Patel OPS, Beteck RM, Legoabe LJ. Exploration of artemisinin derivatives and synthetic peroxides in antimalarial drug discovery research. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;213:113193. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113193
121. Balkovec JM, Hughes DL, Masurekar PS, Sable CA, Schwartz RE, Singh SB. Discovery and development of first in class antifungal caspofungin (CANCIDAS®) - A case study. *Natural Product Reports*. 2014;31(1):15-34. doi:10.1039/c3np70070d
122. Strader CR, Pearce CJ, Oberlies NH. Fingolimod (FTY720): A recently approved multiple sclerosis drug based on a fungal secondary metabolite. *Journal of Natural Products*. 2011;74(4):900-907. doi:10.1021/np2000528
123. Zang Y, Genta-Jouve G, Escargueil AE, et al. Antimicrobial Oligophenalenone Dimers from the Soil Fungus *Talaromyces stipitatus*. *Journal of Natural Products*. 2016;79(12):2991-2996. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00458
124. Chaudhary NK, Crombie A, Vuong D, Lacey E, Piggott AM, Karuso P. Talaxins: Hybrid Phenalenone Dimers from *Talaromyces stipitatus*. *Journal of Natural Products*. 2020;83(4):1051-1060. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01066
125. Wu B, Ohlendorf B, Oesker V, et al. Acetylcholinesterase Inhibitors from a Marine Fungus *Talaromyces* sp. Strain LF458. *Marine Biotechnology*. 2015;17(1):110-119. doi:10.1007/s10126-014-9599-3
126. Inoue Y, Tsuchimori K, Nakamura H. Safety and effectiveness of oral blonanserin for schizophrenia: A review of Japanese post-marketing surveillances. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2021;145(1):42-51. doi:10.1016/j.jphs.2020.09.006
127. Sumitomo Dainippon Pharma Co. L. Sumitomo Dainippon Pharma Announces the Approval of an Atypical Antipsychotic Blonanserin (Brand Name in Japan: LONASEN®) in China. 2017;1407:1. [http://www.ds-pharma.com/ir/news/pdf/ene20170228.2\\_.pdf](http://www.ds-pharma.com/ir/news/pdf/ene20170228.2_.pdf)

128. Wu L, Zhou X, Cao Y, et al. Therapeutic efficacy of novel memantine nitrate MN-08 in animal models of Alzheimer's disease. *Aging Cell*. 2021;(March):1-13. doi:10.1111/accel.13371
129. FDA. full prescription NAMENDA (memantine HCl). *Fda*. Published online 2013:1-18. [http://www.allergan.com/assets/pdf/namenda\\_pi](http://www.allergan.com/assets/pdf/namenda_pi)
130. Katajamaa M, Miettinen J, Orešič M. MZmine: Toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics*. 2006;22(5):634-636. doi:10.1093/bioinformatics/btk039
131. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*. 2014;12(1):7-8. doi:10.1038/nmeth.3213
132. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*. 2010;5(4):725-738. doi:10.1038/nprot.2010.5
133. Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(W1):W174-W181. doi:10.1093/nar/gkv342
134. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*. 1993;26(2):283-291. doi:10.1107/s0021889892009944
135. Laskowski RA, Rullmann JAC, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular NMR*. 1996;8(4):477-486. doi:10.1007/BF00228148

## 10. ANEXO I

<b>Figura AI- 1.</b> Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de la talaromycesona B (2).....	102
<b>Figura AI- 2.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la talaromycesona B (2) en MeOD.....	102
<b>Figura AI- 3.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la talaromycesona B (2) en MeOD.....	103
<b>Figura AI- 4.</b> Espectro de HMBC de la talaromycesona B (2) en MeOD.....	103
<b>Figura AI- 5.</b> Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de la bacilisorina F (5).....	104
<b>Figura AI-6.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la bacilisorina F (5) en CDCl <sub>3</sub> .....	104
<b>Figura AI- 7.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la bacilisorina F (5) en CDCl <sub>3</sub> .....	105
<b>Figura AI- 8.</b> Espectro de HMBC de la bacilisorina F (5) en CDCl <sub>3</sub> .....	105
<b>Figura AI- 9.</b> Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de la 1- <i>epi</i> -bacilisorina F (6).....	106
<b>Figura AI- 10.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la 1- <i>epi</i> -bacilisorina F (6) en CDCl <sub>3</sub> .....	106
<b>Figura AI- 11.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la 1- <i>epi</i> -bacilisorina F (6) en CDCl <sub>3</sub> .....	107
<b>Figura AI- 12.</b> Espectro de HMBC de la 1- <i>epi</i> -bacilisorina F (6) en CDCl <sub>3</sub> .....	107
<b>Figura AI- 13.</b> Espectro de masas de alta resolución obtenido por DART de 01002-107-1 (7).....	108
<b>Figura AI- 14.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de 01002-107-1 (7) en CDCl <sub>3</sub> .....	108
<b>Figura AI- 15.</b> Espectro de masas de alta resolución obtenido por DART de 01002-107-2 (8).....	109
<b>Figura AI- 16.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de 01002-107-2 (8) en CDCl <sub>3</sub> .....	109
<b>Figura AI- 17.</b> Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de 01002-117-1 (9).....	110
<b>Figura AI- 18.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de 01002-117-1 (9) en MeOD.....	110
<b>Figura AI- 19.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de 01002-117-1 (9) en MeOD.....	111
<b>Figura AI- 20.</b> Espectro de HMBC de 01002-117-1 (9) en MeOD.....	111
<b>Figura AI- 21.</b> Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de 01002-114-1 (10).....	112
<b>Figura AI- 22.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de 01002-114-1 (10) en CDCl <sub>3</sub> .....	112
<b>Figura AI- 23.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de 01002-114-1 (10) en CDCl <sub>3</sub> .....	113
<b>Figura AI- 24.</b> Espectro de HMBC de 01002-114-1 (10) en CDCl <sub>3</sub> .....	113
<b>Figura AI- 25.</b> Espectro de masas de alta resolución obtenido por DART de 01002-118-3 (11).....	114
<b>Figura AI- 26.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de 01002-118-3 (11) en CDCl <sub>3</sub> .....	114
<b>Figura AI- 27.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de 01002-118-3 (11) en CDCl <sub>3</sub> .....	115
<b>Figura AI- 28.</b> Espectro de HMBC de 01002-118-3 (11) en CDCl <sub>3</sub> .....	115
<b>Figura AI- 29.</b> Espectro de masas de alta resolución obtenido por DART de 01002-125-1 (12).....	116
<b>Figura AI- 30.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de 01002-125-1 (12) en CDCl <sub>3</sub> .....	116
<b>Figura AI- 31.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de 01002-125-1 (12) en CDCl <sub>3</sub> .....	117
<b>Figura AI- 32.</b> Espectro de HMBC de 01002-125-1 (12) en CDCl <sub>3</sub> .....	117
<b>Figura AI- 33.</b> Espectro de masas de alta resolución obtenido por DART de 01002-135-1 (13).....	118
<b>Figura AI- 34.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de 01002-135-1 (13) en CDCl <sub>3</sub> .....	118

<b>Figura AI- 35.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de 01002-135-1 ( <b>13</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .....	119
<b>Figura AI- 36.</b> Espectro de masas de alta resolución obtenido por DART de 01002-124-1 ( <b>14</b> ).....	119
<b>Figura AI- 37.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de 01002-124-1 ( <b>14</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .....	120
<b>Figura AI- 38.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de 01002-124-1 ( <b>14</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .....	120
<b>Figura AI- 39.</b> Espectro de HMBC de 01002-124-1 ( <b>14</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .....	121
<b>Figura AI- 40.</b> Espectro de masas de alta resolución obtenido por DART de 01002-134-1 ( <b>15</b> ).....	121
<b>Figura AI- 41.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de 01002-134-1 ( <b>15</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .....	122
<b>Figura AI- 42.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de 01002-134-1 ( <b>15</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .....	122



Figura AI- 1. Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de la talaromycesona B (2).

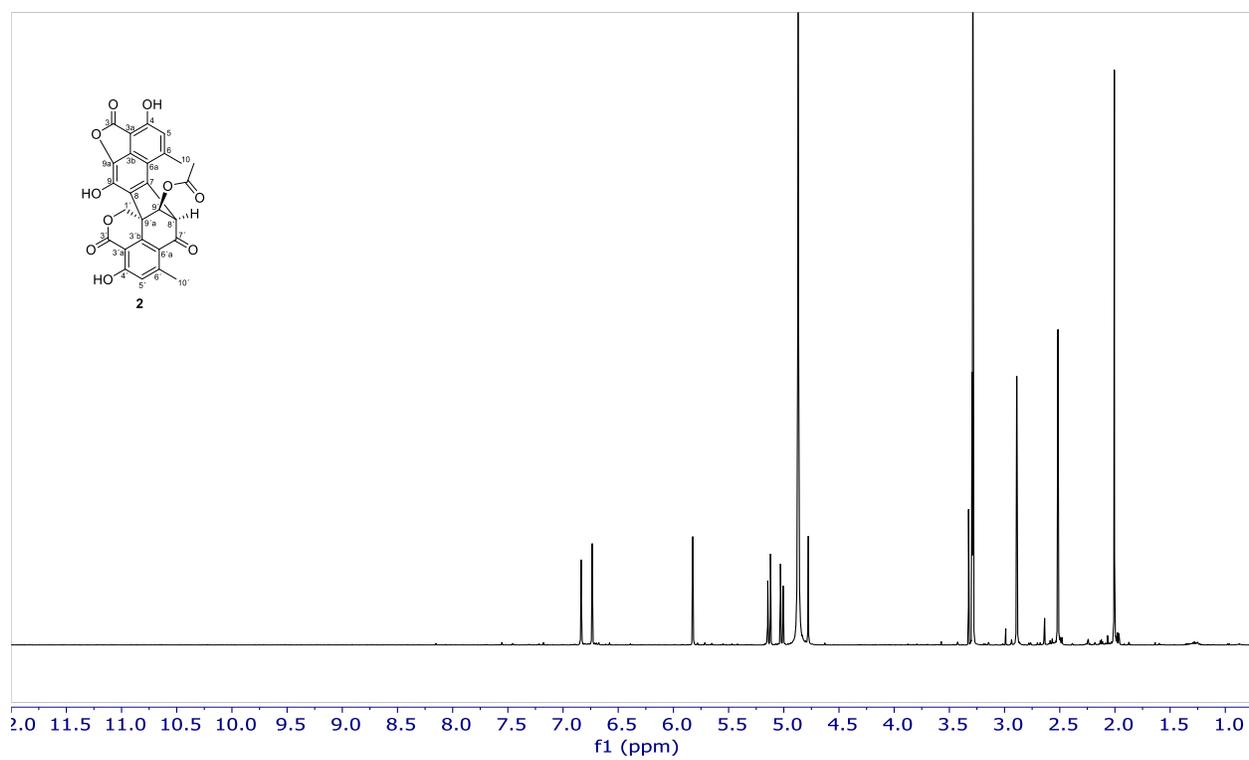


Figura AI- 2. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la talaromycesona B (2) en MeOD.

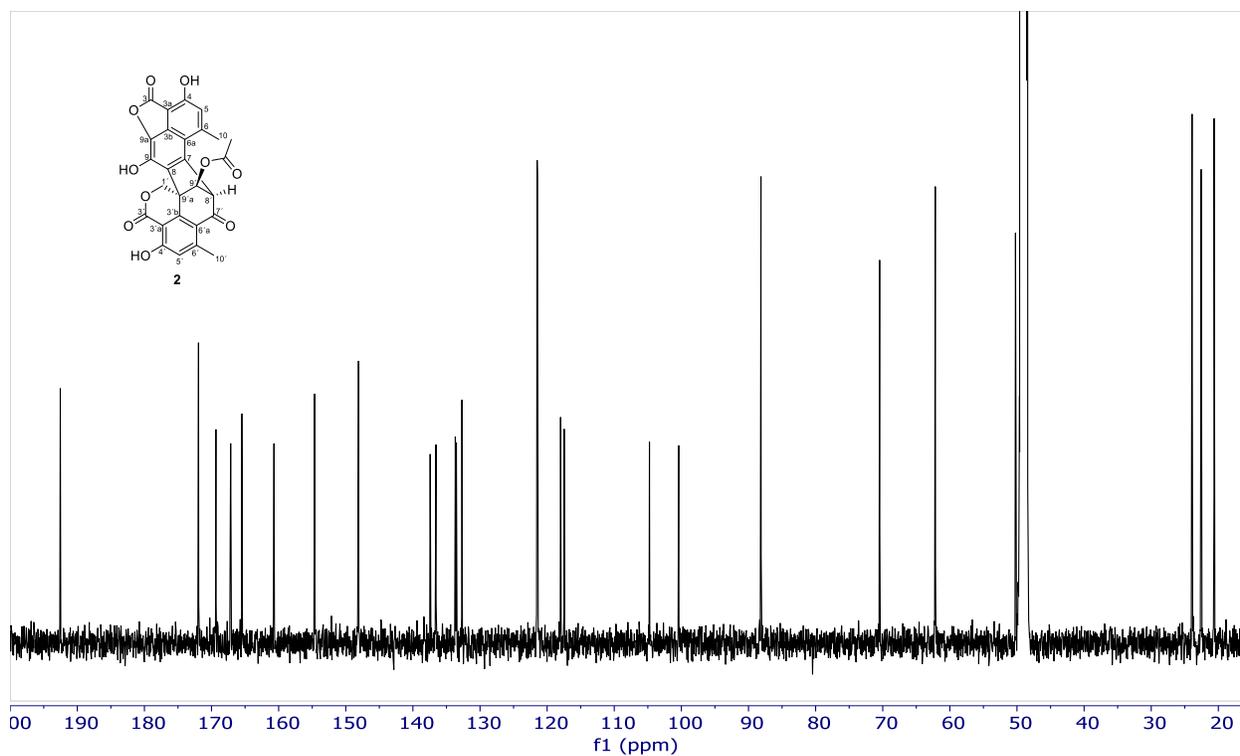


Figura AI- 3. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la talaromycesona B (2) en MeOD.

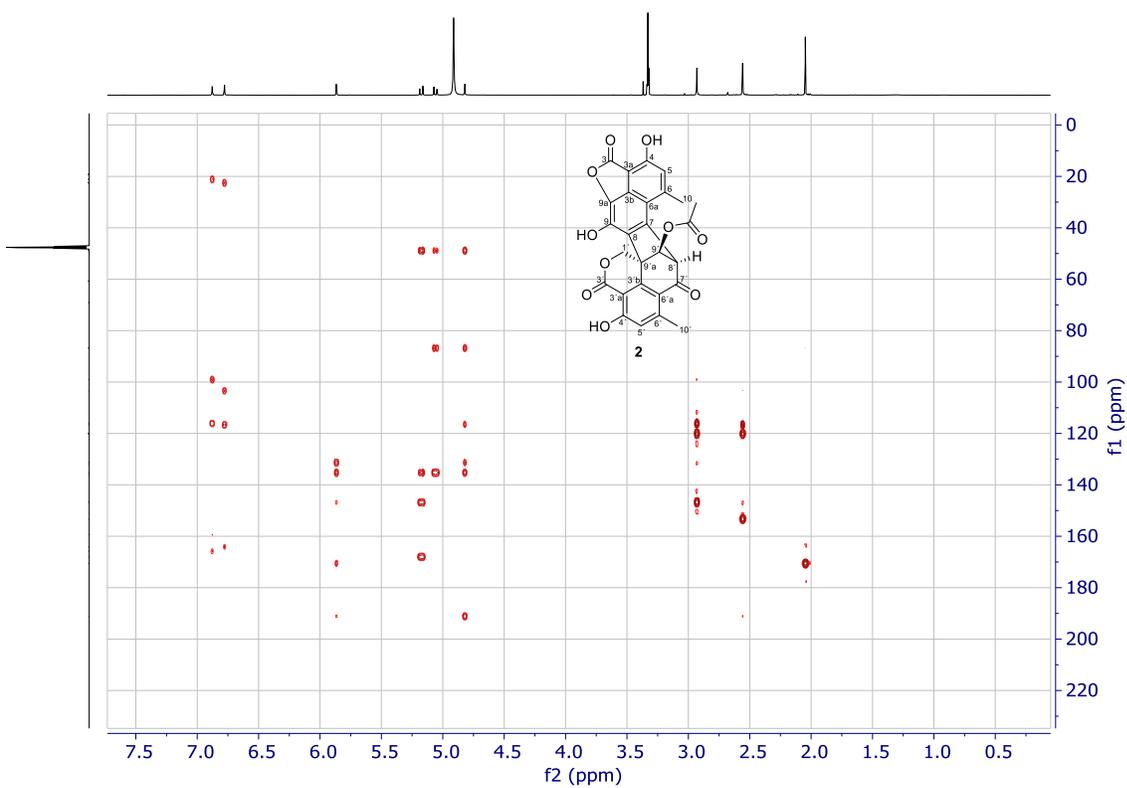


Figura AI- 4. Espectro de HMBC de la talaromycesona B (2) en MeOD.

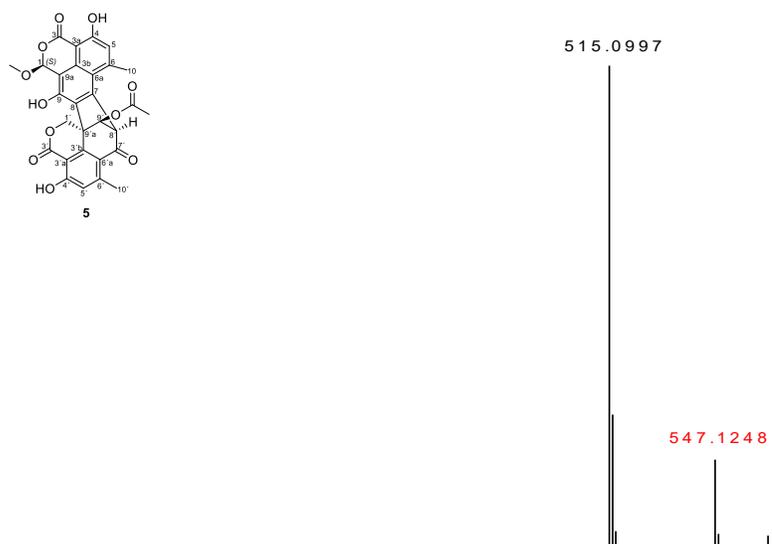


Figura AI- 5. Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de la bacillisporina F (5).

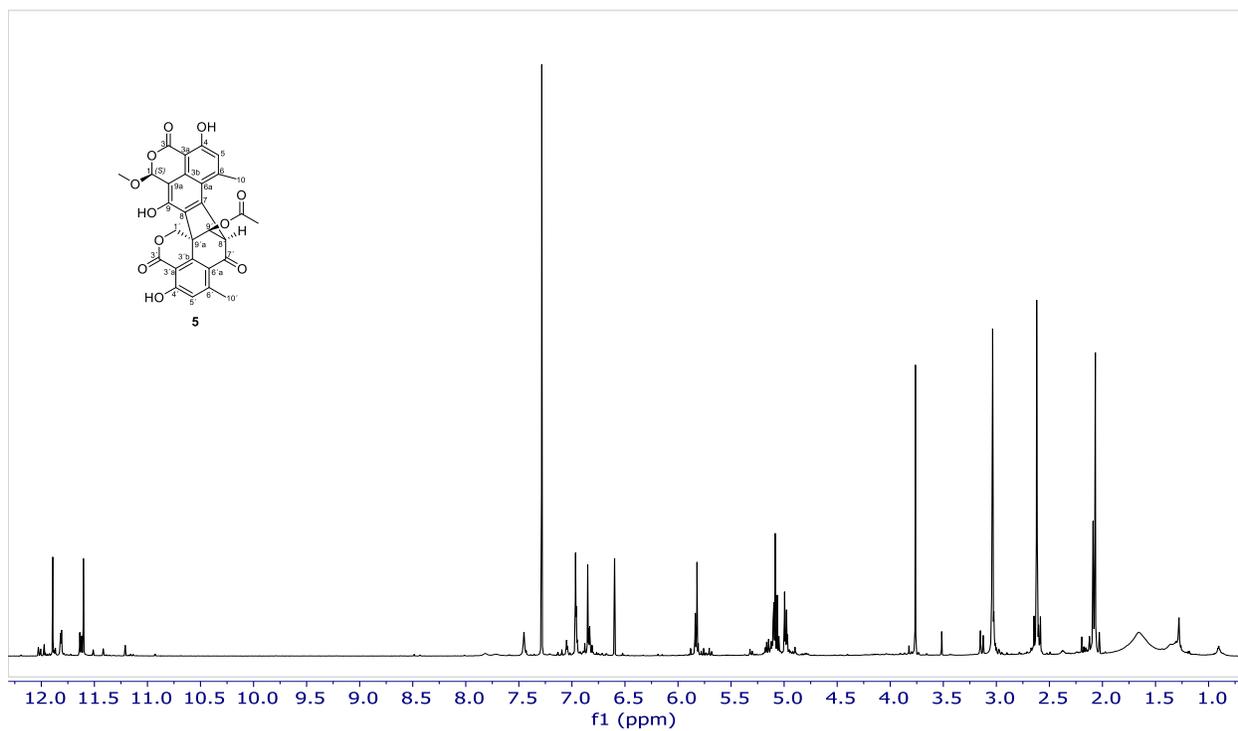


Figura AI-6. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la bacillisporina F (5) en CDCl<sub>3</sub>.

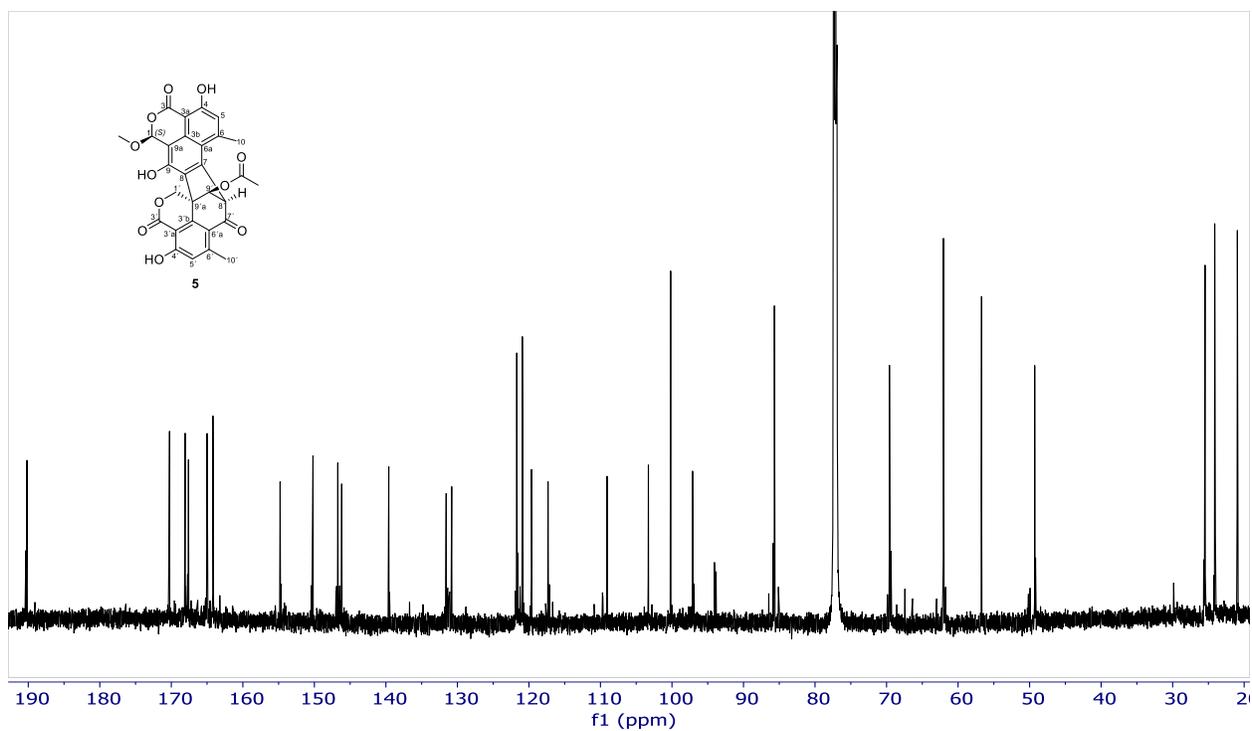


Figura AI- 7. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la bacillisporina F (5) en  $\text{CDCl}_3$ .

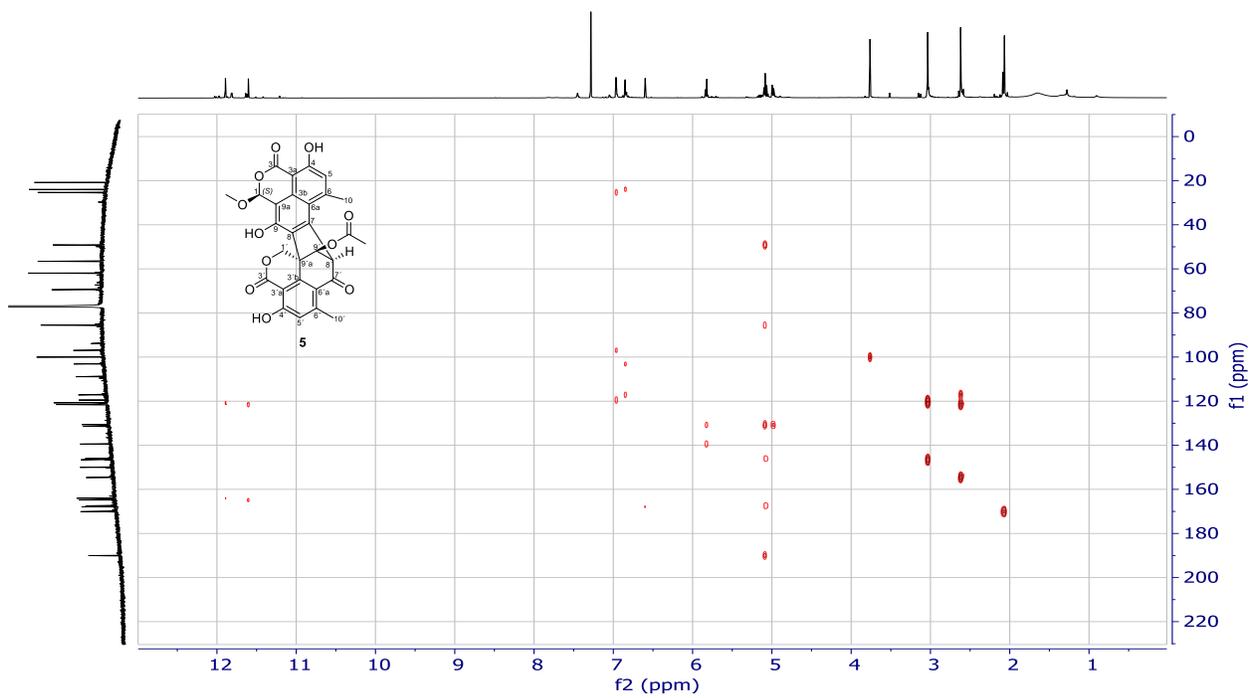
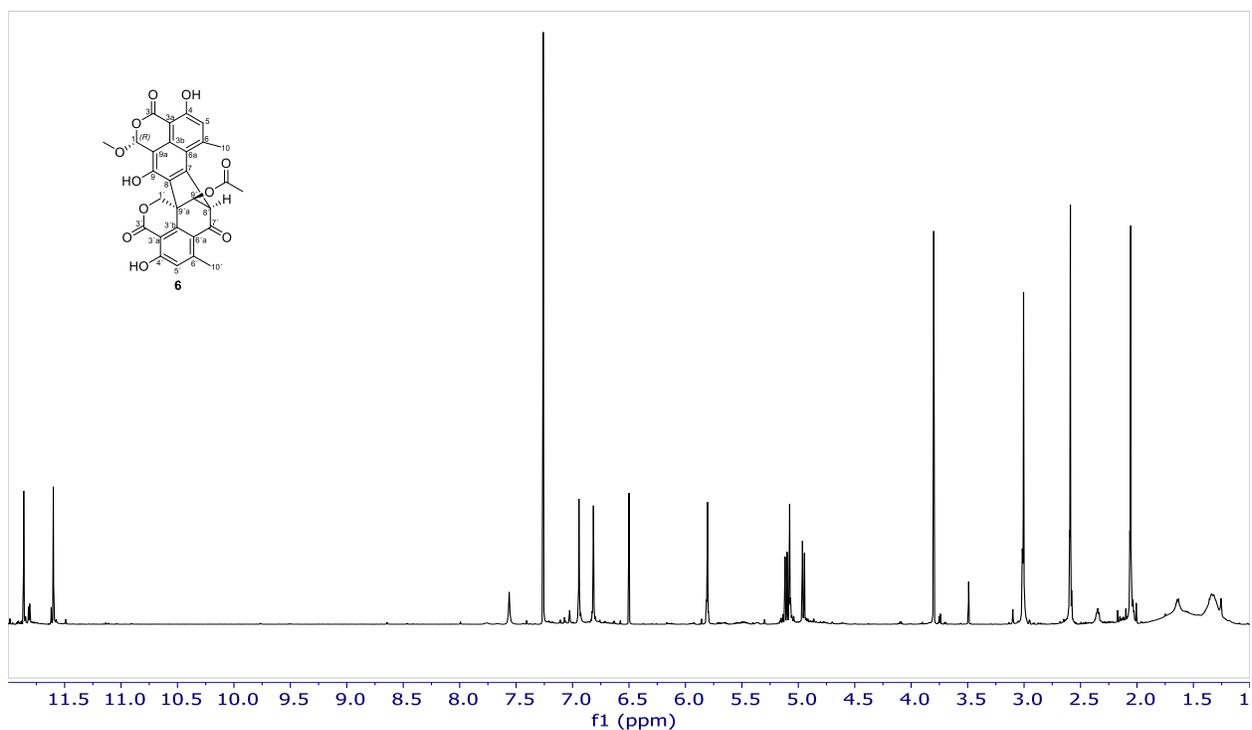


Figura AI- 8. Espectro de HMBC de la bacillisporina F (5) en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura AI- 9.** Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de la 1-*epi*-bacilispোরিনা F (6).



**Figura AI- 10.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la 1-*epi*-bacilispোরিনা F (6) en CDCl<sub>3</sub>.

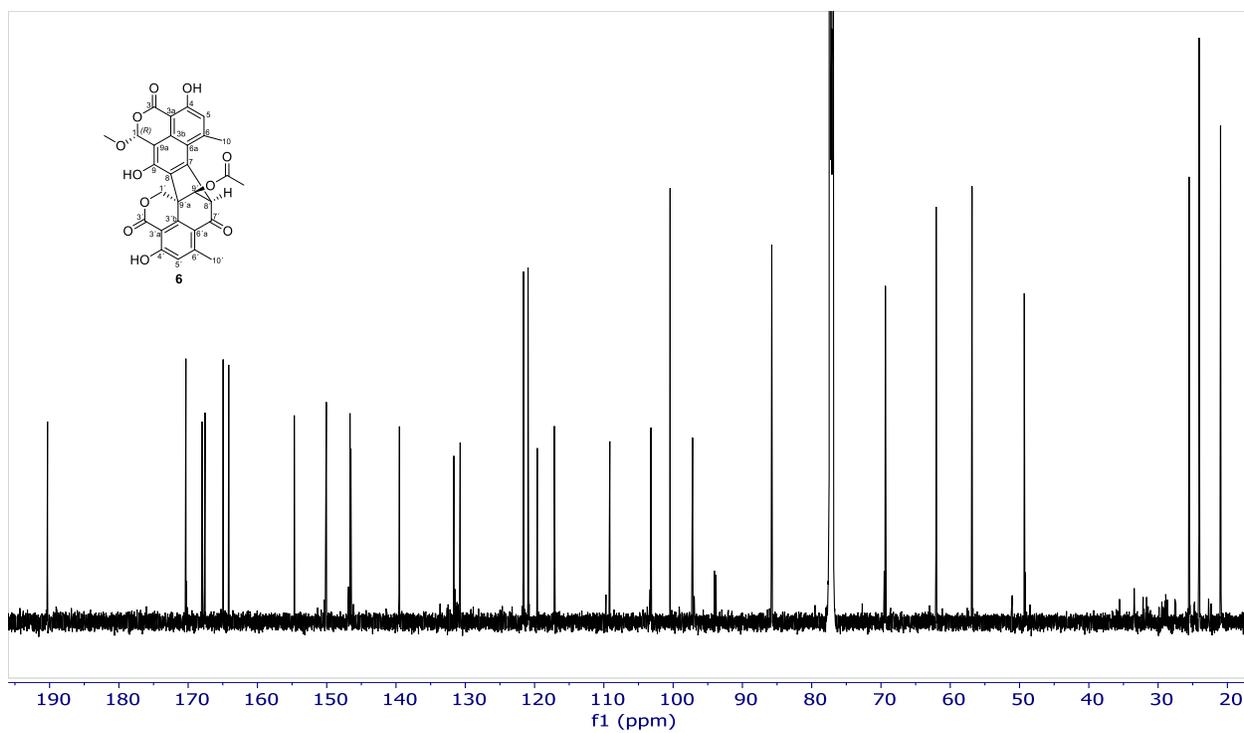


Figura AI- 11. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la 1-*epi*-bacilisporsina F (6) en  $\text{CDCl}_3$ .

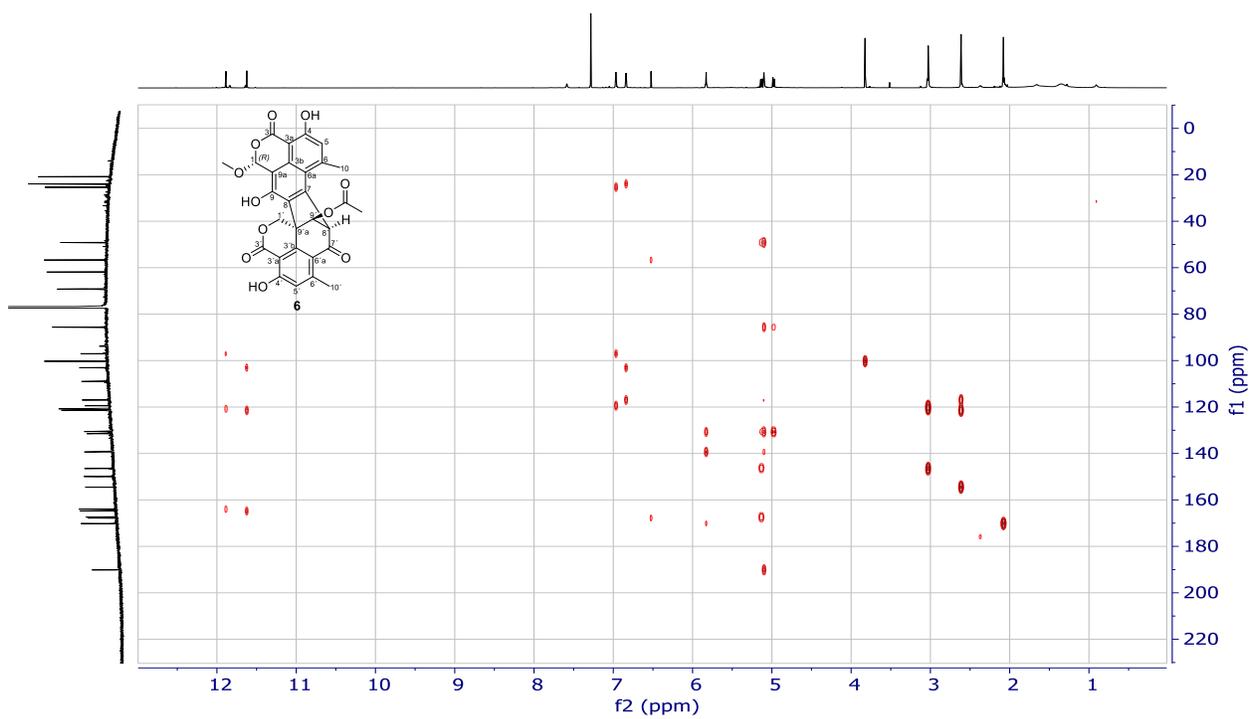


Figura AI- 12. Espectro de HMBC de la 1-*epi*-bacilisporsina F (6) en  $\text{CDCl}_3$ .

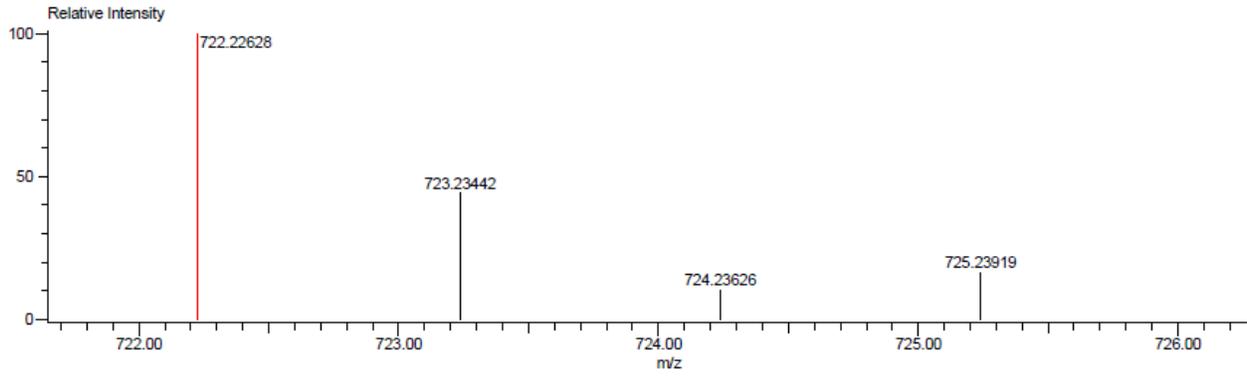
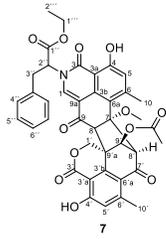


Figura AI- 13. Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-DART de 01002-107-1 (7).

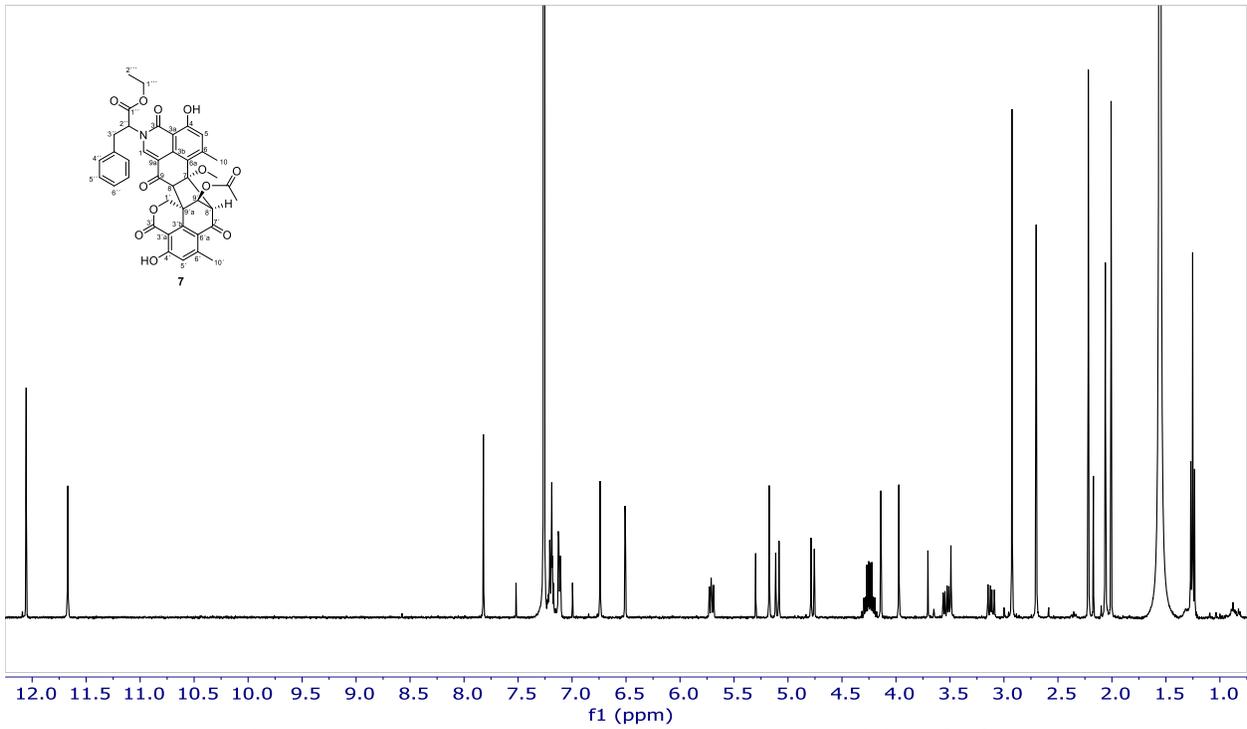


Figura AI- 14. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 01002-107-1 (7) en CDCl<sub>3</sub>.

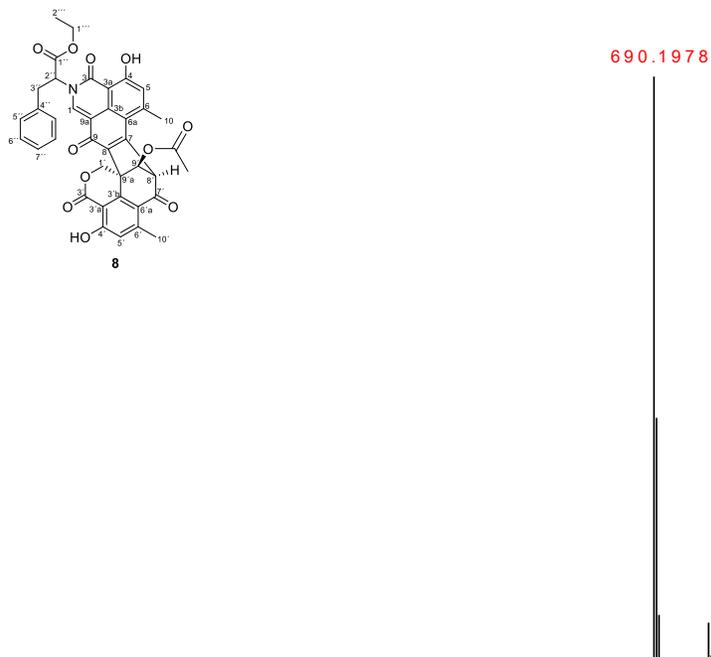


Figura AI- 15. Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de 01002-107-2 (**8**).

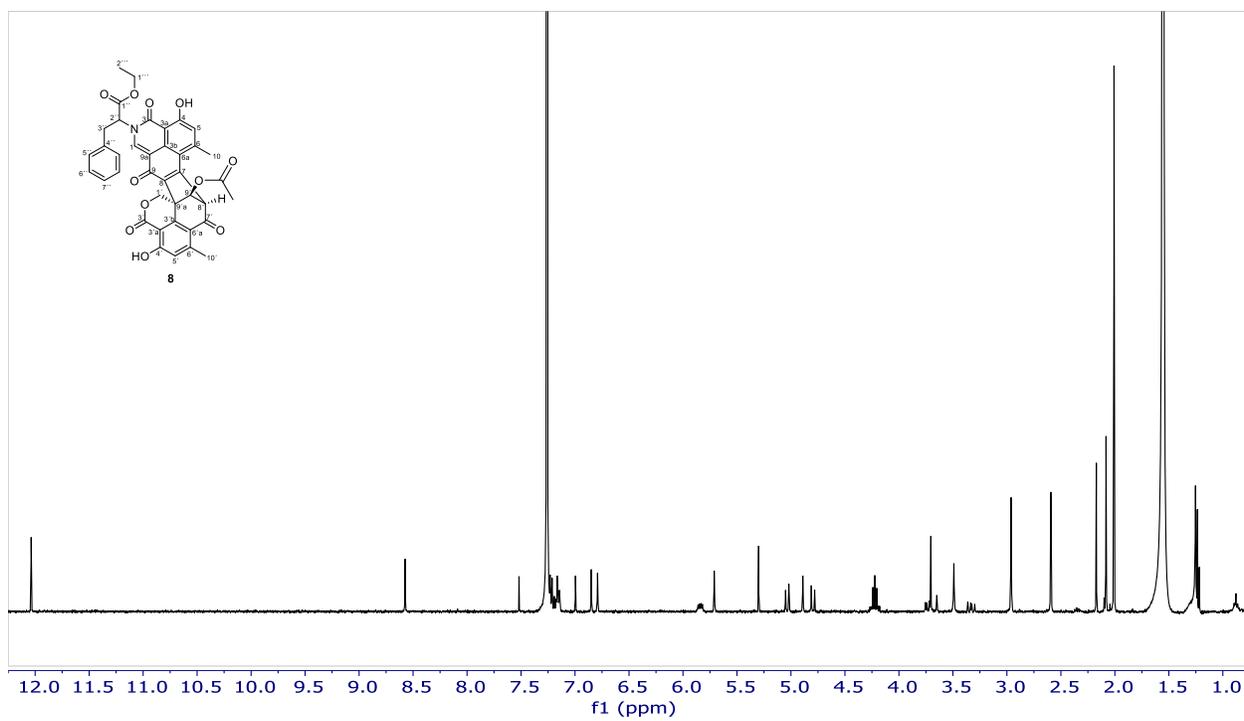
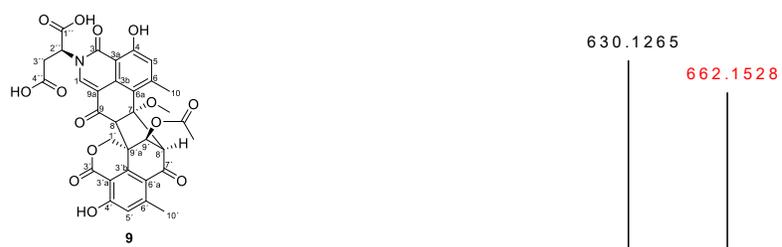
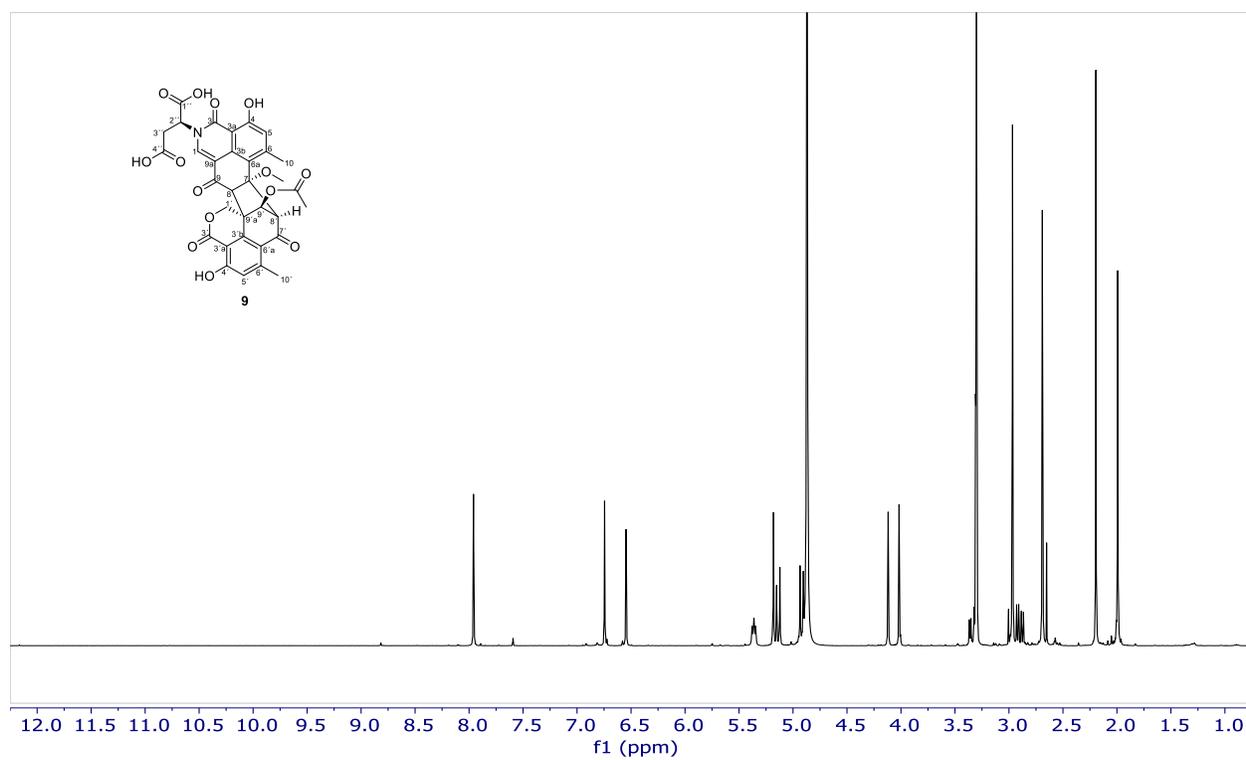


Figura AI- 16. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 01002-107-2 (**8**) en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura Al- 17.** Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de 01002-117-1 (9).



**Figura Al- 18.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de 01002-117-1 (9) en MeOD.

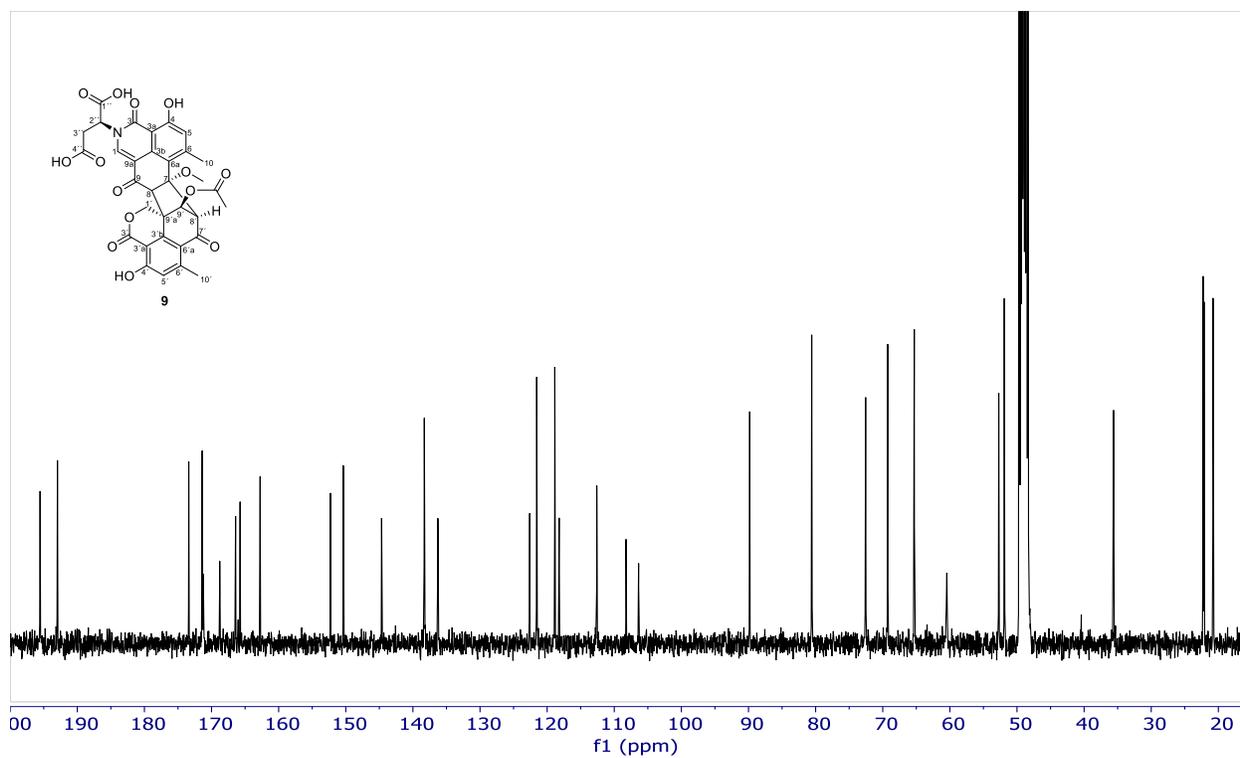


Figura AI- 19. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de 01002-117-1 (9) en MeOD.

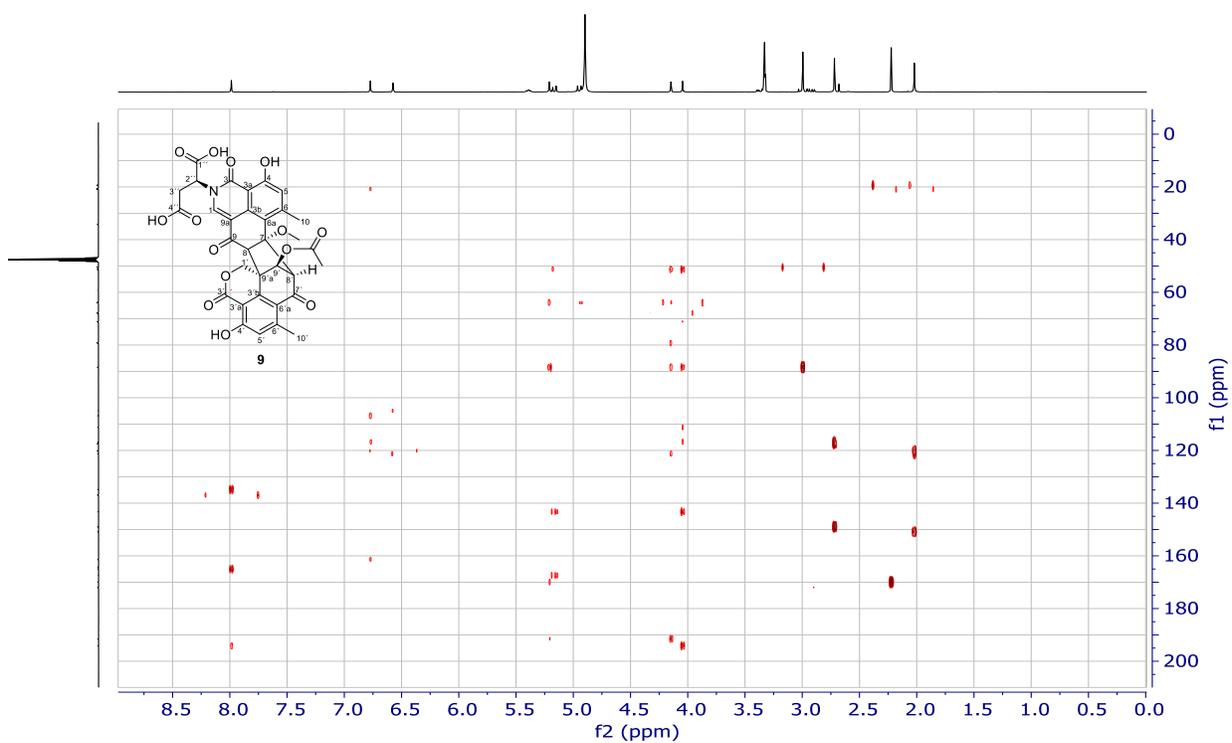
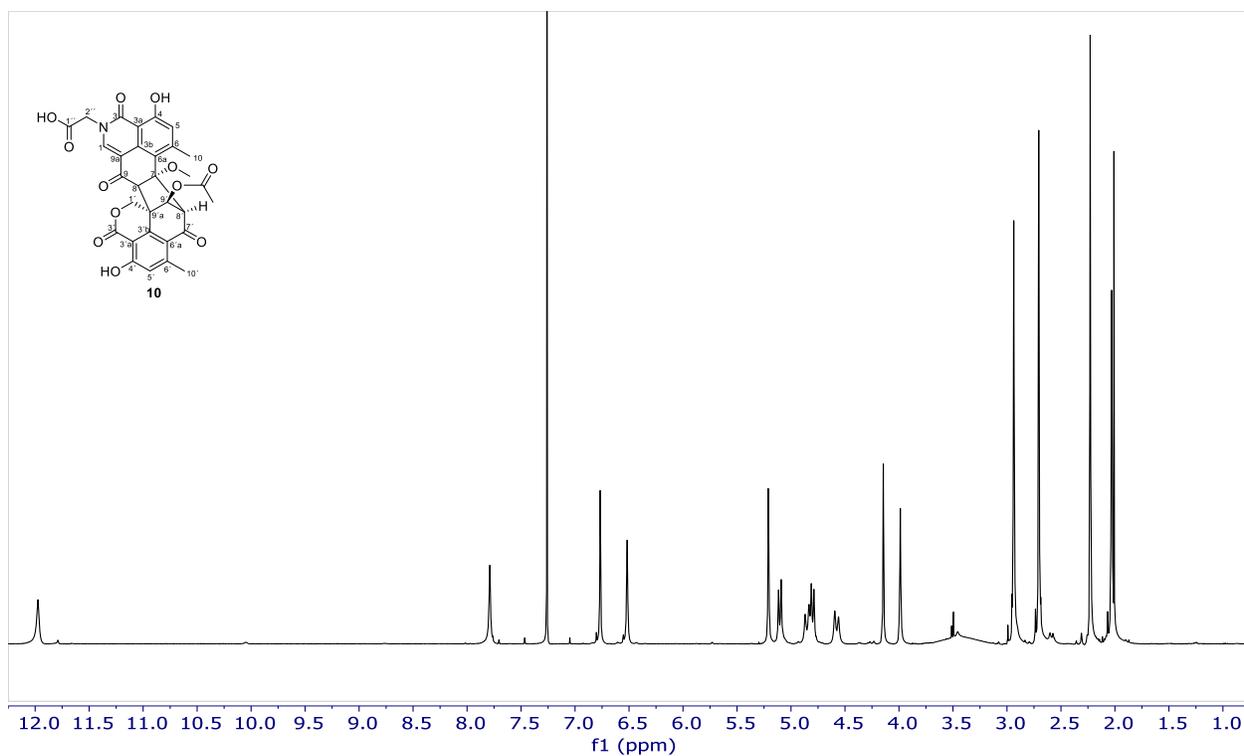


Figura AI- 20. Espectro de HMBC de 01002-117-1 (9) en MeOD.



**Figura AI- 21.** Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de 01002-114-1 (**10**).



**Figura AI- 22.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de 01002-114-1 (**10**) en  $\text{CDCl}_3$ .

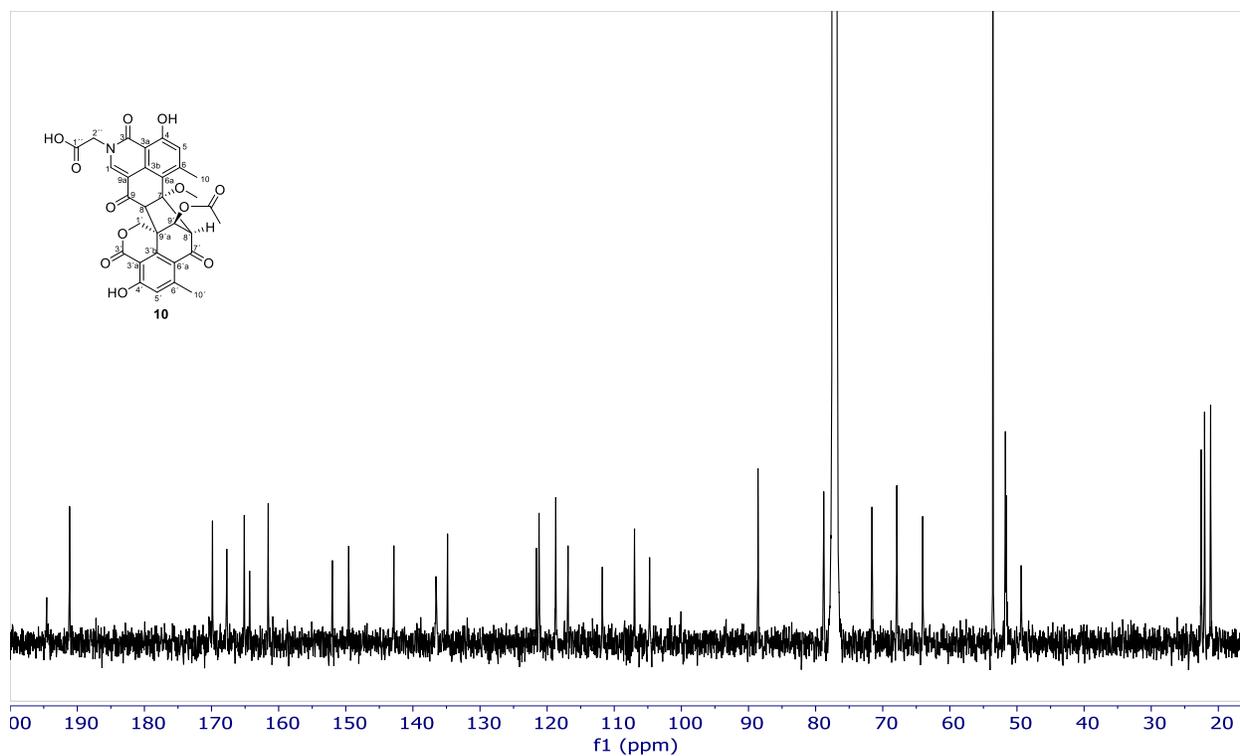


Figura AI- 23. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de 01002-114-1 (10) en  $\text{CDCl}_3$ .

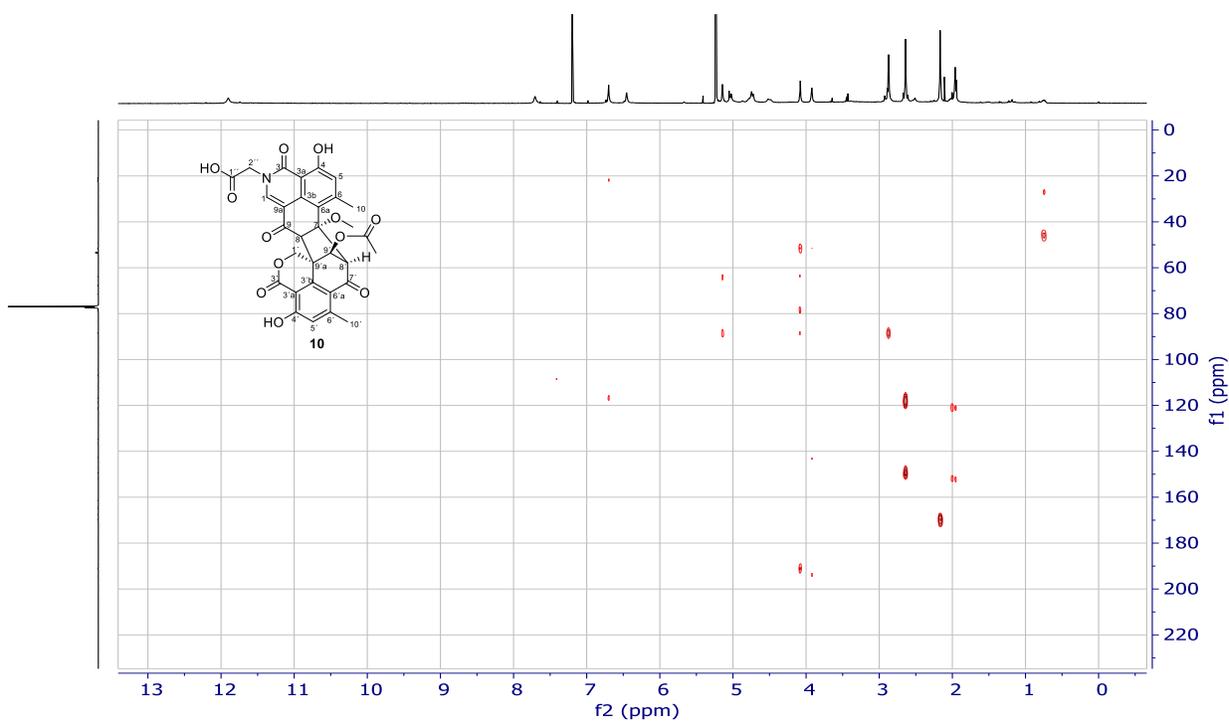


Figura AI- 24. Espectro de HMBC de 01002-114-1 (10) en  $\text{CDCl}_3$ .

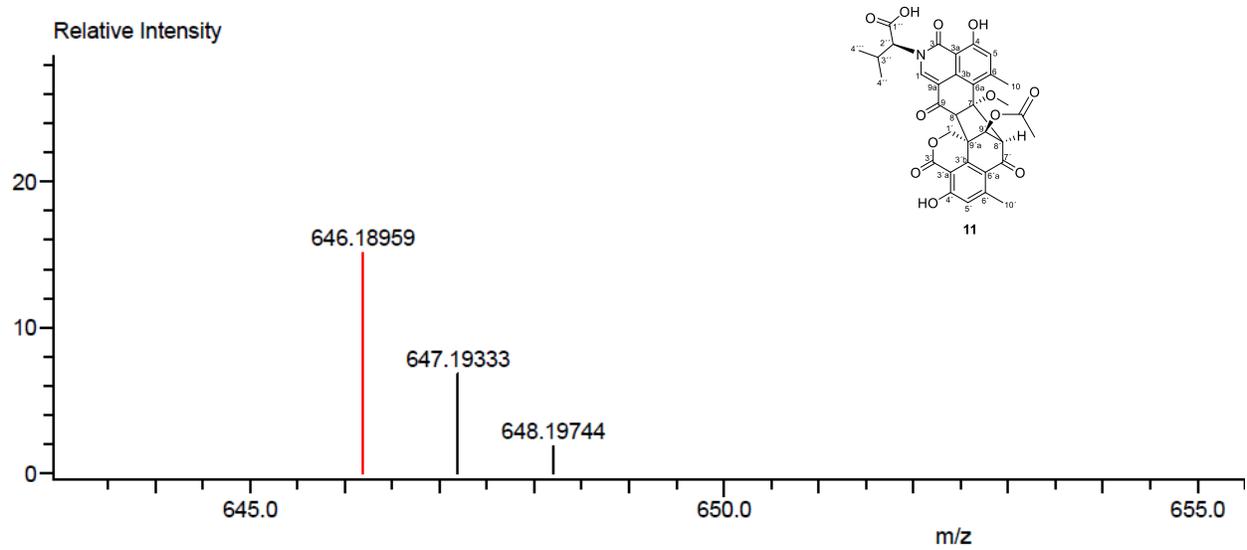


Figura AI- 25. Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-DART de 01002-118-3 (11).

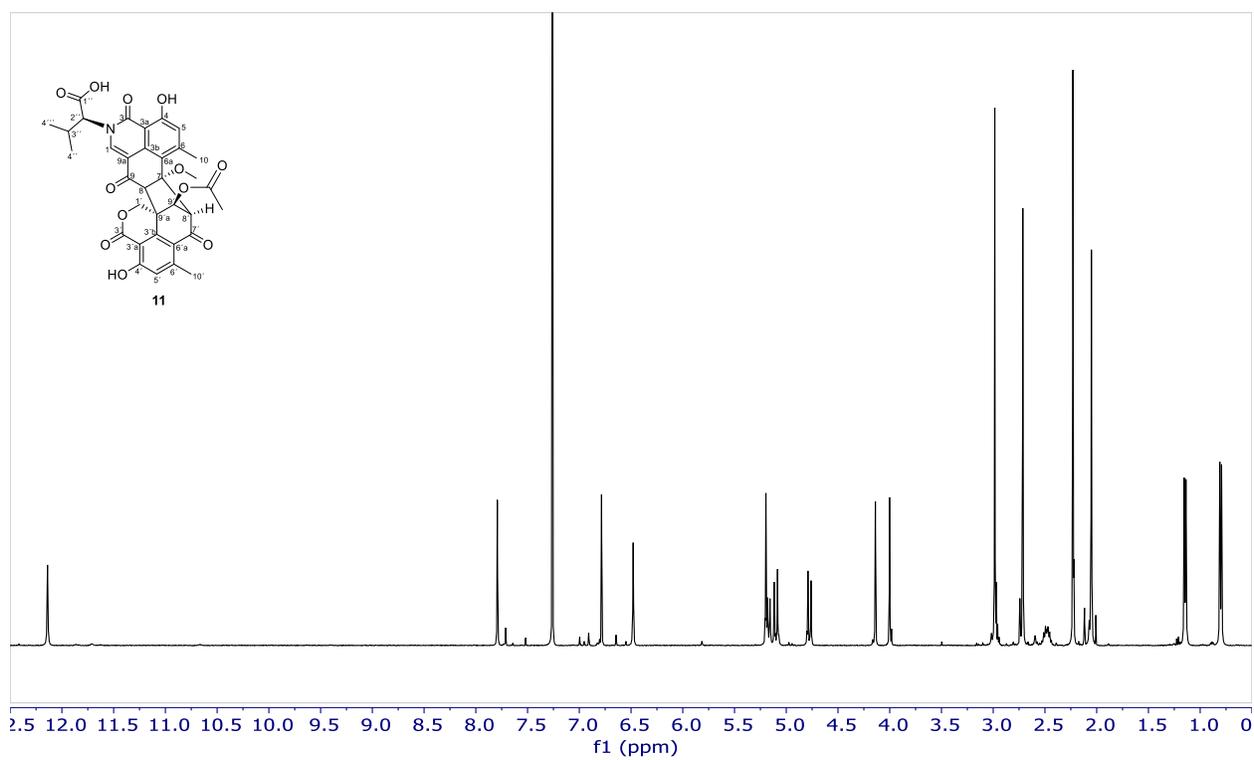


Figura AI- 26. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 01002-118-3 (11) en CDCl<sub>3</sub>.

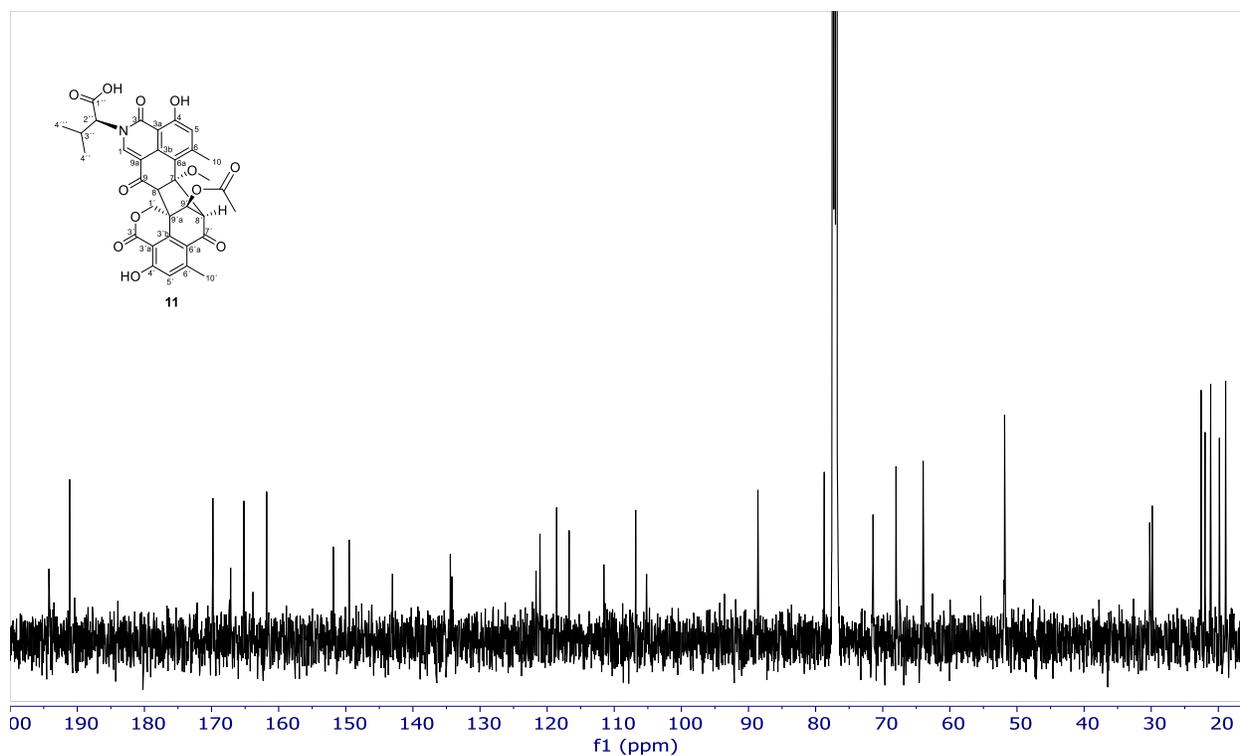


Figura AI- 27. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de 01002-118-3 (11) en  $\text{CDCl}_3$ .

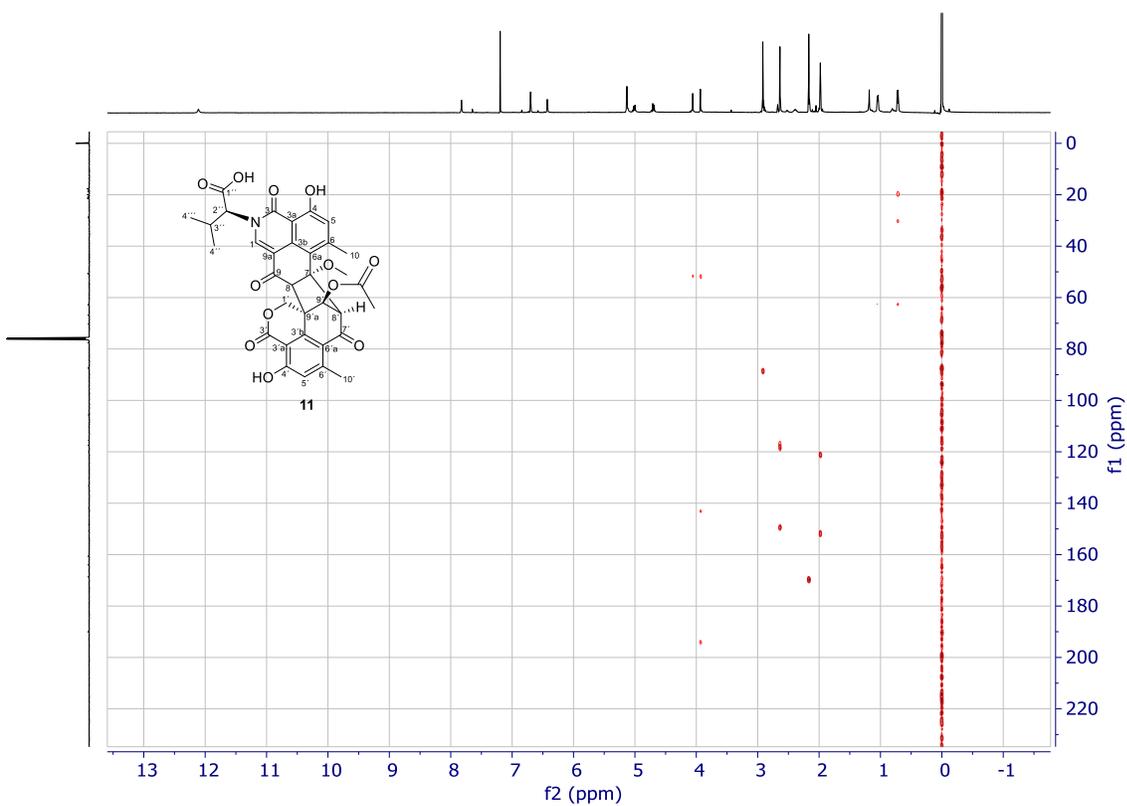


Figura AI- 28. Espectro de HMBC de 01002-118-3 (11) en  $\text{CDCl}_3$ .

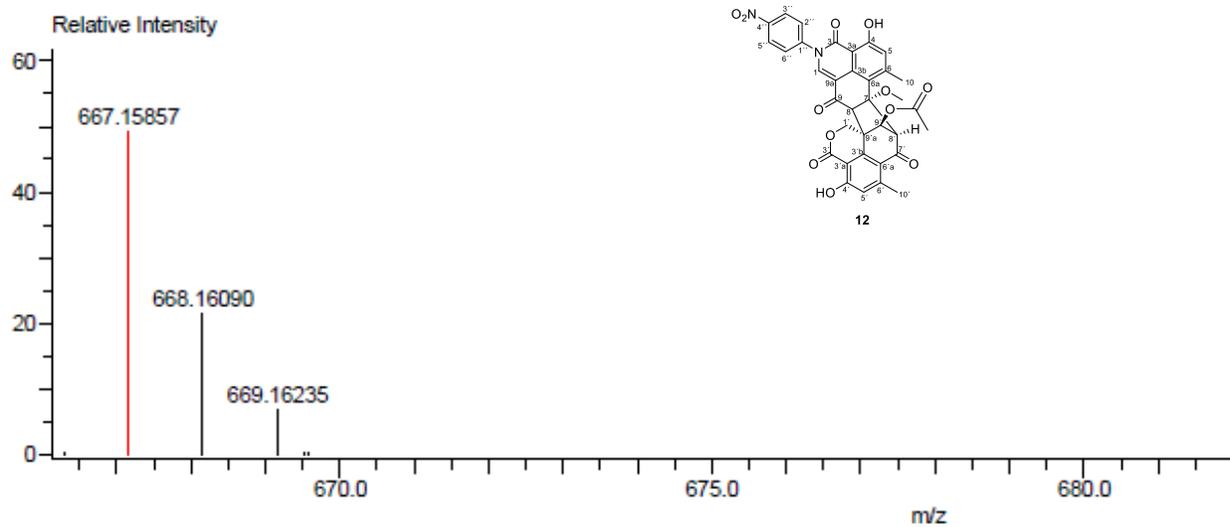


Figura AI- 29. Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-DART de 01002-125-1 (12).

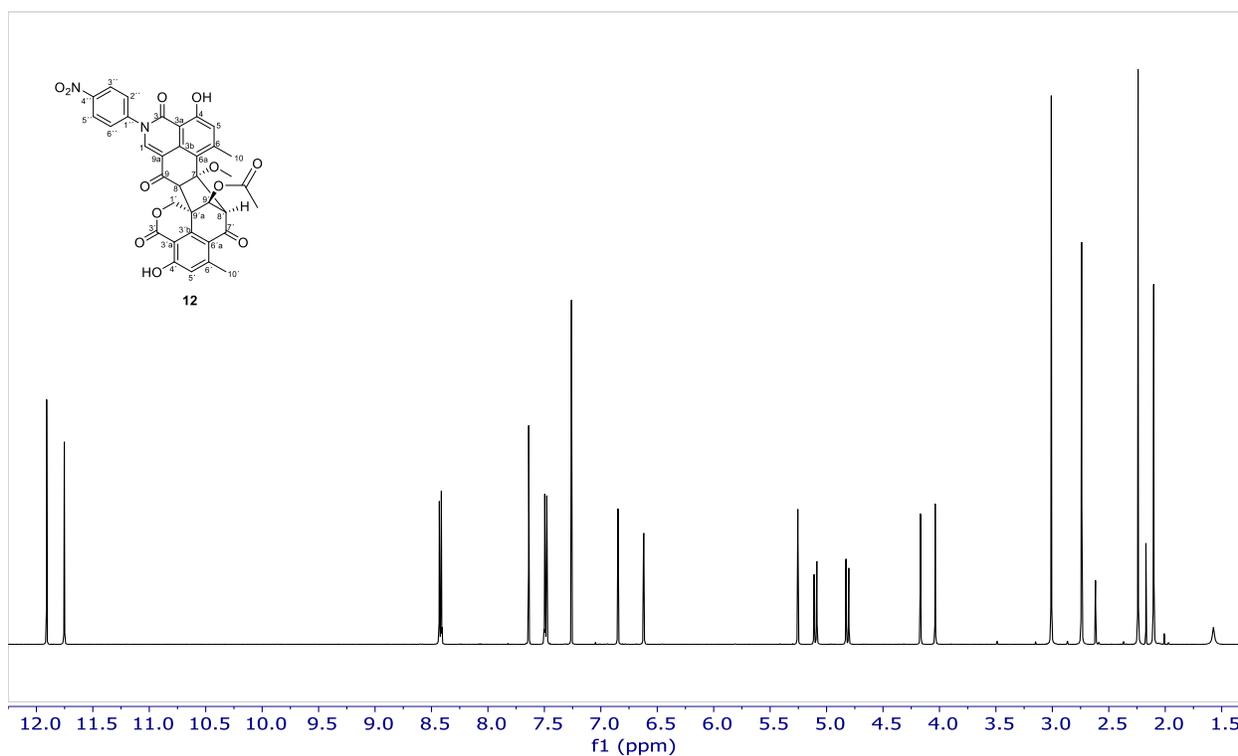


Figura AI- 30. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 01002-125-1 (12) en CDCl<sub>3</sub>.

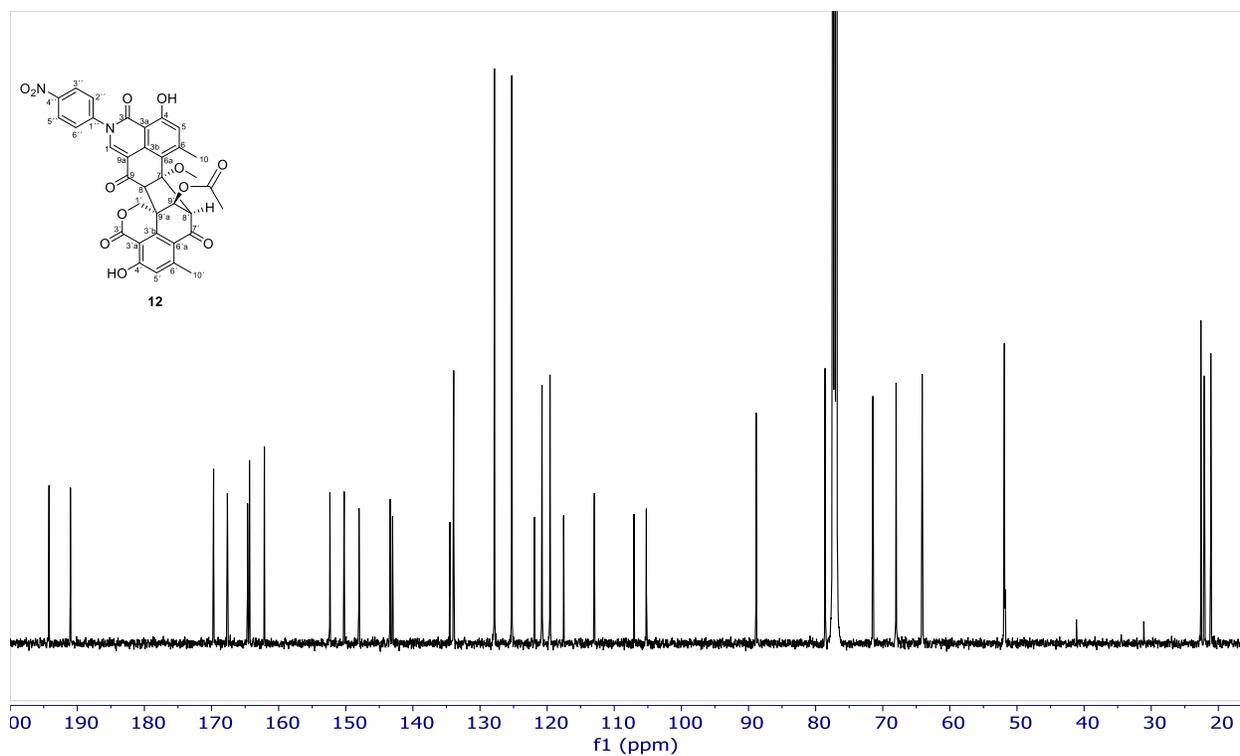


Figura AI- 31. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de 01002-125-1 (12) en CDCl<sub>3</sub>.

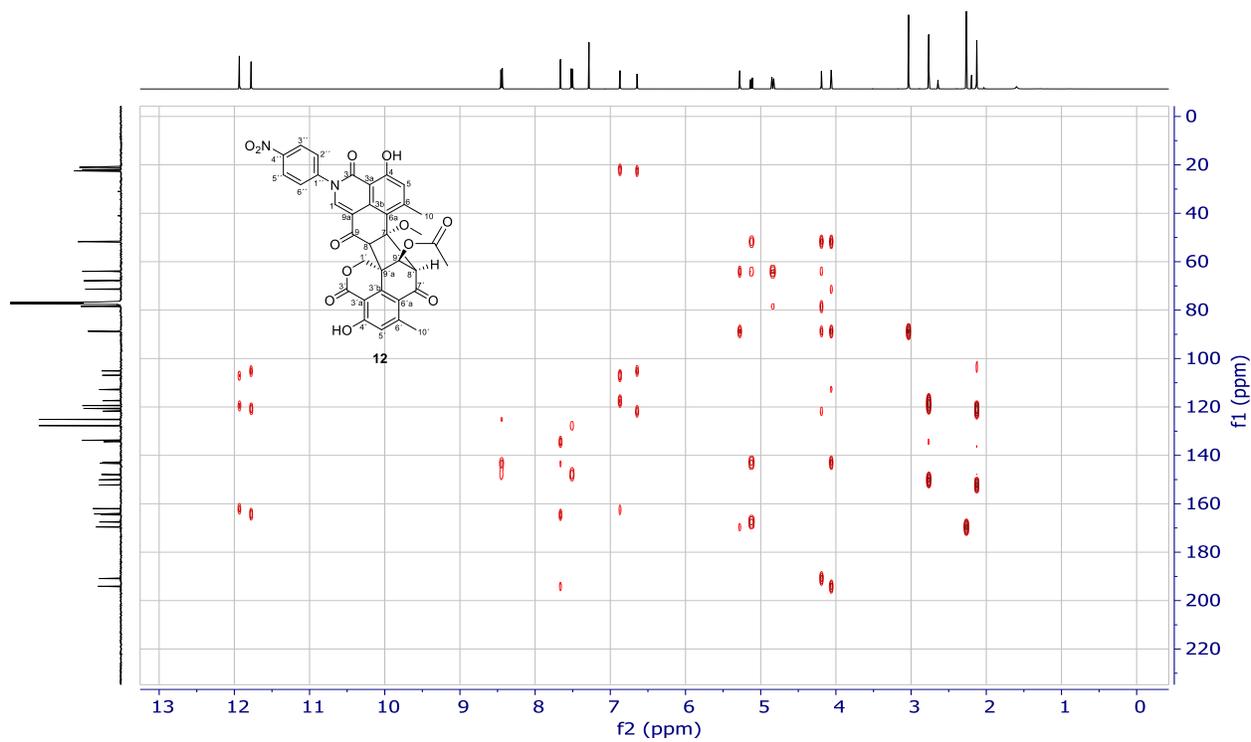
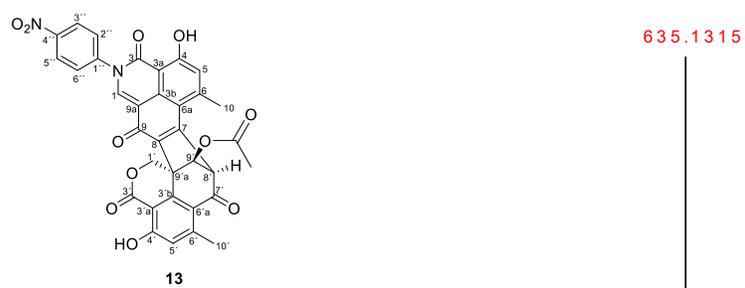
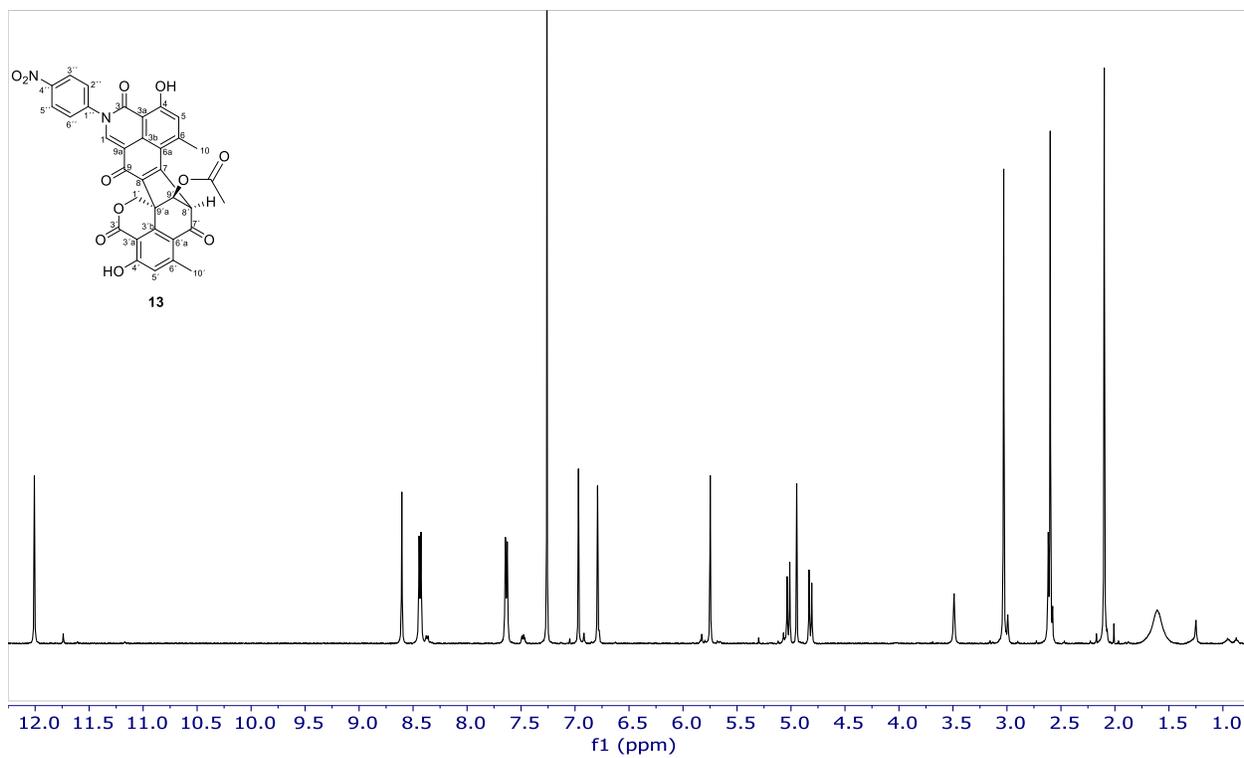


Figura AI- 32. Espectro de HMBC de 01002-125-1 (12) en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura AI- 33.** Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de 01002-135-1 (**13**).



**Figura AI- 34.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 01002-135-1 (**13**) en CDCl<sub>3</sub>.

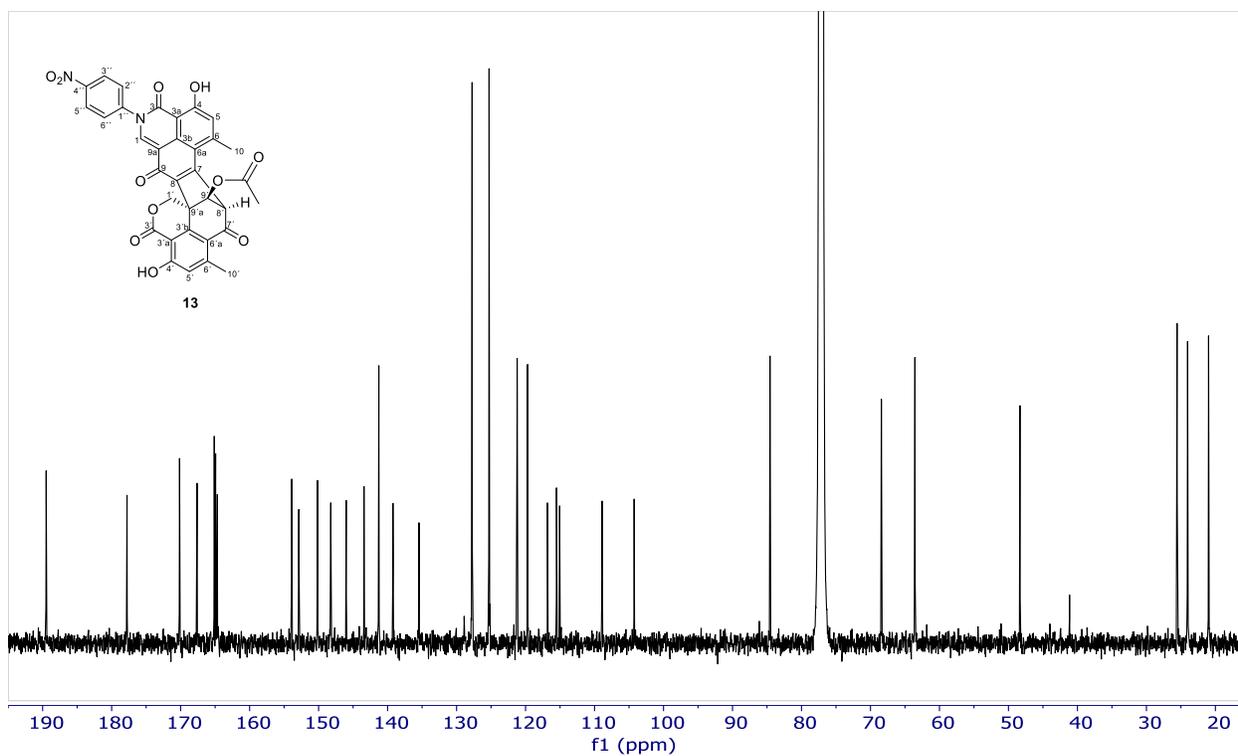
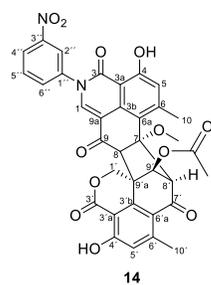


Figura AI- 35. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de 01002-135-1 (**13**) en CDCl<sub>3</sub>.



667.1583

Figura AI- 36. Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de 01002-124-1 (**14**).

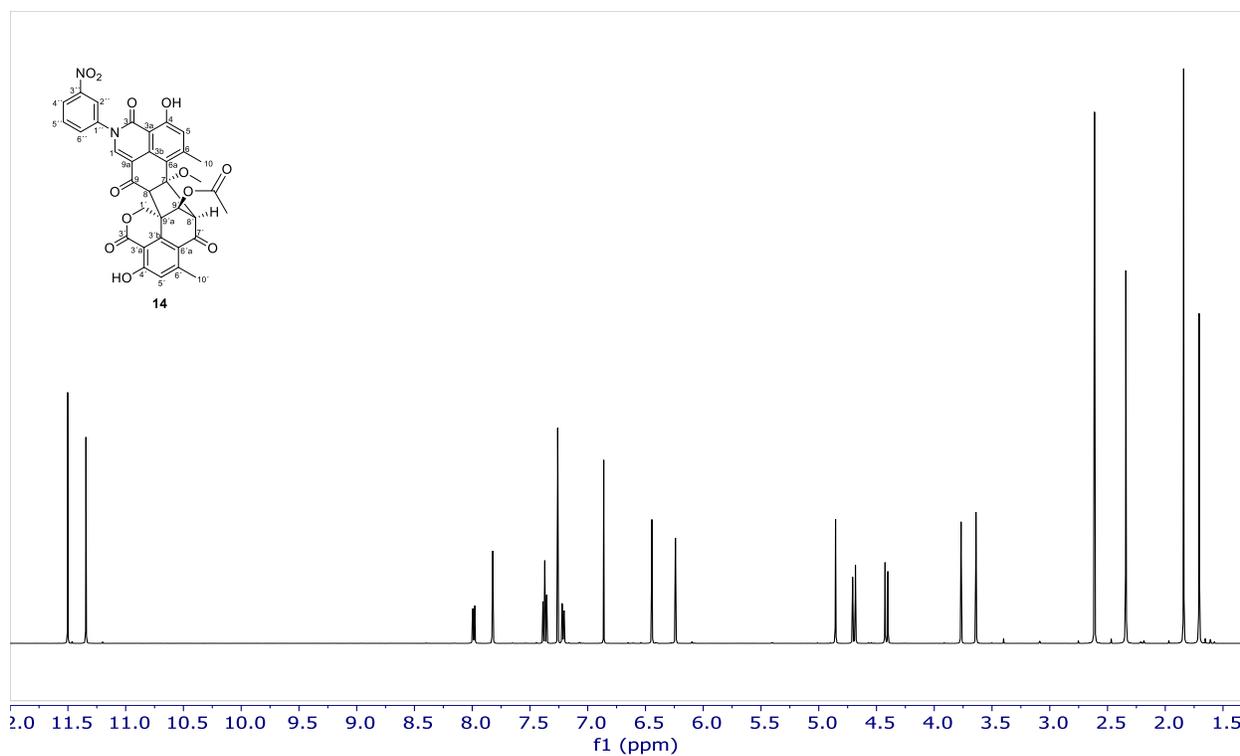


Figura AI- 37. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 01002-124-1 (**14**) en CDCl<sub>3</sub>.

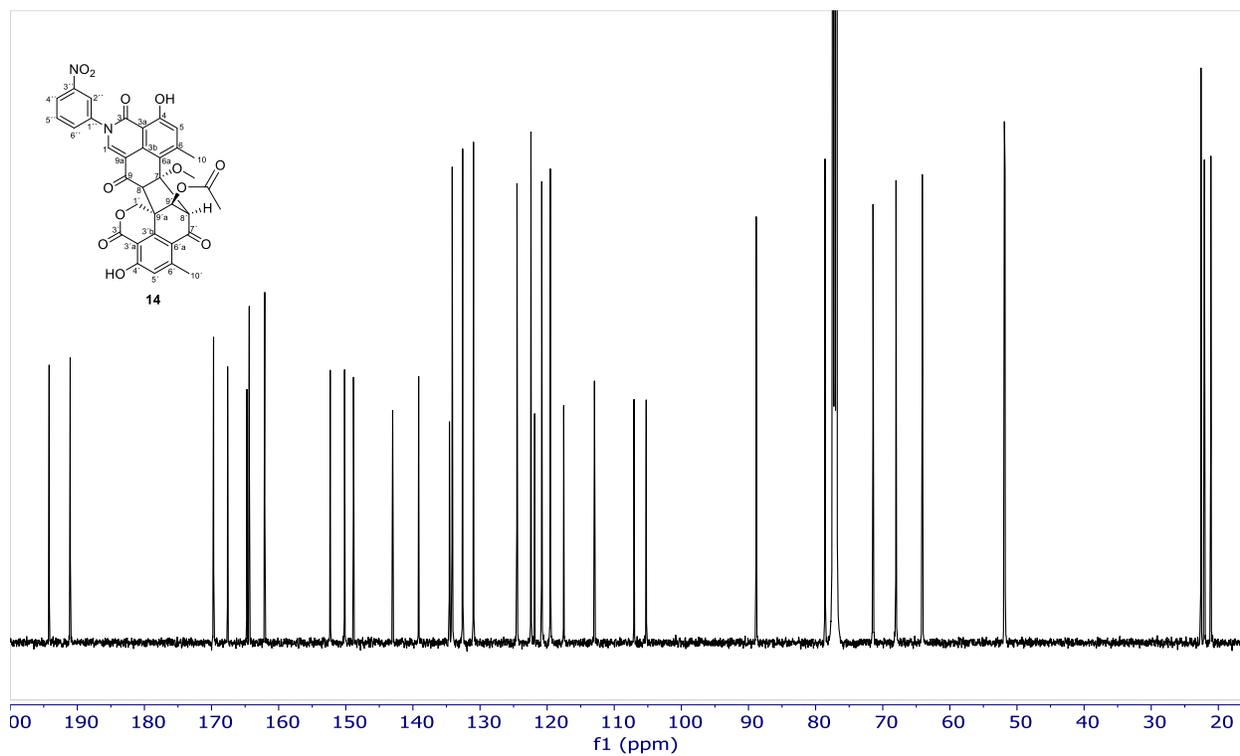


Figura AI- 38. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de 01002-124-1 (**14**) en CDCl<sub>3</sub>.

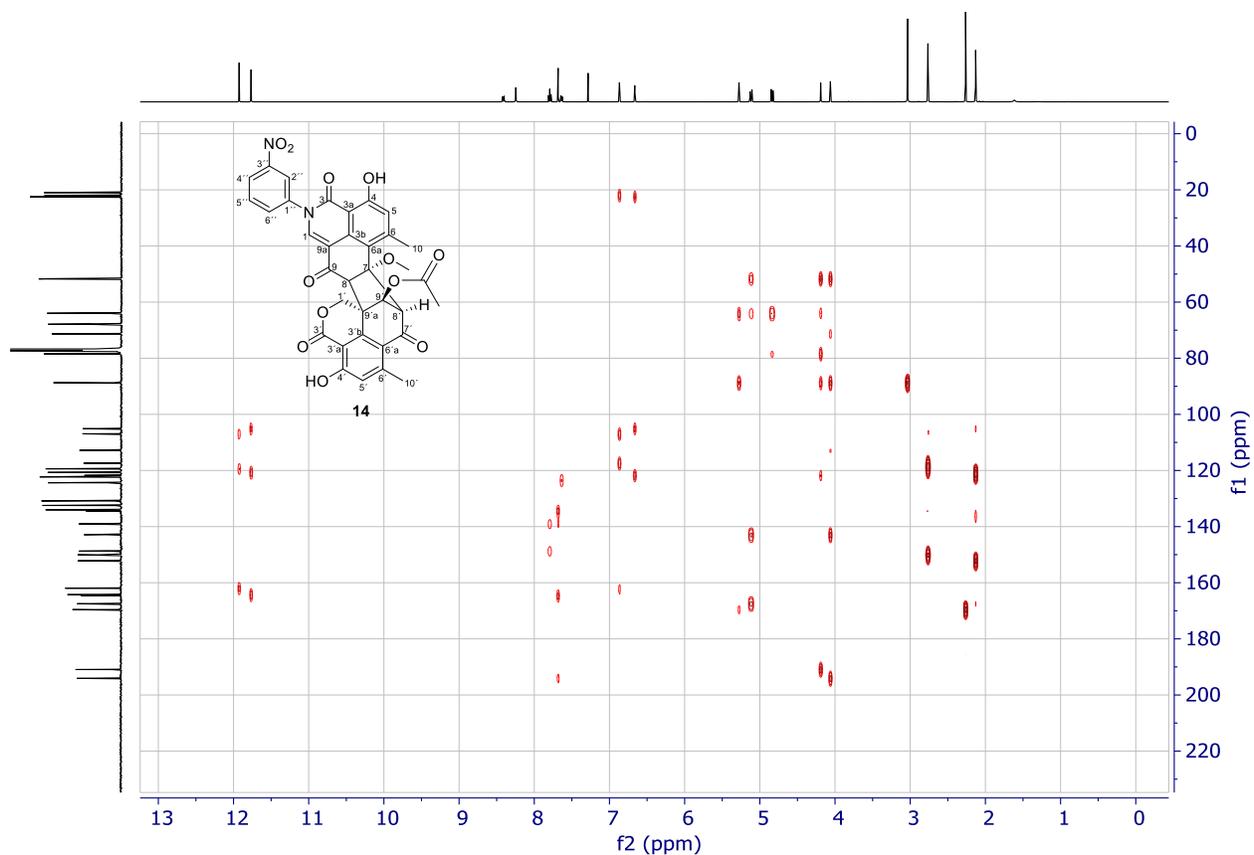


Figura AI- 39. Espectro de HMBC de 01002-124-1 (14) en CDCl<sub>3</sub>.



Figura AI- 40. Espectro de masas de alta resolución obtenido por EM-AR-AJS de 01002-134-1 (15).

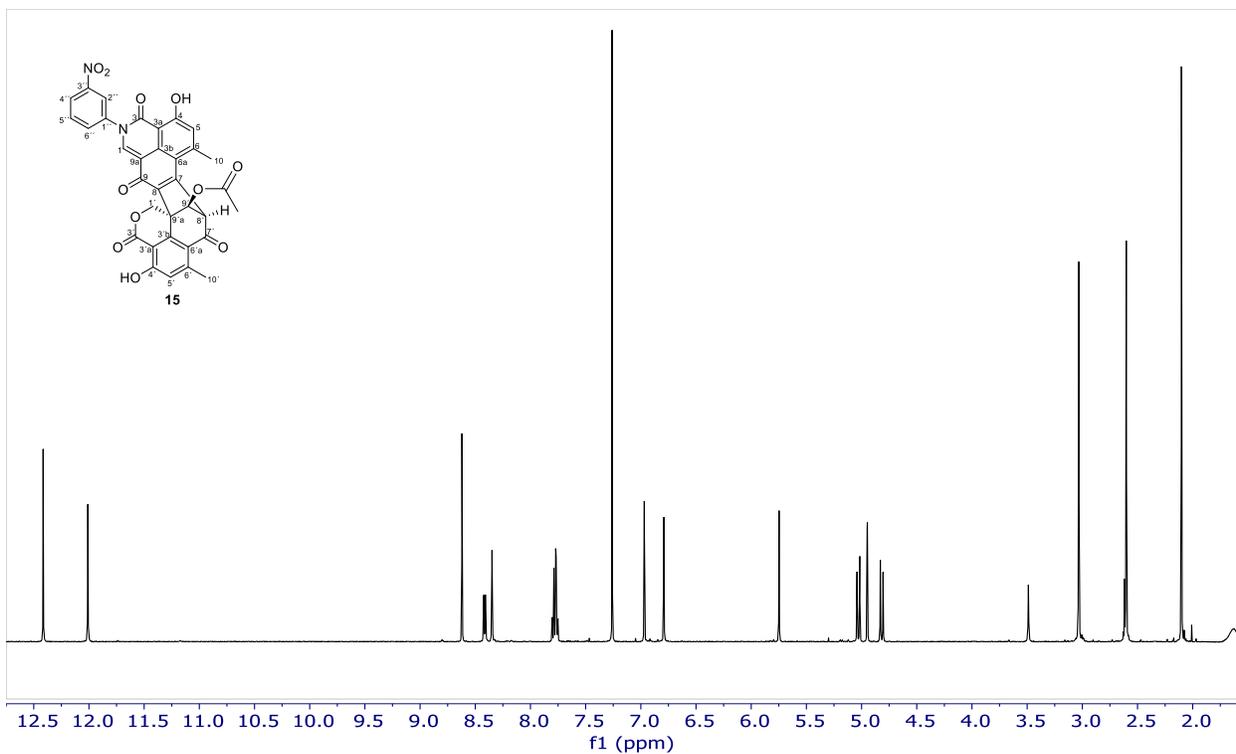


Figura AI- 41. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 01002-134-1 (15) en CDCl<sub>3</sub>.

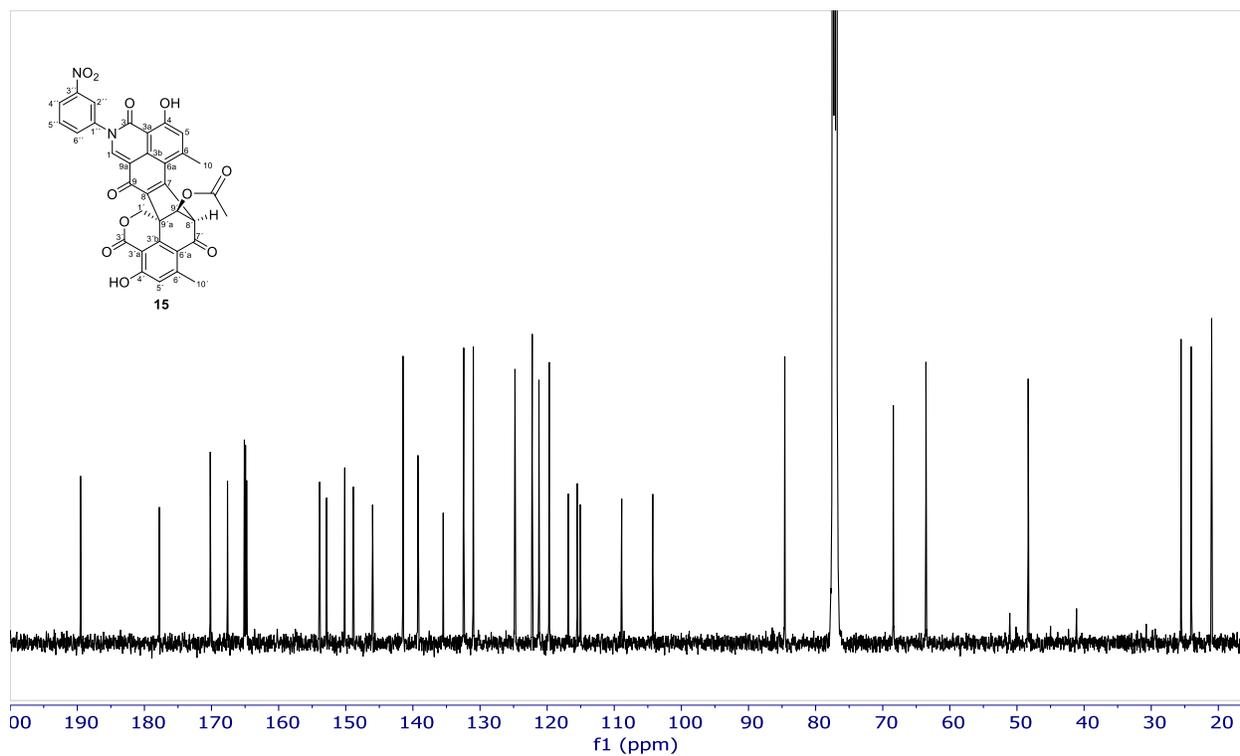


Figura AI- 42. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de 01002-134-1 (15) en CDCl<sub>3</sub>.

## 11. PUBLICACIONES

	Página
Jiménez-Arreola Brenda S., <u>Aguilar-Ramírez Enrique</u> , Cano-Sánchez Patricia, Morales-Jiménez Jesús, González-Andrade Martín, Medina-Franco José L., y Rivera-Chávez José, 2020. <b>Dimeric phenalenones from <i>Talaromyces</i> sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B1-400: Insights into mechanistic kinetics from in vitro and in silico studies.</b> Bioorganic Chemistry. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103893	124
Rivera-Chávez José, Bustos-Brito Celia, <u>Aguilar-Ramírez Enrique</u> , Martínez-Otero Diego, Rosales-Vázquez Luis D., Dorazco González Alejandro y Cano-Sánchez Patricia, 2020. <b>Hydroxy-neo-clerodanes and 5,10-seco-neo-clerodanes from <i>Salvia decora</i>.</b> Journal of Natural Products. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.0c00313	134



## Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B<sub>1-400</sub>: Insights into mechanistic kinetics from *in vitro* and *in silico* studies<sup>☆</sup>

Brenda S. Jiménez-Arreola<sup>a,1</sup>, Enrique Aguilar-Ramírez<sup>a,1</sup>, Patricia Cano-Sánchez<sup>a</sup>, Jesús Morales-Jiménez<sup>b</sup>, Martín González-Andrade<sup>c</sup>, José L. Medina-Franco<sup>d</sup>, José Rivera-Chávez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510, Ciudad de México, Mexico

<sup>b</sup> CONACYT-Consortio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas (CIIDZA), Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4a sección, 78216 San Luis Potosí, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510, Ciudad de México, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510, Ciudad de México, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

hPTP1B<sub>1-400</sub>  
Dimeric phenalenones  
Duclauxin  
*Talaromyces* sp.  
Allosteric modulators/inhibitors  
Homology modeling

### ABSTRACT

A critical biological event that contributes to the appearance and progress of cancer and diabetes is the reversible phosphorylation of proteins, a process controlled by protein tyrosine-kinases (PTKs) and protein tyrosine-phosphatases (PTPs). Within the PTPs, PTP1B has gained significant interest since it is a validated target in drug discovery. Indeed, several PTP1B inhibitors have been developed, from both, synthesis and natural products. However, none have been approved by the FDA, due to their poor selectivity and/or pharmacokinetic properties. One of the most significant challenges to the discovery of PTP1B inhibitors (*in vitro* or *in silico*) is the use of truncated structures (PTP1B<sub>1-300</sub>), missing valuable information about the mechanisms of inhibition, and selectivity of ligands. The present study describes the biochemical characterization of a full-length PTP1B (hPTP1B<sub>1-400</sub>), as well as the description of phenalenones 1–4 and ursolic acid (5) as allosteric modulators. Compounds 1–5 showed inhibitory potential on hPTP1B<sub>1-400</sub>, with IC<sub>50</sub> values ranging from 12.7 to 82.1 μM. Kinetic studies showed that 1 and 5 behave as mixed and non-competitive inhibitors, respectively. Circular dichroism experiments confirmed that 1 and 5 induced conformational changes to hPTP1B<sub>1-400</sub>. Further insights into the structure of hPTP1B<sub>1-400</sub> were obtained from a homology model, which pointed out that the C-terminus (residues 301–400) is highly disordered. Molecular docking with the homologated model suggested that compounds 1 and 3–5 bind to the C-terminal domain, likely inducing conformational changes on the protein. Docking positions of compounds 1, 4, and 5 were refined with molecular dynamics simulations. Importantly, these simulations confirmed the high flexibility of the C-terminus of hPTP1B<sub>1-400</sub>, as well as the changes to its rigidity when bound to 1, 4, and 5.

### 1. Introduction

Chronic diseases cause about 41 million deaths per year, equivalent to 71% of all deaths worldwide. Among them, cardiovascular diseases accounts for the most deaths (17.9 million each year), followed by cancer (9.0 million), respiratory diseases (3.9 million), and diabetes mellitus (1.6 million) [1]. Notably, a critical biochemical event that contributes to the appearance and progress of such diseases is the reversible phosphorylation of proteins, a process actively controlled by

protein tyrosine kinases (PTKs) and protein tyrosine-phosphatases (PTPs), both part of a large enzyme family [2–7]. PTPs are enzymes that catalyze protein tyrosine dephosphorylation. In humans, more than a hundred PTPs have been identified, and can either function as negative or positive modulators in various physiological processes [8]. All PTPs share a common catalytic mechanism based on a nucleophilic cysteine with a low pK<sub>a</sub> that forms a thiophosphate intermediate during catalysis [9]. Within the PTPs, PTP1B has gained significant interest from a pharmacological point of view, since it is an emerging therapeutic

<sup>☆</sup> Taken in part from the Master thesis of E. Aguilar-Ramírez.

\* Corresponding author.

E-mail address: [jrivera@quimica.unam.mx](mailto:jrivera@quimica.unam.mx) (J. Rivera-Chávez).

<sup>1</sup> Authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103893>

Received 9 January 2020; Received in revised form 13 March 2020; Accepted 27 April 2020

Available online 04 May 2020

0045-2068/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

target in the treatment of diabetes and cancer [9]. PTP1B is considered the prototype for the superfamily of PTPs. It is a 50 kDa protein (435 amino acids, Fig. S1). Its structure consists of an N-terminal catalytic domain (PTP domain) followed by two tandem proline-rich motifs (Table S1) [7]. The catalytic domain of PTP1B harbors ten conserved motifs [9], which act in coordination during the catalytic process [9,10].

Since its validation as a target for the development of anti-cancer and anti-diabetic agents, numerous programs have focused their attention on the synthesis or isolation of both competitive and non-competitive inhibitors [8]. Such programs have resulted in the discovery of eriprotafib (6, competitive) and trodusquemine (7, non-competitive), compounds that were discontinued on phase II clinical trials due to their poor selectivity, adverse effects and/or pharmacokinetic properties [11].

Interestingly, since the discovery of an allosteric site in PTP1B that has lower sequence conservation and higher specificity [12], the strategies to discover new inhibitors have shifted, aiming to uncover more specific and less toxic modulators. The allosteric site in PTP1B is located 20 Å away from the catalytic site. It is a hydrophobic pocket constituted by helices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  and  $\alpha 7$  (Fig. S1), situated on the C-terminal domain of the protein [13]. This pocket modulates the flexibility of the WPD loop in the catalytic domain, resulting in a decrease of the phosphatase activity as demonstrated in several studies where the structure of the protein is truncated (lack of  $\alpha 7$ ) [12–14].

Formerly, 6,8-diprenylorobol, 2'-methoxykurarionone, morin, and 3-(3,5-dibromo-4-hydroxy-benzoyl)-2-ethyl-benzofuran-6-sulfonic acid (4-sulfamoyl-phenyl)-amide have been described as allosteric inhibitors of PTP1B, since they bind in the hydrophobic pocket constructed by helices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ , and  $\alpha 7$ , constraining the flexibility of the WPD loop, and compromising its activation [13]. Additionally, trodusquemine (7) an aminosterol isolated from dogfish shark, was recently described as an allosteric modulator of a full length PTP1B, through its interaction with amino acids (Leu<sub>299</sub>, His<sub>310</sub>, Ile<sub>311</sub>, Val<sub>334</sub>, Arg<sub>371</sub>, Arg<sub>373</sub>, Val<sub>375</sub>, and Ser<sub>393</sub>, helix  $\alpha 9'$ ) of the C-terminal domain, with a stoichiometry of 1:2, and binding constants of 300 nM and 1  $\mu$ M [15].

To date, more than 300 PTP1B<sub>1-300</sub> inhibitors have been discovered from nature, including plants and microorganisms [16]. In particular,

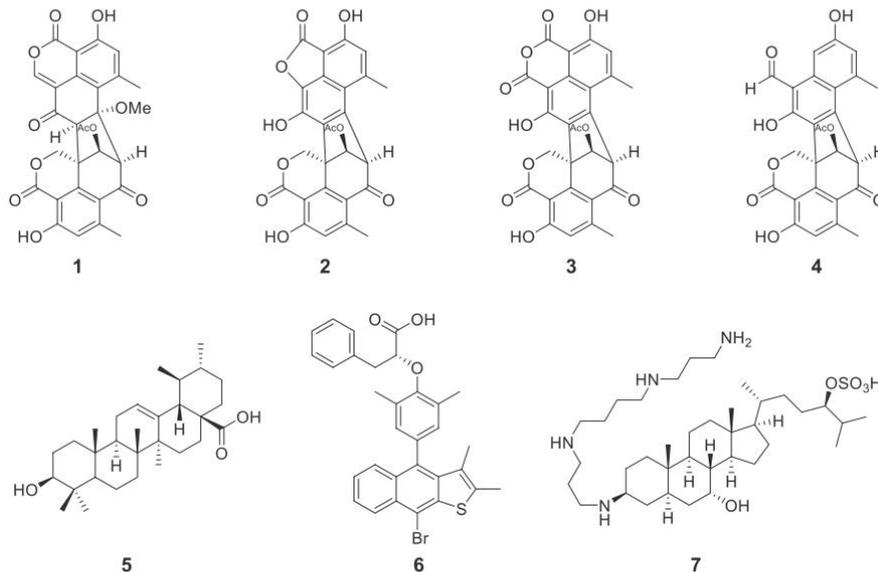
metabolites from fungal species have resulted in the isolation of many different types of PTP1B inhibitors, such as fumosorinone, preautinoid A6, barkeleyone C, fructigenine A, and cyclophenol, with IC<sub>50</sub> values ranging from 14 to 30  $\mu$ M [17–19].

## 2. Results and discussion

As a part of our research program focused on the discovery of allosteric modulators of PTP1B from natural sources, a human PTP1B<sub>1-400</sub> (hPTP1B<sub>1-400</sub>) was overexpressed (70 mg/L) in *Escherichia coli* (Rosetta, (DE3) pLysS™), and a spectrophotometric enzymatic assay developed to evaluate the activity of organic extracts and pure compounds as inhibitors of the protein. Simultaneously, a few anthill associated fungi (Fig. S2) were isolated and cultured on two different solid media (rice and cereal). The extracts were then prepared and tested *in vitro* against hPTP1B<sub>1-400</sub>. The extract from a fungal strain identified as *Talaromyces* sp. (IQ-313, Fig. S3) was chosen for chemical investigation based on its potent activity (84% inhibition at 20 ppm, Fig. S4). Fractionation of this extract using several chromatographic techniques led to the isolation of the dimeric phenalenones (1–4), which were characterized as duclauxin (1) [20], talaromycesone B (2) [21], xenoclauxin (3) [22], and bacillisporin G (4) [23], by comparison of their spectroscopic and spectrometric data with those previously described in the literature. The 1D and 2D NMR for each compound, as well as the MS spectra are provided in the supporting information (Tables S2–S5 and Figs. S5–S23).

### 2.1. Protein expression and purification

To facilitate the expression and purification of the protein, the hPTP1B<sub>1-400</sub> gene was subcloned into a vector pET-28(c) with specific N-terminal peptide tags such as His6 and a TEV protease recognition site. *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS™, BL21 (DE3), Rosetta-gami™ and C41 were used to evaluate the expression of hPTP1B<sub>1-400</sub> at 37 °C. The protein expression was induced with IPTG (0.5 mM) for 6 h. The highest expression levels of active hPTP1B<sub>1-400</sub> (70 mg/L after immobilized Ni<sup>2+</sup> ion-affinity chromatography purification, Fig. S24) were obtained in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS™.



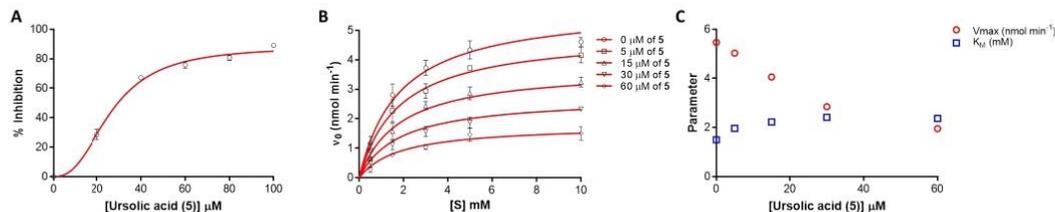


Fig. 1. (A) Concentration-response curve for enzymatic inhibitory activity of ursolic acid (5) against *hPTP1B1-400*. These data corresponds to three independent experiments. (B) Reaction rate vs. substrate concentration graph showing the relative rate of *hPTP1B1-400* in the absence and presence of ursolic acid (5). These data corresponds to three independent experiments. (C) Plot showing the decrease in  $V_{max}$  and no significant changes on  $K_M$  characteristic of a non-competitive inhibition.

## 2.2. Enzymatic assay

A photocolometric assay was developed using *p*-nitrophenol phosphate (pNPP, 3 mM) as substrate and 300 nM *hPTP1B1-400* in a final volume of 100  $\mu$ L, in a 96 well plate format at 37  $^{\circ}$ C. The buffer (50 mM HEPES pH 6.8, 100 mM NaCl, 1.5 mM DTT) and assay conditions were determined from the literature and subsequently optimized [15,24]. The assay was established following the assay guidance manual for High Throughput Screening (HTS) enzymatic assays [25]. The enzyme activity was expressed as the amount of pNP produced per minute. To determine the kinetic parameters ( $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ ,  $K_M$ , and  $k_{cat}/K_M$ ), reaction progress curves were obtained at a range of substrate concentrations. The initial velocities were then plotted against substrate concentration and fitted using a non-linear regression analysis to the Michaelis-Menten model (Fig. S25). The estimated parameters  $V_{max}$  ( $3.2 \pm 0.1$  nmol min $^{-1}$ ),  $k_{cat}$  (107 s $^{-1}$ ),  $K_M$  ( $2.8 \pm 0.3$  mM), and  $k_{cat}/K_M$  ( $3.8 \times 10^4$  M $^{-1}$  s $^{-1}$ ), indicated that the velocity is very sensitive to changes in substrate concentration, and the enzyme has an excellent catalytic conversion rate, comparable with other PTP1Bs, under the assay conditions [26]. Thus, the enzymatic assays to screen for small molecule inhibitors were carried out at a substrate concentration of 3.0 mM, to insure a broad representation of compounds with different inhibition modalities [27].

Subsequently, the tolerance of the *in vitro* assay to DMSO was determined; the results from this evaluation indicated that DMSO concentrations up to 10% did not decrease the activity of the enzyme.

A standard inhibitor of PTP1B<sub>1-300</sub>, ursolic acid (5) (Fig. 1) was used to validate the suitability of the assay for small molecules screening and mechanism of action [28–30]. To obtain the IC<sub>50</sub> value, the enzymatic activity of *hPTP1B1-400* in the presence of an increasing concentration of 5 was determined. Ursolic acid (5) inhibited *hPTP1B1-400* in a concentration-dependent fashion with an IC<sub>50</sub> value of  $26.6 \pm 1.8$   $\mu$ M (Fig. 1A) and 89% of maximum inhibition, similar to data previously reported [29,31]. To determine the type of inhibition, the initial velocities were measured at different substrate and ursolic acid (5) concentrations, to monitor the variation of IC<sub>50</sub> values and kinetic parameters. Kinetic studies demonstrated that ursolic acid (5) behaves as a non-competitive inhibitor (Fig. 1B) against *hPTP1B1-400*. The later was confirmed by the fact that increasing inhibitor concentration decreased the  $V_{max}$  with non-significant changes in the  $K_M$  values (Fig. 1C). Interestingly, the outcomes from our study differ from those reported by Zhang W., et al., where compound 5 was described as a competitive inhibitor of a truncated PTP1B. Importantly, these facts reinforce our hypothesis that the use of truncated structures of PTP1B in *in vitro* or *in silico* approaches to discover new inhibitors might lead to loss of valuable information about the mechanisms of inhibition, and selectivity.

## 2.3. Phenalenones as *hPTP1B1-400* inhibitors, evaluation, and kinetics studies

Dimeric phenalenones 1–4 inhibited *hPTP1B1-400* in a concentration-dependent manner (Fig. S26) with IC<sub>50</sub> values of 12.7, 82.1, 21.8,

and 13.4  $\mu$ M, respectively, indicating that small differences in the structures have an impact on the enzymatic activity. Compounds 1, 3, and 4 were as active as ursolic acid (IC<sub>50</sub> =  $26.6 \pm 1.8$   $\mu$ M), used as a positive control, while compound 2 was three times less potent. To date, about 300 inhibitors of PTP1B<sub>1-300</sub> have been isolated from plants and microorganisms [16]; however, this is the first time phenalenones are described as inhibitors of PTP1B, and constitute the first reported fungal natural products that bind to *hPTP1B1-400*. Interestingly, among the vast variety of natural products isolated from *Talaromyces* spp. just talarodrine, a nonadride derivative has been described as a PTP1B inhibitor [32].

## 2.4. Duclauxin (1) is a mixed-type inhibitor of *hPTP1B1-400*

To obtain further information on the nature of the interaction of the most active compound, duclauxin (1) with *hPTP1B1-400*, kinetic studies were carried out. In this regard, the initial velocities were measured at different substrate and compound 1 concentrations. The results shown in Fig. 2 indicate that 1 acts as a reversible mixed-type inhibitor (Fig. 2A), since increasing concentrations of 1 result in increasing  $K_M$  and decreasing  $V_{max}$  values (Fig. 2B). The  $k_i$  and  $\alpha$  values were  $11.5 \pm 1.9$   $\mu$ M, and 3.3, respectively. These results suggest that 1 binds to both, the complex *hPTP1B1-400*-pNPP and *hPTP1B1-400*. Notably, in this case ( $\alpha > 1$ ), 1 binds with slightly higher affinity to *hPTP1B1-400* than the complex, decreasing the affinity for pNPP.

## 2.5. Duclauxin (1) and ursolic acid (5) induce conformational changes in *hPTP1B1-400*

To experimentally confirming that compounds 1 (the most active and abundant phenalenone), as well as the reference (5), bind to *hPTP1B1-400*, circular dichroism (CD) experiments in the far UV region were carried out. This tool allows easy and quick determination of the secondary structure and folding of proteins [33]. More specifically, CD is commonly used to gain insights about the conformation or stability of proteins, and can also be used to study protein interactions [33]. In this study, CD experiments were performed using 5  $\mu$ M *hPTP1B1-400* by itself, and in the presence of 20  $\mu$ M of 1 or 5 (Fig. 3). The result from this experiment demonstrated that both compounds induce conformational changes in the protein, slightly altering its secondary structure. In the case of 1, analysis of the CD spectra showed an increase in the content of turns, and parallel and antiparallel  $\beta$ -strands, whereas  $\alpha$ -helix and disordered regions decreased in comparison with the native protein (Figs. S27 and S28). Compound 5 also induced changes in the conformation of the protein; however, in this case, the disorder was increased, along with antiparallel  $\beta$ -strands and  $\alpha$ -helix, while parallel  $\beta$ -strands decreased (Fig. 4B). Altogether, CD experiments confirmed that 1 and 5 bind to *hPTP1B1-400*, inducing conformational changes that directly impact its activity. These results are in good agreement with those obtained from the kinetics studies.

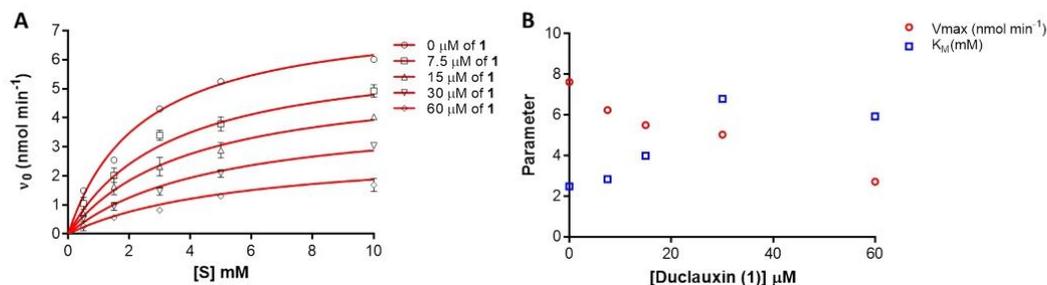


Fig. 2. (A) Reaction rate vs. substrate concentration graph showing the relative rate of hPTP1B<sub>1-400</sub> in the absence and presence of duclauxin (1). These data corresponds to three independent experiments. (B) Plot showing the decrease in  $V_{\text{max}}$  and increase on  $K_M$  characteristic of a mixed-type inhibition.

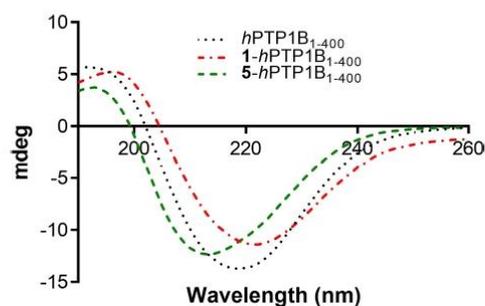


Fig. 3. Circular dichroism curves for hPTP1B<sub>1-400</sub> (black), 1-hPTP1B<sub>1-400</sub> (red), and 5-hPTP1B<sub>1-400</sub> (green). These data correspond to three independent experiments. The plot shows the conformational changes induced by compounds 1 and 5 into the structure of hPTP1B<sub>1-400</sub>. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

## 2.6. Homology modelling of hPTP1B<sub>1-400</sub>

Currently, about 259 hPTP1Bs of different lengths ranging from 297 to 321 amino acids have been crystallized (51) or co-crystallized (202) with competitive and/or non-competitive inhibitors (PDB IDs are given in the Supporting Information), however, to date there is no available crystallographic information of hPTP1B<sub>1-400</sub> [15,24]. One of the reasons is that the C-terminal domain, (noncatalytic segment, residues 300–393) is mostly unstructured [15]. Thus, in order to gain further insights about the structure of hPTP1B<sub>1-400</sub>, and its putative interactions with compounds 1–5, a homology model was built, using the I-TASSER server (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) [34,35].

The 3D structure of hPTP1B<sub>1-400</sub> was assembled using nine templates with identities to the sequence  $\geq 99\%$ , and Z-scores  $> 1$ . Following the I-TASSER protocol, the server generated five models (Fig. 5, .pdb file is provided as Supplementary material). The accuracy of each model was measured using the C-score (confidence score, where higher value signifies a model with higher confidence), which ranged from  $-2.19$  to  $-2.88$  [34]. Additionally, the stereochemical quality of each model was checked using the PROCHECK suite. Results from this analysis indicated that for model 1 (C-score  $-2.19$ ), 99.7% of the amino acids were in the most favored or allowed regions of the Ramachandran plot (Supporting Information, Fig. S29). This data are comparable with crystallographic structures, indicating that the quality of the model is good enough to be used in further analysis such as docking.

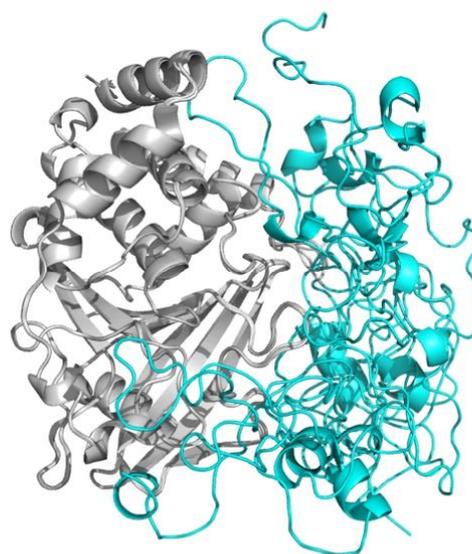


Fig. 4. Top five models generated by I-TASSER server for hPTP1B<sub>1-400</sub>. In grey, is the ensemble of five models overlapping residues 1–300. PTP1B residues 301–400, showing the disordered C-terminal domain in several conformations are displayed in cyan. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

## 2.7. Molecular docking

To gaining structural insights about the putative binding mode of compounds 1–5 with hPTP1B<sub>1-400</sub>, docking studies were performed using the homologated structure. Before molecular docking of 1–5 was performed, the protocol was established and validated by predicting the binding mode of pNPP (Fig. S30), as this protein has not been crystallized. Results from the validation, which was quantitatively measured by the number of poses by blind docking in the predicted binding site (28/100), indicated that the software (AutoDock) and docking protocol successfully predict the binding mode of the ligands, as pNPP binds into the catalytic domain in a proper conformation for the hydrolysis of the phosphate group (Fig. S30).

Compounds 1–5 were then docked with the homology model for hPTP1B<sub>1-400</sub>. The predicted lowest energy conformation for each ligand in a blind docking, the  $k_i$ 's, the  $\text{IC}_{50}$  values, and the experimental  $k_i$ 's for all compounds are summarized in Table 1. The binding sites predicted by AutoDock for the interaction of 1–5 with hPTP1B<sub>1-400</sub> are depicted in

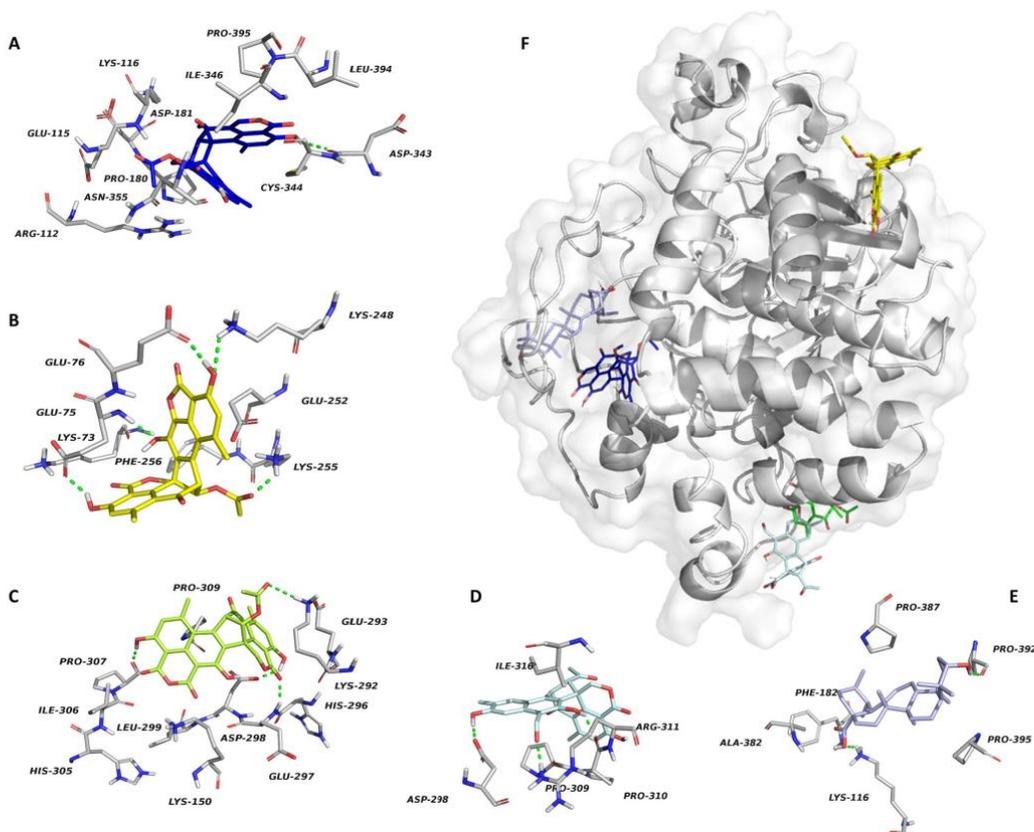


Fig. 5. (A) 3D Representation of the interaction of the complex duclauxin (1) and hP1B<sub>1-400</sub>. (B) 3D Representation of the interaction of the complex talaromycesone B (2) and hP1B<sub>1-400</sub>. (C) 3D Representation of the complex xenoclauxin (3) and hP1B<sub>1-400</sub>. (D) 3D Representation of the complex bacillisporin G (4) and hP1B<sub>1-400</sub>. Sticks in grey represent the amino acids that constitute the binding pocket. (E) 3D Representation of the complex ursolic acid (5) and hP1B<sub>1-400</sub>. (F) Combined structural model of the complex duclauxin (1)-hP1B<sub>1-400</sub> (blue sticks), talaromycesone B (2)-hP1B<sub>1-400</sub> (yellow), xenoclauxin (3)-hP1B<sub>1-400</sub> (green), bacillisporin G (4)-hP1B<sub>1-400</sub> (palecyan), and ursolic acid (5)-hP1B<sub>1-400</sub> (lightblue). Graphics generated with PyMol. For clarity the full-size images are provided in the Supporting Information file (Figs. S31–S36). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Binding energies and estimated  $k_i$ 's of compounds 1–5 interacting with the homologated model generated for hP1B<sub>1-400</sub>. Experimental IC<sub>50</sub> values (1–5) and  $k_i$ 's for compounds 1 and 5.

Compd	Model hP1B <sub>1-400</sub> *Binding Energy (kcal/mol)	* $k_i$ (μM)	Experimental $k_i$ (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	Type of inhibition
1	-5.5	93.1	11.5	12.7	Mixed
2	-5.8	60.8	ND	82.1	ND
3	-6.4	20.0	ND	21.8	ND
4	-5.6	77.2	13.3	13.5	Mixed
5	-6.9	8.5	26.5	26.7	Non-competitive

\* Estimated values from molecular docking. ND: No determined.

Fig. 5A and S31. Results from this study indicated that 1 binds in a pocket formed by amino acids of the C-terminal domain (ASP<sub>343</sub>, CYS<sub>344</sub>, ILE<sub>346</sub>, ASN<sub>355</sub>, and PRO<sub>395</sub>), and a loop of the N-terminal region constituted by ARG<sub>112</sub>, GLU<sub>115</sub>, LYS<sub>116</sub>, PRO<sub>180</sub>, and ASP<sub>181</sub>, the latter being an amino acid involved in the catalytic site. Compounds 3–5 also interact

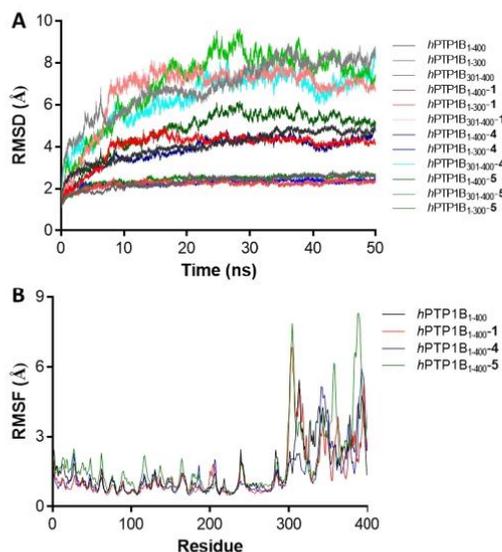
with amino acids of the C-terminal domain (Figs. 5C–F and S33–S36). Conversely, compound 2 binds in a pocket composed mainly by amino acids of the N-terminal domain (LYS<sub>73</sub>, GLU<sub>75</sub>, GLU<sub>76</sub>, LYS<sub>248</sub>, GLU<sub>252</sub>, LYS<sub>255</sub>, and PHE<sub>256</sub>, Figs. 5B and S32). In all cases, the main interactions were hydrophobic, although hydrogen bonds were observed with polar or charged residues, such as Lys, Asn, Asp, Glu, and Arg.

The theoretical and experimental studies indicated that phenanones 1, 3, and 4, as well as ursolic acid (5), interacted with hP1B<sub>1-400</sub> in the C-terminal domain of the protein.

Furthermore, the *in silico* results provided a structure-based hypothesis that is in agreement with the outcomes from the experimental concentration–response curves, kinetic analysis, and CD experiments.

## 2.8. Molecular dynamics (MD) simulations

To get more information about the disorder of the C-terminal domain of hP1B<sub>1-400</sub> (residues 301–400) and the protein–ligand complexes with compounds 1, 4 and 5, MD simulations were carried out. The preliminary results from MD for the protein clearly showed that



**Fig. 6.** (A) RMSD profile for ground-state  $hPTP1B_{1-400}$ ,  $hPTP1B_{1-300}$ , and  $hPTP1B_{301-400}$  (different tones of grey). RMSD of 1- $hPTP1B_{1-400}$ , 1- $hPTP1B_{1-300}$ , and 1- $hPTP1B_{301-400}$  (reds and pinks). RMSD of 4- $hPTP1B_{1-400}$ , 4- $hPTP1B_{1-300}$ , and 4- $hPTP1B_{301-400}$  (different blues). RMSD of 5- $hPTP1B_{1-400}$ , 5- $hPTP1B_{1-300}$ , and 5- $hPTP1B_{301-400}$  (different greens). The RMSD of the backbone atoms from the equilibrated conformation (0 ns) is presented as a function of time. (B) Root-mean-square-fluctuation (RMSF) values for the backbone atoms are shown as a function of residue number. The RMSF values for  $hPTP1B_{1-400}$ , 1- $hPTP1B_{1-400}$ , 4- $hPTP1B_{1-400}$ , and 5- $hPTP1B_{1-400}$ , are shown in black, red, blue and green, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

residues 1–300 are stable over the 50 ns simulation, with an average root-mean-square-deviation (RMSD) of 2.3 Å. However, for residues 301–400, the RMSD was, on average 6.8 Å, supporting the high flexibility of the C-terminal domain of the protein. The calculated RMSD for the whole protein was an average of 4.1 Å. Remarkably, the system was stable over the 50 ns simulation. In regards to the complexes of  $hPTP1B_{1-400}$  with compounds 1, 4 and 5, initial outcomes indicated that the behavior of the systems were in most part similar to the ground state protein for residues 1–300 (RMSD = 1 (2.2 Å), 4 (2.3 Å) and 5 (2.4 Å)) whereas the calculated RMSDs for residues 301–400 were an average 6.7 Å, 6.3 Å and 7.0 Å, respectively. Indicating that compounds 1 and 4 slightly decrease the disorder of the C-terminal domain of  $hPTP1B_{1-400}$ , stabilizing the whole system, while compound 5 increased the disorder (Fig. 6A).

Furthermore, close analysis of the root-mean-square-fluctuation (RMSF) of residues involved in the catalytic, allosteric and C-terminal domains of  $hPTP1B_{1-400}$ , in complexes with 1, 4 and 5 (Table S1, Supporting Information), indicated that duclauxin (1) and bacillisporin G (4) decreased the flexibility of amino acids in these domains, while ursolic acid (5) increased it (Fig. 6B). Both phenomena resulting in allosteric inhibition of  $hPTP1B_{1-400}$ . The outcomes from MD simulations were in agreement with experimental results from kinetics studies and CD experiments. Videos for the trajectory of  $hPTP1B_{1-400}$  and  $hPTP1B_{1-400}$  in complex with 1 are provided as [supplementary files](#).

### 3. Conclusions

In the present study, we have demonstrated that both, ursolic acid (5) and duclauxin (1) bind to  $hPTP1B_{1-400}$  in a site different from the

catalytic domain. Importantly, CD experiments along with kinetic studies, molecular docking, and preliminary data from molecular dynamics evidenced that these secondary metabolites induce conformational changes in the protein, which directly affect its activity, suggesting these compounds are allosteric modulators of the protein. Additionally, these results support our hypothesis that the use of the truncated models of PTP1B in drug discovery programs might lead to the loss of valuable information and at the same time mislead the optimization of putative drug leads. It is important to highlight the use of full-length models in such programs in order to avoid false positives and optimize human and financial resources. Furthermore, these findings are relevant in the search for new leads for the development of drugs to treat obesity and chronic diseases such as diabetes and cancer. Particularly, duclauxin (1) has been described as a potent cytotoxic agent. However, its mechanism of action has not been described. Here we provided evidence of its potency as an allosteric inhibitor of  $hPTP1B_{1-400}$ . Finally, the present investigation underlines the significance of natural products research programs in the search for new drug leads or research tools.

## 4. Experimental

### 4.1. General experimental procedures

NMR experiments were performed in  $CDCl_3$ . A Bruker Ascend III 700 MHz NMR spectrometer equipped with a cryoprobe, operating at 700 MHz for  $^1H$  and 175 MHz for  $^{13}C$  and, or either a JEOL ECS-400 spectrometer operating at 400 MHz for  $^1H$  and 100 MHz for  $^{13}C$ , and equipped with JEOL normal geometry broadband Royal probe, or a JEOL ECA-500 spectrometer operating at 500 MHz for  $^1H$  and 125 MHz for  $^{13}C$  were used to record NMR data. All the chemical shifts ( $\delta$ ) are reported relative to the residual solvent peak. The purity of analytes and their exact mass were obtained simultaneously via LC-MS. The chromatographic separations were carried out with a Waters Acquity Ultra-performance Liquid Chromatography (UPLC) system (Waters Corp.) coupled to a Thermo QExactive Plus (ThermoFisher, San Jose, CA, USA) combined with an electrospray ionization source. In some cases, the exact mass of compounds was measured on a JEOL, AccuTOF JMS-T100LC (HR-DART-MS) spectrometer. UPLC chromatographic analysis was performed with an Acquity BEH  $C_{18}$  column (50 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu m$ ) equilibrated at 40 °C and 0.3 mL/min flow rate [36]. The mobile phase consisted of a gradient (MeCN- $H_2O$ , acidified with CHOOH), starting at 15% MeCN to 100% MeCN over 8 min. The mobile phase was held for another 1.5 min at 100% MeCN before returning to the starting conditions [37,38]. The HPLC separations were performed using a Waters system (2535 quaternary pump) connected to a 2707 autosampler, and 2998 PDA and 2424 ELSD detectors. Data acquisition and analysis were accomplished with the Empower 3 software (Waters) [36]. Analytical, semipreparative, and preparative HPLC were performed on  $C_{18}$  Gemini-NX (5  $\mu m$ ) columns (4.6  $\times$  250 mm, 10.0  $\times$  250 mm, and 21.6  $\times$  250 mm for analytical, semipreparative and preparative runs, respectively; Phenomenex, Torrance, CA, USA) [36]. Flash column chromatography was carried out on a Teledyne ISCO, CombiFlash Rf system equipped with a PDA (200–400 nm) and ELSD detectors, according to standardized protocols [39,40].

### 4.2. Fungal isolation and identification

Biological samples for fungal isolation were collected in July 2018 by E. Aguilar-Ramírez from anthill soil in the area of the Huasteca Hidalguense, Hidalgo State, Mexico. A serial dilution protocol for axenic isolation of fungal microorganisms was applied. Briefly, a stock suspension consisting of 1 g of soil, and 9 mL of sterile distilled water was prepared. From the suspension, four serial dilutions were generated to give five solutions of concentrations of  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , and  $10^{-5}$  g soil/mL. Subsequently, 200  $\mu L$  of each solution was plated in

duplicate into a Petri dish with potato-dextrose-agar (PDA) and amoxicillin (500 mg/L). The Petri dishes were kept at room temperature for 48–72 h. This procedure led to the isolation of ten taxa (IQ-311–IQ-320, Fig. S3). Based on the morphological examination, IQ-313 (Figs. S2 and S3) was identified as a species belonging to the *Talaromyces/Penicillium*. Additionally, the fungal strain IQ-313 was likewise identified using the internal transcribed spacer (ITS) region of the rDNA. The ITS region was amplified using the ITS1 (5'-GGAAGTAAAAGTCTGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primers by PCR [41–43]. The final PCR reactions were prepared as follows in a final volume of 25  $\mu$ L: 10 ng of fungal DNA, 0.8 pM of each primer, 0.2 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U of Taq polymerase, and 1  $\times$  Taq polymerase buffer (Invitrogen Life Technologies, Sao Paulo, Brazil). The reaction conditions were 94 °C for 10 min; 35 cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at 58 °C, and 60 s at 72 °C; and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and sequenced in an ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the ITS1 primer [36].

The ITS sequence of the fungal isolate IQ-313 was compared with GenBank using BLAST search [44] (Fig. S3). A collection of the taxonomically related specimen was obtained from the National Center for Biotechnology Information Taxonomy Browser (NCBI). DNA sequences were aligned with CLUSTAL X and edited and confirmed visually in BIOEDIT [45]. Maximum likelihood analyses were performed using PhyML [46]. The GTR + G model ( $\alpha = 0.235$ ) was selected for the tree construction. One thousand bootstrap replicates were run to assess the confidence at each node [47]. *Chrysosporium inops* strain CBS 297.95 (GU73340) was used as the out-group. The ITS sequence of strain IQ-313 was deposited in the GenBank under the accession number MN699967 [36].

Based on the BLAST search results and phylogenetic analysis of the ITS region, the fungal isolate IQ-313 was identified as a *Talaromyces* sp., Eurotiales, Ascomycota.

#### 4.3. Fermentation extraction and isolation

Two seed cultures for each fungus (IQ-311 to IQ-314) were prepared in centrifuge tubes with 15 mL of potato-dextrose-broth (PDB). Then, the cultures were poured into two different flasks, one with 12 g of rice and another with 10 g of Cheerios®. The cultures were grown for 30 days at room temperature with regular periods of light and dark.

Fungal strains IQ-311 to IQ-314 were selected for extraction. After fermentation, the organic extracts were obtained by maceration and liquid–liquid partition. First, 60 mL of a 1:1 mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH was added to every flask containing fungal culture (rice and Cheerios®), and with a spatula, the biomass was fragmented and left to macerate with stirring for approximately 24 h. After 24 h, the cultures were filtered under vacuum, and the solid residue was washed with 90 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Then, to the resulting biphasic samples, 75 mL of distilled water was added and placed under stirring for 15 min. The biphasic mixtures were transferred into a separatory funnel to perform a partitioning process. The organic fractions were concentrated under vacuum. Finally, the resulting organic extracts were reconstituted with 100 mL of a 1:1 mixture of MeOH:MeCN and subjected to a partitioning process with 100 mL of Hex. The biphasic mixtures were transferred to a separatory funnel, and the MeOH:MeCN phase was concentrated and placed in vials for further analysis.

In 100 mg of IQ-313 extract from Cheerios® medium, 43.8 mg of duclauxin (1) were isolated by centrifugation and precipitation with MeOH. Simultaneously, approximately 4 g of the organic extract of IQ-313 (obtained by scaling up of the cultures) were fractionated by open column chromatography (OCC) over silica gel (CV = 350 mL) using mixtures of Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1 (15 CV), Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 8:2 (10.5 CV), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% (10.5 CV), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 9:1 (3.2 CV), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 8:2 (2 CV), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 7:3 (4 CV), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 1:1 (4.5 CV), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/

MeOH 45:45:10 (6.4 CV) as the mobile phase. Each fraction was monitored via TLC, and eluates with similar patterns were combined in primary fractions (F<sub>I</sub>–F<sub>XII</sub>). Fraction<sub>XI</sub> (~450 mg) was fractionated by flash column chromatography on a CombiFlash Rf system (Teledyne ISCO, NE, USA), equipped with a binary pump, a diode array detector (DAD) and an evaporative light scattering detector (ELSD) detectors. The stationary phase consisted of silica gel (RediSep R<sub>f</sub>), while the mobile phase was a gradient of increasing polarity between different mixtures of Hex, CHCl<sub>3</sub>, and MeOH. This procedure gave nine secondary subfractions (F<sub>XI-1</sub>–F<sub>XI-9</sub>). Subsequently, F<sub>XI-7</sub> (180 mg) was fractionated by OCC using Sephadex LH-20 as the stationary phase (CV = 95 mL) and MeOH as the mobile phase. Each fraction was monitored via TLC, and fractions with similar patterns were combined to give eight subfractions (F<sub>XI-7-A</sub>–F<sub>XI-7-H</sub>). Finally, fraction F<sub>XI-7-D</sub> (~25 mg) was resolved by semi-preparative HPLC, using a gradient elution of 40–100% MeCN in H<sub>2</sub>O with 0.1% formic acid over 30 min with a flow rate of 4.6 mL/min. This procedure afforded 6.0 mg of talaromycesone B (2). Fraction F<sub>VII</sub> (~970 mg) was subjected to a reverse-phase flash chromatography using a C18 column (RediSep R<sub>f</sub>, 130 g), and a gradient between different mixtures of MeOH and H<sub>2</sub>O with a flow rate of 50 mL/min. This procedure generated 13 subfractions (F<sub>VII-1</sub>–F<sub>VII-13</sub>). Fraction F<sub>VII-13</sub> afforded 11.1 mg of xenoclauxin (3). Resolution of 20 mg of fraction F<sub>VII</sub> by preparative HPLC (20.0 mL/min) using a C-18 column (Gemini-NX) afforded 9.3 mg of bacillisporin G (4). The structure of all compounds were elucidated by spectroscopic (<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR) and spectrometric (DART-MS and ESI-MS) techniques, and by comparison with data reported in the literature [20–23].

#### 4.4. Recombinant production, expression, and purification of human Protein Tyrosine Phosphatase 1B (hPTP1B<sub>1-400</sub>)

The protein tyrosine phosphatase isoform hPTP1B<sub>1,400</sub> coding sequence ID: NP\_002818.1, previously synthesized and codon optimized sequence cloned into expression vector pET-27, was kindly donated by Dr. Martin González-Andrade. The construction was amplified by PCR using the specific oligonucleotide primers PTP1B Fwd 5'-TGGTCATATGGAAATGGAAAAG-3' and PTP1B Rev 5'-TGC AAGCTTAGTCTTCATCTTTTTC-3' which introduce 5'NdeI and 3'HindIII restriction sites (underlined). The PCR product was cloned into a pET-28 plasmid, in which thrombin protease site was mutated into a TEV site. The resulting new vector p28HTHPTP1B<sub>1,400</sub> (Fig. S37) was verified by DNA sequencing (Laragen Inc).

Approximately, 20 mL volume of LB media containing ampicillin (100  $\mu$ L/mL) and chloramphenicol (34  $\mu$ L/mL) was inoculated with one colony of previously transformed *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS strain (Novagen, Madison, WI, USA) with p28HTHPTP1B<sub>1,400</sub> vector and grown overnight at 37 °C with continuous shaking. The next day, the culture was diluted 1:100 in fresh LB media with antibiotics, and incubated at 37 °C until it reached an OD<sub>600</sub> of 0.6. Protein expression was induced by adding 0.5 mM IPTG (Goldbio, USA) and incubating the culture at 30 °C for 6 h. The cell pellet was harvested by centrifugation (5500g, 10 min, 4 °C) and kept at –20 °C until required for protein purification.

Purification of PTP1B was carried out following the procedure described by Krishnan et al., 2018 with some modifications [24]. Briefly, the cells pellet from a 1 L culture was thawed on ice and suspended in 40 mL of lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.2, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 2 mM TCEP). Lysis was carried out by sonication (Misonix 3000) with intervals of 5 s ON and 15 s OFF for a total of four minutes of total sonication time with a power setting off 4.5. The soluble fraction was clarified by centrifugation (45 min at 30,000g), after filtration with a PVDF membrane (pore size of 45  $\mu$ m). The hPTP1B<sub>1,400</sub> enzyme was purified by affinity chromatography (His Trap FF, GE Healthcare). The affinity column was equilibrated with 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, and 1.5 mM DTT. The elution buffer

consisted of 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 300 mM imidazole, and 1.5 mM DTT, with subsequent buffer exchange using 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, and 1.5 mM DTT to remove imidazole. The protein was used immediately -as is-, or stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the same buffer plus 4% of glycerol [15,24].

#### 4.5. PTP1B inhibition assay

Extract (20 ppm), fractions (20 ppm), compounds (1–4, 0.6 or 3.0 mM), and ursolic acid (5, positive control, 1 mM) were dissolved in DMSO. Aliquots of 0–10  $\mu\text{L}$  of testing materials (in triplicate) were incubated for 10 min with 10  $\mu\text{L}$  of enzyme stock solution (3.0  $\mu\text{M}$ ) in 50 mM HEPES pH 6.8, 100 mM NaCl, 1.5 mM DTT. After incubation, 10  $\mu\text{L}$  of substrate (pNPP 30 mM, Sigma-Aldrich) was added and incubated for 20 min at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and the absorbance was determined. All assays were performed in a final volume of 100  $\mu\text{L}$ . For endpoint assays, the inhibitory activity was determined as a percentage in comparison to the blank (DMSO) according to Eq. (1).

$$\%Inh = \left(1 - \frac{A_{s_{405nm}}}{A_{b_{405nm}}}\right) \times 100, \quad (1)$$

where %inh is the enzyme inhibition percentage;  $A_{s_{405nm}}$  is the corrected absorbance of the sample ( $A_{s_{405nm}} = A_{20min.sample_{405nm}} - A_{initialsample_{405nm}}$ ) and  $A_{b_{405nm}}$  is the corrected absorbance of the control test ( $A_{b_{405nm}} = A_{20min.blank_{405nm}} - A_{initialblank_{405nm}}$ ). The  $IC_{50}$  values were calculated by non-linear regression analysis using Eq. (2).

$$\%Inh = \frac{A_{100}}{1 + \left(\frac{I}{IC_{50}}\right)^s}, \quad (2)$$

where  $A_{100}$  is the maximum inhibition,  $I$  is the inhibitor concentration,  $IC_{50}$  is the concentration required to inhibit the activity of the enzyme by 50%, and  $s$  is the cooperative degree. All experiments were carried out in triplicate. The data are shown as the mean  $\pm$  SD. The  $IC_{50}$  values were calculated by nonlinear regression with Hill adjustment using GraphPad Prism 6.0 software.

#### 4.6. Kinetics studies

The inhibition model of compounds 1 and 5 over the activity of hPTP1B<sub>1-400</sub> was determined using multiple inhibitor concentrations and various concentrations of substrate. The corresponding inhibition constant ( $k_i$ ) values were calculated by a non-linear regression analysis (GraphPad Prism 6.0 software) using Eq. (3).

$$v = \frac{V_{max}S}{K_M\left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) + S\left(1 + \frac{[I]}{\alpha k_i}\right)}, \quad (3)$$

where  $v$  is the velocity of the reaction,  $V_{max}$  is the maximum velocity;  $S$  and  $I$  are the substrate and inhibitor concentrations, respectively;  $K_M$  is the Michaelis constant;  $k_i$  is the competitive inhibition constant, and  $\alpha k_i$  is the non-competitive inhibition constant.

#### 4.7. Circular dichroism (CD) experiments of hPTP1B<sub>1-400</sub> and complexes 1- hPTP1B<sub>1-400</sub> and 5- hPTP1B<sub>1-400</sub>

CD spectra were recorded on a Jasco J-1500 spectrophotometer in buffer pH 6.8 (HEPES 0.5 mM, 1 mM NaCl and 0.015 mM DTT), at  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a 0.1 cm cell. The hPTP1B<sub>1-400</sub> spectrum was collected at 5  $\mu\text{M}$  (0.24 mg/mL) in a final volume of 250  $\mu\text{L}$ . Stock solutions (2 mM) for compounds 1 and 5, were prepared in MeOH or DMSO, respectively, and then mixed with 250  $\mu\text{L}$  of protein solution (5  $\mu\text{M}$ ), to get a final concentration of 20  $\mu\text{M}$ . Buffer was exchanged by amicon (250  $\mu\text{L} \times 5$ ). The blank for each compound was prepared in the same fashion. The spectra were registered with a bandwidth of 1 nm at a rate of 20 nm/min in a window of 195–260 nm. The estimated secondary structure

content for hPTP1B<sub>1-400</sub>, 1-hPTP1B<sub>1-400</sub>, and 5-hPTP1B<sub>1-400</sub> were calculated using the BeStSel server for accurate protein secondary structure prediction [48].

#### 4.8. Computational methods

##### 4.8.1. 3D structure prediction of hPTP1B<sub>1-400</sub>

The three-dimensional structure of hPTP1B<sub>1-400</sub> was generated using the I-TASSER server (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER>), a package designed for protein structure modeling by iterative threading assembly refinement simulations, and structure-based function annotation [34,35]. The I-TASSER protocol is divided into four stages: (1) threading, (2) structure assembly, (3) model selection and refinement, and (4) structure-based functional annotation [34,35]. The accuracy of the model was measured using the C-score (confidence score) [34].

##### 4.8.2. Proteins and ligands

Polar hydrogens and charges (Kollman) were allocated to the homologated model for hPTP1B<sub>1-400</sub> using AutoDockTools (ADT) 1.5.6, and the files saved in .pdbqt format for their use in AutoGrid 4.0 and AutoDock 4.0 interfaces. Compounds 1–5 were built and energy-optimized using Spartan10 using a semi-empiric method (PM3). The ligands were prepared in ADT 1.5.6 by adding the Gasteiger-Marsili charges.

##### 4.8.3. Molecular docking

Molecular docking simulations were performed using AutoDock 4.0. Initially, the docking protocols were validated to warranty the veracity of the data. In this regard, pNPP was used as a probe to validate the simulations generated for hPTP1B<sub>1-400</sub>. After validation, a blind docking was performed for each ligand at the interface as the first ligand binding position in a grid box with dimensions of  $126 \times 126 \times 126\text{ \AA}$ . Docking simulations were performed with Lamarckian Genetic Algorithm calculations of 100 runs. The obtained poses were then analyzed using ADT 1.5.6 using cluster analysis and PyMol.

#### 4.9. Molecular dynamics simulations

All simulations were carried out with the AMBER 16 suite of MD with the FF14SB force field [49,50]. The coordinates of the homology model generated for hPTP1B<sub>1-400</sub>, as well as the coordinates of ligands obtained from docking studies of compounds 1, 4, and 5 with this model, were processed with Antechamber to generate the topologies suitable for the LEaP module. Subsequently, the LEaP module was used to reduce, neutralize (by randomly adding 11  $\text{Na}^+$  counterions) and include the system in a water-filled truncated octahedral box with a leg on each side of 10  $\text{\AA}$ , using the TIP3P solvent model. The simulations were performed under periodic boundary conditions. Conjugate gradient minimization followed by NVT heating and NPT equilibration using Langevin dynamics were carried out to relax the structure and equilibrate the solvent. The MD production was run for 50 ns at 300 K. Frames were saved at 4 ps intervals for subsequent analysis. RMSD and RMSF analyses were conducted with CPPTRAJ on the trajectory [51].

#### Funding

This work was supported by a grant from DGAPA, PAPIIT, UNAM (IA200818/IA203220), and CONACyT N $^{\circ}$  295057.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

We thank Dr. Beatriz Quiroz-García and Dr. María del Carmen García-González (Instituto de Química, UNAM) for the collection of spectroscopic and spectrometric data. We also thank Dr. Annia Rodríguez-Hernández, Dr. Enrique García-Hernández, and Dr. Adela Rodríguez-Romero (Instituto de Química, UNAM), for their help on the purification and characterization of the enzyme. We are grateful to Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC, LANCAD-UNAM-DGTIC-374), UNAM, for providing the resources to carry out molecular dynamics simulations through the Miztli System. This study made use of the instrumentation acquired through the BGSII-IQ node. E.A-R would like to thank CONACyT for the fellowship provided to pursue graduate studies. J. R-C. would like to thank MSc. Tyler N. Graff and Jacklyn M. Gallagher and Dr. Huzefa Raja for their assistance in the revision of the manuscript.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103893>.

## References

- [1] W.H. Organization, World Health Organization, Noncommunicable Diseases, 2019.
- [2] P. Cohen, The role of protein phosphorylation in human health and disease, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 5001–5010.
- [3] S. De Munter, M. Kohn, M. Bollen, Challenges and opportunities in the development of protein phosphatase-directed therapeutics, *ACS Chem. Biol.* 8 (2013) 36–45.
- [4] S. Fahs, P. Lujan, M. Kohn, Approaches to study phosphatases, *ACS Chem. Biol.* 11 (2016) 2944–2961.
- [5] W.J. Hendriks, A. Elson, S. Harroch, R. Pulido, A. Stoker, J. den Hertog, Protein tyrosine phosphatases in health and disease, *FEBS J.* 280 (2013) 708–730.
- [6] T.K. Sawyer, *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Elsevier, Oxford, 2007, pp. 959–992, <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00070-5>.
- [7] A. Bourdeau, N. Dube, M.L. Tremblay, Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 (2005) 203–209.
- [8] S. Zhang, Z.Y. Zhang, PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery, *Drug Discov. Today* 12 (2007) 373–381.
- [9] M. Feldhammer, N. Uetani, D. Miranda-Saavedra, M.L. Tremblay, PTP1B: a simple enzyme for a complex world, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48 (2013) 430–445.
- [10] K.V. Ruddaraju, Z.Y. Zhang, Covalent inhibition of protein tyrosine phosphatases, *Mol. Biosyst.* 13 (2017) 1257–1279.
- [11] J. Jin, X. Ye, D. Boateng, K. Dai, F. Ye, P. Du, H. Yu, Identification and characterization of potent and selective inhibitors targeting protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 29 (2019) 2358–2363.
- [12] C. Wiesmann, K.J. Barr, J. Kung, J. Zhu, D.A. Erlanson, W. Shen, B.J. Fahr, M. Zhong, L. Taylor, M. Randall, R.S. McDowell, S.K. Hansen, Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 730–737.
- [13] F. Zargari, M. Lotfi, O. Shahraki, Z. Nikfarjam, J. Shahraki, Flavonoids as potent allosteric inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B: molecular dynamics simulation and free energy calculation, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 36 (2018) 4126–4142.
- [14] Z.Y. Zhang, S.Y. Lee, PTP1B inhibitors as potential therapeutics in the treatment of type 2 diabetes and obesity, *Expert. Opin. Invest. Drugs* 12 (2003) 223–233.
- [15] N. Krishnan, D. Koveal, D.H. Miller, B. Xue, S.D. Akshinhal, J. Kragej, M.R. Jensen, C.-M. Gauss, R. Page, M. Blackledge, S.K. Muthuswamy, W. Pei, N.K. Tonks, Targeting the disordered C terminus of PTP1B with an allosteric inhibitor, *Nat. Chem. Biol.* 10 (2014) 558.
- [16] M. Verma, S.J. Gupta, A. Chaudhary, V.K. Garg, Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors as anti-diabetic agents - A brief review, *Bioorg. Chem.* 70 (2017) 267–283.
- [17] Z.-Q. Liu, T. Liu, C. Chen, M.-Y. Li, Z.-Y. Wang, R.-S. Chen, G.-X. Wei, X.-Y. Wang, D.-Q. Luo, Fumosorinone, a novel PTP1B inhibitor, activates insulin signaling in insulin-resistance HepG2 cells and shows anti-diabetic effect in diabetic KKAY mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 285 (2015) 61–70.
- [18] J.H. Sohn, Y.R. Lee, D.S. Lee, Y.C. Kim, H. Oh, PTP1B inhibitory secondary metabolites from marine-derived fungal strains *Penicillium* spp. and *Eurotium* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23 (2013) 1206–1211.
- [19] J.-S. Park, T.H. Quang, N. Thi Thanh Ngan, J.H. Sohn, H. Oh, New preautinoids from a marine-derived fungal strain *Penicillium* sp. SF-5497 and their inhibitory effects against PTP1B activity, *J. Antibiot. (Tokyo)* (2019) 72629–72633.
- [20] I. Kühr, J. Füska, P. Sedmera, M. Podojil, J. Vokoun, Z. Vanek, An antitumor antibiotic produced by *Penicillium stipitatum* Thom; its identity with daclauxin, *J. Antibiot. (Tokyo)* 26 (1973) 535–536.
- [21] Bin Wu, Birgit Ohlendorf, Vanessa Oesker, Jutta Wiese, Susann Malien, Rolf Schmaljohann, Johannes F. Imhoff, Acetylcholinesterase inhibitors from a marine fungus *Talaromyces* sp. strain LF458, *Mar. Biotechnol.* 17 (1) (2015) 110–119, <https://doi.org/10.1007/s10126-014-9599-3> <http://link.springer.com/10.1007/s10126-014-9599-3>.
- [22] M. Yamazaki, E.M.I. Okuyama, Isolation and structures of oxaphalenone dimers from *Talaromyces bacillosporius*, *Chem. Pharm. Bull.* 28 (1980) 3649–3655.
- [23] Y. Zang, G. Genta-Jouve, A.E. Escargueil, A.K. Larsen, L. Guedon, B. Nay, S. Prado, Antimicrobial oligophalenone dimers from the soil fungus *Talaromyces stipitatus*, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 2991–2996.
- [24] N. Krishnan, C.A. Bonham, I.A. Rus, O.K. Shrestha, C.M. Gauss, A. Haque, A. Tocilj, L. Joshua-Tor, N.K. Tonks, Harnessing insulin- and leptin-induced oxidation of PTP1B for therapeutic development, *Nat. Commun.* 9 (2018) 283.
- [25] H.B. Brooks, S. Geeganage, S.D. Kahl, C. Montrose, S. Sittampalam, M.C. Smith, J.R. Weidner, Assay Guidance Manual, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD), 2004.
- [26] M. Sarmiento, Y. Zhao, S.J. Gordon, Z.Y. Zhang, Molecular basis for substrate specificity of protein-tyrosine phosphatase 1B, *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 26368–26374.
- [27] V. Sancenón, W.H. Goh, A. Sundaram, K.S. Er, N. Johal, S. Mukhina, G. Carr, S. Dhakshinamoorthy, Development, validation and quantitative assessment of an enzymatic assay suitable for small molecule screening and profiling: A case-study, *Biomol. Detect. Quantif.* 4 (2015) 1–9.
- [28] R. Guzmán-Avila, V. Flores-Morales, P. Paoli, G. Camici, J.J. Ramírez-Espinoza, L. Cerón-Romero, G. Navarrete-Vázquez, S. Hidalgo-Figueroa, M. Yolanda Ríos, R. Villalobos-Molina, S. Estrada-Soto, Ursolic acid derivatives as potential anti-diabetic agents: *In vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies, *Drug Dev. Res.* 79 (2018) 70–80.
- [29] J.J. Ramírez-Espinoza, M.Y. Ríos, S. López-Martínez, F. López-Vallejo, J.L. Medina-Franco, P. Paoli, G. Camici, G. Navarrete-Vázquez, R. Ortiz-Andrade, S. Estrada-Soto, Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTP-1B: *In vitro*, *in silico*, and *in vivo* approaches, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 2243–2251.
- [30] W. Zhang, D. Hong, Y. Zhou, Y. Zhang, Q. Shen, J.-Y. Li, L.-H. Hu, J. Li, Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1760 (2006) 1505–1512.
- [31] X.F. Tan, Z. Uddin, C. Park, Y.H. Song, M. Son, K.W. Lee, K.H. Park, Competitive protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors, prenylated caged xanthones from *Garcinia hanburyi* and their inhibitory mechanism, *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017) 2498–2506.
- [32] J.-Y. Zhao, X.-J. Wang, Z. Liu, F.-X. Meng, S.-F. Sun, F. Ye, Y.-B. Liu, Nonadrine and spirocyclic anhydride derivatives from the plant endophytic fungus *Talaromyces purpurigenus*, *J. Nat. Prod.* 82 (2019) 2953–2962.
- [33] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2876–2890.
- [34] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 725–738.
- [35] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, Y. Zhang, The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction, *Nat. Methods* 12 (2015) 7–8.
- [36] J. Rivera-Chávez, J. Zacatenco-Abarca, J. Morales-Jiménez, B. Martínez-Aviña, S. Hernández-Ortega, E. Aguilar-Ramírez, Cuatrecastalorin, a 7,8-dihydrochromene-oxoisochroman adduct bearing a hexacyclic scaffold from *Pestalotiopsis* sp. IQ-011, *Org. Lett.* 21 (2019) 3558–3562.
- [37] J. Rivera-Chávez, H.A. Raja, T.N. Graf, J.E. Burdette, C.J. Pearce, N.H. Oberlies, Biosynthesis of fluorinated peptaibols using a site-directed building block incorporation approach, *J. Nat. Prod.* 80 (2017) 1883–1892.
- [38] T. El-Elmag, M. Figueroa, B.M. Ehrmann, N.B. Cech, C.J. Pearce, N.H. Oberlies, High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products, *J. Nat. Prod.* 76 (2013) 1709–1716.
- [39] J. Rivera-Chávez, L.K. Caesar, J.J. Garcia-Salazar, H.A. Raja, N.B. Cech, C.J. Pearce, N.H. Oberlies, Mycopyranone: A 8,8'-binaphthopyranone with potent anti-MRSA activity from the fungus *Phialemonionopsis* sp., *Tetrahedron Lett.* 60 (2019) 594–597.
- [40] J. Rivera-Chavez, T. El-Elmag, J.M. Gallagher, T.N. Graf, J. Fournier, G.K. Panigrahi, G. Deep, R.L. Bunch, H.A. Raja, N.H. Oberlies, Deltipyrone:  $\alpha$ -pyrone derivatives from a freshwater *Delicchia* sp. *Planta Med.* 85 (2019) 62–71.
- [41] M. Gardes, T.D. Bruns, ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Mol. Ecol.* 2 (1993) 113–118.
- [42] M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic press, 2012.
- [43] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 4876–4882.
- [44] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402.
- [45] T.A. Hall, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series* 41 (1999) 95–98.
- [46] Stéphane Guindon, Jean-François Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, Olivier Gascuel, New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0, *Syst. Biol.* 59 (3) (2010) 307–321, <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010> <https://academic.oup.com/sysbio/article/59/3/307/1702850>.
- [47] D.M. Hillis, J.J. Bull, An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis, *Syst. Biol.* 42 (1993) 182–192.
- [48] A. Miconai, F. Wien, É. Bulyáki, J. Kun, É. Moussong, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, BeStSel: a web server for accurate protein secondary

- structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) W315–W322.
- [49] J.A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K.E. Hauser, C. Simmerling, ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.* 11 (2015) 3696–3713.
- [50] R. Salomon-Ferrer, D.A. Case, R.C. Walker, An overview of the Amber biomolecular simulation package, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 3 (2013) 198–210.
- [51] D.R. Roe, T.E. Cheatham, PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data, *J. Chem. Theory Comput.* 9 (2013) 3084–3095.

## Hydroxy-*neo*-Clerodanes and 5,10-*seco-neo*-Clerodanes from *Salvia decora*

José Rivera-Chávez,\* Celia Bustos-Brito, Enrique Aguilar-Ramírez, Diego Martínez-Otero, Luis D. Rosales-Vázquez, Alejandro Dorazco-González, and Patricia Cano-Sánchez

Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00313>

Read Online

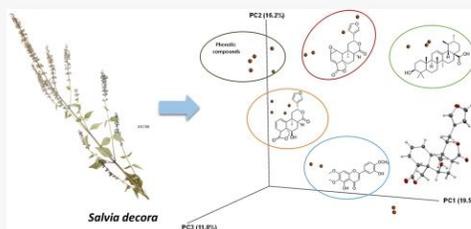
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** Preliminary analysis of the mass spectrometric (MS) and NMR spectroscopic data of the primary fractions from the biologically active extract of *Salvia decora* revealed spectra that are characteristic for *neo*-clerodane-type diterpenoids. MS-guided isolation of the bioactive fractions led to the isolation of three new chemical entities, including two hydroxy-*neo*-clerodanes (1 and 2) and one acylated 5,10-*seco-neo*-clerodane (3), along with three known diterpenoids (4–6), ursolic acid (7), and eupatorin (8). The structures of the new compounds were established by analysis of the 1D and 2D NMR and MS data, whereas their absolute configuration was deduced using a combination of experimental and theoretical ECD data and confirmed by X-ray crystallography (1 and 4). Furthermore, compounds 1, 3, 4, and 6–8 were evaluated as hPTP1B<sub>1–400</sub> (human protein tyrosine phosphatase) inhibitors, where 7 showed the best activity, with an IC<sub>50</sub> value in the lower μM range. Additionally, compound 7 was evaluated as an α-glucosidase inhibitor. The affinity constant of the 7-hPTP1B<sub>1–400</sub> complex was determined by quenching fluorescence experiments ( $k_a = 1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ), while the stoichiometry ratio (1:1 protein–ligand) was determined by a continuous variation method.



Multi-informative approaches have emerged as powerful tools to revolutionize the discovery of new secondary metabolites, giving them several advantages over the traditional natural products methodology.<sup>1,2</sup> These approaches have the potential to save both human and financial resources by prioritizing samples and avoiding redundant work such as reisolating known compounds. Specifically, bioassay-guided approaches using mass spectrometry and NMR spectroscopy have afforded the isolation of several interesting secondary metabolites from plants, including phenylphenalenones and isopimaradiene-type diterpenoids,<sup>3</sup> among others. Additionally, a MS (molecular networking)-bioassay targeted approach has permitted the discovery of several bioactive natural products from plants,<sup>4</sup> bacteria,<sup>5</sup> and more recently fungi.<sup>6</sup> These examples validate the use of multi-informative approaches to explore the chemistry produced by natural sources. However, despite the success of these methodologies, they have not been applied to explore the chemical constellation produced by *Salvia* spp.

As the largest genus in the Labiatae family, *Salvia* contains over 1000 species worldwide, which are mainly distributed in tropical and subtropical zones, including Central Asia, tropical Africa, North and South America, mainland China, and the Pacific Islands.<sup>7</sup> Out of the approximately 309 *Salvia* species growing naturally in Mexico, around 77.1% are endemic,<sup>8</sup> including *Salvia decora* Epling (Lamiaceae), a shrub mainly spread in Colima, Guerrero, Jalisco, and Michoacán states.<sup>9</sup>

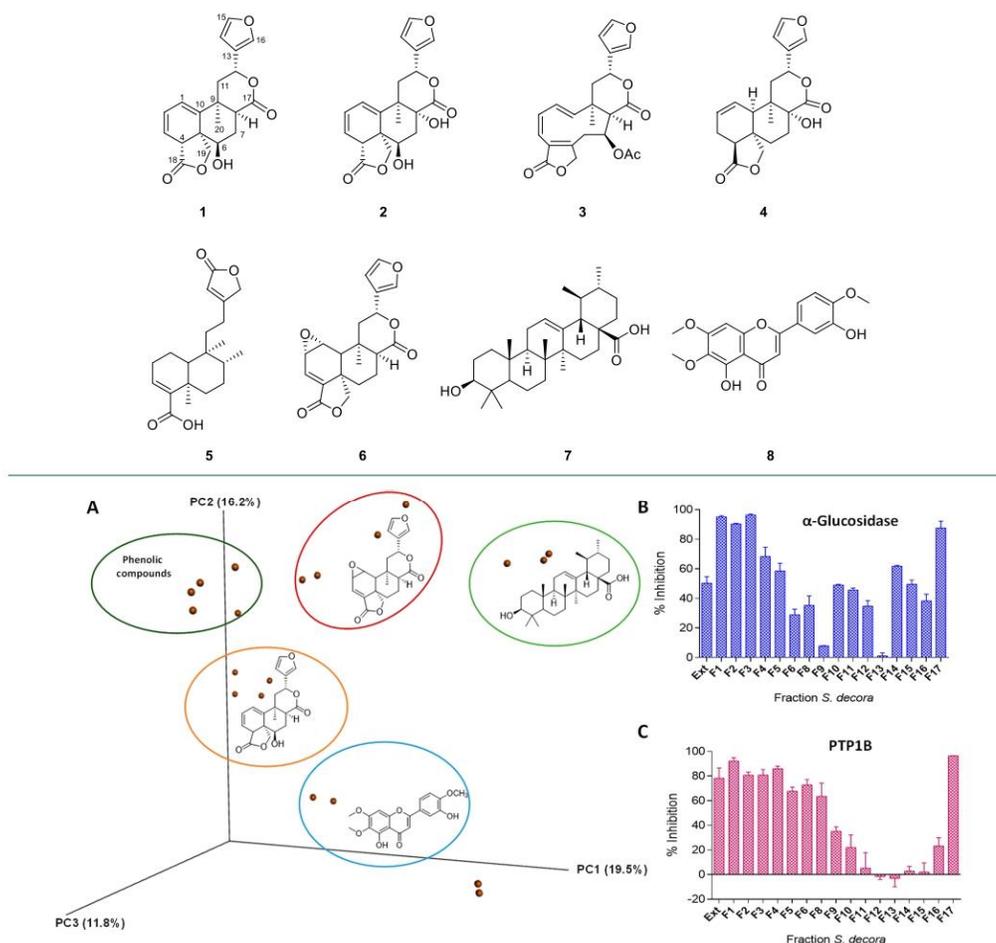
*Salvia* species have long been used for many purposes, for example, for the treatment of numerous diseases, as spices and culinary herbs, and in perfumery and the cosmetic industry.<sup>7</sup> Previous studies on the biological and chemical constituents of *Salvia* spp. have resulted in the isolation of several phytochemicals from different classes. Biological studies of these metabolites have demonstrated their activity as anti-protozoal,<sup>10</sup> psychotropic,<sup>11,12</sup> and antihyperglycemic and hypoglycemic agents, in both in vivo and in vitro assays.<sup>13,14</sup>

As of 2019, approximately half of the estimated 463 million adults living with type II diabetes mellitus (TIIDM) were undiagnosed, making this one of the most challenging health issues of the 21st century.<sup>15</sup> With a projected 51% increase in the prevalence of TIIDM by 2045, it is crucial to develop new approaches to some of the current pharmacological treatment focuses, such as reduced glucose absorption in the gastrointestinal tract or increasing tissue sensitivity to insulin.<sup>16,17</sup> While α-glucosidase inhibitors are important in delaying glucose absorption and reducing the postprandial glucose levels

Received: March 20, 2020

Downloaded via UPPSALA UNIV on June 29, 2020 at 16:59:55 (UTC). See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

Chart 1



**Figure 1.** (A) PCA of primary fractions from the extract of *S. decora*, indicating five different groups of secondary metabolites. In green, ursolic acid type compounds; in blue, flavonoids; in orange, hydroxy-*neo*-clerodanes; in red, *neo*-clerodanes; and in dark green, phenolic compounds. (B)  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory properties of the extract and primary fractions of *S. decora*; all fractions were evaluated at a final concentration of 100 ppm. (C) *h*PTP1B<sub>1-400</sub> inhibitory properties of the extract and primary fractions of *S. decora*; all fractions were evaluated at a final concentration of 50 ppm.

(associated with micro- and macrovascular complications), an emerging target for increasing insulin sensitivity is protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), a significant regulator in the insulin and leptin pathways.<sup>18</sup>

PTP1B, an important protein in regulating several physiological and pathological processes, is a validated target for the treatment of obesity, T1DM,<sup>19,20</sup> some cancers,<sup>21,22</sup> and it has most recently been described as a critical protein in Alzheimer's disease.<sup>18</sup> Even though researchers have developed several competitive and noncompetitive PTP1B inhibitors, none have made it past phase II clinical trials. This is due to the inability of molecules to penetrate membranes and their adverse pharmacokinetic properties and associated side effects.<sup>23,24</sup>

For these reasons, the continued search for more effective and safe PTP1B inhibitors is of significance. Thus, it is imperative to search for more effective and safe inhibitors through exploration of the allosteric sites located at the C-terminus of the full-length *h*PTP1B<sub>1-400</sub>. This region of the protein has a higher specificity and lower sequence conservation, subsequently permitting the discovery of specific molecules with less toxic effects.

Described herein is the application of a multi-informative approach (MS, NMR, bioassay-guided isolation) to uncover the secondary metabolites produced by *Salvia decora* (an endemic species), as well as the in vitro evaluation of the isolates obtained as  $\alpha$ -glucosidase and *h*PTP1B<sub>1-400</sub> inhibitors.

B

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00313>  
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX-XXX

Table 1. NMR Data (<sup>1</sup>H 700 MHz, APT 175 MHz) of Compounds 1 and 2

position	1 <sup>a,d</sup>				2 <sup>b</sup>			
	$\delta_C$	type	$\delta_H$ (J in Hz)	HMBC	$\delta_C$	type	$\delta_H$ (J in Hz)	HMBC
1	120.7	CH	6.06, d (6.1)	3, 5, 9, 19, 10	122.0	CH	6.33, d (6.1)	3, 5, 9
2	124.0	CH	6.13, ddd (9.4, 6.1, 3.1)	1, 4, 10, 18 <sup>c</sup>	125.1	CH	6.21, ddd (9.4, 6.1, 3.2)	1, 4
3	119.2	CH	5.66, dd (9.4, 3.1)	3, 4, 10, 18, 19, <sup>c</sup> 20 <sup>c</sup>	119.0	CH	5.59, dd (9.4, 3.1)	1, 5, 18
4	46.1	CH	3.95, t (3.1)	1, 4, 5, 6, 10, <sup>c</sup> 18, 19 <sup>c</sup>	46.7	CH	3.85, t (3.2)	
5	47.9	C			48.3 <sup>c</sup>	C		
6	67.5	CH	3.75, brs	4, 8, 10	68.4 <sup>c</sup>	CH	3.72, brs	
7a	27.1	CH <sub>2</sub>	2.90, dd (13.4, 4.2)	5, 6, 9, 10, 17	36.2	CH <sub>2</sub>	2.91, dd (14.3, 4.0)	5, 6, 8, 9, 17
7b			2.41, ddd (13.4, 5.9, 1.4)	6, 8, 9, 17			2.40, dd (14.3, 1.9)	8, 17
8	44.7	CH	2.43, d (5.9)	6, 7, 9, 10, 17, 20	73.1	C		
9	37.0	C			43.0 <sup>c</sup>	C		
10	138.2	C			140.6	C		
11a	41.2	CH <sub>2</sub>	2.59, dd (14.9, 2.0)	8, 9, 10, 13	35.8	CH <sub>2</sub>	2.46, m	8, 9, 10, 12, 13, 20
11b			1.93, dd (14.9, 11.9)	8, 9, 10, 12, 13, 20			2.43, m	8, 9, 10, 12, 13, 20
12	70.8	CH	5.49, dd (12.0, 2.0)	9, 11, 13, 14, 16	71.1	CH	5.52, dd (8.6, 6.3)	11, 13, 14, 16
13	124.6	C			126.7	C		
14	108.6	CH	6.45, dd (1.8, 0.9)	12, 13, 15, 16	109.6	CH	6.58, dd (1.9, 0.9)	13, 16
15	143.9	CH	7.42, t (1.7)	13, 14, 16	144.5	CH	7.57, t (1.7)	13, 14, 16
16	140.0	CH	7.49, m	13, 14, 15	141.0	CH	7.67, dt (1.7, 0.8)	13, 14, 15
17	173.9	C			173.3 <sup>c</sup>	C		
18	177.4	C			177.7	C		
19a	75.0	CH <sub>2</sub>	4.41, d (9.1)	4, 6, 18	75.9	CH <sub>2</sub>	4.69, d (9.2)	4, 6, 18
19b			4.04, d (9.1)	4, 6, 10			4.06, d (9.2)	4, 6, 10
20	33.0	CH <sub>3</sub>	1.22, s	8, 9, 10, 11, 17 <sup>c</sup>	27.6	CH <sub>3</sub>	1.23, s	8, 9, 10, 11
OH-6			2.27, d (2.4)	5, 6				
OH-8							4.82, s	8, 9

<sup>a</sup>CDCl<sub>3</sub>. <sup>b</sup>Acetone-*d*<sub>6</sub>. <sup>c</sup>J<sup>4</sup>. <sup>d</sup>Recorded at 500 MHz for <sup>1</sup>H and 125 MHz for <sup>13</sup>C. <sup>e</sup> $\delta_C$  deduced from the HMBC spectrum.

## RESULTS AND DISCUSSION

An acetone extract of *S. decora* showed modest inhibitory activity when evaluated against hPTP1B<sub>1–400</sub> (~80% inhibition at 50 ppm) and  $\alpha$ -glucosidase (~50% inhibition at 100 ppm), two validated molecular targets in the treatment of T2DM. Bioassay-guided fractionation, combined with MS-targeted isolation directed by molecular networking analysis [Global Natural Products Social Molecular Networking tool (GNPS)]<sup>25</sup> and NMR spectroscopic data, resulted in the isolation of three new compounds, including two hydroxy-*neo*-clerodanes (1 and 2) and an acylated 5,10-*seco-neo*-clerodane (3), along with three known diterpenoids (4–6), ursolic acid (7), and eupatorin (8).

UPLC-HRESIMS-MS/MS data of 17 primary fractions from *S. decora* were structured as a molecular network using the GNPS tool. This map provided an organized and rapid examination of the complex structural space of the species. The molecular network was constructed by considering 11 966 spectra, which were summarized in 1638 nodes. The analysis produced 163 clusters that contained at least two nodes and exhibited 817 individual nodes (Figure S17, Supporting Information). Principal component analysis (PCA) of the spectra concentrated the fractions into five groups, including one for *neo*-clerodanes, one for hydroxy-*neo*-clerodanes, one for triterpenoids, one for flavonoids, and one for phenolic compounds (Figure 1A). Bioactivity assays were used to prioritize and reduce the number of groups investigated to the following three categories: one containing potent inhibitors toward both hPTP1B<sub>1–400</sub> and  $\alpha$ -glucosidase (F1–F4 and F17), one with modest to high activity against  $\alpha$ -glucosidase and hPTP1B<sub>1–400</sub> (F5–F9), and one with modest activity against  $\alpha$ -

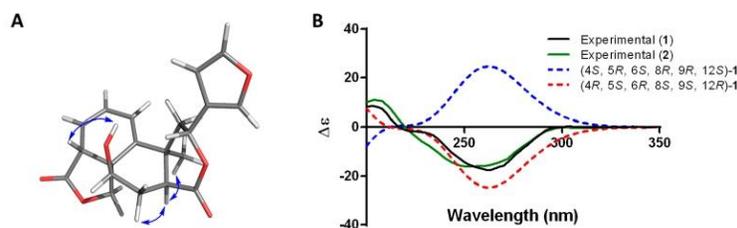
glucosidase and low to null activity toward hPTP1B<sub>1–400</sub> (F10–F12, F14–F16) (Figure 1B and C).

Analysis of the MS profiles of fractions with potent anti-hPTP1B<sub>1–400</sub> and anti- $\alpha$ -glucosidase activity displayed an exact mass of  $m/z$  457.3669 ( $[M + H]^+$ ) or  $m/z$  439.3567 ( $[M - H_2O + H]^+$ ) (Figures S1–S3, Supporting Information), corresponding to the molecular formula C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub> or C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>, respectively. These data, in combination with <sup>1</sup>H NMR values (Figure S43, Supporting Information), indicated the presence of triterpene-like compounds. In particular, fraction F3 displayed <sup>1</sup>H NMR signals attributable to oleanolic and ursolic acid, permitting the redundancy of reanalysis to be avoided. Furthermore, examination of the LC-MS profiles of fractions with modest  $\alpha$ -glucosidase and hPTP1B<sub>1–400</sub> inhibitory properties showed masses corresponding to molecular formulas consistent with diterpenoids. <sup>1</sup>H NMR analysis of fractions F6–F8 revealed the presence of *neo*-clerodane-like compounds as the main components, while the <sup>1</sup>H NMR data of fractions F9–F11 suggested the presence of hydroxy-*neo*-clerodanes as the major constituents. Motivated by the vast diversity of this population, both chemically and biologically,<sup>26</sup> MS and NMR targeted isolation of the major components in these fractions was conducted.

Compound 1 was isolated as an optically active white powder ( $[\alpha]_D^{25} -287$  (c 0.14, MeOH)), for which a molecular formula of C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> was established based on the HRDARTMS peak at  $m/z$  357.1329  $[M + H]^+$  (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> + H, 357.1338), suggesting 11 degrees of unsaturation. The IR spectrum of compound 1 exhibited characteristic absorption bands for a  $\gamma$ -lactone, a  $\delta$ -lactone, and a hydroxy group at 1765, 1701, and 3440 cm<sup>-1</sup>, respectively, along with a furan ring (1504 and 873 cm<sup>-1</sup>). The <sup>13</sup>C NMR spectrum (Table 1 and Figure S20,

C

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00313>  
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX



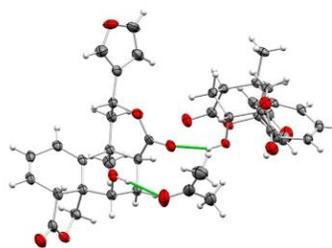
**Figure 2.** (A) Selected NOESY correlations of compound 1. (B) Comparison between the experimental (black line) and calculated ECD spectra for enantiomers (4*R*,5*S*,6*R*,8*S*,9*S*,12*R*)-1 (red dashed line) and (4*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*R*,12*S*)-1 (blue dashed line). Experimental ECD spectrum for 2 (green line).

Supporting Information) showed resonances for 20 carbons, grouped according to the HSQC experiment (Figure S22, Supporting Information), into one methyl, three methylenes, 10 methines, and four nonprotonated carbons, including two carbonyls and two quaternary carbons. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data (Table 1, Figures S19 and S20, Supporting Information) confirmed the presence of a furan ring [ $\delta_{\text{C}}$  108.6 (C-14), 143.9 (C-15), 140.0 (C-16);  $\delta_{\text{H}}$  6.45 (1*H*, dd,  $J = 1.8, 0.9$  Hz, H-14), 7.42 (1*H*, t,  $J = 1.7$  Hz, H-15), and 7.49 (1*H*, m, H-16)].

The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 1 showed an AB system at  $\delta_{\text{H}}$  4.41 and 4.04 ( $J = 9.1$  Hz), assigned to the oxymethylene at C-19. Other relevant signals were those due to an ABX system where the X part was observed at  $\delta_{\text{H}}$  5.49 (dd,  $J = 12.0, 2.0$  Hz), the B part at  $\delta_{\text{H}}$  2.59 (dd,  $J = 14.9, 2.0$  Hz), and the A part at  $\delta_{\text{H}}$  1.93 (dd,  $J = 14.9, 11.9$  Hz). Moreover, the 1D NMR spectrum (Table 1) showed resonances for one oxymethine at  $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  67.5/3.75, which was assigned to CH-6 and accordingly must be  $\beta$ -axially oriented to explain the deshielding effect on H-4, which appeared as a triplet at  $\delta_{\text{H}}$  3.95 (1*H*,  $J = 3.1$  Hz). The OH-6 signal was observed as a doublet at  $\delta_{\text{H}}$  2.27 (d,  $J = 2.4$  Hz). Additionally, the COSY experiment (Figure S21, Supporting Information) showed a spin system between H-4 and the signals at  $\delta_{\text{H}}$  6.06 (d,  $J = 6.1$  Hz), 6.13 (ddd,  $J = 9.4, 6.1, 3.1$  Hz), and 5.66 (dd,  $J = 9.4, 3.1$  Hz), which were ascribed to H-1, H-2, and H-3, respectively. Detailed analysis of the HMBC spectrum (Figure S23, Supporting Information), especially the three-bond correlations of H-3 with the carbonyl group at  $\delta_{\text{C}}$  177.4 (C-18), the cross-peak between H-12 and carbons C-13 and C-16 ( $\delta_{\text{C}}$  124.6 and 140.0, respectively), the correlation of H<sub>3</sub>-20 with C-8, C-10, and C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  44.7, 138.2, and 41.2), and the connection of H<sub>2</sub>-7 ( $\delta_{\text{H}}$  2.90, dd,  $J = 13.4, 4.2$  Hz and 2.41, ddd,  $J = 13.4, 5.9, 1.4$  Hz) with the carbonyl at C-17 ( $\delta_{\text{C}}$  173.9), confirmed the structure of 1 as depicted.

The relative configuration of 1 was established by considering an  $\alpha$ -orientation of CH<sub>3</sub>-20 and correlations observed in the NOESY spectrum (Figure 2A). Interactions among H<sub>3</sub>-20, H<sub>2</sub>-19, and H<sub>2</sub>-11 indicated that these are all on the same face of the molecule. The cross-peak of H-8 with H<sub>3</sub>-20 suggested the presence of a *cis*-fused  $\delta$ -lactone.

In order to establish the absolute configuration of compound 1, TD-DFT calculations were performed for the 4*S*, 5*R*, 6*S*, 8*R*, 9*R*, 12*S* diastereoisomer and its enantiomer. The experimental ECD spectra for 1 displayed a negative Cotton effect at 262 nm and was in good agreement with the calculated data for the 4*R*, 5*S*, 6*R*, 8*S*, 9*S*, 12*R* diastereoisomer (Figure 2B). Fortunately, a crystal suitable for single-crystal X-ray diffraction (Figure 3) was obtained and confirmed the absolute configuration of 1. Therefore, compound 1 was assigned as 1-dehydro-6 $\beta$ -



**Figure 3.** ORTEP drawing for compound 1 (two independent molecules). Ellipsoids are shown at the 30% probability level.

hydroxysalviarin, based on its similarity with 6 $\beta$ -hydroxysalviarin, a compound isolated previously from *Salvia rhyacophila*.<sup>27</sup>

Compound 2 was isolated as a glassy yellow solid. Its chemical structure was determined mainly by 1D and 2D NMR spectroscopic data analysis. The molecular formula of compound 2 was established as C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub> on the basis of its HRESIMS spectrum, which displayed a peak at  $m/z$  373.1279 [ $M + \text{H}]^+$  (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub> + H, 373.1282). The  $^1\text{H}$  and APT NMR spectra for compound 2 (Table 1, Figures S25 and S26, Supporting Information) were almost identical to those recorded for 1 and related analogues previously isolated from Mexican *Salvia* species.<sup>28,29</sup> The most evident difference found was the deshielding of C-8, which shifted from 44.7 ppm in 1 to 73.1 ppm in 2 and is attributed to an oxygenated function at this position. The absolute configuration of 2 was established as 4*R*, 5*S*, 6*R*, 8*R*, 9*R*, 12*R*, by comparison of its experimental ECD curve with that of 1 (Figure 1) and based on the NOESY correlation observed between OH-8 and H<sub>3</sub>-20 (Figure S30, Supporting Information). Interestingly, the chemical shift for OH-8 ( $\delta_{\text{H}}$  5.92 ppm) when recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub> was in agreement with the empiric rules established by Bautista and co-workers, which describe important  $^1\text{H}$  NMR features for assigning the absolute configuration at C-4, C-8, and C-10 in hydroxy-*neo*-clerodanes that bear a tertiary alcohol at these positions.<sup>29</sup> Even when quaternary carbons were not visible in the APT spectra (Figure S26, Supporting Information), their presence was evident in the HMBC experiment (Figure S29, Supporting Information). Consequently, compound 2 was assigned as 1-dehydro-6 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxysalviarin.

Compound 3 displayed a [ $M + \text{H}]^+$  molecular ion at  $m/z$  399.1436, as determined by HRESIMS, consistent with the molecular formula, C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>. The IR spectrum revealed absorption bands at 1739, 1709, 1518, and 875 cm<sup>-1</sup> ascribed

D

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00313>  
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX

to a  $\gamma$ -lactone, a  $\delta$ -lactone, an acetate, and a furan ring, respectively. The NMR data of compound 3 (Table 2) exhibited

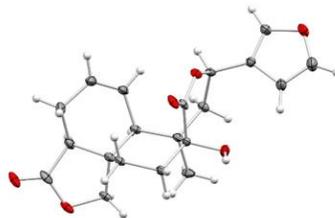
**Table 2.** NMR Data ( $^1\text{H}$  700 MHz, APT 175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) of Compound 3

position	$\delta_{\text{C}}$	type	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)	HMBC
1	130.7	CH	6.29, ddd (16.8, 5.9, 1.7)	2, 3, 9, 10
2	131.5	CH	6.53, ddd (11.2, 5.9, 1.6)	1, 4, 5, 10
3	121.3	CH	6.13, dquin (11.2, 1.4)	1, 5, 18
4	124.8	C		
5	159.8	C		
6a	34.1	$\text{CH}_2$	2.88, dd (15.4, 7.1)	4, 5, 7
6b			2.74, d (15.1)	4, 5, 7, 8
7	72.5	CH	5.05, dt (7.2, 1.3)	5, 6, 8, 9, 17
8	58.7	CH	2.88, d (1.7)	6, 7, 9, 10, 20, 1'
9	38.8	C		
10	135.6	CH	5.97, dd (17.0, 1.6)	2, 9, 20
11a	41.4	$\text{CH}_2$	2.21, dd (14.5, 3.7)	8, 9, 10, 12, 13, 20
11b			2.08, dd (14.5, 12.3)	8, 9, 10, 12, 13, 20
12	71.2	CH	5.67, dd (12.3, 3.7)	9, 13, 14, 16
13	124.5	C		
14	108.4	CH	6.43, dd (1.9, 0.9)	12, 13, 15, 16
15	144.1	CH	7.44, t (1.7)	13, 14, 16
16	139.9	CH	7.49, dt (1.7, 0.9)	13, 14, 15
17	168.4	C		
18	173.2	C		
19a	72.1	$\text{CH}_2$	4.69, brd (18.0)	4, 5, 18
19b			4.64, d (17.7)	4, 5, 18
20	25.4	$\text{CH}_3$	1.52, s	8, 9, 10
1'	171.0	C		
2'	21.4	$\text{CH}_3$	2.15, s	1'

features similar to those reported for salvimicrophyllin A,<sup>30</sup> except for the resonances corresponding to  $\text{CH}_2$ -7, which in compound 3 appeared as a deshielded doublet of triplets at  $\delta_{\text{H}}$  5.05 (1H,  $J = 7.2, 1.3$  Hz). Moreover, a sharp methyl singlet at  $\delta_{\text{H}}$  2.15 in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum (Figure S31, Supporting Information) and the two extra carbon resonances at  $\delta_{\text{C}}$  171.0 and 21.4 in the APT NMR spectrum (Figure S32, Supporting Information), associated with the presence of an acetate group, indicated that 3 is the acetoxy derivative of salvimicrophyllin A.<sup>30</sup> The structure was assigned unequivocally through the analysis of the HMBC spectrum (Figure S35, Supporting Information). The magnitude of its coupling constant and the cross-peak between H-7, H-8, and  $\text{H}_3$ -20 in the NOESY experiment (Figure 4A) were used to establish a  $\beta$ -orientation of

the acetate group. The absolute configuration of compound 3 was established as 7*S*, 8*R*, 9*R*, 12*R* based on the results obtained from the comparison between the theoretical (for conformers 3a–3d, Figure S44, Supporting Information) and experimental ECD curves (Figure 4B). Therefore, compound 3 was assigned as 7 $\beta$ -acetoxy-salvimicrophyllin A.

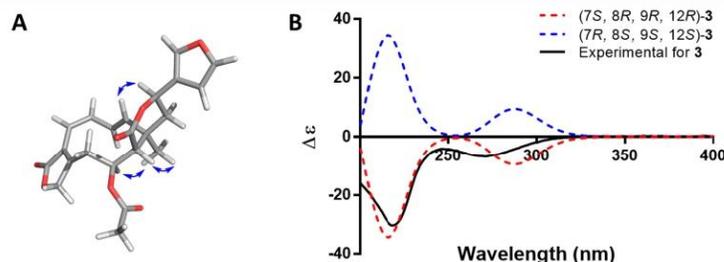
Sepulturin E (4) has been described previously;<sup>31</sup> nevertheless, in this work its absolute configuration (4*S*, 5*S*, 8*R*, 9*R*, 10*R*, 12*R*) was determined by single-crystal X-ray diffraction analysis (Figure 5) [Flack parameter = 0.07(3)].



**Figure 5.** ORTEP drawing for compound 4. Ellipsoids are shown at the 30% probability level.

Based on preliminary bioactivity results, compounds 1, 3, 4, and 6–8 were evaluated as  $h\text{PTP1B}_{1-400}$  inhibitors, while only compound 7 was evaluated as an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. Bioassay results for this set of compounds indicated that only compounds 3 and 7 inhibited  $h\text{PTP1B}_{1-400}$ . Interestingly, compound 3 only inhibits this enzyme by 50% at concentrations ranging from 380  $\mu\text{M}$  to 1 mM, whereas the  $\text{IC}_{50}$  value calculated for 7 was 33.1  $\mu\text{M}$ , in agreement with previously reported data.<sup>32</sup> Compound 7 inhibited the hydrolase activity of yeast  $\alpha$ -glucosidase with an  $\text{IC}_{50}$  of 7.5  $\mu\text{M}$ , similar to that described in the literature.<sup>33</sup> Hydroxy-*neo*-clerodanes have previously been reported as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors with  $\text{IC}_{50}$  values ranging from 113  $\mu\text{M}$  to higher than 5 mM.<sup>13</sup> Nevertheless, in this study, the obtained hydroxylated and nonhydroxylated *neo*-clerodane-rich fractions did not display significant activity against this molecular target when evaluated at 100 ppm.

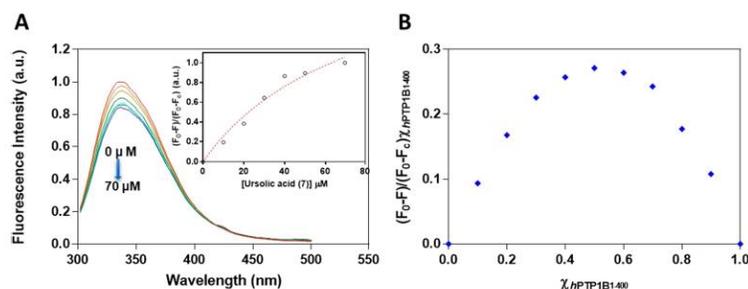
The affinity of ursolic acid (7) with  $h\text{PTP1B}_{1-400}$  in solution was measured by intrinsic quenching fluorescence experiments (Figure 6A). These experiments afford the ability to monitor the protein's conformational changes that occur when a ligand binds to the macromolecule and affects the local environment



**Figure 4.** (A) Selected NOESY correlations of compound 3. (B) Comparison between the experimental (black line) and calculated ECD spectra for enantiomers (7*S*, 8*R*, 9*R*, 12*R*)-3 (red dashed line) and (7*R*, 8*S*, 9*S*, 12*S*)-3 (blue dashed line).

E

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00313>  
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX



**Figure 6.** (A) Fluorescence spectra and titration curves (inset) of  $hPTP1B1_{1-400}$  ( $2 \mu\text{M}$ ) with ursolic acid ( $7, 0\text{--}70 \mu\text{M}$ ). Samples were excited at  $279 \text{ nm}$ , and the emission spectra recorded from  $300$  to  $500 \text{ nm}$ . The changes in maximal fluorescence emission were corrected for light scattering and plotted against the total concentration of ursolic acid ( $7$ ). The dashed red line in the inset comes from fitting the data to the binding model displayed in eq 3, to obtain  $k_a = (1/k_b)$ . (B) Job continuous variation plot of the  $7\text{--}hPTP1B1_{1-400}$  complex system at a final concentration of  $2.0 \mu\text{M}$  in HEPES pH  $6.8$ .

surrounding the aromatic amino acids (tryptophan, tyrosine, or phenylalanine).<sup>34</sup> In this experiment, the tryptophan-tyrosine residues were used as intrinsic fluorophores, and the samples excited at  $279 \text{ nm}$ . The results showed that compound **7** binds to the protein with a  $k_a$  of  $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , displaying less affinity than that reported for MSI-1436 (trodosquemine), an aminosterol that binds to  $hPTP1B1_{1-405}$  with stoichiometry (1:2, protein–ligand) and affinity constants of  $3.3 \times 10^6$  and  $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .<sup>22</sup> Furthermore, the stoichiometry ratio of the ursolic acid  $7\text{--}hPTP1B1_{1-400}$  complex was determined by the continuous variation method<sup>35</sup> (Job plot, Figure 6B), which indicated a 1:1 protein–ligand complex.

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Experimental Procedures.** Melting points (uncorrected) were determined on a Fisher-Johns apparatus. Optical rotations were measured on a PerkinElmer 341 polarimeter. The UV spectra were recorded on a Shimadzu UV 160U spectrophotometer. ECD spectra were recorded in a JASCO-1500 polarimeter in MeOH or  $\text{CH}_3\text{CN}$ . The IR spectra were obtained on a Bruker Tensor 27 spectrometer. NMR experiments were conducted in  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , or acetone- $d_6$ . NMR instrumentation was a Bruker Ascend III 700 MHz NMR spectrometer equipped with a cryoprobe, operating at  $700 \text{ MHz}$  for  $^1\text{H}$  and  $175 \text{ MHz}$  for  $^{13}\text{C}$  and APT, or a Bruker Avance III 500 NMR spectrometer ( $^1\text{H}$   $500 \text{ MHz}$ ,  $^{13}\text{C}$   $125 \text{ MHz}$ ). The chemical shifts are reported in ppm relative to the solvent resonances as the internal standard. HRESIMS data were obtained using a Thermo QExactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher, San Jose, CA, USA), combined with an electrospray ionization source, or a JEOL AccuTOF JMS-T100LC mass spectrometer (HRDARTMS). MS analysis of primary fractions was carried out with a Waters Acquity ultra performance liquid chromatography (UPLC) system (Waters Corporation) coupled to a Thermo QExactive Plus. The UPLC separations were performed using an Acquity BEH  $\text{C}_{18}$  column ( $50 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ , internal diameter,  $1.7 \mu\text{m}$ ) equilibrated at  $40^\circ\text{C}$  and with a flow rate set at  $0.3 \text{ mL/min}$ . The mobile phase consisted of a linear  $\text{CH}_3\text{CN--H}_2\text{O}$  (acidified with  $0.1\%$  formic acid) gradient starting at  $15\%$   $\text{CH}_3\text{CN}$  to  $100\%$   $\text{CH}_3\text{CN}$  over  $8 \text{ min}$ . The mobile phase was held for another  $1.5 \text{ min}$  at  $100\%$   $\text{CH}_3\text{CN}$  before returning to the starting conditions. The HPLC separations were performed using a Waters system (2535 quaternary pump) connected to a 2707 autosampler, a 2998 PDA, and a 2424 ELSD detector. Data acquisition and analysis were accomplished with the Empower 3 software (Waters). Analytical, semipreparative, and preparative HPLC were performed on a Gemini-NX  $5 \mu\text{m}$  particle size  $\text{C}_{18}$  or a Luna PFP column ( $4.6 \times 250 \text{ mm}$ ,  $10.0 \times 250 \text{ mm}$ , and  $21.2 \times 250 \text{ mm}$  for analytical, semipreparative, and preparative runs, respectively; Phenomenex, Torrance, CA, USA).

Silica gel 230–400 mesh (Macherey-Nagel; Düren, Germany) was used for open column chromatography.

**Plant Material.** Dr. Baldomero Esquivel-Rodríguez collected *Salvia decora* from Coyomeapan, Puebla, Mexico ( $18^\circ 19' 85'' \text{ N}$ ,  $97^\circ 3' 26'' \text{ W}$ ), in December 2016. The plant material was identified by Dr. Martha Martínez-Gordillo, and a voucher specimen (FCME 161789) was deposited at the Herbarium (FCME) of Facultad de Ciencias, UNAM.

**Extraction and Isolation.** The aerial and dried parts of *S. decora* were extracted following the procedure described by Bautista et al.<sup>31</sup> Briefly, the powdered material ( $550 \text{ g}$ ) was extracted via percolation with  $\text{Me}_2\text{CO}$  ( $4 \text{ L}$ ). The filtrate was evaporated to dryness in vacuo, and the resulting extract partitioned between hexanes ( $500 \text{ mL}$ ) and  $\text{MeOH--H}_2\text{O}$ ,  $4:1$  ( $500 \text{ mL} \times 3$ ). The  $\text{MeOH--H}_2\text{O}$  fraction was concentrated to one-fifth of its volume ( $300 \text{ mL}$ ) and extracted with EtOAc ( $500 \text{ mL} \times 3$ ) to yield  $10.3 \text{ g}$  of an organic extract. Then,  $9.5 \text{ g}$  of the EtOAc extract was adsorbed onto Celite 545 (Acros Organics) and fractionated by silica gel open column chromatography ( $250 \text{ g}$ ,  $\text{CV} = 500 \text{ mL}$ ), eluting with mixtures of hexanes–EtOAc ( $8:2$ ;  $2 \text{ CV}$ ), hexanes–EtOAc ( $7:3$ ;  $10 \text{ CV}$ ), hexanes–EtOAc ( $6:4$ ;  $10 \text{ CV}$ ), hexanes–EtOAc ( $1:1$ ;  $9 \text{ CV}$ ), hexanes–EtOAc ( $3:7$ ;  $3 \text{ CV}$ ), and EtOAc– $\text{Me}_2\text{CO}$  ( $1:1$ ;  $3 \text{ CV}$ ). Each fraction was monitored via TLC, and fractions with similar patterns were combined to give 17 primary fractions (F1–F17). Eupatorin (**8**,  $50.0 \text{ mg}$ ), the major constituent in fraction F8 ( $739.7 \text{ mg}$ ), precipitated out and was separated by filtration. Compound **4** ( $13.9 \text{ mg}$ ) spontaneously crystallized from fraction F6. Approximately  $1150 \text{ mg}$  of F6 was fractionated by silica gel open column chromatography ( $50 \text{ g}$ ,  $\text{CV} = 100 \text{ mL}$ ), eluting with mixtures of  $\text{CHCl}_3$   $100\%$  ( $2 \text{ CV}$ ),  $\text{CHCl}_3\text{--Me}_2\text{CO}$  ( $98:2$ ;  $3 \text{ CV}$ ),  $\text{CHCl}_3\text{--Me}_2\text{CO}$  ( $96:4$ ;  $18 \text{ CV}$ ),  $\text{CHCl}_3\text{--Me}_2\text{CO}$  ( $94:6$ ;  $4 \text{ CV}$ ),  $\text{CHCl}_3\text{--Me}_2\text{CO}$  ( $90:10$ ;  $4 \text{ CV}$ ),  $\text{CHCl}_3\text{--Me}_2\text{CO}$  ( $85:15$ ;  $6 \text{ CV}$ ),  $\text{CHCl}_3\text{--Me}_2\text{CO--MeOH}$  ( $85:10:5$ ;  $4 \text{ CV}$ ), and  $\text{CHCl}_3\text{--Me}_2\text{CO--MeOH}$  ( $75:10:15$ ;  $2 \text{ CV}$ ). Each fraction was monitored via TLC, and fractions with similar patterns were combined to give 14 secondary fractions (F6<sub>1</sub>–F6<sub>14</sub>). Fraction F6<sub>5</sub> ( $62.4 \text{ mg}$ ) afforded compound **3**. Fraction F6<sub>3</sub> ( $30.0 \text{ mg}$ ) was subjected to preparative reversed-phase chromatography on a Luna PFP column with a gradient solvent system of  $\text{CH}_3\text{CN--H}_2\text{O}$  ( $0.1\%$  formic acid) ( $40:60 \rightarrow 45:55$ ) over  $30 \text{ min}$  at a  $21.2 \text{ mL/min}$  flow rate, to afford compound **6** ( $7.2 \text{ mg}$ ). Resolution of fraction F6<sub>12</sub> ( $10.0 \text{ mg}$ ) by reversed-phase HPLC with an analytical Symmetry column ( $\text{C}_{18}$ ,  $3.5 \mu\text{m}$ ,  $4.6 \times 75 \text{ mm}$ , Waters Corporation) and an isocratic solvent system of  $\text{CH}_3\text{CN--H}_2\text{O}$  ( $0.1\%$  formic acid) ( $45:55$ ) at a  $1.0 \text{ mL/min}$  flow rate afforded clerodermic acid (**5**,  $3.0 \text{ mg}$ ). Compound **1** ( $25.0 \text{ mg}$ ) precipitated from fraction F9. Resolution of fraction F10 ( $30.0 \text{ mg}$ ) by reversed-phase ( $\text{C}_{18}$ ) preparative HPLC using a gradient method starting with  $30\%$   $\text{CH}_3\text{CN}$  in acidic water ( $0.1\%$  formic acid) to  $60\%$   $\text{CH}_3\text{CN}$  over  $30 \text{ min}$  at  $15 \text{ mL/min}$  gave compound **2** ( $5.0 \text{ mg}$ ). Fraction F3 was subjected to bentonitic clay open column chromatography ( $20 \text{ g}$ ,  $\text{CV} = 30 \text{ mL}$ ), eluting with mixtures of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   $100\%$  ( $5 \text{ CV}$ ),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{--Me}_2\text{CO}$  ( $98:2$ ;  $5 \text{ CV}$ ),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{--}$

F

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00313>  
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX

Me<sub>2</sub>CO (95:5; (5 CV), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–Me<sub>2</sub>CO (9:1; 5 CV), and EtOAc 100% (5 CV). Each fraction was monitored via TLC, and fractions with similar patterns were combined to give five secondary fractions (F3<sub>1</sub>–F3<sub>5</sub>). Fraction F3<sub>4</sub> afforded 37.8 mg of 7.

**1-Dehydro-6β-hydroxysalviarin (1):** colorless crystals; mp 201–204 °C;  $[\alpha]_D^{25}$  –287 (*c* 0.14, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 207.0 (4.09), 263.0 (3.83) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3440, 1765, 1701, 1504, 1452, 1227, 1011, 873, 704, 602 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, see Table 1; HRDARTMS *m/z* [M + H]<sup>+</sup> 357.1329 (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>O<sub>6</sub>, 357.1338).

**1-Dehydro-6β,8α-dihydroxysalviarin (2):** colorless crystals;  $[\alpha]_D^{25}$  –287 (*c* 0.17, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 207.0 (4.03), 263.0 (3.60) nm; IR (film)  $\nu_{\max}$  3431, 1764, 1712, 1504, 1455, 1228, 1019, 874, 731, 601 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and APT NMR, see Table 1; HRESIMS *m/z* 373.1279 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub> + H, 373.1282).

**7β-Acetoxyalvimicrophyllin A (3):** colorless oil;  $[\alpha]_D^{25}$  –287 (*c* 0.25, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 205.0 (4.15) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  2958, 2930, 1739, 1709, 1518, 1159, 875 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and APT NMR, see Table 2; HRESIMS *m/z* 399.1436 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>, 399.1434).

**Sepulturnin E (4):** colorless crystals; mp 250–253 °C (lit. 204–206 °C);  $[\alpha]_D^{25}$  –287 (*c* 0.28, MeOH); <sup>1</sup>H and APT NMR data were essentially the same as reported.<sup>27</sup>

**X-ray Crystallographic Analysis.** Crystallographic data for **1** and **4** were collected on a Bruker SMART APEX DUO three-circle diffractometer, equipped with an Apex II CCD detector, using Cu K $\alpha$  radiation ( $\lambda$  = 1.541 78 Å, Incoatec I $\mu$ S microsource) at 100 K. The crystals were coated with hydrocarbon oil, picked up with a nylon loop, and mounted in the cold nitrogen stream (100 K) of the diffractometer. The structures of compounds **1** and **4** were solved by direct methods (SHELXS-97) and refined by full-matrix least-squares on F<sup>2</sup>,<sup>36</sup> using shelXle GUI.<sup>37</sup> The hydrogen atoms of the C–H bonds were placed in idealized positions, whereas the hydrogen atoms from the OH moieties and water molecule in the cocrystal were localized from the difference in electron density maps, and their positions refined with U<sub>iso</sub> tied to the parent atom with a distance restraint of 0.84 Å for the O–H bond (using the DFIX instruction).

The disordered moieties in **4** and the solvent molecules in **1** were refined using geometry (SAME) and U<sub>ij</sub> restraints (SIMU, RIGU), as implemented in SHELXL. One molecule of acetone in **4** displayed positional disorder promoted by water incorporated in the crystal (12.60%). The relationship of occupational disorder was calculated using a free variable. In the crystal for **1**, an acetone and a water molecule showed occupational disorder, and the occupation was calculated using a free variable; the ratio was 74:26 acetone–water.

The crystallographic data and refinement details for **1** and **4** are summarized in Table S1 (Supporting Information). The crystallographic data have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC) with numbers 1991345 (**1**) and 1991346 (**4**). These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving/html>.

**X-ray Crystallographic Analysis of 1.** A colorless crystal (C<sub>22</sub>H<sub>25.48</sub>O<sub>7</sub>, M = 409.19, approximate dimensions 0.452 × 0.273 × 0.128 mm) was obtained by slow evaporation of acetone solutions and used for the X-ray crystallographic analysis. Two independent molecules of **1**, 1.74 molecules of acetone, and 0.26 molecule of water are present in the asymmetric unit. The integration of the data for one molecule of **1** using a monoclinic unit cell in the P<sub>2</sub><sub>1</sub> space group yielded a total of 7010 independent reflections (completeness = 100.0%, R<sub>int</sub> = 3.03%) in the range of 2.075° <  $\theta$  < 70.060°. The final cell constants were *a* = 12.3816(4) Å, *b* = 7.6040(3) Å, *c* = 21.7468(7) Å,  $\alpha$  = 90.00°,  $\beta$  = 101.7694(12)°,  $\gamma$  = 90.00°, *V* = 2004.41(12) Å<sup>3</sup>. The final *R* indices [*I* > 2 $\sigma$ (*I*)], *R*<sub>1</sub> and *wR*<sub>2</sub>, were 0.0353 and 0.1006, respectively. The *R* indices (all data) for *R*<sub>1</sub> was 0.0356 and 0.1010 for *wR*<sub>2</sub>. The goodness of fit on F<sup>2</sup> was 1.047, and the absolute configuration of **1** was determined as 4*R*, 5*S*, 6*R*, 8*S*, 9*S*, 12*R* by the Flack parameter of 0.01(5). The OH moieties form discrete H-bonds are described as D<sub>2</sub><sup>9</sup> in terms of graph sets (Figure 4).

**X-ray Crystallographic Analysis of 4.** A colorless crystal (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>, M = 358.37, approximate dimensions 0.185 × 0.154 ×

0.153 mm) was used for the X-ray crystallographic analysis. Compound **4** crystallized in an orthorhombic system in the P<sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub> space group with five molecules in the asymmetric unit (20 total molecules in the unit cell), four of which are disordered into two orientations, with ratios of 57:43, 57:43, 81:19, and 81:19, respectively, for each orientation. The integration of the data using an orthorhombic unit cell yielded a total of 16 015 independent reflections (completeness = 99.9%, R<sub>int</sub> = 3.86%) in the range of 2.146° <  $\theta$  < 69.123°. The final cell constants were *a* = 9.1387(10) Å, *b* = 24.286(3) Å, *c* = 38.773(4) Å,  $\alpha$  =  $\beta$  =  $\gamma$  = 90.00°, *V* = 8605.5(16) Å<sup>3</sup>. The final *R* indices [*I* > 2 $\sigma$ (*I*)], *R*<sub>1</sub> and *wR*<sub>2</sub>, were 0.0583 and 0.1399, respectively. The *R* indices (all data) for *R*<sub>1</sub> and *wR*<sub>2</sub> were 0.0600 and 0.1413, respectively. The goodness of fit on F<sup>2</sup> was 1.094. The absolute configuration of **4** was determined as 4*S*, 5*S*, 8*R*, 9*R*, 10*R*, 12*R* by the Flack parameter of 0.07(3). The molecules form discrete H-bonds between O–H and the carboxylate of the pyranone moiety and are described as D<sub>1</sub><sup>2</sup> in terms of graph sets (Figure 6).

**Molecular Networking Analysis.** HRESIMS data were obtained using a Thermo QExactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher, San Jose, CA, USA) combined with an ESI source. All data were converted from .raw files to mzXML file format using Thermo MSFileReader Software.<sup>1,5</sup> Data were submitted to the GNPS server (gnps.ucsd.edu), and molecular networking was performed using the GNPS data analysis workflow with the spectral clustering algorithm.<sup>25</sup> Altogether, six matched peaks were chosen for further analysis. The parameters include fragment ion mass tolerance (0.5 Da), precursor ion mass tolerance (2.0 Da), and a minimum cluster size of two. The network was visualized using Cytoscape 3.6.1 (Figure S17, Supporting Information).<sup>1,2,4</sup>

**$\alpha$ -Glucosidase Inhibition Assay.** The extract (1000 ppm), fractions (1000 ppm), ursolic acid (**7**), and acarbose (positive control, 30 mM, Sigma-Aldrich) were dissolved in MeOH or phosphate buffer solution (PBS, 100 mM, pH 7). Aliquots of 0–10  $\mu$ L of testing materials (in triplicate) were incubated for 10 min with 5  $\mu$ L of enzyme stock solution (1.0 U/mL, *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich) in PBS. After incubation, 10  $\mu$ L of the substrate (pNPG, 5 mM, Sigma-Aldrich) was added and incubated for 20 min at 37 °C, and the absorbances were determined. All assays were carried out in a final volume of 100  $\mu$ L. For end point assays, the inhibitory activity was determined as a percentage in comparison to the blank (MeOH) according to eq 1.

$$\% \alpha \text{GHY} = \left( 1 - \frac{A_{405t}}{A_{405c}} \right) 100\% \quad (1)$$

where  $\alpha$ GHY is the percentage of inhibition, *A*<sub>405t</sub> is the corrected absorbance of the extract or compound under testing (*A*<sub>405-end</sub> – *A*<sub>405-initial</sub>), and *A*<sub>405c</sub> is the absorbance of the blank (*A*<sub>405-end/blank</sub> – *A*<sub>405-initial/blank</sub>). The IC<sub>50</sub> values were calculated by regression analysis, using eq 2.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{100} I^s}{(I + IC_{50})^s} \quad (2)$$

where *A*<sub>100</sub> is the maximum inhibition, *I* is the inhibitor concentration, IC<sub>50</sub> is the concentration required to inhibit activity of the enzyme by 50%, and *s* is the cooperative degree.

**Expression and Purification of hPTP1B<sub>1–400</sub>.** Wild-type PTP1B (hPTP1B<sub>1–400</sub>, residues 1–400) containing an N-terminal 6 $\times$ His-tag was cloned into the pET28 vector. The plasmid was transformed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS strain using LB medium. Protein expression was induced using 1 mM IPTG at 20 °C for 16 h. Purification of hPTP1B<sub>1–400</sub> was carried out following the procedure described by Krishnan et al. and Jiménez-Arreola et al., with some modifications.<sup>21,22,32</sup> Briefly, cells were resuspended in lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.2, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, and 2 mM TCEP) and lysed using sonication in an ice bath (4 °C). Lysates were then centrifuged and purified using affinity chromatography by gravity (1 mL/min) with 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 300 mM imidazole, and 1.5 mM DTT. Buffer solution was exchanged using 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, and 1.5 mM DTT. The protein was

G

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00313>  
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX

used immediately or stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, and 4% glycerol.<sup>21,22,32</sup>

**hPTP1B<sub>1-400</sub> Inhibition Assay.** The extract (500 ppm), fractions (500 ppm), and isolated compounds, including ursolic acid (7, positive control, 600  $\mu\text{M}$ ), were dissolved in DMSO. Aliquots of 0–10  $\mu\text{L}$  of test materials (in triplicate) were incubated for 10 min with 5  $\mu\text{L}$  of enzyme stock solution (3  $\mu\text{M}$ ) in 50 mM HEPES pH 6.8, 100 mM NaCl, and 1.5 mM DTT. After incubation, 10  $\mu\text{L}$  of the substrate (*p*-NPP 30 mM, Sigma-Aldrich) was added and incubated for 20 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ ; then the absorbances were determined. All assays were performed in a final volume of 100  $\mu\text{L}$ . For end point assays, the inhibitory activity was determined as a percentage in comparison to the blank (DMSO) according to eq 1. The  $\text{IC}_{50}$  values were calculated by regression analysis using eq 2.

**Steady-State Quenching Fluorescence Experiments.** All measurements were carried out with an Agilent Cary Eclipse spectrometer with continuous stirring at 25  $^{\circ}\text{C}$ . hPTP1B<sub>1-400</sub> (2  $\mu\text{M}$ ) was incubated in buffer (50 mM HEPES pH 6.8, 100 mM NaCl, and 1.5 mM DTT). The excitation wavelength was 279 nm, and emission wavelengths were recorded from 300–500 nm. The saturation degree of hPTP1B<sub>1-400</sub> with ursolic acid (7) was calculated by changes in fluorescence according to  $(F_0 - F)/(F_0 - F_c)$ , where  $F$  is the measured fluorescence and  $F_0$  and  $F_c$  are the fluorescence in the absence of the ligand and the fully saturated protein, respectively. The value of the  $k_a$  for the 7–hPTP1B<sub>1-400</sub> complex was calculated by analyzing the changes in fluorescence according to eq 3.

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} = \frac{[P]_t + [L]_t + k_d - \sqrt{([P]_t + [L]_t + k_d)^2 - 4[P]_t[L]_t}}{2[P]_t} \quad (3)$$

where  $[P]_t$  and  $[L]_t$  are the total protein and ligand concentration, respectively, and  $k_d = (1/k_2)$  is the dissociation constant.<sup>38</sup>

**Stoichiometry of the Complex Ursolic Acid (7)–hPTP1B<sub>1-400</sub>.** The stoichiometry of the complex 7–hPTP1B<sub>1-400</sub> was established by the continuous variation method. In this experiment, the sample (final concentration 2  $\mu\text{M}$ ) was excited at 279 nm, and the emission spectra were recorded from 300 to 500 nm. Plots of  $(F_0 - F)/(F_0 - F_c)\chi_{\text{PTP1B}}$  against  $\chi_{\text{PTP1B}}$  resulted in a typical Job plot, and the intersection of the resulting lines indicated the stoichiometry ratio.

**Computational Details.** 3D models for compounds 1 and 3 were built and geometry optimized using Spartan'10 with a semiempirical method (PM3). Conformational analysis was carried out by means of the same software and force field. The resulting conformers were filtered and checked for redundancy. All conformers within 10 kcal/mol were minimized using a DFT force field at the B3LYP/DGDZVP level of theory, employing Gaussian 09. The conformers were optimized, and thermochemical properties, IR, and vibrational analyses were obtained at the same level of theory. The TD-SCF with the default solvent model was used to perform the ECD calculations of the major conformers, in MeOH solution and using a B3LYP/DGDZVP or B3LYP/6-31G\*(d) force field. The calculated excitation energy (nm) and rotatory strength ( $R$ ) in dipole velocity ( $R_{\text{vd}}$ ) form was simulated into an ECD curve using eq 4 as implemented in the SpecDis software,<sup>39,40</sup> where  $E_k$  and  $R_k$  are the transition energy and rotatory strength of the  $k$ th electronic transition, respectively, and  $\sigma$  is the exponential half-width.

$$\Delta\epsilon(\lambda) = \frac{1}{2.296 \times 10^{-39}} \times \frac{1}{\sigma\sqrt{\pi}} \sum_k E_{0k} R_{0k} e^{-\left\{ \frac{E - E_{0k}}{\sigma} \right\}^2} \quad (4)$$

All calculations were performed on the HP Cluster Platform 3000SL "Miztli", a parallel supercomputer with a Linux operating system, containing 25 312 cores and a total of 15 000 GB of RAM.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.0c00313>.

1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and APT) and 2D (COSY, HSQC, HMBC, and NOESY) NMR and HRMS data for compounds 1, 2, and 3. (PDF)

X-ray data (CIF)

X-ray data (CIF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

José Rivera-Chávez – *Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico*; [orcid.org/0000-0002-9225-6200](https://orcid.org/0000-0002-9225-6200); Phone: +52 55 5622-4450; Email: [jrivera@iquimica.unam.mx](mailto:jrivera@iquimica.unam.mx)

### Authors

Celia Bustos-Brito – *Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico*

Enrique Aguilar-Ramírez – *Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico*

Diego Martínez-Otero – *Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM, Carretera Toluca-Atacomulco, Toluca 50200, Mexico*

Luis D. Rosales-Vázquez – *Departamento de Química Inorgánica, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico*; [orcid.org/0000-0002-9704-5146](https://orcid.org/0000-0002-9704-5146)

Alejandro Dorazco-González – *Departamento de Química Inorgánica, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico*; [orcid.org/0000-0002-7056-4237](https://orcid.org/0000-0002-7056-4237)

Patricia Cano-Sánchez – *Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico*

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.0c00313>

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from DGAPA, PAPIIT, UNAM (IA200818/IA203220). This research received partial financial support from CONACYT, through infrastructure project no. 295057. The authors would like to thank Dr. Beatriz Quiroz-García (Instituto de Química, UNAM) for the collection of spectroscopic and spectrometric data. We also thank M. Sc. Antonio Nieto and M. Sc. Rocío Patiño (Instituto de Química, UNAM), for their help with the enzymatic assays and collection of spectroscopic data, respectively. J.R.-C. is indebted to the Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for providing the resources to carry out the computational calculations through the Miztli System, through the seed project LANCAD-UNAM-DGTIC-374. This study made use of

H

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00313>  
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX

UNAM's NMR Laboratory, LURMN at IQ-UNAM, which is funded by CONACyT-Mexico (Project 0224747) and UNAM, as well as the instrumentation acquired through the BGS-IQ node. J.R.-C. would like to thank Dr. Leovigildo Quijano (Instituto de Química, UNAM) for providing the infrastructure to perform this research. We thank Dr. Baldomero Esquivel-Rodríguez for providing the plant material to carry out this research. Finally, J.R.-C. would like to thank MSc. Jacklyn M. Gallagher for her assistance in the revision of the manuscript.

## REFERENCES

- (1) Olivon, F.; Allard, P.-M.; Koval, A.; Righi, D.; Genta-Jouve, G.; Neyts, J.; Apel, C.; Pannecouque, C.; Nothias, L.-F.; Cachet, X.; Marcourt, L.; Roussi, F.; Katanaev, V. L.; Touboul, D.; Wolfender, J.-L.; Litaudon, M. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2644–2651.
- (2) Olivon, F.; Remy, S.; Grelier, G.; Apel, C.; Eyedoux, C.; Guillemot, J.-C.; Neyts, J.; Delang, L.; Touboul, D.; Roussi, F.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 330–340.
- (3) Ravu, R. R.; Jacob, M. R.; Jeffries, C.; Tu, Y.; Khan, S. I.; Agarwal, A. K.; Guy, R. K.; Walker, L. A.; Clark, A. M.; Li, X.-C. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2255–2259.
- (4) Nothias, L.-F.; Nothias-Esposito, M.; da Silva, R.; Wang, M.; Protsyuk, I.; Zhang, Z.; Sarvepalli, A.; Leyssen, P.; Touboul, D.; Costa, J.; Paolini, J.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Dorrestein, P. C. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 758–767.
- (5) Crüseman, M.; O'Neill, E. C.; Larson, C. B.; Melnik, A. V.; Floros, D. J.; da Silva, R. R.; Jensen, P. R.; Dorrestein, P. C.; Moore, B. S. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 588–597.
- (6) Rivera-Chávez, J.; Zacatenco-Abarca, J.; Morales-Jiménez, J.; Martínez-Aviña, B.; Hernández-Ortega, S.; Aguilar-Ramírez, E. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 3558–3562.
- (7) Wu, Y.-B.; Ni, Z.-Y.; Shi, Q.-W.; Dong, M.; Kiyota, H.; Gu, Y.-C.; Cong, B. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5967–6026.
- (8) Martínez-Gordillo, M.; Bedolla-García, B.; Cornejo-Tenorio, G.; Fragoso-Martínez, I.; García-Peña, M. d. R.; González-Gallegos, J. G.; Lara-Cabrera, S. L.; Zamudio, S. *Bot. Sci.* **2017**, *95*, 780–806.
- (9) Villaseñor, J. L. *Rev. Mex. Biodiv.* **2016**, *87*, 559–902.
- (10) Llubra-Montesino, N.; Schmidt, T. J. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1–32.
- (11) Roach, J. J.; Shenvi, R. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 1436–1445.
- (12) Ortega, A.; Blount, J. F.; Manchand, P. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 2505–2508.
- (13) Bisio, A.; de Mieri, M.; Milella, L.; Schito, A. M.; Parricchi, A.; Russo, D.; Alfei, S.; Lapillo, M.; Tuccinardi, T.; Hamburger, M.; de Tommasi, N. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 503–514.
- (14) Flores-Bocanegra, L.; González-Andrade, M.; Bye, R.; Linares, E.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1584–1593.
- (15) Federation, I. D. *IDF Diabetes Atlas*, 9th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2019.
- (16) Israilli, Z. H. *Ame. J. Ther.* **2011**, *18*, 117–152.
- (17) Schwartsburd, P. *Curr. Pharm. Des.* **2018**, *24*, 1007–1011.
- (18) Vieira, M. N.; Lyra, E. S. N. M.; Ferreira, S. T.; De Felice, F. G. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, 1–9.
- (19) Maheshwari, N.; Karthikeyan, C.; Bhadada, S. V.; Verma, A. K.; Sahi, C.; Moorthy, N. S. H. N.; Trivedi, P. *Bioorg. Chem.* **2019**, *92*, 103221.
- (20) Tamrakar, A. K.; Maurya, C. K.; Rai, A. K. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, *24*, 1101–1115.
- (21) Krishnan, N.; Bonham, C. A.; Rus, I. A.; Shrestha, O. K.; Gauss, C. M.; Haque, A.; Tocilj, A.; Joshua-Tor, L.; Tonks, N. K. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–17.
- (22) Krishnan, N.; Koveal, D.; Miller, D. H.; Xue, B.; Akshinthala, S. D.; Kragelj, J.; Jensen, M. R.; Gauss, C.-M.; Page, R.; Blackledge, M.; Muthuswamy, S. K.; Peti, W.; Tonks, N. K. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 558–566.
- (23) Feldhammer, M.; Uetani, N.; Miranda-Saavedra, D.; Tremblay, M. L. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *48*, 430–445.
- (24) Zhang, S.; Zhang, Z.-Y. *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 373–381.
- (25) Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kapono, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; Porto, C.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; Meehan, M. J.; Liu, W. T.; Crusemann, M.; Boudreau, P. D.; Esquenazi, E.; Sandoval-Calderon, M.; Kersten, R. D.; Pace, L. A.; Quinn, R. A.; Duncan, K. R.; Hsu, C. C.; Floros, D. J.; Gavilan, R. G.; Kleigrewe, K.; Northen, T.; Dutton, R. J.; Parrot, D.; Carlson, E. E.; Aigle, B.; Michelsen, C. F.; Jelsbak, L.; Sohlenkamp, C.; Pevzner, P.; Edlund, A.; McLean, J.; Piel, J.; Murphy, B. T.; Gerwick, L.; Liaw, C. C.; Yang, Y. L.; Humpf, H. U.; Maansson, M.; Keyzers, R. A.; Sims, A. C.; Johnson, A. R.; Sidebottom, A. M.; Sedio, B. E.; Klitgaard, A.; Larson, C. B.; P, C. A. B.; Torres-Mendoza, D.; Gonzalez, D. J.; Silva, D. B.; Marques, L. M.; Demarque, D. P.; Pociute, E.; O'Neill, E. C.; Briand, E.; Helfrich, E. J. N.; Granatosky, E. A.; Glukhov, E.; Ryffel, F.; Houson, H.; Mohimani, H.; Kharbush, J. J.; Zeng, Y.; Vorholt, J. A.; Kurita, K. L.; Charusanti, P.; McPhail, K. L.; Nielsen, K. F.; Vuong, L.; Elfeki, M.; Traxler, M. F.; Engene, N.; Koyama, N.; Vining, O. B.; Baric, R.; Silva, R. R.; Mascuch, S. J.; Tomasi, S.; Jenkins, S.; Macherla, V.; Hoffman, T.; Agarwal, V.; Williams, P. G.; Dai, J.; Neupane, R.; Gurr, J.; Rodriguez, A. M. C.; Lamsa, A.; Zhang, C.; Dorrestein, K.; Duggan, B. M.; Almalliti, J.; Allard, P. M.; Phapale, P. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828–837.
- (26) Li, R.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K.-H. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 1166–1226.
- (27) Fernández, M. C.; Esquivel, B.; Cárdenas, J.; Sánchez, A. A.; Toscano, R. A.; Rodríguez-Hahn, L. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 7199–7208.
- (28) Bautista, E.; Maldonado, E.; Ortega, A. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 951–958.
- (29) Ortega, A.; Ortiz-Pastrana, N.; Bedolla-García, B. Y.; Toscano, R. A.; Bautista, E. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1141*, 157–162.
- (30) Bautista, E.; Toscano, R. A.; Ortega, A. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1088–1092.
- (31) Bautista, E.; Toscano, A.; Calzada, F.; Díaz, E.; Yépez-Mulia, L.; Ortega, A. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1970–1975.
- (32) Jiménez-Arreola, B. S.; Aguilar-Ramírez, E.; Cano-Sánchez, P.; Morales-Jiménez, J.; González-Andrade, M.; Medina-Franco, J. L.; Rivera-Chávez, J. *Bioorg. Chem.* **2020**, *101*, 103893.
- (33) Wu, P. P.; Zhang, B. J.; Cui, X. P.; Yang, Y.; Jiang, Z. Y.; Zhou, Z. H.; Zhong, Y. Y.; Mai, Y. Y.; Ouyang, Z.; Chen, H. S.; Zheng, J.; Zhao, S. Q.; Zhang, K. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–17.
- (34) Akbar, S. M.; Sreeramulu, K.; Sharma, H. C. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2016**, *48*, 241–247.
- (35) Ingham, K. C. *Anal. Biochem.* **1975**, *68*, 660–663.
- (36) Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **2008**, *64*, 112–122.
- (37) Hübschle, C. B.; Sheldrick, G. M.; Dittrich, B. *J. Appl. Crystallogr.* **2011**, *44*, 1281–1284.
- (38) Bakar, K. A.; Feroz, S. R. *Spectrochim. Acta, Part A* **2019**, *223*, 117337–117341.
- (39) Rivera-Chávez, J.; Figueroa, M.; González, M. d. C.; Glenn, A. E.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 730–735.
- (40) Bruhn, T.; Schaumlöffel, A.; Hemberger, Y.; Bringmann, G. *Chirality* **2013**, *25*, 243–249.