



LATVIJAS UNIVERSITĀTE

ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

ANETE PARKOVA

POTENCIĀLU β -LAKTAMĀŽU INHIBITORU SINTĒZE CIKLISKO BORSKĀBJU ESTERU KLASĒ

PROMOCIJAS DARBS

Zinātniskais vadītājs:

Dr. chem. vad. pētn. Pēteris Trapencieris

RĪGA

2021

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā laika posmā no 2013. gada līdz 2021. gadam.



InnovaBalt
Strengthening the research and innovative capacities
of the Latvian Institute of Organic Synthesis



FP7-REGPOT-InnovaBalt

LOSI iekšējie studentu granti IG-2016-09 un IG-2018-08.

Darbs sastāv no ievada, 3 nodaļām, secinājumiem, literatūras saraksta, 3 pielikumiem.

Darba forma: disertācija ķīmijas nozarē, organiskās ķīmijas apakšnozarē.

Darba zinātniskais vadītājs: *Dr. chem. Pēteris Trapencieris*

Darba recenzenti:

- 1) *Dr. chem. Pāvels Arsenjans*, Latvijas Organiskās sintēzes institūts;
- 2) *Dr. chem., prof. Ērika Bizdēna*, Rīgas Tehniskā Universitāte;
- 3) *Dr. chem. Einārs Loža*, Latvijas Organiskās sintēzes institūts.

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2021. gada 16. decembrī plkst. 14.00 Latvijas Universitātes Ķīmijas nozares promocijas padomes atklātajā sēdē Latvijas Universitātes Dabaszinātņu akadēmiskajā centrā, Rīgā, Jelgavas ielā 1 vai attālināti tiešsaistes platformā *Zoom*, atkarībā no epidemioloģiskās situācijas valstī.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Raiņa bulvārī 19.

LU Ķīmijas zinātņu nozares promocijas

padomes priekšsēdētājs _____ / *Edgars Sūna* /
(paraksts)

promocijas padomes sekretāre _____ / *Vita Rudoviča* /
(paraksts)

© Latvijas Universitāte, 2021

© Anete Parkova, 2021

ANOTĀCIJA

Potenciālu β -laktamāžu inhibitoru sintēze ciklisko borskābju esteru klasē. Parkova A., zinātniskais vadītājs *Dr. chem.* Trapencieris P. Promocijas darbs, 156 lappuses, 63 attēli, 6 tabulas, 94 literatūras avoti, 3 pielikumi. Latviešu valodā.

Darbā apkopota literatūra par β -laktamāžu lomu antibiotiku rezistences veicināšanā un par pašlaik zināmiem β -laktamāžu inhibitoriem. Apkopota literatūra par ciklisku borskābju pusesteru iegūšanas metodēm. Pētījuma ietvaros izstrādātas metodes ciklisko borskābju pusesteru iegūšanai un sintezēti viens biciklisks un seši tricikliski borskābju pusesteri. Veikta sintezēto savienojumu β -laktamāžu inhibēšanas aktivitātes datu analīze. Veikta atsevišķu savienojumu kristalogrāfijas datu analīze, nosakot to saistīšanās veidu enzīmu aktīvajā centrā. Sintezētie savienojumi uzrādīja inhibitoro aktivitāti gan pret serīna β -laktamāžu, gan pret metāl- β -laktamāžu enzīmiem.

Atslēgvārdi: ANTIBIOTIKU REZISTENCE, SERĪNA β -LAKTAMĀZES, METĀL- β -LAKTAMĀZES, CIKLISKI BORSKĀBJU PUSESTERI.

ABSTRACT

Synthesis of cyclic boronates as potential β -lactamase inhibitors. Parkova A., supervisor *Dr. chem.* Trapencieris P. Doctoral thesis, 156 pages, 63 figures, 6 tables, 94 literature references, 3 appendices. In Latvian.

Doctoral thesis summarizes the literature review about the role of β -lactamases in rise of antibiotic resistance and known-to-date β -lactamase inhibitors. Reports about synthesis of cyclic boronates have been reviewed. Procedures for the synthesis of cyclic boronates have been developed. One bicyclic and six tricyclic boronates were synthesized. The inhibitory activity against β -lactamases of synthesized compounds was analyzed. Analysis of crystallographic data of selected compounds was made, allowing to identify their binding modes in the active site of an enzyme. Synthesized compounds have shown inhibitory activity against both, serine β -lactamase and metallo- β -lactamase enzymes.

Keywords: ANTIBIOTIC RESISTANCE, SERINE β -LACTAMASES, METALLO- β -LACTAMASES, CYCLIC BORONATES.

SATURA RĀDĪTĀJS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	6
IEVADS	9
1. LITERATŪRAS APSKATS	12
1.1. β -Laktāma antibiotikas, β -laktamāzes un β -laktamāžu inhibitori	12
1.2. Ciklisko borskābju pusesteru sintēzes metodes.....	22
1.2.1. Iegūšana borilēšanas reakcijā ar BCl_3 vai BBr_3	22
1.2.2. Iegūšana metāla-halogēna apmaiņas reakcijā.....	23
1.2.3. Iegūšana ar rutēnija katalizētās reakcijās.....	23
1.2.4. Iegūšana no benzofurāniem ar bora iespiešanos C-O saitē	26
1.2.5. Dibenzoksaborīnu iegūšana <i>Suzuki-Miyaura</i> sametināšanas reakcijā.....	27
1.2.6. Iegūšana zelta katalizētā reakcijā no 2-alkinilfenilborskābēm	28
1.3. Efektīvāko boru saturošo SBL un MBL inhibitoru sintēze	29
1.3.1. Monocikliskā vaborbaktāma sintēzes metode	29
1.3.2. Biciklisko boronātu sintēzes metodes	30
1.3.3. Taniborbaktāma sintēze.....	32
1.3.4. Bicikliskā boronāta QPX7728 sintēze.....	33
2. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	35
2.1. Bicikliskā benziltiobenzoksaborīna sintēze un inhibitorā aktivitāte	36
2.2. Triciklisko benzoksaborīnu sintēze un to MBL inhibitorā aktivitāte.....	49
3. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	64
SECINĀJUMI	88
LITERATŪRAS SARAKSTS	90
PATEICĪBAS	100
1. Pielikums - Broad Spectrum β -Lactamase Inhibition by a Thioether Substituted Bicyclic Boronate	101
2. Pielikums - Bicyclic Boronates as Potent Inhibitors of AmpC, the Class C β -Lactamase from <i>Escherichia coli</i>	128
3. Pielikums – Konferenču tēzes	154

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

Δ – vārīšana
Ac – acetil-
AEŠH – augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija
AIMS – augstas izšķirtspējas masspektrometrija
Ala – alanīns
Ar – aril-
b/ū – bezūdens
BINAP - 2,2'-bis(difenilfosfīno)-1,1'-binaftalīns
BLA – β -laktāma antibiotikas
Bn – benzil-
Boc – *tert*-butiloksikarbonil-
BPO – benzoilperoksīds
Cy – cikloheksil-
CyJohnPhos – (2-bifenil)d cikloheksilfosfīns
COD – 1,5-ciklooktadiēn-
Cp – ciklopentadienil komplekss
*c*Pr – ciklopropil-
Dan – 1,8-diaminonaftil-
DBO - 1,6-diazabicyklo[3,2,1]-oktāns
DCC – *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimīds
DCE – 1,2-dihloretāns
DCM – dihlormetāns
de – diastereomērais pārkums
DIPEA – *N,N*-diizopropiletilamīns
DMAP – 4-dimetilaminopiridīns
DMF – *N,N*-dimetilformamīds
dppb - 1,4-bis(difenilfosfīno)butāns
dppf – 1,1'-bis(difenilfosfīno)ferrocēns
EA – elektronakceptora grupa
ED – elektrondonora grupa
EDCI – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimīds
ee – enantiomērais pārkums
ekviv. – ekvivalents

Et – etil-

FDA - U.S.A. *Food and Drug Administration*; ASV Pārtikas un zāļu pārvalde

HATU – (1-[bis(dimetilamino)metilēn]-1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridīnija 3-oksīda
heksafluorofosfāts

Hex – heksil-

HOBt – 1-hidroksibenzotriazols

*i*Bu – izobutil-

ICy – *N,N*-dicikloheksilimidazolil-

IPr – 1,3-bis(2,6-diizopropilfenil)imidazol-2-ilīdēns

NHC – *N* heterocikliskais karbēna katalizators

*i*Pr – izopropil-

ist.t. – istabas temperatūra

pies. – piesātināts

kat. – katalītisks daudzums

KMR – kodolmagnētiskā rezonanse

Konc. – koncentrēts

LDA – litija diizopropilamīds

LiHDMS – litija heksametildisilazīds

MBL – metāl- β -laktamāze

Me – metil-

Mes – mezil-; metānsulfonil-

MS – molekulārie sieti

NBS – *N*-bromsukcīnimīds

*n*Bu – *n*-butil-; normālais butil-

NMM – *N*-metilmorfolīns

ODCB – 1,2-dihlorbenzols

P(*o*-tol)₃ – tris(2-metilfenil)fosfīns

PBP – penicilīnu saistošais proteīns

PDB – proteīnu datu banka (proteīnu datu bāze)

Pent – pentil-

PĒ – petrolēteris

Ph – fenil-

Pin – pinakol-

PSH – plānslāņa hromatogrāfija

SBL – serīna- β -laktamāze

Ser – serīns

ŠH-MS – šķidrumu hromatogrāfija – masspektrometrija

*t*AmilOH – trešējais amilspirts

TBDMS – *terc*-butildimetilsilil-

*t*Bu – *terc*-butil-

TES – trietilsilāns

Tf – trifluormetānsulfonil-

TFA – trifluoretiķskābe

TFAA – trifluoretiķskābes anhidrīds

THF – tetrahidrofurāns

TIPS – triizopropilsilil-

TMEDA – *N,N,N',N'*-tetrametilēndiamīns

TMS – trimetilsilil-

Tol – toluols

TRIP – 3,3'-bis(2,4,6-triizopropilfenil)-1,1'-binaftil-2,2'-diil hidroģēnfosfāts

ūd. šķīd. – ūdens šķīdums

XantPhos – (9,9-dimetil-9*H*-ksantēn-4,5-diil)bis(difenilfosfīns)

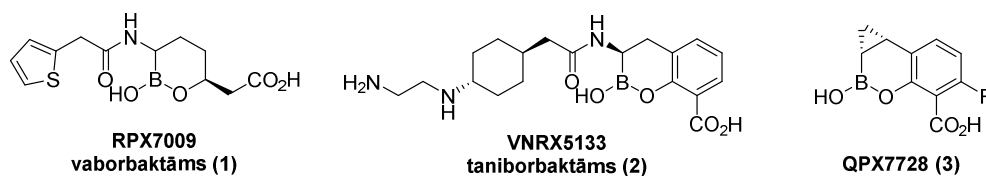
IEVADS

No 1940-ajiem gadiem β -laktāma antibiotikas (BLA) tika lietotas bakteriālo infekciju ārstēšanai un kopš tā laika ir glābušas neskaitāmas dzīvības. Šis atklājums uzsāka antibiotiku pētījumu “zelta laikmetu”, kas ilga aptuveni 40 gadus, kuru laikā tika atklātas pašlaik aktuālākās antibiotiku klases [1,2]. Kopš 2000. gada tika atsākti jaunu antibakteriālo zāļu pētījumi, taču neskatoties uz to, BLA joprojām ir visplašāk izplatītā (aptuveni 60% no visām ražotajām antibiotikām) mikrobiālo zāļu klase visā pasaulē. Tomēr pārlietu lielas BLA lietošanas dēļ baktēriju rezistence pret BLA ir pieaugusi nekontrolējamā ātrumā [3,4].

Eiropas Slimību un profilakses kontroles centrs un Pasaules Veselības organizācija antimikrobiālās rezistences ierobežošanu ir pasludinājušas par vienu no globālās veselības prioritātēm. Eiropā no multirezistentu baktēriju izraisītām infekcijām gadā mirst ap 34 tūkstošiem cilvēku. Tiek prognozēts, ka, neieviešot papildus aktivitātes antimikrobiālās rezistences ierobežošanā, ap 2050. gadu šis varētu kļūt par galveno nāves cēloni pasaulē [5].

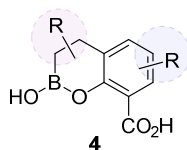
β -Laktamāzes ir galvenais BLA rezistences noteicošais faktors Gram-negatīvajās baktērijās. Nozīmīgs un laika gaitā apstiprināts β -laktamāžu rezistences pretdarbības mehānisms ir β -laktāmu antibiotiku lietošana kopā ar β -laktamāžu inhibitoriem. Tomēr tādēļ, ka parādās arvien vairāk plaša iedarbības spektra β -laktamāzes, ir skaidrs, ka nepieciešami labāki inhibitori, ja vēlamies saglabāt β -laktāmu antibiotiku iedarbību [6].

Pašlaik tirgū ir pieejami vairāki FDA apstiprinātie serīna β -laktamāžu (SBL) inhibitori, bet nav vēl neviena klīniski pielietojama metāl- β -laktamāžu (MBL) inhibitora. SBL inhibitori nespēj nomākt MBL enzīmu aktivitāti [3].



Starp β -laktamāžu inhibitoriem, kas līdz šim ir izstrādāti, boru saturošie β -laktamāžu inhibitori patreiz vieš vislielākās cerības cīņai pret rezistentajām baktērijām [7]. Piemēram, vaborbaktāms (1) ir klīniskā lietojams SBL inhibitors. Pēdējā laikā tomēr ir ziņots par daudzsoļiem MBL inhibitoru kandidātiem, piemēram, taniborbaktāms (2) inhibē gan SBL, gan MBL enzīmus un patreiz ir jau klīnisko pētījumu 3. fāzē [8]. Jaunākajam plaša spektra β -laktamāžu inhibitoram QPX7728 (3), kas ir aktīvs gan pret SBL, gan MBL enzīmiem, 2020. gadā tika uzsākta klīnisko pētījumu 1. fāze [9,10].

Ņemot vērā augstākminēto borskābju pusesteru spēju ietekmēt SBL un MBL enzīmu aktivitāti, **promocijas darba mērķis** ir izstrādāt ciklisko borskābju pusesteru **4** sintēžu metodes ar mērķi atrast savienojumus, kas spētu vienlaicīgi inhibēt gan SBL, gan MBL enzīmus.



Mērķa sasniegšanai izvirzīti sekojoši **darba uzdevumi**:

- 1) izstrādāt ciklisko borskābju pusesteru **4** iegūšanas metodes;
- 2) sintezēt ciklisko borskābju pusesteru **4** atvasinājumus;
- 3) noteikt iegūto savienojumu inhibitorās aktivitātes vērtības uz SBL un MBL enzīmiem un salīdzināt ar patreiz zināmiem efektīviem inhibitoriem;
- 4) izpētīt iegūto savienojumu saistīšanos SBL un MBL enzīmos.

Promocijas darba **zinātniskā novitāte** un **praktiskā nozīme**. Pētījuma ietvaros tika attīstītas sintēzes metodes bi- un tri- ciklisku borskābju pusesteru iegūšanai. Iegūti jauni tricikliski borskābju pusesteru atvasinājumi. Prof. *Christopher J. Schofield* grupā Oksfordas Universitātē (Oksforda, Lielbritānija) tika noteiktas inhibēšanas aktivitātes uz SBL un MBL enzīmiem (eksperimentus un datu apstrādi veica Dr. *Karina Calvopiņa* un Dr. *Gareth W. Langley*, Oksfordā), kā arī veikti kristalogrāfijas pētījumi (eksperimentus un datu apstrādi veica *Anka Lucic* un *Pauline Lange*, Oksfordā), kuru rezultātā tika analizēta iegūto ciklisko boronātu saistīšanās ar Amp_{CEC} SBL enzīmu un VIM-2 vai NDM-1 MBL enzīmiem. Šie pētījumi ļāva gūt papildus datus par ciklisko borskābju saistīšanās veidu ar atsevišķām SBL un MBL, kas pastiprināja pieņēmumu, ka cikliskās borskābes darbojas kā „pārejas stāvokļa analogi”, inhibējot β -laktamāzes.

Promocijas darba rezultātu aprobācija:

Zinātniskās publikācijas:

1. Parkova A.; Lucic A.; Krajnc A.; Brem J.; Calvopiņa K.; Langley G. W.; McDonough M. A.; Trapencieris P.; Schofield C. J. Broad Spectrum β -Lactamase Inhibition by a Thioether Substituted Bicyclic Boronate. *ACS Infect Dis.* **2020**, *12*, 1398-1404. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00330.
2. Lang, P. A.; Parkova, A.; Leissing, T. M.; Calvopiņa, K.; Cain, R.; Krajnc, A.; Panduwawala, T. D.; Philippe, J.; Fishwick, C. W. G.; Trapencieris, P.; Page, M. G. P.; Schofield, C. J.; Brem, J. Bicyclic Boronates as Potent Inhibitors of AmpC, the

Class C β -Lactamase from *Escherichia coli*. *Biomolecules* **2020**, *10*, 899–914.
<https://doi.org/10.3390/biom10060899>.

Konferenču tēzes:

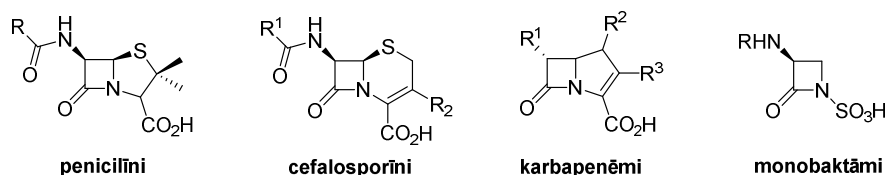
1. Parkova, A.; Trapencieris, P. Cyclic boronic acids as beta-lactamase inhibitors. Latvijas Universitātes 75. konference. Organiskās ķīmijas sekcija, 10. februāris, **2017**, Rīga, Latvija (mutiskais referāts);
2. Parkova, A.; Trapencieris, P. Cyclic boronic acids as beta-lactamase inhibitors. Paul Walden 10th Symposium un Organic Chemistry, 15.–16. jūnijs, **2017**, Rīga, Latvija. Stenda referāts (P-D7);
3. Parkova, A.; Schofield, C. J.; Trapencieris, P. Florida Heterocyclic and Synthetic Conference, 4.–7. marts, **2018**, Geinsvila, Florida, ASV. Stenda referāts (23b);
4. Parkova, A.; Schofield, C. J.; Trapencieris, P. Cyclic boronic acids as beta-lactamase inhibitors. International Conference on Organic Synthesis, Balticum Organicum Syntheticum, 1.–4. jūlijs, **2018**, Tallina, Igaunija. Stenda referāts (PO77);
5. Parkova, A.; Schofield, C. J.; Trapencieris, P. Cyclic boronic acids as beta-lactamase inhibitors. Frontiers in Chemistry, Armenia, 21.–25. oktobris, **2018**, Erevāna, Armēnija. Stenda referāts (P95).

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. β -Laktāma antibiotikas, β -laktamāzes un β -laktamāžu inhibitori

Penicilīna atklāšana tiek atzīta par pavērsiena punktu medicīnas vēsturē un 1940-ajos gados tā ieviešana klīnikā radikāli uzlaboja mūsu spējas ārstēt bakteriālās infekcijas, tādā veidā palielinot dzīves ilgumu. Taču tā saucamo *superbugs* jeb multirezistentu baktēriju parādīšanās un izplatīšanās visā pasaulē patreiz nopietni apdraud šo zāļu efektivitāti bakteriālo infekciju ārstēšanā. Šiem mikroorganismiem piemīt dabiska spēja rast veidus kā pretoties zāļu iedarbībai un tās spēj nodot ģenētisko materiālu citām baktērijām, kuras, savukārt, var kļūt zāļu rezistentas. Diemžēl cilvēka uzvedība ir viens no galvenajiem faktoriem, kas šo dabisko parādību pārvērš par vienu no nopietnākajām sabiedrības veselības problēmām. Rezistentu baktēriju infekcijas tagad ir pārāk bieža parādība, un daži patogēni ir kļuvuši rezistenti pret dažādiem antibiotiku veidiem. Rezultātā strauji samazinās efektīvu antibiotisko preparātu skaits. Šī situācija ir izveidojusies galvenokārt dēļ nepiemērotas un pārmērīgas antibiotiku lietošanas medicīnā, veterinārijā un lauksaimniecības jomās vairāku gadu desmitu garumā, kur šīs zāles tika izmantotas pat ne-bakteriālo infekciju ārstēšanai [7]. Līdz ar to cilvēce riskē nonākt tādā laikmetā, kurā pieejamās antibiotikas vairs nebūs efektīvas bakteriālo infekciju ārstēšanai [6,7].

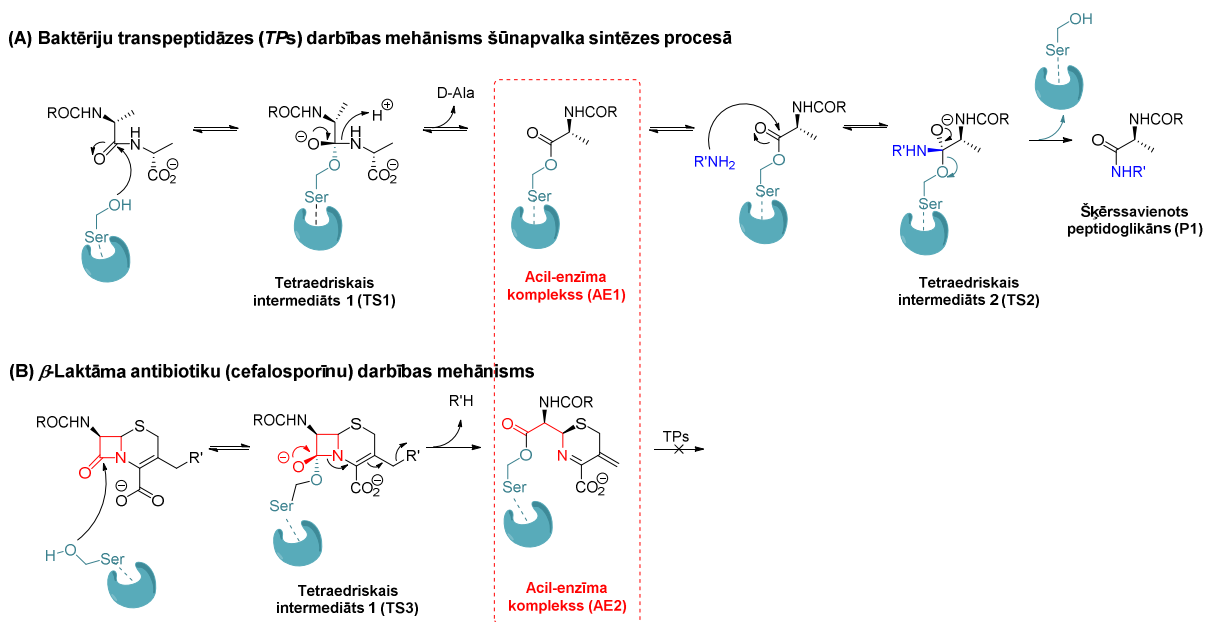
BLA pētniecība turpina attīstīties kopš penicilīna ieviešanas klīnikā ar mērķi uzlabot to iedarbību, aktivitātes spektru, farmakokinētiku un drošības profilus, kā arī, lai cīnītos ar rezistences parādīšanos. Šobrīd ir četras galvenās BLA klases, kas tiek klīniski izmantotas (1.1. attēls). Trīs no tām veido biciklisku struktūru: 1) penicilīni, kuros četrlocekļu β -laktāma cikls ir kondensēts ar tiazolidīna ciklu; 2) cefalosporīni, kuros β -laktāma cikls ir kondensēts ar sešlocekļu dihidrotiazīnu; 3) karbapenēmi, kuros β -laktāma cikls ir kondensēts ar pieclocekļu pirolīna ciklu; 4) monobaktāmi, kuri ir monocikliskas β -laktāma sistēmas [11,12].



1.1. att. Galvenās β -laktāmu antibiotiku klases

β -Laktāma antibiotiku mērķi ir D-Ala-D-Ala transpeptidāzes – penicilīna saistošie proteīni, kas ir iesaistīti baktēriju šūnāpvalka biosintēzes procesā. Šajā procesā parasti ir

iesaisītis peptīds ar D-Ala-D-Ala terminālo fragmentu peptidoglikānā, kas ar enzīma nukleofīlo serīna atlikumu izveido acil-enzīma kompleksu **AE1** un D-alanīnu (1.2. attēls A). Tad izveidotais acil-enzīma komplekss **AE1** reaģē ar blakusesošā peptīda lizīna N^{ϵ} -aminogrupu un izveido šķērssaistītu produktu **P1**, kas ir īpaši svarīgs baktēriju šūnapvalka veseluma nodrošināšanā [13]. β -Laktāmu antibakteriālo aktivitāti atklāja *Tipper* un *Strominger*, kas tika balstīta uz to līdzību ar terminālo D-Ala-D-Ala atlikumu peptidoglikāna pentapeptīdā, kur β -laktāma amīda un blakusesošā karboksilāta (vai monobaktāmu gadījumā sulfonskābes) grupas imitē peptīdsaiti un terminālo D-Ala-D-Ala karboksilātu [14]. Aktivitāti rada β -laktāma cikla reakcija ar nukleofīlo serīnu mērķa *PBP*, kur tālāk notiek cikla atvēršanās un *PBP* acilēšana, kā rezultātā iegūst ļoti stabilu acil-enzīma kompleksu **AE2**, kas novērš tālāko peptidoglikāna transpeptīdu šķērssaīšu veidošanos [11].

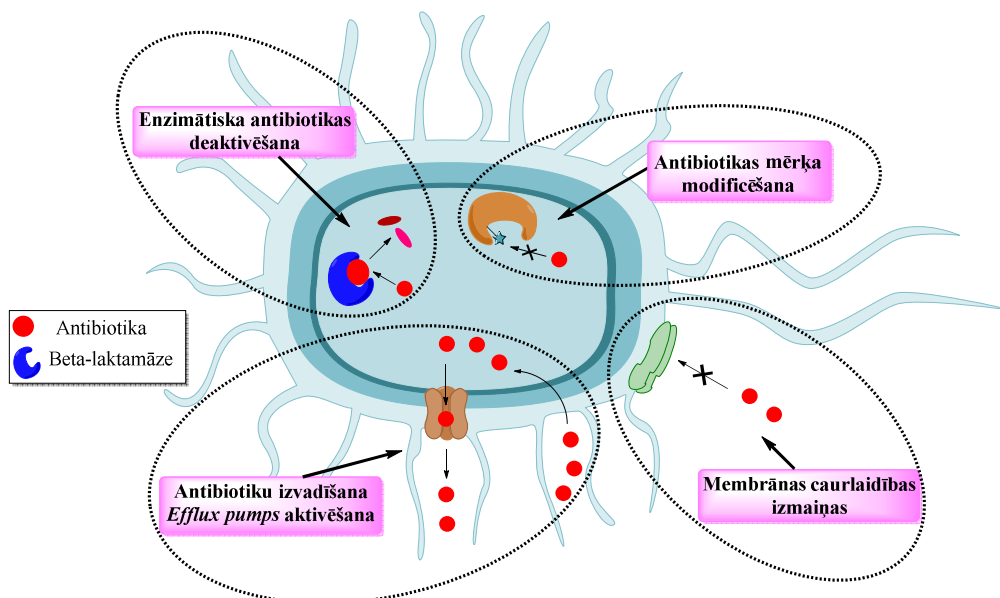


1.2. att. Baktēriju transpeptidāzes darbības mehānisms šūnapvalka sintēzes procesā (A); β -laktāma antibiotiku (attēlā cefalosporīnu) darbības mehānisms (B)

Pēdējos gados veiksmīgākā stratēģija pret infekciju zāļu izstrādē grūti ārstējamu infekciju ārstēšanai ir kombinētās terapijas “antibiotika + rezistences inhibitori” pieeja. Šajā gadījumā antibiotika tiek lietota kopā ar inhibitoru pret baktēriju antibiotikas rezistences mehānismu, tādā veidā nezaudējot antibiotiku efektu. Rezistences inhibitoru izmantošanai ir divas lielas priekšrocības: (i) tie ļauj izmantot izcilu dzīvības glābjošu antibiotiku klāstu, kas ir pieejamas klīnikā un pierādījušas savu efektivitāti un drošību vairāku gadu garumā; (ii) ļauj izvairīties no lieliem papildus finansiāliem ieguldījumiem jaunu terapeitisko mērķu izstrādes, to dārgās identificēšanas un validēšanas procesos [7].

Četri galvenie baktēriju rezistences mehānismi ir parādīti 1.3. attēlā: (1) šūnas mērķa modifikācijas, kas izmaina antibiotikas saistīšanos, tādā veidā samazinot tās efektivitāti; (2)

šūnas ārējās membrānas caurlaidības izmaiņas, tādējādi samazinot antibiotiku spēju iekļūt šūnā; (3) izplūdes sūkņu (*efflux pumps*) aktivēšana, lai palielinātu antibiotiku izplūšanu ārā no šūnas; un (4) antibiotiku noārdīšana ar baktēriju enzīmiem, lai tās pārvērstu par neaktīvām zāļu formām [7,12].



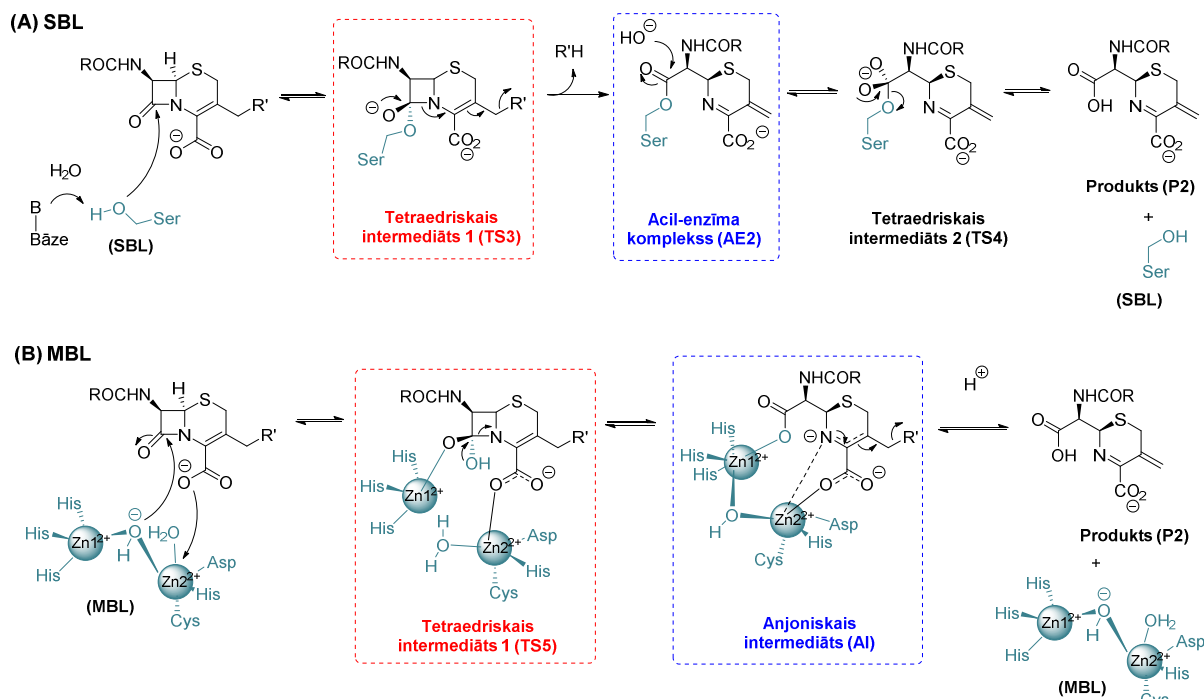
1.3. att. Galvenie baktēriju rezistences mehānismi pret antibiotikām

Pamatojoties uz šiem baktēriju rezistences mehānismiem, ir attīstīti trīs galvenie rezistences inhibitoru tipi: (1) izplūdes sūkņu (*efflux pumps*) inhibitori; (2) ārējās membrānas caurlaidības atjaunotāji un (3) β -laktamāžu inhibitori [7].

β -Laktamāžu inhibitori izjauc visbiežāk sastopamo Gram-negatīvo baktēriju rezistences mehānismu – visplašāk izmantojamo β -laktāma antibiotiku deaktivēšanu, ražojot β -laktamāzes. β -Laktamāžu enzīmi hidrolizē penicilīnu, cefalosporīnu, monobaktāmu un karbapenēmu β -laktāma ciklu acilēšanas/deacilēšanas balstītos procesos. Ir izveidotas vairākas enzīmu substrātu klasifikācijas to lielā daudzuma dēļ [15]. Visplašāk izmantotais iedalījums ir balstīts uz proteīnu secības līdzību, izveidojot četras galvenās β -laktamāžu klases – A, B, C un D (*Ambler* klasifikācija [16]). Trīs no tām - klase A, C un D, ir serīna β -laktamāzes (SBL), jo tās izmanto katalītisko serīna atlikumu kā reaģētspējīgu nukleofīlu, un B klases enzīmi ir cinka atkarīgās metāl- β -laktamāzes (MBL) [7].

Serīna β -laktamāžu katalītiskās β -laktāmu hidrolīzes mehānisma pamatā ir enzīma aktīvajā centrā esošā nukleofīlā serīna uzbrukums β -laktāma karbonilgrupai, rezultātā izveidojot tetraedrisku pievienošanās starpsavienojumu **TS3** (1.4. attēls (A)). Tālāk notiek β -laktāma cikla atvēršanās un rodas acil-enzīma komplekss **AE2**, kurā serīns ir kovalenti saistīts

ar modificēto β -laktāmu. Acil-enzīma kompleksa hidrolīzes rezultātā veidojas β -laktāma substrāta hidrolīzes produkts **P2** [7,13].



1.4. att. Serīna- β -laktamāžu (A) un metāl- β -laktamāžu (B) izraisītie cefalosporīnu hidrolīzes mehānismi

Starp visām β -laktamāzēm, A klases enzīmi ir diezgan daudzpusīga grupa attiecībā uz substrātu veidiem, ko tie hidrolizē (1.1. tabula). Visbiežāk sastopamie enzīmi ir plazmīdukodētās β -laktamāzes TEM un SHV, kuras ir atrodamas lielākajā daļā *Enterobacteriaceae*, un CTX-M, kuras parasti atrodamas *E. coli* un *K. pneumoniae*. Visi šie enzīmi hidrolizē penicilīnus un cefalosporīnus. Šajā grupā ir arī enzīmi, kas specifiski hidrolizē karbapenēmus (serīna karbapenēmāzes, ieskaitot KPC (*K. pneumoniae* karbapenēmāze)), SME (*Serratia marcescens* enzīmi), NMC-A (ne-metāl-karbapenēmāze-A) un noteiktus GES (*Guiana extended spectrum*) variantus. C klases enzīmi ir β -laktamāzes, kas hidrolizē cefalosporīnus (serīna cefalosporināzes). Spilgtākie šīs grupas pārstāvju piemēri ir AmpC-tipa β -laktamāze, kas hidrolizē lielāko daļu cefalosporīnu, ieskaitot paplašināta spektra cefalosporīnus (ceftazidīms, cefotaksīms un ceftriaksons) un cefamicīnus (cefoksitīns) [7].

D klases enzīmi, saukti arī par “oksacilināzēm (OXA)”, ir visstraujāk augošā β -laktamāžu grupa. Šie enzīmi hidrolizē penicilīnus, paplašināta spektra cefalosporīnus (cefotaksīms, ceftazīms un cefepīms), metacilīnu un aztreonamu. Īpaši bažas rada pieaugošais dažu D klases enzīmu ar karbapenēmāžu aktivitāti (karbapenēmu-hidrolizējošās D klases β -

laktamāzes) skaits, kas plaši izkliedējas klīniski nozīmīgās baktērijās, tādās kā *A. Baumannii* (OXA-23 vai OXA-24/40) vai *Enterobacteriaceae* (OXA-48) [7].

1.1. tabula

β -Laktamāžu enzīmu klasifikācija un būtiskākie piemēri

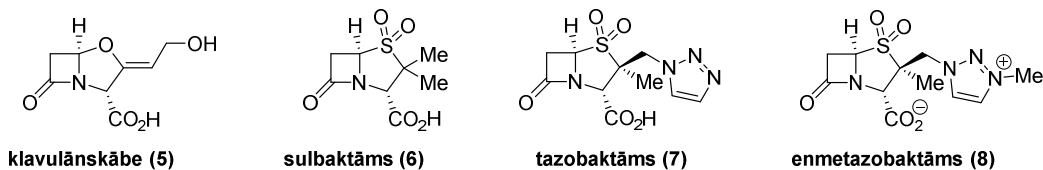
Ambler klase	Substrāti	Būtiskākie piemēri
A (dažādas darbības serīna- β -laktamāzes)	Penicilīni	Gram-pozitīvo baktēriju penicilināzes
	Penicilīni un šaura spektra cefalosporīni	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	Penicilīni, šaura un paplašināta spektra cefalosporīni	SHV-2, TEM-10, CTX-M, GES-1
	Penicilīni	TEM-30, SHV-72
	Penicilīni un karbenicilīns	PSE
	Penicilīni, cefalosporīni un karbapenēmi	KPC, SME, NMC-A, GES-2
B (metāl- β -laktamāzes)	β -Laktāmi, izņemot monobaktāmus	IMP, VIM, NDM
C (serīna cefalosporināzes)	Cefalosporīni	AmpC, CMY, ACT-1, DHA
D (serīna oksacilināzes)	Penicilīni un kloksacilīns; dažas hidrolizē cefalosporīnus un/vai karbapenēmus	OXA-1/30, OXA-10, OXA-23, OXA-23/40, OXA-48

B klases enzīmi izmanto vienu vai divus Zn^{2+} jonus, lai katalizētu β -laktāma cikla hidrolīzi. Enzīmiem ar dinukleāro metāla centru aktīvajā centrā viens Zn^{2+} jons ir koordinēts ar trīs histidīna atlikumiem un hidroksīda anjonu (Zn1 centrs), un otrs Zn^{2+} jons koordinējas ar histidīna, cisteīna un aspartāta atlikumiem un ūdens molekulu (Zn2 centrs). Hidroksīda anjons atrodas starp diviem metāla joniem. Enzīmos ar vienu cinka jonu koordinēšanās ar Zn^{2+} jonu ir līdzīga kā Zn2 centrā un tas koordinējas ar ūdens molekulu un histidīna, cisteīna un aspartāta atlikumiem. Atšķirībā no serīna β -laktamāzēm, hidrolīze nenotiek kovalentas katalīzes ceļā un neveidojas enzīma adukts (1.4. attēls; (B)). Hidrolīzi izraisa pie cinka saistītā hidroksīda anjona nukleofīlais uzbrukums β -laktāma karbonilgrupai, izveidojot tetraedrisko starpsavienojumu **TS5**, kuru stabilizē koordinēšanās ar metāla jonu. Tālāk notiek cikla atvēršanās, izveidojot anjonisko intermediātu **AI**, kuram protonējoties veidojas hidrolīzes produkts **P2** [7,13].

Atskaitot monobaktāmus, metāl- β -laktamāzes hidrolizē lielāko daļu β -laktāmu, ieskaitot karbapenēmus. Karbapenēma rezistentās *Enterobacteriaceae* (CRE), kuras ražo metāl- β -laktamāzes ir klīniski katastrofālas un bieži vien tiek sauktas par „nightmare bacteria” dēļ to ārstēšanas sarežģītības un plašas izplatības. Šīs MBL ietver sevī IMP (IMIpenēmu

hidrolizējošā β -laktamāze), VIM (*Verona-integron*-kodētā metāl- β -laktamāze) un NDM (*New Delhi* metāl- β -laktamāze) un to izplatīšanās pa visu pasauli rada lielas bažas [7,12].

β -Laktamāžu inhibitori ar penicilīna struktūru. Penicilīna sulfonu analogi ir starp pirmajiem klīnikā izmantotajiem β -laktamāžu inhibitoriem. Šie savienojumi radās pēc klavulānskābes (**5**) atklāšanas (1.5. attēls), kas ir dabas produkts, kas tagad tiek izmantots kombinācijā ar penicilīniem, piemēram, amoksicilīnu [17,18]. Klavulānskābes (**5**) neatgriezeniskais inibēšanas mehānisms parādīja ceļu citu savienojumu sintēzei ar līdzīgu mehānismu un noveda līdz penicilīna sulfonu analogu atvasinājumu identificēšanai un sulbaktāma (**6**) atklāšanai (1.5. attēls) [19]. Sulbaktāms (**6**) tiek izmantots klīniskajā praksē kombinācijā ar ampicilīnu, cefoperazonu vai ceftriaksonu, taču diemžēl tas nav aktīvs pret karbapenēmus hidrolizējošām D-klases β -laktamāzēm. Tālāka sulbaktāma struktūras modificēšana noveda pie tazobaktāma (**7**) atklāšanas, kas šobrīd tiek izmantots klīniskajā praksē kombinācijā ar ceftozolānu vai pipracilīnu [20]. Nesen *Allegra Therapeutics* izstrādāja jaunu tazobaktāma atvasinājumu enmetazobaktāmu (**8**), kas kombinācijā ar cefepīmu patreiz ir klīnisko pētījumu 3. fāzē komplikētu urīnceļu infekciju ārstēšanai [21].

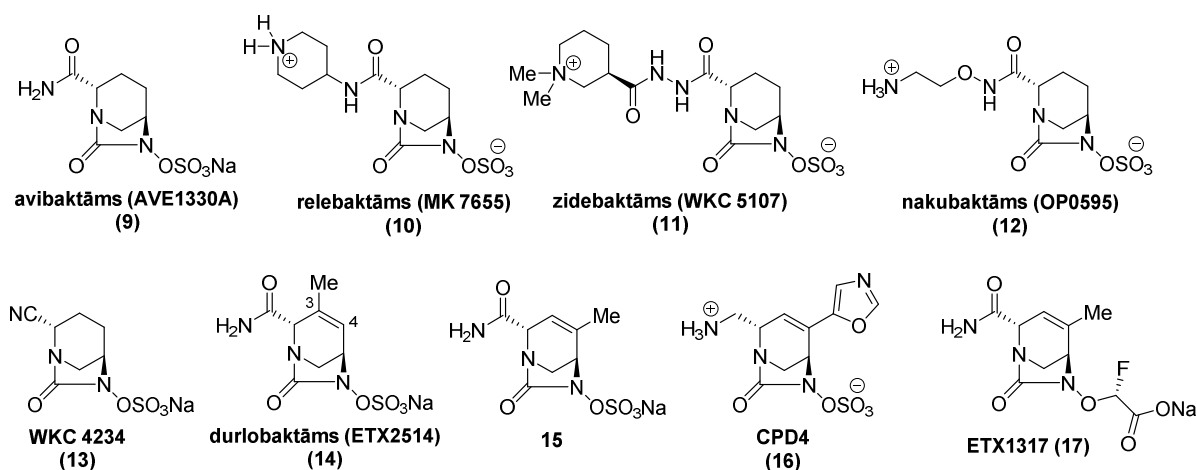


1.5. att. Klīniski nozīmīgākie penicilīna tipa struktūras atvasinājumu β -laktamāžu inhibitori

β -Laktamāžu inhibitori ar ne- β -laktāma struktūru. Pie būtiskākajiem β -laktamāžu inhibitoriem bez β -laktāma cikla struktūras fragmenta pieskaita 1,6-diazabicyclo[3,2,1]oktānus (DBO) (1.6. attēls), tiola atvasinājumus (1.7. attēls), dikarboksilātu atvasinājumus un boru saturošus inhibitorus (1.9. attēls) [7].

Kā potenciālus β -laktāma tipa savienojumus 1990-ajos gados DBO atvasinājumus izstrādāja ķīmiķi no uzņēmuma *Hoechst Marion Roussel* (tagad daļa no *Sanofi-Aventis*), tā kā tika sagaidīts, ka bicikliskais karbamoil-fragments imitētu β -laktāma ciklu acilējot nukleofīlos enzīmus [22]. Sākotnējie pētījumi parādīja potenciālas inibēšanas spējas pret A un C klašu β -laktamāžu enzīmiem un pēc liela DBO analogu skaita izstrādes tika identificēts avibaktāms (**9**) (1.6. attēls), kuru 2015. gadā *FDA* kombinācijā ar ceftazidīmu apstiprināja lietošanai komplikētu *intra* abdominālo infekciju ārstēšanai (kombinācijā ar metroindazolu) un komplikētu urīnceļu infekciju ārstēšanai. Atšķirībā no citiem β -laktamāžu inhibitoriem, avibaktāms (**9**) ir atgriezenisks inhibitors, kas darbojas kovalenti saistoties ar nukleofīlo aktīvā centra serīnu, izveidojot relatīvi hidrolītiski stabilu acil-enzīma tipa kompleksu [23].

Pēc avibaktāma (**9**) atklāšanas un tā efektivitātes uzrādīšanas pret A, C un dažu D klases β -laktamāžu enzīmiem, turpmākajos gados tika izstrādāti jauni avibaktāma analogi **10-17** (1.6. attēls). No izstrādātajiem avibaktāma analogiem nozīmīgākie piemēri ir relebaktāms (**10**), zidebaktāms (**11**) un nakubaktāms (**12**), kuriem jau ir sākti klīniskie pētījumi. Šajos inhibitoros avibaktāma amīda grupas slāpekklis ir funkcionalizēts ar dažādiem aizvietotājiem, lai uzlabotu saistīšanos un/vai farmakoloģiskās īpašības [7].

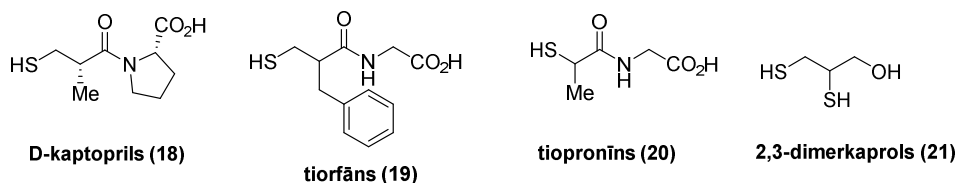


1.6. att. Avibaktāms un klīniski nozīmīgākie avibaktāma atvasinājumu β -laktamāžu inhibitori

Starp neseno izstrādātajiem avibaktāma analogu atvasinājumiem ievērtības cienīgus rezultātus ir parādījis DBO atvasinājums WKC4234 (**13**), kur avibaktāma amīda grupa ir aizvietota ar nitrila funkcionālo grupu. Salīdzinājumā ar avibaktāmu (**9**) un relebaktāmu (**10**), inhibitors WKC4234 (**13**) uzrādīja uzlabotu aktivitāti pret OXA-24/40, OXA-23 un KPC-2 enzīmiem. *Durand-Reville* ar līdzstrādniekiem ziņoja, ka, samazinot avibaktāma sešlocekļu cikla kustīgumu, ieviešot C3 un C4 vietās dubultsaiti (1.6. attēls, savienojumi **14-17**), uzlaboja inhibitoro aktivitāti pret A, C un dažiem D klases β -laktamāžu enzīmiem [24]. Tomēr avibaktāms (**9**) neuzrāda inhibitoro aktivitāti pret MBL un diemžēl ir jau ziņots par rezistences gadījumiem cefatizidīma/avibaktāma kombinācijas lietošanai [7,25].

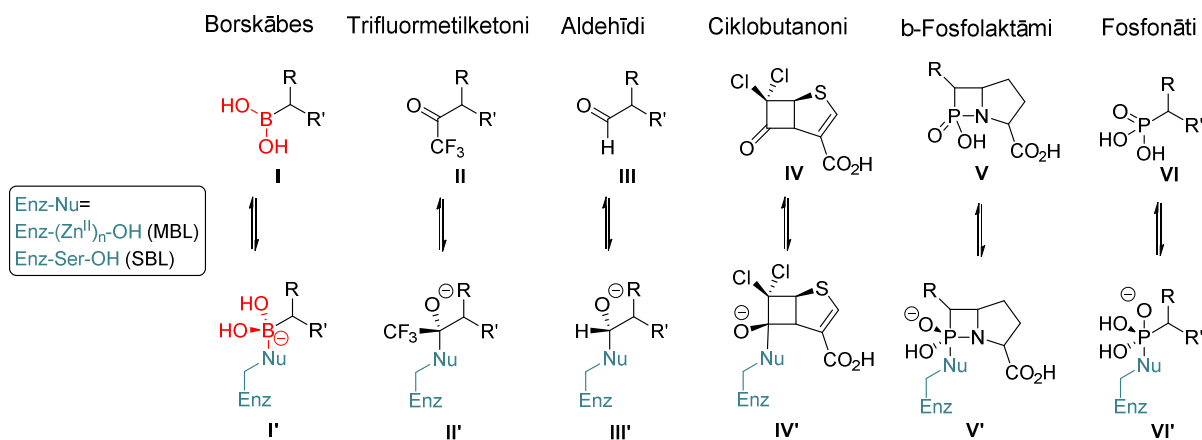
Tiola funkcionālā grupa ir zināma kā cinka helatējošā grupa, tādēļ nav pārsteigums, ka tā parasti tiek izmantota pētījumos, kur terapeitiskais mērķis ir B klases β -laktamāzes [7,26,27]. Tā *Klinger* ar līdzstrādniekiem pārbaudīja brīvu tiola grupu saturošas 11 apstiprinātās zāļvielas un identificēja četrus savienojumus, kas inhibēja klīniski nozīmīgās metāl- β -laktamāzes NDM-1, VIM-1 un IMP-7 [28]. Starp šiem aktīvajiem savienojumiem bija D-kaptoprils (**18**), tiorfāns (**19**), tiopronīns (**20**) un 2,3-dimerkaprols (**21**) (1.7. attēls), kas uzrādīja aktivitāti IC_{50} zemā mikromolārā diapazonā uz testētajām MBL. Kaptoprila **18** tiolāta grupa iestarpinās starp diviem Zn^{2+} joniem un nomaina hidroksīda anjonu, kurš izraisa enzīma

katalizēto hidrolīzes reakciju. Labai inhibitorai aktivitātei svarīga loma ir arī karboksilāta grupai molekulas struktūrā [7].



1.7. att. Tiola grupu saturoši savienojumi, kas inhibē klīniski nozīmīgas metāl-β-laktamāzes

Kā augstāk jau bija minēts, transpeptidāžu un SBL katalizētos procesos acil-enzīma kompleksu veidošanās norit caur tetraedrisku (ar sp^3 hibridizētu oglekli) starpsavienojumu (1.4. attēls). Šis mehānisma pieņēmums uzvedināja uz “pārejas stāvokļa starpsavienojumu analogu” pielietošanu SBL/transpeptidāžu inhibēšanai, kuri imitētu šo tetraedrisko pārejas stāvokli. Tika pētīti dažādi elektrofīli, kas izveidotu tetraedriskus kompleksus, piemēram, trifluormetilketoni **II**, aldehīdi **III**, ciklobutanoni **IV**, β-fosfolaktāmi **V**, fosfonāti **VI** u.c. (1.8. attēls).[13,29] Starp β-laktamāžu inhibitoriem, kas līdz šim ir izstrādāti, boru saturošie β-laktamāžu inhibitori pašreiz vieš vislielākās cerības cīņai pret rezistentajām baktērijām [7].

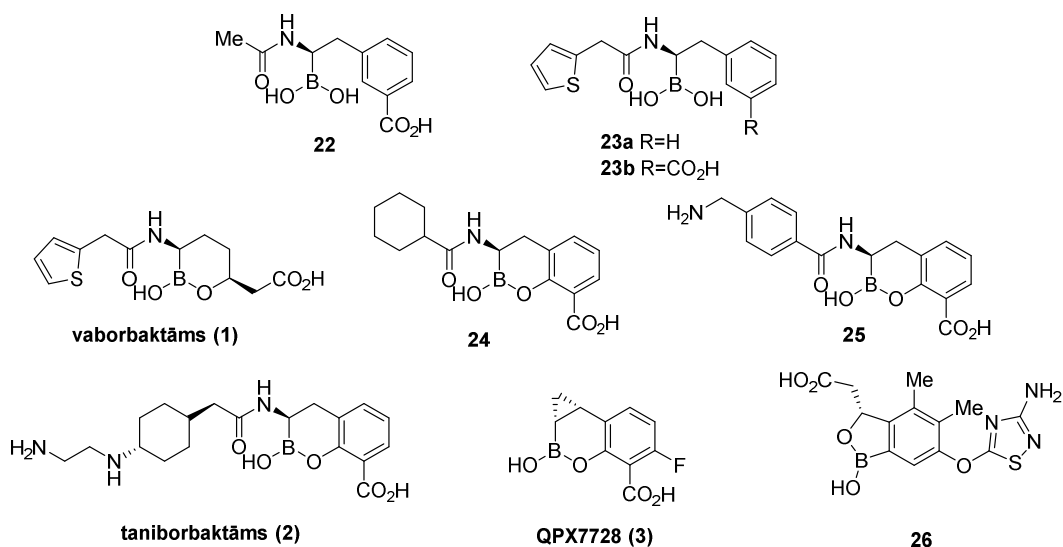


1.8. att. Tetraedriskā intermediāta “pārejas stāvokļa analogu” piemēri [13]

Kā vienu no pirmajiem iedarbīgajiem pārejas stāvokļa analogu inhibitoriem borskābes atvasinājumu **22** (1.9. attēls) aprakstīja *Martin* un *Jones* [30]. Pret TEM-1 β-laktamāzi savienojums **22** uzrādīja nanomolāru inhibējošo aktivitāti, bet kristālstruktūras analīze kompleksā ar TEM-1 enzīmu apstiprināja tetraedriska adukta veidošanos ar aktīvā centra serīnu, kas struktūras ziņā ir līdzīgs ar tetraedrisko starpsavienojumu **TS4** (1.4. attēls) [31]. Struktūras modificēšana, galvenokārt ievadot funkcionālās grupas, kas uzlabotu saistīšanos, ļāva identificēt savienojumus **23a,b**, kuri uzrādīja nanomolāru inhibējošo aktivitāti. To

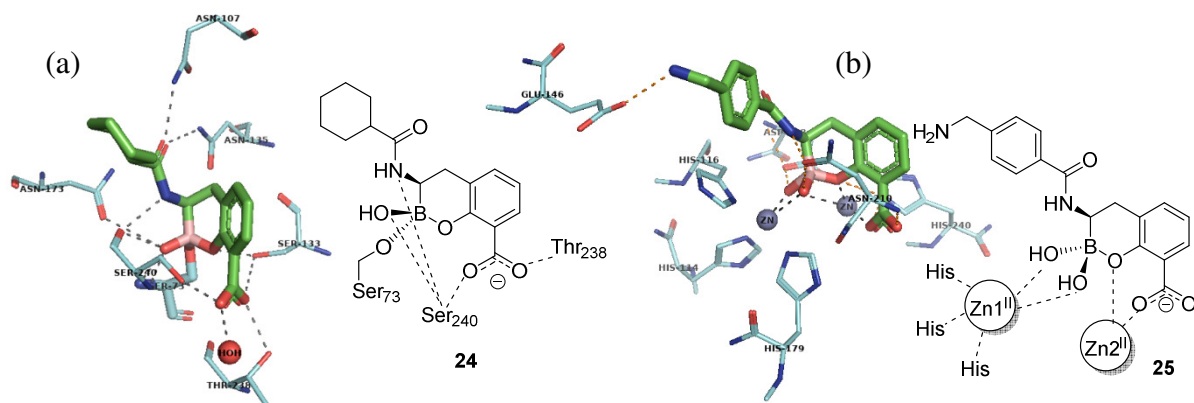
kristālstruktūru analīze ar AmpC enzīmu parādīja, ka nozīmīga loma ir savienojuma **23b** karboksilāta grupai [32].

Borskābju atvasinājumu inhibitoru izmantošanu varētu ierobežot to potenciālās spējas inhibēt arī citas serīna proteāzes. Lai uzlabotu šo savienojumu selektivitāti pret β -laktamāzēm, tika pētīti cikliskie boronāti, kas ļāva atklāt vaborbaktāmu (**1**) [33,34]. Šis savienojums izrādījās spēcīgs serīna β -laktamāžu inhibitors, kas darbojas uz A un C klases enzīmiem un tika apstiprināts FDA kombinācijā ar meropenēmu komplikētu urīnceļu infekciju ārstēšanai [7,34].



1.9. att. Borskābju un ciklisko boronātu “pārejas stāvokļa analogu” inhibitoru piemēri

Vaborbaktāma (**1**) trūkums ir tas, ka tam nav aktivitātes pret D klases enzīmiem un B klases MBL. Salīdzinot atšķirīgos SBL un MBL darbības mehānismus, tomēr ir saskatāma līdzība veidot pirmo tetraedrisko starpsavienojumu (tetraedriskais starpsavienojums **TS3** un **TS5**, 1.4. attēls). Cikliskie boronāti darbojas kā šī tetraedriskā starpsavienojuma pārejas stāvokļa analogi un *Schofield* grupa ir parādījusi, ka tie spēj inhibēt visas četras β -laktamāžu klases [35,36].



1.10. att. Ciklisko boronātu struktūranāle ar SBL un MBL (a) Savienojuma **24** kristālstruktūra kompleksā ar SBL CTX-M-15 (PDB ID 5T66); (b) Savienojuma **25** kristālstruktūra kompleksā ar MBL VIM-2 (PDB ID 5FQC)

Pēc savienojuma **24** kompleksa ar SBL CTX-M-15 kristālstruktūras analīzes (1.10. attēls) var redzēt, ka pie sp^3 hibridizētā bora atoma ir kovalenti saistīts aktīvā centra nukleofīlais serīns [35]. Arī boronāta **25** kompleksa gadījumā ar MBL VIM-2 enzīmu kristalogrāfijas analīze parādīja, ka bora atoms ir sp^3 hibridizēts (1.10. attēls). Cikliskā boronāta **25** “eksocikliskie” skābekļa atomi/hidroksīdgrupas saistās ar $Zn1^{2+}$ jonu, savukārt “endocikliskais” boronāta skābekļa atoms un karboksilāta grupas skābeklis saista $Zn2^{2+}$ jonu, tādējādi atgādinot β -laktāma substrāta/enzīma saistīšanās kompleksu [13,35].

Uzņēmums *VenatoRx Pharmaceuticals* 2012. gadā atklāja biciklisko boronātu taniborbaktāmu (**2**), kas uzrādīja inhibējošo aktivitāti pret A, C un noteiktiem D klases enzīmiem, kā arī pret klīniski nozīmīgiem MBL enzīmiem, tādiem kā NDM-1 un VIM-1/2 [37,38]. Taniborbaktāms (**2**) kombinācijā ar cefepīmu pašlaik ir klīnisko pētījumu 3. fāzē (klīniskais pētījums NCT03840148) [8]. *Hecker* ar līdzstrādniekiem nesē ziņoja par ciklisku boronātu QPX7728 (**3**) (1.9. attēls), kas uzrādīja inhibēšanas aktivitāti gan pret SBL, gan pret MBL enzīmiem un pašlaik ir klīnisko pētījumu 1. fāzē (klīniskais pētījums NCT04380207) [9,10].

Tika pētīti arī citi ciklisku boronātu atvasinājumi, tādi kā benzoksoborola atvasinājums **26** (1.9. attēls), kas parādīja ievērojamu aktivitāti pret AmpC un OXA-23 serīna β -laktamāzēm, taču nav datu par MBL inhibēšanas aktivitāti [7,39]. Pašreiz ir pieejams ierobežots informācijas daudzums par biciklisku boronātu struktūras-aktivitātes mijiedarbību, īpaši salīdzinot ar plašo informāciju par β -laktāmiem [13].

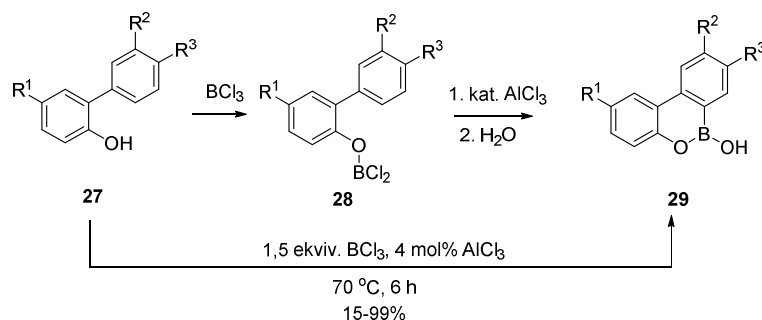
Ir panākts būtisks progress SBL inhibitoru izstrādē ar daudzām FDA apstiprinātām SBL inhibitora/antibiotikas kombinācijām bakteriālo infekciju ārstēšanai. Tomēr situācija ar MBL inhibitoriem krasi atšķiras – vēl nav pieejams neviens klīniski apstiprināts MBL inhibitors [3].

Līdz ar to parādās ievērojamas iespējas optimizācijai un radošumam jaunu β -laktamāžu inhibitoru izstrādei ar boronāta pamatstruktūru [13].

1.2. Ciklisko borskābju pusesteru sintēzes metodes

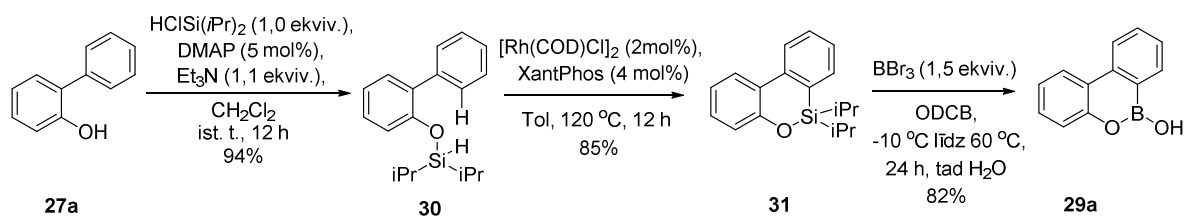
1.2.1. Iegūšana borilēšanas reakcijā ar BCl_3 vai BBr_3

1960. gadā *Dewar* aprakstīja 9,10-boroksofenantrēna **29** iegūšanas metodi no 2-fenilfenola **27** tā reakcijā ar BCl_3 gāzi heksānā ar secīgu AlCl_3 pievienošanu (1.11. attēls) [40]. *Zhou* ar līdzstrādniekiem optimizēja šo procedūru, kā rezultātā ieguva 9,10-boroksofenantrēnu atvasinājumus **29** [41]. Optimizētie apstākļi ietvēra fenola **27** pievienošanu atšķaidītam BCl_3 šķīdumam heksānā (~0.1 M), kam sekoja AlCl_3 pievienošana katalītiskā daudzumā. Autori atzīmēja, ka elektronakceptori vai elektrondonori aizvietotāji savienojuma **27** fenola gredzenā (R^1) reakcijas iznākumus neietekmēja un 9,10-boroksofenantrēni **29** tika iegūti ar ļoti labiem iznākumiem (80-90%). Savukārt EA aizvietotāji fenola **27** felnigredzenā (R^2 un R^3), ievērojami samazināja reakcijas iznākumu (0-15%).



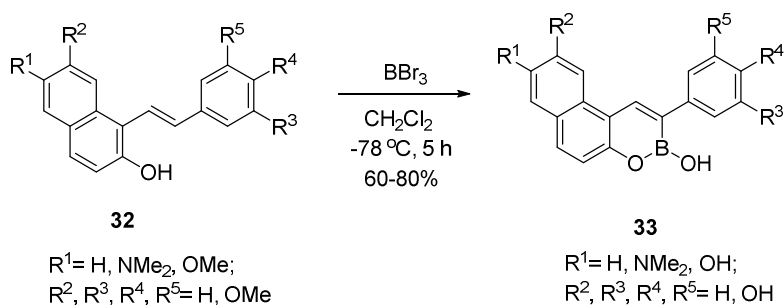
1.11. att. 9,10-Boroksofenantrēnu **29** sintēze

Zhao ar kolēģiem ziņoja par dibenzooksaborīna **29a** sintēzi no dibenzooksasilīna **31** BBr_3 klātbūtnē (1.12. attēls). Savienojumu **31** ieguva divās stadijās no 2-fenilfenola (**27a**). Sākotnēji fenola **27a** sililēšanas reakcijā ieguva diizopropilsiliēteri **30**, kas rodija(I) katalizētā C-H sililēšanas reakcijā, XantPhos klātienē, tika transformēts par dibenzooksasilīnu **31** ar labu iznākumu. Desililēšanas reakcijā ar BBr_3 no savienojuma **31** ieguva dibenzooksaborīnu **29a** ar augstu iznākumu (82%) [42].



1.12. att. Dibenzoksaborīna 29a iegūšana

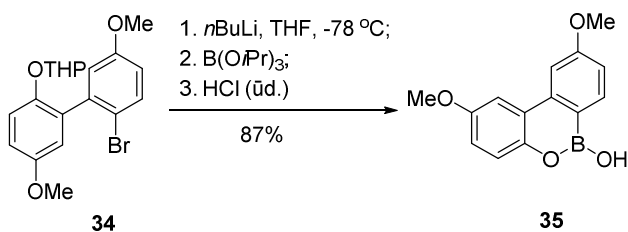
Lu ar līdzstrādniekiem ar labiem iznākumiem sintezēja cikliskus polihidroksi borskābes pusesterus **33**, savienojumu **32** demetilēšanas un ciklizēšanas reakcijā ar BBr_3 pārākumu pazeminātā temperatūrā ($-78\text{ }^\circ\text{C}$) (1.13. attēls) [43].



1.13. att. Polifenolisku boronātu 33 iegūšana

1.2.2. Iegūšana metāla-halogēna apmaiņas reakcijā

Literatūrā aprakstīta vēl viena ērti pielietojama metode dibenzoksaborīnu **35** iegūšanai metāla-halogēna apmaiņas reakcijā ar sekojošu borilēšanu ar triizopropilborātu (1.14. attēls) [44,45]. Veicot tetrahidropiranilgrupas un borskābes estera hidrolīzi skābos apstākļos, ar labu iznākumu tika iegūts dibenzoksaborīns **35**.

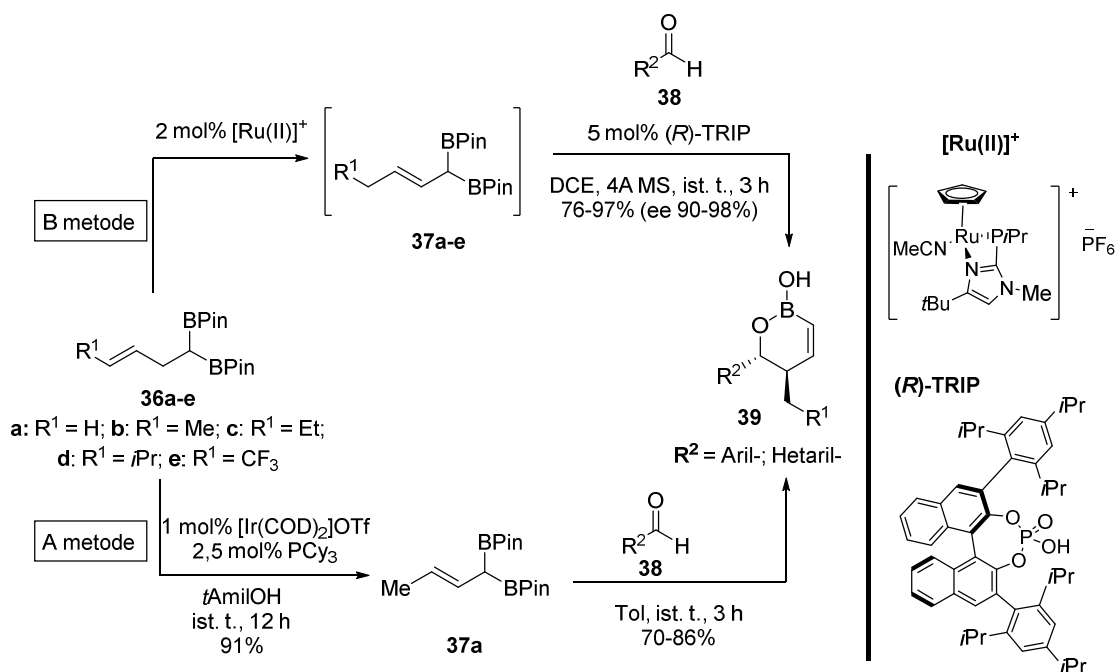


1.14. att. Dibenzoksaborīna 35 iegūšana

1.2.3. Iegūšana ar rutēniju katalizētās reakcijās

Park ar līdzstrādniekiem 2017. gadā ziņoja par stereoselektīvu 1,2-oksaborinīn-2-olu **39** iegūšanu no krotil *gem*-diboronāta **36a** reakcijā ar aldehīdiem (1.15. attēls, A metode) [46]. Alil *gem*-diboronāta **37a** iegūšanu veica irīdija katalizētā olefīnu izomerizācijas reakcijā no homoalil *gem*-diborskābes estera **36a**. Autori atzīmēja, ka reakcija tika veiksmīgi īstenota arī

10 mmolu mērogā, kā rezultātā tika iegūts **37a** ar 91% iznākumu. Diemžēl autoriem nebija izdevies iegūt citus aizvietotus alil *gem*-diboronātus **37** pēc aprakstītās metodes [46].



1.15. att. 1,2-Oksaborin-2-olu **39** iegūšanas metodes

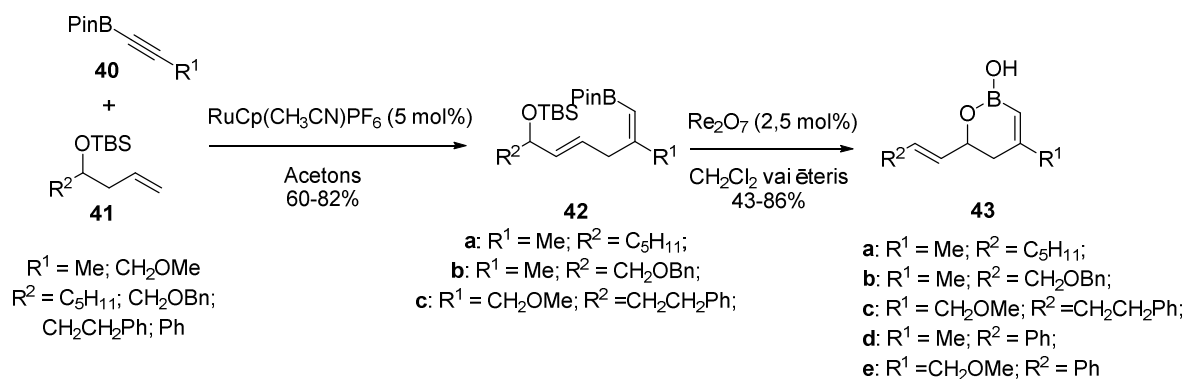
Vienlaikus savu ziņojumu publicēja *Miura* un kolēģi, kur autori no 1,1-di(boril)alk-3-ēniem **36a-e** katjonā rutēnija (II) kompleksa katalizētā dubultsaites migrācijas rezultātā *in situ* ģenerēja 1,1-di(boril)alk-2-ēnus **37a-e**, kas tālāk hirālās fosforskābes katalizētā aldehīdu alilēšanas reakcijā veidoja 1,2-oksaborin-2-olus **39** (1.15 attēls, B metode) [47].

Pēc abām metodēm alilēšanas reakcija notika ar dažādi aizvietotiem aldehīdiem **38**. Pēc A metodes reakcijas apstākļiem ar labiem iznākumiem autori ieguva 1,2-oksaborin-2-ola aril un hetarilatvasinājumus **39**. Autori minēja, ka reakcijas notika *anti*- un (*Z*)-selektīvi, taču enantiomēro pārkumu nebija norādījuši [46]. Savukārt, (*R*)-TRIP katalizētā alilēšanas reakcijā (B metode) ieguva aril un hetaril 1,2-oksaborin-2-olu atvasinājumus **39** ar ļoti labiem iznākumiem un augstu enantiomēro pārkumu (90-98%) [47].

Atšķirībā no irīdija katalizētās reakcijas metodes (metode A), kur dubultsaites pārvietošanos novēroja tikai 1,1-di(boril)but-3-ēna (**36a**) gadījumā, ar $[\text{Ru}(\text{II})]^+$ kompleksa katalizēto reakciju (metode B) bija iespējams arī citus 1,1-di(boril)alk-3-ēnus **36b-e** *in situ* pārvērst par 1,1-di(boril)alk-2-ēniem **37a-e**, no kuriem tālāk hirālās fosforskābes katalizētā aldehīdu alilēšanas reakcijā ieguva 1,2-oksaborin-2-olus **39**.

Hansen un *Lee* izstrādāja efektīvu metodi ciklisku vinilborskābju **43** iegūšanai no *cis*-vinilborskābes pinakolesteriem **42** Re_2O_7 katalizētā alil [1,3]-migrācijas reakcijā (*allylic transposition*) (1.16. attēls) [48]. Savukārt, *cis*-vinilborskābes pinakolesterus **42a-c**, ar labiem

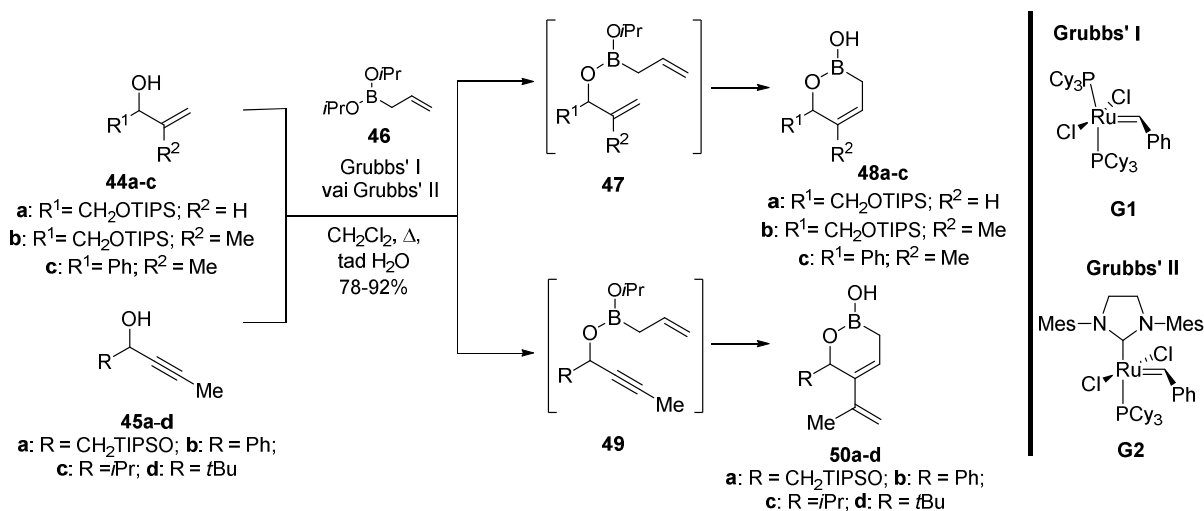
iznākumiem, bet vidēju *Z*-izomēra selektivitāti (3:1 līdz 13:1), ieguva rutēnija-katalizētā Aldera-ēnu (*Alder-ene*) reakcijā no alkinilborskābes pinakolestera **40** un homoalilsililēteriem **41** [48].



1.16. att. Alkenilborskābju pusesteru **43** sintēze ar dubultsaites alil [1,3]-transpozīciju

Pārgrupēšanās reakciju veica istabas temperatūrā, Re_2O_7 klātienē, kā rezultātā ieguva cikliskās vinilborskābes pusesterus **43a-c** ar labiem iznākumiem. Autori atzīmēja, ka ciklisko borskābju pusesteru **43d** un **43e** sintēzes procesā notika tandēma Aldera – ēnu reakcija ar sekojošu pārgrupēšanos, kā rezultātā uzreiz ieguva produktus **43d,e** ar 43% un 54% iznākumiem [49].

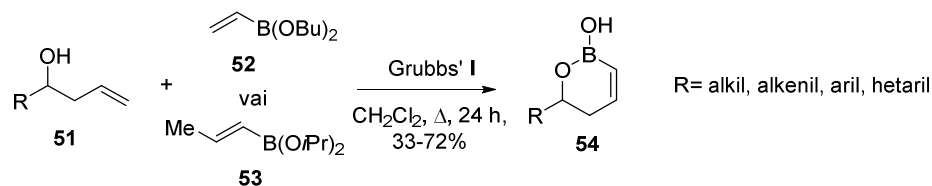
Micalizio un *Schreiber* izstrādāja jaunu ciklisko borskābju esteru **48** un **50** sintēzes metodi nepiesātinātās borskābes **46** anulēšanas reakcijā ar alil un propargilspirtu atvasinājumiem **44** un **45** (1.17. attēls) [50]. Transesterificēšanas reakcijā no alilspirtiem **44a-c** kā starpproduktus ieguva jauktos borskābes esterus **47**, kas cikla saslēgšanas metatēzes reakcijā, izmantojot *Grubbs* katalizatoru **G1** vai **G2**, deva cikliskos borskābes pusesterus **48a-c**.



1.17. att. Alilborskābes diizopropilestera **46** anulēšana

Pēc analogijas propargilspirta atvasinājumi **45a-d** transesterificēšanas reakcijā ar alilborskābes esteri **46** kā starpproduktus deva jauktos borskābes esterus **49**, kas ēnu-īnu (*ene-yne*) metatēzes reakcijā, *Grubbs* katalizatora **G1** klātienē, deva 1,2-oksaborinīn-2-olus **50a-d** (1.17. attēls) [50].

Vēlāk *McNulty* ar līdzstrādniekiem publicēja ciklisku alkenilborskābju pusesteru **54** sintēzi (1.18. attēls), kurus ieguva cikla saslēgšanas metatēzes reakcijā no vinilborskābes estera **52** un homoalilspirtiem **51** [51]. Cikla saslēgšanas metatēzi veica reakcijas maisījumu vārot CH_2Cl_2 , *Grubbs* pirmās paaudzes katalizatora klātienē.



1.18. att. Alkenilborskābju pusesteru **54** sintēze

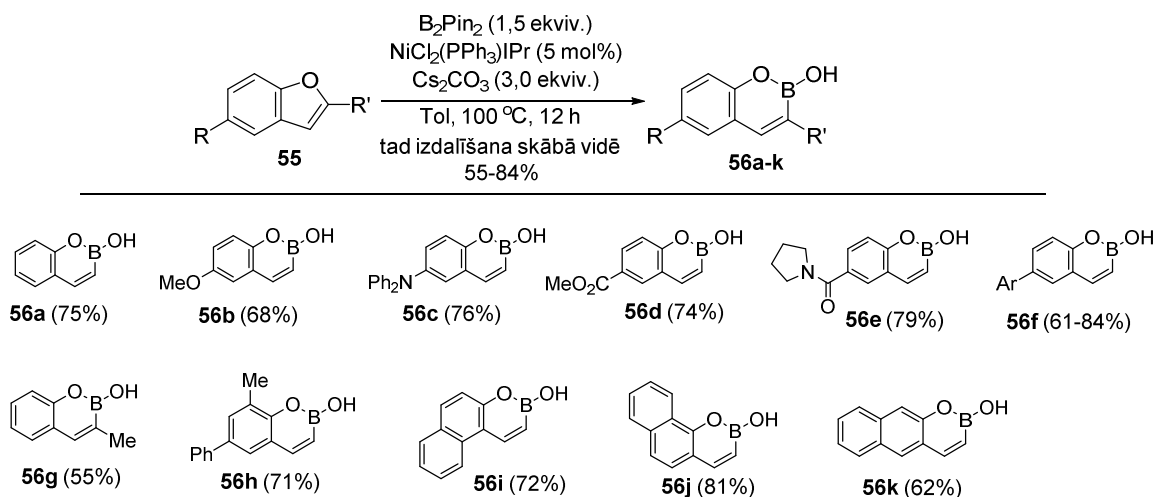
Līdzīgi kā iepriekš, sākotnēji notika vinilborskābes estera **52** transesterificēšanas reakcija ar homoalilspirtu un sekojošu cikla saslēgšanos. Autori norādīja, ka ņemot vērā vinilborskābes dibutilestera (**52**) dārgās izmaksas un tā polimerizēšanās iespējas, propenilborskābes diizopropilesteris (**53**) ir tam laba alternatīva, kas ļāva iegūt cikliskos alkenilborskābju pusesterus **54** ar 33-72% iznākumiem [51].

Šo cikla saslēgšanas metatēzi veica ar dažādiem alkil, aril un alkenil homoalilspirtiem. Reakcijas ar fenil un 2-furil aizvietotajiem spirtiem notika ar nedaudz augstākiem iznākumiem nekā reakcijas ar alkil un alkenil aizvietotājiem [51].

1.2.4. Iegūšana no benzofurāniem ar bora iespiešanos C-O saitē

2016. gadā profesora *Yorimitsu* grupa aprakstīja benzoksaborīnu **56a-k** iegūšanas metodi, kurā notika bora iespiešanās benzofurānu C-O saitē niķeļa-NHC katalizētā reakcijā ar bis(pinakol)diborānu, Cs_2CO_3 klātbūtnē (1.19. attēls) [52]. Autori uzsvēra, ka šis bija pirmais piemērs katalītiskai bora atoma ievadīšanai heteroaromātiskajā ciklā, neizjaucot tā aromātisko sistēmu. Tāpat autori norādīja, ka 5-vietā aizvietotu benzofurāna substrātu klāsts bija plašs un reakcija notika bez fluor, metoksi un estera funkcionālo grupu zaudēšanas, kuras potenciāli ir reaģētspējīgas niķeļa katalizētajās reakcijās [52].

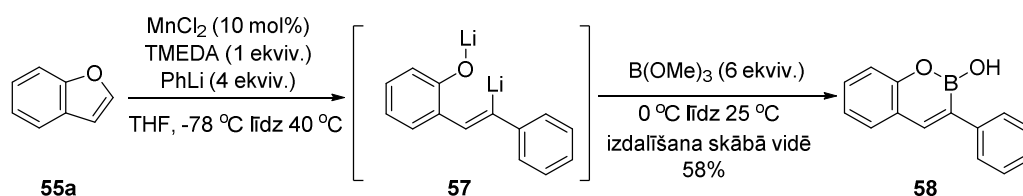
Benzofurānu **55** C2–O saites borilēšana tika veikta $\text{NiCl}_2(\text{PPh}_3)\text{IPr}$ katalizatora klātienē, karsējot toluolā, 100 °C temperatūrā (1.19. attēls). Pēc reakcijas izdalīšanas skābā vidē, bora iespiešanās produkti, oksaborīni **56a-k**, tika iegūti ar 55-84% iznākumu [52].



1.19. att. Benzoksaborīnu **56a-k** sintēze

Minētie reakcijas apstākļi izrādījās piemēroti benzofurānu atvasinājumiem ar aizvietotājiem benzola gredzenā. Ar furāna cikla 2-vietā atvasinātiem substrātiem autoriem izdevās iegūt tikai benzoksaborīnu **56g** ar 55% iznākumu ar metil aizvietotāju 2-vietā, izmantojot 10 mol% katalizatora [52].

Turpinot pētījumu, 2017. gadā profesora *Yorimitsu* grupa aprakstīja jaunu metodi heteroatomu iespiešanās reakcijai benzofurāna **55a** C-O saitē (1.20. attēls) [53]. Mangāna katalizētā arilējošā cikla atvēršanās reakcijā ar fenillitiju ieguva cikla atvēršanās starpproduktu **57**, kuru apstrādājot ar $B(OMe)_3$ pārākumu, ieguva 3-fenilbenzoksaborīnu **58** ar 58% iznākumu.

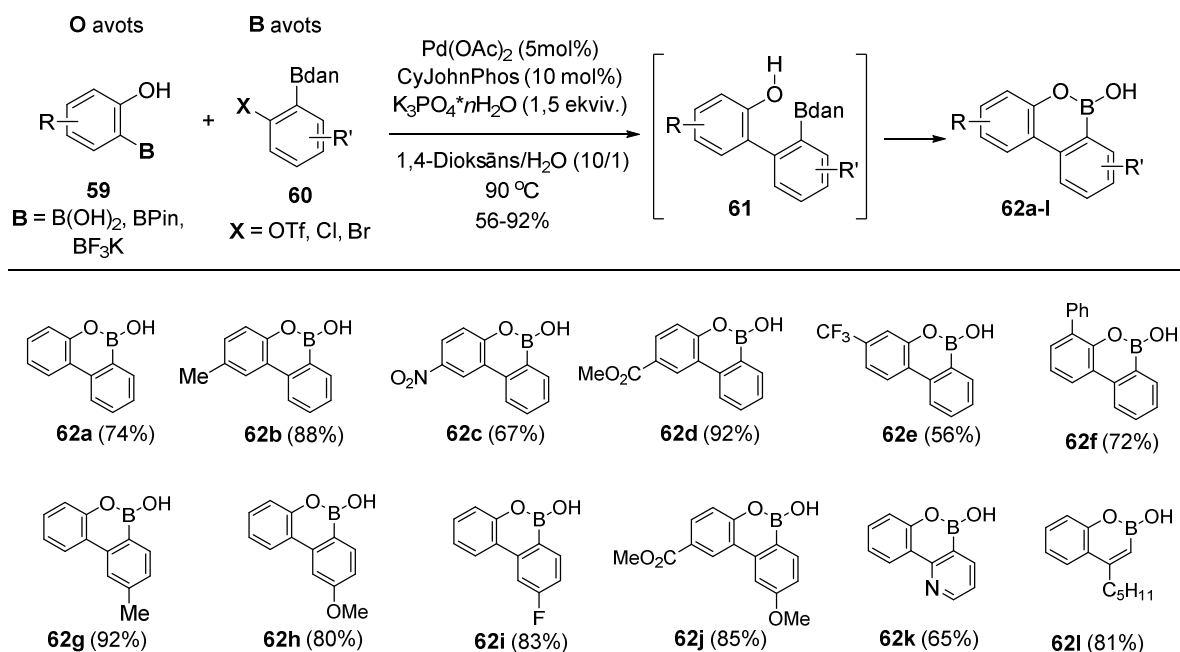


1.20. att. Benzoksaborīna **58** sintēze

1.2.5. Dibenzoksaborīnu iegūšana *Suzuki-Miyaura* sametināšanas reakcijā

Jaunu metodi dibenzoksaborīnu **62** iegūšanai bora-selektīvā *Suzuki-Miyaura* šķērssametināšanas reakcijā publicēja *Sumida* ar kolēģiem (1.21. attēls) [54]. Autori sagaidīja, ka palādija katalizētā reakcijā starp *orto*-hidroksifenilborskābi (**59a**) un arilhalogenīdu vai triflātu **60** veidosies *Suzuki* sametināšanas produkts **61**, kam nošķēloties diaminoaftilgrupai, iekšmolekulāras ciklizēšanās reakcijas rezultātā iegūs dibenzoksaborīnu **62a**. Taču, veicot *Suzuki* reakciju, sagaidāmais sametināšanas produkts **61** netika izdalīts, bet uzreiz tika iegūts dibenzokaborīns **62** bez papildus manipulācijām. Autori to skaidroja ar skābekļa augsto afinitāti pret bora atomu, kas iespējami veicināja diaminoaftilgrupas nošķelšanu un stabilas

benzoksaborīna struktūras veidošanos. Labākie reakcijas rezultāti bija iegūti katalītiskajā sistēmā par ligandu izmantojot CyJohnPhos un K_3PO_4 kā bāzi [54].

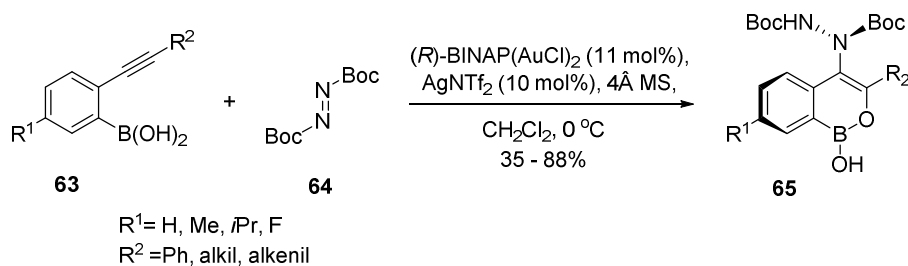


1.21. att. Benzoksaborīnu 62a-l sintēze

Šajos reakcijas apstākļos dažādi fenola atvasinājumi **59** un bora avota savienojumi **60** gan ar ED aizvietotājiem, gan ar EA aizvietotājiem kalpoja kā labi substrāti dibenzoksaborīnu **62a-l** iegūšanai (1.21. attēls). Jāatzīmē, ka reakcija notika ne tikai ar fenola borskābju atvasinājumiem, bet arī fenola borskābes pinakolesteru vai trifluoroborāta sāļu atvasinājumiem **59**. Pēc šīs metodes bija iespējams iegūt arī diaizvietotu benzoksaborīnu atvasinājumu **62j**, kā arī heteroatomu saturošu atvasinājumu – ar piridīna ciklu kondensētu benzoksaborīnu **62k**. Autoriem izdevās iegūt arī biciklisku alkilatvasinājumu **62l** ar ļoti labu iznākumu (81%) [54].

1.2.6. Iegūšana zelta katalizētā reakcijā no 2-alkinilfenilborskābēm

Guo ar līdzstrādniekiem 2014. gadā aprakstīja jaunu heteroaril atropoizomēru **65a-k** sintēzi no 2-alkinilfenilborskābes **63**, tās reakcijā ar diazēnu **64** zelta(I) kompleksa katalizētā cikloizomerizācijas-aminēšanas kaskādes reakcijā (1.22. attēls) [55]. Autori ar labiem iznākumiem un augstu enantioselectivitāti ieguva savienojumus **65** no alkinilborskābēm ar lineāriem, sazarotiem alkil un alkenil, kā arī fenil aizvietotājiem.



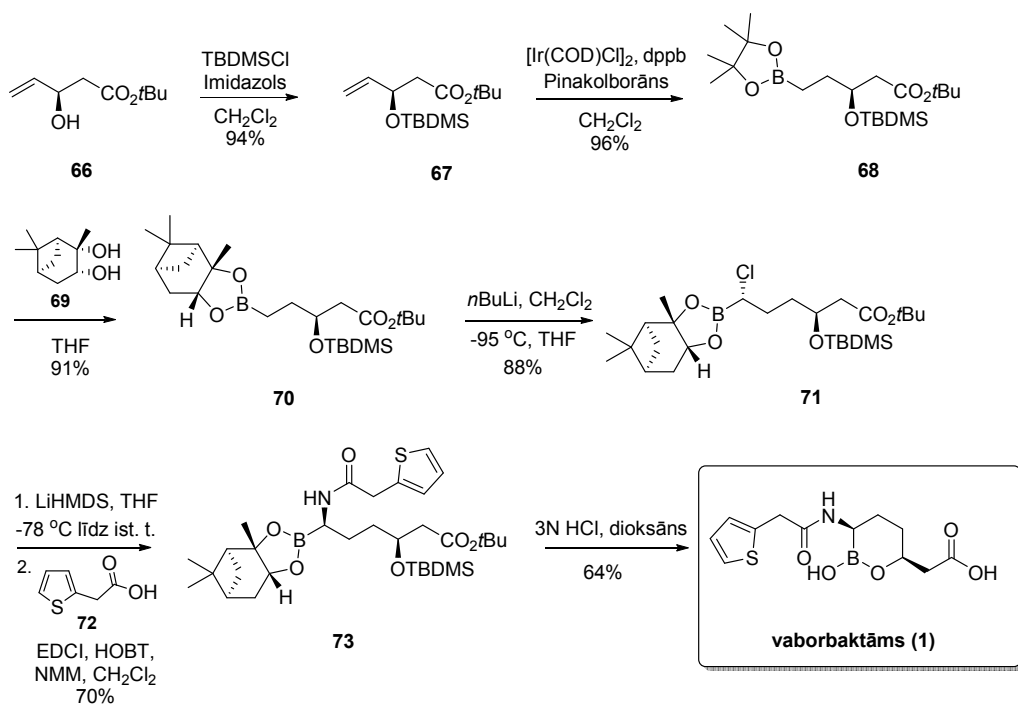
1.22. att. Ciklisku borskābes pusesteru 65a-k sintēze zelta katalizētā reakcijā

Autori norādīja, ka alkilaizvietotāji borskābes **63** aromātiskajā gredzenā reakcijas iznākumus un enantioselectivitāti neietekmēja, savukārt fluora aizvietotājs enantioselectivitāti samazināja līdz 74% [55].

1.3. Efektīvāko boru saturošo SBL un MBL inhibitoru sintēze

1.3.1. Monocikliskā vaborbaktāma (1) sintēzes metode

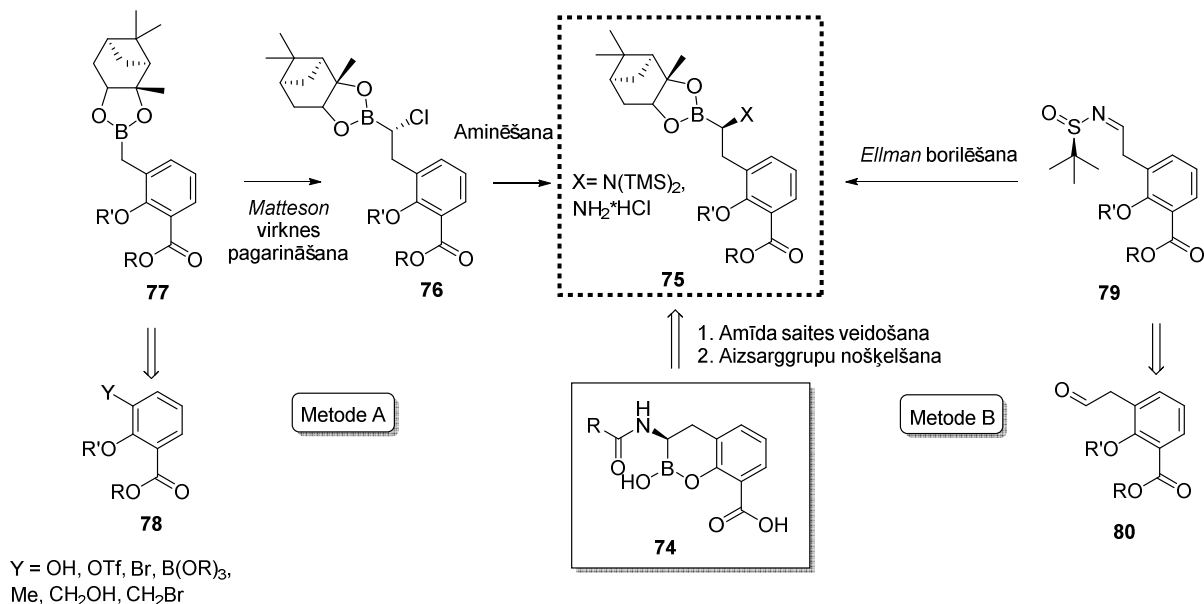
Hecker ar līdzstrādniekiem (*Rempex Pharmaceuticals*) monocikliskā α -acilamidoborskābes pusestera vaborbaktāma (**1**) sintēzi veica sešās stadijās ar kopējo iznākumu ap 30% (1.23. attēls) [34]. Sintēzi sāka no β -hidroksi estera **66**, kurā spirta funkciju aizsargāja ar TBDMSCl imidazola klātienē, iegūstot sililēteri **67**. Attiecīgais borskābes pinakolesteris **68** tika iegūts irīdija katalizētā hidroborēšanas reakcijā. Lai uzlabotu pinakolāta **68** stabilitāti un stereoselectivitāti, to pārvērta par pināndiola esteri **70**. Hlorīdu **71** kā diastereomēru maisījumu (*dr* 85:15) ieguva stereoselectīvā hlormetilēšanas reakcijā pēc *Matteson* protokola [56]. Amīda atvasinājumu **73** ieguva hlorīda **71** stereospecifiskā aizvietošanas reakcijā ar LiHMDS, kam sekoja *in situ* acilēšana ar karbonskābi **72**. Visu aizsarggrupu nošķelšanu veica skābā vidē, iegūstot ciklisko borskābes pusesteri **1** [34].



1.23. att. Vaborbaktāma (1) sintēze

1.3.2. Biciklisko boronātu sintēzes metodes

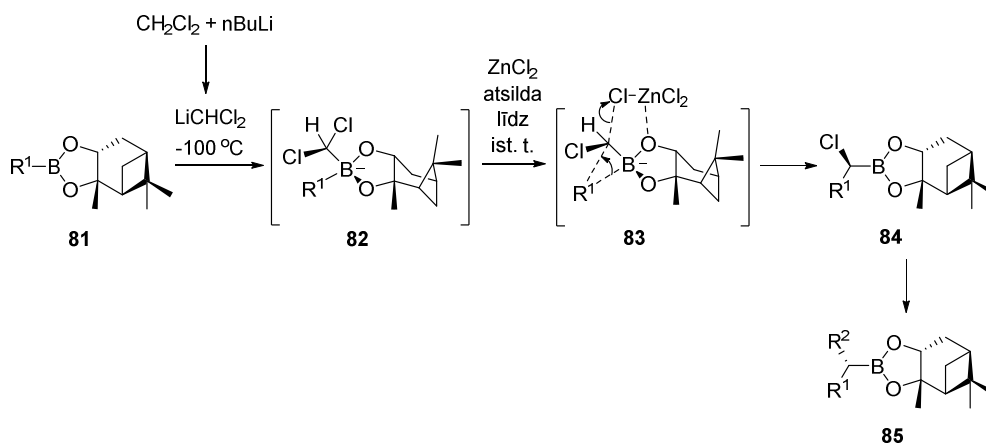
Reddy ar līdzstrādniekiem bicikliskos α -acilamidoborskābes pusesterus **74** sintezēja no attiecīgajiem α -aminoboronātiem **75**, kurus savukārt piedāvāja iegūt pēc divām dažādām metodēm (1.24. attēls) [57]. Viena no pieejām bija līdzīga monocikliskā vaborbaktāma (**1**) sintēzei, kur izmantoja *Matteson* virknes pagarināšanas reakciju (1.24 attēls, metode A).



1.24. att. Biciklisko boronātu **74** iegūšanas shēma

Pateicoties borskābes pināndiola esterim, no benzilborskābes atvasinājuma **77** *Matteson* virknes pagarināšanas reakcijā ar labu stereokontroli ieguva α -hlor-borskābes esteru **76**.

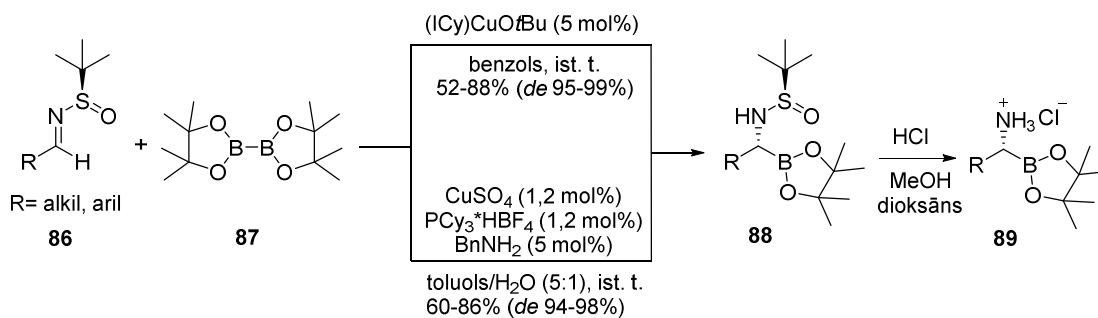
Matteson 1983. gadā aprakstīja virknes pagarināšanas reakciju, kur notika CHCl grupas iespīšanās C-B saitē dioksoborolāna molekulā, kas nodrošināja stereoselektīvu sintēzes ceļu (α -hloralkil)borskābju esteru **84** iegūšanai (1.25. attēls) [56]. Iegūtos hlorīdus **84** tālāk varēja stereospecifiski pārvērst par dažādiem α -aizvietotiem atvasinājumiem **85** [56,58–62]. (Dihlormetil)litiju ieguva no dihlormetāna un butillitija -100°C , kas reakcijā ar borskābes esteru **81** izveidoja “bora-āta” kompleksu **82**. (Dihlormetil)litija pievienošana borskābes pināndiola esterim novietoja dihlormetilgrupu mazāk stēriski traucētā pusē. Reakcijas maisījumu atšildot līdz istabas temperatūrai ZnCl_2 klātienē, pārgrupēšanās rezultātā ieguva (α -hloralkil)borskābes esterus **84** ar diastereomēro tīrību līdz pat 99% [58–62].



1.25. att. Matteson virknes pagarināšanas reakcija

Tālāk iegūto hlorīdu **76** (1.24. attēls, metode A) pārvērta par bis(trimetilsilil)amīnu **75** stereospecifiskā aizvietošanas reakcijā ar LiHMDS , kuru skābā vidē varēja pārvērst par amīnu vai izmantot tālāk amīda saites veidošanā tāpat, bez TMS grupu nošķelšanas [57]. Otra pieeja α -aminoborskābes esteru **75** iegūšanai bija izmantojot jaunāku sintēzes metodi, veicot vara katalizētu *N-terc*-butilsulfinilaldimīnu **79** borilēšanu ar bis(pinakol)diborānu ar sekojošu Ellmana hirālās palīggrupas nošķelšanu skābā vidē (1.24. attēls, metode B) [57].

Ellman ar līdzstrādniekiem 2008. gadā publicēja jaunu efektīvu pieeju dažādu α -aminoborskābju **89** asimetriskajai sintēzei vara (I) katalizētā bis(pinakol)diborāna (**87**) pievienošanas reakcijā *N-terc*-butilsulfinilaldimīniem **86** istabas temperatūrā (1.26. attēls) [63]. Tā no alkil un aril aizvietotiem *N-terc*-butilsulfinilaldimīniem **86** vara (I) katalizētā reakcijā ar B_2Pin_2 , ieguva *N*-sulfinil- α -aminoborskābes pinakolesterus **88** ar vidējiem līdz labiem iznākumiem (diastereoselektivitāte 95-99%).

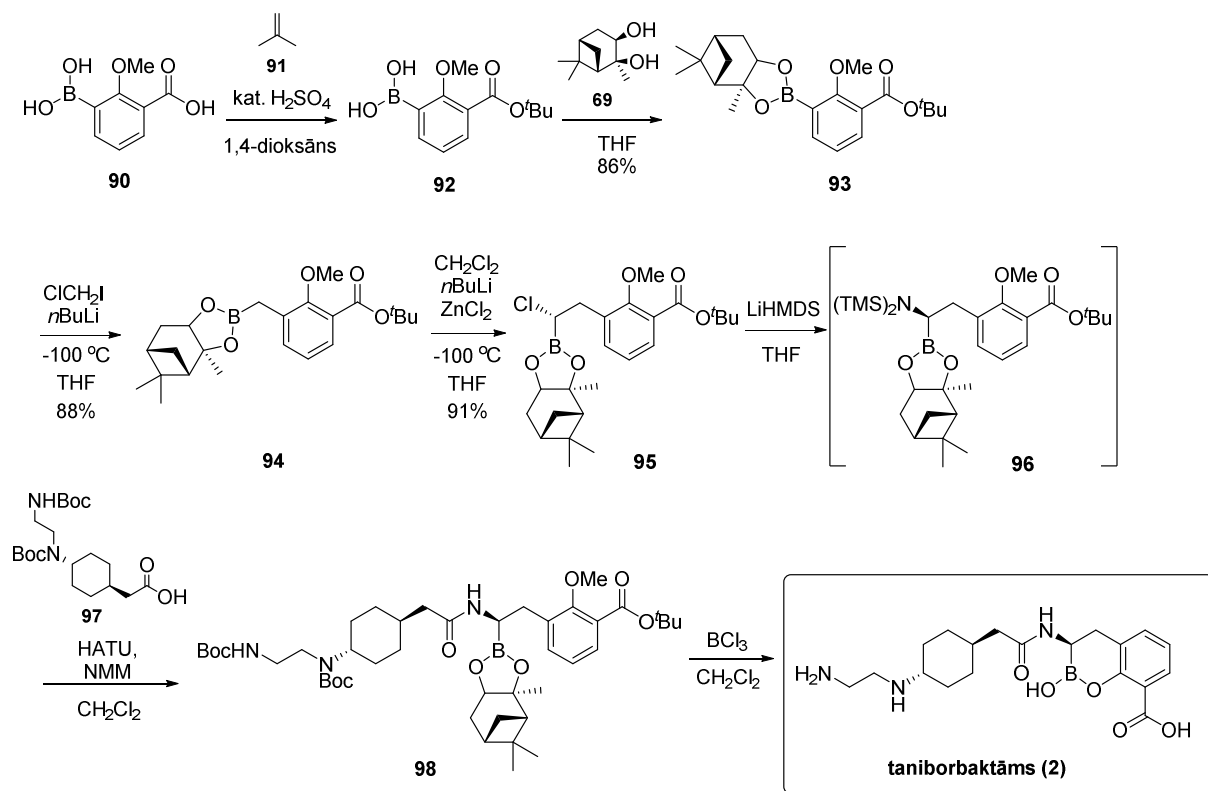


1.26. att. Ellman borilēšanas reakcija

Vēlāk 2014. gadā *Ellman* grupa ziņoja par gaisa un mitrumu izturīgu vara (II) katalizatora sistēmu *N-tert*-butilsulfinilaldimīnu **86** borilēšanai [64]. Izmantojot CuSO₄ un PCy₃·HBF₄ katalītisko sistēmu, borilēšanas reakcija notika toluola/ūdens maisījumā (5:1) istabas temperatūrā, ļaujot viegli iegūt alkil un aril aizvietotus *N*-sulfinil- α -aminoborskābes pinakolesterus **88** ar labiem iznākumiem un augstu diastereoselektivitāti (94-98%).

1.3.3. Taniborbaktāma sintēze

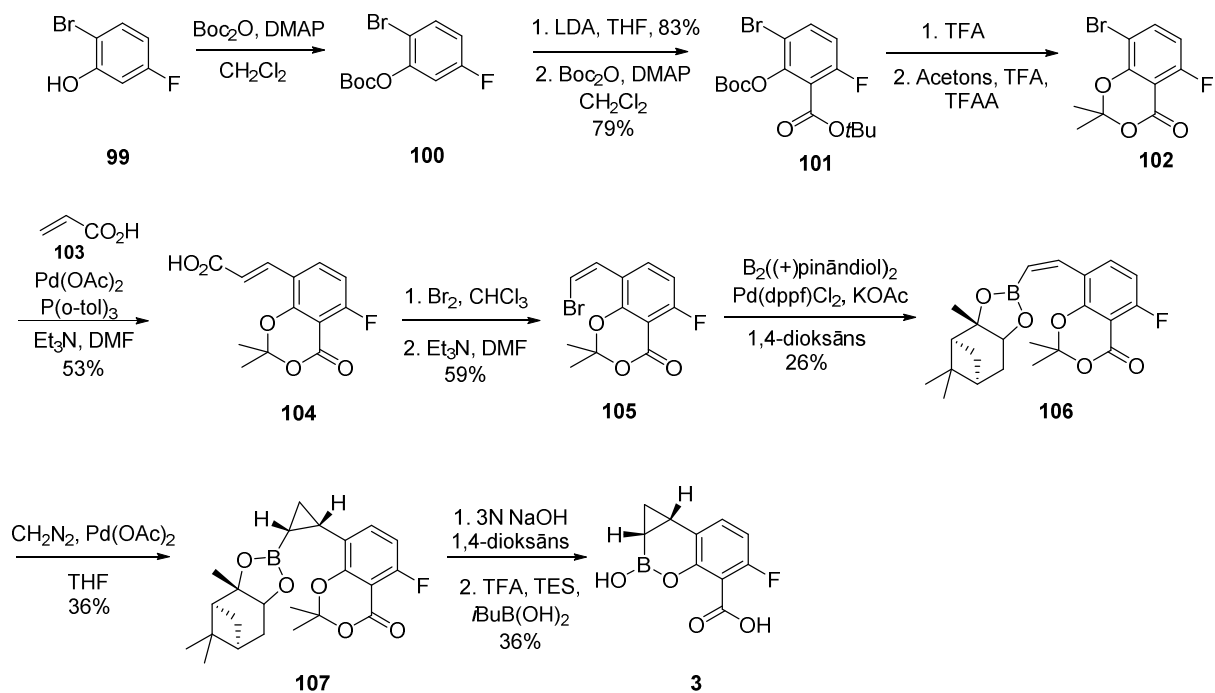
Burns ar līdzstrādniekiem (*Venatorx Pharmaceuticals*) taniborbaktāmu (**2**) ieguva 7 stadiju sintēzē no komerciāli pieejamās 3-borono-2-metoksibenzoskābes (**90**), kur karboksilgrupu aizsargāja *tert*-butilestera formā (1.27. attēls) [38]. Tālāk benzoskābes *tert*-butilestera **92** borskābes grupu reakcijā ar (+)-pināndiolu (**69**) pārvērtā hirālā borskābes esterī **93**. Sekojot *Matteson* protokolam, no arilborskābes estera **93**, tā reakcijā ar hlormetilīti - 100 °C ar 88% iznākumu tika iegūts par vienu CH₂ fragmentu pagarināts borskābes esteris **94** [61]. Otro virknes pagarināšanu veica ar (dihlormetil)litiju, kuru ģenerēja no dihlormetāna, rezultātā selektīvi iegūtot (*S*)- α -hlor-borskābes esterī **95**. Stereospecifiska savienojuma **95** hlora atoma aizvietošana ar LiHMDS -20 °C deva α -sililaminoborskābes esterī **96**, kuru tālāk bez attīrīšanas izmantoja amīda saites veidošanas reakcijā ar karbonskābi **97**, HATU un NMM klātienē, kā rezultātā ieguva amīdu **98**. Ar 1 M BCl₃ šķīdumu dihlormetānā tika veikta aizsarggrupu nošķelšana un produkta ciklizēšana, kā rezultātā tika iegūts taniborbaktāms (**2**) [38].



1.27. att. Taniborbaktāma (2) sintēzes metode

1.3.4. Bicikliskā boronāta QPX7728 sintēze

Hecker un kolēģu izstrādātā savienojuma QPX7728 (**3**) sintēzi autori sāka no 2-brom-5-fluorfenola (**99**), kuru pārvērta par *tert*-butilkarbonātu **100** (1.28. attēls) [9]. Reakcijā ar LDA tika veikta savienojuma **100** deprotonēšana ar acilgrupas pārnesi un iegūto fenolu, aizsargājot ar Boc_2O , ieguva *tert*-butilkarbonātu **101**. Skābā vidē Boc un *t*Bu aizsarggrupas tika nošķeltas un reakcijā ar acetonu nomainītas pret izopropilidēngrupu, iegūstot savienojumu **102**. Tālāk tas Heka reakcijā ar akrilskābi (**103**) tika transformēts par kanēļskābes atvasinājumu **104**. Karbonskābes **104** bromēšanas un tai sekojošas dekarboksilējošās eliminēšanas reakcijas rezultātā ieguva *cis*-vinilbromīdu **105**, kas palādija katalizētā reakcijā tika pārvērsts par attiecīgo *cis*-vinilborskābes esteru **106** [9].

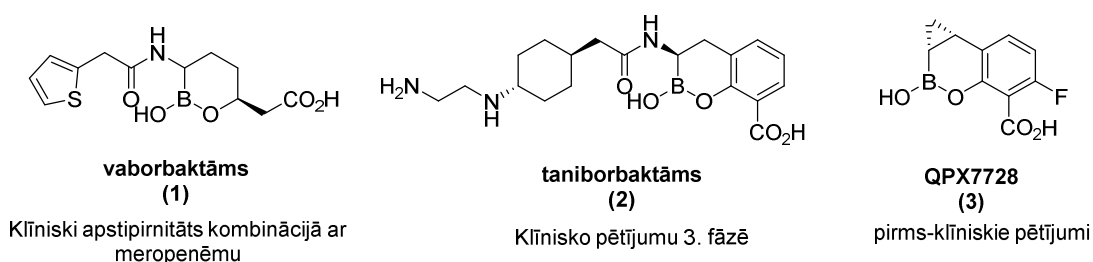


1.28. att. Bicikliskā boronāta QPX7728 (3) sintēze

Savienojumu **107** ieguva palādija katalizētā ciklopropanēšanas reakcijā ar diazometānu no *cis*-vinilborskābes estera **106**. Produkts **107** tika iegūts kā diastereomēru maisījums, kuru sadalīja ar AEŠH un ieguva vēlamo diastereomēru **107** ar 36% iznākumu. Hidrolizējot acetonīda un pināndiola estera grupas, ieguva ciklisko boronātu QPX7728 (**3**) ar apmierinošu iznākumu (36%) [9].

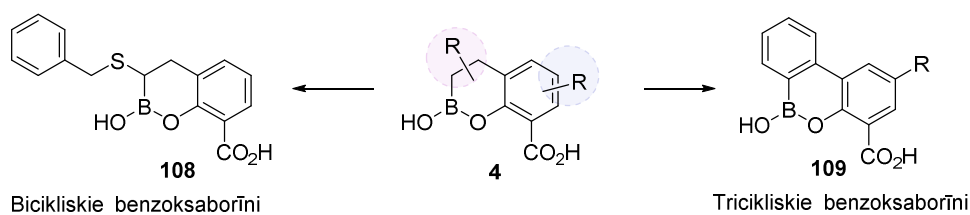
2. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Boru saturošie savienojumi kā β -laktamāžu inhibitori jau ilgu laiku tiek pētīti zinātniskajās laboratorijās [31,32,65–67]. Pēdējā desmitgadē arī farmaceitiskā industrija izrādījusi palielinātu interesi šajā jomā. *Rempex Pharmaceuticals* atklāja un attīstīja monociklisku boru saturošu SBL inhibitoru vaborbaktāmu (**1**) (2.1. attēls), kuru kombinācijā ar meropenēmu *FDA* 2017. gadā apstiprināja kā zāles sarežģītu urīnceļu infekciju ārstēšanai (*Vabomere*) [34,68]. Pašlaik klīnisko pētījumu 3. fāzē ir *Venatorx Pharmaceuticals* izstrādātais bicikliskais boronāts taniborbaktāms (**2**), kurš ir iedarbīgs plaša spektra β -laktamāžu inhibitors, kas inhibē visas četras *Ambler* klasifikācijas β -laktamāzes [38,69]. *Qpex Biopharma* izstrādātais savienojums QPX7728 (**3**) parādīja ievērojamu saistīšanās spēju gan ar SBL, gan arī ar MBL enzīmiem, tādiem kā D klases OXA un B klases NDM1 enzīmiem. Savienojums QPX7728 (**3**) pašlaik ir pirmsklīnisko pētījumu stadijā [9]. 2020. gada 3. decembrī *Qpex Biopharma* paziņoja, ka uzsāk plaša darbības spektra β -laktamāžu inhibitora QPX7728 (**3**) 1. fāzes klīniskos pētījumus [10].



2.1. att. Zināmie cikliskie boronāti kā aktīvi β -laktamāžu inhibitori

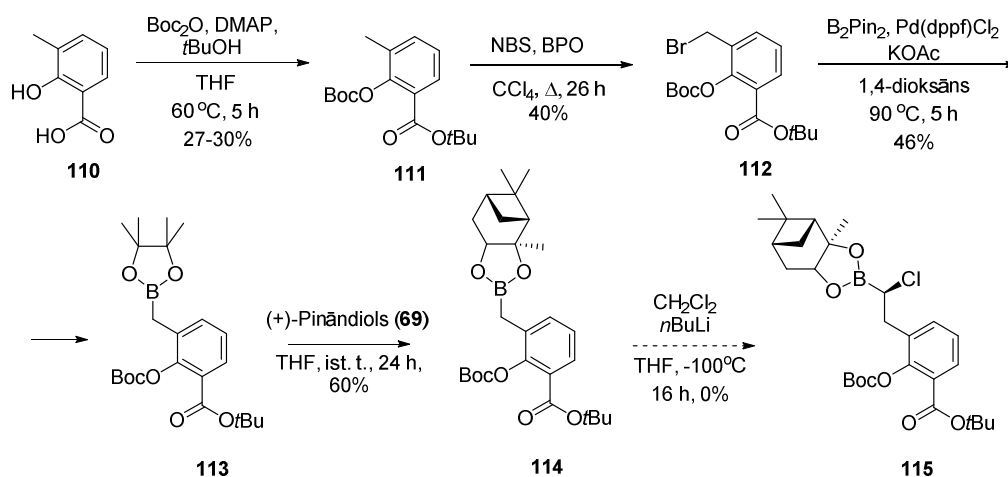
Ņemot vērā iepriekšminēto un izmantojot cikliskā boronāta pamatstruktūru, šī promocijas darba ietvaros tika veikta benzoksaborīnu atvasinājumu **4** (2.2. attēls) sintēzes metožu izstrāde. Dēļ tā, ka pašlaik nav klīniski pielietojamu MBL inhibitoru, ir pastiprināta interese un nepieciešamība šādu inhibitoru izstrādei. Sadarbībā ar prof. *Christopher J. Schofield* grupu, sintezētajiem savienojumiem tika noteikta inhibējošā aktivitāte uz MBL, kā arī potenciāli uz SBL enzīmiem. Tika arī veikti kristalogrāfiskie pētījumi, lai noskaidrotu to saistīšanās veidus β -laktamāžu aktīvajos centros.



2.2. att. Šajā darbā sintezēto ciklisko boronātu struktūras

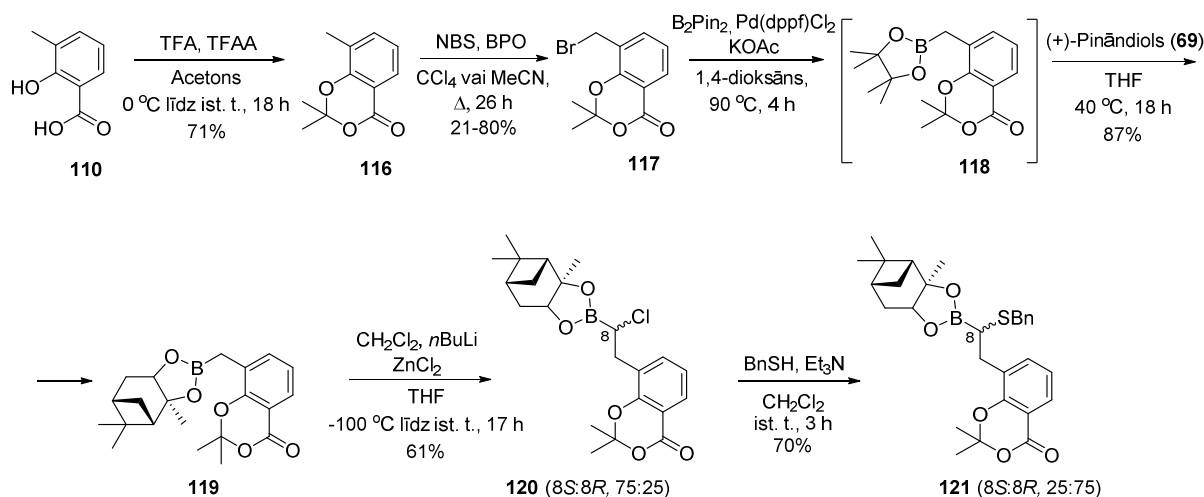
2.1. Bicikliskā benziltiobenzoksaborīna sintēze un inhibitorā aktivitāte

Sākotnēji tika veikti mēģinājumi iegūt mērķsavienojumu **115** pēc aprakstītas metodes [57], kur sintēze tika sākta no komerciāli pieejamās 3-metilsalicilskābes (**110**) (2.3. attēls). Karboksil un hidroksil funkcionālās grupas tika aizsargātas ar *tert*-butil un Boc aizsarggrupām. Savienojuma **111** metilgrupas bromēšana veikta ar NBS, vārot tetrahlorogleklī, benzoilperoksīda klātienē. Iegūtais bromīds **112** *Miyaura* borilēšanas reakcijā tika pārvērst par pinakolborātu **113**, kuru pāresterificējot ar (+)-pināndiolu tika iegūts boronāts **114**. Tālāk mēģinājām veikt virknes pagarināšanas reakciju patentu literatūrā [57] dotajos reakcijas apstākļos, taču produktu **115** iegūt neizdevās, jo *Matteson* virknes pagarināšanas reakcija ir b/ū $ZnCl_2$ katalizēta reakcija, kura bez šīs Luisa skābes nenotiek [59,60,70].



2.3. att. Savienojuma 115 sintēze pēc patenta literatūras metodes

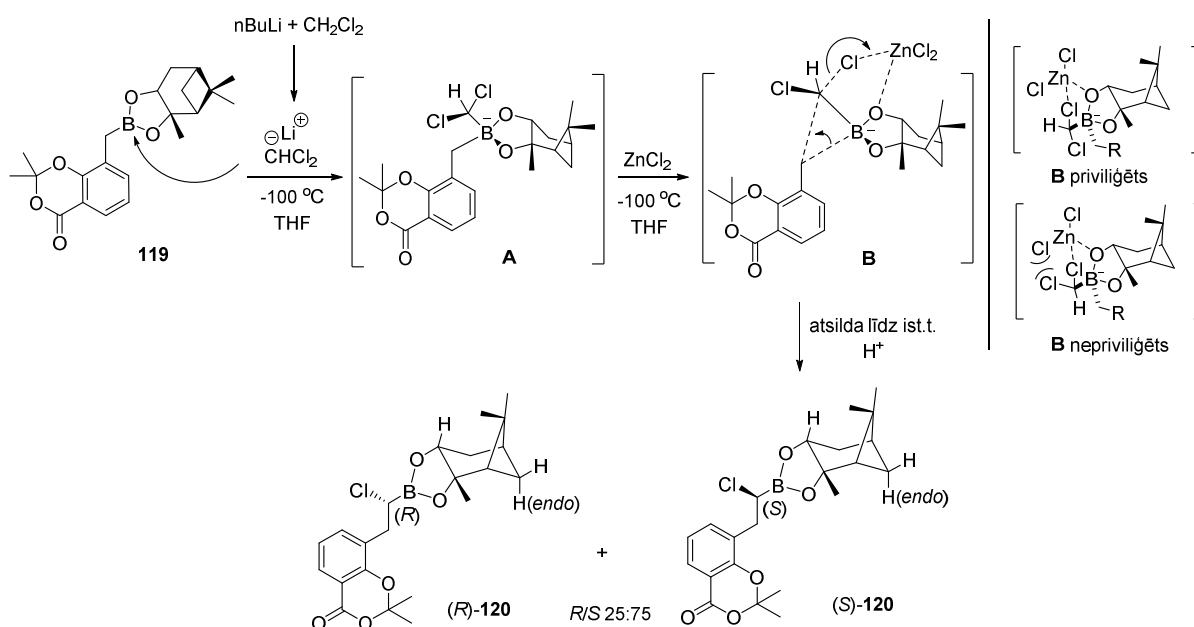
Tā kā iepriekšminētajā sintēzes ceļā zemi reakciju iznākumi bija jau sākot ar aizsarggrupu “uzlikšanas” stadiju, tika nolemts nomainīt *tert*-butil un Boc aizsarggrupas pret izopropilidēnaizsarggrupu (2.4. attēls). Aizsarggrupu maiņa nedaudz atviegloja arī reakciju gaitas analīzi ar ŠH-MS metodi, jo nebija pamata bažām par iepieš izmantoto *tert*-butil un Boc aizsarggrupu iespēju nošķelties hromatogrāfijas skābajos apstākļos.



Sintēze sāka tāpat no komerciāli pieejamās 3-metilsalicilskābes (**110**), kuru maisot istabas temperatūrā ar acetonu, trifluoretiķskābi un trifluoretiķskābes anhidrīdu tika iegūts ar izpropilidēngrupu aizsargāts produkts **116** ar labu iznākumu (71%) (2.4. attēls). Bromēšanu pēc radikāļu mehānisma veicām ar NBS benzoilperoksīda klātienē. Reakcijas maisījumu vārot tetrahlorogleklī, tika iegūts bromīds **117** ar ~20% iznākumu. Tā kā bromēšanas reakcijas iznākums bija zems, kā arī tetrahlorogleklis ir toksisks un ozona slāni noārdošas vielas klasifikācijas dēļ ir stringri reglamentēts, tika nolemts veikt bromēšanu citā šķīdinātājā. Mēģinājām veikt reakciju metilēnchlorīdā, taču tā viršanas temperatūra izrādījās par zemu (40 °C), lai iniciētu bromēšanas reakciju. Nomainot šķīdinātāju pret acetonitrilu un karsējot 80-90 °C temperatūrā, izdevās iegūt bromīdu **117** ar 80% iznākumu. *Miyaura* borilēšanas reakciju veicām ar bis(pinakolāto)diborānu, Pd(dppf)Cl₂ (5 mol%) katalizatora klātienē, par bāzi izmantojot b/ū KOAc. Par šķīdinātāju tika izmantots sauss 1,4-dioksāns un reakcijas maisījumu karsēja 4 stundas 90 °C temperatūrā. Pēc attīrīšanas ar kolonnas hromatogrāfiju tika iegūts pinakolborāts **118** ar ~70% iznākumu, kuru reakcijā ar (+)-pināndiolu tetrahidrofurānā pāresterificējām par borātu **119** ar labu iznākumu (80-90%). Lai izvairītos no zudumiem, kas radās pinakolāta **118** attīrīšanas procesā, uzreiz pēc savienojuma **118** izdalīšanas no reakcijas maisījuma, bez attīrīšanas, tika veikta pāresterificēšanas reakcija. Rezultātā no bromīda **117** divu soļu reakcijā izdevās iegūt borātu **119** ar 87% iznākumu (rēķinot iznākumu no bromīda **117**).

Matteson virknes pagarināšanas reakcijā ieguvām (α -hloralkil)boronātu **120** kā diastereomēru maisījumu (75:25 (*S/R*)) ar viduvēju iznākumu. Balstoties uz borskābes pināndiola estera atvasinājumu aprakstīto reakcijas mehānismu [58–62], pieņemām, ka pārākumā tika iegūts (*S*)-hloratvasinājums (*S*)-**120** (2.5. attēls). *Matteson* reakcijā no sākuma *in situ* tika ģenerēts (dihlormetil)litijs, deprotonējot dihlormetānu -100 °C sausā THF. Tālāk -

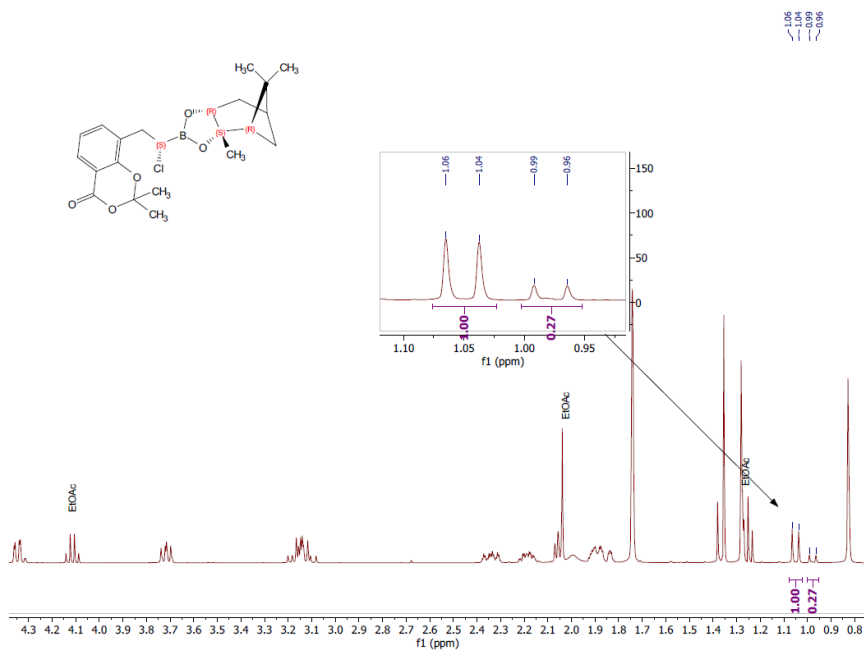
100 °C lēnām pievienojot (+)-pināndiola borskābes estera atvasinājumu **119**, veidojās „bora-āta” komplekss (2.5. attēls, **A**), kuram pievienojot ZnCl₂ tas koordinējas ar mazāk stēriski traucēto borskābes skābekļa atomu, kā arī ar aizejošo hlorīdu (2.5. attēls, **B**). Tādējādi ZnCl₂ nosaka aizvietotāju izvietojumu un, atsildot reakcijas maisījumu līdz istabas temperatūrai, tas veicina pārgrupēšanās reakciju un koordinētā hlorīda atšķelšanos.



2.5.att. (α -Hloralkil)boronāta **120** iegūšana Matteson virknes pagarināšanas reakcijā

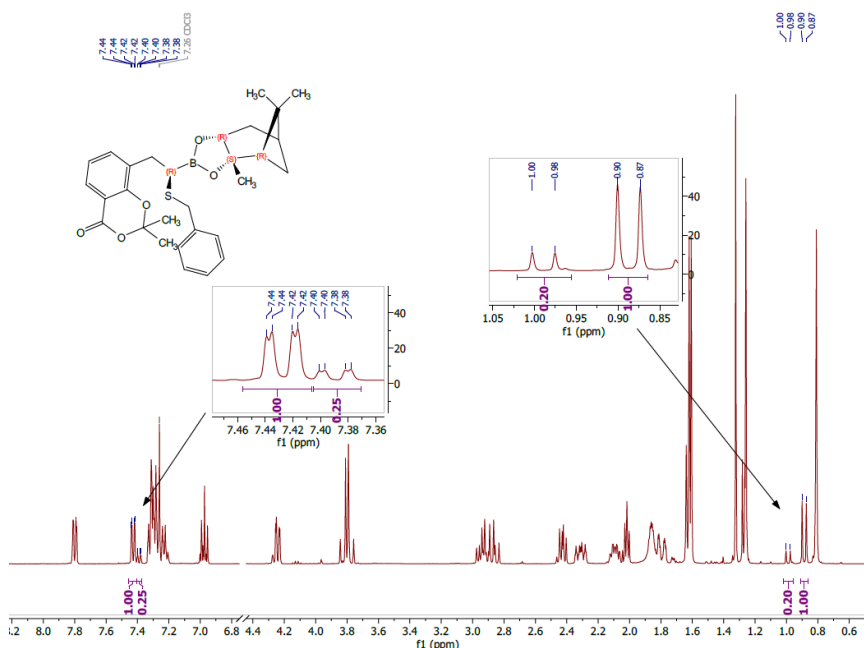
Grūtības šajā stadijā sagādāja produkta **120** attīrīšana – diastereomēri uz tiešās fāzes kolonnas neatdalījās. Virknes pagarināšanas reakcija ne reizi nenotika līdz galam, vismaz 5% izejvielas **119** palika neizreaģējusi, arī tad, ja $n\text{BuLi}$ un DCM pievienoja lielākā pārkumā (2 ekviv.). Ar to varētu skaidrot arī viduvējo iznākumu, jo attīrīt produktu **120** no izejvielas **119** bija sarežģīti.

Savienojuma **120** diastereomēru attiecība aprēķināta pēc aprakstītas metodes [59], nointegrējot ^1H KMR spektrā (2.6. attēls) pināndiola grupas H_{endo} protonu, kas parādījās dubleta veidā pie 1.0-1.2 m.d. ($J=11.0\text{ Hz}$) (pamatprodukts (S)-hlorīds δ 1.05 m.d., mazākumā (R)-hlorīds δ 0.98 m.d.).



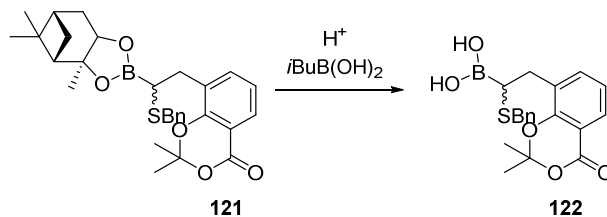
2.6. att. Diastereomēru attiecības noteikšana savienojumam 120 pēc ^1H KMR spektra

Tioēteris **121** ar labu iznākumu tika iegūts nukleofīlās aizvietošanas reakcijā ar benzilmerkaptānu, diastereomēru attiecībā $\sim 25:75$ (*S/R*). Diastereomēru attiecība aprēķināta līdzīgi kā hlorīda **120** gadījumā pēc ^1H KMR spektra (2.7. attēls). Pēc signālu attiecības maiņas, kur tagad signāls pie 0.89 m.d. attiecas uz diastereomēru, kas ir pārākumā, varam secināt, ka $\text{S}_{\text{N}}2$ reakcija, kā tas bija gaidīts, notika ar konfigurācijas apgriešanos.



2.7. att. Diastereomēru attiecības noteikšana savienojumam 121 pēc ^1H KMR spektra

Savienojuma **121** aizsarggrupu hidrolīzi tika plānots veikt skābos apstākļos, nošķeļot abas grupas vienā solī, taču reakcijā skābā vidē, izobutilborskābes klātienē, tika nošķelta tikai pināndiola grupa (2.8. attēls).



2.8. att. Pināndiola grupas hidrolīze

Lai atrastu piemērotus reakcijas apstākļus savienojuma **121** pināndiola grupas hidrolīzei, mēģinājām veikt reakciju ar sālsskābi, trifluoretiķskābi, trifluoretiķskābes un ūdens maisījumu, jonapmaiņas sveķiem, kā arī mainījām šķīdinātājus. Rezultāti apkopoti 2.1. tabulā.

Pināndiola estera hidrolīzi veicām metanolā ar konc. sālsskābes pārākumu, izobutilborskābes klātienē. Veicot reakciju istabas temperatūrā, pēc 21 stundas novērojām aptuveni 60% konversiju, taču šo reakcijas maisījumu sildot 60 °C temperatūrā tika iegūts sarežģīts vielu maisījums, kura ŠH-MS hromatogrammā nevarēja vairs identificēt ne produktu **122**, ne izejvielu **121** (2.1. tabula, 2. rinda). Mēģinājām nepaaugstināt reakcijas temperatūru un borāts **121** augstākminētajos reakcijas apstākļos tika maisīts istabas temperatūrā 2 dienas (2.1. tabula, 1. rinda). Rezultātā pēc ŠH-MS analīzes atkal tika novērots sarežģītu vielu maisījumu, kurā vairs nebija ne produkta, ne izejvielas.

Nomainot šķīdinātāju uz acetonitrilu, reakcijas gaita izskatījās tīrāka. Tādējādi reakcijā ar konc. sālsskābes pārākumu, izobutilborskābes klātienē, istabas temperatūrā pēc 17 stundām tika novērota ~60% konversija (2.1. tabula, 3. rinda). Reakcijas maisījumu karsējot 60 °C temperatūrā, konversiju uzlabot neizdevās (2.1. tabula 4. rinda). Vēl palielinot sālsskābes pārākumu un maisot istabas temperatūrā, joprojām novērota ~60% konversija, taču, pievienojot lielāku izobutilborskābes pārākumu (4 ekviv.) un 4 dienas maisot istabas temperatūrā, tika panākta 70% konversija (2.1. tabula 5. rinda). Pēc tam reakcijas temperatūra bija paaugstināta līdz 40 °C, kā rezultātā pēc ~20 stundām tika panākta 75% konversija (2.1. tabula 6. rinda). Vēl paaugstināt reakcijas temperatūru vairs netika mēģināts, jo bija šaubas par savienojumu stabilitāti.

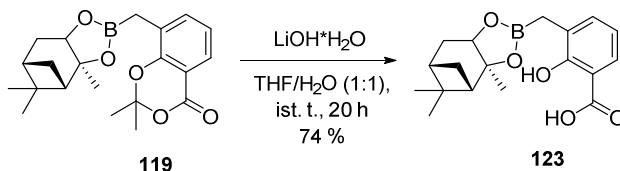
Savienojuma **121** borskābes estera grupas nošķelšanas reakcijas apstākļi

	Skābe	<i>i</i> BuB(OH) ₂ , ekviv.	Šķīdinātājs	T, °C	ŠH-MS analīze
1.	36-38% HCl (pārākums)	1.5	MeOH	ist. t.	Sarežģīts vielu maisījums
2.		1.5		60 °C	Sarežģīts vielu maisījums
3.		1.5	MeCN	ist. t.	~60% konversija
4.		1.5		60 °C	~60% konversija
5.		4		ist. t.	~70% konversija
6.		4		40 °C	~75% konversija
7.	TFA (pārākums)	-	CH ₂ Cl ₂	ist.t	Reakcija nenotiek
8.	TFA (1 ekviv.)	-	THF	70 °C	Sarežģīts vielu maisījums
9.	4M HCl dioksānā (pārākums)	2	dioksāns	ist.t. līdz 50 °C	~70% konversija
10.	75% TFA ūd. šķīd. (pārākums)	-	MeCN	ist.t.	~80% konversija, pēc ietvaicēšanas sarežģīts vielu maisījums
11.	DOWEX 50W _x 4-50	-	MeOH	ist.t.	Reakcija nenotiek

Hidrolīzi mēģinājām veikt ar DOWEX 50W_x4 jonapmaiņas sveķiem, maisot metanolā 3 dienas, taču pēc ŠH-MS analīzes novērota tikai izejvielas klātbūtne (2.1. tabula 11. rinda). Arī ar TFA pārākumu istabas temperatūrā pēc 3 dienām reakcijas maisījumā novērojām tikai izejvielu (2.1. tabula 7. rinda). Savukārt, savienojumu **121** ar TFA karsējot THF 70 °C temperatūrā, ieguvām sarežģītu vielu maisījumu.

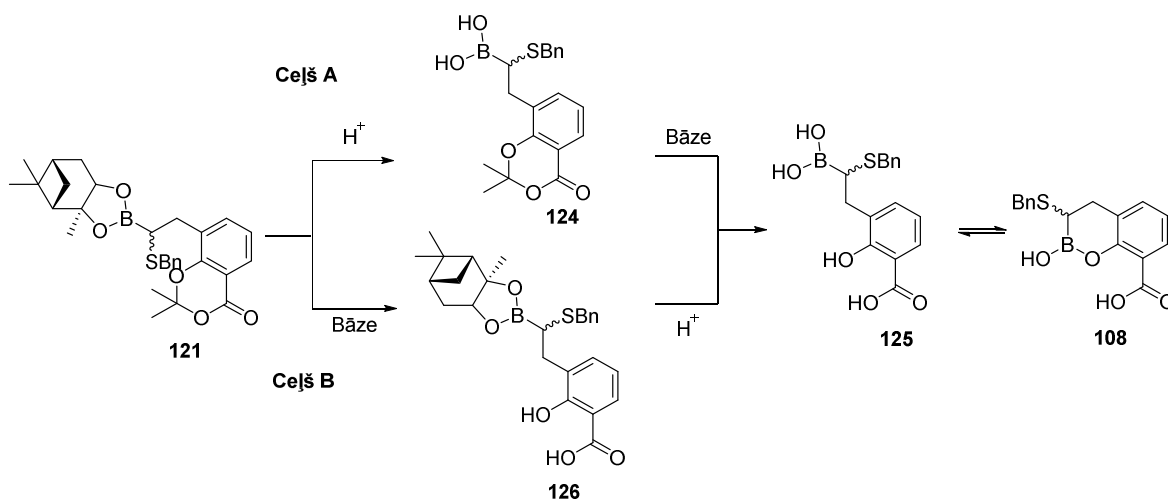
Veicot savienojuma **121** hidrolīzi ar 75% TFA ūd. šķīd. (kopsummā pa porcijām pievienojot 150 ekviv.), izdevās reakciju novest līdz 80% konversijai, taču pēc reakcijas maisījuma ietvaicēšanas produkts sadalījās, tika iegūts sarežģīts vielu maisījums, kurā ar ŠH-MS produktu **122** vairs nevarēja identificēt (2.1. tabula 10. rinda). Līdz ar to tika secināts, ka piemērotākie apstākļi savienojuma **121** pināndiola grupas hidrolīzei bija par skābi izmantojot konc. sālsskābes pārākumu, 4 ekviv. izobutilborskābes klātienē, reakciju karsējot acetonitrilā 40 °C temperatūrā.

Tā kā skābos apstākļos izopropilidēngrupa “nenošķēlās”, tika mēģināts hidrolīzi veikt bāziskos apstākļos. Veicām savienojuma **122** hidrolīzi ar LiOH·H₂O, taču tika iegūts sarežģīts vielu maisījums. Lai saprastu, cik labi izopropilidēngrupa vispār hidrolizēsies bāziskos apstākļos, nolēmām veikt modeļreakciju ar savienojumu **119** (2.9. attēls). Tā, veicot reakciju ar 6 ekvivalentiem LiOH·H₂O tetrahidrofurānā/ūdenī (1:1), izdevās iegūt attiecīgo karbonskābi **123** ar 74% iznākumu.



2.9. att. Boronāta 119 izopropilidēn aizsarggrupas nošķelšana ar bāziskos apstākļos (modeļreakcija)

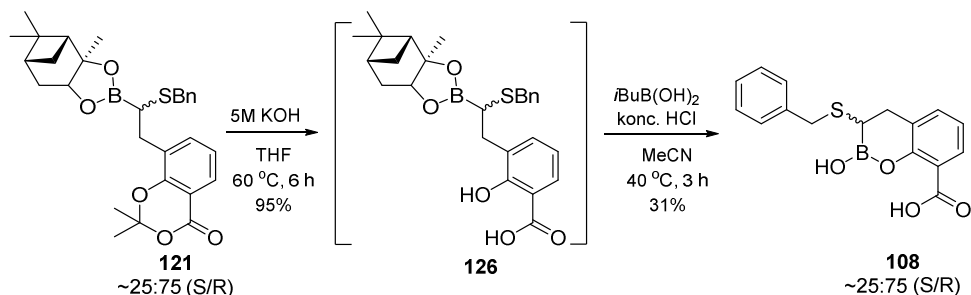
Noskaidrojot, ka ar labu iznākumu izopropilidēn aizsarggrupa hidrolizējas reakcijā ar LiOH monohidrātu, tika secināts, ka ir pieejami divi sintēzes ceļi kā tikt līdz mērķsavienojumam **108**. Ceļš A būtu – no sākuma skābos apstākļos hidrolizēt savienojuma **121** pināndiola esteri no borskābes grupas un pēc tam bāziskos apstākļos hidrolizēt savienojuma **124** izopropilidēngrupu. Savukārt, ceļš B būtu pretējs – no sākuma savienojuma **121** izopropilidēngrupas hidrolīze bāziskā vidē un pēc tam iegūtās karbonskābes **126** pināndiola nošķelšana skābos apstākļos (2.10. attēls).



2.10. att. Aizsarggrupu nošķelšanas ceļi mērķsavienojuma 108 iegūšanai

Sintēzes ceļš A neizrādījās labs variants, jo, pirmkārt, borskābes estera hidrolīze noritēja visai grūti un ar zemiem iznākumiem, otrkārt, savienojuma **124** reakcijā ar LiOH neizdevās identificēt un izolēt mērķsavienojumu **108**. Sekojot sintēzes ceļam B, tika veikta izopropilidēngrupas hidrolīze ar LiOH monohidrātu THF/ūdenī (1:1), kā arī ar 5M KOH

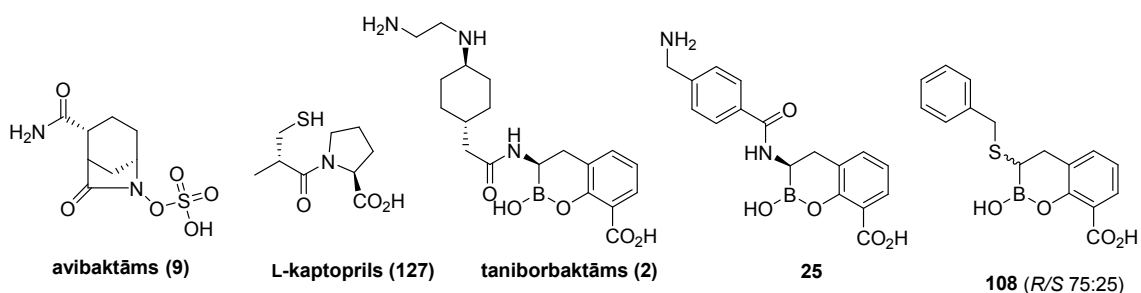
ūdens šķīdumu tetrahidrofurānā. Abos gadījumos hidrolīze noritēja veiksmīgi, taču reakcija 5M KOH notika tīrāk un savienojumu **126** bez attīrīšanas varēja izmantot nākamajā solī, lai tiktu pie mērķsavienojuma **108**.



2.11. att. Mērķsavienojuma **108** iegūšana

Rezultātā, lai iegūtu mērķsavienojumu **108**, piemērotākie aizsarggrupu nošķelšanas apstākļi bija bāziskā acetonīda hidrolīze ar KOH, kuras rezultātā tika iegūta karbonskābe **126** ar 95% iznākumu (2.11. attēls). Tad sekoja borskābes estera hidrolīze skābā vidē ar sālsskābi, izobutylborskābes klātienē, kā rezultātā tika iegūts mērķsavienojums **108** ar 31% uzņēmumu.

Iegūtajam benziltiobenzoksiborīnam **108** tika noteikta inhibitorā aktivitāte uz 10 dažādām β -laktamāzēm, starp kurām bija pārstāvji no visām 4 *Ambler* klasēm. Aktivitātes vērtības attēlotas pIC_{50} vienībās, kas ir IC_{50} molārās koncentrācijas negatīvais logaritms. Kā references savienojumi tika izmantoti avibaktāms (**9**) un L-kaptoprils (**127**). Avibaktāms (**9**) ir klīnikā izmantojamais SBL inhibitors [71], savukārt L-kaptoprils (**127**) ir literatūrā zināms mēreni aktīvs MBL inhibitors [72]. Iegūtie rezultāti salīdzināti arī starp ciklisko boronātu inhibitoru pārstāvjiem – literatūrā aprakstītajiem plaša spektra SBL un MBL inhibitoriem biciklisko boronātu **25** un taniborbaktāmu (**2**) [35,38]. Iegūtie rezultāti apkopoti 2.2. tabulā.



2.12. att. Benziltiobenzoksiborīns **108** un literatūrā aprakstītie β -laktamāžu inhibitori

2.2. tabula

Inhibitorās aktivitātes vērtības pret β -laktamāzēm (pIC_{50}) ^a						
<i>Ambler</i> klase	β -Laktamāze	Avibaktāms	L-Kaptoprils	108 (R/S)	25 [35,36]	2 [37,38]
A	TEM-116	8,1	<3,4	6,7	8,5	6,9
B1	IMP-1	<3,4	5,0	6,9	6,0	5,6
B1	NDM-1	<3,4	5,8	7,4	7,5	8,0

2.2. tabulas turpinājums

Ambler klase	β - Laktamāze	Avibaktāms	L- Kaptoprils	108 (R/S)	25 [35,36]	2 [37,38]
B1	VIM-1	<3,4	5,6	7,1	7,0	8,1
B1	VIM-2	<3,4	6,1	7,2	8,5	9,3
B2	CphA	<2,4	<5,0	6,3	>4	5,6
B3	L1	<4,7	5,6	5,3	n.d. ^b	<5,0
C	AmpC (<i>P. aeruginosa</i>)	6,5	<4,4	7,8	6,9	6,5
D	OXA-10	<4,7	<4,4	5,9	4,5	6,6
D	OXA-10 (+100 mM NaHCO ₃)	<4,7	<4,4	4,1	4,7	6,2
D	OXA-48	6,2	<4,4	8,2	4,6	6,3
D	OXA-48 (+100 mM NaHCO ₃)	6,1	<4,4	8,0	4,8	5,6

^aSavienojumu noteikto aktivitāšu pIC₅₀ vērtību standartnovirzes ir $\pm 0,2$ log kārtas robežās; ^b nav datu

Balstoties uz 2.2. tabulas datiem secināts, ka avibaktāms (**9**) neuzrādīja MBL inhibēšanas aktivitāti un L-kaptoprils (**127**) neuzrādīja SBL inhibēšanas aktivitāti. Savukārt, līdzīgi kā ciklisko boronātu inhibitoru pārstāvji, boronāts **25** un taniborbaktāms (**2**), arī iegūtais benziltiobenzoksaborīns **108** spēja inhibēt visas 10 testētās β -laktamāzes.

Salīdzinot A un C klases SBL inhibēšanas aktivitātes, novērots, ka savienojums **108** un taniborbaktāms (**2**) ir mazāk aktīvi pret A klases TEM-116 enzīmu nekā acilaminoatvasinājums **25** un avibaktāms (**9**). Savukārt, pret C klases AmpC enzīmu aktīvāks izrādījās savienojums **108**.

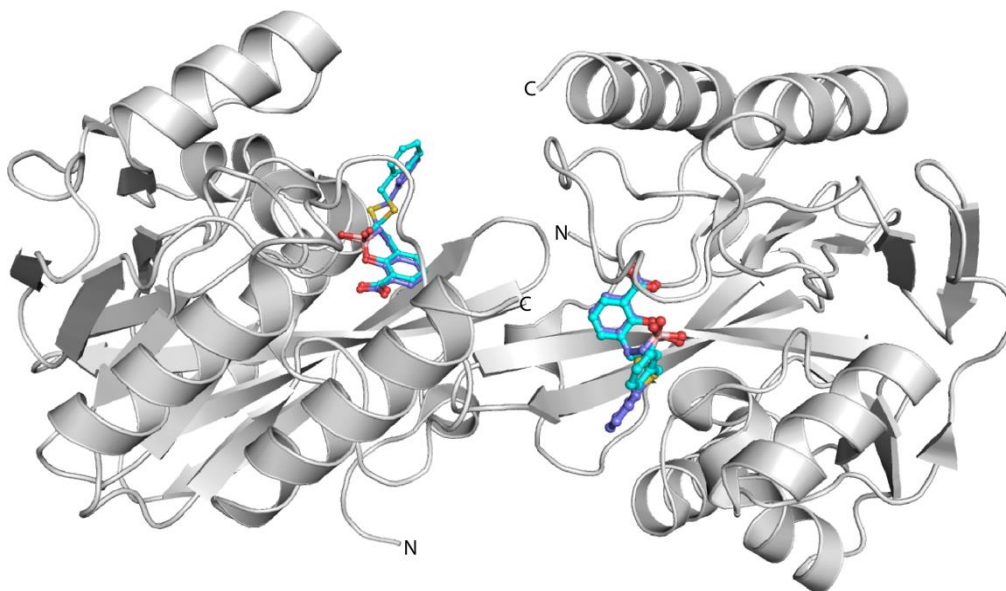
D klases enzīmu katalīzei ir nepieciešams lizīna karbamāts, kurš veidojas reaģējot aktīvā centra lizīnam ar (bi)karbonātu/oglekļa dioksīdu [73,74]. Šī iemesla dēļ OXA enzīmu inhibēšanas aktivitātes noteica gan ar, gan bez pievienota bikarbonāta. Savienojums **108**, tāpat kā bicikliskais boronāts **25** un taniborbaktāms (**2**), neuzrādīja augstu inhibitoro aktivitāti uz OXA-10 enzīmu. Taču savienojuma **108** saistīšanās spēja ar OXA-48 enzīmu izrādījās augstāka nekā savienojumam **25**, taniborbaktāmam (**2**) vai avibaktāmam (**9**). Benziltiobenzoksaborīns **108** uzrādīja nanomolāru inhibēšanas aktivitāti pret OXA-48.

Analizējot B1 klases MBL (NDM-1, VIM-1 un VIM-2) inhibēšanas datus, secināts, ka savienojums **108** izrādījās aktīvāks nekā L-kaptoprils (**127**). Aptuveni līdzīgu savienojuma **108** aktivitāti kā boronātam **25** novērots pret NDM-1 un VIM-1 enzīmiem, taču uz VIM-2 enzīmu savienojums **108** izrādījās mazāk aktīvs. Šīs aktivitātes atšķirības visticamāk atspoguļo MBL aktīvo centru dažādību [75]. Arī savienojuma **108** paaugstinātais iedarbīgums

pret B3 klases MBL L1 un mono-cinka B2 klases MBL (CphA) ir nozīmīgs, jo tas norāda, ka tālākie struktūras–aktivitātes likumsakarību pētījumi visdrīzāk paplašinās potenciāli iedarbīgu biciklisko boronātu inhibitoru klāstu pret visām 3 MBL apakšklasēm.

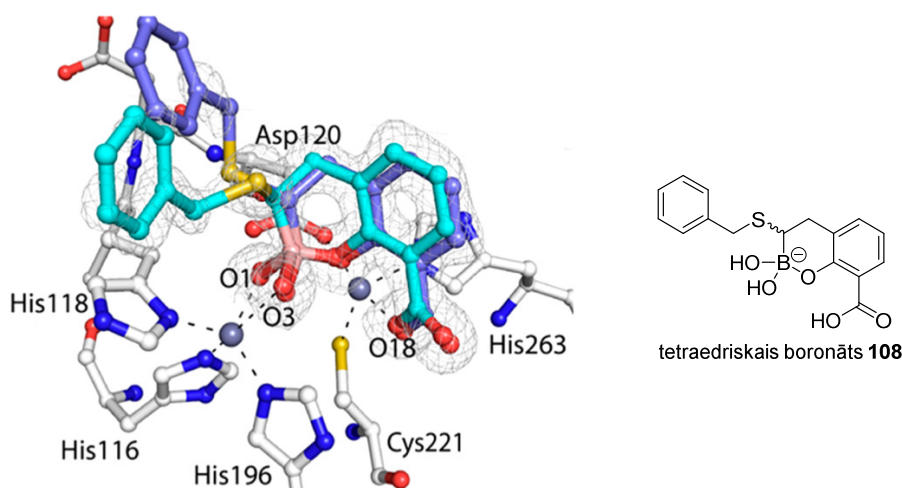
Lai izpētītu cikliskā boronāta **108** β -laktamāžu saistības veidu, tika iegūtas savienojuma **108** kompleksu kristālstruktūras ar SBL AmpC (no *Escherichia coli*) un MBL VIM-2.

Metāl- β -laktamāzes VIM-2 un **108** kompleksa asimetriskajā vienībā ir 2 proteīna molekulas (A un B ķēde) un abu savienojuma **108** (*R*)- un (*S*)- enantiomēru elektronu blīvums bija saskatāms abās ķēdēs (enantiomēru *S/R* attiecība 1:1, 2.13 attēlā ciānkrāsas un violeta struktūra attiecīgi). Savienojums **108** bija iegūts kā enantiomēru maisījums, kurā (*R*)-enantiomērs bija pārkumā (nosakot pēc starpsavienojumu KMR spektriem, attiecībā 25:75 (*S/R*)), tādējādi pēc kristalogrāfijas rezultātiem varētu spriest, ka (*S*)-enantiomēra saistīšanās varētu būt privilēģēta, taču, lai apstiprinātu šo pieņēmumu, ir nepieciešami tālāki pētījumi.



2.13. att. VIM-2 un benziltiobenzoksiborīna **108** kompleksa kristālstruktūra. PDB kods: 6RPN

Savienojuma **108** elektronu blīvums VIM-2 abās proteīnu A un B ķēdēs skaidri norādīja uz tetraedrisko bicikliskā boronāta klātbūtni (2.14. attēls). Galvenie saistīšanās veidi bicikliskā boronāta ciklā un ar karboksilāta skābekļiem ir ļoti līdzīgi tiem, kas raksturoti savienojumam **25** ar VIM-2 [35] un citām MBL. Šis novērojums ir pierādījums par labu pieņēmumu, ka bicikliskās borskābes un boronāti varētu būt pielietojami β -laktāma ciklu saturošu β -laktamāžu substrātu (to sp^2 formā) un ar enzīmu saistīto tetraedrisko starpsavienojumu (to sp^3 formā) imitēšanai.

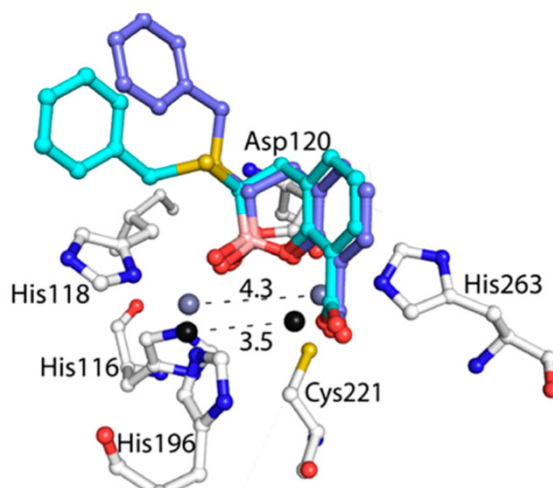


2.14. att. Benziltiobenzoksiborīna **108** VIM-2 MBL inhibēšana. PDB kods: 6RPN

Viens no savienojuma **108** karboksilāta skābekļa atomiem ir novietots tā, lai koordinētos ar cinku VIM-2 aktīvajā centrā, tāpat ar cinku koordinējas arī boronāta cikla “endocikliskais” skābeklis. “Eksocikliskie” ar boru saistītie hidroksilgrupu skābekļi (2.14. attēls, O3 un O1) koordinējas ar otru cinku VIM-2 aktīvajā centrā, tādā veidā imitējot saistīšanos ar diviem skābekļiem oksianjona starpsavienojumā, kurš veidojas β -laktāma hidrolīzes procesā.

Tika novērota cinka jonu atrašanās vietas maiņa aktīvajā centrā salīdzinot ar to novietojumu VIM-2 miera stāvokļa struktūrā, tādējādi Zn-Zn attālumam palielinoties no $\sim 3,5$ Å uz $4,3$ Å (2.15. attēls, kur cinka joni miera stāvoklī attēloti melnā krāsā, bet kompleksā ar savienojumu **108** pelēkā krāsā). Šis novērojums sakrīt ar citiem kristalogrāfiskajiem pētījumiem, kas norāda uz to, ka metāla jonu kustība var notikt MBL vai citu metaloenzīmu inhibēšanas vai katalīzes procesā [72].

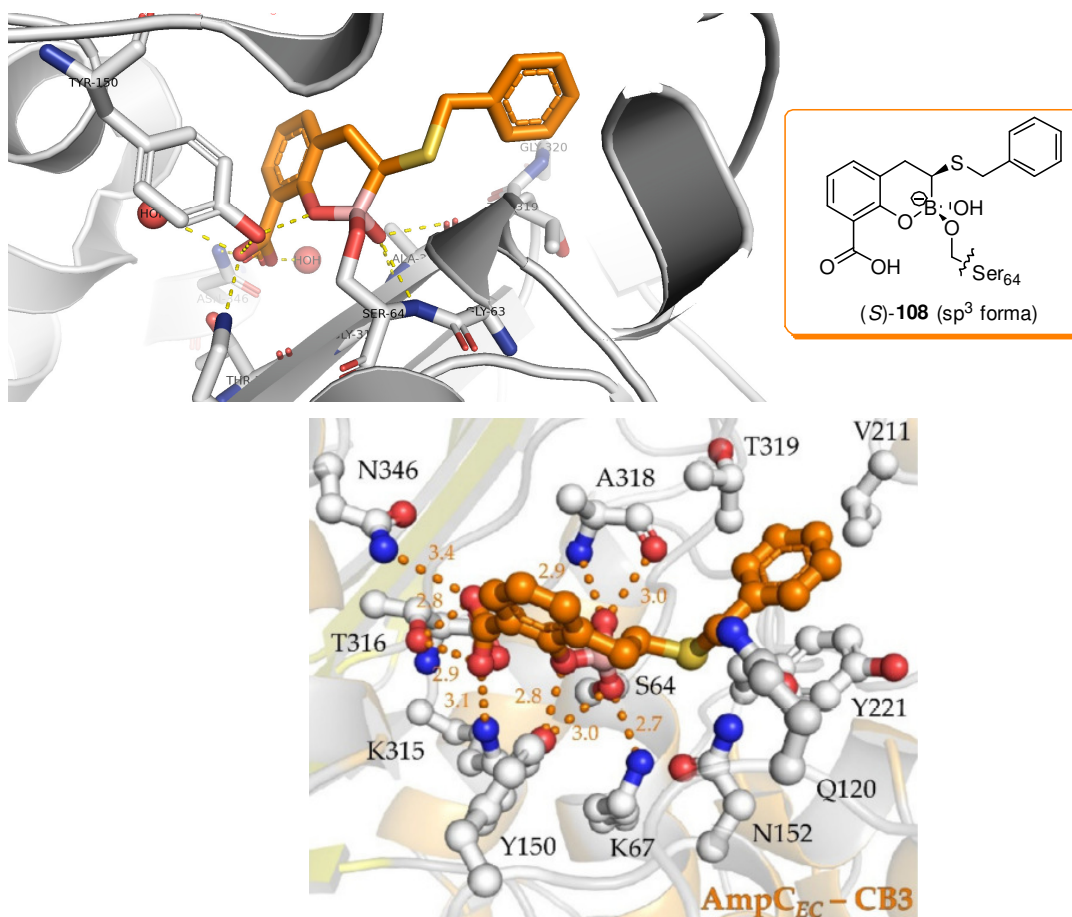
Salīdzinot ar iepriekš ziņoto savienojuma **25** un VIM-2 kompleksa struktūru [35,76], kopumā boronātu **108** un **25** pamata struktūru saistīšanās pozīcijas ir ļoti līdzīgas. Līdz ar to, tāpat kā boronātam **25** un citiem līdzīgiem savienojumiem, savienojuma **108** benzoksaborinīna cikls ir izvietots analogi cefalosporīna ciklam (vai analogi penicilīnu vai karbapenēmu β -laktāmu kondensētiem cikliem) VIM-2 aktīvajā centrā. Tas nozīmē, ka bicikliskajiem boronātiem kopumā ir līdzīga saistīšanās aktīvajā centrā kā ar cefalosporīnu un citu β -laktāmu substrātiem.



2.15. att. Cinka-cinka attālumu izmaiņas VIM-2 MBL miera stāvoklī (PDB kods 4BZ3) un kompleksā ar savienojumu **108** (PDB kods: 6RPN).

Savienojuma **108** tioētera sānu ķēde VIM-2 aktīvajā centrā izkārtojas līdzīgā virzienā kā acilamino ķēde cefalosporīna (un tā atvasinājumu) vai boronāta **25** kompleksā ar VIM-2 [36,38,76]. Tomēr savienojuma **108** tioētera sānu ķēde neveido ūdeņraža saites ar proteīna pamata NH- grupu Asp119 molekulā, kā tas novērots substrātiem un inhibitoriem ar acilamino (piemēram, boronāts **25**, penicilīni, cefalosporīni) vai hidroksietil (karbapenēmi) sānu ķēdēm. Šī saistīšanās atšķirība varētu daļēji izskaidrot inhibēšanas spējas atšķirības savienojumiem **108**, **25** un taniborbaktāmam (**2**). Kaut arī jāpiebilst, ka šī mijiedarbība, iespējams, nav tik būtiska spējai inhibēt atsevišķas β -laktamāzes, piemēram, AmpC (*P. aeruginosa*) un OXA-48, kur tioētera atvasinājums **108** bija aktīvāks par acilaminoatvasinājumu **25** un taniborbaktāmu (**2**). Tomēr, ņemot vērā, ka kopumā savienojuma **108** aktivitāte ir zemāka salīdzinājumā ar biciklisko boronātu **25**, iespējams, ka šī ūdeņražu saišu veidošana varētu sekmēt saistīšanos ar enzīmu.

Analizējot **108** elektronu blīvuma izvietojumu AmpC_{EC} proteīna A ķēdes aktīvajā centrā, var secināt, ka bicikliskais boronāts **108** ar aktīvā centra nukleofīlo serīna hidroksilgrupu izveidoja tetraedrisko savienojumu ar sp^3 hibridizētu boru (2.16 attēls), līdzīgi kā tas tika novērots ar citām biciklisko boronātu un SBL kompleksu struktūrām [35,36,38,76–78]. Lai arī boronāts **108** tika iegūts kā enantiomēru maisījums ar (*R*)-enantiomēru pārkumā, tomēr AmpC_{EC} aktīvajā centrā tika novērota tikai (*S*)- enantiomēra klātbūtne.



2.16. att. AmpC_{EC} un benziltiobenzoksiborīna **108** kompleksa kristālstruktūra. PDB kods: 6YPD

Bicikliskā boronāta **108** karboksilgrupai AmpC_{EC} aktīvajā centrā tika novērota mijiedarbība ar lizīna-315, treonīna-316 un asparģīna-346 aminoskābju atlikumiem. Savukārt pie bora esošai hidroksilgrupai tika novērota ūdeņraža saišu veidošanās ar alanīna-318 NH-grupu un skābekli. Benziltioētera grupa aktīvajā centrā novietota tā, lai veidotu π -saišu sistēmu mijiedarbību ar tirozīnu-221 un hidrofobas mijiedarbības ar valīna-211 un treonīna-319 sānu ķēdēm. Šīs hidrofobās mijiedarbības varētu skaidrot boronāta **108** augsto aktivitāti pret AmpC un, iespējams, citām C klases SBL.

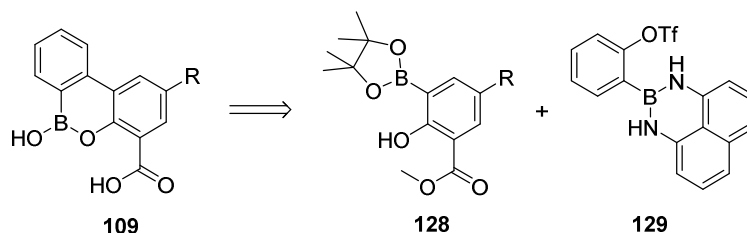
Nozīmīgi ir tas, ka savienojums **108** inhibē virkni MBL, kas nostiprina pieņēmumu, ka bicikliskie boronāti ir potenciāli plaša spektra SBL un MBL inhibitori.

Ņemot vērā kristalogrāfijas rezultātus, var secināt, ka iegūtais benzoksaborīna tioētera atvasinājums **108** izrādījās diezgan daudzsoļš sākums turpmākām plaša spektra SBL un MBL inhibitoru optimizācijām. Selektīvā (AmpC_{EC} gadījumā) un privilēģētā (VIM-2 gadījumā) (*S*)-enantiomēra saistīšanās enzīma aktīvajā centrā norāda uz stereoselektīvas (*S*)-**108** sintēzes nepieciešamību, kas varētu uzlabot inhibēšanas rezultātus. Lai arī iegūtais boronāts **108** izrādījās aktīvs atsevišķu β -laktamāžu inhibitors, tomēr diemžēl tas neuzrādīja labus rezultātus šūnās (mikrobioloģiskajos testos). Tādēļ varētu būt nepieciešams modificēt

tioētera sānu ķēdi, pievienojot tajā aminogrupu, lai uzlabotu savienojuma iespīšanās spēju šūnās.

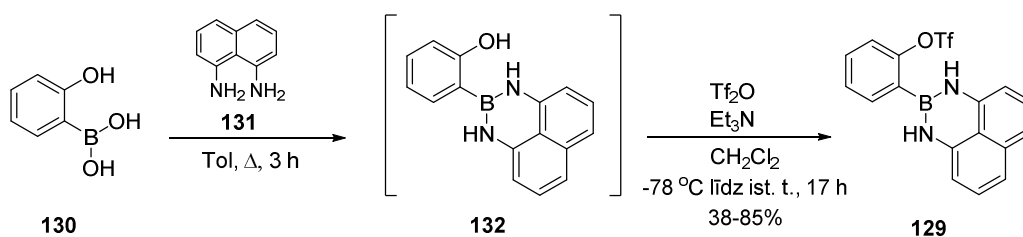
2.2. Triciklisko benzoksaborīnu sintēze un to MBL inhibitorā aktivitāte

Par triciklisko borskābju **109** sintēzes pamatu tika ņemta literatūrā aprakstītā metode ar *Suzuki* sametināšanas reakciju (2.17. attēls) [54]. Līdz ar to no sākuma bija nepieciešams sintezēt būvblokus **128** un **129**.



2.17. att. Retrosintētiskā shēma ciklisko borskābju **109** iegūšanai

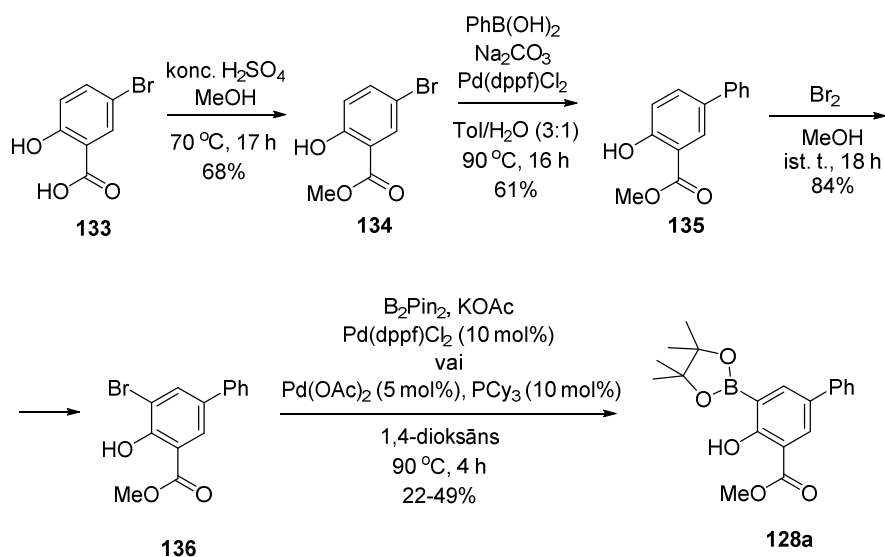
Būvbloka **129** sintēze tika veikta sākot ar *o*-hidroksifenilborskābi (**130**) [54], kur no sākuma borskābes grupa tika aizsargāta ar 1,8-diaminonaftalīnu (**131**) (2.18. attēls) un pēc tam fenola grupa pārvērsta par triflātu reakcijā ar triluormetānsulfonskābes anhidrīdu, trietilamīna klātienē. Rezultātā tika iegūts būvbloks **129** ar 38% iznākumu divu soļu reakcijā (rēķinot iznākumu no **130**).



2.18. att. Būvbloka **129** sintēze

Tā kā nevarējām izskaidrot zemos reakcijas iznākumus, vēlāk pieļāvām iespēju, ka būvbloka **129** sintēzes procesā veidojās gaismas jutīgi blakusprodukti, kas samazināja reakcijas iznākumu. Par to liecināja dažādi faktori, pirmkārt, tas, ka pats 1,8-diaminonaftalīns (**131**) ir gaismas jutīgs, līdz ar to pastāv iespēja, ka tā atvasinājumi arī tādi varētu būt. Otrkārt, pamanījām, ka pēc kāda laika uz PSH plāksnes punkti iekrāsojās violetā un zilā krāsā, lai gan analizējot reakcijas maisījumu, punkti bija redzami tikai UV starojumā. Un, treškārt, pēc attīrīšanas ar kolonnu hromatogrāfiju uz tiešās fāzes, silikagels kolonnā ar laiku krāsojās zilgans, taču noņemot kolonnu nost no stiprinājumiem, var redzēt, ka stiprinājuma vietās, kur

gaisma netika klāt, silikagels nebija iekrāsojies. Līdz ar to nākamreiz veicot būvbloka **129** sintēzi, pēc iespējas tika mazināta gaismas piekļuve reakcijas maisījumam (izslēgta gaisma, kolbas un kolonna notītas ar foliju). Rezultātā izdevās uzlabot reakcijas iznākumu līdz 85% divu soļu reakcijā (rēķinot iznākumu **130**).

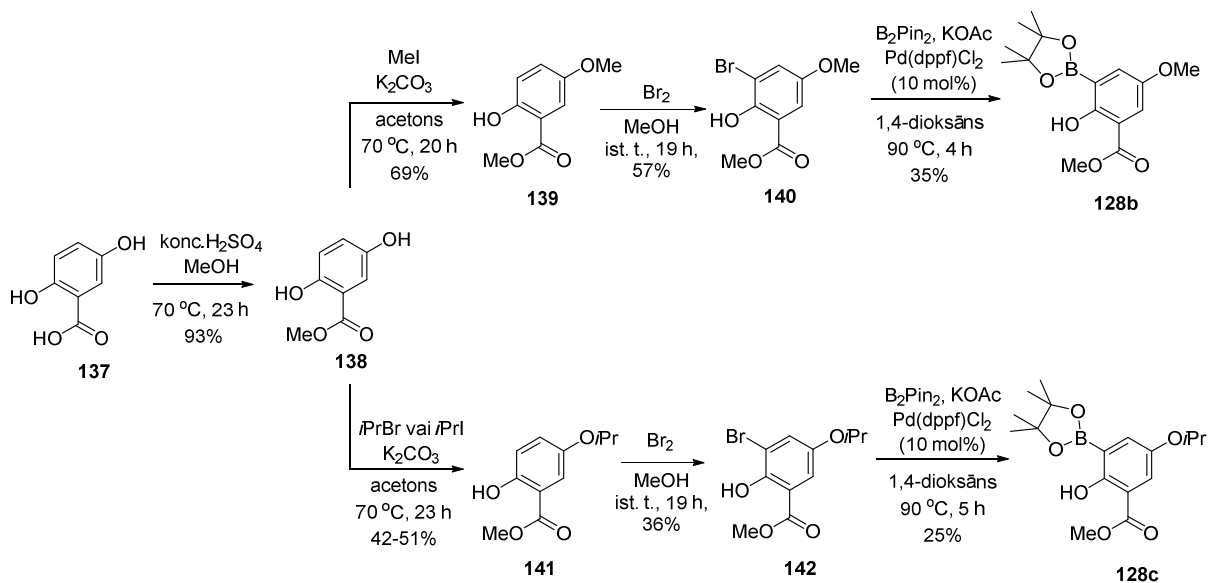


2.19. att. Būvbloka **128a** sintēze

Būvbloks **128a** tika iegūts 4 stadiju sintēzē no komerciāli pieejamās 5-bromsalicilskābes (**133**) (2.19. attēls). Sintēzes shēma tika iesākta ar esterificēšanas reakciju, 5-bromsalicilskābi (**133**) vārot metanolā koncentrētas sērskābes klātienē [79]. No iegūtā metilestera **134** *Suzuki-Miyaura* šķērssametnāšanas reakcijā ar fenilborskābi, Na_2CO_3 un 5 mol% $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ klātienē [80], iegūts savienojums **135**, kurš bromēšanas reakcijas rezultātā tika pārvērsts par attiecīgo 3-bromatvasinājumu **136** [81].

Bromīda **136** *Miyaura* borilēšanas reakcija sākotnēji veikta sausā 1,4-dioksānā ar bis(pinakol)diborānu, $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ katalizatora klātienē, par bāzi izmantojot KOAc, kā rezultātā, pēc GH-MS datiem, tika iegūts produkta **128a** un dehalogenētā produkta **135** maisījums. Lai gan pēc plānslāņa hromatogrāfijas un GH-MS varēja redzēt, ka reakcija ir notikusi un ir redzams produkts **128a**, radās grūtības to attīrīt. Veicot attīrīšanu ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfiju, uz plānslāņa hromatogrāfijas plāksnes izskatījās, ka produkts eluējas un ir izdalāms. Tomēr veicot hromatogrāfiju uz kolonnas ar šķīdinātāju sistēmu $\text{P}\bar{\text{E}}/\text{EtOAc}$, produktu iegūt neizdevās. Nomainot šķīdinātāju sistēmu uz $\text{P}\bar{\text{E}}/\text{acetons}$, tomēr izdevās iegūt produktu, bet ar bis(pinkol)diborāna piemaisījumu, kuru bija iespējams atdalīt mazgājot ar petrolēteri. Rezultātā tika iegūts produkts **128a** ar 22% iznākumu. Nomainot katalizatoru uz $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ar PCy_3 kā ligandu, reakcijas maisījumu analizējot ar GH-MS, izskatījās, ka reakcija notiek tūrāk, radās mazāk dehalogenētā blakusprodukta **135** un izdevās uzlabot

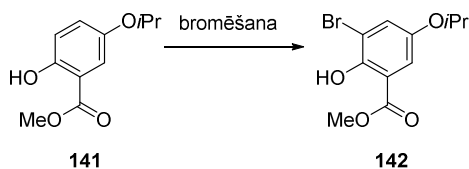
reakcijas iznākumu līdz 49%. Produkta **128a** zudums un līdz ar to salīdzinoši zems iznākums varētu būt skaidrojams ar attīrīšanas stadiju. Iespējams iegūtais pinakolāts **128a** daļēji palika uz kolonnas un neizskalojās.



2.20. att. Būvbloku **128b,c** sintēze

Būvbloki **128b** un **128c** sākotnēji tika sintezēti no komerciāli pieejamās 5-hidroksisalicilskābes (**137**), kuru esterificējām par metilesteri **138** (2.20. attēls). Tālāk veikta *O*-alkilēšana ar alkilhalogenīdu (metiljodīdu vai izopropilbromīdu) K_2CO_3 klātienē [82]. Reakcijas gaitā tika iegūti vēlamie 5-vietā monoalkilētie produkti **139** un **141**. Izopropoksiatvasinājuma **141** gadījumā, mēģinot uzlabot iznākumu, nomainījām alkilējošo reaģentu pret izopropiljodīdu, kā rezultātā reakcijas iznākums pieauga no 42% uz 51%.

Veicot metoksi atvasinājuma **138** bromēšanu pēc elektrofīlās aromātiskās aizvietošanas reakcijas mehānisma ar Br_2 , iegūts vēlamais bromīds **140** ar 57% iznākumu. Pateicoties hidroksilgrupas *orto*-pozīcijas aktivējošai un metilestera *orto*- un *para*-pozīciju deaktivējošām īpašībām, bromēšana notika selektīvi 3-vietā. Taču bromējot izopropoksiatvasinājumu **141** tajos pašos apstākļos, produkta **142** iznākums nepārsniedza 36%. Savienojuma **141** reakcijā metanolā ar Br_2 , pārākumā veidojās 5-metoksiatvasinājums **140**. Tas varētu būt skaidrojams ar to, ka bromēšanas reakcijā izveidojusies bromūdeņražskābe (HBr) nošķēla izopropilgrupu. Savukārt reakcijas maisījumā izveidojies metilbromīds, kas varēja rasties metanola reakcijā ar HBr , alkilējot iegūto fenolu, pārvērta to par metoksiatvasinājumu **140**.



2.21. att. Savienojuma **141** bromēšanas reakcija

2.3. tabula

Bromēšanas reakcijas apstākļu pētījums

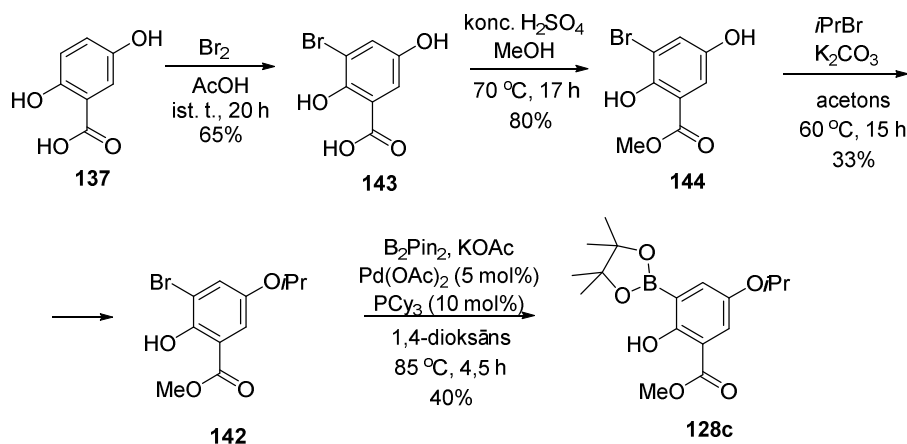
	Bromējošais reaģents	Šķīdinātājs	Rezultāti (ŠH-MS)
1.	Br ₂	MeOH	Produkts 142 /blakusprodukts 140 ~33:66
2.	Br ₂	<i>i</i> PrOH	Izejviela
3.	Br ₂	<i>t</i> BuOH	Vielu maisījums, produkta nav
4.	Br ₂	AcOH	Sarežģīts vielu maisījums, produkta nav
5.	Br ₂	DCM	Vielu maisījums, produkta nav
6.	PyHBr ₃	AcOH	Sarežģīts vielu maisījums
7.	DBDMH	CHCl ₃	Vielu maisījums, grūti attīrīt

Lai izvairītos no šādas blakusprodukta veidošanās, tika mēģināts reakciju veikt izopropanolā, taču diemžēl izopropanols ar Br₂ noreāģēja vēl pirms pievienošanas reakcijas maisījumam. Tad bromēšanas reakciju mēģinājām veikt metilēnhlorīdā, *tert*-butanolā un etiķskābē (2.3. tabula), taču diemžēl vēlamo produktu **142** iegūt neizdevās. Reakcijā ar PyHBr₃ ieguvām sarežģītu reakcijas maisījumu. Literatūrā aprakstīta metode, kurā ar DBDMH (1,3-dibrom-5,5-dimetilhidantoīnu) selektīvi bromē fenolus un polifenolus *orto*-pozīcijā [83]. Veicot reakciju ar substrātu **141** pēc aprakstītās metodes, ieguvām izejvielas **141** un produkta **142** maisījumu (~1:1). Pievienojot papildus ekvivalentu DBDMH izdevās reakciju novest līdz pilnai konversijai, bet rezultātā tika iegūts vismaz 3 produktu maisījums, kur vēlamais produkts **140** bija aptuveni 43%. Veicot kolonnu hromatogrāfiju produktu **142** neizdevās attīrīt no blakusproduktiem. Reakcija ar NBS šim substrātam **141** netika veikta, jo metoksiatvasinājuma **139** testa reakcijā ar NBS, karsējot 75 °C temperatūrā [84], tika iegūts sarežģīts produktu maisījums, no kura vēlamais bromīds **140** bija izdalīts tikai ar 9% iznākumu. Līdz ar to šajā sintēzes stadijā mēs neatradām piemērotākus reakcijas apstākļus bromīda **142** iegūšanai.

Iegūto bromīdu **140** un **142** *Miyaura* borilēšanas reakcijas sākotnēji veiktas sausā 1,4-dioksānā ar bis(pinakol)diborānu, Pd(dppf)Cl₂ kā katalizatoru, par bāzi izmantojot KOAc, kā rezultātā iegūti pinakolāti **128b** un **128c** attiecīgi ar 35% un 25% iznākumu.

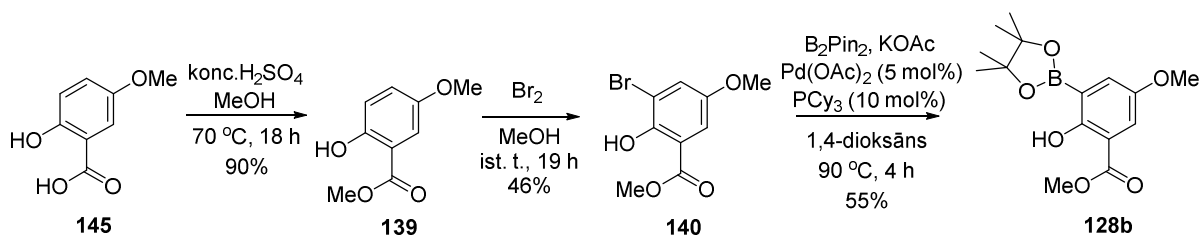
Būvbloka **128c** augstākminētajā sintēzes ceļā (2.20. attēls) reakcijas iznākumi bromēšanas stadijā bija zemi un neparedzami, tāpēc mēģinājām atrast alternatīvu sintēzes

metodi. Tika mēģināts veikt bromēšanu pirms izopropilgrupas ievadīšanas molekulā (2.22. attēls). No komerciāli pieejamās 5-hidroksisalicilskābes (**137**) reakcijā ar Br₂ etiķskābē [85] ieguvām bromīdu **143**, kuru tālāk reakcijā ar metanolu sērskābes klātienē pārvērtām par metilesteri **144** ar labu iznākumu (80%).



2.22. att. Būvbloka 128c alternatīvā sintēze

Veicot šajā stadijā O-alkilēšanu ar izopropilbromīdu K₂CO₃ klātienē, monoalkilētais produkts **142** tika iegūts ar 33% iznākumu. Šāds iznākums skaidrojams ar to, ka, sekojot reakcijas gaitai ar ŠH-MS, reakciju nevarēja novest līdz pilnai konversijai. Ar 1,1 ekvīv. *i*PrI pēc 16 stundām 50 °C temperatūrā reakcijas maisījumā vēl bija atlikuši ~35% neizreaģējušas izejvielas **144**, taču pievienojot papildus 0,3 ekvīv. *i*PrI, analizējot ar ŠH-MS, novērojām di-alkilēta produkta pīķa palielināšanos un mono-alkilētā produkta pīķa samazināšanos. Tādēļ turpmāk šī alkilēšanas reakcija tika veikta ar 1,1 ekvīv *i*PrI un vēlāk atgūstot neizreaģējušo izejvielu **144** pēc attīrīšanas ar kolonnas hromatogrāfiju. Veicot *Miyaura* borilēšanas reakciju par katalizatoru izmantojot Pd(OAc)₂ ar PCy₃ kā ligandu, sausā 1,4-dioksānā, tika iegūts būvbloks **128c** ar 40% iznākumu.

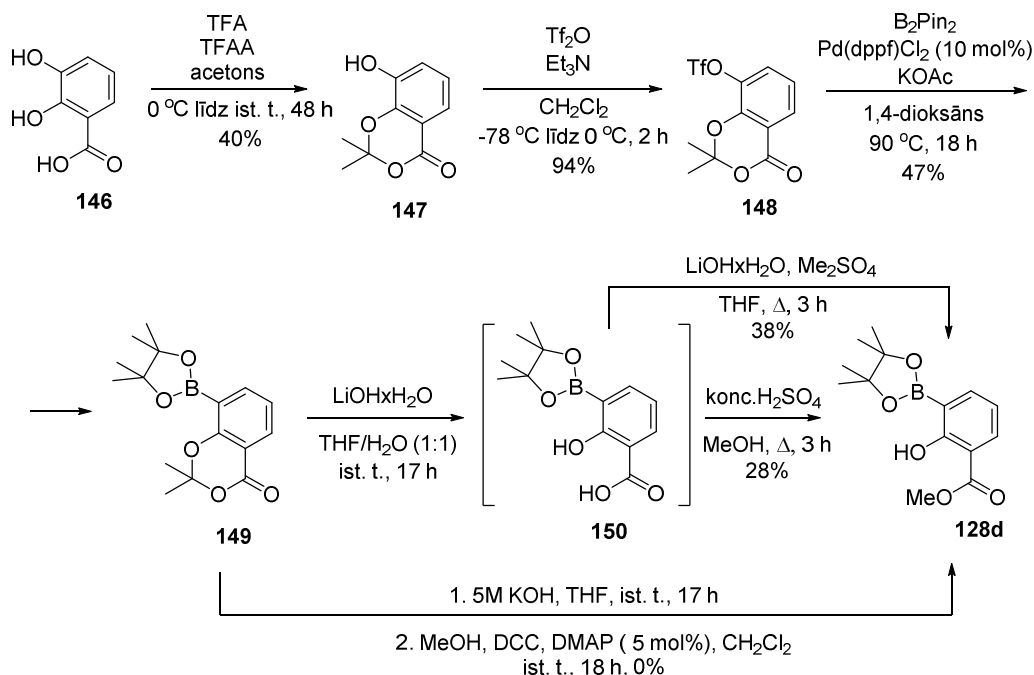


2.23. att. Būvbloka 128b alternatīvā sintēze

Sākot būvbloka **128b** sintēzi no komerciāli pieejamās 5-metoksisalicilskābes (**145**), kas cenas ziņā daudz neatšķiras no 5-hidroksisalicilskābes (**137**), izdevās saīsināt sintēzes ceļu par 1 stadiju (2.23. attēls). Kā arī *Miyaura* borilēšanas reakciju veicot sausā 1,4-dioksānā, par katalizatoru izmantojot Pd(OAc)₂ ar PCy₃ kā ligandu, pinakolāts **128b** tika iegūts ar 55%

iznākumu. Rezultātā kopējais iznākums 3 stadiju sintēzē bija 22% iepriekšējo 11% vietā, 4 stadiju sintēzes ceļā.

Lai iegūtu 5-vietā neaizvietotu būvbloku **128d** tika veikta sintēze, izmantojot 2.24. attēlā redzamo sintēzes shēmu. Komerciāli pieejamo 2,3-dihidroksibenzoskābi (**146**) aizsargājām ar izopropilidēngrupu, lai selektīvi 3-vietā varētu ieviest trifluorometānsulfonilgrupu, kā rezultātā vēlamais triflāts **148** tika iegūts ar labu iznākumu (94%). *Miyaura* borilēšanas reakcijā iegūts pinakolāts **149**, kuram tālāk bija nepieciešams nošķelt izopropilidēngrupu un iegūto benzoskābi pārvērst par metilesteri **128d**.

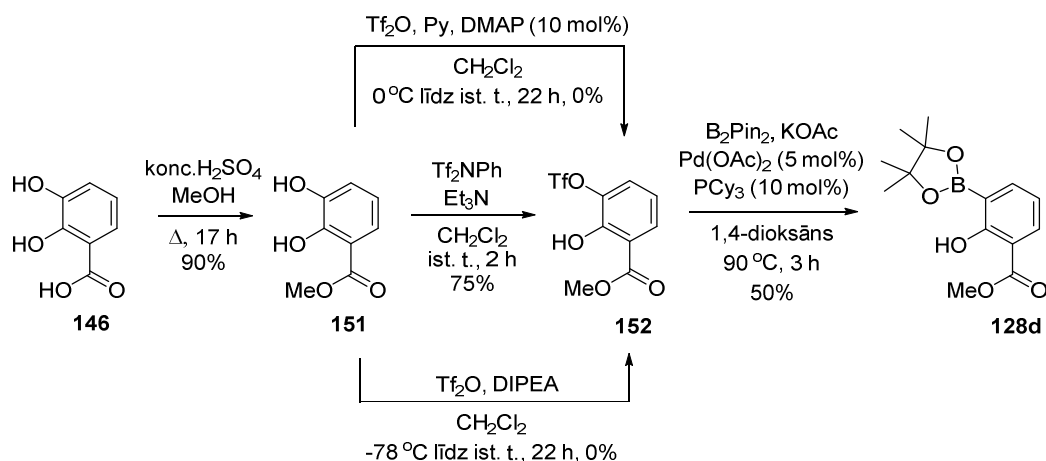


2.24. att. Būvbloka **128d** sintēze

Izopropilidēngrupa labi hidrolizējas reakcijā gan ar LiOH·H₂O, gan 5M KOH ūd. šķīdumu, kā rezultātā pēc ŠH-MS analīzes novērojām savienojuma **149** pilnu konversiju par benzoskābi **150**. Tomēr benzoskābes **150** esterificēšanas solis sagādāja grūtības. Veicot benzoskābes **150** reakciju ar metanolu sērskābes klātienē, vēlamo metilesteri **128d** izdevās iegūt ar 28% iznākumu, taču atkārtot šo reakciju neizdevās. Šajos reakcijas apstākļos hidrolizējās arī borskābes pinakolesteris un metanola klātienē notika pāresterificēšanās, kā rezultātā atkārtojot šo reakciju ieguvām borskābes metilesteri kā galveno produktu un tikai pēdas no vēlamā produkta **128d**. Lai izvairītos no šīs blakusreakcijas, veicām esterificēšanas reakciju bāziskā vidē ar dimetilsulfātu [86], vārot 3 stundas tetrahidrofurānā. Taču arī šajos reakcijas apstākļos iznākums bija zems (38%). Mēģinājām izmantot *Steglich* esterificēšanas reakciju [87], kur esterificēšanu veicām ar DCC, DMAP izmantojot kā katalizatoru. Sekojot

reakcijas gaitai ar ŠH-MS novērojām produkta veidošanos, taču diemžēl izdalīt tīru produktu **128d** neizdevās.

Triflāts **152** ir literatūrā zināms savienojums [88], kas sintezēts no 2,3-dihidroksibenzoskābes (**146**), to sākotnēji esterificējot ar metanolu sērskābes klātienē. No estera **151** reakcijā ar trifluorometānsulfonskābes anhidrīdu, piridīna un katalītiska daudzuma DMAP klātienē, iegūts triflāts **152** ar 37% līdz 76% iznākumu [88–90].

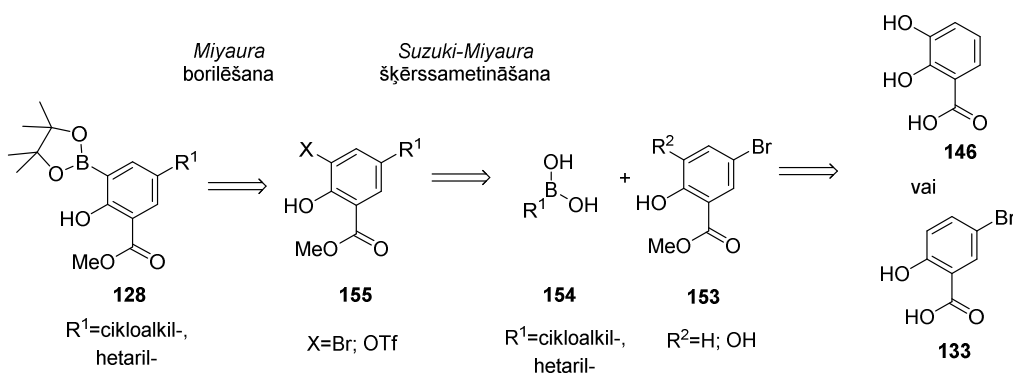


2.25. att. Būvbloka **127d** alternatīva sintēze

Mēģinājām atkārtot literatūrā aprakstīto sintēzes metodi (2.25. attēls), taču selektīvi aizvietot 3-hidroksigrupu pret 3-trifluorometānsulfonylgrupu neizdevās. Tika mēģināts veikt savienojuma **151** reakciju ar trifluorometānsulfonskābes anhidrīdu DIPEA klātienē, taču arī neizdevās selektīvi ieviest triflātu 3-pozīcijā. Reakcija notika pa abām hidroksilgrupām.

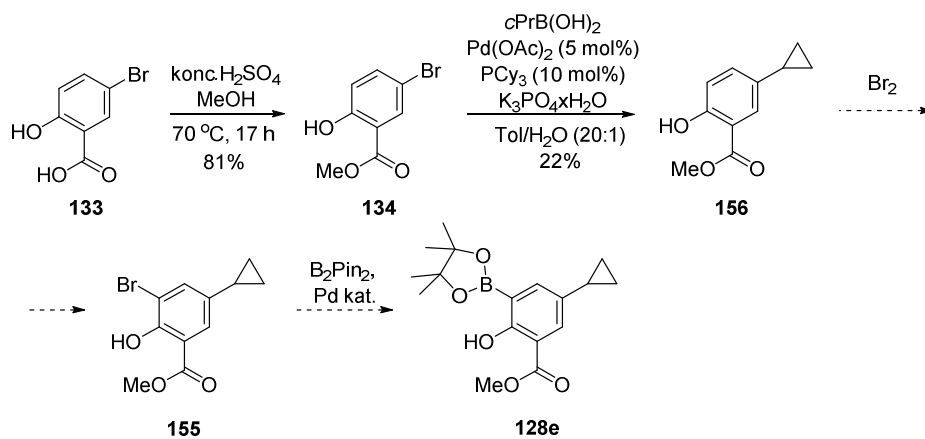
N-Feniltrifluorometānsulfonimīds literatūrā [91] aprakstīts kā maigs triflējošais reaģents, tādēļ tika nolemts to izmantot reakcijā ar substrātu **151**. Reakcijā ar Tf_2NPh , par bāzi izmantojot trietilamīnu, izdevās selektīvi nomainīt savienojuma **151** 3-hidroksilgrupu pret trifluorometānsulfonylgrupu. Selektivitāti trifluorometānsulfonylēšani pa 3-pozīciju varētu skaidrot ar to, ka tā ir mazāk stēriski traucēta nekā 2-hidroksilgrupa, līdz ar to reakcija notiek pa vieglāk pieejamo pozīciju. Rezultātā ieguvām triflātu **152** ar 75% iznākumu (2.25. attēls). Tālāk *Miyaura* borilēšanas reakcijā ieguvām vēlamo būvbloku **128d** ar vidēju iznākumu (50%).

Tālāk mēģinājām 5-vietā ievadīt alkil un hetaril atvasinājumus. To realizēt tika plānots pēc 2.26. attēlā dotās retrosintētiskās shēmas. No 5-brom-aizvietotā savienojuma **153** *Suzuki* šķērssametinašanas reakcijā ar attiecīgo cikloalkil vai hetaril borskābi **154**, iegūstot attiecīgo atvasinājumu **155**, kuru tālāk pārvērstu par pinakolātu **128**.



2.26. att. Retrosintētiskā shēma 5-vietā aizvietotiem pinakolātiem **128**

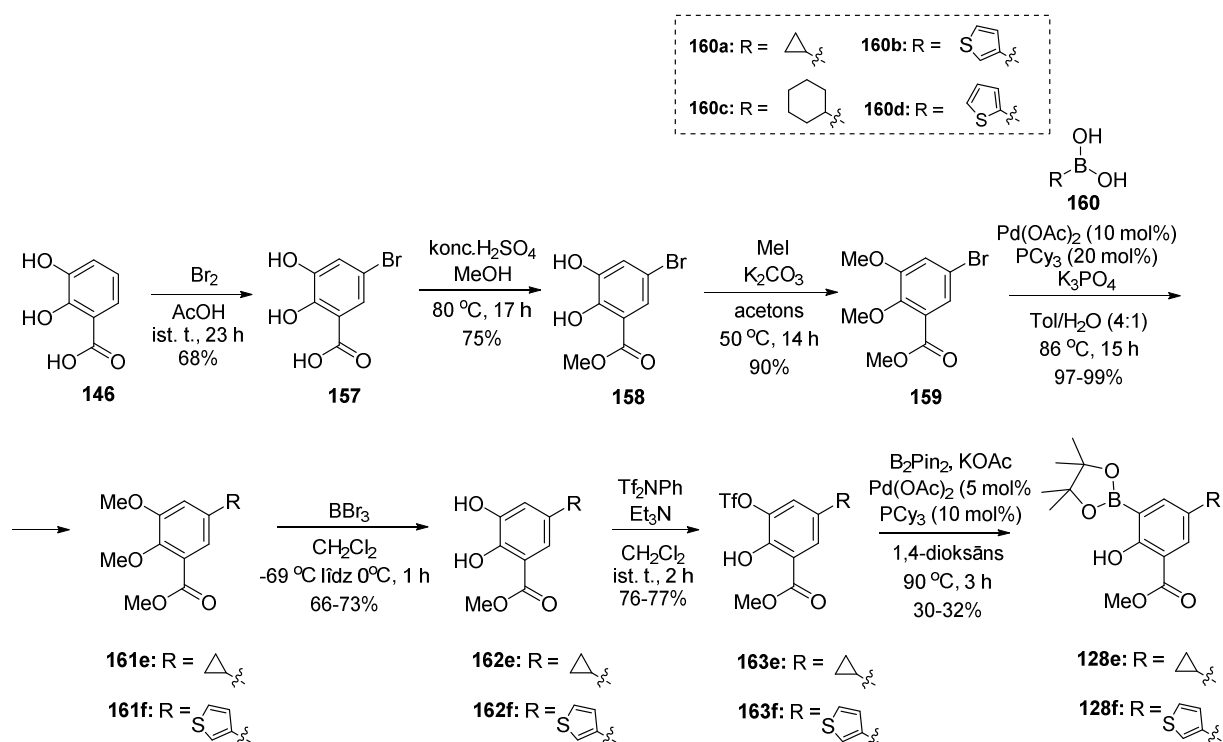
Būvbloka **128e** sintēzi sākām līdzīgi, kā to veicām būvbloka **128a** gadījumā (2.27. attēls). 5-Bromsalicilskābe (**133**) tika pārvērsta par metilesteri **134**, no kura *Suzuki-Miyaura* šķērssametināšanas reakcijā ar ciklopropilborskābi, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (5 mol%) kā katalizatora un Na_2CO_3 kā bāzes klātienē mēģinājām iegūt produktu **156**, taču reakcijas maisījumā manījām tikai “pēdas” no vēlamā produkta un izejvielu **134**. Literatūrā atradām optimizētus apstākļus ciklopropilborskābes *Suzuki-Miyaura* šķērssametināšanas reakcijai ar arilbromīdiem, kur par katalizatoru izmantoja $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ar PCy_3 kā ligandu un K_3PO_4 kā bāzi [92]. Rezultātā ieguvām 5-ciklopropilatvasinājumu **156** ar zemu iznākumu (22%). Iespējams, ja aizsargātu brīvo hidroksilgrupu ar metil vai acetilgrupu, reakcija noritētu daudz labāk. Taču mēs nevarējām paredzēt, vai un kā notiks bromēšanas stadija, tāpēc nolēmām šo sintēzes ceļu tālāk neattīstīt.



2.27. att. Būvbloka **128e** sintēze

Zinot, ka 2,3-dihidroksibenzoskābes metilesteri **151** iespējams selektīvi pārvērst 3-trifluormetilsulfonilatvasinājumā **152** (2.25 attēls), tika nolemts būvbloku **128e,f** sintēzi sākt no iepriekš izmantotās 2,3-dihidroksibenzoskābes (**146**) (2.28. attēls). Bromīdu **157** ieguvām reakcijā ar Br_2 etiķskābē, pēc aprakstītas metodes [85,93]. Pēc tam tas pārvērsts par metilesteri **158** ar 75% iznākumu. Ar labu iznākumu (90%) fenola **158** hidroksilgrupas tika

pārvērstas par metoksigrupām ar metiljodīda pārākumu, K_2CO_3 klātienē, iegūstot savienojumu **159**. 5-Bromo-2,3-dimetoksibenzoskābes metilestera (**159**) reakcijā ar ciklopropilborskābi (**160a**), $Pd(OAc)_2$, PCy_3 un K_3PO_4 klātienē ieguvām vēlamo 5-ciklopropilaizvietoto produktu **161e** ar gandrīz kvantitatīvu iznākumu (99%). Šajos *Suzuki-Miyaura* reakcijas apstākļos mēģinājām sametināt bromīdu **159** arī ar tiofēn-3-borskābi (**160b**), cikloheksilborskābi (**160c**) un tiofēn-2-borskābi (**160d**), taču ieguvām tikai 3-tienil atvasinātu produktu **161f**, bet ar teicamu iznākumu (97%). Diemžēl reakcijas ar cikloheksilborskābi (**160c**) un tiofēn-2-borskābi (**160d**) nenotika, reakcijas maisījumos neidentificējām izejvielas un citus blakusproduktus.



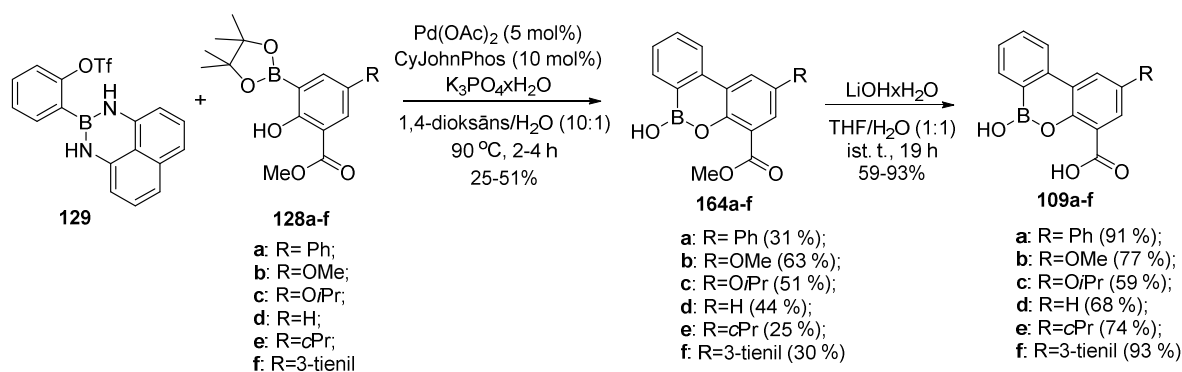
2.28. att. Būvbloku **128e,f** sintēze

Iegūtajiem 5-ciklopropil un 5-(3-tienil) atvasinājumiem, attiecīgi **161e** un **161f**, tālāk tika nošķeltas metilgrupas reakcijā ar 1M BBr_3 šķīduma DCM pārākumu. Iegūtos 2,3-dihidroksiatvasinājumus **162e** un **162f** attiecīgi pārvērtām par triflātiem **163e** un **163f** ar labiem iznākumiem (76-77%), izmantojot 2.24. attēlā izstrādāto metodi. Un beidzot *Miyaura* borilēšanas reakcijā tika iegūti būvbloki **128e** un **128f** ar 30-32% iznākumu.

Lai tiktu pie mērķsavienojumiem **109a-f**, no iegūtajiem būvblokiem **128a-f** un **129** *Suzuki-Miyaura* šķerssametināšanas reakcijā mēģinājām iegūt cikliskos borātus **164a-f** (2.29. attēls). Lai saprastu, kuri reakcijas apstākļi ir piemērotāki mūsu mērķsavienojumiem, tika veiktas triflāta **129** un pinakolāta **128a** testa reakcijas pēc 2 metodēm – vienā gadījumā

reakcijas maisījums karsēts dimetoksietānā 85-90 °C temperatūrā, par katalizatoru izmantojot 5 mol% Pd(PPh₃)₄ un kā bāzi izmantojot 2M Na₂CO₃ ūdens šķīdumu. Otrā gadījumā reakcijas maisījums karsēts pie 85-90 °C 1,4-dioksānā/ūdenī (10:1), 5 mol% Pd(OAc)₂ katalizatora, 10 mol% CyJohnPhos liganda un K₃PO₄·H₂O kā bāzes klātienē [54]. Abos gadījumos tika novērota produkta veidošanās, taču Pd(OAc)₂/CyJohnPhos katalītiskās sistēmas izmantošana deva mazāk blakusproduktu. Reakcijā ar Pd(PPh₃)₄ izdalīto reakcijas maisījumu bija grūti attīrīt. Situāciju sarežģīja arī trifenilfosfīna oksīda klātbūtne, kas attīrīšanas procesu padarīja vēl grūtāku. Tādēļ tika nolemts *Suzuki-Miyaura* reakcijas veikt 1,4-dioksānā/ūdenī (10:1), Pd(OAc)₂ katalizatora un CyJohnPhos liganda klātienē, par bāzi izmantojot K₃PO₄·H₂O.

Reakcijā ar fenilatvasinājumu **128a** iegūtā cikliskā borāta **164a** attīrīšana bija salīdzinoši vienkārša – no reakcijas maisījuma produktu izgulsnējot ar EtOAc/MeOH maisījumu. Rezultātā ieguvām produkta **164a** un tā “āta kompleksa” ar MeOH maisījumu, kuru istabas temperatūrā maisot acetonitrilā ar ūdeni un dažiem pilieniem TFA pārvērtām par tīru produktu **164a** ar 31% iznākumu. Diemžēl gadījumos ar pārējiem atvasinājumiem **164b-f** izgulsnēšanas metode nestrādāja, tāpēc tos attīrījām ar hromatogrāfijas metodēm. Cikliskos borātus **164b-f** mēģinājām tīrīt gan ar tiešās fāzes, gan ar apgrieztās fāzes kolonnas hromatogrāfiju palīdzību.

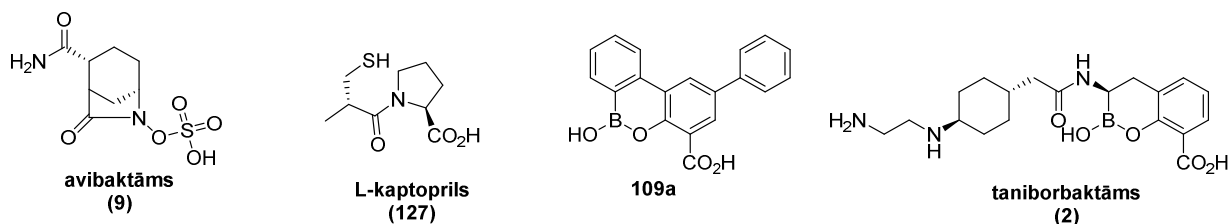


2.29. att. Mērķsavienojumu 109a-f sintēze

Sintēžu procesā pieņēmām, ja reiz izejvielas **129** sintēzi apgrūtināja gaismas klātbūtne, visticamāk arī *Suzuki-Miyaura* reakcijas procesā veidosies blakusprodukti, kas gaismas ietekmē sadalīsies un „bojās” reakcijas maisījumu. Šī iemesla dēļ reakciju trauki tika aptīti ar alumīnija foliju, lai izvairītos no gaismas klātbūtnes reakcijas laikā. Vēlāk arī izdalīšanas procesi tika veikti pēc iespējas izvairoties no gaismas piekļuves reakcijas maisījumiem. Attīrīšanas procesā hromatogrāfijas kolonnas arī tika notītas ar foliju. Rezultātā vispiemērotākais veids, kā iegūt tīrus cikliskos borātus **164b-f** bija reakcijas maisījuma attīrīšana ar apgrieztās fāzes kolonnas hromatogrāfijas palīdzību un sekojošu attīrīšanu uz tiešās fāzes preparatīvās PSH plāksnes. Līdz ar to zemie iznākumi ir skaidrojami ar sarežģīto

attīrīšanas procesu. Tālāk mērķsavienojumus **109a-f** ar labiem iznākumiem ieguvām hidrolizējot esterus **164a-f** ar LiOH monohidrātu THF/H₂O maisījumā (1:1).

Inhibitorā aktivitāte uz 10 β -laktamāzēm (starp kurām ir pārstāvji no visām 4 *Ambler* klasēm) tika noteikta tricikliskā boronāta fenilatvasinājumam **109a**. Aktivitāte un rezultāti tika salīdzināti ar jau iepriekšminēto taniborbaktāmu (**2**) [37, 38] un bicikliskā boronāta benziltioētera atvasinājumu **108** (2.2. tabula). Kā references savienojumam izmanti avibaktāms (**9**) un L-kaptoprils (**127**). Iegūtie rezultāti apkopoti 2.4. tabulā



2.30. att. Mērķsavienojums **109a** un literatūrā zināmie SBL un MBL inhibitori

2.4. tabula

Inhibitorās aktivitātes vērtības pret β -laktamāzēm (pIC₅₀)^a

<i>Ambler</i> klase	β -Laktamāze	Avibaktāms	L-Kaptoprils	109a	2
A	TEM-1	8,1	<4,4	6,7	n/a
B1	IMP-1	<3,4	5,0	8,8	5,6
	NDM-1	<3,4	5,8	7,2	8,0
	VIM-1	<3,4	5,6	5,6	8,1
	VIM-2	<3,4	6,1	7,1	9,3
B2	CphA	<2,4	<5,0	<4,7	5,6
B3	L1	<4,7	5,6	5,0	<5,0
C	AmpC (<i>P. aeruginosa</i>)	6,5	<4,4	6,9	6,5
D	OXA-10	<4,7	<4,4	6,9	6,6
	OXA-10 (+100 mM NaHCO ₃)	<4,7	<4,4	5,5	6,2
D	OXA-48	6,2	<4,4	8,6	6,3
	OXA-48 (+100 mM NaHCO ₃)	6,1	<4,4	8,3	5,6

^aSavienojumu noteikto aktivitāšu pIC₅₀ vērtību standartnovirzes ir $\pm 0,2$ log kārtas robežās

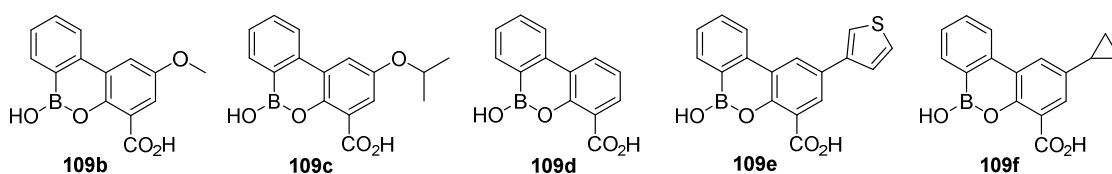
Tricikliskais boronāts **109a** uzrādīja inhibējošo aktivitāti uz 9 no 10 testētajām β -laktamāzēm, pie tam demonstrējot aktivitāti uz visām četrām β -laktamāžu *Ambler* klasēm.

Salīdzinot saistīšanos ar A un C klases serīna β -laktamāžu enzīmiem, novērots, ka savienojums **109a**, tāpat bicikliskais tioētera atvasinājums **108**, ir mazāk aktīvs pret A klases TEM-1 enzīmu nekā avibaktāms (**9**). Savukārt C klases AmpC enzīma inhibēšanas aktivitāte savienojumam **109a** ir līdzīga kā avibaktāmam (**9**) un taniborbaktāmam (**2**), taču zemāka nekā

bicikliskajam tioētera atvasinājumam **108**. Līdzīgi kā taniborbaktāms (**2**), arī tricikliskais boronāts **109a** neuzrādīja īpaši augstu saistīšanās spēju ar OXA-10 enzīmu, taču pret OXA-48 enzīmu **109a** izrādījās aktīvāks par taniborbaktāmu (**2**) un avibaktāmu (**9**).

Salīdzinot B1 klases metāl- β -laktamāžu (IMP-1, NDM-1 un VIM-2) inhibēšanas rezultātus, savienojums **109a** izrādījās aktīvāks nekā L-kaptoprils (**127**). Savienojumam **109a**, līdzīgi kā bicikliskajam tioētera atvasinājumam **108**, novērota inhibēšanas aktivitāte pret NDM-1 un VIM-2 enzīmiem submikromolārā līmenī, taču boronāta **109a** saistīšanās spēja ar VIM-1 enzīmu neuzrādīja tik augstu rezultātu. Atšķirībā no savienojuma **108**, tricikliskajam boronātam **109a**, līdzīgi kā taniborbaktāmam (**2**), netika novērota aktivitāte pret B3 klases metāl- β -laktamāzi L1 un mono-cinka B2 klases metāl- β -laktamāzi CphA.

Ņemot vērā augstākminētos datus par bicikliskā boronāta **108** un tricikliskā boronāta **109a** inhibējošo aktivitāti, varējām secināt, ka cikliskie boronāti spēj inhibēt β -laktamāžu pārstāvjus no visām 4 *Ambler* klasēm. Bet tā kā pastiprināta interese ir tieši metāl- β -laktamāžu inhibitoru izveidē, tad turpmāk uzmanība tika koncentrēta uz metāl- β -laktamāžēm. Tā savienojumiem **109b-f** tika noteikta inhibitorā aktivitāte uz B1 klases metāl- β -laktamāžēm (IMP-1, NDM-1, VIM-1 un VIM-2). Rezultāti apkopoti 2.5. tabulā.



2.31. att. Mērķsavienojumi **109b-f**

2.5. tabula

Inhibitorās aktivitātes vērtības pret B1 klases metāl- β -laktamāžēm (pIC_{50})^a

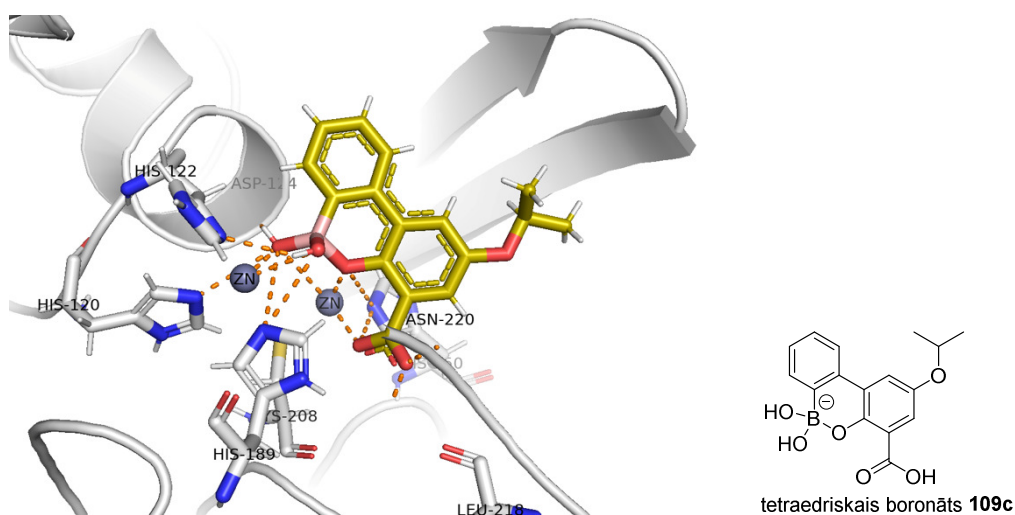
β -Laktamāze	L-kaptoprils	109b	109c	109d	109e	109f
IMP-1	5,7	6,7	7,2	7,8	6,5	6,9
NDM-1	5,0	7,8	8,4	7,2	8,0	7,9
VIM-1	5,1	5,1	5,2	5,1	5,3	5,8
VIM-2	5,8	6,9	7,0	6,8	6,7	7,3

^aSavienojumu noteikto aktivitāšu pIC_{50} vērtību standartnovirzes ir $\pm 0,2$ log kārtas robežās

Par references savienojumu tika izmantots L-kaptoprils (**127**). Novērojām, ka savienojumiem **109b-f** aktivitāte uz VIM-1 metāl- β -laktamāzes inhibēšanu ir līdzīga kā L-kaptoprilam (**127**). Savukārt uz IMP-1, NDM-1 un VIM-2 enzīmiem savienojumi **109b-f** izrādījās aktīvāki inhibitori nekā L-kaptoprils (**127**), uzrādot aktivitāti submikromolārās

koncentrācijās. Visaugstāko aktivitāti tricikliskie borāti **109b-f** uzrādīja NDM-1 metāl- β -laktamāzes inhibēšanai.

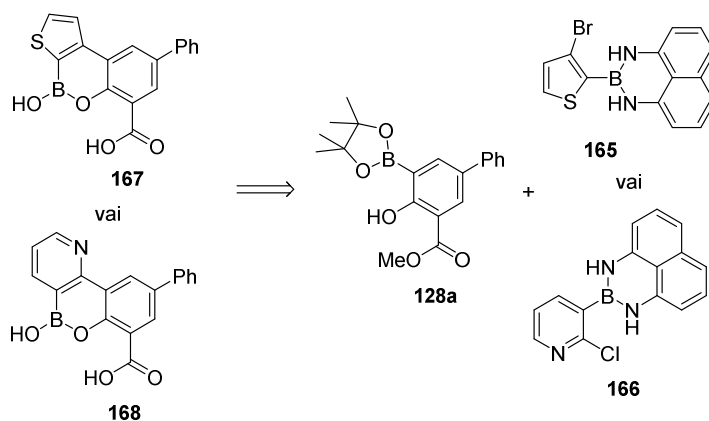
Tā kā tricikliskā borāta izopropiloksi atvasinājumam **109c** piemīt diezgan augsta sasitīšanās spēja ar NDM-1 metāl- β -laktamāzes enzīmu ($IC_{50} = 4.0$ nM), tad tika mēģināts šo savienojumu kristalizēt ar NDM-1 enzīmu. Izdevās iegūt **109c** un NDM-1 kompleksa kristālstruktūru (2.32. attēls).



2.32. att. Mērķsavienojuma **109c** un NDM-1 kompleksa kristālstruktūra (nav publicēts)

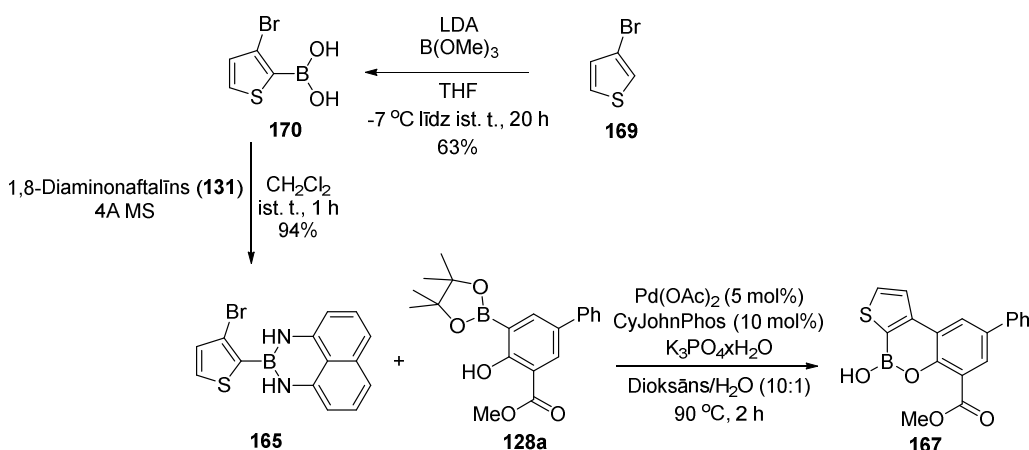
Savienojuma **109c** elektronu blīvums NDM-1 proteīna ķēdē norādīja uz tetraedriskā tricikliskā boronāta klātbūtni (2.32. attēls). Galvenie saistīšanās veidi tricikliskā boronāta pamatā un ar karboksilāta skābekļiem ir ļoti līdzīgi tiem, kas raksturoti bicikliskajam boronātam **108** ar VIM-2. Viens no savienojuma **109c** karboksilāta skābekļa atomiem ir novietots tā, lai koordinētos ar cinku NDM-1 aktīvajā centrā, tāpat arī koordinējas boronāta cikla “endocikliskais” skābeklis. “Eksocikliskie” pie bora saistītie hidroksilgrupu skābekļi koordinējas ar otru cinku NDM-1 aktīvajā centrā.

Tālāk plānojām atvasināt ciklisko boronātu no otras puses ciklā, tuvāk bora atomam, aizvietojojot benzociklu ar heterociklu, piemēram, piridīnu vai tiofēnu (2.33. attēls). Testa reakcijām par pinakolāta būvbloku izvēlējamies fenilatvasinājumu **128a**, jo no visiem sintezētajiem pinakolātiem, tas bija visērtāk iegūstams. Savukārt būvblokus **165** un **166** bija nepieciešams sintezēt.



2.33. att. Retrosintētiskā shēma ciklisko borskābju **167** un **168** iegūšanai

Tiofēna atvasinājums **165** tika sintezēts no komerciāli pieejamā 3-bromtiofēna (**169**) reakcijā ar litija diizopropilamīdu (LDA), veicot protona-litija apmaiņu tiofēna cikla 2-vietā, tad tika pievienots trimetilborāts un pēc hidrolīzes skābā vidē iegūta borskābe **170** (2.34. attēls). Reakcijā ar 1,8-diaminonaftalīnu (**131**), iegūtā borskābe **170** tika pārvērsta par būvbloku **165**.

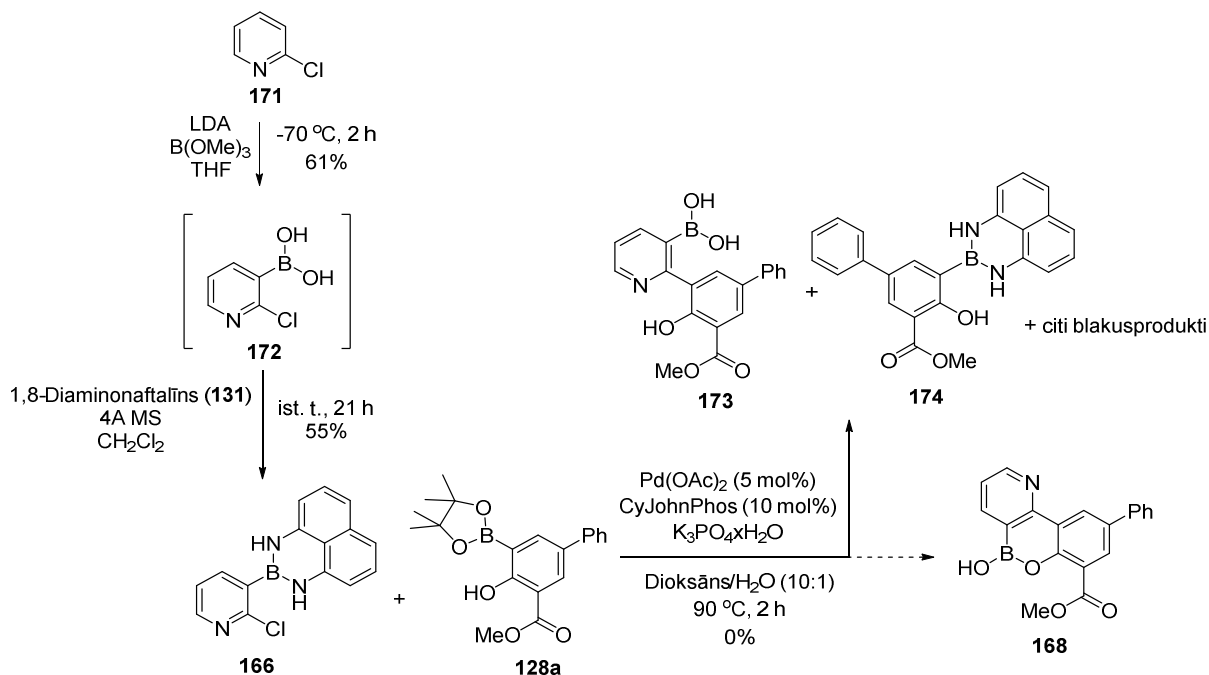


2.34. att. Mērķsavienojuma **167** sintēzes shēma

Tālāk veicām būvbloku **165** un **128a** Suzuki-Miyaura šķērssametnāšanas reakciju ar 5 mol% $Pd(OAc)_2$ /10 mol% CyJohnPhos katalītisko sistēmu un K_3PO_4 kā bāzi, karsējot reakcijas maisījumu $90\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrā. Sekojot reakcijas gaitai ar ŠH-MS, jau pēc 1,5 stundas tika novērota pilnīga izejvielu konversija un vēlamā produkta **167** rašanās. Pēc reakcijas izdalīšanas boronātu **167** mēģinājām attīrīt ar apgrieztās fāzes hromatogrāfijas palīdzību, kolonnu notinot ar foliju, lai nebūtu gaismas klātbūtnes, taču pietiekami tīru produktu iegūt neizdevās.

Būvbloks **166** tika sintezēts no komerciāli pieejamā 2-hlorpiridīna (**171**) divos sintēzes soļos (2.35. attēls). No sākuma savienojumam **171** veicām protona-litija apmaiņu piridīna

cikla 3-vietā ar LDA, kuru reakcijā ar trimetilborātu un tai sekojošu hidrolīzi skābā vidē, pārvērtām par borksābi **172**. Iegūtais jēlprodukts, bez attīrīšanas, reakcijā ar 1,8-diaminonaftalīnu (**131**) tika pārvērsts par būvbloku **166** ar 55% iznākumu.



2.35. att. Mērķsavienojuma **168** sintēzes shēma

No iegūtajiem būvblokiem **166** un **128a** *Suzuki-Miyaura* šķērssametnāšanas reakcijā mēģinājām iegūt ciklisko borātu **168**. Veicām reakciju ar 5 mol% Pd(OAc)₂/10 mol% CyJohnPhos kā katalizatoru, par bāzi izmantojot K₃PO₄, un karsējām reakcijas maisījumu 90 °C temperatūrā 25 stundas. Rezultātā tika iegūts sarežģīts vielu maisījums, kurā, saskaņā ar ŠH-MS analīzi, izejvielas **166** un **128a** netika novērotas, taču arī cikliskā produkta **168** masa arī netika identificēta. Viens no reakcijas maisījuma blakusproduktiem, saskaņā ar ŠH-MS, varētu būt *Suzuki* reakcijas produkts ar hidrolizētu diaminonaftil grupu **173**, taču reakcijas maisījumā šis savienojums bija mazākumā, bet pēc reakcijas maisījuma izdalīšanas praktiski vairs nebija novērojams. Tika izdalīts vēl blakusprodukts, kas pēc ¹H KMR spektra izskatījās kā 2 vielu maisījums. Vienu no šiem blakusproduktiem, saskaņā ar ŠH-MS un ¹H KMR spektru, identificējām kā pāresterificētu izejvielu ar diaminonaftilgrupu **174**, taču otru identificēt neizdevās. Otrs maisījuma produkts varētu būt *Suzuki* reakcijas produkts, jo spektrā novērojām abu izejvielu struktūru fragmentu protonus, kā arī brīva fenola grupas protonu. Līdz ar to varējām spriest, ka tas nav cikliskais produkts, bet ar ŠH-MS analīzi identificēt otru blakusproduktu neizdevās.

3. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

Vispārējā informācija

Sintēzēm, kurām bija nepieciešama sausa vide, traukus vairākas stundas izturēja žāvskapī 110 °C temperatūrā un atdzesēja argona plūsmā. Reakcijām inertā vide tika nodrošināta ar argona vai slāpekļa atmosfēru.

Reakcijām nepieciešamie reaģenti iegādāti no ķīmisko vielu piegādātājiem (*Acros, Alfa Aesar, Apollo Scientific, Fluorochem, Sigma Aldrich*) un lietoti bez papildus attīrīšanas. Šķīdinātāji žāvēti un attīrīti (THF un dihlormetāns) *MBraun-SPS 800* iekārtā. Sauss acetons un 1,4-dioksāns iegādāti no *Acros*. Vielu svēršanai izmantoti *Boeco Germany* svāri ($d=0.1$ mg).

Plānslāņa hromatogrāfijai lietotas *TLC Silica gel F₂₅₄(Merck)* sorbenta alumīnija plāksnes. Preparatīvajai PSH lietotas *PLC Silica gel 60 F₂₅₄, 2mm (Merck)* sorbenta stikla plāksnes. Produktu detektēšanai izmantots UV starojums (viļņa garums 254 nm) un/vai attīstīšana KMnO_4 šķīdumā (1,5 g KMnO_4 , 10 g K_2CO_3 , 150 ml H_2O , 2,5 ml 5% NaOH). Kolonnu hromatogrāfijai izmantots silikagels: *Silicagel 0,035–0,070 mm (Merck)* un etilacetāta/petrolētera (frakcijas ar $T_{\text{virš.}} = 40\text{--}60^\circ\text{C}$), acetona/petrolētera (frakcijas ar $T_{\text{virš.}} = 40\text{--}60^\circ\text{C}$), un metanola/dihlormetāna eluentu sistēmas. Apgrieztās fāzes kolonnu hromatogrāfija veikta ar *Biotage[®] SP1* iekārtu, izmantojot *SNAP KP-C18-HS* 12g un 30g kolonnas.

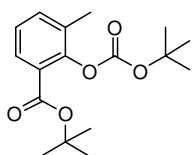
Reakcijas gaitu kontrolēja un vielu tīrību noteica ar UEŠH *Waters Acquity*, detektoru *Acquity UPLC PDA eλ*, datu apstrādes sistēmu *MassLynx*, apgrieztās fāzes kolonnu *Acquity UPLC[®] BEH C18*, 50×2.1 mm, 1.7 μm, ar kustīgo fāzi: acetonitrils ar 0.01% trifluoretiķskābes šķīdumu ūdenī, eluenta sastāvam 6 minūšu laikā, mainoties no 10% acetonitrila ūdens šķīduma līdz 95% acetonitrila ūdens šķīduma, plūsmas ātrums 0.5 mL/min. Masspektrometrs *SQ Detector 2* ar elektroizsmidzināšanas jonizāciju un kvadrupola analizatoru.

^1H un ^{13}C KMR spektri uzņemti ar 200, 300 un 400 MHz spektrometriem. Ķīmiskās nobīdes (δ) norādītas miljonajās daļās (m.d.), izmantojot šķīdinātāju kā standartu (^1H : CDCl_3 , $\delta = 7.26$ m.d., CD_3OD , $\delta = 4.78, 3.31$ m.d., DMSO, $\delta = 2.50, 3.33$ m.d.; ^{13}C : CDCl_3 , $\delta = 77.16$ m.d., CD_3OD , $\delta = 49.10$ m.d.; DMSO, $\delta = 39.52$ m.d.)

AIMS analīzes veiktas ar *Waters Acquity UPLC H-Class* UEŠH, kas apvienots ar *Waters Synapt G2-Si TOF MS* masspektrometru.

Savienojumu **116-121** un mērķsavienojuma **108** sintēžu apraksti un eksperimentālie dati publicēti *ACS Infect Dis.* **2020**, 12, 1398-1404. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00330.

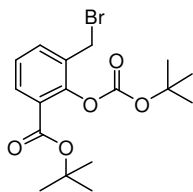
***tert*-Butil 2-((*tert*-butoksikarbonil)oksi)-3-metilbenzoāts (111)** [9,57]



2-Hidroksi-3-metilbenzoscābi (**110**) (5,00 g, 32,8 mmol) izšķīdināja sausā THF (20 mL), pievienoja Boc₂O (28,6 g, 131 mmol), DMAP (1,14 g, 9,90 mmol) un *tert*-butanolu (40 ml, 394 mmol). Reakcijas maisījumu karsēja 60 °C temperatūrā 5 stundas, tad atdzesēja līdz istabas temperatūrai un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (cikloheksāns/EtOAc 100:1). Ieguva 3,33 g (33%) savienojuma **111** kā bezkrāsainu eļļu.

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.74 (dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.38–7.33 (m, 1H), 7.16 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), 1.56 (d, *J* = 2.9 Hz, 18H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 164.2, 151.3, 149.0, 134.8, 132.0, 129.3, 125.5, 125.4, 83.5, 81.5, 28.3, 27.9, 16.3 m.d.

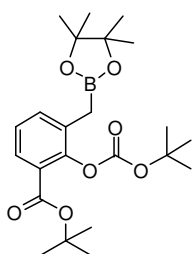
***tert*-Butil 3-(bromometil)-2-((*tert*-butoksikarbonil)oksi)benzoāts (112)** [9,57]



Savienojuma **111** (3,00 g, 9,70 mmol) šķīdumam tetrahlorogleklī (27 mL) pievienoja NBS (1,90 g, 10,7 mmol) un dibenzoilperoksīdu (313 mg, 0,97 mmol). Reakcijas maisījumu vārīja 26 stundas, atdzesēja līdz istabas temperatūrai, nofiltrēja, filtrātu ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (cikloheksāns/EtOAc 50:1). Ieguva 1,49 g (40%) savienojuma **112** kā bezkrāsainu eļļu.

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 7.26 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.52 (s, 2H), 1.58 (s, 18H) m.d.

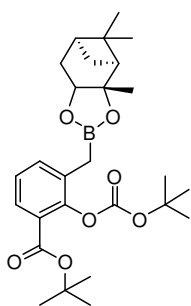
***tert*-Butil 2-((*tert*-butoksikarbonil)oksi)-3-((4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioksaborolān-2-il)metil)benzoāts (113)** [9,57]



Apaļkolbā iesvēra bromīdu **112** (100 mg, 0,26 mmol), B₂Pin₂ (72 mg, 0,28 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (10 mg, 0,013 mmol) un KOAc (76 mg, 0,78 mmol), suspendēja sausā 1,4-dioksānā (1,1 mL), reakcijas maisījumu izpūta ar N₂ un oranžo suspensiju karsēja 5 stundas 95 °C. Iegūto tumši brūno suspensiju atdzesēja līdz istabas temperatūrai un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (cikloheksāns/EtOAc 9:1). Ieguva 62 mg (46%) pinakolāta **113** ka bezkrāsainu eļļu.

¹H KMR (400 MHz, MeOD) δ 7.66 (dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 7.20 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 1.56 (d, *J* = 8.6 Hz, 18H), 1.24 (s, 12H) m.d.

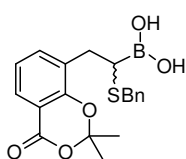
terc-Butil 2-((terc-butoksikarbonil)oksi)-3-(((3aS,4S,6S)-3a,5,5-trimetilheksahidro-4,6-metanobenzo[d][1,3,2]dioksaborol-2-il)metil)benzoāts (114) [9,57]



Pinakolātu **113** (450 mg, 1,03 mmol) izšķīdināja sausā THF (10 mL), pievienoja (1*S*,2*S*,3*R*,5*S*)-(+)-pināndiolu (**69**) (264 mg, 1,55 mmol) un maisīja istabas temperatūrā 24 stundas. Reakcijas maisījumu ietvaicēja pazeminātā spiedienā un jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (cikloheksāns/EtOAc 9:1). Ieguva 300 mg (60%) produkta **114** kā bezkrāsainu eļļu.

¹H KMR (400 MHz, MeOD) δ 7.66 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 7.19 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.30 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 2.33 (ddt, *J* = 13.9, 8.9, 2.5 Hz, 1H), 2.24–2.16 (m, 3H), 1.98 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 1.87 (tt, *J* = 5.6, 2.9 Hz, 1H), 1.81 (ddd, *J* = 14.3, 3.4, 2.1 Hz, 1H), 1.55 (d, *J* = 10.8 Hz, 18H), 1.37 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.21 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 0.84 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, MeOD) δ 165.9, 152.6, 149.4, 135.9, 134.9, 129.3, 126.6, 126.5, 87.3, 84.4, 82.6, 79.2, 52.5, 40.7, 39.21, 36.3, 29.0, 28.5, 28.1, 27.5, 27.3, 24.3 m.d.

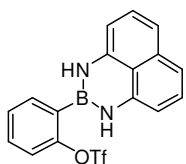
(1-(Benziltio)-2-(2,2-dimetil-4-okso-4H-benzo[d][1,3]dioksīn-8-il)etil)borskābe (122)



Borskābes esteri **121** (470 mg, 0,93 mmol) izšķīdināja acetonitrilā (15 mL), pievienoja *i*BuB(OH)₂ (189 mg, 1,86 mmol), konc. HCl (1,44 mL, 46,5 mmol) un dažus pilienus destilēta ūdens. Reakcijas maisījumu karsēja 40 °C temperatūrā 23 stundas, ietvaicēja pazeminātā spiedienā un jēlproduktu attīrīja ar apgrieztās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (KP-C18-HS 12g kolona), gradients 10-100% MeCN/H₂O+0,04% TFA. Ieguva 106 mg (30%) borskābes **122** kā iedzeltenu amorfu vielu.

¹H KMR (300 MHz, MeOD) δ 7.79 (dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 7.31–7.18 (m, 5H), 7.10 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.72 – 3.60 (m, 2H), 2.97 (dd, *J* = 7.9, 2.6 Hz, 2H), 2.43 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 1.72 (s, 6H) m.d.

2-(1*H*-nafto[1,8-de][1,2,3]diazaborinīn-2(3*H*)-il)feniltrifluorometānfulfonāts (129) [54]

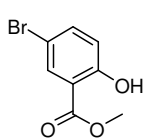


Divkaklu apaļkolbā 2-hidroksifenilfenilborskābi (**130**) (1,00 g, 7,25 mmol) suspendēja toluolā (24 mL), pievienoja 1,8-diaminonaftalīnu (**131**) (1,00 g, 7,61 mmol) un reakcijas maisījumu tumsā 3 stundas vārīja ar Dīna-Starka uznavu. Pēc atdzesēšanas līdz istabas temperatūrai reakcijas maisījumu ietvaicēja un attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfiju (PĒ/EtOAc 9:1 līdz 4:1) tumsā. Ieguva bāli rozā cietu vielu, kuru izšķīdināja sausā CH₂Cl₂ (30 mL), istabas temperatūrā piepilināja DIPEA (2,42 mL, 13,9 mmol) un maisīja istabas temperatūrā 20 minūtes. Tad reakcijas maisījumu

atdzesēja līdz $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ un lēnām piepilināja trifluormetānsulfonskābes anhidrīdu (1,83 mL, 10,9 mmol). Reakcijas maisījumam ļāva atsilt līdz istabas temperatūrai un turpināja maisīt tumsā, istabas temperatūrā 1 stundu. Iegūtajam brūnajam šķīdumam pievienoja 30 mL piesātināta NaHCO_3 ūd. šķīd. un ekstrahēja ar Et_2O (3x20 mL), mazgāja ar ūdeni, piesātinātu NaCl ūd. šķīd., žāvēja uz b/ū Na_2SO_4 un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja tumsā ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību ($\text{P}\ddot{\text{E}}/\text{EtOAc}$ 9:1). Ieguva 2,43 g (84%) produkta **129** kā zaļganbrūnu amorfu vielu. $R_f = 0,17$ (9:1 PE/EtOAc).

^1H KMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.71–7.63 (m, 1H), 7.58–7.41 (m, 2H), 7.39–7.31 (m, 1H), 7.20–7.03 (m, 4H), 6.41 (dd, $J = 7.1, 1.1$ Hz, 2H), 6.08 (s, 2H) m.d.

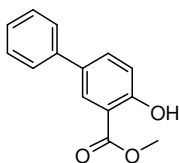
Metil 5-brom-2-hidroksibenzoāts (**134**) [79]



5-Bromsalicilskābi (**133**) (3,00 g, 13,8 mmol) šķīdināja metanolā (120 mL), istabas temperatūrā piepilināja konc. H_2SO_4 (2,58 mL, 43,4 mmol) un tad karsēja 17 stundas $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iegūto bezkrāsaino šķīdumu atdzesēja līdz istabas temperatūrai, ietvaicēja pazeminātā spiedienā, tad izšķīdināja EtOAc (100 mL), mazgāja ar piesātinātu NaHCO_3 ūd. šķīdumu (100 mL), žāvēja virs b/ū Na_2SO_4 , filtrēja un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Ieguva 2,15 g (68%) produkta **134** kā baltu cietu vielu. $R_f = 0,63$ (9:1 $\text{P}\ddot{\text{E}}/\text{EtOAc}$).

^1H KMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.69 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.53 (dd, $J = 8.9, 2.6$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 3.96 (s, 3H) m.d.

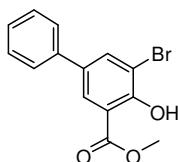
Metil 4-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilāts (**135**) [94]



Bromīdam **134** (2,13 g, 9,26 mmol) toluolā/ūdenī (45 mL/25 mL) pievienoja fenilborskābi (1,36 g, 11,1 mmol), Na_2CO_3 (2,94 g, 27,8 mmol) un $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (535 mg, 0,46 mmol), reakcijas maisījumu izpūta ar Ar un karsēja $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 16 stundas. Reakcijas maisījumu atdzesēja līdz istabas temperatūrai, pievienoja dest. H_2O (50 mL) un ekstrahēja ar EtOAc (3x50 mL). Organiskos slāņus apvienoja, mazgāja ar pies. NaCl ūd. šķīdumu, žāvēja virs b/ū Na_2SO_4 , filtrēja un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Atlikumu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību eluentu sistēmā $\text{P}\ddot{\text{E}}/\text{EtOAc}$ (100:1 līdz 90:10). Ieguva 1,29 g (61%) produkta **135** kā baltu cietu vielu. $R_f = 0,56$ (9:1 $\text{P}\ddot{\text{E}}/\text{EtOAc}$).

^1H KMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.77 (s, 1H), 8.08 (dd, $J = 2.5, 0.3$ Hz, 1H), 7.71 (ddd, $J = 8.6, 2.5, 0.3$ Hz, 1H), 7.57–7.53 (m, 2H), 7.47–7.40 (m, 2H), 7.37–7.31 (m, 1H), 7.07 (dd, $J = 8.6, 0.3$ Hz, 1H), 3.99 (s, 3H) m.d. ^{13}C KMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170.7, 161.1, 140.0, 134.6, 132.6, 129.0, 128.3, 127.2, 126.8, 118.2, 112.7, 52.5 m.d.

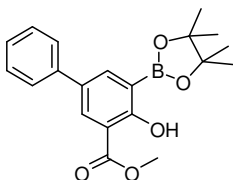
Metil 5-brom-4-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilāts (136) [81]



Savienojumu **135** (0,96 g, 4,21 mmol) suspendēja metanolā (25 mL) un istabas temperatūrā piepilināja Br₂ (0,26 mL, 5,05 mmol) šķīdumu metanolā (10 mL) un maisīja istabas temperatūrā 18 stundas. Iegūto oranžo suspensiju filtrēja uz stikla filtra un nogulsnes mazgāja ar aukstu metanolu. Ieguva 1,07 g (84%) bromīda **136** kā baltu cietu vielu. $R_f = 0,45$ (9:1 PĒ/acetons).

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 11.44 (d, $J = 0.4$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.98 (dd, $J = 2.3, 0.3$ Hz, 1H), 7.55–7.50 (m, 2H), 7.47–7.41 (m, 2H), 7.38–7.33 (m, 1H), 4.01 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.3, 157.6, 138.8, 137.6, 133.6, 129.1, 127.7, 127.6, 126.8, 113.7, 111.8, 53.0 m.d.

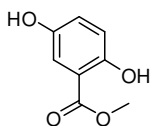
Metil-4-hidroksi-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,2,3-dioksaborolān-2-il)-[1,1'-bifenil]-3-karboksilāts (128a)



Spiediena ampulā iesvēra bromīdu **136** (1,00 g, 3,27 mmol), B₂Pin₂ (1,24 g, 4,90 mmol), KOAc (936 mg, 9,81 mmol) un Pd(dppf)Cl₂ (240 mg, 0,33 mmol), pievienoja sausu degazētu 1,4-dioksānu (20 mL), reakcijas maisījumu izpūta ar Ar, aizskrūvēja spiediena ampulu un oranžo suspensiju karsēja 4 stundas 90 °C. Iegūto tumši brūno suspensiju atdzesēja līdz istabas temperatūrai, nofiltrēja caur Celītu, filtru mazgāja ar EtOAc, filtrātus apvienoja, mazgāja ar ūdeni, piesātinātu NaCl ūd. šķīdumu un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/acetons 9:1), pēc tam iegūto bezkrāsaino amorfo vielu izgulsnēja ar petrolēteri. Ieguva 0,25 g (22%) produkta **128a** kā pelēcīgu cietu vielu. $R_f = 0,30$ (9:1 PĒ/acetons).

¹H KMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11.36 (s, 1H), 8.20–8.15 (m, 2H), 7.61–7.55 (m, 2H), 7.46–.38 (m, 2H), 7.36–7.28 (m, 1H), 3.97 (s, 3H), 1.39 (s, 12H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.7, 165.7, 142.4, 142.4, 140.0, 132.1, 131.8, 128.9, 127.1, 126.9, 112.5, 84.0, 52.6, 25.0 m.d. IS (plēve, cm⁻¹) 3155, 2979, 1683, 1675, 1611, 1330, 1244, 764, 705. AIMS (m/z): [M+H]⁺ aprēķināts C₂₀H₂₃BO₅: 355.1717. Noteikts: 355.1716.

Metil 2,5-dihidroksibenzoāts (138) [82]

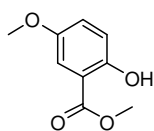


2,5-Dihidroksibenzoskābi (**137**) (2,65 g, 17,2 mmol) izšķīdināja MeOH (110 mL), piepilināja konc. H₂SO₄ (3,20 mL, 60,2 mmol) un iedzeltenu reakcijas maisījuma šķīdumu karsēja 70 °C temperatūrā 23 stundas. Reakcijas maisījumu

atdzesēja līdz istabas temperatūrai, ietvaicēja, atlikumu izšķīdināja EtOAc (100 mL), mazgāja ar pies. NaHCO₃ ūd. šķīd. (2x150 mL), žāvēja virs Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Ieguva 2,70 g (93%) metilestera **129** kā bēšu cietu vielu.

¹H KMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.34 (s, 1H), 7.28 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.01 (dd, *J* = 8.9, 3.1 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H) m.d.

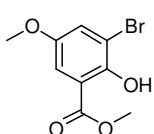
Metil 2-hidroksi-5-metoksibenzoāts (**139**) [82]



2-Hidroksi-5-metoksibenzoskābes (**145**) (3,00 g, 17,8 mmol) šķīdumam metanolā (120 mL) piepilināja konc. H₂SO₄ (3,32 mL, 62,4 mmol) un karsēja 18 stundas 70 °C. Iegūto iedzelteno šķīdumu atdzesēja līdz istabas temperatūrai, ietvaicēja, atlikumu izšķīdināja EtOAc (100 mL), mazgāja ar pies. NaHCO₃ ūd. šķīd. (100 mL), žāvēja uz b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Ieguva 2,90 g (90%) metilestera **139** kā dzeltenu eļļu.

¹H KMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.36 (s, 1H), 7.29 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 9.1, 3.2 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.78 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.4, 156.2, 152.1, 124.2, 118.7, 112.0, 111.9, 56.0, 52.5 m.d. IS (plēve, cm⁻¹) 3201, 2956, 1638, 1487, 1227, 1083, 1038. AIMS (*m/z*): [M]⁺ aprēķināts C₉H₁₀O₄: 182,0579. Noteikts: 182,0580.

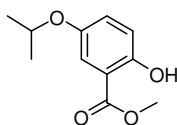
Metil 3-brom-2-hidroksi-5-metoksibenzoāts (**140**)



Metil 2-hidroksi-5-metoksibenzoāta (**139**) (1,50 g, 8,24 mmol) šķīdumam metanolā (47 mL) istabas temperatūrā piepilināja Br₂ (0,46 mL, 9,06 mmol) šķīdumu metanolā (19 mL) un maisīja istabas temperatūrā 19 stundas. Iegūto dzeltenu šķīdumu ietvaicēja pazeminātā spiedienā un jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/EtOAc 20:1 → 9:1). Ieguva 0,99 g (46%) bromīda **140** kā baltu amorfū vielu. R_f = 0,40 (9:1 PĒ/acetons).

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.98 (s, 1H), 7.36 (dd, *J* = 3.1, 0.5 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.78 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.1, 152.8, 152.1, 126.8, 112.9, 112.5, 111.6, 56.2, 52.9 m.d. IS (plēve, cm⁻¹) 3012, 1675, 1609, 1441, 1244, 1043, 786. AIMS (*m/z*): [M]⁺ aprēķināts C₉H₉BrO₄: 259,9684. Noteikts: 259,9686.

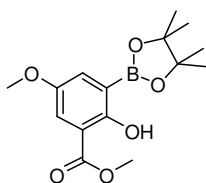
Metil 2-hidroksi-5-izopropoksibenzoāts (141) [82]



Savienojumu **138** (1,00 g, 5,95 mmol) izšķīdināja sausā acetonā (11 mL), pievienoja b/ū K_2CO_3 (0,74 g, 5,36 mmol) un *iPrBr* (0,56 ml, 5,95 mmol) un iegūto dzeltenu suspensiju karsēja 70 °C slēgtā ampulā 23 stundas. Reakcijas maisījumu atdzesēja, nofiltrēja, filtrātu ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Atlikumu šķīdināja EtOAc (30 mL), mazgāja ar ūdeni (30 mL), pies. NaCl ūd. šķīd. (30 mL), žāvēja virs b/ū Na_2SO_4 un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/EtOAc 20:1). Ieguva 0,52 g (42%) produkta **141** kā bezkrāsainu eļļu.

1H KMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.35 (d, $J = 0.4$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.06 (dd, $J = 9.1, 3.1$ Hz, 1H), 6.91–6.88 (m, 1H), 4.42 (p, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.30 (s, 3H) m.d.

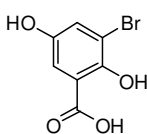
Metil 2-hidroksi-5-metoksi-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioksaborolān-2-il)benzoāts (128b)



Spiediena ampulā iesvēra bromīdu **140** (0,99 g, 3,45 mmol), B_2Pin_2 (1,31 g, 4,90 mmol), $Pd(OAc)_2$ (39 mg, 0,17 mmol), PCy_3 (97 mg, 0,34 mmol) un KOAc (1,02 g, 10,4 mmol), pievienoja sausu degazētu 1,4-dioksānu (6 mL), reakcijas maisījumu izpūta ar Ar, aizskrūvēja spiediena ampulu un oranžo suspensiju karsēja 4 stundas 90 °C. Iegūto tumši brūno suspensiju atdzesēja līdz istabas temperatūrai, nofiltrēja caur Celītu, filtru nomazgāja ar EtOAc, filtrātus apvienoja un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/acetons 20:1 \rightarrow 4:1). Ieguva 0,52 g (55%) pinakolāta **128b** kā baltu amorfu vielu. $R_f = 0,28$ (9:1 PĒ/acetons).

1H KMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.93 (s, 1H), 7.52 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 1.37 (s, 12H) m.d. ^{13}C KMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 170.4, 160.6, 151.6, 130.5, 116.9, 112.1, 84.0, 56.1, 52.5, 25.0 m.d. IS (plēve, cm^{-1}) 3175, 2071, 1678, 1603, 1427, 1244, 1148, 1049. AIMS (m/z): $[M+Na]^+$ aprēķināts $C_{15}H_{21}BO_6Na$: 331,1329. Noteikts: 331,1343.

3-Brom-2,5-dihidroksibenzoskābe (143)

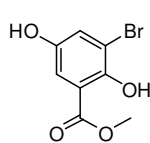


2,5-Dihidroksibenzoskābi (**137**) (0,50 g, 3,24 mmol) suspendēja etiķskābē (5 mL) un piepilināja Br_2 (0,20 mL, 4,06 mmol) istabas temperatūrā. Iegūto oranžo suspensiju maisīja istabas temperatūrā 20 stundas, tad ietvaicēja pazeminātā

spiedienā, atlikumu ietvaicēja kopā ar hloroformu (x2). Atlikumu suspendēja hloroformā, nogulsnes nofiltrēja un uz filtra mazgāja ar hloroformu, tad petrolēteri. Ieguva 0,94 g (63%) bromīda **143** kā bēšu cietu vielu.

^1H KMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.46 (s, 1H), 9.52 (s, 1H), 7.25 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H) m.d. ^{13}C KMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 171.4, 150.7, 149.6, 126.0, 114.8, 114.0, 110.0 m.d. IS (KBr, cm^{-1}) 3407, 3097, 1713, 1439, 1223. AIMS (m/z): $[\text{M}]^+$ aprēķināts $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4\text{Br}$: 231,9371. Noteikts: 231,9368.

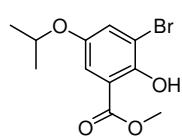
Metil 3-brom-2,5-dihidroksibenzoāts (**144**)



Bromīdu **143** (0,89 g, 8,32 mmol) šķīdināja metanolā (40 mL) un istabas temperatūrā piepilināja konc. H_2SO_4 (0,71 mL, 13,4 mmol) un iegūto šķīdumu karsēja 16 stundas 70 °C. Reakcijas maisījumu atdzesēja līdz istabas temperatūrai, ietvaicēja pazeminātā spiedienā, atlikumu šķīdināja EtOAc (50 mL), mazgāja ar pies. NaHCO_3 ūd. šķīd., pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja uz b/ū Na_2SO_4 un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/EtOAc 4:1). Ieguva 0,74 g (78%) metilestera **144** kā bālu rozā amorfū vielu. $R_f = 0,26$ (4:1 PĒ/EtOAc).

^1H KMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.96 (d, $J = 0.5$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 3.0$, 1H), 7.29 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 4.72 (s, 1H), 3.96 (s, 3H) m.d. ^{13}C KMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169.9, 152.8, 147.8, 127.3, 114.9, 113.1, 111.5, 53.0 m.d. IS (plēve, cm^{-1}) 3446, 3400, 1655, 1606, 1229. AIMS (m/z): $[\text{M}]^+$ aprēķināts $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_4\text{Br}$: 245,9528; Noteikts: 245,9529.

Metil 3-brom-2-hidroksi-5-izopropoksibenzoāts (**142**)

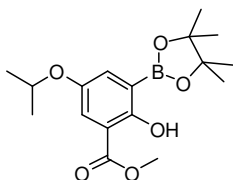


Spiediena ampulā savienojumu **144** (0,70 g, 2,83 mmol) šķīdināja sausā acetona (7 mL), pievienoja b/ū K_2CO_3 (1,02 g, 7,36 mmol) un $i\text{PrBr}$ (0,36 mL, 3,68 mmol). Spiediena ampulu aizskrūvēja un reakcijas maisījumu karsēja 15 stundas 60 °C. Iegūto brūno suspensiju atdzesēja līdz istabas temperatūrai, nofiltrēja caur Celītu, uz filtra Celītu mazgāja ar EtOAc, filtrātus apvienoja un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Atlikumu šķīdināja EtOAc, mazgāja ar dest. ūdeni, pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja uz b/ū Na_2SO_4 un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/EtOAc 20:1). Ieguva 0,24 g (33%) izopropoksibenzoāta **142** kā bālu bezkrāsainu amorfū vielu.

^1H KMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.99 (s, 1H), 7.35 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 4.41 (h, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.29 (s, 3H) m.d. ^{13}C KMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170.1, 152.8, 150.2, 129.0, 115.8, 113.0, 111.4, 71.8, 52.9, 22.1 m.d. IS

(plēve, cm^{-1}) 3152, 2978, 1683, 1607, 1442, 1240. AIMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ aprēķināts $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{Br}$: 289,0075; Noteikts: 289,0084.

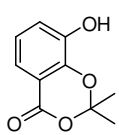
Metil 2-hidroksi-5-isopropoksi-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioksaborolān-2-il)benzoāts (128c)



Bromīdu **142** (220 mg, 0,76 mmol), bis(pinakol)diborānu (251 mg, 0,99 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (9 mg, 0,038 mmol), PCy_3 (21 mg, 0,076 mmol) un KOAc (244 mg, 2,28 mmol) suspendēja sausā degazētā 1,4-dioksānā (4 mL), reakcijas maisījumu izpūta ar Ar, aizskrūvēja spiediena ampulu un oranžo suspensiju karsēja 4,5 stundas 85°C . Iegūto tumši brūno reakcijas maisījumu atdzesēja līdz istabas temperatūrai, atšķaidīja ar EtOAc , nfiltrēja caur Celītu, Celīta slāni uz filtra mazgāja ar EtOAc , filtrātus apvienoja un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību ($\text{P}\bar{\text{E}}$ /acetons 20:1). Ieguva 103 mg (40%) produkta **128c** kā bezkrāsas amorfu vielu. $R_f = 0,43$ (4:1 $\text{P}\bar{\text{E}}$ /acetons).

^1H KMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.95 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.45 (hept, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 1.36 (s, 12H), 1.29 (d, $J = 6.1$ Hz, 6H) m.d. ^{13}C KMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170.5, 160.8, 149.7, 133.4, 120.1, 112.19, 84.0, 71.4, 52.4, 25.0, 22.2 m.d. IS (plēve, cm^{-1}) 3205, 2978, 2934, 1675, 1609, 1432, 1236. AIMS (ESI/ TOF-Q) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ Aprēķināts $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{BO}_6$: 337,1822; Noteikts: 337,1832.

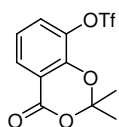
8-Hidroksi-2,2-dimetil-4H-benzo[d][1,3]dioksīn-4-ons (147) [9, 57]



2,3-Dihidroksibenzoskābi (**146**) (2,50 g, 16,2 mmol) suspendēja TFAA (12 mL) un pievienoja 0,5 mL trifluoretiķskābes. Suspensiju atdzesēja ledus-ūdens vannā un pievienoja iepriekš atdzesētu acetona (4,2 mL, 57,2 mmol) šķīdumu trifluoretiķskābē (5 mL). Iegūtai sārtai suspensijai ļāva lēnām atsilt līdz istabas temperatūrai un turpināja maisīt istabas temperatūrā 48 stundas. Iegūto brūno šķīdumu atšķaidīja ar toluolu un ietvaicēja. Atlikumu izšķīdināja EtOAc (20 mL), mazgāja ar pies. NaHCO_3 ūd. šķīd. (30 mL), žāvēja virs b/ū Na_2SO_4 un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību ($\text{P}\bar{\text{E}}$ / EtOAc/DCM 20:1:20). Ieguva 1,29 g (41%) produkta **147** kā bēšu amorfu vielu.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.50 (dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 1H), 7.19 (dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H), 7.01 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.56 (s, 1H) 1.77 (s, 6H) m.d.

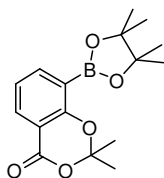
2,2-Dimetil-4-okso-4H-benzo[d][1,3]dioksīn-8-il trifluorometānsulfonāts (**148**) [9, 57]



Savienojuma **147** (2,57 g, 13,2 mmol) suspensiju sausā CH₂Cl₂ (35 mL) atdzesēja līdz -78 °C zem Ar plūsmas. Pievienoja Et₃N (9,2 mL, 66,0 mmol), tad piepilināja Tf₂O (4,5 mL, 26,5 mmol) un reakcijas maisījumam ļāva lēnām atsilt līdz 0 °C, tad turpināja maisīt 0 °C vēl 2 stundas. Reakcijas maisījumam pievienoja H₂O (~80 mL), ekstrahēja ar CH₂Cl₂ (3x50 mL), žāvēja virs b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/EtOAc 9:1). Ieguva 4,04 g (94%) produkta **148** kā bēšu amorfu vielu.

¹H KMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.00 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1H), 7.17 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 1.79 (s, 6H) m.d.

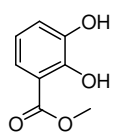
2,2-Dimetil-8-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioksaborolān-2-il)-4H-benzo[d][1,3]dioksīn-4-ons (**149**) [9, 57]



Spiediena ampulā ievēra triflātu **148** (1,00 g, 3,07 mmol), B₂Pin₂ (1,17 g, 4,60 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (0,22 g, 0,31 mmol) un KOAc (0,90 g, 9,21 mmol), suspendēja sausā degazētā 1,4-dioksānā (17 mL), reakcijas maisījumu izpūta ar Ar, aizskrūvēja spiediena ampulu un oranžo suspensiju karsēja 18 stundas 90 °C. Iegūto tumši brūno suspensiju atdzesēja līdz istabas temperatūrai, nofiltrēja caur Celītu, filtru nomazgāja ar EtOAc, filtrātus apvienoja un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/acetons 20:1 → 4:1), tīrās frakcijas ietvaicēja pazeminātā spiedienā, mazgāja ar PĒ un nofiltrēja. Ieguva 0,39 g (41%) pinakolāta **149** ka bēšu amorfu vielu.

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.03 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.90 (dd, *J* = 7.3, 1.9 Hz, 1H), 7.10 (dd, *J* = 7.7, 7.3 Hz, 1H), 1.73 (s, 6H), 1.34 (s, 12H) m.d.

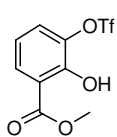
Metil-2,3-dihidroksibenzoāts (**151**) [88]



2,3-Dihidroksibenzoskābes (**146**) (2,00 g, 12,9 mmol) šķīdumam MeOH (80 mL) istabas temperatūrā piepilināja konc. H₂SO₄ (0,71 mL, 13,4 mmol) un vārīja 17 stundas. Reakcijas maisījumu atdzesēja līdz istabas temperatūrai, ietvaicēja pazeminātā spiedienā, tad izšķīdināja EtOAc, mazgāja ar pies. NaHCO₃ ūd. šķīd., pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja uz b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Ieguva 1,95 g (90%) metilestera **151** kā bēšu cietu vielu.

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.89 (s, 1H), 7.37 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.15–7.08 (m, 1H), 6.80 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.67 (s, 1H), 3.96 (s, 3H) m.d.

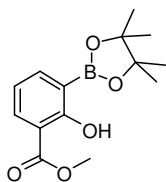
Metil-2-hidroksi-3-(((trifluormetil)sulfonil)oksi)benzoāts (**152**) [88]



Savienojuma **151** (0,85 g, 5,06 mmol) šķīdumu sausā CH₂Cl₂ (15 mL) atdzesēja līdz 0 °C, pievienoja Et₃N (1,41 mL, 10,1 mmol) un Tf₂NPh (1,99 g, 5,56 mmol). Iegūto šķīdumu maisīja 0 °C vēl 30 minūtes, tad ļāva atsilt līdz istabas temperatūrai un maisīja 2 stundas. Brūngano šķīdumu atšķaidīja ar CH₂Cl₂ (50 mL), mazgāja ar 1M HCl, pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja uz b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/EtOAc 20:1). Ieguva 1,14 g (75%) triflāta **152** kā baltu cietu vielu. R_f = 0,57 (4:1 PĒ/EtOAc).

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 11.17 (s, 1H), 7.87 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 6.93 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.8, 154.0, 138.0, 129.8, 128.3, 118.9, 118.8 (q, *J*_{CF} = 321 Hz, CF₃), 115.1, 53.1 m.d.

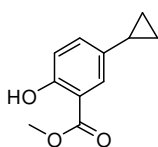
Metil 2-hidroksi-3-(4,4,5,5-terametil-1,2,3-dioksaborolān-2-il)benzoāts (**128d**)



Izkarsētā un Ar plūsmā atdzesētā mikroviļņu ampulā triflātu **152** (300 mg, 1,00 mmol), bis(pinakol)diborānu (304 mg, 1,20 mmol), Pd(OAc)₂ (11 mg, 0,05 mmol), PCy₃ (21 mg, 0,10 mmol) un KOAc (294 mg, 3,00 mmol) suspendēja sausā degazētā 1,4-dioksānā (1,5 mL), reakcijas maisījumu izpūta ar Ar un oranžo suspensiju karsēja slēgtā mikroviļņu ampulā 3 stundas 90 °C. Iegūto tumši brūno suspensiju atdzesēja līdz istabas temperatūrai, atšķaidīja ar EtOAc, pievienoja pies. NH₄Cl ūd.šķīd., ūdens slāni ekstrahēja ar EtOAc (3x5 mL), organiskos slāņus apvienoja, mazgāja ar piesātinātu NaCl ūd.šķīd., žāvēja uz b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/acetons 20:1). Ieguva 139 mg (50%) pinakolāta **128d** kā brūnu eļļu. R_f = 0,53 (4:1 PĒ/EtOAc).

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 11.36 (s, 1H), 7.97–7.90 (m, 2H), 6.88 (dd, *J* = 7.8, 7.3 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 1.38 (s, 12H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.7, 166.3, 143.8, 133.5, 118.9, 112.2, 83.9, 52.4, 25.0 m.d. IS (plēve, cm⁻¹) 3154, 2979, 2856, 1674, 1615, 1430. AIMS (ESI/ TOF-Q) (*m/z*): [M+Na]⁺ Aprēķināts C₁₄H₁₉BO₅Na: 301,1223; Noteikts: 301,1234.

Metil 5-ciklopropil-2-hidroksibenzoāts (**155**)

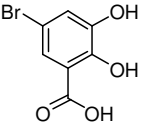


Bromīdam **134** (100 mg, 0,43 mmol) toluolā/ūdenī (2 mL/0,1 mL) pievienoja ciklopropilborskābi (48 mg, 0,56 mmol), K₃PO₄·H₂O (319 mg, 1,51 mmol), Pd(OAc)₂ (5 mg, 0,022 mmol) un Cy₃P (12 mg, 0,043 mmol). Reakcijas maisījumu izpūta ar Ar un slēgtā traukā karsēja 90 °C 16 stundas. Reakcijas maisījumu atdzesēja līdz istabas temperatūrai, pievienoja dest. H₂O (50 mL) un ekstrahēja ar EtOAc

(3x10 mL). Organiskos slāņus apvienoja, mazgāja ar pies. NaCl ūd. šķīdumu, žāvēja virs b/ū Na₂SO₄, filtrēja un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Atlikumu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību eluentu sistēmā PĒ/EtOAc (20:1). Ieguva 18 mg (22%) produkta **155** kā bezkrāsainu eļļu.

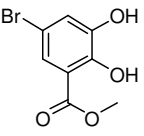
¹H KMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.55 (s, 1H), 7.55 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 1.88–1.79 (m, 1H), 0.96–0.86 (m, 2H), 0.67–0.56 (m, 2H) m.d.

5-Brom-2,3-dihidroksibenzoskābe (**157**) [93]

 2,3-Dihidroksibenzoskābi (**146**) (3,00 g, 19,5 mmol) suspendēja ledus etiķskābē (24 mL), istabas temperatūrā piepilināja Br₂ (1,0 mL, 19,5 mmol) un maisīja istabas temperatūrā 23 stundas. Iegūto bāli oranžo suspensiju ietvaicēja pazeminātā spiedienā, atlikumu ietvaicēja kopā ar CHCl₃ (x3), tad izšķīdināja EtOAc (50 mL), mazgāja ar piesātinātu NaCl ūd. šķīd., žāvēja uz b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Ieguva 3,61 g (79%) bromīda **157** kā bāli violetu pulveri.

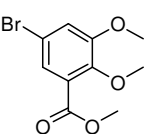
¹H KMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.90 (br s, 1H), 7.31 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, DMSO) δ 171.1, 150.0, 147.6, 122.6, 121.6, 114.7, 109.1 m.d.

Metil 5-brom-2,3-dihidroksibenzoāts (**158**)

 5-Brom-2,3-dihidroksibenzoskābi (**157**) (3,00 g, 12,9 mmol) izšķīdināja MeOH (120 mL) un istabas temperatūrā piepilināja konc. H₂SO₄ (2,40 mL, 45,1 mmol) un reakcijas maisījumu karsēja 17 stundas 80 °C. Iegūto iedzeltenu šķīdumu atdzesēja līdz istabas temperatūrai, ietvaicēja pazeminātā spiedienā, tad izšķīdināja EtOAc, mazgāja ar pies. NaHCO₃ ūd. šķīd., pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja uz b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Ieguva 2,39 g (75%) metilestera **158** kā violetu amorfu vielu.

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.85 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 2.4, 0.7 Hz, 1H), 5.73 (s, 1H), 3.96 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.9, 148.3, 146.1, 123.0, 113.5, 111.1, 52.9 m.d. IS (plēve, cm⁻¹) 3446, 3093, 2959, 1675, 1467, 1319, 1198, 1153, 1009.

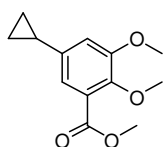
Metil 5-brom-2,3-dimetoksibenzoāts (**159**)

 Istabas temperatūrā b/ū K₂CO₃ (4,26 g, 30,8 mmol) pievienoja dihidroksibenzoāta **158** (2,70 g, 10,9 mmol) šķīdumam sausā acetonā (40 mL), tad piepilināja MeI (2,04 mL, 30,8 mmol). Iegūto violeto suspensiju sildīja

aizskrūvētā spiediena ampulā 50 °C 14 stundas. Reakcijas maisījumu atdzesēja līdz istabas temperatūrai, nofiltrēja caur Celītu, filtru mazgāja ar EtOAc, filtrātus apvienoja un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Atlikumu izšķīdināja EtOAc, mazgāja ar dest. ūdeni, pies. NaCl ūd. šķīdumu, žāvēja uz b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/EtOAc 9:1). Ieguva 2,70 g (90%) dimetoksibenzoāta **159** kā bezkrāsainu eļļu, kura pēc laika sacietēja. $R_f = 0,50$ (4:1 PĒ/EtOAc).

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.87 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 165.5, 154.4, 148.6, 127.3, 124.9, 119.1, 116.2, 61.8, 56.5, 52.6. IS (film, cm⁻¹) 3087, 2947, 2832, 1732, 1575, 1259, 1002. AIMS (ESI/ TOF-Q) m / z : [M+Na]⁺ Aprēķināts C₁₀H₁₁O₄BrNa: 296,9738; Noteikts: 296,9737.

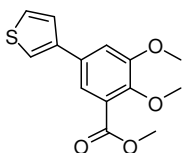
Metil 5-ciklopropil-2,3-dimetoksibenzoāts (**161e**)



Izkarsētā un Ar plūsmā atdzesētā mikroviļņu ampulā iesvēra bromīdu **159** (1,00 g, 3,64 mmol), ciklopropilborskābi (**160a**) (0,47 g, 5,46 mmol), Pd(OAc)₂ (82 mg, 0,36 mmol), tricikloheksilfosfīnu (0,20 g, 0,73 mmol) un b/ū K₃PO₄ (2,32 g, 10,9 mmol), pievienoja toluolu (16 mL) un destilētu ūdeni (4 mL), reakcijas maisījumu degazēja, cauri suspensijai burbuļojot Ar ~10 min, tad karsēja 86 °C 15 stundas. Iegūto brūno suspensiju atdzesēja līdz istabas temperatūrai, pievienoja ūdeni (25 mL), ekstrahēja ar EtOAc (3x15 mL), organiskos slāņus apvienoja, mazgāja ar pies. NaCl ūd. šķīdumu, žāvēja uz b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/EtOAc 100:0, tad 9:1). Ieguva 0,85 g (99%) ciklopropilatvasinājuma **161e** kā dzeltenoranžu eļļu. $R_f = 0,43$ (4:1 PĒ/EtOAc).

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.01 (dd, $J = 2.2, 0.5$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 1.91–1.82 (m, 1H), 0.99–0.91 (m, 2H), 0.71–0.64 (m, 2H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.1, 153.4, 147.0, 139.9, 125.7, 119.1, 114.2, 61.6, 56.2, 52.3, 15.4, 9.0 m.d. IS (plēve, cm⁻¹) 3083, 3001, 2842, 1729, 1490, 1268, 1064. AIMS (ESI/ TOF-Q) m / z : [M+Na]⁺ Aprēķināts C₁₃H₁₆O₄Na: 259,0946; Noteikts: 259,0952.

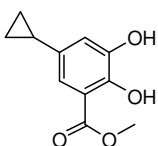
Metil 2,3-dimetoksi-5-(tiofēn-3-il)benzoāts (161f)



Izkarsētā un Ar plūsmā atdzesētā mikroviļņu ampulā iesvēra bromīdu **159** (1,00 g, 3,64 mmol), tiofēn-3-borskābi (0,70 g, 5,46 mmol), Pd(OAc)₂ (82 mg, 0,36 mmol), tricikloheksilfosfīnu (0,20 g, 0,73 mmol) un b/ū K₃PO₄ (2,32 g, 10,9 mmol), pievienoja toluolu (16 mL) un destilētu ūdeni (4 mL), reakcijas maisījumu degazēja, cauri suspensijai burbuļojot Ar ~10 min, tad karsēja 86 °C 15 stundas. Iegūto brūno suspensiju atdzesēja līdz istabas temperatūrai, pievienoja ūdeni (25 mL), ekstrahēja ar EtOAc (3x15 mL), organiskos slāņus apvienoja, mazgāja ar pies. NaCl ūd. šķīdumu, žāvēja uz b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/EtOAc 100:0, tad 9:1). Ieguva 0,98 g (97%) 3-tienil-atvasinājuma **161f** kā brūnu eļļu. R_f = 0,39 (4:1 PĒ/EtOAc).

¹H KMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.55 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 2.9, 1.4 Hz, 1H), 7.39 (dd, *J* = 5.0, 2.9 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 5.0, 1.4 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.94–3.92 (m, 6H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.8, 153.8, 148.4, 141.4, 132.1, 126.6, 126.4, 126.3, 120.7, 120.4, 114.2, 61.8, 56.4, 52.4 m.d. IS (plēve, cm⁻¹) 3108, 2947, 2831, 1728, 1488, 1267, 1061. AIMS (ESI/ TOF-Q) m/z: [M+Na]⁺ Aprēķināts C₁₄H₁₄O₄NaS: 301,0510; Noteikts: 301,0505.

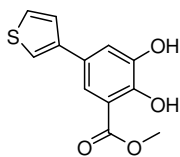
Metil 5-ciklopropil-2,3-dihidroksibenzoāts (162e)



Ar atmosfērā dimetoksibenzoāta **161e** (0,80 g, 3,39 mmol) šķīdumu sausā CH₂Cl₂ (35mL) atdzesēja līdz -69 °C un piepilināja 1M BBr₃ šķīdumu CH₂Cl₂ (13,5 mL, 13,5 mmol). Iegūto brūno šķīdumu maisīja -69 °C 40 minūtes, tad atsildīja līdz 0°C un maisīja vēl 1 stundu. Reakcijas maisījumam 0°C lēnām pievienoja ūdeni (40 mL), tad ekstrahēja ar CH₂Cl₂ (3x15 mL), organiskos slāņus apvienoja, mazgāja ar pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja uz b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Produktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/EtOAc 4:1). Ieguva 0,51 g (73%) produkta **162e** kā zaļganu amorfu vielu. R_f = 0,46 (PĒ/EtOAc 4:1).

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.65 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 2.2, 0.6 Hz, 1H), 6.84 (dt, *J* = 2.2, 0.6 Hz, 1H), 5.59 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 1.86–1.77 (m, 1H), 0.93–0.86 (m, 2H), 0.65–0.58 (m, 2H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.8, 146.9, 145.0, 135.2, 117.9, 117.7, 112.1, 52.5, 14.9, 8.6 m.d. IS (plēve, cm⁻¹) 3468, 3123, 3008, 2958, 1669, 1496, 1436, 1375, 1274, 1016. AIMS (ESI/ TOF-Q) m/z : [M-H]⁻ Aprēķināts C₁₁H₁₁O₄: 207,0664; Noteikts: 207,0657.

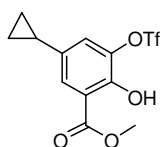
Metil 2,3-dihidroksi-5-(tiofēn-3-il)benzoāts (**162f**)



Ar atmosfērā dimetoksibenzoāta **161f** (0,90 g, 3,23 mmol) šķīdumu sausā CH_2Cl_2 (32 mL) atdzesēja līdz $-72\text{ }^\circ\text{C}$ un piepilināja 1M BBr_3 šķīdumu CH_2Cl_2 (16,2 mL, 16,2 mmol). Iegūto brūno šķīdumu maisīja $-69\text{ }^\circ\text{C}$ 30 minūtes, tad atsildīja līdz 0°C un maisīja 1,5 stundu. Reakcijas maisījumam $0\text{ }^\circ\text{C}$ lēnām pievienoja ūdeni (40 mL), tad ekstrahēja ar CH_2Cl_2 (3x15 mL), organiskos slāņus apvienoja, mazgāja ar pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja uz b/ū Na_2SO_4 un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Produktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/EtOAc 4:1). Ieguva 0,53 g (66%) produkta **162f** kā oranžu amorfu vielu. $R_f = 0,39$ (PĒ/EtOAc 4:1).

^1H KMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.87 (d, $J = 0.7$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.39–7.35 (m, 3H), 7.35–7.32 (m, 1H), 5.75–5.64 (br s, 1H), 3.99 (s, 3H) m.d. ^{13}C KMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170.8, 148.2, 145.4, 141.3, 127.8, 126.5, 126.22, 119.9, 118.3, 118.2, 112.6, 52.7 m.d. IS (plēve, cm^{-1}) 3466, 3103, 2957, 1675, 1442, 1311, 1236, 1181, 1012. AIMS (ESI/TOF-Q) m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ Aprēķināts $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_4\text{S}$: 249,0222; Noteikts: 249,0229.

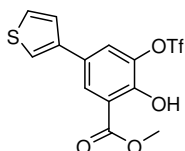
Metil 5-ciklopropil-2-hidroksi-3-(((trifluormetil)sulfonyl)oksi)benzoāts (**163e**)



Savienojuma **162e** (480 mg, 2,30 mmol) šķīdumu sausā CH_2Cl_2 (10 mL) atdzesēja līdz 0°C , pievienoja Et_3N (0,64 mL, 4,60 mmol) un Tf_2NPh (905 mg, 2,53 mmol). Iegūto šķīdumu maisīja $0\text{ }^\circ\text{C}$ vēl 20 minūtes, tad ļāva atsilt līdz istabas temperatūrai un maisīja 2 stundas. Zaļgano šķīdumu atšķaidīja ar CH_2Cl_2 (50 mL), mazgāja ar 1M HCl ūd. šķīd., ūdens slāni ekstrahēja ar CH_2Cl_2 (2x20 mL), organiskos slāņus apvienoja un mazgāja pies. NaHCO_3 ūd. šķīd., pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja virs b/ū Na_2SO_4 un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/EtOAc 20:1, tad 4:1). Ieguva 604 mg (77%) triflāta **163e** kā baltu amorfu vielu. $R_f = 0,60$ (PE/EtOAc 4:1).

^1H KMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.90 (d, $J = 0.6$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 1.93–1.81 (m, 1H), 1.03–0.94 (m, 2H), 0.69–0.60 (m, 2H) m.d. ^{13}C KMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169.7, 151.5, 137.8, 135.2, 126.8, 126.4, 118.7 (q, $J_{\text{CF}} = 320$ Hz, CF_3), 114.6, 53.0, 14.7, 8.9 m.d. IS (plēve, cm^{-1}) 3189, 3089, 3012, 2962, 1696, 1423, 1196, 1064. AIMS (ESI/TOF-Q) m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ Aprēķināts $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_6\text{SF}_3$: 339,0150; Noteikts 339,0155.

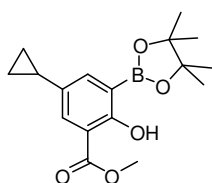
Metil 2-hidroksi-5-(tiofēn-3-il)-3-(((trifluormetil)sulfonyl)oksi)benzoāts (163f)



Savienojuma **162f** (500 mg, 1,98 mmol) šķīdumu sausā CH₂Cl₂ (10 mL) atdzesēja līdz 0 °C, pievienoja Et₃N (0,55 mL, 3,96 mmol) un Tf₂NPh (0,78 g, 2,18 mmol). Iegūto šķīdumu maisīja 0 °C vēl 20 minūtes, tad ļāva atsilt līdz istabas temperatūrai un maisīja 2 stundas. Zaļganbrūno šķīdumu atšķaidīja ar CH₂Cl₂ (50 mL), mazgāja ar 1M HCl ūd. šķīd., ūdens slāni ekstrahēja ar CH₂Cl₂ (2x20 mL), organiskos slāņus apvienoja un mazgāja pies. NaHCO₃ ūd. šķīd., pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja virs b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/EtOAc 20:1, tad 4:1). Ieguva 580 mg (76%) triflāta **163f** kā baltu amorfu vielu. R_f = 0,56 (PĒ/EtOAc 4:1).

¹H KMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11.10 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.45–7.39 (m, 2H), 7.33–7.28 (m, 1H), 4.02 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.7, 152.7, 139.5, 138.2, 129.9, 127.3, 126.3, 125.9, 123.9, 121.0, 118.9 (q, *J*_{CF} = 320 Hz, CF₃), 115.1, 53.2 m.d. IS (plēve, cm⁻¹) 3185, 2955, 1695, 1423, 1334, 1201, 1139, 994. AIMS (ESI/ TOF-Q) m/z: [M-H]⁻ Aprēķināts C₁₃H₈O₆S₂F₃: 380,9714; Noteikts: 380,9714.

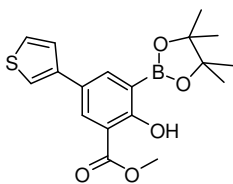
Metil 5-ciklopropil-2-hidroksi-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioksaborolān-2-il)benzoāts (128e)



Izkarsētā un Ar plūsmā atdzesētā mikroviļņu ampulā triflātu **163e** (500 mg, 1,47 mmol), bis(pinakol)diborānu (448 mg, 1,76 mmol), Pd(OAc)₂ (17 mg, 0,07 mmol), PCy₃ (41 mg, 0,15 mmol) un KOAc (433 mg, 4,41 mmol) suspendēja sausā degazētā 1,4-dioksānā (3 mL), reakcijas maisījumu izpūta ar Ar un oranžo suspensiju karsēja slēgtā mikroviļņu ampulā 3 stundas 90 °C. Iegūto tumši brūno suspensiju atdzesēja līdz istabas temperatūrai, atšķaidīja ar EtOAc, pievienoja pies. NH₄Cl ūd. šķīd., ūdens slāni ekstrahēja ar EtOAc (3x5 mL), organiskos slāņus apvienoja, mazgāja ar pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja virs b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/acetons 9:1). Ieguva 142 mg (30%) pinakolāta **128e** kā brūnu eļļu. R_f = 0,46 (4:1 PĒ/EtOAc).

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 11.14 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 2.5, 0.6 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 1.90–1.81 (m, 1H), 1.35 (s, 12H), 0.92–0.86 (m, 2H), 0.67–0.61 (m, 2H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.7, 164.3, 142.1, 133.9, 130.4, 112.0, 83.9, 52.4, 25.0, 14.6, 8.3 m. d. IR (plēve, cm⁻¹) 3161, 3083, 2996, 1679, 1607, 1436, 1353, 1323, 1255, 1143. AIMS (ESI/ TOF-Q) m/z: [M+Na]⁺ Aprēķināts C₁₇H₂₃O₅BNa: 341,1536; Noteikts: 341,1546.

Metil 2-hidroksi-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioksaborolān-2-il)-5-(tiofēn-3-il)benzoāts (128f)



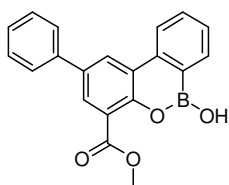
Izkarsētā un Ar plūsmā atdzesētā mikroviļņu ampulā triflātu **163f** (500 mg, 1,52 mmol), bis(pinakol)diborānu (463 mg, 1,82 mmol), Pd(OAc)₂ (17 mg, 0,07 mmol), PCy₃ (44 mg, 0,15 mmol) un KOAc (447 mg, 4,56 mmol) suspendēja sausā degazētā 1,4-dioksānā (3 mL), reakcijas maisījumu izpūta ar Ar un dzelteni suspensiju karsēja slēgtā mikroviļņu ampulā 3 stundas 90 °C. Iegūto tumši brūno suspensiju atdzesēja līdz istabas temperatūrai, atšķaidīja ar EtOAc, pievienoja pies. NH₄Cl ūd. šķīd., ūdens slāni ekstrahēja ar EtOAc (3x5 mL), organiskos slāņus apvienoja, mazgāja ar pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja virs b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Jēlproduktu attīrīja ar tiešās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (PĒ/acetons 9:1). Ieguva 175 mg (32%) pinakolāta **128f** kā brūnu eļļu. R_f = 0,46 (4:1 PĒ/EtOAc).

¹H KMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11.34 (s, 1H), 8.19–8.13 (m, 2H), 7.44–7.41 (m, 1H), 7.41–7.35 (m, 2H), 3.97 (s, 3H), 1.39 (s, 12H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.6, 165.4, 141.8, 141.2, 131.1, 129.8, 127.2, 126.4, 123.9, 119.8, 112.4, 84.1, 52.6, 25.0 m.d. IS (plēve, cm⁻¹) 3202, 3112, 2979, 1676, 1606, 1447, 1372, 1324, 1245, 1144. AIMS (ESI/ TOF-Q) m/z :[M+Na]⁺ Aprēķināts C₁₈H₂₁O₅NaSB: 383,1100; Noteikts: 383,1097.

Vispārīgā Suzuki-Miyaura šķērssametināšanas reakcijas procedūra

Izkarsētā un Ar plūsmā atdzesētā mikroviļņu ampulā iesvēra triflātu **129** (1,0 ekviv.), pinakolātu **128a-f** (1,5 ekviv.), Pd(OAc)₂ (5 mol%), CyJohnPhos (0,1 ekviv.) un K₃PO₄ monohidrātu (1,5 ekviv.). Ampulu aptina ar foliju, izpūta ar Ar, pievienoja 1,4-dioksānu/ūdeni (10:1) (0,1-0,2M rēķinot uz triflātu) un karsēja 90 °C 2-4 stundas. Reakcijas maisījumu atdzesēja līdz istabas temperatūrai, pievienoja pies. NH₄Cl ūd. šķīd., pēc iespējas samazinot apgaismojumu, ekstrahēja ar EtOAc (x3), mazgāja ar ūdeni (x2) un pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja virs b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Atlikumu attīrīja ar kolonnu hromatogrāfijas palīdzību, kolonnu aptinot ar foliju, vai izgulsnējot.

Metil 6-hidroksi-2-fenil-6H-dibnezo[c,e][1,2]oksaborinīn-4-karboksilāts (164a)

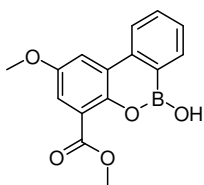


Ciklisko boronātu **164a** (111 mg, 31%) kā pelēku cietu vielu ieguva pēc vispārīgās Suzuki-Miyaura šķērssametināšanas reakcijas procedūras no pinakolāta **128a** (380 mg, 1,07 mmol), triflāta **129** (280 mg, 0,72 mmol), Pd(OAc)₂ (8 mg, 0,036 mmol), CyJohnPhos (25 mg, 0,072 mmol) un K₃PO₄ monohidrāta (246 mg, 1,07 mmol) dioksāna/H₂O maisījumā (6 mL/0,6 mL). Atlikumu

šķīdināja EtOAc (2 mL) un pievienoja MeOH (2 mL), izveidojušās nogulsnes nofiltrēja, filtrātu ietvaicēja pazeminātā spiedienā un izgulsnēšanas procedūru atkārtoja vēl 2 reizes. Nogulsnes apvienoja, suspendēja MeCN (2 mL)/H₂O (0,2 mL), piepilināja divus pilienus TFA un iegūto pelēko suspensiju maisīja istabas temperatūrā 30 minūtes, tad ietvaicēja pazeminātā spiedienā. R_f = 0,30 (9:1 PĒ/acetons).

¹H KMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.62 (s, 1H), 8.70 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.15 (dd, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.85–7.81 (m, 2H), 7.78 (ddd, *J* = 8.2, 7.3, 1.5 Hz, 1H), 7.55 (td, *J* = 7.3, 0.8 Hz, 1H), 7.53–7.48 (m, 2H), 7.44–7.38 (m, 1H), 3.92 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.4, 148.7, 139.0, 138.8, 133.8, 133.5, 133.3, 132.5, 129.0, 127.9, 127.5, 126.8, 125.2, 125.0, 123.8, 123.5, 122.7, 52.3 m.d. IS (KBr, cm⁻¹) 3369, 2952, 1705, 1605, 1490, 1412, 1388, 1301, 1232, 762. AIMS (ESI/ TOF-Q) m/z: [M+H]⁺ Aprēķināts C₂₀H₁₆BO₄: 331,1142; Noteikts: 331,1154.

Metil 6-hidroksi-2-metoksi-6*H*-dibenzo[*c,e*][1,2]oksaborinīn-4-karboksilāts (164b)

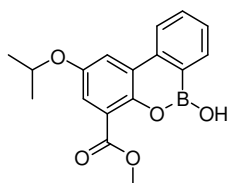


Ciklisko boronātu **164b** (131 mg, 63%) kā brūnu amorfu vielu ieguva pēc visparīgās *Suzuki-Miyaura* šķērssametināšanas reakcijas procedūras no pinakolāta **128b** (335 mg, 1,08 mmol), triflāta **129** (284 mg, 0,72 mmol), Pd(OAc)₂ (12 mg, 0,054 mmol), CyJohnPhos (25 mg, 0,011 mmol) un

K₃PO₄ monohidrāta (249 mg, 1,08 mmol) dioksāna/H₂O maisījumā (6 mL/0,6 mL). Atlikumu attīrīja ar apgrieztās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (KP-C18-HS 12 g kolona), gradients no 10-100% MeCN/H₂O+0,1% TFA.

¹H KMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.13 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.76–7.65 (m, 1H), 7.50 (t, *J* = 7.4, 1H), 7.43 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 6.18 (s, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.91 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.5, 153.9, 145.0, 139.5, 133.7, 132.7, 128.00, 125.0, 121.9, 115.7, 113.6, 56.1, 52.5 m.d. IS (KBr, cm⁻¹) 3421, 2950, 2839, 1711, 1605, 1497, 1339, 1300, 1215. AIMS (ESI/ TOF-Q) m / z :[M+H]⁺ + Aprēķināts C₁₅H₁₄BO₅: 285,0934; Noteikts: 285,0945.

Metil 6-hidroksi-2-izopropoksi-6*H*-dibenzo[*c,e*][1,2]oksaborinīn-4-karboksilāts (164c)



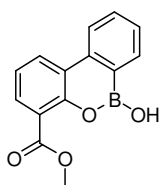
Ciklisko boronātu **164c** (32 mg, 51%) kā brūnu eļļu ieguva pēc visparīgās *Suzuki-Miyaura* šķērssametināšanas reakcijas procedūras no pinakolāta **128c** (100 mg, 0,30 mmol), triflāta **129** (78 mg, 0,20 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0,01 mmol), CyJohnPhos (7 mg, 0,02 mmol) un K₃PO₄ monohidrāta

(69 mg, 0,30 mmol) dioksāna/H₂O maisījumā (1 mL/0,1 mL). Atlikumu attīrīja ar apgrieztās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (KP-C18-HS 12 g kolonna), gradients no 10-100%

MeCN/H₂O+0,1% TFA. Papildus attīra uz preparatīvās PSH plāksnes sistēmā PĒ/EtOAc/AcOH (30:20:0,5).

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (dd, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.70 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.49 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.45–7.40 (m, 1H), 6.15 (s, 1H), 4.61 (hept, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.38 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 174.5, 166.6, 152.1, 145.0, 139.6, 133.7, 132.7, 131.2, 127.9, 125.1, 121.9, 118.3, 116.2, 71.4, 52.5, 22.2 m.d. IS (KBr, cm⁻¹) 3415, 2976, 2932, 1705, 1605, 1494, 1328, 1301, 1209, 1114, 1014. AIMS (ESI/ TOF-Q) m/z: [M+H]⁺ Aprēķināts C₁₇H₁₈BO₅: 313,1247; Noteikts: 313,1249.

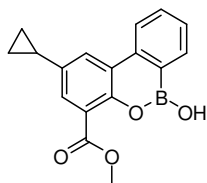
Metil 6-hidroksi-6*H*-dibenzo[*c,e*][1,2]oksaborinīn-4-karboksilāts (164d)



Ciklisko boronātu **164d** (31 mg, 44%) kā brūnu eļļu ieguva pēc vispārīgās *Suzuki-Miyaura* šķērssametināšanas reakcijas procedūras no pinakolāta **128d** (120 mg, 0,42 mmol), triflāta **129** (110 mg, 0,28 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0,014 mmol), CyJohnPhos (10 mg, 0,028 mmol) un K₃PO₄ monohidrāta (97 mg, 0,42 mmol) dioksāna/H₂O maisījumā (1 mL/0,1 mL). Atlikumu attīrīja ar apgrieztās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (KP-C18-HS 12 g kolona), gradients no 10-100% MeCN/H₂O+0,1% TFA. Papildus attīrīja uz preparatīvās PSH plāksnes sistēmā PĒ/EtOAc/AcOH (30:20:0,5).

¹H KMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.85–9.21 (br s, 1H), 8.49 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.12 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.79–7.72 (m, 1H), 7.69 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 1H), 7.53 (td, *J* = 7.4, 0.9 Hz, 1H), 7.29 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, DMSO) δ 166.5, 149.2, 139.1, 133.4, 132.6, 129.5, 127.7, 127.4, 123.2, 123.0, 122.2, 121.8, 52.2 m.d. ŠH/MS [M+1]⁺ 255.

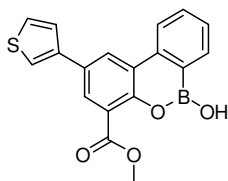
Metil 2-ciklopropil-6-hidroksi-6*H*-dibenzo[*c,e*][1,2]oksaborinīn-4-karboksilāts (164e)



Ciklisko boronātu **164e** (38 mg, 25%) kā pelēku eļļu ieguva pēc vispārīgās *Suzuki-Miyaura* šķērssametināšanas reakcijas procedūras no pinakolāta **128e** (240 mg, 0,75 mmol), triflāta **129** (197 mg, 0,50 mmol), Pd(OAc)₂ (6 mg, 0,025 mmol), CyJohnPhos (17 mg, 0,050 mmol) un K₃PO₄ monohidrāta (172 mg, 0,75 mmol) dioksāna/H₂O maisījumā (2 mL/0,2 mL). Atlikumu attīrīja ar apgrieztās fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (KP-C18-HS 12 g kolona), gradients no 10-100% MeCN/H₂O+0,1% TFA. Papildus attīrīja uz preparatīvās PSH plāksnes sistēmā PĒ/EtOAc/AcOH (30:20:0,5). R_f = 0,67 (PE/EtOAc/AcOH 30:20:0,5).

¹H KMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.17–8.10 (m, 2H), 8.05 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.74–7.68 (m, 1H), 7.59 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.49 (td, *J* = 7.3, 0.9 Hz, 1H), 6.49 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.03–1.97 (m, 1H), 1.06–0.98 (m, 2H), 0.79–0.73 (m, 2H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.8, 148.8, 139.7, 137.1, 133.7, 132.6, 128.3, 127.8, 125.8, 123.9, 121.8, 121.2, 52.4, 15.2, 8.9 m.d. IS (KBr, cm⁻¹) 3404, 3082, 3003, 2951, 1713, 1495, 1377, 1301, 1219. AIMS (ESI/TOF-Q) m/z: [M+H]⁺ Aprēķināts C₁₇H₁₆BO₄: 295,1142; Noteikts: 295,1154.

Metil 6-hidroksi-2-(tiofēn-3-il)-6*H*-dibenzo[*c,e*][1,2]oksaborinīn-4-karboksilāts (164f)



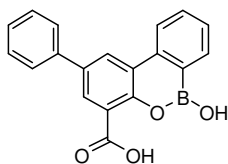
Ciklisko boronātu **164f** (41 mg, 30%) kā brūnu eļļu ieguva pēc vispārīgās *Suzuki-Miyaura* šķērssametināšanas reakcijas procedūras no pinakolāta **128e** (150 mg, 0,42 mmol), triflāta **129** (108 mg, 0,28 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0,014 mmol), CyJohnPhos (10 mg, 0,028 mmol) un K₃PO₄ monohidrāta (96 mg, 0,42 mmol) dioksāna/H₂O maisījumā (1 mL/0,1 mL). Atlikumu attīrīja ar apgrieztais fāzes kolonnu hromatogrāfijas palīdzību (KP-C18-HS 12 g kolona), gradients 10-100% MeCN/H₂O+0,1% TFA. Papildus attīrīja uz preparatīvās PSH plāksnes sistēmā PĒ/EtOAc/AcOH (30:20:0,5). R_f = 0,63 (PE/EtOAc/AcOH 30:21:0,5).

¹H KMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.50 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.15 (dd, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.74 (ddd, *J* = 8.2, 7.3, 1.5 Hz, 1H), 7.57–7.42 (m, 4H), 4.00 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.5, 149.8, 141.2, 139.6, 133.8, 132.8, 130.0, 129.1, 128.1, 126.8, 126.5, 125.8, 124.5, 121.9, 121.9, 120.7, 52.5 m.d. IS (KBr, cm⁻¹) 3393, 3101, 2952, 1717, 1436, 1386, 1299, 1235. AIMS (ESI/TOF-Q) m/z: [M+H]⁺ + Aprēķināts C₁₈H₁₄BO₄S: 337,0706; Noteikts: 337,0717.

Vispārīgā metilestera hidrolīzes procedūra

Estera **164a-f** (1 ekviv.) šķīdumu THF (1 mmol /3 mL) atdzesēja līdz 0°C un pievienoja LiOH·H₂O (5 ekviv.) šķīdumu H₂O (THF/H₂O tilpumu attiecība 1:1) un ļāva lēnām atsilt līdz istabas temperatūrai maisot 19 stundas. Iegūto šķīdumu paskābināja ar 1M HCl ūdens šķīdumu līdz pH ~1, maisīja istabas temperatūrā 2 stundas, nogulsnes nofiltrēja, uz filtra mazgāja ar H₂O un žāvēja eksikatorā virs P₂O₅.

6-Hidroksi-2-fenil-6*H*-dibenzo[*c,e*][1,2]oksaborinīn-4-karbonskābe (109a)

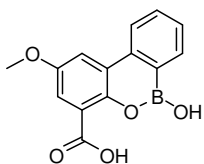


Estera **164a** (90 mg, 0,27 mmol) šķīdumam THF (1,1 mL) istabas temperatūrā pievienoja LiOH·H₂O (57 mg, 1,36 mmol) šķīdumu H₂O (1,4 mL) un maisīja istabas temperatūrā 19 stundas. Iegūto šķīdumu paskābināja ar 1M HCl ūdens šķīdumu līdz pH ~1, ekstrahēja ar EtOAc (3x3 mL), mazgāja ar

pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja virs b/ū Na₂SO₄ un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Ieguva 78 mg (91%) savienojuma **109a** kā pelēku cietu vielu.

¹H KMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.83 (s, 1H), 9.60 (s, 1H), 8.67 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 8.56 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.15 (dd, 1H, *J* = 7.5, 1.3 Hz), 7.93 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 7.87–7.81 (m, 2H), 7.81–7.74 (m, 1H), 7.59–7.45 (m, 3H), 7.45–7.36 (m, 1H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.5, 148.5, 139.1, 139.0, 133.7, 133.4, 132.5, 129.0, 127.8, 127.5, 127.4, 126.8, 125.0, 124.6, 123.6, 122.7 m.d. ¹¹B KMR (DMSO-*d*₆) 28.3 m.d. IS (KBr, cm⁻¹) 3411, 3217, 1713, 1610, 1455, 1424, 1308, 754, 691. AIMS (ESI/ TOF-Q) m/z: [M+H]⁺ Aprēķināts C₁₉H₁₄BO₄: 317,0985; Noteikts: 317,0994.

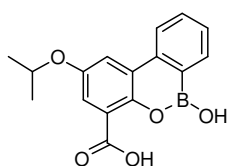
6-Hidroksi-2-metoksi-6*H*-dibenzo[*c,e*][1,2]oksaborinīn-4-karbonskābe (**109b**)



Savienojumu **109b** (36 mg, 77%) kā pelēku cietu vielu ieguva pēc vispārīgās metilestera hidrolīzes procedūras no estera **164b** (50 mg, 0,18 mmol) un LiOH·H₂O (37 mg, 0,88 mmol).

¹H KMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.91 (s, 1H), 9.45 (s, 1H), 8.37 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.11 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.78–7.70 (m, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.4, 1H), 7.23 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.5, 158.7, 148.4, 144.3, 138.6, 137.6, 133.0, 130.2, 129.1, 127.8, 120.1, 116.5, 61.0 m.d. IS (KBr, cm⁻¹) 3261, 3198, 1728, 1607, 1449, 1373, 1284, 1034. AIMS (ESI/ TOF-Q) m/z: [M+H]⁺ Aprēķināts C₁₄H₁₂BO₅: 271,0778; Noteikts: 271,0782.

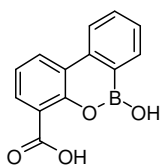
6-Hidroksi-2-izopropoksi-6*H*-dibenzo[*c,e*][1,2]oksaborinīn-4-karbonskābe (**109c**)



Savienojumu **164c** (16 mg, 59%) kā pelēku cietu vielu ieguva pēc vispārīgās metilestera hidrolīzes procedūras no estera **164c** (25 mg, 0,093 mmol) un LiOH·H₂O (19 mg, 0,46 mmol).

¹H KMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.93 (s, 1H), 9.44 (s, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.76–7.68 (m, 1H), 7.55–7.48 (m, 1H), 7.20 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 4.75 (hept, *J* = 6.0 Hz, 1H), 1.30 (s, 3H), 1.29 (s, 3H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.3, 151.6, 143.1, 139.1, 133.4, 132.4, 127.7, 125.0, 124.0, 122.6, 116.9, 113.7, 70.2, 21.8 m.d. IS (KBr, cm⁻¹) 3304, 3201, 2975, 2604, 1699, 1604, 1493, 1301, 1109. AIMS (ESI/ TOF-Q) m/z: [M+H]⁺ Aprēķināts C₁₆H₁₆BO₅: 299,1091; Noteikts: 299,1106.

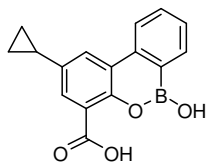
6-Hidroksi-6*H*-dibenzo[*c,e*][1,2]oksaborinīn-4-karbonskābe (109d)



Savienojumu **109d** (19 mg, 68%) kā pelēku cietu vielu ieguva pēc vispārīgās metilestera hidrolīzes procedūras no estera **164d** (30 mg, 0,12 mmol) un LiOH·H₂O (25 mg, 0,59 mmol).

¹H KMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.89 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.45 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 8.34 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.12 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.75 (ddd, *J* = 8.3, 7.2, 1.5 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 1H), 7.52 (td, *J* = 7.3, 0.9 Hz, 1H), 7.27 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.63, 148.97, 139.21, 133.44, 132.52, 129.32, 127.65, 126.79, 124.41, 123.10, 122.22, 121.77 m.d. IS (KBr, cm⁻¹) 3291, 3190, 3062, 1700, 1605, 1405, 1353, 1279, 1248. AIMS (ESI/ TOF-Q) *m/z*: [M+H]⁺ Aprēķināts C₁₃H₁₀BO₄: 241,0672; Noteikts: 241,0676.

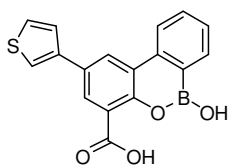
2-Ciklopropil-6-idroksi-6*H*-dibenzo[*c,e*][1,2]oksaborinīn-4-karbonskābe (109e)



Savienojumu **109e** (20 mg, 74%) kā pelēku cietu vielu ieguva pēc vispārīgās metilestera hidrolīzes procedūras no estera **164e** (29 mg, 0,098 mmol) un LiOH·H₂O (21 mg, 0,49 mmol).

¹H KMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.10–12.55 (br s, 1H), 9.48 (s, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.18–8.04 (m, 2H), 7.80–7.69 (m, 1H), 7.51 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 2.12–2.02 (m, 1H), 1.04–0.92 (m, 2H), 0.84–0.74 (m, 2H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.7, 146.9, 139.2, 136.9, 133.4, 132.4, 127.5, 126.1, 124.9, 124.2, 123.5, 122.8, 122.4, 14.6, 9.2 m.d. IS (KBr, cm⁻¹) 3269, 3086, 2999, 2365, 1720, 1607, 1436, 1280, 1023. AIMS (ESI/ TOF-Q) *m/z*: [M+H]⁺ Aprēķināts C₁₆H₁₄BO₄: 281,0985; Noteikts: 281,0995.

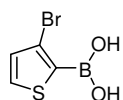
6-Hidroksi-2-(tiofēn-3-il)-6*H*-dibenzo[*c,e*][1,2]oksaborinīn-4-karbonskābe (109f)



Savienojumu **109f** (25 mg, 93%) kā pelēku cietu vielu ieguva pēc vispārīgās metilestera hidrolīzes procedūras no estera **164f** (29 mg, 0,086 mmol) un LiOH·H₂O (18 mg, 0,43 mmol).

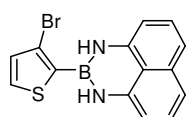
¹H KMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.03 (s, 1H), 9.82–9.37 (m, 1H), 8.72 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.14 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 2.9, 1.3 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.83–7.74 (m, 2H), 7.68 (dd, *J* = 5.0, 2.9 Hz, 1H), 7.55 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H) m.d. ¹³C KMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.6, 147.9, 140.3, 139.2, 133.4, 132.5, 129.0, 127.8, 127.1, 126.6, 126.5, 125.1, 123.7, 123.5, 122.7, 121.1 m.d. IS (KBr, cm⁻¹) 3325, 3099, 2575, 2256, 2127, 1942, 1717, 1609, 1296, 1003. AIMS (ESI/ TOF-Q) *m/z*: [M+H]⁺ Aprēķināts C₁₇H₁₁BO₄S: 323,0549; Noteikts: 323,0559.

(3-Bromtiofēn-2-il)borskābe (170)



2M LDA šķīdumu THF (3,7 mL, 7,36 mmol) atšķaidīja sausā THF (15 mL), Ar atmosfērā atdzesēja līdz $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ un piepilināja 3-bromtiofēna (0,57 mL, 6,13 mmol) šķīdumu sausā THF (10 mL). Izveidojušos brūno šķīdumu maisīja $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā 1 stundu. Iegūtajam dzeltenajam šķīdumam $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ piepilināja $\text{B}(\text{OMe})_3$ (1,4 mL, 12,3 mmol), maisīja $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 minūtes, tad istabas temperatūrā 20 stundas. Iegūto brūno šķīdumu atdzesēja ledus-ūdens vannā un paskābināja ar 1M HCl ūd. šķīd. (50 mL), nodalīja organisko slāni, mazgāja ar pies. NH_4Cl ūd. šķīd. (20 mL). Ūdens slāni ekstrahēja ar Et_2O (2x20 mL), organiskos slāņus apvienoja, mazgāja ar pies. NaCl ūd. šķīdumu, žāvēja virs b/ū Na_2SO_4 , filtrēja un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Ieguva 799 mg (63%) produkta **170** kā pelēku amorfu vielu, kuru bez attīrīšanas izmantoja nākamajā sintēzes solī.

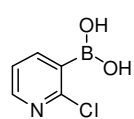
2-(3-Bromtiofēn-2-il)-2,3-dihidro-1H-nafto[1,8-de][1,3,2]diazaborinīns (165)



Borskābi **170** (739 mg, 3,57 mmol) suspendēja sausā CH_2Cl_2 (9 mL), pievienoja 4Å molekulāros sietus (~500 mg), 1,8-diaminonaftalīnu (**131**) (565 mg, 3,57 mmol) un maisīja tumsā istabas temperatūrā 1 stundu. Reakcijas maisījumu filtrēja caur Celītu, Celīta slāni mazgāja ar CH_2Cl_2 , filtrātus apvienoja un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Ieguva 1,10 g (94%) savienojuma **165** kā zaļganbrūnu amorfu vielu.

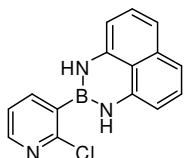
^1H KMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.51 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 7.17–7.12 (m, 3H), 7.07 (dd, $J = 8.4, 1.1$ Hz, 2H), 6.43 (dd, $J = 7.3, 1.1$ Hz, 2H), 6.30 (s, 2H) m.d. ^{13}C KMR (101 MHz, CDCl_3) δ 140.6, 136.4, 132.9, 130.2, 127.7, 120.0, 118.3, 116.5, 106.4 m.d.

(2-Hlorpiridīn-3-il)borskābe (172)



Ar atmosfērā diizopropilamīnu (1,05 mL, 7.5 mmol) šķīdināja sausā THF (12 mL), atdzesēja līdz $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, piepilināja $n\text{BuLi}$ (3,0 mL, 7,5 mmol) un maisīja $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā 30 minūtes. Tad reakcijas maisījumu atdzesēja līdz $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, piepilināja 2-hlorpiridīna (**171**) (567 mg, 5,0 mmol) šķīdumu sausā THF (10 mL) un maisīja $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā vēl 1,5 stundu. Tālāk reakcijas maisījumam piepilināja $\text{B}(\text{OMe})_3$ (0,84 mL, 7,5 mmol) turpināja maisīt $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā 2 stundas. Reakcijas maisījumam pievienoja THF/ H_2O maisījumu (5mL/1mL), atsildīja atsildīja reakcijas maisījumu līdz $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, pievienoja vēl H_2O (5 mL) un Et_2O (5 mL), paskābināja ar konc. HCl līdz pH 1, ekstrahēja ar EtOAc (3x5 mL), organiskos slāņus apvienoja, mazgāja ar pies. NaCl ūd. šķīd., žāvēja virs b/ū Na_2SO_4 , filtrēja un ietvaicēja pazeminātā spiedienā. Ieguva 484 mg (61%) produkta **172** kā sārtu amorfu vielu, kuru bez attīrīšanas izmantoja nākamajā sintēzes solī.

2-(2-Hloropiridīn-3-il)-2,3-dihidro-1H-nafto[1,8-de][1,3,2]diazaborinīns (166)



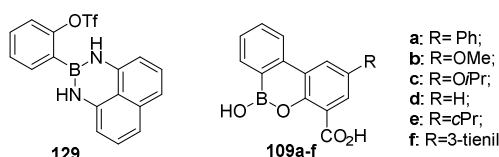
Borskābi **172** (480 mg, 3,05 mmol) suspendēja sausā CH_2Cl_2 (5 mL), pievienoja 4Å molekulāros sietus (~300 mg), 1,8-diaminonafalīnu (723 mg, 4,57 mmol) un maisīja tumsā istabas temperatūrā 21 stundu. Reakcijas maisījumu filtrēja caur Celītu, Celīta slāni mazgāja ar CH_2Cl_2 , filtrātus apvienoja un ietvaicēja. Ieguva 470 mg (55%) savienojuma **166** kā pelēku amorfu vielu.

^1H KMR (400 MHz, DMSO) δ 8.44 (dd, $J = 4.8, 2.1$ Hz, 1H), 8.26 (s, 2H), 7.98 (dd, $J = 7.3, 2.1$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J = 7.3, 4.8$ Hz, 1H), 7.07 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.45 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H) m.d. ^{13}C KMR (101 MHz, DMSO) δ 153.1, 150.1, 144.0, 142.0, 136.0, 127.6, 122.5, 119.8, 116.6, 105.7 m.d.

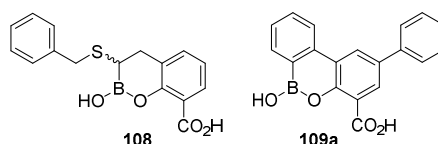
SECINĀJUMI

1. Bicikliskā boronāta **108** iegūšanai, vispiemērotākie apstākļi aizsarggrupu hidrolīzei ir sākotnēja izopropilidēngrupas hidrolīze bāziskā vidē un sekojoša borskābes pināndiola estera hidrolīze skābos apstākļos.

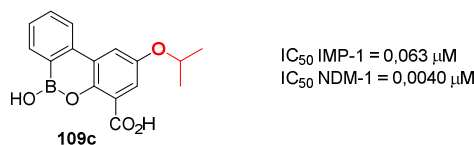
2. Triciklisko boronātu **109a-f** un 2,3-dihidro-1*H*-nafto[1,8-*de*][1,3,2]diazaborinīna atvasinājuma **129** sintēzes procesā, iespējams, rodas gaismas jutīgi blakusprodukti, kas samazina reakciju iznākumus. Tādēļ izdalīšanu un produktu attīrīšanu jāveic tumsā.



3. Iegūtie boronāti - bicikliskais **108** un tricikliskais **109a** uzrāda inhibitoro aktivitāti gan uz SBL, gan MBL enzīmiem, kas pastiprina pieņēmumu, ka cikliskie boronāti potenciāli darbojas kā plaša spektra β -laktamāžu pārejas stāvokļa analoģu inhibitori.

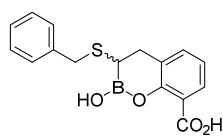


4. Tricikliskiem boronātiem **11a-f** piemīt augsta saistīšanās spēja ar B1 klases MBL enzīmiem IMP-1 un NDM-1. Aktivitāte ir atkarīga no aizvietotāja dabas 2. pozīcijā. Izopropoksigrupas ievadīšana noved līdz NDM-1 aktivitātes inhibīcijai līdz $IC_{50}=4,0$ nM. Savienojums **11c** ir par kārtu aktīvāks nekā traniborbaktāms (**2**).



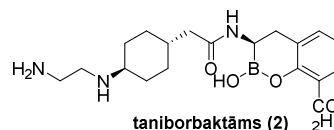
5. Bicikliskais boronāts **108** salīdzinājumā ar **2** uzrāda augstāku inhibitoro aktivitāti pret B2 (CphA) un B3 (L1) klases MBL enzīmiem, kā arī pret D klases OXA-48 SBL enzīmu.

Līdz ar to tioētera atvasinājums **108** ir daudzsološs sākumpunkts tālākām optimizācijām plaša spektra duālu SBL/MBL inhibitoru izstrādē.



108

IC₅₀ AmpC = 0,016 μM
IC₅₀ CphA = 0,50 μM
IC₅₀ L1 = 5,01 μM
IC₅₀ OXA-48 = 0,0063 μM



taniborbaktāms (2)

IC₅₀ AmpC = 0,32 μM
IC₅₀ CphA = 2,51 μM
IC₅₀ L1 = 10,0 μM
IC₅₀ OXA-48 = 0,50 μM
IC₅₀ IMP-1 = 2,51 μM
IC₅₀ NDM-1 = 0,010 μM

6. Kristalogrāfijas dati savienojuma **108** VIM-2 enzīma aktīvajā centrā skaidri norāda uz tetraedriskā bicikliskā boronāta klātbūtni. Galvenie saistīšanās veidi bicikliskā boronāta **108** ciklā un ar karboksilāta skābekļiem ir ļoti līdzīgi aprakstītajam savienojumam **25** un līdzīgiem savienojumiem VIM-2 un citu MBL aktīvajā centrā. Tas ļauj secināt, ka cikliskiem boronātiem ir līdzīga saistīšanās MBL aktīvajā centrā.

7. Savienojuma **108** tioētera sānu ķēde VIM-2 aktīvajā centrā izkārtojas līdzīgā virzienā acilaminoķēdei boronāta **25** kompleksā ar VIM-2. Enzīma aktīvajā centrā neveido ūdeņraža saites ar enzīma aminoskābju atlikumiem, taču tās izvietojums veicina hidrofobu un π-saišu sistēmu mijiedarbību veidošanos ar proteīna aminoskābju sānu ķēdēm, kas izskaidro boronāta **108** augsto aktivitāti pret AmpC.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) Butler, M. S.; Blaskovich, M. A.; Cooper, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J. Antibiot.* **2013**, *66*, 571–591, DOI: 10.1038/ja.2013.86.
- (2) Egorov, A. M.; Ulyashova, M. M.; Rubtsova, M. Yu. Inhibitors of β -Lactamases. New Life of β -Lactam Antibiotics. *Biochem. (Mosc.)* **2020**, *85*, 1292–1309, DOI: 10.1134/S0006297920110024.
- (3) Reddy, N.; Shungube, M.; Arvidsson, P. I.; Baijnath, S.; Kruger, H. G.; Govender, T.; Naicker, T. A 2018–2019 patent review of metallo beta-lactamase inhibitors. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2020**, *30*, 541–555, DOI: 10.1080/13543776.2020.1767070.
- (4) Qin, W.; Panunzio, M.; Biondi, S. β -Lactam Antibiotics Renaissance. *Antibiotics* **2014**, *3*, 193–215, DOI: 10.3390/antibiotics3020193.
- (5) www.spkc.gov.lv/lv/antibiotiku-rezistences-problema (skatīts 18.03.2021.)
- (6) Buynak, J. D. β -Lactamase inhibitors: a review of the patent literature (2010–2013). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23*, 1469–1481, DOI: 10.1517/13543776.2013.831071.
- (7) González-Bello, C.; Rodríguez, D.; Pernas, M.; Rodríguez, Á.; Colchón, E. β -Lactamase Inhibitors To Restore the Efficacy of Antibiotics against Superbugs. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 1859–1881, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279.
- (8) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03840148> (skatīts 18.03.2021.)
- (9) Hecker, S. J.; Reddy, K. R.; Lomovskaya, O.; Griffith, D. C.; Rubio-Aparicio, D.; Nelson, K.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Sabet, M.; Tarazi, Z.; Parkinson, J.; Totrov, M.; Boyer, S. H.; Glinka, T. W.; Pemberton, O. A.; Chen, Y.; Dudley, M. N. Discovery of Cyclic Boronic Acid QPX7728, an Ultrabroad-Spectrum Inhibitor of Serine and Metallo- β -Lactamases. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 7491–7507, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01976.
- (10) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04380207> (skatīts 18.03.2021.)
- (11) Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E. C.; Colenso, C. K.; Hirvonen, V. H. A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 3472–3500, DOI: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.
- (12) Douafer, H.; Andrieu, V.; Phanstiel, O.; Brunel, J. M. Antibiotic Adjuvants: Make Antibiotics Great Again! *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8665–8681. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01781.

- (13) Krajnc, A.; Lang, P. A.; Panduwawala, T. D.; Brem, J.; Schofield, C. J. Will morphing boron-based inhibitors beat the β -lactamases? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *50*, 101–110, DOI: 10.1016/j.cbpa.2019.03.001.
- (14) Tipper, D. J.; Strominger, J. L. Mechanism of action of aenicillins: a proposal based on their structural similarity to Acyl-D-Alanyl-D-Alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1965**, *54*, 1133–1141, DOI: 10.1073/pnas.54.4.1133.
- (15) Bush, K.; Bradford, P. A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 295–306. DOI: 10.1038/s41579-019-0159-8.
- (16) Hall, B. G.; Barlow, M. Revised Ambler classification of β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *55*, 1050–1051. DOI: 10.1093/jac/dki130.
- (17) Reading, C.; Cole, M. Clavulanic Acid: A Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 852–857. DOI: 10.1128/AAC.11.5.852.
- (18) Padayatti, P. S.; Helfand, M. S.; Totir, M. A.; Carey, M. P.; Carey, P. R.; Bonomo, R. A.; van den Akker, F. High Resolution Crystal Structures of the Trans-Enamine Intermediates Formed by Sulbactam and Clavulanic Acid and E166A SHV-1 β -Lactamase. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 34900–34907, DOI: 10.1074/jbc.M505333200.
- (19) English, A. R.; Retsema, J. A.; Girard, A. E.; Lynch, J. E.; Barth, W. E. CP-45,899, a Beta-Lactamase Inhibitor That Extends the Antibacterial Spectrum of Beta-Lactams: Initial Bacteriological Characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1978**, *14*, 414–419, DOI: 10.1128/AAC.14.3.414.
- (20) Micetich, R. G.; Maiti, S. N.; Spevak, P.; Hall, T. W.; Yamabe, S.; Ishida, N.; Tanaka, M.; Yamazaki, T.; Nakai, A.; Ogawa, K. Synthesis and β -Lactamase Inhibitory Properties of 2β -[(1,2,3-Triazol-1-yl)methyl]- 2α -Methylpenam- 3α -carboxylic Acid 1,1-Dioxide and Related Triazolyl Derivatives. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1469–1474, DOI: 10.1021/jm00391a032.
- (21) Papp-Wallace, K. M.; Bethel, C. R.; Caillon, J.; Barnes, M. D.; Potel, G.; Bajaksouzian, S.; Rutter, J. D.; Reghal, A.; Shapiro, S.; Taracila, M. A.; Jacobs, M. R.; Bonomo, R. A.; Jacqueline, C. Beyond Piperacillin-Tazobactam: Cefepime and AAI101 as a Potent β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Combination. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00105-19, DOI: 10.1128/AAC.00105-19.
- (22) Coleman, K. Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non- β -lactam β -lactamase inhibitors. *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, *14*, 550–555, DOI: 10.1016/j.mib.2011.07.026.

- (23) Ehmann, D. E.; Jahić, H.; Ross, P. L.; Gu, R.-F.; Hu, J.; Kern, G.; Walkup, G. K.; Fisher, S. L. Avibactam is a covalent, reversible, non- β -lactam β -lactamase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 11663–11668, DOI: 10.1073/pnas.1205073109.
- (24) Durand-Réville, T. F.; Guler, S.; Comita-Prevoir, J.; Chen, B.; Bifulco, N.; Huynh, H.; Lahiri, S.; Shapiro, A. B.; McLeod, S. M.; Carter, N. M.; Moussa, S. H.; Velez-Vega, C.; Olivier, N. B.; McLaughlin, R.; Gao, N.; Thresher, J.; Palmer, T.; Andrews, B.; Giacobbe, R. A.; Newman, J. V.; Ehmann, D. E.; de Jonge, B.; O'Donnell, J.; Mueller, J. P.; Tommasi, R. A.; Miller, A. A. ETX2514 is a broad-spectrum β -lactamase inhibitor for the treatment of drug-resistant Gram-negative bacteria including *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17104–17114, DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.104.
- (25) Abboud, M. I.; Damblon, C.; Brem, J.; Smargiasso, N.; Mercuri, P.; Gilbert, B.; Rydzik, A. M.; Claridge, T. D. W.; Schofield, C. J.; Frère, J.-M. Interaction of Avibactam with Class B Metallo- β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 5655–5662. DOI: 10.1128/AAC.00897-16.
- (26) Liénard, B. M. R.; Garau, G.; Horsfall, L.; Karsisiotis, A. I.; Damblon, C.; Lassaux, P.; Papamicael, C.; Roberts, G. C. K.; Galleni, M.; Dideberg, O.; Frère, J.-M.; Schofield, C. J. Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo- β -lactamases by thiols. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2282–2294. DOI: 10.1039/B802311E.
- (27) Li, N.; Xu, Y.; Xia, Q.; Bai, C.; Wang, T.; Wang, L.; He, D.; Xie, N.; Li, L.; Wang, J.; Zhou, H.-G.; Xu, F.; Yang, C.; Zhang, Q.; Yin, Z.; Guo, Y.; Chen, Y. Simplified captopril analogues as NDM-1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 386–389. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.10.068.
- (28) Klingler, F.-M.; Wichelhaus, T. A.; Frank, D.; Cuesta-Bernal, J.; El-Delik, J.; Müller, H. F.; Sjuts, H.; Göttig, S.; Koenigs, A.; Pos, K. M.; Pogoryelov, D.; Proschak, E. Approved Drugs Containing Thiols as Inhibitors of Metallo- β -Lactamases: Strategy To Combat Multidrug-Resistant Bacteria. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3626–3630, DOI: 10.1021/jm501844d.
- (29) Palacios, A. R.; Rossi, M.-A.; Mahler, G. S.; Vila, A. J. Metallo- β -Lactamase Inhibitors Inspired on Snapshots from the Catalytic Mechanism. *Biomolecules* **2020**, *10*, 854–888, DOI: 10.3390/biom10060854.
- (30) Martin, R.; Jones, J. B. Rational design and synthesis of a highly effective transition state analog inhibitor of the RTEM-1 β -lactamase. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8399–8402, DOI: 10.1016/0040-4039(95)01799-N.

- (31) Strynadka, N. C. J.; Martin, R.; Jensen, S. E.; Gold, M.; Jones, J. B. Structure-based design of a potent transition state analogue for TEM-1 β -lactamase. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 688–695, DOI: 10.1038/nsb0896-688.
- (32) Morandi, F.; Caselli, E.; Morandi, S.; Focia, P. J.; Blázquez, J.; Shoichet, B. K.; Prati, F. Nanomolar Inhibitors of AmpC β -Lactamase. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 685–695. DOI: 10.1021/ja0288338.
- (33) Lomovskaya, O.; Sun, D.; Rubio-Aparicio, D.; Nelson, K.; Tsivkovski, R.; Griffith, D. C.; Dudley, M. N. Vaborbactam: Spectrum of Beta-Lactamase Inhibition and Impact of Resistance Mechanisms on Activity in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01443-17, DOI: 10.1128/AAC.01443-17.
- (34) Hecker, S. J.; Reddy, K. R.; Totrov, M.; Hirst, G. C.; Lomovskaya, O.; Griffith, D. C.; King, P.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Sabet, M.; Tarazi, Z.; Clifton, M. C.; Atkins, K.; Raymond, A.; Potts, K. T.; Abendroth, J.; Boyer, S. H.; Loutit, J. S.; Morgan, E. E.; Durso, S.; Dudley, M. N. Discovery of a Cyclic Boronic Acid β -Lactamase Inhibitor (RPX7009) with Utility vs Class A Serine Carbapenemases. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3682–3692, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00127.
- (35) Brem, J.; Cain, R.; Cahill, S.; McDonough, M. A.; Clifton, I. J.; Jiménez-Castellanos, J.-C.; Avison, M. B.; Spencer, J.; Fishwick, C. W. G.; Schofield, C. J. Structural basis of metallo- β -lactamase, serine- β -lactamase and penicillin-binding protein inhibition by cyclic boronates. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12406–12414, DOI: 10.1038/ncomms12406.
- (36) Cahill, S. T.; Cain, R.; Wang, D. Y.; Lohans, C. T.; Wareham, D. W.; Oswin, H. P.; Mohammed, J.; Spencer, J.; Fishwick, C. W. G.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J.; Brem, J. Cyclic Boronates Inhibit All Classes of β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02260-16, DOI: 10.1128/AAC.02260-16.
- (37) Krajnc, A.; Brem, J.; Hinchliffe, P.; Calvopiña, K.; Panduwawala, T. D.; Lang, P. A.; Kamps, J. J. A. G.; Tyrrell, J. M.; Widlake, E.; Saward, B. G.; Walsh, T. R.; Spencer, J.; Schofield, C. J. Bicyclic Boronate VNRX-5133 Inhibits Metallo- and Serine- β -Lactamases. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8544–8556, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00911.
- (38) Liu, B.; Trout, R. E. L.; Chu, G.-H.; McGarry, D.; Jackson, R. W.; Hamrick, J. C.; Daigle, D. M.; Cusick, S. M.; Pozzi, C.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Mangani, S.; Docquier, J.-D.; Weiss, W. J.; Pevear, D. C.; Xerri, L.; Burns, C. J. Discovery of Taniborbactam (VNRX-5133): A Broad-Spectrum Serine- and Metallo- β -Lactamase Inhibitor for Carbapenem-Resistant Bacterial Infections. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 2789–2801, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01518.

- (39) McKinney, D. C.; Zhou, F.; Eyermann, C. J.; Ferguson, A. D.; Prince, D. B.; Breen, J.; Giacobbe, R. A.; Lahiri, S.; Verheijen, J. C. 4,5-Disubstituted 6-Aryloxy-1,3-Dihydrobenzo[*c*][1,2]Oxaboroles Are Broad-Spectrum Serine β -Lactamase Inhibitors. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 310–316, DOI: 10.1021/acsinfecdis.5b00031.
- (40) Dewar, M. J. S.; Dietz, R. 269. New heteroaromatic compounds. Part V. Some 9,10-boroxarophenanthrenes. *J. Chem. Soc.* **1960**, 1344–1347, DOI: 10.1039/JR9600001344.
- (41) Zhou, Q. J.; Worm, K.; Dolle, R. E. 10-Hydroxy-10,9-boroxarophenanthrenes: Versatile Synthetic Intermediates to 3,4-Benzocoumarins and Triaryls. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5147–5149, DOI: 10.1021/jo049343w.
- (42) Zhao, W.-T.; Lu, Z.-Q.; Zheng, H.; Xue, X.-S.; Zhao, D. Rhodium-Catalyzed 2-Arylphenol-Derived Six-Membered Silacyclization: Straightforward Access toward Dibenzooxasilines and Silicon-Containing Planar Chiral Metallocenes. *ACS Catal.* **2018**, *8*, 7997–8005, DOI: 10.1021/acscatal.8b01992.
- (43) Lu, C.-J.; Hu, J.; Wang, Z.; Xie, S.; Pan, T.; Huang, L.; Li, X. Discovery of boron-containing compounds as $A\beta$ aggregation inhibitors and antioxidants for the treatment of Alzheimer's disease. *Med. Chem. Commun.* **2018**, *9*, 1862–1870, DOI: 10.1039/C8MD00315G.
- (44) He, J.; Crase, J. L.; Wadumethrige, S. H.; Thakur, K.; Dai, L.; Zou, S.; Rathore, R.; Hartley, C. S. *ortho*-Phenylenes: Unusual Conjugated Oligomers with a Surprisingly Long Effective Conjugation Length. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13848–13857, DOI: 10.1021/ja106050s.
- (45) Mathew, S.; Crandall, L. A.; Ziegler, C. J.; Hartley, C. S. Enhanced Helical Folding of *ortho*-Phenylenes through the Control of Aromatic Stacking Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16666–16675, DOI: 10.1021/ja509902m.
- (46) Park, J.; Choi, S.; Lee, Y.; Cho, S. H. Chemo- and Stereoselective Crotylation of Aldehydes and Cyclic Aldimines with Allylic *gem*-Diboronate Ester. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 4054–4057, DOI: 10.1021/acs.orglett.7b01821.
- (47) Miura, T.; Nakahashi, J.; Zhou, W.; Shiratori, Y.; Stewart, S. G.; Murakami, M. Enantioselective Synthesis of *anti*-1,2-Oxaborinan-3-enes from Aldehydes and 1,1-Di(boryl)alk-3-enes Using Ruthenium and Chiral Phosphoric Acid Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10903–10908, DOI: 10.1021/jacs.7b06408.
- (48) Hansen, E. C.; Lee, D. Regiochemical Control in the Metal-Catalyzed Transposition of Allylic Silyl Ethers. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8142–8143, DOI: 10.1021/ja0620639.

- (49) Volchkov, I.; Lee, D. Recent developments of direct rhenium-catalyzed [1,3]-transpositions of allylic alcohols and their silyl ethers. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4381–4394, DOI: 10.1039/C4CS00036F.
- (50) Micalizio, G. C.; Schreiber, S. L. A Boronic Ester Annulation Strategy for Diversity-Oriented Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 152–154, DOI: 10.1002/1521-3773(20020104)41:1<152::AID-ANIE152>3.0.CO;2-N.
- (51) McNulty, L.; Kohlbacher, K.; Borin, K.; Dodd, B.; Bishop, J.; Fuller, L.; Wright, Z. Cyclic Alkenyl Boronic Half Acid Synthesis and Applications. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6001–6004, DOI: 10.1021/jo1003423.
- (52) Saito, H.; Otsuka, S.; Nogi, K.; Yorimitsu, H. Nickel-Catalyzed Boron Insertion into the C2–O Bond of Benzofurans. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 15315–15318, DOI: 10.1021/jacs.6b10255.
- (53) Tsuchiya, S.; Saito, H.; Nogi, K.; Yorimitsu, H. Manganese-Catalyzed Ring Opening of Benzofurans and Its Application to Insertion of Heteroatoms into the C2–O Bond. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 5557–5560, DOI: 10.1021/acs.orglett.7b02660.
- (54) Sumida, Y.; Harada, R.; Kato-Sumida, T.; Johmoto, K.; Uekusa, H.; Hosoya, T. Boron-Selective Biaryl Coupling Approach to Versatile Dibenzoxaborins and Application to Concise Synthesis of Defucogilvocarcin M. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 6240–6243, DOI: 10.1021/ol5031734.
- (55) Guo, R.; Li, K.-N.; Liu, B.; Zhu, H.-J.; Fan, Y.-M.; Gong, L.-Z. Asymmetric synthesis of heteroaryl atropisomers *via* a gold-catalyzed cycloisomerization–amination cascade reaction. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5451–5454, DOI: 10.1039/C4CC01397B.
- (56) Matteson, D. S.; Majumdar, D. Homologation of boronic esters to α -chloro boronic esters. *Organometallics* **1983**, *2*, 1529–1535, DOI: 10.1021/om50005a008.
- (57) Glinka, T.; Hecker, S.; Reddy, K. R.; Rodny, O.; Totrov, M. BORONIC ACID DERIVATIVES AND THERAPEUTIC USES THEREOF. WO2016003929 (A1), Jul 1, **2016**
- (58) Matteson, D. S.; Ray, R. Directed Chiral Synthesis with Pinanediol Boronic Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7590–7591, DOI: 10.1021/ja00545a046.
- (59) Matteson, D. S.; Sadhu, K. M.; Peterson, M. L. 99% Chirally Selective Synthesis via Pinanediol Boronic Esters: Insect Pheromones, Diols, and an Amino Alcohol. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 810–819, DOI: 10.1021/ja00264a039.
- (60) Matteson, D. S.; Soundararajan, R.; Ho, O. C.; Gatzweiler, W. (Alkoxyalkyl)boronic Ester Intermediates for Asymmetric Synthesis. *Organometallics* **1996**, *15*, 152–163, DOI: 10.1021/om950574q.

- (61) Matteson, D. S. α -Halo Boronic Esters in Asymmetric Synthesis. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 10555–10607, DOI: 10.1016/S0040-4020(98)00321-4.
- (62) Matteson, D. S. Boronic Esters in Asymmetric Synthesis. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 10009–10023, DOI: 10.1021/jo4013942.
- (63) Beenen, M. A.; An, C.; Ellman, J. A. Asymmetric Copper-Catalyzed Synthesis of α -Amino Boronate Esters from *N-tert*-Butanesulfinyl Aldimines. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6910–6911, DOI: 10.1021/ja800829y.
- (64) Buesking, A. W.; Bacauanu, V.; Cai, I.; Ellman, J. A. Asymmetric Synthesis of Protected α -Amino Boronic Acid Derivatives with an Air- and Moisture-Stable Cu(II) Catalyst. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3671–3677, DOI: 10.1021/jo500300t.
- (65) Kiener, P. A.; Waley, S. G. Reversible inhibitors of penicillinases. *Biochem. J.* **1978**, *169*, 197–204, DOI: 10.1042/bj1690197.
- (66) Beesley, T.; Gascoyne, N.; Knott-Hunziker, V.; Petursson, S.; Waley, S. G.; Jaurin, B.; Grundström, T. The inhibition of class C β -lactamases by boronic acids. *Biochem. J.* **1983**, *209*, 229–233, DOI: 10.1042/bj2090229.
- (67) Wang, X.; Minasov, G.; Blázquez, J.; Caselli, E.; Prati, F.; Shoichet, B. K. Recognition and Resistance in TEM β -Lactamase. *Biochemistry* **2003**, *42*, 8434–8444, DOI: 10.1021/bi034242y.
- (68) Jorgensen, S. C. J.; Rybak, M. J. Meropenem and Vaborbactam: Stepping up the Battle against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* **2018**, *38*, 444–461, DOI: 10.1002/phar.2092.
- (69) Geibel, B.; Dowell, J.; Dickerson, D.; Henkel, T. 1401. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of the Safety and Pharmacokinetics of Single and Repeat Doses of VNRX-5133 in Healthy Subjects. *Open Forum Infect. Dis.* **2018**, *5*, S431, DOI: 10.1093/ofid/ofy210.1232.
- (70) Thomas, S. P.; French, R. M.; Jheengut, V.; Aggarwal, V. K. Homologation and alkylation of boronic esters and boranes by 1,2-metallate rearrangement of boron ate complexes. *Chem. Rec.* **2009**, *9*, 24–39, DOI: 10.1002/tcr.20168.
- (71) Wang, D. Y.; Abboud, M. I.; Markoulides, M. S.; Brem, J.; Schofield, C. J. The road to avibactam: the first clinically useful non- β -lactam working somewhat like a β -lactam. *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 1063–1084, DOI: 10.4155/fmc-2016-0078.
- (72) Brem, J.; van Berkel, S. S.; Zollman, D.; Lee, S. Y.; Gileadi, O.; McHugh, P. J.; Walsh, T. R.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J. Structural Basis of Metallo- β -Lactamase Inhibition by Captopril Stereoisomers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 142–150, DOI: 10.1128/AAC.01335-15.

- (73) Golemi, D.; Maveyraud, L.; Vakulenko, S.; Samama, J.-P.; Mobashery, S. Critical involvement of a carbamylated lysine in catalytic function of class D β -lactamases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 14280–14285, DOI: 10.1073/pnas.241442898.
- (74) van Groesen, E.; Lohans, C. T.; Brem, J.; Aertker, K. M. J.; Claridge, T. D. W.; Schofield, C. J. ^{19}F NMR Monitoring of Reversible Protein Post-Translational Modifications: Class D β -Lactamase Carbamylation and Inhibition. *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25*, 11837–11841, DOI: 10.1002/chem.201902529.
- (75) Salimraj, R.; Hinchliffe, P.; Kosmopoulou, M.; Tyrrell, J. M.; Brem, J.; van Berkel, S. S.; Verma, A.; Owens, R. J.; McDonough, M. A.; Walsh, T. R.; Schofield, C. J.; Spencer, J. Crystal structures of VIM-1 complexes explain active site heterogeneity in VIM-class metallo- β -lactamases. *FEBS J.* **2019**, *286*, 169–183, DOI: 10.1111/febs.14695.
- (76) Cahill, S. T.; Tyrrell, J. M.; Navratilova, I. H.; Calvopiña, K.; Robinson, S. W.; Lohans, C. T.; McDonough, M. A.; Cain, R.; Fishwick, C. W. G.; Avison, M. B.; Walsh, T. R.; Schofield, C. J.; Brem, J. Studies on the inhibition of AmpC and other β -lactamases by cyclic boronates. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2019**, *1863*, 742–748, DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.02.004.
- (77) Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Krajnc, A.; Mulholland, A. J.; Brem, J.; Schofield, C. J.; Spencer, J. Cyclic boronates as versatile scaffolds for KPC-2 β -lactamase inhibition. *RSC Med. Chem.* **2020**, *11*, 491–496, DOI: 10.1039/C9MD00557A.
- (78) Calvopiña, K.; Hinchliffe, P.; Brem, J.; Heesom, K. J.; Johnson, S.; Cain, R.; Lohans, C. T.; Fishwick, C. W. G.; Schofield, C. J.; Spencer, J.; Avison, M. B. Structural/mechanistic insights into the efficacy of nonclassical β -lactamase inhibitors against extensively drug resistant *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Mol. Microbiol.* **2017**, *106*, 492–504, DOI: 10.1111/mmi.13831.
- (79) Zhao, J.; Larock, R. C. Synthesis of Xanthenes, Thioxanthenes, and Acridones by the Coupling of Arynes and Substituted Benzoates. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 583–588, DOI: 10.1021/jo0620718.
- (80) Deng, L.; Sundriyal, S.; Rubio, V.; Shi, Z.-Z.; Song, Y. Coordination Chemistry Based Approach to Lipophilic Inhibitors of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6539–6542, DOI: 10.1021/jm9012592.
- (81) El-Kabbani, O.; Scammells, P. J.; Gosling, J.; Dhagat, U.; Endo, S.; Matsunaga, T.; Soda, M.; Hara, A. Structure-Guided Design, Synthesis, and Evaluation of Salicylic Acid-Based Inhibitors Targeting a Selectivity Pocket in the Active Site of Human 20 α -

- Hydroxysteroid Dehydrogenase (AKR1C1). *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3259–3264, DOI: 10.1021/jm9001633.
- (82) Yan, Y.; Qin, B.; Ren, C.; Chen, X.; Yip, Y. K.; Ye, R.; Zhang, D.; Su, H.; Zeng, H. Synthesis, Structural Investigations, Hydrogen–Deuterium Exchange Studies, and Molecular Modeling of Conformationally Stabilized Aromatic Oligoamides. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5869–5879, DOI: 10.1021/ja100579z.
- (83) Alam, A.; Takaguchi, Y.; Tsuboi, S. 1,3-Dibromo-5,5-dimethylhydantoin, a useful reagent for *ortho*-monobromination of phenols and polyphenols. *J. Fac. Environ. Sci. Technol. Okayama Univ.* **2005**, *10*, 105–109.
- (84) Sui, Z.; Subasinghe, N. L. BENZO-FUSED HETEROCYCLIC DERIVATIVES USEFUL AS AGONISTS OF GPR120. WO2014159061 (A2), October 2, **2014**.
- (85) Huang, Y.; Luedtke, R. R.; Freeman, R. A.; Wu, L.; Mach, R. H. Synthesis of 2-(2,3-dimethoxyphenyl)-4-(aminomethyl)imidazole analogues and their binding affinities for dopamine D₂ and D₃ receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 3113–3122, DOI: 10.1016/S0968-0896(01)00175-4.
- (86) Chakraborti, A. K.; Basak, A.; Grover, V. Chemoselective Protection of Carboxylic Acid as Methyl Ester: A Practical Alternative to Diazomethane Protocol. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8014–8017, DOI: 10.1021/jo9900351.
- (87) Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 522–524, DOI: 10.1002/anie.197805221.
- (88) Hardcastle, I. R.; Cockcroft, X.; Curtin, N. J.; El-Murr, M. D.; Leahy, J. J. J.; Stockley, M.; Golding, B. T.; Rigoreau, L.; Richardson, C.; Smith, G. C. M.; Griffin, R. J. Discovery of Potent Chromen-4-one Inhibitors of the DNA-Dependent Protein Kinase (DNA-PK) Using a Small-Molecule Library Approach. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7829–7846, DOI: 10.1021/jm050444b.
- (89) Abbott, B.; Thompson, P. Synthetic Studies of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor LY294002 and Related Analogues. *Aust. J. Chem.* **2003**, *56*, 1099–1106. DOI: 10.1071/CH03113.
- (90) Bergamini, G.; Bell, K.; Shimamura, S.; Werner, T.; Cansfield, A.; Müller, K.; Perrin, J.; Rau, C.; Ellard, K.; Hopf, C.; Doce, C.; Leggate, D.; Mangano, R.; Mathieson, T.; O'Mahony, A.; Plavec, I.; Rharbaoui, F.; Reinhard, F.; Savitski, M. M.; Ramsden, N.; Hirsch, E.; Drewes, G.; Rausch, O.; Bantscheff, M.; Neubauer, G. A selective inhibitor reveals PI3K γ dependence of T_H17 cell differentiation. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 576–582, DOI: 10.1038/nchembio.957.

- (91) Zeller, W. E.; Schwörer, R. *N*-Phenyltrifluoromethanesulfonimide. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Ltd, Ed., Chichester, UK, 2009; pp 142–147, DOI: 10.1002/047084289X.rp142.pub2.
- (92) Wallace, D. J.; Chen, C. Cyclopropylboronic acid: synthesis and Suzuki cross-coupling reactions. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6987–6990, DOI: 10.1016/S0040-4039(02)01606-4.
- (93) Abbiati, G.; Doda, A.; Dell'Acqua, M.; Pirovano, V.; Facoetti, D.; Rizzato, S.; Rossi, E. Synthesis of Two Unnatural Oxygenated Aaptaminoids. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 10461–10467, DOI: 10.1021/jo3020598.
- (94) Schmidt, B.; Hölter, F. Suzuki–Miyaura cross coupling reactions with phenoldiazonium salts. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4914–4920, DOI: 10.1039/C1OB05256J.

PATEICĪBAS

Izsaku pateicību par finansiālu atbalstu InnovaBalt projektam “EC 7th Framework Programme project REGPOT-InnovaBalt” (Strengthening the research and innovative capacities of the Latvian Institute of Organic Synthesis, the leading Baltic regional centre for drug discovery) un Latvijas Organiskās sintēzes institūtam par iekšējiem studentu grantiem IG-2016-09 un IG-2018-08.

Pateicība zinātniskajam vadītājam Dr. chem. Pēterim Trapencierim par sniegtajām konsultācijām darba izstrādes gaitā.

Esmu ļoti pateicīga Prof. *Schofield* grupai Oksfordas Universitātē (Oksforda, Lielbritānija) par sintezēto savienojumu bioloģiskās aktivitātes pētījumiem, kā arī ar kristalogrāfijas pētījumiem. Esmu dziļi pateicīga Prof. *Christopher J. Schofield* par iespēju gūt pieredzi viņa laboratorijā Oksfordā (Lielbritānija) un Dr. *Jürgen Brem* par ļoti laipno atbalstu un palīdzību.

Vēlos izteikt pateicību Latvijas Organiskās sintēzes institūta Fizikāli organiskās ķīmijas laboratorijas kolektīvam par KMR, IS un AIMS spektru uzņemšanu.

Pateicība Latvijas Organiskās sintēzes institūta kolēģiem par palīdzību, atbalstu un motivāciju promocijas darba izstrādē. Īpaši liels paldies kolēģiem Ilzei Kumpiņai (no Binghamtonas Universitātes, ASV), Dr. chem. Borisam Štrumfam un Dr. chem. Marijai Skvorcovai.

Visbeidzot vēlos izteikt visdziļāko pateicību savai ģimenei par nebeidzamo atbalstu visā doktorantūras laikā. Daļēji vēlētos veltīt šo darbu savam tēvam Viktoram Parkovam, kurš šķiet būtu bijis lielākais līdzjutējs un par paveikto lepojies visstiprāk.

1. Pielikums - Broad Spectrum β -Lactamase Inhibition by a Thioether Substituted Bicyclic Boronate

Parkova A.; Lucic A.; Krajnc A.; Brem J.; Calvopiña K.; Langley G. W.; McDonough M. A.; Trapencieris P.; Schofield C. J.

ACS Infect Dis. **2020**, 12, 1398-1404. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00330

Broad Spectrum β -Lactamase Inhibition by a Thioether Substituted Bicyclic BoronateAnete Parkova,[†] Anka Lucic,[§] Alen Krajnc,[§] Jürgen Brem,[§] Karina Calvopiña,[§] Gareth W. Langley,^{§,‡} Michael A. McDonough,[§] Peteris Trapencieris,^{*,†} and Christopher J. Schofield^{*,§}[†]Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, LV-1006 Riga, Latvia[§]The Chemistry Research Laboratory, The Department of Chemistry, University of Oxford, 12 Mansfield Road, Oxford OX1 3TA, United Kingdom

Supporting Information

ABSTRACT: β -Lactamases comprise the most widely used mode of resistance to β -lactam antibiotics. Cyclic boronates have shown promise as a new class of β -lactamase inhibitor, with pioneering potential to potently inhibit both metallo- and serine- β -lactamases. We report studies concerning a bicyclic boronate ester with a thioether rather than the more typical β -lactam antibiotic "C-6/C-7" acylamino type side chain, which is present in the penicillin/cephalosporin antibiotics. The thioether bicyclic boronate ester was tested for activity against representative serine- and metallo- β -lactamases. The results support the broad inhibition potential of bicyclic boronate based inhibitors with different side chains, including against metallo- β -lactamases from B1, B2, and B3 subclasses. Combined with previous crystallographic studies, analysis of a crystal structure of the thioether inhibitor with the clinically relevant VIM-2 metallo- β -lactamase implies that further SAR work will expand the already broad scope of β -lactamase inhibition by bicyclic boronates.

KEYWORDS: β -lactam antibiotic resistance, boronate/boron based β -lactamase/hydrolase inhibitors, serine β -lactamase, metallo- β -lactamase, carbapenem, penicillin, cephalosporin



The β -lactams are the most prescribed class of antibacterials, but their clinical utility is being eroded by multiple resistance mechanisms.¹ Currently, the most prevalent resistance mechanism is hydrolysis via β -lactamases² (Figure 1), of which there are two mechanistic groups, the nucleophilic serine- β -lactamases (Ambler classes A, C, and D; SBLs) and the zinc ion dependent metallo- β -lactamases (class B, MBLs).³ While for many years the SBLs were the most clinically relevant β -lactamases, the MBLs are of increasing relevance, being endemic in some regions.^{4,5} Several SBL inhibitors, including clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam (Figure 1), are established for clinical use in combination with β -lactam antibiotics. These combinations have been highly effective against class A and some class D β -lactamases.^{6–8} However, they are ineffective against MBLs and evolved broad spectrum SBLs.⁹ Moreover, recent studies have shown that MBLs are being expressed alongside SBLs, making these current methods even less effective.⁹

The development of avibactam, a broad spectrum SBL inhibitor, was significant as this was the first clinically used β -lactamase inhibitor that did not contain a β -lactam ring, reducing its rate of SBL cleavage.¹⁰ However, like the β -lactams, avibactam works by the formation of an acyl-enzyme type complex, which has the potential to be hydrolytically labile.¹¹ Further, there is evidence that avibactam may become

susceptible to MBLs.¹² Consequently, there is a desire to develop β -lactamase inhibitors and antibiotics targeting the transpeptidase targets of the β -lactams that do not operate via an acylation type mechanism susceptible to β -lactamases.

Toward this objective, the "transition state" analogue approach for SBL/transpeptidase inhibition has long been explored.^{11,13–15} Of the different functional groups investigated for this approach, cyclic boronic acids and boronate esters have emerged as of particular promise (Figure 1).^{13,14} One such compound, vaborbactam¹⁶ (**1**), has been approved for clinical use as an SBL inhibitor, but it does not efficiently inhibit MBLs and has limited SBL coverage.¹⁶ By contrast, bicyclic boronates (e.g., **2** and VNRX-5133) are reported to inhibit a broader range of SBLs,^{14,17–19} as well as some members of the clinically important B1MBL subfamily such as VIM-2.^{18–20}

There are only very limited SAR studies reported on potent bicyclic boronates as β -lactamase inhibitors, with work to date focusing on those with the canonical penicillin/cephalosporin type acylamino side chains on the boronate ester ring.^{13,17,20}

Special Issue: Antibiotics

Received: August 30, 2019

Published: December 16, 2019

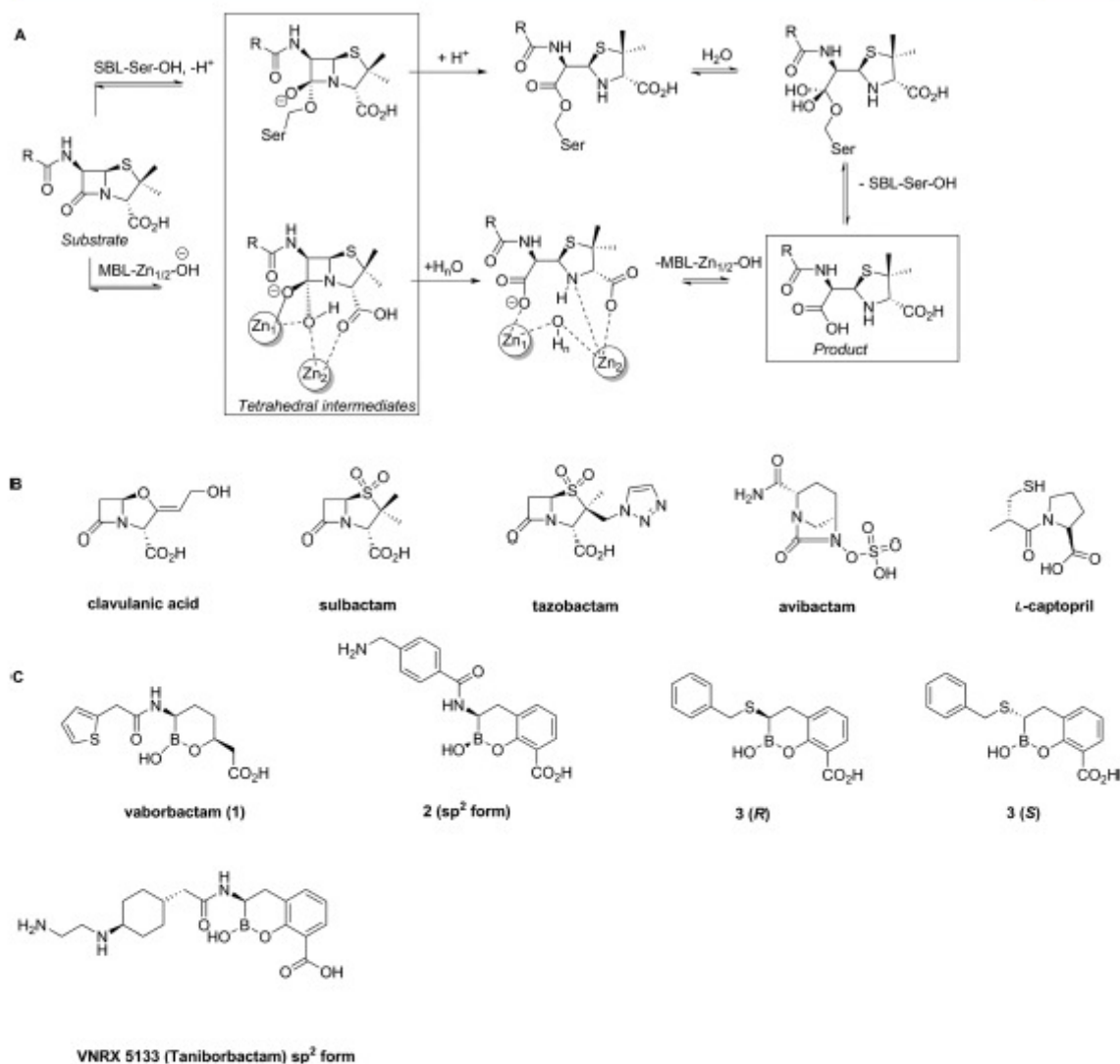


Figure 1. β -lactamase mechanisms and inhibitors. (A) Outline of the SBL and MBL mechanisms with a penicillin substrate. (B) Clinically used SBL inhibitors (clavulanate, sulbactam, tazobactam, avibactam), which operate using acylation type mechanisms, and L-captopril, a nonclinically used MBL inhibitor. (C) Boronate based β -lactamase inhibitors: the SBL inhibitor vaborbactam and the broader spectrum bicyclic boronates 2, VNRX-5133, and 3, the latter of which is the subject of the current work. Note that both the penicillins and 2 have an acylamino side chain.

Here, we report biochemical and biophysical studies on a bicyclic boronate (3) (reported in the patent literature²¹) that has a thioether side chain positioned analogously to the typical C-6/C-7 side chain of penicillins/cephalosporins (Figure 1). The results further validate the potential of bicyclic boronates as broad-spectrum inhibitors of both SBLs and MBLs and highlight the need for more SAR work on side chain variants of bicyclic boronate β -lactamase inhibitors.

RESULTS

Synthesis of Thioether Substituted Cyclic Boronate 3.

The thioether substituted cyclic boronate 3 was prepared via an eight-step stereoselective route from commercially available 3-methylsalicylic acid (Figure 2). One-pot protection of the

phenolic alcohol and benzoic acid groups under acidic conditions gave acetanide 4 (71%), which was then brominated using *N*-bromosuccinimide to give benzylic bromide 5 (72%). Bromide 5 underwent Miyaura borylation to give pinacolato boronate 6, which was transesterified *in situ* with (1*S*,2*S*,3*R*,5*S*)-(+)-pinanediol to give the boronic acid (+)-pinanediol ester 7 in good yield (87% over two steps). Boronate 7 was then subjected to Matteson homologation^{22,23} to give the chloride 8 as a mixture of stereoisomers (8*S*/8*R* 72:28, as assigned by ¹H NMR).²⁴ Subsequent nucleophilic substitution (with assumed inversion) with benzylmercaptan gave thioether 9 (70%) with inversion of stereochemistry (8*S*/8*R* 24:76, as assigned by ¹H NMR). Cleavage of the isopropylidene protecting group and hydrolysis of the chiral

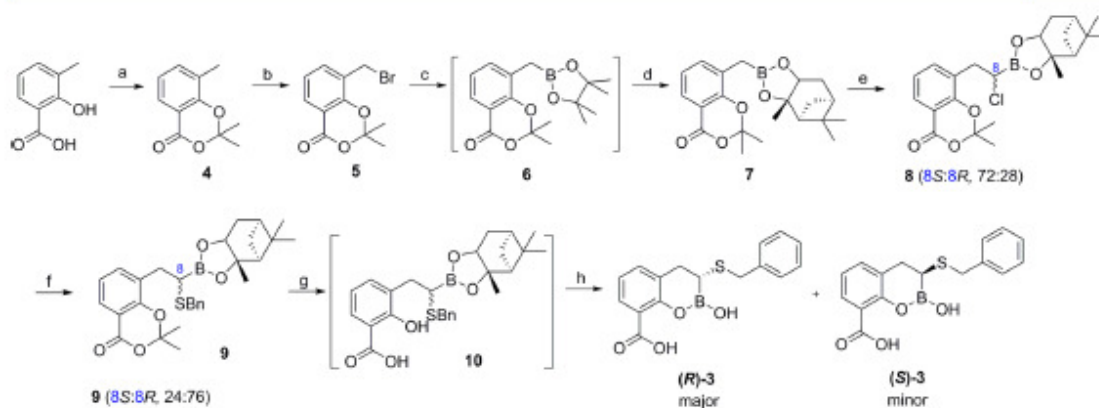


Figure 2. Synthesis of C-2 substituted bicyclic boronates. (a) Trifluoroacetic acid, trifluoroacetic anhydride, acetone, 0 °C then room temperature (71%); (b) *N*-bromosuccinimide, benzoyl peroxide, MeCN, 90 °C (72%); (c) bis(pinacolato)diboron, Pd(dppf)Cl₂, KOAc, dioxane, 90 °C; (d) (1*S*,2*S*,3*R*,5*S*)-(+)-pinane-1,2-diol, THF, 30 °C (87% over two steps); (e) CH₂Cl₂, *n*-BuLi, ZnCl₂, THF, -100 °C, then room temperature (61%); (f) PhCH₂SH, Et₃N, CH₂Cl₂, room temperature (70%); (g) aqueous KOH, THF, 60 °C; (h) *n*-BuLi, *i*BuB(OH)₂, MeCN, H₂O, 40 °C (31%). dppf = 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene, Bn = benzyl.

Table 1. pIC₅₀ values for 3 with Several β-Lactamases and for Selected Reported Inhibitors^a

Ambler class	β-lactamase	avibactam	1-captopril	3	2	VNRX-5133 ^{18,19}
A	TEM-116	8.1	<3.4	6.7	8.5 ²⁰	6.92 ¹⁸
B1	IMP-1	<3.4	5.0	6.9	6(5) ²⁰	5.6 ¹⁸
B1	NDM-1	<3.4	5.8	7.4	7.5 ²⁰	8 ¹⁸
B1	VIM-1	<3.4	5.6	7.1	7.0 ¹⁴	8.1 ¹⁸
B1	VIM-2	<3.4	6.1	7.2	8.5 ²⁰	9.3, ¹⁸ 7.7 ¹⁹
B2	CphA	<2.4	<5.0	6.3	>4 ²⁰	5.6 ¹⁸
B3	Li	<4.7	5.6	5.3	^b	<5 ¹⁸
C	AmpC (<i>P. aeruginosa</i>)	6.5	<4.4	7.8	6.9 ¹⁴	6.5, ¹⁸ 7.5 ¹⁹
D	OXA-10	<4.7	<4.4	5.9	4.5	6.6 ¹⁸
D	OXA-10 (+100 mM NaHCO ₃)	<4.7	<4.4	4.1	4.7 (5.2 ²⁰)	6.2 ¹⁸
D	OXA-48	6.2	<4.4	8.2	4.6	6.3, ¹⁸ 6.4 ¹⁹
D	OXA-48 (+100 mM NaHCO ₃)	6.1	<4.4	8	4.8 (5.6 ¹⁴)	5.6 ¹⁸

^aInhibition assays for β-lactamases were performed as described.²⁶ The cephalosporin FC-5 was used as a substrate for VIM-1, VIM-2, IMP-1, NDM-1, SPM-1, TEM-116, OXA-10, and OXA-48;²⁰ meropenem was used for CphA.¹⁹ Column 1 defines the Ambler class or subclass for MBLs of the β-lactamases used. Experiments involving inhibition of OXA-10 and OXA-48 by compound 2 were done with and without added bicarbonate. All *in vitro* assays except for VNRX-5133, were freshly determined. The results are generally in accord with the reported values,^{14,18–20} with exceptions in parentheses. ^bNot inhibited.

auxiliary gave the desired bicyclic boronate 3, which was isolated as a mixture of (*R/S*)-enantiomers.

Inhibition of β-Lactamases. Compound 3 was tested for inhibition against ten β-lactamases, comprising representatives from all four Ambler classes, using an established fluorescence based method.^{14,17,20,25,26} The clinically used SBL inhibitor avibactam¹¹ and 1-captopril, a well-studied and moderately potent MBL inhibitor (Figure 1),²⁷ were used for comparison. As anticipated, avibactam did not manifest MBL inhibition¹¹ and 1-captopril did not manifest SBL inhibition.²⁷ By contrast thioether 3 inhibited all 10 of the tested β-lactamases, though like the reported acylamino bicyclic boronates (e.g., 2^{14,20} and VNRX-5133^{18,19}) it showed variations in potency. Notably, the inhibition profiles for 2, VNRX-5133, and 3 differ (Table 1). With the class A and C SBLs, 3 and VNRX-5133 are less potent than 2 against the class A TEM-116 enzyme, but 3 is more potent than 2 and VNRX-5133 against the AmpC enzyme from *P. aeruginosa*.

The results for the inhibition of the class D enzymes OXA-10 and OXA-48 by 3 are notable. Class D enzymes require a lysine carbamate for catalysis, which is formed by reaction of an essential active site lysine with (bi)carbonate/carbon dioxide^{28–30} (hence OXA assays were carried out with and without added bicarbonate). Notably, 3, like cyclic boronate 2 and VNRX-5133, was not highly potent against the class D enzyme OXA-10, either with or without added bicarbonate (100 mM), and the pIC₅₀ value was reduced in the latter case (pIC₅₀ from 5.9 to 4.1; Table 1). Importantly, thioether 3 was significantly more potent than 2 and VNRX-5133^{18,19} (or avibactam) against OXA-48, an SBL of major contemporary clinical importance.^{10–12} The pIC₅₀ values of 3 against OXA-48, both in the absence and presence of bicarbonate were substantially greater than for 2 and VNRX-5133 (Table 1).³⁰ Recent work employing kinetic and biophysical (NMR and crystallography) analyses shows that different inhibitor classes interact with class D OXA enzymes in a manner that differently influences their lysine-carbamylation status.²⁸ The molecular

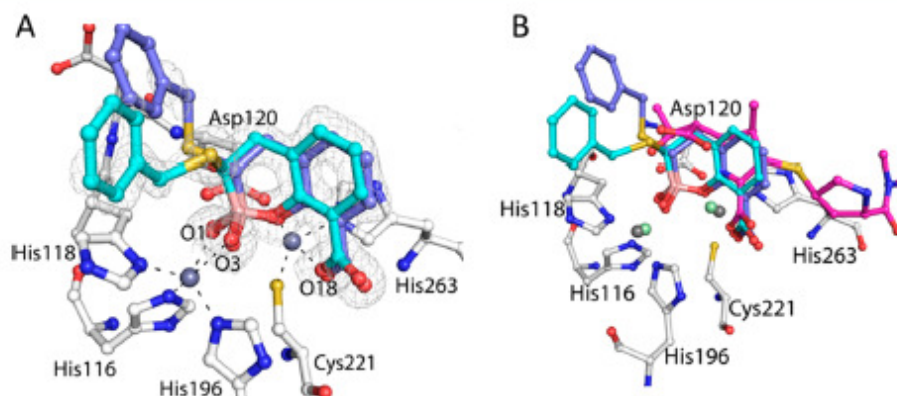


Figure 3. Mode of inhibition of the VIM-2 MBL by thioether 3. (A) View from a crystal structure of 3 in complex with VIM-2. Both the (*R*)- (cyan) and (*S*)- (slate blue) enantiomers of 3 are present in the active site. $mF_o - DF_c$ OMIT electron density contoured to 3σ is shown as a gray mesh. Note, the phenyl side-chain of 3 is partially disordered in both the (*S*)- and (*R*)-enantiomers, as reflected by high B-factors for these atoms. (B) Comparison of crystal structures of VIM-1 in complex with hydrolyzed meropenem (pink)³³ along with the *R*-enantiomer (cyan) and the *S*-enantiomer (slate blue) of C-3 thioether 3. The zinc ions for VIM-1 (5N5I) are shown in green and those for VIM-2 (6RPN) in gray.

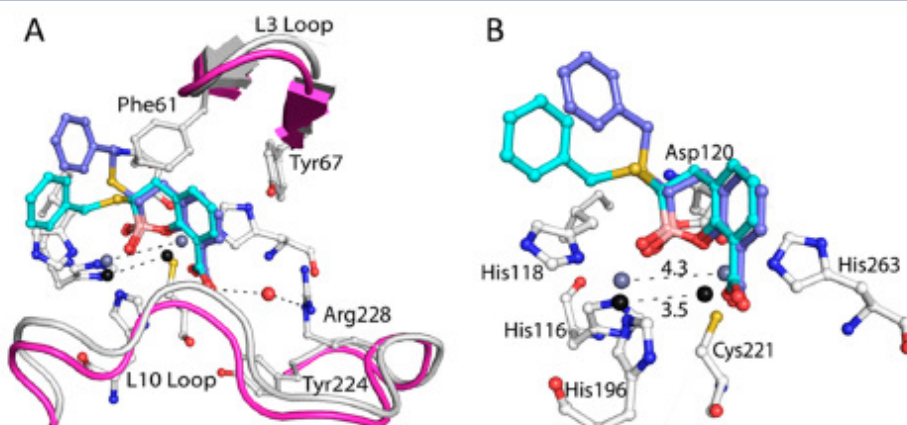


Figure 4. Comparison of the L3 and L10 loop conformations and zinc-zinc distances in the VIM-2 resting state (4BZ3) (pink) and VIM-2 in complex with thioether 3 (white) (6RPN). (A) Both the L3 and L10 loops adopt different positions in the resting state (pink) compared to the complex with 3 (white). Residues important for interactions are also shown. (B) When 3 is bound to VIM-2, the zinc ions are displaced; VIM-2 (black) compared to VIM-2/3 complex (gray). Distances are in Å.

basis of the difference in potency between 3 and 2 for OXA-10 and OXA-48 merits further investigation and will be the subject of future studies.

Most importantly, thioether 3 inhibits a range of MBLs supporting the proposal that bicyclic boronates have considerable potential as potent broad spectrum SBL and MBL inhibitors.^{14,20} In terms of the tested B1 MBLs (NDM-1, VIM-1, VIM-2), 3 was considerably more potent than r-captopril, by at least 10-fold. Compound 3 was of similar (NDM-1, VIM-1) or reduced (VIM-2) potency compared to 2 against B1 MBLs. These differences in potency likely reflect variations in the active sites of individual MBLs, for example, VIM-1 and VIM-2 differ in their binding modes for the β -lactam substrate (or analogous inhibitor) carboxylate (Figure 3).³¹ The increased potency of 3 compared to 2 versus the B3 MBL L1¹⁴ and a mono-zinc B2 MBL (CphA) is notable because it implies that further structure-activity relationship

(SAR) studies will likely expand the scope of potent inhibition by bicyclic boronates to all three MBL subclasses.

Minimum Inhibitory Concentrations. We then investigated the potency of 3 in microbiological assays. Given the inhibitory activity of 3 against OXA-48, we assessed its ability to restore the antimicrobial activity of a carbapenem (meropenem) against an OXA-48 producing bacteria (*Klebsiella pneumoniae* NCTC 13442) and compared it with the monocyclic boronate vaborbactam. Determination of MIC values were performed in triplicate using broth microdilution following CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) guidelines.³² Plates were incubated overnight at 37 °C for 18–24 h, and the absorbance at 600 nm was read using a ClarioSTAR (BMG LabTech) microplate reader.

Meropenem alone had a MIC value of 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13442. As expected, the addition of vaborbactam has no effect in an OXA-48 carrier³³ with the MIC value being maintained at 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. However, the

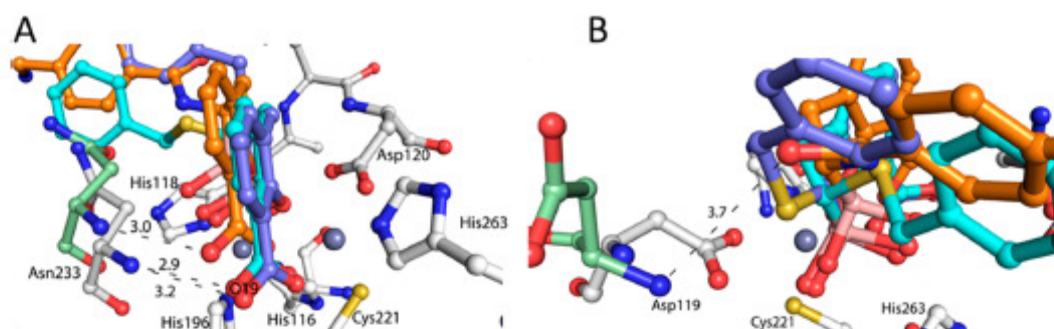


Figure 5. Views from crystal structures of the (*S*)- and (*R*)-enantiomers of **3** (blue and cyan, respectively) superimposed with that of **2** (orange) at the VIM2 active site comparing analogous hydrogen bonding interactions. (A) One carboxylate oxygen (HETATM O18) of both **2** and **3** interacts with the main chain amide of Asn233. PDB IDs 6RPN and 5FQC. (B) Carbonyl group of the acylamino side chain of compound **2** interacts with the backbone NH of Asp119; **3** cannot make this interaction due to its thioether side chain. Residues Asp119 and Asn233 from the VIM-2/2 complex structure are shown in green (PDB 5FQC). Hydrogen bonds: dotted lines. Distances are in Å.

combination of meropenem and **3** at the same fixed concentration used for vaborbactam ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$) reduced the MIC value to the susceptible range ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Although, **3** is not particularly potent in these microbiological assays, this observation provides evidence to support the proposal that bicyclic boronates with varied side chains should be further explored to identify more potent broad spectrum β -lactamase inhibitors.

Crystallographic Investigations. To investigate the mode of β -lactamase inhibition by **3**, we obtained a crystal structure of VIM-2 in complex with **3**. Crystals appeared in wells with a solution of 0.2 M MgCl_2 , 0.1 M Tris (pH 8.25), and 25% PEG 8000; a structure of VIM-2 in complex with **3** was determined to 1.4 Å resolution (Figure 3, Supplementary Table 1). There are two protein molecules in the asymmetric unit (chains A and B, Supplementary Figure 1); electron density for both (*S*)- and (*R*)-enantiomers of **3** was apparent in each of the chains. Each enantiomer of **3** was refined with 50% occupancy in both A and B chains. Compound **3** was prepared as a mixture in which the (*R*)-enantiomer was in excess as assigned by NMR of intermediates (see above); thus the crystallographic evidence indicates binding of the (*S*)-enantiomer may be preferred, though further work is required to verify this proposal in solution. The electron density for **3** in both chains A and B is clearly consistent with the presence of a “tetrahedral” bicyclic boronate. The general binding modes of the bicyclic boronate core and its carboxylate are very similar to those reported for **2** and related compounds with VIM-2 and other MBLs, including NDM-1.³⁴ No evidence for partial tricyclization, as observed crystallographically for VNRX-5133 in complex with NDM-1 was observed.¹⁸ These observations further support the use of bicyclic boronic acids and boronates to mimic β -lactam containing β -lactamase substrates (in their sp^2 form) and enzyme bound high energy tetrahedral intermediates (in their sp^3 form).

One of the oxygen atoms (HETATM designation O18) of the C-3 carboxylate of **3** is positioned to coordinate to Zn2 of the dizinc ion active site of VIM-2, as is the “endocyclic” boronate ring oxygen (Figures 3 and 4). Moreover, there is clear repositioning of the zinc ions in the active site when compared to “resting state” VIM-2 structures, with the Zn–Zn distance increasing from ~ 3.5 Å to 4.3 Å (Figure 4).²⁷ These observations are consistent with other solution and crystallographic studies, implying metal ion movement may occur

during inhibition and catalysis by MBLs and other metalloenzymes.^{35,36}

The L3 loop bordering the VIM-2 active site is in a different position compared to the reported unligated structures, apparently to accommodate the binding of **3** (Figure 4). Compared to previously reported structures of VIM-2 with the cyclic boronate **2**,^{17,20} the overall binding positions of the bicyclic boronate core rings of **2** and **3** are very similar; however, **2** binds at a slightly greater distance (2.5 Å) from the zinc ions compared to **3** (2.3 Å) relative to the boron bound oxygens and hydroxides (Figure 4). Moreover, the non-zinc ion-ligating carboxylate oxygen of **3** (HETATM designation O19) is positioned to form a hydrogen bond with the amide nitrogen of Asn233 (Figure 5). The “exocyclic” boron bound oxygens and hydroxides (HETATM designation O3 and O1) appear to mimic the binding modes proposed for the two oxygens in the oxyanion intermediate in β -lactam hydrolysis (Figure 3). Again, as with **2** and related compounds,^{17,20} the bicyclic phenyl-boronate ring of **3** is analogously positioned to the cephalosporin dihydrothiazine ring (or analogous penicillin or carbapenem β -lactam fused rings) at the VIM-2 active site; that is, the bicyclic boronates have a similar overall active site binding mode to cephalosporins and other β -lactam substrates.

At the VIM-2 MBL active site, the C-6 thioether side chain of **3** projects in a similar direction to that of the acylamino side chain of cephalosporin derived complexes and that of **2**.^{14,17,19,36} However, **3** does not have an amido group containing side chain and hence cannot hydrogen bond with the backbone NH of Asp119 as observed for substrates and inhibitors with acylamino (e.g., **2**, penicillins, cephalosporins) or hydroxyethyl (carbapenems) side chains. This difference may, at least in part, reflect variations in the inhibition potencies of **2**, **3**, and VNRX-5133 though different side chain conformations may also be important. It should also be noted that this interaction is not essential for potent inhibition of some β -lactamases (e.g., AmpC *P. aeruginosa*) and OXA-48, where **3** is more potent than **2**, Table 1), though given the mostly lower activity of **3** compared to **2**, it is possible that it can promote binding.

CONCLUSIONS

The combined inhibition, crystallographic, and microbiological results support the potential of bicyclic boronate based β -

lactamase inhibitors with broad spectrum activity against both SBLs and MBLs. In principle, bicyclic boronates are in equilibrium with monocyclic and potentially even acyclic forms, which can react with nucleophilic active site residues.^{37–39} In several cases, structural studies have revealed the potential for enzyme bound boronate esters to undergo unexpected reactions, as exemplified by the observation of tricyclic ring formation in the reaction of the bicyclic boronate VNRX-5133 with NDM-1 and tricovalent binding of a boronate with a penicillin binding protein.^{18,40} However, in most (bi)cyclic cases studied by protein crystallography, the core cyclic unit, as observed in solution, appears to adopt a bicyclic structure as revealed in this study (Figure 3 and 4) and in most previous work as shown in Supplementary Figure 2, which compares the observed binding modes of different bicyclic boronates in both MBLs and SBLs.^{14,18,19,18}

Although there are limited studies on varied side chain types in bicyclic boronates reported in the academic literature,^{18,19} our study indicates that the potency and selectivity of the bicyclic boronates can be substantially altered by the nature of the C-3 substituent (equivalent to C-6 penicillin and C-7 cephalosporin side chains). Thus, while 3 was less potent than 2 against some of the tested β -lactamases, it was more potent against others, notably MBLs in the B2 (CphA) and B3 subclasses (L1), revealing the potential of bicyclic boronates for potent inhibition of all three MBL subclasses. Although 3 is a potent inhibitor of some β -lactamases, it was not very active in our cell based assays (including compared to 2),¹⁴ possibly due to lack of cell penetration or to efflux.

The overall results imply not only that further work on side chain SAR of bicyclic boronates will be productive, but also that it may be useful to revisit side chain chemistry of the established types of β -lactam containing SBL/transpeptidase inhibitors, the SAR of which mostly reflects cell-based studies. At least in the case of the clinically established β -lactam based class A SBL inhibitors, the range of C-6 penicillin equivalent side chains is limited to either none (e.g., as in clavulanic acid, sulbactam, tazobactam) or hydroxyethyl (carbapenems). The suggestion that further work on side chain optimization should be done is supported by ongoing work concerning derivatives of avibactam, wherein substitution of the avibactam CONH₂ side chain can lead to improved activity, including with respect to conferring transpeptidase inhibition and antibacterial activity.³⁹ Given the enormous contemporary societal importance of β -lactams and related antibiotics, we suggest there is considerable scope for continued work in the field.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.9b00330>.

Further information about synthesis of compounds and crystallographic data processing (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*C.J.S. Email: christopher.schofield@chem.ox.ac.uk

*P.T. Email: peteris@osi.lv

ORCID

Alen Krajnc: 0000-0001-7822-1944

Jürgen Brem: 0000-0002-0137-3226

Christopher J. Schofield: 0000-0002-0290-6565

Present Address

[‡]G.W.L.: Charles River Laboratories, Chesterford Research Park, Saffron Walden, Essex, CB10 1XL, U.K.

Author Contributions

This research was conceived by C.S., P.T., and J.B. Synthesis and characterization was performed by A.P. and A.K., and crystallography was done by A.L. with help from M.A.M. and J.B. G.L. and K.C. performed the kinetic experiments and microbiology studies, respectively. C.S., A.P., and A.L. drafted the manuscript, which was commented on by all authors.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The Trapencieris group thanks the 7th FP project (InnovaBalt) and Latvian Institute of Organic Synthesis, internal grants IG-2016-09 and IG-2018-08, for funding. The Schofield group thanks the Wellcome Trust, University of Oxford, the EPSRC, and MRC (Grant EP/L016044/1) for funding on β -lactamases and related enzymes. We thank the staff of Diamond Light Source for technical support.

■ LIST OF ABBREVIATIONS

CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute; MBL, metallo- β -lactamase; MIC, minimum inhibitory concentration; NDM-1, New Delhi metallo- β -lactamase 1; SAR, structure–activity relationship; SBL, serine- β -lactamase; SPM-1, São Paulo metallo- β -lactamase 1; VIM-1, Verona Integron metallo- β -lactamase 1; VIM-2, Verona Integron metallo- β -lactamase 2

■ REFERENCES

- (1) Fair, R. J., and Tor, Y. (2014) Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect. Med. Chem.* 6, PMC.S14459.
- (2) Frère, J.-M., Joris, B., Granier, B., Matagne, A., Jacob, F., and Bourguignon-Bellefroid, C. (1991) Diversity of the Mechanisms of Resistance to β -Lactam Antibiotics. *Res. Microbiol.* 142 (6), 705–710.
- (3) Bush, K., and Jacoby, G. A. (2010) Updated Functional Classification of Beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (3), 969–976.
- (4) Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., and Nordmann, P. (2005) Metallo-Beta-Lactamases: The Quiet before the Storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2), 306–325.
- (5) Struelens, M. J., Monnet, D. L., Magiorakos, A. P., Santos, F. O., Giesecke, J., and European NDM-1 Survey Participants Collective (2010) New Delhi Metallo-Beta-Lactamase 1-Producing Enterobacteriaceae: Emergence and Response in Europe. *Eurosurveillance* 15, 19716.
- (6) Reading, C., and Cole, M. (1977) Clavulanic Acid: A Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from Streptomyces Clavuligerus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11 (5), 852–857.
- (7) Campoli-Richards, D. M., and Brogden, R. N. (1987) Sulbactam/Ampicillin. *Drugs* 33 (6), 577–609.
- (8) Bryson, H. M., and Brogden, R. N. (1994) Piperacillin/Tazobactam. *Drugs* 47 (3), 506–535.
- (9) Weldhagen, G. F. (2004) Integrons and β -Lactamases—a Novel Perspective on Resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23 (6), 556–562.
- (10) Ehmann, D. E., Jahić, H., Ross, P. L., Gu, R.-F., Hu, J., Kern, G., Walkup, G. K., and Fisher, S. L. (2012) Avibactam Is a Covalent, Reversible, Non- β -Lactam β -Lactamase Inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (29), 11663.
- (11) Wang, D. Y., Abboud, M. I., Markoulides, M. S., Brem, J., and Schofield, C. J. (2016) The Road to Avibactam: The First Clinically Useful Non- β -Lactam Working Somewhat like a β -Lactam. *Future Med. Chem.* 8 (10), 1063–1084.

Broad Spectrum β -lactamase Inhibition By A Thioether Substituted Bicyclic Boronate

Supplementary Information

Anete Parkova*, Anka Lucic**, Alen Krajnc**, Jürgen Brem**, Karina T. Calvopiña**, Gareth W. Langley**, Michael A. McDonough**, Peteris Trapencieris*, and Christopher J. Schofield**.

*Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, LV-1006, Riga, Latvia;

**The Department of Chemistry, 12 Mansfield Road, Oxford OX1 3TA, United Kingdom.

*Current Address: Charles River Laboratories, Chesterford Research Park, Saffron Walden, Essex, CB10 1XL.

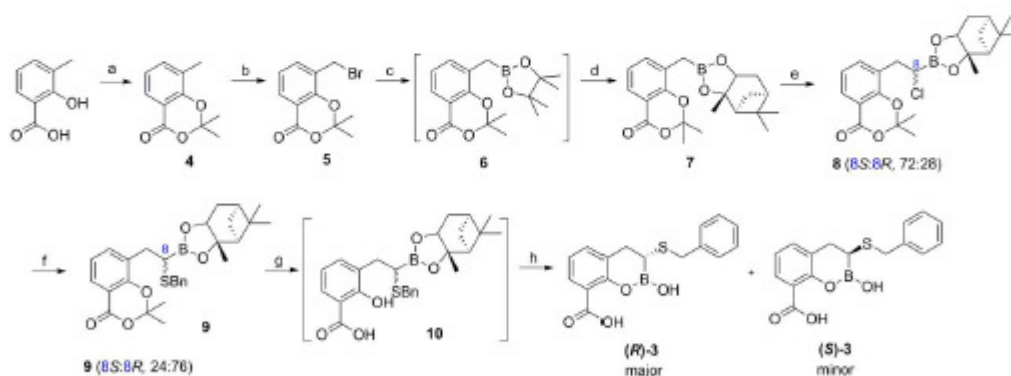
Table of Contents

1. Experimental Details for synthesis	2
1.1 Synthesis and compound characterization	2-10
^1H and ^{13}C NMR Spectra.....	8-18
2 Experimental details for Protein Purification and Crystallisation	14
Supplementary Figure 1. Cartoon showing the two VIM-2:3 complex molecules in the asymmetric unit with compound 3	15
Supplementary Figure 2. Figure showing the different binding modes of various cyclic boronates in complex with β -lactamases and a PBP.....	16
Supplementary Table 1: Data processing and refinement statistics for the VIM-2:3 crystal structure (PDB Code: 6RPN).	17
Supplementary Figure 3. Estimation of the diastereomeric ratio of compound 8.	18
Supplementary Figure 4. Estimation of the diastereomeric ratio of compound 9.	19
References	20

1. Experimental Details for synthesis

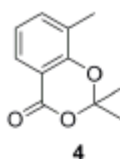
All commercially acquired starting materials, reagents and solvents were used as received, except for *N*-bromosuccinimide, which was recrystallized. Flash chromatography employed Silicagel (35 – 70 μm) (*Merck*). Thin layer chromatography was performed using *Merck* silica gel 60 F₂₅₄ TLC plates and was visualized using UV or by staining with KMnO_4 . Reverse phase chromatographic purifications were performed using a *Biotage* SP1 purification system with *Biotage* SNAP Cartridge KP-C18-HS (12g or 30g) pre-packed columns. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on *Varian* Mercury spectrometer (400 MHz) or *Bruker* Fourier spectrometer (300 MHz) machines. Chemical shift values (δ) are reported in ppm using the residual solvent signal as an internal standard; J values are to the nearest 0.5 Hz. Multiplicity is given as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), br (broad), app (apparent), or a combination of these. IR spectra were recorded using a *Shimadzu FTIR IR Prestige-21* spectrometer. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded using a mass spectrometer with a time-of-flight (TOF) mass analyzer using the ESI technique. Specific optical rotations were measured on an *Autopol VI polarimeter*. $[\alpha]_D^{25}$ values are reported in $10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ g}^{-1}$, and concentrations (*c*) are quoted in g per 100 mL; D refers to the D-line of sodium (589 nm), and temperatures (*T*) are given in degrees Celsius ($^\circ\text{C}$). Petroleum ether refers to distilled light petroleum of fraction 30–40 $^\circ\text{C}$.

1.1 Synthesis and compound characterization



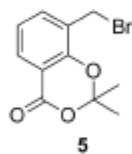
Scheme S1. Synthesis of cyclic boronate with a thio-ether side chain 3. TFA = trifluoroacetic acid, TFAA = trifluoroacetic anhydride, NBS = *N*-bromosuccinimide, BPO = benzoyl peroxide, B_2Pin_2 = bis(pinacolato)diboron, dppf = 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene, DCM = dichloromethane, Bn = benzyl, TEA = triethylamine.

2,2,8-Trimethyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-4-one (4)



To a cooled suspension of 3-methylsalicylic acid (2.5 g, 16.4 mmol) in trifluoroacetic acid (7.5 mL) was added a cooled solution of acetone (3 mL, 40.6 mmol) in trifluoroacetic anhydride (5 mL) dropwise at 0°C. The resultant suspension was then stirred at room temperature for 18h. The resultant yellow solution was diluted with toluene (15 mL), then concentrated under reduced pressure (this procedure was repeated three times). The residue was dissolved in EtOAc, washed with saturated aqueous NaHCO₃, brine, dried (Na₂SO₄), then concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by flash chromatography (5-10% EtOAc in petroleum ether) to give 4 (2.23 g, 71% yield) as an off white solid. *R_f* 0.50 (6:1 Hexanes/EtOAc). *m.p.*: 66 – 67°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 – 7.80 (m, 1H), 7.36 – 7.41 (m, 1H), 6.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 2.21 (s, 3H), 1.73 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.7, 154.3, 137.4, 127.2, 126.8, 122.1, 113.3, 106.2, 26.0, 15.1. IR (film, cm⁻¹) 3062, 2922, 1727, 1383, 1263, 1064, 982. HRMS (ESI/ TOF-Q) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for C₁₁H₁₃O₃, 193.0856; found, 193.0865.

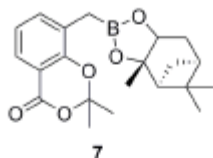
8-(Bromomethyl)-2,2-dimethyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-4-one (5)



To a solution of compound 4 (2.21 g, 11.5 mmol) in acetonitrile (33 mL) was added *N*-bromosuccinimide (2.25 g, 12.6 mmol) at room temperature, followed by benzoyl peroxide (with 25% of H₂O) (371 mg, 1.15 mmol). The yellow colored suspension was heated at 80°C for 22h. The resultant yellow solution was concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography (5-10% EtOAc in petroleum ether) to afford bromide 5 (2.24 g, 72% yield) as an off white solid. *R_f* 0.45 (6:1 Hexanes/EtOAc). *m.p.*: 141 – 142°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.10 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.48 (s, 2H), 1.79 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 160.7, 154.3, 137.2, 130.3, 126.9, 122.7, 114.3, 107.1, 26.2, 26.0. IR (film, cm⁻¹) 3031, 1734, 1313, 1066, 757. HRMS (ESI/ TOF-Q) *m/z*: [M+H]⁺ + calculated for C₁₁H₁₂O₃Br, 270.9957; found, 270.9970. The obtained spectral data were consistent with that reported by Bosnich *et al.*¹

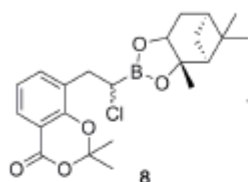
2,2-Dimethyl-8-(((3S,4S,6S)-3,5,5-trimethylhexahydro-4,6-

methanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-yl)methyl)-4H-benzo[d][1,3]dioxin-4-one (7)



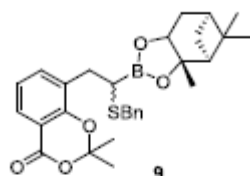
Bromide 5 (2.14 g, 7.89 mmol), B_2Pin_2 (2.20 g, 8.68 mmol), KOAc (2.32 g, 23.7 mmol) and $Pd(dppf)Cl_2$ (289 mg, 0.39 mmol) were suspended in degassed 1,4-dioxane (30 mL). The mixture was flushed with argon and the resulting orange suspension was heated at 90°C in a sealed tube for 4h. The dark brown suspension was cooled to room temperature and filtrated through a pad of Celite® with EtOAc washing. The filtrate was washed with water and brine, dried (Na_2SO_4), then concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in THF (35 mmol); (1S, 2S, 3R, 5S)-(+)-pinanediol (2.69 g, 15.8 mmol) was added and solution was stirred at 40°C for 18h. The resultant brown solution was concentrated under reduced pressure and purified using flash chromatography (10-20% EtOAc in petroleum ether) to give pinanediol boronic ester 7 (2.55 g, 87% yield over 2 steps) as a colorless oil. R_f 0.25 (9:1 petroleum ether/EtOAc). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.75 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H), 7.48 – 7.32 (m, 1H), 6.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.25 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 1H), 2.33 – 2.28 (m, 1H), 2.26 (s, 2H), 2.22 – 2.16 (m, 1H), 2.01 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 1.91 – 1.87 (m, 1H), 1.79 (dd, $J = 14.5, 3.5, 2.0$ Hz, 1H), 1.72 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.13 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 0.81 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 161.8, 153.9, 137.1, 128.3, 126.6, 122.2, 113.3, 106.2, 86.1, 78.1, 51.3, 39.5, 38.25, 35.5, 28.8, 27.1, 26.5, 26.1, 25.8, 24.1. IR (film, cm^{-1}) 2987, 2919, 2871, 1741, 1379, 1305, 1058, 758. HRMS (ESI/ TOF-Q) m/z : $[M+H]^+$ + calculated for $C_{21}H_{28}BO_5$, 371.2030; found, 371.2048. Optical rotation: $[\alpha]_D^{20} = +15.6$ ($c = 10.0$ mg/mL, $CHCl_3$).

8-((2S)-2-Chloro-2-((3aS,4S,6S)-3a,5,5-trimethylhexahydro-4,6-methanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-yl)ethyl)-2,2-dimethyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-4-one (8, major product)



A cold bath at $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ was prepared by addition of liquid nitrogen to 50:50 mixture of ethanol/methanol. To an oven dried 2-necked round bottom flask under an argon atmosphere was added a solution of CH_2Cl_2 (0.61 mL, 9.45 mmol) in anhydrous THF (10 mL) at $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. 2.5M *n*BuLi solution in hexane (1.73 mL, 4.32 mmol) was added slowly down the inside wall of the flask, keeping the temperature below $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$. The resulting white turbid solution was stirred at $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 50min. At $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a solution of boronate 7 (1.0 g, 2.70 mmol) in anhydrous THF (4 mL) was then added dropwise. The solution was stirred at $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ for ca. 15 min before a 0.5M solution of ZnCl_2 in anhydrous THF (4.32 mL, 2.16 mmol) was added dropwise; the yellow solution was allowed to warm to room temperature slowly and stirred for 17h. The resultant orange solution was quenched with sat. NH_4Cl (ca. 30 mL), extracted with EtOAc (3 x 30 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , concentrated under reduced pressure, then purified by silica gel chromatography (5-20% EtOAc in petroleum ether) to give product 8 (678 mg, 61% yield) as a colorless oil and a mixture of stereoisomers (8S:8R 72:28 as assigned by ^1H NMR; Supplementary Figure 3). Analytical data are given for the major stereoisomer. R_f 0.25 (9:1 petroleum ether/EtOAc). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.86 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.05 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 4.35 (dd, J = 9.0, 2.0 Hz, 1H), 3.76 – 3.68 (m, 1H), 3.22 – 3.07 (m, 2H), 2.39 – 2.29 (m, 1H), 2.23 – 2.15 (m, 1H), 2.08 – 2.04 (m, 1H), 1.93 – 1.81 (m, 2H), 1.74 (s, 6H), 1.36 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.05 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 0.83 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 161.4, 154.4, 137.9, 128.5, 127.2, 122.2, 113.7, 106.5, 87.1, 78.7, 77.5, 77.2, 76.84, 51.3, 39.4, 38.4, 35.3, 34.0, 28.5, 27.1, 26.4, 26.1, 26.0, 24.1. IR (film, cm^{-1}) 2987, 2928, 2871, 1741, 1379, 1302, 1060, 759. HRMS (ESI/TOF-Q) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{BClO}_5$, 419.1798; found, 419.1806. Optical rotation: $[\alpha]_D^{20} = +13.0$ ($c = 12.3$ mg/mL, CHCl_3).

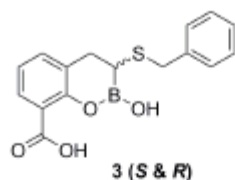
8-((2*R*)-2-(Benzylthio)-2-((3*aS*,4*S*,6*S*)-3*a*,5,5-trimethylhexahydro-4,6-methanobenzo[*d*][1,3,2]dioxaborol-2-yl)ethyl)-2,2-dimethyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-4-one (9, major product)



To a solution of chloride 9 (534 mg, 1.27 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (11 mL) at room temperature was added benzyl mercaptan (0.19 mL, 1.66 mmol), followed by addition of triethylamine (0.35 mL, 2.54 mmol). The resultant yellowish solution was stirred at room temperature for 3h, then diluted with ~10 mL CH₂Cl₂, washed with aqueous HCl (1M), dried (Na₂SO₄) and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography (5-20% EtOAc in petroleum ether) to give product 9 (449 mg, 70% yield) as a colorless amorphous solid and a mixture of stereoisomers (8*S*:8*R* 24:76) as assigned by ¹H NMR (Supplementary Figure 4). Analytical data are given for the major stereoisomer. *R_f* 0.30 (9:1 petroleum ether/EtOAc). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.35 – 7.27 (m, 4H), 7.25 – 7.19 (m, 1H), 6.97 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.24 (dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz, 1H), 3.85 – 3.75 (m, 2H), 2.98 – 2.83 (m, 2H), 2.47 – 2.40 (m, 1H), 2.35 – 2.26 (m, 1H), 2.14 – 2.06 (m, 1H), 2.03 – 1.98 (m, 1H), 1.88 – 1.83 (m, 1H), 1.82 – 1.76 (m, 1H), 1.62 (d, *J*=5.5Hz, 6H), 1.32 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 0.89 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 0.81 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.5, 154.4, 138.4, 137.8, 129.2, 128.6, 128.0, 127.1, 122.00, 113.6, 106.3, 86.3, 78.2, 77.5, 77.2, 76.8, 51.4, 39.5, 38.3, 36.5, 35.5, 31.3, 28.7, 27.1, 26.3, 26.2, 25.6, 24.1. IR (film, cm⁻¹) 2987, 2924, 2871, 1743, 1379, 1305, 1060, 759, 703. HRMS (ESI/TOF-Q) *m/z* : [M+H]⁺ + calcd for C₂₉H₃₅BO₅S, 507.2377; found, 507.2395. Optical rotation: [α]_D²⁰ = -24.2 (*c* = 10.5 mg/mL, CHCl₃).

(R)-3-(Benzylthio)-2-hydroxy-3,4-dihydro-2H-benzo[e][1,2]oxaborinine-8-carboxylic acid

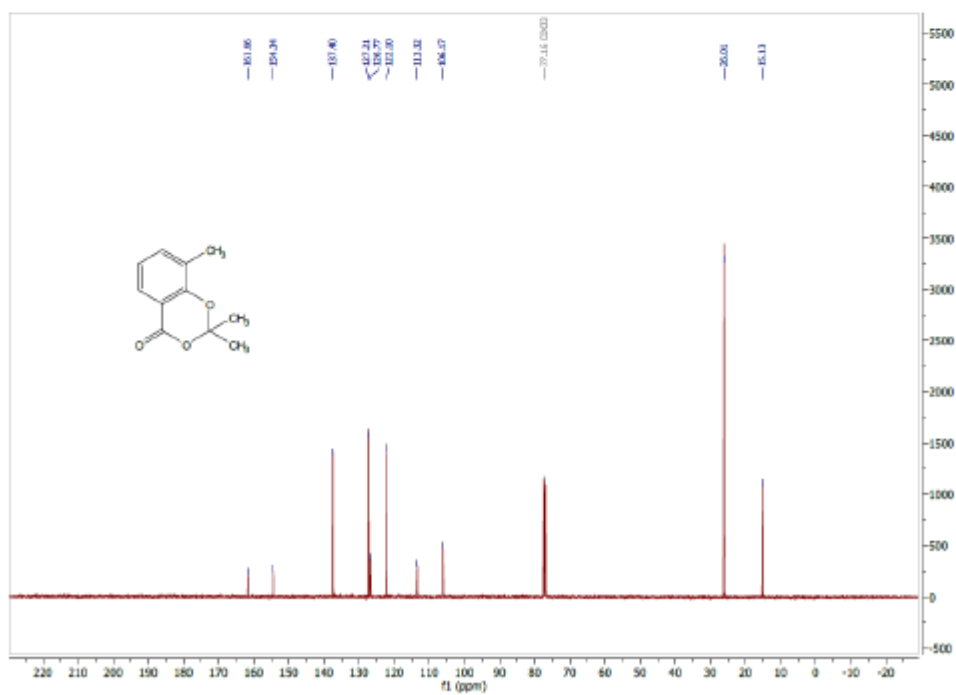
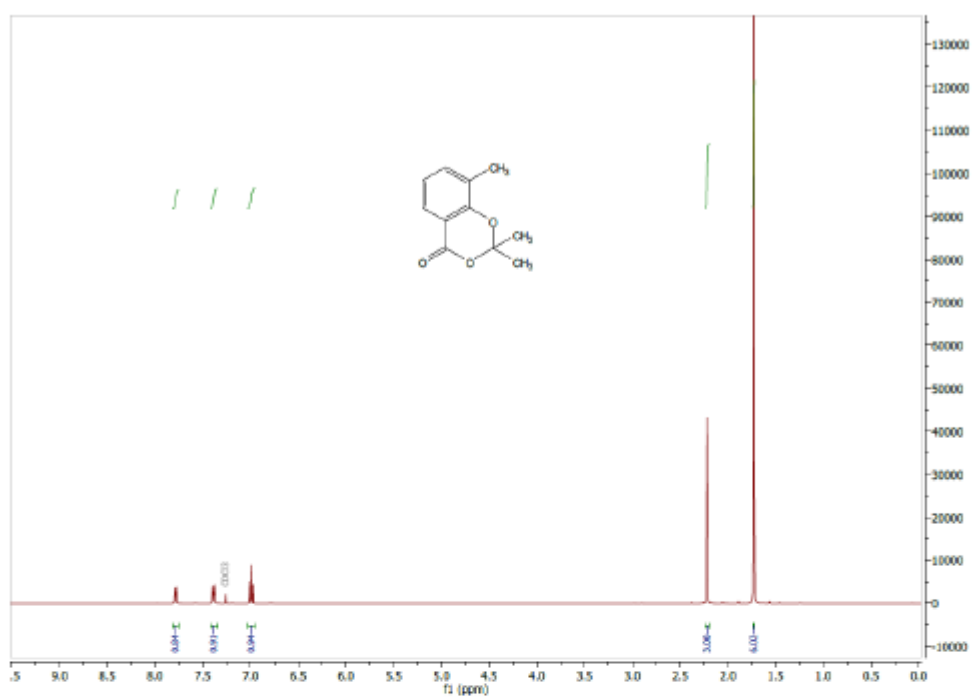
(3, major enantiomer)



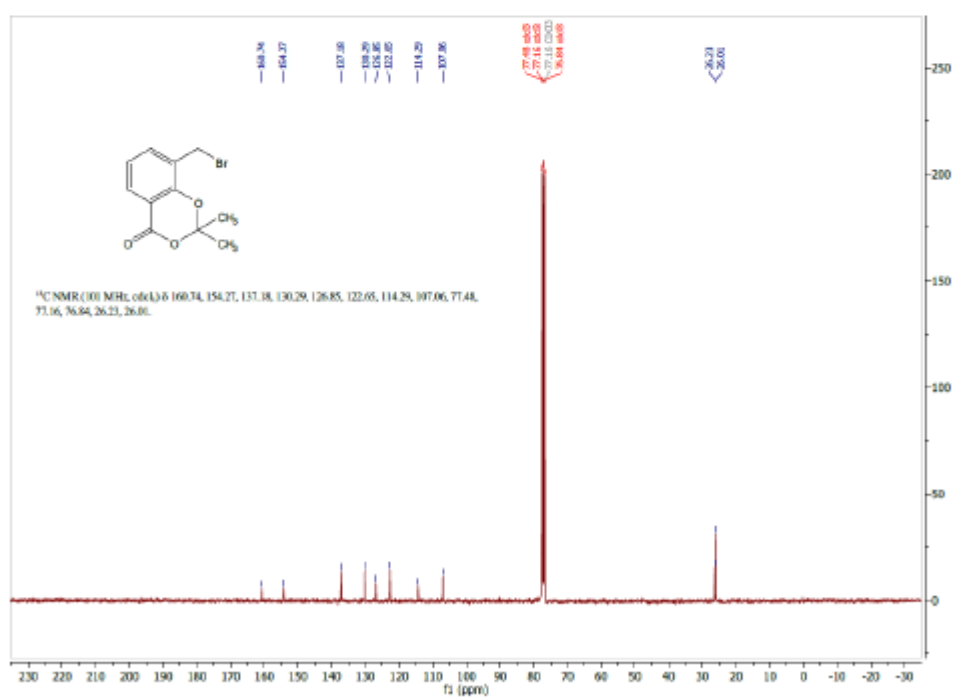
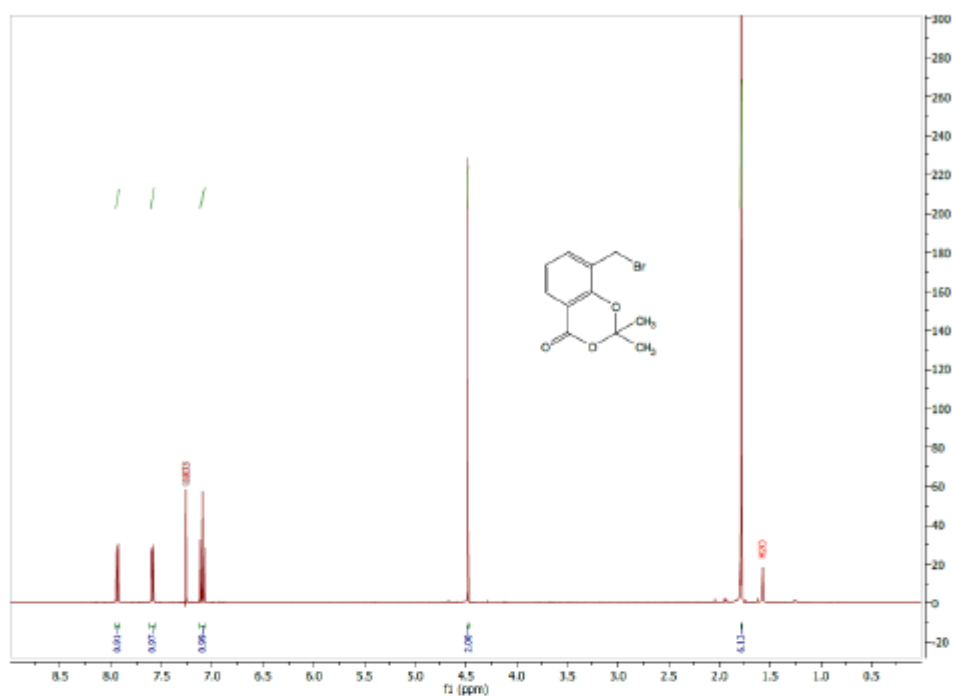
To a solution of compound 9 (244 mg, 0.48 mmol) in THF (4 mL) at room temperature 5M aqueous KOH (3 mL) was added. The resulting two-phase solution was stirred at 60°C for 6h, then cooled to room temperature. Et₂O (2 mL) and water (2 mL) were added, the phases were separated and the organic layer extracted with water (3 x 2 mL). The combined aqueous extracts were acidified with aqueous HCl (1M) to pH 1 and extracted with EtOAc (3 x 3 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried (Na₂SO₄), then concentrated *in vacuo*. The residue thus obtained and *t*BuB(OH)₂ (90 mg, 0.88 mmol) were dissolved in acetonitrile (6 mL), before *conc* HCl (0.68 mL, 22.0 mmol) and few drops of water were added. The resulting yellow solution was stirred at 40°C for 3h. The resulting orange solution was allowed to cool to room temperature, was washed with petroleum ether (3 x 3 mL), then concentrated under reduced pressure. The residue was purified using a C18 column 10-100% MeCN in water (+ 0.1% v/v aqueous TFA) to give the desired product 3 (43 mg, 31% yield) as a yellow solid. **m.p.**: 190 – 192°C. **¹H NMR** (400 MHz, MeOD) δ 7.75 (d, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 7.36 – 7.32 (m, 1H), 7.29 – 7.23 (m, 4H), 7.20 – 7.16 (m, 1H), 6.85 – 6.79 (m, 1H), 3.64 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 3.06 – 2.95 (m, 2H), 2.52 (dd, *J* = 8.5, 6.5 Hz, 1H). **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD) δ 140.5, 137.6, 130.3, 130.0, 130.0, 129.9, 129.3, 129.2, 129.2, 127.8, 127.4, 119.7, 36.9, 33.8. **IR** (film, cm⁻¹) 3401, 2913, 1700, 1597, 1475, 1230, 758, 698. **¹¹B NMR** (MeOD) 27.9. **HRMS** (ESI/ TOF-Q) *m/z*: [M-H] – calculated for C₁₆H₁₄BO₄S, 313.0706; found, 313.0708. **Optical rotation**: [α]_D²⁰ = +68.6 (*c* = 10.0 mg/mL, MeOH).

^1H and ^{13}C NMR Spectra

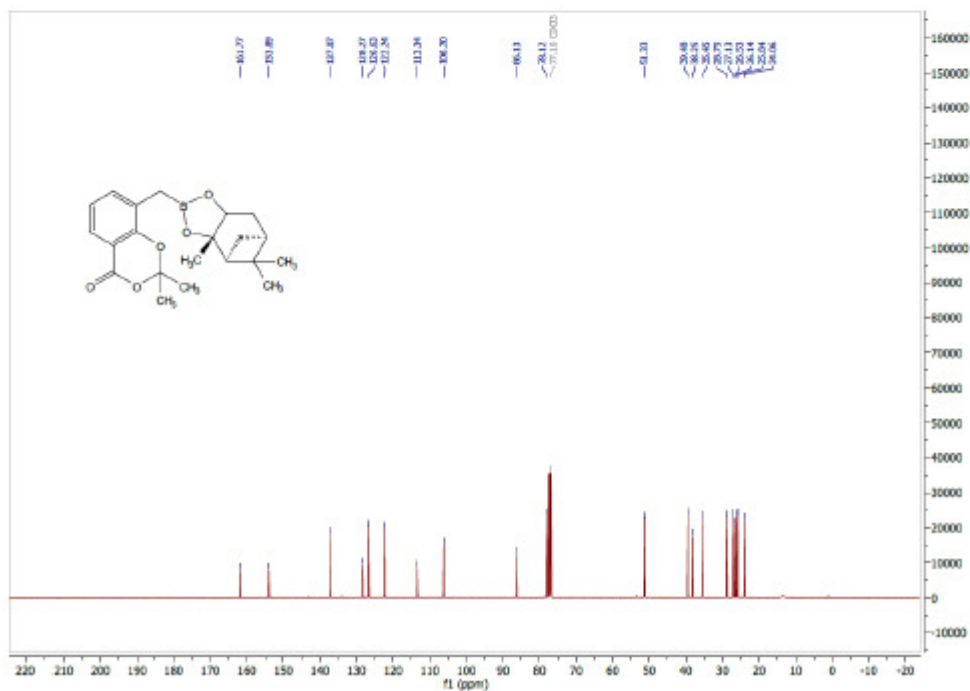
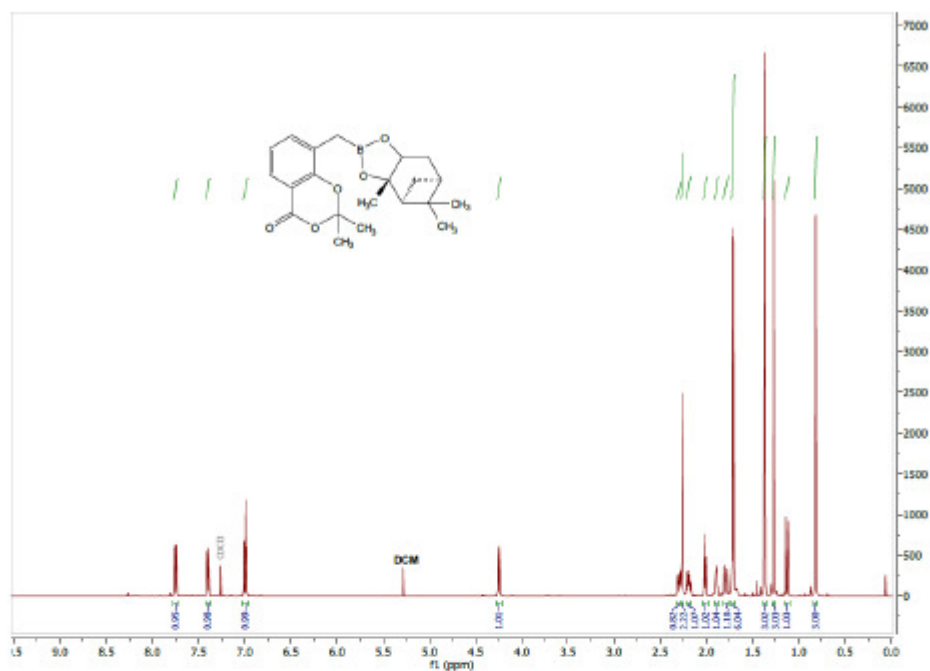
^1H and ^{13}C NMR for 2,2,8-Trimethyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-4-one (4) in CDCl_3 .



^1H and ^{13}C NMR for 8-(Bromomethyl)-2,2-dimethyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-4-one (5) in CDCl_3 .

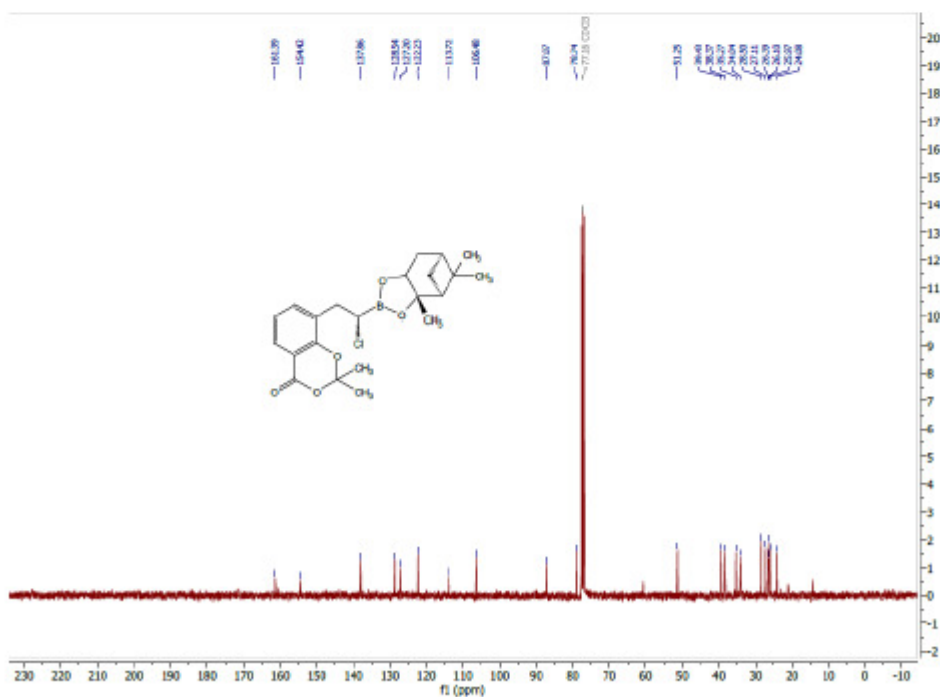
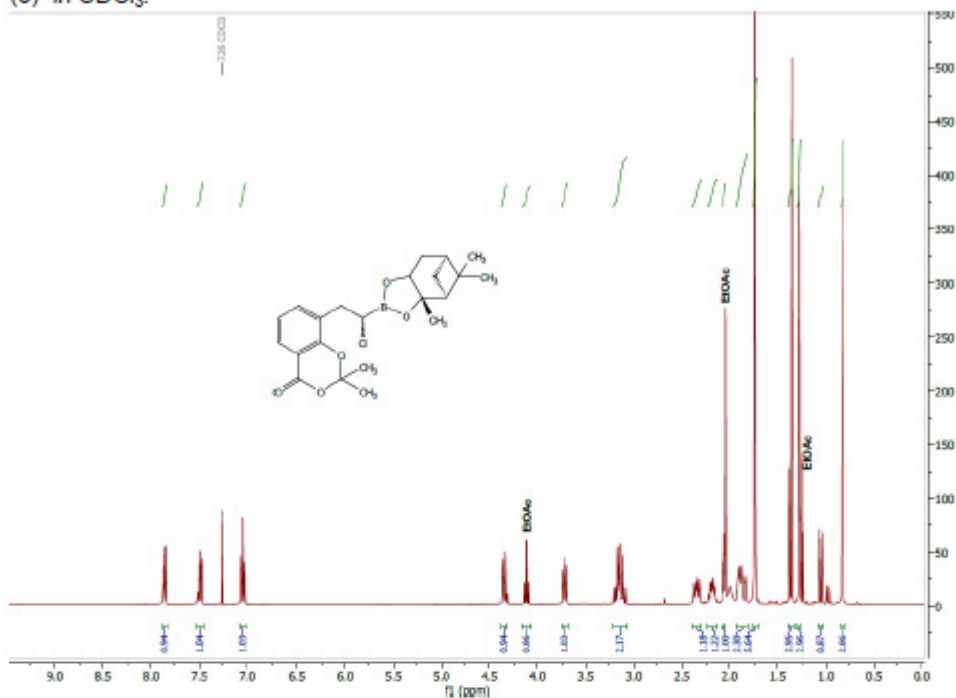


^1H and ^{13}C NMR for 2,2-Dimethyl-8-(((3S,4S,6S)-3,5,5-trimethylhexahydro-4,6-methanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-yl)methyl)-4H-benzo[d][1,3]dioxin-4-one (7) in CDCl_3 .

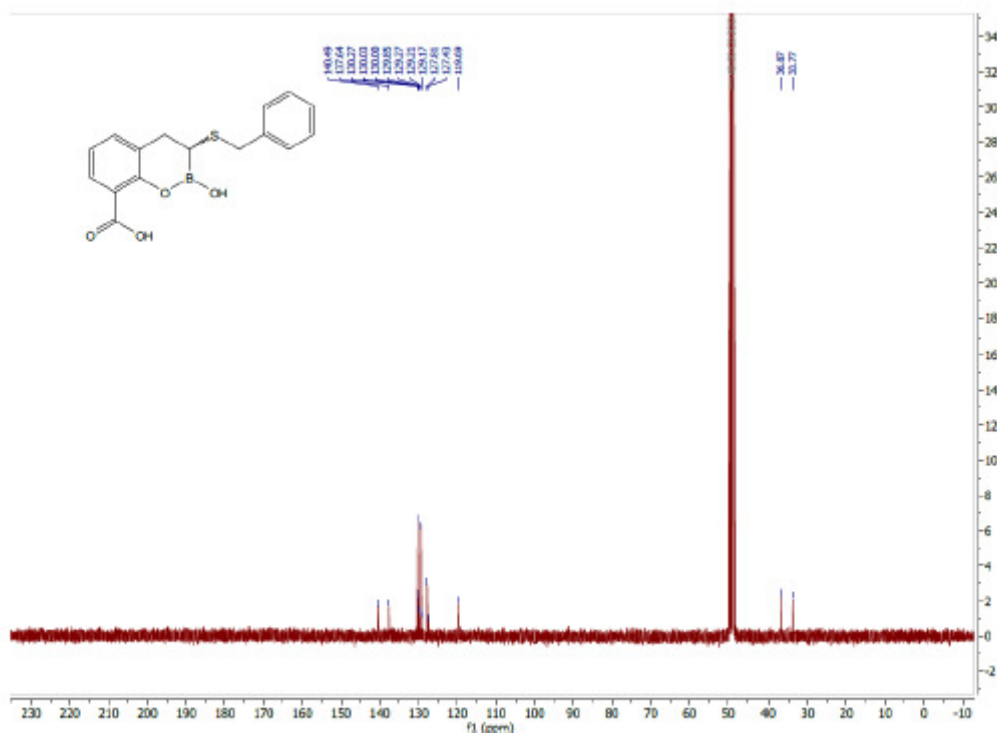
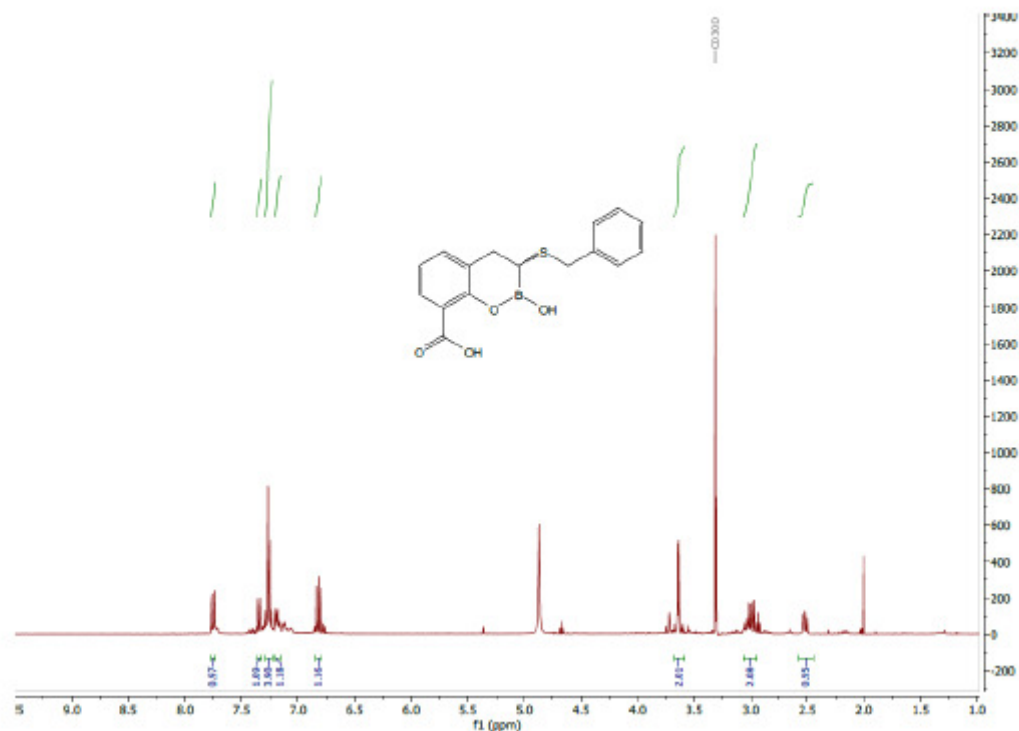


10

^1H and ^{13}C NMR for 8-((2S)-2-Chloro-2-((3aS,4S,6S)-3a,5,5-trimethylhexahydro-4,6-methanobenzo[d][1,3,2]dioxaborol-2-yl)ethyl)-2,2-dimethyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-4-one (8) in CDCl_3 .

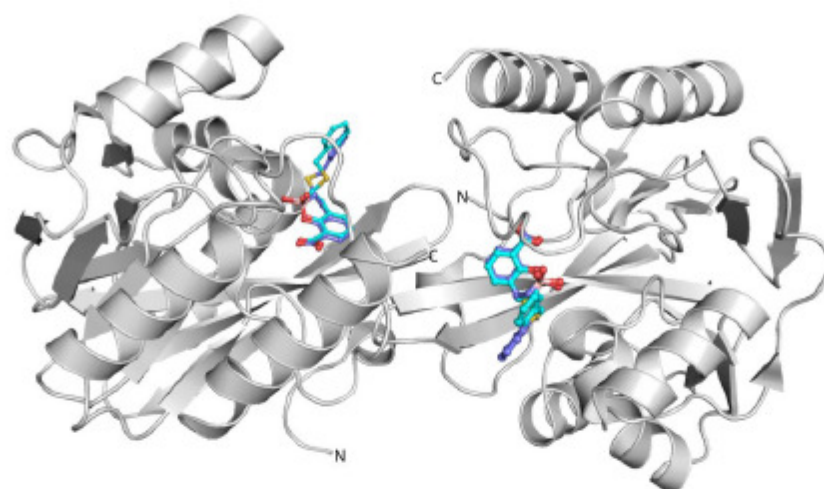


^1H and ^{13}C NMR for (*R*)-3-(Benzylthio)-2-hydroxy-3,4-dihydro-2H-benzo[e][1,2]oxaborinine-8-carboxylic acid (3) in MeOD (major enantiomer).

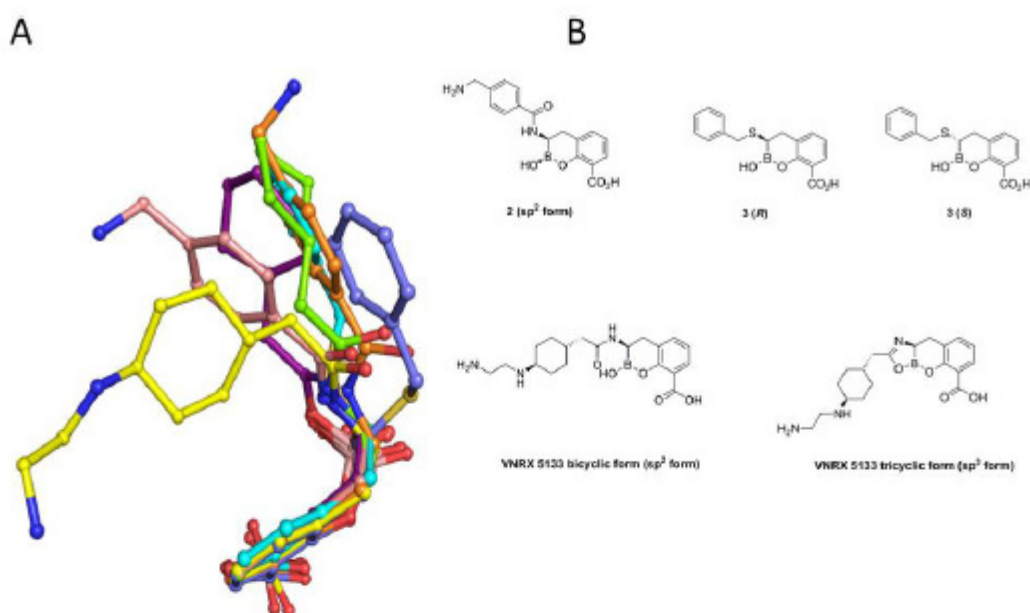


2 Experimental details for Protein Purification and Crystallisation

The VIM-2 DNA inserted into the pOPINF vector was used to produce recombinant VIM-2 protein in Lemo21(DE3) pLysS *E. coli* cells as previously reported.² The purified protein was then buffer exchanged into the crystallisation buffer (50mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP and 100 μ M ZnCl₂) and concentrated to 8.1 mg/mL. To prepare the protein solution with inhibitor for co-crystallisation a 10 mM solution of compound 3 was diluted tenfold in a 8.1 mg/ml solution of VIM-2 and incubated on ice for 10 minutes. The protein-inhibitor mixture was then co-crystallised by sitting drop vapour diffusion method at room temperature by varying concentrations of PEG 8000 (7.5 - 35% (w/v)), Tris buffer (pH 7 - 8.75) and 0.2 M magnesium chloride. Crystallization plates (96 well Art Robbins low profile intelliplates) were prepared using a PhoenixRE liquid dispenser (with 200-300nL drops and 80uL reservoir volumes in 1:2, 1:1, and 2:1 ratios of protein:reservoir). VIM-2 crystals appeared after 24 hours in the condition 25 % PEG 8000, 0.2 M magnesium chloride and 0.1 M Tris pH 8.25. A 150 x 50 x 50 crystal was cryo-protected using 15% (v/v) glycerol diluted in well solution, harvested using nylon loops, then cryo-cooled by plunging in liquid nitrogen. Data were collected using a single crystal which diffracted to 1.4 Å resolution in-house using a Rigaku FRE+ X-ray generator equipped with HF Varimax optics (300uM collimator) and a Saturn 944+ CCD detector. The data were processed using HKL3000³ (Supplementary Table 1). The structure was solved by molecular replacement using XYZ as a search model in PHASER Model building⁴ and fitting was done using COOT.⁵ Refinement was carried out using the PHENIX suite (Supplementary Figure 3).²⁻⁵



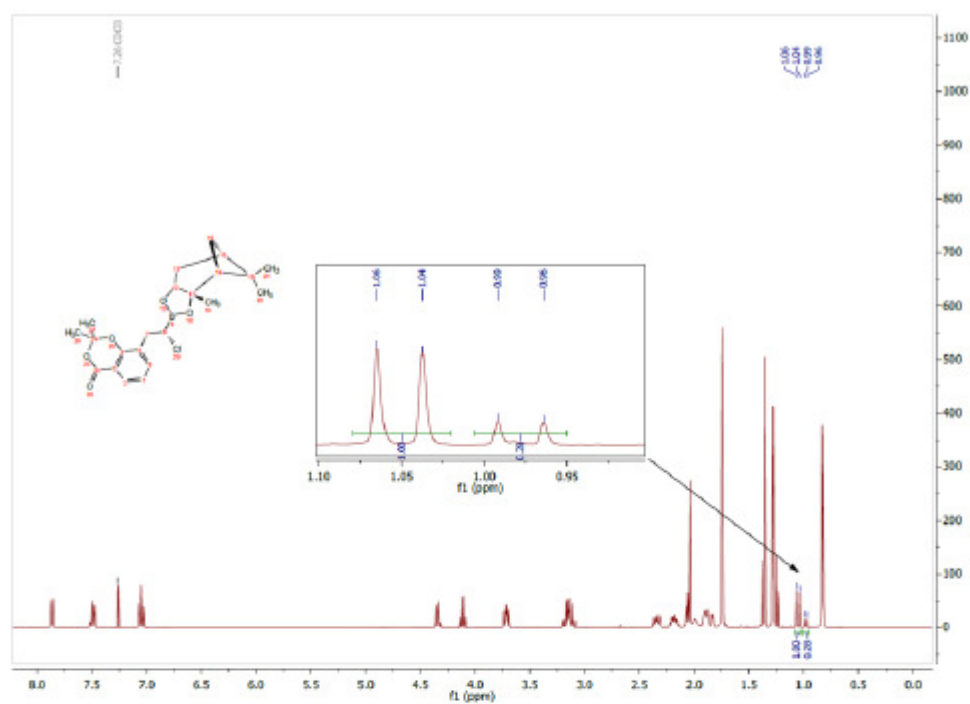
Supplementary Figure 1. Cartoon showing the two VIM-2:3 complex molecules in the asymmetric unit with compound 3. Both (*S*) and (*R*)-enantiomers of 3 were refined (1:1) at the active site of each of the chains (A and B) comprising the asymmetric unit, cyan and slate blue sticks respectively. PDB code: 6RPN.



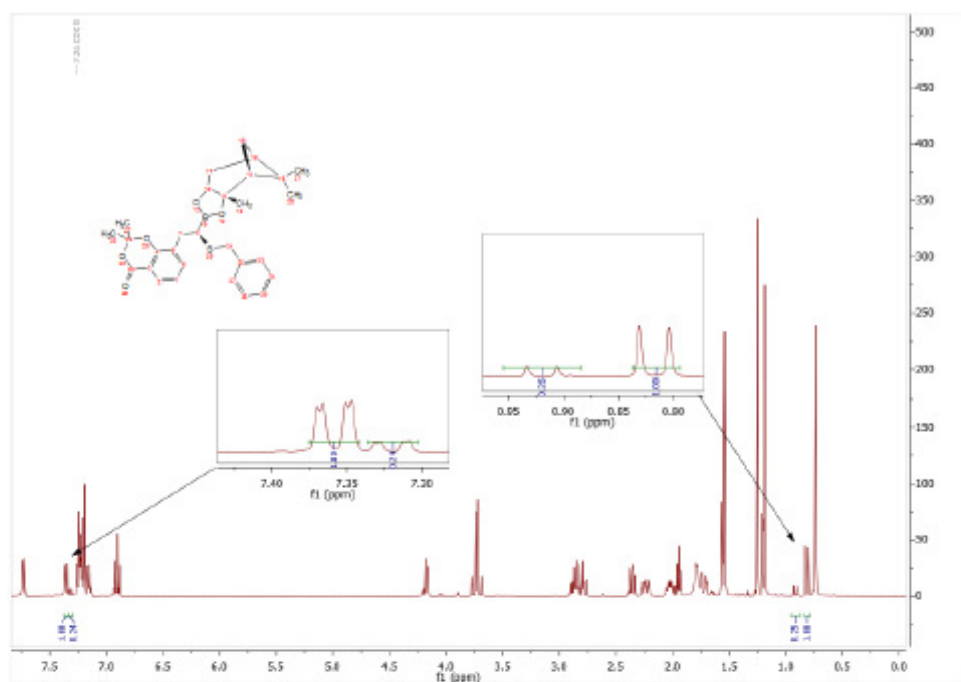
Supplementary Figure 2. Figure showing the different binding modes of various cyclic boronates in complex with β -lactamases and a PBP. (A) Cyan and blue: conformations of the (*R*) and (*S*)-enantiomers of compound 3 in complex with VIM-2, respectively (PDB: 6RPN); Orange: compound 2 bound to VIM-2 (5FQC); Light pink: compound 2 bound to PBP5 (5J8X⁶); Green and purple, VNRX-5133 bound to NDM-1 (6RMF⁷) in its bicyclic and tricyclic forms, respectively; Yellow: VNRX-5133 bound to OXA-10 (6RTN⁷). The different side chain conformations observed imply that there is scope for optimisation to extend the spectrum of activity of cyclic boronates. (B) Structures of bicyclic and tricyclic boronates.

Data collection and refinement statistics from VIM-2:3 structure	
X-ray source (λ)	Rigaku FR-E+ Superbright (CuK_{α} 1.54 \AA)
Sample temperature (K)	100
Crystal size (μm)	150 x 50 x 50
Resolution range (\AA)	31.34-1.41 (1.46-1.41)*
Space group	C 2
Unit cell (a, b, c) (\AA)	101.081 79.155 67.746
Unit cell (α, β, γ) ($^{\circ}$)	90, 130.3, 90
No. of reflections	75121 (6682)*
R_{merge}	0.084 (0.365)*
I/σ	14.4 (1.85)*
CC1/2	0.725 (0.658)*
Completeness (%)	95.5 (85.1)*
Multiplicity	2.0 (1.4)*
Wilson B values (\AA^2)	15.4
Refinement*	
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.1287/ 0.1556
Average B factors (\AA^2)	
All Atoms	15.8
Enzyme Atoms	13.2
Ligand Atoms	22.4
Water Atoms	28.3
RMS Deviations	
Bond lengths (\AA)	0.007
Bond angles ($^{\circ}$)	1.086

Supplementary Table 1: Data processing and refinement statistics for the VIM-2:3 crystal structure (PDB Code: 6RPN). *Values from the highest resolution shell are in brackets.



Supplementary Figure 3. Estimation of the diastereomeric ratio of compound **8**. Following reported procedures⁸, the diastereomeric ratio (8*S*:8*R*, 72:28) of the Matteson homologation was estimated by ¹H NMR by integration of the H_{endo} proton of the (+)-pinanediol derived moiety of the chloro intermediate **8** (δ major, (*S*)-chloride, 1.05 ppm, doublet; δ minor, (*R*)-chloride: 0.98 ppm, doublet)⁹.



Supplementary Figure 4. Estimation of the diastereomeric ratio (8S:8R, 24:76) of compound 9. The diastereomeric ratio was estimated by ¹H NMR by integration, as described in the legend of Supplementary Figure 3.

References

- (1) McCollum, D. G.; Hall, L.; White, C.; Ostrander, R.; Rheingold, A. L.; Whelan, J.; Bosnich, B. Bimetallic Reactivity. Preparation and Characterization of Symmetrical Bimetallic Complexes of a Binucleating Macrocyclic Ligand, Cytim, Containing 6- and 4-Coordinate Sites. *Inorg. Chem.* **1994**, *33* (5), 924–933. <https://doi.org/10.1021/ic00083a016>.
- (2) Gewirth, D.; Otwinowski, Z.; Minor, W. *THE HKL MANUAL Denzo XDisplayF Scalepack An Oscillation Data Processing Suite for Macromolecular Crystallography*.
- (3) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J.; IUCr. Phaser Crystallographic Software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40* (4), 658–674. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>.
- (4) Afonine, P. V.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Mustyakimov, M.; Terwilliger, T. C.; Urzhumtsev, A.; Zwart, P. H.; Adams, P. D. Towards Automated Crystallographic Structure Refinement with *Phenix.Refine*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68* (4), 352–367. <https://doi.org/10.1107/S0907444912001308>.
- (5) Emsley, P.; Cowtan, K.; IUCr. Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (12), 2126–2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>.
- (6) Brem, J.; Cain, R.; Cahill, S.; McDonough, M. A.; Clifton, I. J.; Jiménez-Castellanos, J.-C.; Avison, M. B.; Spencer, J.; Fishwick, C. W. G.; Schofield, C. J. Structural Basis of Metallo- β -Lactamase, Serine- β -Lactamase and Penicillin-Binding Protein Inhibition by Cyclic Boronates. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12406. <https://doi.org/10.1038/ncomms12406>.
- (7) Krajnc, A.; Brem, J.; Hinchliffe, P.; Calvopiña, K.; Panduwawala, T. D.; Lang, P. A.; Kamps, J. J. A. G.; Tyrrell, J. M.; Widlake, E.; Saward, B. G.; et al. Bicyclic Boronate VNRX-5133 Inhibits Metallo- and Serine- β -Lactamases. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (18), 8544–8556. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00911>.
- (8) Matteson, D. S.; Majumdar, D. Homologation of Boronic Esters to α -Chloro Boronic Esters. *Organometallics* **1983**, *2* (11), 1529–1535. <https://doi.org/10.1021/om50005a008>.
- (9) Matteson, D. S.; Ray, R. Directed Chiral Synthesis with Pinanediol Boronic Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (25), 7590–7591. <https://doi.org/10.1021/ja00545a046>.








2. Pielikums - Bicyclic Boronates as Potent Inhibitors of AmpC, the Class C β -Lactamase from *Escherichia coli*.

Lang, P. A.; Parkova, A.; Leissing, T. M.; Calvopiña, K.; Cain, R.; Krajnc, A.; Panduwawala, T. D.; Philippe, J.; Fishwick, C. W. G.; Trapencieris, P.; Page, M. G. P.; Schofield, C. J.; Brem, J.

Biomolecules **2020**, *10*, 899–914. <https://doi.org/10.3390/biom10060899>

Article

Bicyclic Boronates as Potent Inhibitors of AmpC, the Class C β -Lactamase from *Escherichia coli*

Pauline A. Lang ¹, Anete Parkova ^{2,†}, Thomas M. Leissing ^{1,†}, Karina Calvopiña ¹, Ricky Cain ^{3,‡}, Alen Krajnc ^{1,‡}, Tharindi D. Panduwawala ¹, Jules Philippe ⁴, Colin W. G. Fishwick ³, Peteris Trapencieris ², Malcolm G. P. Page ⁴, Christopher J. Schofield ^{1,*} and Jürgen Brem ^{1,*}

¹ Department of Chemistry, University of Oxford, Chemistry Research Laboratory, Oxford OX1 3TA, UK

² Latvian Institute of Organic Synthesis, LV-1006 Riga, Latvia

³ School of Chemistry, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK

⁴ Jacobs University Bremen gGmbH, 28759 Bremen, Germany

* Correspondence: Christopher.schofield@chem.ox.ac.uk (C.J.S.); jurgen.brem@chem.ox.ac.uk (J.B.)

† These authors contributed equally.

‡ These authors contributed equally.

Received: 30 April 2020; Accepted: 1 June 2020; Published: 12 June 2020



Abstract: Resistance to β -lactam antibacterials, importantly via production of β -lactamases, threatens their widespread use. Bicyclic boronates show promise as clinically useful, dual-action inhibitors of both serine- (SBL) and metallo- (MBL) β -lactamases. In combination with cefepime, the bicyclic boronate taniborbactam is in phase 3 clinical trials for treatment of complicated urinary tract infections. We report kinetic and crystallographic studies on the inhibition of AmpC, the class C β -lactamase from *Escherichia coli*, by bicyclic boronates, including taniborbactam, with different C-3 side chains. The combined studies reveal that an acylamino side chain is not essential for potent AmpC inhibition by active site binding bicyclic boronates. The tricyclic form of taniborbactam was observed bound to the surface of crystalline AmpC, but not at the active site, where the bicyclic form was observed. Structural comparisons reveal insights into why active site binding of a tricyclic form has been observed with the NDM-1 MBL, but not with other studied β -lactamases. Together with reported studies on the structural basis of inhibition of class A, B and D β -lactamases, our data support the proposal that bicyclic boronates are broad-spectrum β -lactamase inhibitors that work by mimicking a high energy ‘tetrahedral’ intermediate. These results suggest further SAR guided development could improve the breadth of clinically useful β -lactamase inhibition.

Keywords: antibiotic resistance; β -lactam antibacterial; bicyclic boronate inhibitors; VNRX-5133/taniborbactam; vaborbactam; metallo- and serine- β -lactamase inhibition; transition state analogue

1. Introduction

The β -lactams are amongst the most important antibiotics [1], but their widespread use is challenged by resistance, substantially through the global dissemination of β -lactamases [2,3]. There are two structural/mechanistic groups of β -lactamases—the nucleophilic serine- β -lactamases (SBLs: Ambler classes A, C, D) and the zinc dependent metallo- β -lactamases (MBLs: Ambler class B) (Figure 1b) [4]. Treatment of bacterial infections exhibiting resistance via some SBLs, particularly class A enzymes, was substantially advanced by the co-administration of a β -lactam antibiotic with a β -lactam-based SBL inhibitor, i.e., clavulanic acid [5,6], sulbactam [7], or tazobactam [8] (Figure 1a). However, these inhibitors are inactive, or are insufficiently active, against most class C SBLs, class

A carbapenemases, and class B MBLs [3]. The clinical introduction of avibactam and avibactam derivatives such as relebactam [9] was an important step in more broadly combating SBLs because avibactam is active against class A β -lactamases (including carbapenemases), class C β -lactamases, and some class D β -lactamases [10]. Avibactam is also important because it demonstrates the clinical viability of non- β -lactam-based β -lactamase inhibition [11]. However, there is emerging SBL-mediated resistance to avibactam [12,13] and MBLs can hydrolyze avibactam, albeit slowly [14], suggesting that its future use may be compromised by the evolution of new β -lactamases [14,15].

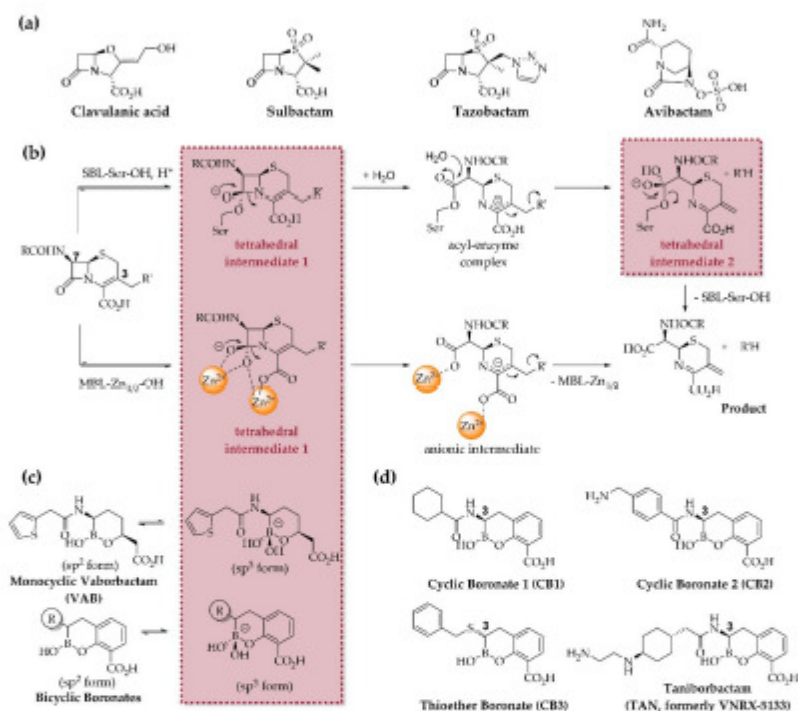


Figure 1. Mechanistic basis for β -lactamase inhibition by (bi)cyclic boronates. (a) clinically used β -lactamase inhibitors; (b) outline general mechanisms of SBLs and MBLs, exemplified by hydrolysis of a cephalosporin with elimination at C-3'. The tetrahedral intermediates, common to both SBL and MBL catalysis, may be mimicked by the sp^3 form of (bi)cyclic boronates; (c) equilibria between sp^2 - and sp^3 -hybridized forms of mono- and bi-cyclic boronates; (d) structures of bicyclic boronate β -lactamase inhibitors cyclic boronate 1 (CB1), cyclic boronate 2 (CB2), the thioether boronate (CB3), and taniborbactam (TAN, formerly VNRX-5133). Note that the CB3 used in this study contained a mixture of the (3S)- and (3R)-enantiomers (–1:3, respectively) [16].

By contrast with the successes in inhibiting SBLs, to date, there are no clinically useful MBL inhibitors [3]. There is thus interest in development of non-acylating β -lactamase inhibitors, especially those exhibiting dual-action SBL and MBL inhibition. Boron-based compounds have long been known as SBL and, more recently, MBL inhibitors [17]. After early work on acyclic boronic acids, recent efforts have focused on cyclic boronates. One such compound, the (predominantly) monocyclic boronic acid vaborbactam [18] (VAB, Figure 1c) which is approved for treatment of complicated urinary tract infections (cUTI) in co-administration with meropenem [19]. Vaborbactam is a relatively potent inhibitor of class A ESBLs and the KPC carbapenemases, but is not, at least usefully, active against tested MBLs and clinically relevant class C and D SBLs [19]. By contrast, boronates that are predominantly

bicyclic in solution, are able to inhibit many, but not all, of the tested representatives of all four Ambler β -lactamase classes [20,21]. The bicyclic boronates are proposed to work by binding in a manner analogous to that of the tetrahedral intermediate(s) likely involved in β -lactam catalyzed hydrolysis by both SBLs and MBLs [20,21] (Figure 1b). Taniborbactam (TAN, formerly VNRX-5133, Figure 1d) has passed phase 1 clinical testing [22] and is currently in phase 3 clinical testing in combination with cefepime (registration No. NCT03840148 at [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov)). TAN has been shown to successfully inhibit SBLs and MBLs *in vitro* [23–26], and to restore cefepime's activity *in vivo* against a class A SBL (CTX-M-14) producing strain of *Klebsiella pneumoniae* in a neutropenic lung model of infection as well as CTX-M-15 expressing *E. coli* in ascending urinary tract infections in mice [26].

Many β -lactamases are encoded by plasmids, but the AmpC type β -lactamases that are present in most *Escherichia coli* strains are chromosomally encoded [27]. While normally expressed at low levels, mutations in the *ampC* gene promoter and/or attenuator regions can lead to constitutive hyperproduction of AmpC in *E. coli* [28,29]. This is clinically relevant because *E. coli* is a common Gram-negative pathogen, which is often responsible for bloodstream infections [30].

Structural data on the modes of action of bicyclic boronate β -lactamase inhibitors are relatively limited [20,21,24,26,31–33]. Work to date indicates that more than one side chain binding mode can occur, making structure-guided optimization challenging. Work on the B1 subfamily MBL NDM-1 has shown partial cyclisation of the TAN acylamino side chain to form a tricyclic structure, as an observed bound at the NDM-1 active site by protein crystallography [24]. The extent to which such tricyclisation contributes to β -lactamase inhibition more generally is unclear.

To enable future efforts on the optimization of bicyclic boronates, we report crystallographic and kinetic studies on inhibition of the clinically important class C AmpC β -lactamase from *Escherichia coli* (AmpC_{EC}) by TAN, a previously reported model bicyclic boronate 2 (CB2) [20,21,34], and a thioether bicyclic boronate derivative (CB3) that we have recently shown to have enhanced potency against some SBLs and MBLs *in vitro* [16,35]. Together with previously reported studies [20,21,24,26,31–33], the crystallographic results support the proposal that bicyclic boronates mimic the tetrahedral intermediate(s) common to both SBL and MBL catalysis. The results indicate scope for the modification of the C-3 side chain of bicyclic boronates to improve potency towards AmpC type β -lactamases and inform on the likelihood of tricycle formation.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

CB2, TAN, and CB3 were prepared as previously described [16,20,24]; VAB was purchased from Cayman Chemical (An Arbor, MI, USA). FC-5 was prepared as previously described [36].

2.2. Enzyme Production

Recombinant AmpC from *Escherichia coli* was produced according to a modification of the reported protocol [37]. In brief, AmpC_{EC} was produced using the pAD7 vector [38] in *E. coli* W3110 cells using 2TY media supplemented with 12.5 mg/mL tetracycline. Cells were grown overnight at 37 °C, harvested via centrifugation (10 min, 12,000×g, 4 °C), resuspended in 50 mL lysis buffer (20 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 50 μ g/mL DNase I), then lysed via sonification. Subsequent chromatography steps employed ÄKTA (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) FPLC machines. The resultant supernatant was dialyzed with three buffer exchanges of 300 mL 10 mM Tris pH 6.75, then loaded onto a SP Sepharose (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) cation exchange column and gradually eluted using a gradient of 10–75 mM Tris pH 7.0. Fractions containing the purified protein were pooled and concentrated to 20 mg/mL using an Amicon Ultra (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) centrifugal filter (15 mL, 10kDa MWCO). The protein was highly purified (>95%) as judged by SDS-PAGE and electrospray ionization mass spectrometry analyses (observed mass: 39,551 Da, calculated mass: 39,551 Da).

2.3. Kinetics

All kinetic measurements were carried out in competition assays using the fluorescent substrate FC-5 [36] under steady-state conditions monitoring hydrolysis, in 100 mM phosphate buffer pH 7.5 supplemented with 0.01% (*v/v*) Triton X-100 (Assay Buffer). Fluorescence was measured using a PHERAstarFS (BMG Labtech, Aylesbury, United Kingdom) plate-reader, recording emission spectra at $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm. IC_{50} s were determined after 10 min incubation time of 500 pM AmpC_{EC} with varying concentrations of inhibitors and assayed using 5 μ M FC-5. Nonlinear regression analyses were carried out using GraphPad Prism V. 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

As described for avibactam inhibition [11], the kinetics of bicyclic boronate inhibition of β -lactamases can be described assuming a two-step, reversible inhibition model:



with E : enzyme; I : inhibitor; k_1 : association rate constant; k_{-1} : dissociation rate constant; k_2 : binding rate constant, and k_{-2} : recyclization rate constant.

To obtain the pseudo first-order rate constant k_{obs} and the apparent inhibition constant K_{iapp} , the rate of FC-5 (5 μ M) hydrolysis by AmpC_{EC} (100 nM) was measured in the presence of varying concentrations of the inhibitor. Time-courses were then first fitted to Equation (2) to give the observed initial rate constants k_{obs} as previously described [39]:

$$P = V_S t + (V_0 - V_S) \frac{(1 - e^{-k_{\text{obs}} t})}{k_{\text{obs}}} + P_0 \quad (2)$$

with P : formed product, proportional to fluorescence signal; P_0 : initial fluorescence; V_S : velocity of no-inhibitor control; and V_0 : velocity of no-enzyme control to estimate a fully inhibited enzyme.

Plotting the resultant k_{obs} values against the inhibitor concentration $[I]$ (Figure S1b) and fitting to Equation (3) gives the apparent second-order rate constant (k_2/K')

$$k_{\text{obs}} = k_2 + \frac{k_2}{K'} * [I] \quad (3)$$

with K' representing the equilibrium coefficient of AmpC_{EC} inhibition in the presence of FC-5 in the set concentration of 5 μ M.

This can then be corrected using the Michaelis constant (K_M) of FC-5 for AmpC_{EC} and the FC-5 concentration $[S]$ according to Equation (4) to give the second-order rate constant (k_2/K):

$$\frac{k_2}{K} = \frac{k_2}{K'} * \left(\frac{[S]}{K_M} + 1 \right) \quad (4)$$

The same data were used to determine the apparent inhibition constant K_{iapp} [40]. The reciprocals of the initial rates were plotted against inhibitor concentration (Figure S1a), giving a straight line for which the value of the intercept divided by the slope gives K_{iapp}' . From this, K_{iapp} can be obtained after correction with the K_M for FC-5 according to Equation (5):

$$K_{\text{iapp}} = \frac{K_{\text{iapp}}'}{1 + \left(\frac{[S]}{K_M} \right)} \quad (5)$$

Off rates (k_{-2} or k_{off}) were measured using the jump-dilution method [41] (Figure S1c). AmpC_{EC} (1 μ M) was incubated with the respective inhibitor (10 μ M for TAN, CB2 and CB3, and 100 μ M for VAB) for 30 min at room temperature, then diluted 100,000 fold in the Assay Buffer (final enzyme concentration: 10 pM) and immediately assayed with 25 μ M FC-5. The data were fitted to Equation (2) with V_0 in this case representing the velocity of the no-enzyme control and V_S representing the initial velocity of uninhibited enzyme.

The half-life of the enzyme-inhibitor complex $t_{1/2}$ is given by Equation (6):

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{off}} \quad (6)$$

2.4. Antimicrobial Susceptibility Testing

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by broth microdilution in triplicate and interpreted using published Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [22].

Ceftazidime (CAZ) was tested alone (0.25–256 $\mu\text{g mL}^{-1}$) against DH5 α *Escherichia coli* and DH5 α *E. coli* containing the pAD7-Amp_{CEC} plasmid and in combination with CB2, CB3, TAN, and VAB (all tested at a fixed concentration of 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) using the DH5 α *E. coli* strain containing the pAD7-Amp_{CEC} plasmid [38].

2.5. Crystallization Experiments, X-Ray Data Collection and Processing

Crystallization plates (low reservoir Intelli-Plate 93-3, Art Robbins Instruments, Sunnyvale, CA, USA) were set up with a Phoenix RE Drop setter instrument (Art Robbins Instrument, Sunnyvale, CA, USA). Crystals were grown via the vapor diffusion technique at room temperature. To obtain Amp_{CEC}-TAN and Amp_{CEC}-CB3 complex crystals, crystals of apo-Amp_{CEC} were grown in Condition A, comprising 200 nL Amp_{CEC} (20 mg/mL in 50 mM Tris pH 7.5), mixed with 200 nL Precipitant Solution (10 mM zinc chloride, 100 mM MES pH 6.0 and 20% (*w/v*) PEG 6000). Crystals grew at room temperature over 2–3 days, were transferred into a well solution supplemented with approximately 20 mM inhibitor and incubated for 15 and 10 min, respectively. These Amp_{CEC} crystals are highly sensitive to DMSO and prolonged soaking times (>15 min). Soaking was successful for TAN and CB3, but, in the case of CB2, only low occupancy was observed for CB2 following soaking under the same conditions. A single crystal of the Amp_{CEC}-CB2 complex was obtained via co-crystallization using Condition B, comprising 200 nL Amp_{CEC} (18 mg/mL in 50 mM Tris pH 7.5) and CB2 (20 mM), mixed with 200 nL Precipitant Solution (150 mM HEPES, 60% (*v/v*) 2-methyl-2,4-pentane diol (MPD)). Crystals grew at room temperature over 1–2 weeks. Due to the less robust crystallization system and the lower resolution of the data obtained (see Table S1), the co-crystallization approach was not explored for TAN and CB3. Crystals were cryo-cooled and then stored in liquid nitrogen. Datasets from single crystals were collected using the i03 and i24 MX beamlines at the Diamond Light Source (Table S1). Structures were solved by molecular replacement in Phaser [42] using PDB ID 1IEM [43] as the starting model. Alternating cycles of refinement using PHENIX [44] and model building using Coot [45] were performed until R_{work} and R_{free} converged. Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank. PDB IDs are 6T3D, 6YEO, 6YPD and 6YEN for the crystal structure of AmpC from *Escherichia coli* in its apo-form and in complex with CB2, CB3, and TAN, respectively.

3. Results and Discussion

3.1. Kinetic Studies of Amp_{CEC} Inhibition by Bicyclic Boronates

To investigate the importance of different side chains at the C-3 position (equivalent to C-6 of penicillins or C-7 of cephalosporins) of the bicyclic boronate core for inhibition of Amp_{CEC}, steady-state kinetic assays (Table 1) were carried out using the fluorescent reporter substrate FC-5 [36]. All three tested bicyclic boronates showed enhanced potency for Amp_{CEC} inhibition compared to the monocyclic boronate VAB ($K_{\text{iapp}} \sim 1\text{--}4 \mu\text{M}$ for the bicyclic boronates, compared to 19 μM for VAB). Interestingly, the thioether CB3 was slightly more potent against isolated Amp_{CEC} than TAN and the structurally similar compound CB2 ($K_{\text{iapp}} 1 \mu\text{M}$ for CB3, compared to 3 μM and 4 μM for CB2 and TAN, respectively). The increased potency of CB3 likely results from accelerated binding ($k_2/K \sim 224 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ compared to $\sim 81/86 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for CB2/TAN and $\sim 7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for VAB). However, dissociation of CB3 is equally accelerated ($21 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, compared to $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ for CB2/TAN and $0.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ for VAB), resulting in a shorter half-life of the enzyme-inhibitor complex for CB3. This proposal is supported by

pIC₅₀ measurements showing equivalent potency of all three tested bicyclic boronates after a 10 min pre-incubation period with AmpC_{EC} (pIC₅₀s of 7.5 for CB2, TAN, and CB3 compared to 6.3 for VAB).

Table 1. Kinetic analyses of AmpC_{EC} inhibition by (bi)cyclic boronates *in vitro*. K_{app} values and pseudo first-order rates (k_2/K) were determined by assaying 100 nM AmpC_{EC} with 5 μ M FC-5 [36]. k_{off} rates were determined after jump-dilution (100,000 fold) of AmpC_{EC} (1 μ M) that had been pre-incubated with cyclic boronates (10 μ M for TAN, CB2 and CB3 and 100 μ M for VAB) at room temperature for 30 min, then assayed using 25 μ M FC-5. pIC₅₀s were obtained from assays using 500 pM AmpC_{EC} and 5 μ M FC-5 following a 10 min inhibitor pre-incubation at room temperature. Buffer: 50 mM Tris, pH 7.5, 0.01% (v/v) Triton X-100. Data were analyzed as described in Materials and Methods.

Inhibitor	K_{app} (μ M)	k_2/K ($M^{-1} s^{-1}$) $\times 10^5$	k_{off} (s^{-1}) $\times 10^{-3}$	$t_{1/2}$ (min)	pIC ₅₀
VAB	19.1 \pm 1.32	6.55 \pm 0.46	0.69 \pm 0.03	16.8 \pm 0.7	6.32 \pm 0.03
TAN	3.73 \pm 0.50	85.6 \pm 9.2	2.54 \pm 0.51	4.55 \pm 0.91	7.53 \pm 0.02
CB2	3.26 \pm 0.40	81.0 \pm 6.4	2.77 \pm 0.27	4.18 \pm 0.41	7.49 \pm 0.01
CB3	1.16 \pm 0.14	224 \pm 21	20.9 \pm 12.8	0.55 \pm 0.34	7.53 \pm 0.02

3.2. Microbiology Experiments Confirm Potential of (Bi)cyclic Boronates to Inhibit AmpC_{EC} in Cells

We then investigated the activity of VAB, TAN, CB2 and CB3 (fixed at 4 μ g mL⁻¹) in combination with ceftazidime (CAZ) against *E. coli* DH5 α producing AmpC_{EC} (Table 2). Production of AmpC_{EC} substantially increased the extent of CAZ resistance (MIC 256 μ g mL⁻¹ compared to 1 μ g mL⁻¹ without the AmpC_{EC} expressing plasmid); all the tested inhibitors significantly restored CAZ activity against the AmpC_{EC} expressing strain. Despite the high potency of CB3 observed in the kinetic analyses against isolated AmpC_{EC}, it was less potent than CB2, TAN or VAB in restoring CAZ activity in the engineered strain, i.e., CB3 reduced the MIC only to 4 μ g mL⁻¹, whereas the other inhibitors restored the activity of CAZ to \leq 1 μ g mL⁻¹.

Table 2. Microbiology analyses with vaborbactam (VAB), taniborbactam (TAN), cyclic boronate 2 (CB2) and cyclic boronate 3 (CB3). All inhibitors were tested at a fixed concentration of 4 μ g mL⁻¹.

Strain	Plasmid	Minimum Inhibitory Concentration Ceftazidime (μ g mL ⁻¹)				
		CAZ	CAZ (+ VAB)	CAZ (+ TAN)	CAZ (+ CB2)	CAZ (+ CB3)
DH5 α	-	1	-	-	-	-
DH5 α	pAD7 AmpC _{EC}	256	1	1	0.5	4

3.3. AmpC_{EC} Crystal Structures with Bicyclic Boronates Give New Insights into Structural Basis of Inhibition

To investigate the structural basis of AmpC_{EC}-inhibition by the three bicyclic boronates (CB2, TAN, and CB3), we obtained crystal structures of their complexes with recombinant AmpC_{EC}. The structures of AmpC_{EC} in complex with TAN (1.42 Å resolution, PDB ID: 6YEN) and CB3 (1.60 Å resolution, PDB ID: 6YPD) were obtained by soaking of apo-AmpC_{EC} crystals. A structure of the complex of AmpC_{EC} with CB2 (2.03 Å resolution, PDB ID: 6YEO) was obtained by co-crystallization (see Materials and Methods). Apo-AmpC_{EC} crystallized with a single chain in the asymmetric unit (space group $P4_332$), while the asymmetric unit of the AmpC_{EC}-CB2 co-crystal complex contains four molecules of the β -lactamase (space group $P222_1$).

The overall fold of the AmpC_{EC}-boronate complexes is very similar to that of the apo-AmpC_{EC} structure (PDB ID: 6T3D; main chain RMSDs with respect to the apo-structure: 0.39, 0.15, 0.07 Å for CB2, TAN, and CB3, respectively, for chain A). In all three structures, analysis of the electron density maps for the AmpC_{EC} active site indicates that the bicyclic boronates CB2, TAN, and CB3 have reacted with the nucleophilic S64 to form an anionic tetrahedral species in which the boron is sp³ hybridized (Figure 2), as observed for other bicyclic boronate SBL complex structures [20,21,26,31–33]. The bicyclic

core of all three inhibitors in complex with AmpC_{EC} is bound in a similar manner to that observed for cyclic boronate 1 (CB1, Figure 1d) in complex with the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC (PDB ID: 6I30 [32]). In none of these cases did any of the active site bound bicyclic boronates form a tricyclic structure, as was observed in crystallographic studies of the MBL NDM-1-TAN complex [24].

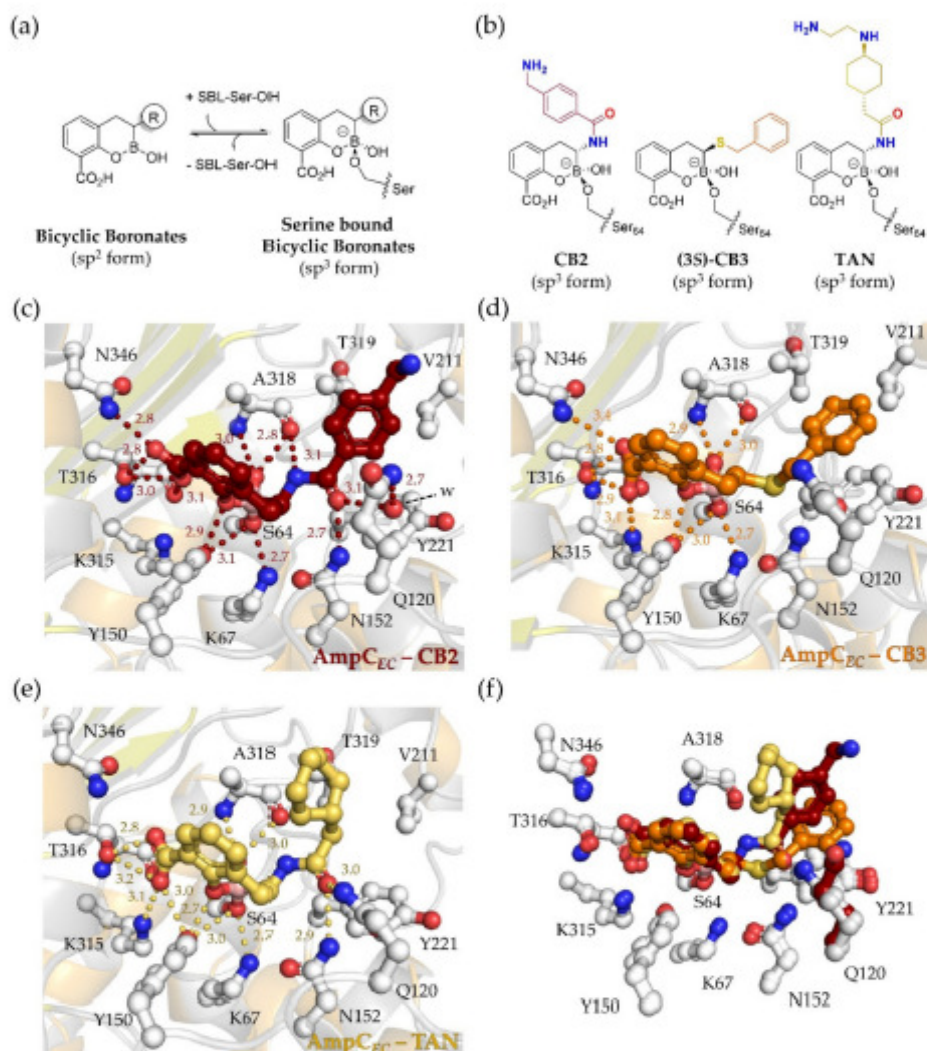


Figure 2. Structural basis for AmpC_{EC} inhibition by bicyclic boronates. (a) reaction between sp²-hybridized bicyclic boronates and SBLs give a serine-bonded anionic sp³-hybridized species; (b) structures of serine-bonded sp³ forms of the bicyclic boronates; (c–e) active site views of complexes of AmpC_{EC} with CB2, CB3, and TAN. Hydrogen-bonding interactions are shown in colored dashes, distances are in Å; (f) overlay of active site views, color coding as in (c–e). Note that the Q120 side chain is rotated in AmpC_{EC}-CB2 structure (highlighted in dark red); it is unclear whether this is induced by binding of CB2, or due to the crystallization conditions (see text).

The aryl carboxylic acid of the bicyclic boronates is positioned similarly to that of the monocyclic inhibitor VAB as observed in complex with the *Enterobacter cloacae* AmpC (PDB ID: 4XUX [18]) and that of CB1 observed in complex with *P. aeruginosa* AmpC [32]. The aryl carboxylic acid of all the bicyclic boronates is involved in hydrogen-bonding or electrostatic interactions with active site residues K315, T316, and N346. The boron-linked hydroxyl group engages in hydrogen-bonding interactions with the backbone NH and oxygen of A318, as observed for the equivalent S345/338 residues in the *P. aeruginosa* AmpC-CB1 and *E. cloacae* AmpC-VAB complex structures [18,32].

As observed in the *P. aeruginosa* AmpC-avibactam [46] and *P. aeruginosa* AmpC-relebactam [9,47] complex structures, the amide nitrogen and carbonyl group of the TAN acylamino side chain are positioned to make hydrogen-bonding interactions with active site residues, i.e., Q120, N152, and A318. The cyclohexyl ring of TAN is directed out of the active-site R1 pocket (Figure 2e); only weak density was observed for the likely disordered terminal alkyl-amine side chain, which was excluded from the model.

AmpC_{EC} was co-crystallized with CB2 giving crystals with four molecules in each asymmetric unit, all of which manifested clear and continuous electron density for the covalently bound CB2 at the active site (Figure S2). The overall folds and orientations of active site residues and CB2 (Figure S2d) are very similar in all four chains (main chain RMSD of Chain B, C and D in relation to chain A: 0.31, 0.28, and 0.33 Å, respectively). Binding of the bicyclic boronate core of CB2, together with that of the amido side chain group portion, is very similar to that observed for TAN (CB3 has a different type of side chain).

Interestingly, in the CB2 structure, the side chain of Q120 is directed away from the active site in all four molecules in the asymmetric unit (Figure 2c); Q120 interacts with a water molecule (Figure 2c, 'w', observed in all chains of the ASU), which in turn interacts with the carbonyl oxygen of the acylamino CB2 side chain. In the apo structure of AmpC_{EC} in condition A (PDB ID: 6T3D), the Q120 side chain is oriented towards the active site; however, the apparently weak density and elevated B-factors for the Q120 side chain indicate partial disorder. The reorientation of the Q120 side chain relative to the apo-enzyme observed in the AmpC_{EC}-CB2 complex is not manifest in the structure of the AmpC_{EC}-TAN complex. Although the AmpC_{EC}-CB2 complex was co-crystallized using a different crystallization condition than for the two other structures reported here (see Materials and Methods), because the Q120 side chain does not interact with residues of other AmpC_{EC} molecules in the crystalline lattice, reorientation due to formation of crystal contacts seems unlikely. In a crystal structure of AmpC_{EC}, obtained by soaking with CB2, partial density for the bound CB2 was observed in the active site, though reorientation of the Q120 side chain was not observed (data not shown, because of poor electron density for the CB2 C-3 side chain). It is thus unclear whether the different orientation of Q120 compared to apo-AmpC_{EC} is due to the different crystallization conditions or due to a specific feature of CB2 binding. The positioning of the Q120 side chain could impact on the potency of inhibition by bicyclic boronates containing an amido side chain, as in CB2 and TAN.

A structure of the AmpC_{EC}-CB3 complex was obtained by soaking of apo crystals of the β-lactamase. CB3 does not contain the amido C-3 side chain, but instead features a benzyl-thioether side chain (Figure 1d) [16]. CB3 was synthesized as a mixture of the (3S)- and (3R)-isomers with the (3R)-isomer in excess (~24:76 (S:R) ratio) [16]. Although binding of low levels of the (3R)-isomer cannot be excluded, only evidence for binding of the (3S)-CB3 was observed at the active site of AmpC_{EC}. The thioether side chain is partially disordered, as manifested by ~50% elevated B-factors compared to the CB3 average. The thioether is positioned to make hydrophobic π-stacking interaction with Y221 (~4 Å distance between Y221 and CB3 benzyl rings) and hydrophobic interactions with the side chains of V211 and T319 in the R1 pocket (Figure 2d). These hydrophobic residues located on the AmpC_{EC} Ω-loop (residues 185-225) are also present in the *P. aeruginosa* AmpC, rationalizing the high potency of CB3 against both AmpC_{EC} and *P. aeruginosa* AmpC and likely other class C SBLs, as reported here and elsewhere [16]. Notably, mutations in the Ω-loop, e.g., deletion of Y221, have been observed to widen the substrate specificity and also confer ceftazidime-avibactam resistance [12]. Such AmpC variants

may be less susceptible to bicyclic boronates like CB3 and are thus a potential source of resistance to such inhibitors. This is of particular concern given that mutations in the Ω -loop have been linked to reduced susceptibility of cefepime against AmpC-expressing *E. coli* [48], which is the β -lactam proposed for use in combination with TAN and which is not efficiently turned-over by the wildtype AmpC_{EC}.

Interestingly, apart from covalent modification of S64, analysis of the electron density map in the structure obtained by soaking AmpC_{EC} with TAN clearly reveals a second TAN molecule at the interface between chain A and symmetry related molecules (Figure S3a). The second TAN molecule adopts a U-shaped conformation in which its side chain folds over the bicyclic core (Figure 3); it is positioned to form hydrogen-bonding interactions with multiple water molecules that interact with the backbone carbonyls of P140, A141, and N102, and to make hydrophobic interactions with the side chains of A143 and A98 in a symmetry related molecule (Figure 3a).

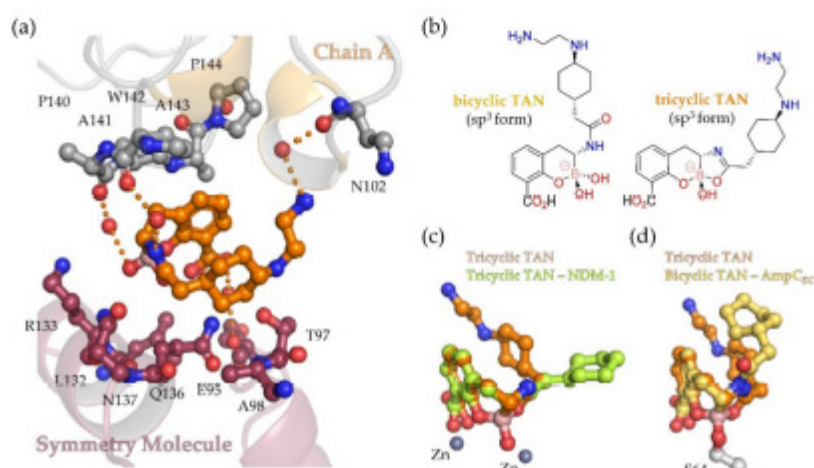


Figure 3. Comparison of bi- and tri-cyclic forms of sp^3 hybridized taniboractam in complex with AmpC_{EC}. (a) The tricyclic form of TAN as observed at the interface between symmetry related AmpC_{EC} molecules along a three-fold rotation axis (see Figure S3a for overview, PDB ID 6YEN). Residues within 6 Å of TAN are shown as grey/purple sticks, hydrogen-bonding interactions as orange dashes, and waters as red spheres; (b) structures of proposed bi- and tricyclic sp^3 forms of TAN; (c) overlay of the ‘interface’ tricyclic TAN (AmpC_{EC}, orange) with active site bound tricyclic TAN (NDM-1, green); (d) overlay of the ‘interface’ tricyclic TAN (AmpC_{EC}, orange) with active site bound bicyclic TAN bonded to AmpC_{EC} S64 (yellow). Note, with the MBL NDM-1 (PDB ID: 6RMF), both the bicyclic and the tricyclic forms were observed in one chain of the crystallographic dimer (chain A, shown here), while, in the second chain, only the tricyclic form was observed [24].

Notably, with the surface bound TAN molecule, its C-3 amido side chain is rotated relative to the conformation observed for bicyclic TAN at the active site, positioning the carbonyl derived oxygen in close proximity to the boron. Based on the short distance between the refined carbonyl oxygen and the boron (1.5 Å), this molecule of TAN was thus modelled in a tricyclic form, as shown in Figure 3b. The 5-membered ring of this TAN molecule was modelled in its unsaturated form based on its planar conformation and the angle between the carbonyl-derived oxygen, carbon- and amide-derived nitrogen atoms (122°). The observation of tricyclic TAN on the surface of AmpC_{EC} indicates the viability of its formation in solution; reaction of acyl-amino side chains to form a ring onto a proximate boronic acid has synthetic precedent [49]. An analogous tricycle has also been observed in the complex formed between the B1 MBL NDM-1 and TAN [24]. Overlay of the tricyclic boronate core

observed with Amp_{C_{EC}} and that observed in the active site of NDM-1 shows a strong resemblance (Figure 3c); however, the side chains adopt different conformations in the two structures.

Importantly, overlays of the bicyclic portions of the tricyclic TAN core with the bicyclic TAN reveals a steric clash for a potential tricycle, including its side chain, at the Amp_{C_{EC}} active site (Figure 4). This analysis is consistent with the observed bicyclic structure at the Amp_{C_{EC}} active site and indicates that it is unlikely that the boronates studied can bind to the Amp_{C_{EC}} active site in the tricyclic form (at least without conformational change). Further comparisons suggest that the other SBLs, for which crystallographic studies are reported in complex with the bicyclic form of TAN (i.e., KPC-2 [31] (PDB ID 6TD1), CTX-M-15 [26] (PDB ID 6SP6), OXA-10 [24] (PDB ID 6RTN)), will also not accommodate the tricyclic core, assuming a conserved general binding mode of the bicycle and no conformational changes (Figure S5).

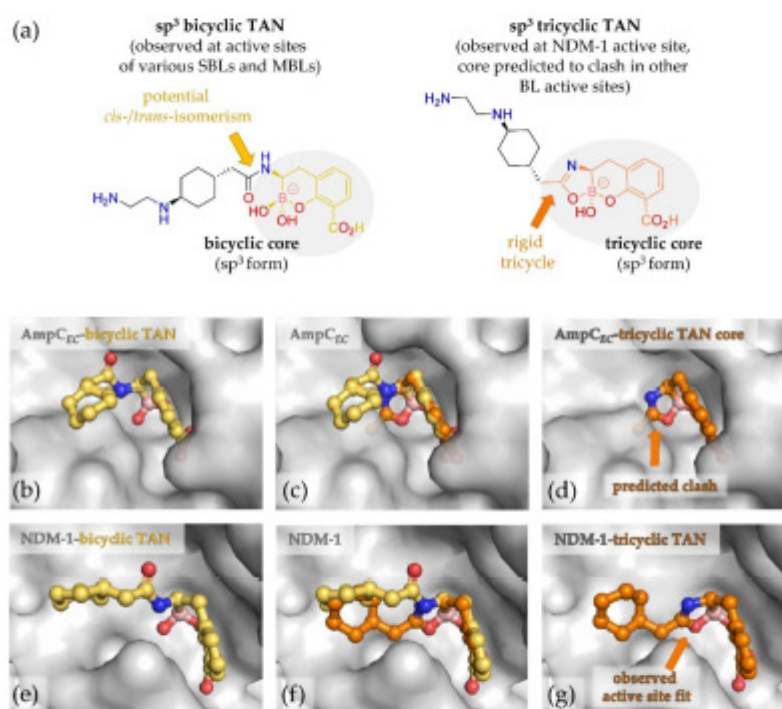


Figure 4. Tricyclic TAN likely cannot bind at the Amp_{C_{EC}} active site due to a steric clash of the putative tricyclic core and side chain. (a) Structural comparison of tricyclic and bicyclic forms of TAN; (b–g) overlay of tricyclic TAN core (orange, not crystallographically observed at Amp_{C_{EC}} active site) with bicyclic TAN (yellow) crystallographically observed bound to active site S64 of Amp_{C_{EC}} (PDB ID: 6YEN) reveals a likely steric clash of the rigid tricycle in the Amp_{C_{EC}} active site as well as active sites of other β -lactamases (Figure S5). By contrast, both tricyclic (orange) and bicyclic (yellow) forms of TAN have been crystallographically observed at the active site of the B1 MBL NDM-1 (PDB ID: 6RMF) [24]. Note, in both structures, that the terminal amine of the side chain was disordered and therefore excluded from the model; (b) observed conformation of bicyclic TAN at the Amp_{C_{EC}} active site; (c) alignment of tricyclic TAN core to bicyclic TAN observed at the Amp_{C_{EC}} active site; (d) putative steric clash of tricyclic TAN in the Amp_{C_{EC}} active site based on the overlay in c). Note the apparently flexible parts of the side chain are not shown, but would make a clear steric clash with the active site; (e) observed conformation of bicyclic TAN at the NDM-1 active site; (f) overlay of tricyclic TAN and bicyclic TAN, both as observed at the NDM-1 active site; (g) observed conformation of tricyclic TAN at the NDM-1 active site.

Although there are substantial differences in the active site chemistry of the SBLs and MBLs, crystallographic analysis on the class B1 MBL VIM-2 [26] (PDB ID: 6SP7) shows that the bicyclic conformation of TAN as observed in SBLs is maintained in binding to this clinically relevant MBL (Figure S5). In the case of NDM-1, active site binding of both bicyclic and tricyclic TAN was observed as shown in Figure 4e–g (~75% of the active sites were occupied by the tricyclic and ~25% by the bicyclic form) [24]. By contrast, overlay of the tricyclic form of TAN with the bicyclic form of TAN as observed in the active site of VIM-2 reveals a steric clash (Figure S5). This implies that the tricyclic form of TAN is likely relevant to the inhibition of some (NDM-1), but not all MBLs, assuming a conserved binding mode for the tri-/bi-cycle core and a lack of substantial conformational changes. It should be noted that recent work has shown other tricyclic boronates, i.e., those containing a cyclopropyl group fused to the C2/C3 carbons of the bicyclic boronate potentially inhibit both SBLs and MBLs [50], though the cyclopropyl ring methylene projects in a different orientation to the 'third' ring of the tricyclic ring system that can be formed with TAN (Figure S6).

4. Conclusions

Following the clinical application of boronic acids as proteasome inhibitors for treatment of myeloma, boronic acids/boronates have become more common in medicinal chemistry [17]. In the antibacterial field, the monocyclic boronate vaborbactam has been approved for clinical use as an inhibitor of class A and some class C SBLs [19]. More recent work has demonstrated that the scope of boronates as β -lactamase inhibitors can be extended to multiple SBLs and MBLs by integration into a bicyclic scaffold [20,21], as present in TAN [26] (Figure 1d), which is currently in late stage clinical trials. Our kinetic and structural studies with TAN and other bicyclic boronate derivatives (CB2, CB3) with different C-3 side chains reveal their potential for inhibition of the class C AmpC serine- β -lactamase from *Escherichia coli*.

Our results further support the potential of bicyclic boronates as unusually broad-spectrum inhibitors of all SBL types and, at least B1 type, MBLs. It is possible that the potential of cyclic boronates as clinically useful inhibitors of two or more mechanistically distinct groups of enzymes will extend to other families, such as proteases. Improvements in methods for their preparation should enable more systematic SAR. In this regard, it may be that the incorporation of the boron into a ring system that limits conformations and modes of reactivity may both enhance potency and reduce unwanted modes of reaction (e.g., oligomerization) compared to acyclic boronic acids.

Combined with previous reports, our three crystal structures of bicyclic boronates with AmpC_{EC} reveal remarkable similarity between the binding modes of the 6,6-core ring system of the bicyclic boronates to SBLs from class A (e.g., CTX-M-15 [21,26], L2 [33], and KPC-2 [31]), class D (e.g., OXA-10 [20,24]) and the class C AmpC from *Pseudomonas aeruginosa* [32] as well as the penicillin-binding protein-5 (PBP-5) from *Escherichia coli* [20]. The results thus support the proposal that mimicking high-energy intermediates common to different types of enzymes can enable their inhibition by the same inhibitor. Note that the reported bicyclic boronates tend to be weaker PBP inhibitors (and hence antibiotics) than SBL/B1 MBL inhibitors [20,21]; this may reflect the fact that, although they react with β -lactams, PBPs are not optimized to catalyze their hydrolysis. Alternatively, it may be that optimized functionalization of the core bicyclic boronate will enable potent PBP inhibition. The combined results show that, in the case of SBL/MBL inhibition by bicyclic boronates, there is scope for (C-3) side chain optimization, which may further broaden the scope of β -lactamase inhibition, including to multiple B2/B3 type MBLs. Optimization in potency will need to be carried out in parallel with that at a microbiological level, as has been done for TAN with respect to improved cell penetration [26]. Interestingly, although VAB was substantially less potent than TAN against isolated AmpC_{EC}, it performed equally well against our AmpC bearing engineered *E. coli* strain as TAN (Table 2), possibly reflecting either improved penetration or reduced efflux.

Together with previous reports showing enhanced activity of CB3 against class D SBLs, as well as certain B2 and B3 MBLs compared to TAN and CB2 [16], our results suggest the thioether CB3 could be

a promising start for further optimization towards a broad-spectrum, dual SBL and MBL inhibitor. Selective binding of the minor (3S)-isomer indicates that stereoselective synthesis might further benefit Amp_{C_{EC}} inhibition. Further optimization will need to address the relatively low potency of CB3 in cells, which could reflect potential poor cell penetration of CB3 due to its lipophilicity. CB3 has a predicted logP of 4.42; studies have shown that compounds with relatively low logPs (e.g., CB2, TAN and VAB with predicted logPs of 2.09, 1.50, and 1.86, respectively) manifest improved penetration of Gram-negative bacteria [51], leaving further scope for optimization of the thioether side chain, e.g., by addition of an amino group as in TAN [26].

The observation of an apparently weakly bound tricyclic form of TAN on the surface of Amp_{C_{EC}} is of interest from a boronate chemistry perspective as it potentially further exemplifies the ability of boron-based inhibitors to interchange between different forms in aqueous solution. It should be noted that, in both the cases where a tricyclic boronate form has been observed crystallographically, i.e., with Amp_{C_{EC}} and the MBL NDM-1, the crystallization conditions were acidic (pH 6.0 and 5.8 [24], respectively). Thus, the tricycle could be formed in aqueous solution during crystallization; such formation in aqueous solution is preceded in small molecule chemistry [49]. Comparison of SBL and MBL structures with tri- and bi-cyclic boronates suggests most SBL active sites will not readily accommodate tricyclic structures of the type reported here and previously [24]. Although tricyclic TAN likely does not significantly contribute to inhibition of Amp_{C_{EC}} and related SBLs, at least one β -lactamase (NDM-1) can bind a tricyclic form at its active site (at least in crystals) [24], thus the ability of boronate type inhibitors to interchange between different forms has the potential to extend the range of β -lactamases usefully inhibited by them.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2218-273X/10/6/899/s1>, Table S1: Data collection and refinement statistics of Amp_{C_{EC}} crystals. Figure S1: Kinetic characterization of reversible Amp_{C_{EC}} inhibition by cyclic boronates. Figure S2: Views from a crystal structure of Amp_{C_{EC}} in complex with CB2. Figure S3: Views from a crystal structure of Amp_{C_{EC}} in complex with TAN. Figure S4: Views from a crystal structure of Amp_{C_{EC}} in complex with CB3. Figure S5: The tricyclic form of TAN likely cannot bind to some β -lactamases including members from all Ambler classes. Figure S6: Structures of the tricyclic form of TAN and QPX7728.

Author Contributions: P.A.L. and J.P. prepared Amp_{C_{EC}}. P.A.L. carried out biochemical studies. P.A.L., T.M.L., and J.B. carried out crystallographic studies. P.A.L. and K.C. carried out antimicrobial susceptibility studies. A.P. prepared CB3. R.C. prepared CB2. A.K. with the help of T.D.P. prepared TAN. C.W.G.F., M.G.P.P., P.T., C.J.S., and J.B. supervised the work. P.A.L. drafted the original version of the manuscript with assistance of A.P. All authors have read and agreed to the submitted version of the manuscript.

Funding: P.A.L. thanks the National PhD Training Programme in Antimicrobial Resistance Research by the Medical Research Foundation (MRF-145-0004-TPG-AVISO) for funding a postgraduate studentship. This research was further funded by the Wellcome Trust, the Medical Research Council, the Biotechnology and Biological Research Council (BB/S50676X/1), and the Innovative Medicines Initiative (European Lead factory and ENABLE components).

Acknowledgments: Diffraction data were collected at the I03 and I24 beamlines at the Diamond Light Source, Didcot, United Kingdom.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Versporten, A.; Bolokhovets, G.; Ghazaryan, L.; Abilova, V.; Pyshnik, G.; Spasojevic, T.; Korinteli, I.; Raka, L.; Kambaralieva, B.; Cizmovic, L.; et al. Antibiotic use in eastern Europe: A cross-national database study in coordination with the WHO Regional Office for Europe. *Lancet Infect. Dis.* **2014**, *14*, 381–387. [CrossRef]
2. Bush, K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01076-18. [CrossRef] [PubMed]
3. Drawz, S.M.; Bonomo, R.A. Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 160–201. [CrossRef] [PubMed]
4. Bush, K.; Jacoby, G.A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 969–976. [CrossRef] [PubMed]

5. Leigh, D.A.; Bradnock, K.; Marriner, J.M. Augmentin (amoxicillin and clavulanic acid) therapy in complicated infections due to β -lactamase producing bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **1981**, *7*, 229–236. [CrossRef]
6. Reading, C.; Cole, M. Clavulanic acid: A β -lactamase-inhibiting β -lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 852–857. [CrossRef] [PubMed]
7. Benson, J.M.; Nahata, M.C. Sulbactam/ampicillin, a new β -lactamase inhibitor/ β -lactam antibiotic combination. *Drug Intell. Clin. Pharm.* **1988**, *22*, 534–541. [CrossRef]
8. Gutmann, L.; Kitzis, M.D.; Yamabe, S.; Acar, J.F. Comparative evaluation of a new β -lactamase inhibitor, YTR 830, combined with different β -lactam antibiotics against bacteria harboring known β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, *29*, 955–957. [CrossRef]
9. Blizzard, T.A.; Chen, H.; Kim, S.; Wu, J.; Bodner, R.; Gude, C.; Imbriglio, J.; Young, K.; Park, Y.-W.; Ogawa, A.; et al. Discovery of MK-7655, a β -lactamase inhibitor for combination with Primaxin®. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 780–785. [CrossRef]
10. Wang, D.Y.; Abboud, M.I.; Markoulides, M.S.; Br em, J.; Schofield, C.J. The road to avibactam: The first clinically useful non- β -lactam working somewhat like a β -lactam. *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 1063–1084. [CrossRef]
11. Ehmann, D.E.; Jahic, H.; Ross, P.L.; Gu, R.-F.; Hu, J.; Durand-R eville, T.F.; Lahiri, S.; Thresher, J.; Livchak, S.; Gao, N.; et al. Kinetics of avibactam inhibition against Class A, C, and D β -lactamases. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 27960–27971. [CrossRef] [PubMed]
12. Lahiri, S.D.; Walkup, G.K.; Whiteaker, J.D.; Palmer, T.; McCormack, K.; Tanudra, M.A.; Nash, T.J.; Thresher, J.; Johnstone, M.R.; Hajec, L.; et al. Selection and molecular characterization of ceftazidime/avibactam-resistant mutants in *Pseudomonas aeruginosa* strains containing derepressed AmpC. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 1650–1658. [CrossRef] [PubMed]
13. Shields, R.K.; Chen, L.; Cheng, S.; Chavda, K.D.; Press, E.G.; Snyder, A.; Pandey, R.; Doi, Y.; Kreiswirth, B.N.; Nguyen, M.H.; et al. Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Due to Plasmid-Borne *bla*_{XP-3} Mutations during Treatment of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, 1–11. [PubMed]
14. Abboud, M.I.; Damblon, C.; Br em, J.; Smargiasso, N.; Mercuri, P.; Gilbert, B.; Rydzik, A.M.; Claridge, T.D.; Schofield, C.J.; Frere, J.M. Interaction of Avibactam with Class B Metallo- β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 5655–5662. [CrossRef]
15. Pogue, J.M.; Bonomo, R.A.; Kaye, K.S. Ceftazidime/Avibactam, Meropenem/Vaborbactam, or Both? Clinical and Formulary Considerations. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *68*, 519–524. [CrossRef] [PubMed]
16. Parkova, A.; Lucic, A.; Krajnc, A.; Br em, J.; Calvo pina, K.; Langley, G.W.; McDonough, M.A.; Trapencieris, P.; Schofield, C.J. Broad Spectrum β -Lactamase Inhibition by a Thioether Substituted Bicyclic Boronate. *ACS Infect. Dis.* **2019**. [CrossRef] [PubMed]
17. Krajnc, A.; Lang, P.A.; Panduwawala, T.D.; Br em, J.; Schofield, C.J. Will morphing boron-based inhibitors beat the β -lactamases? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *50*, 101–110. [CrossRef] [PubMed]
18. Hecker, S.J.; Reddy, K.R.; Totrov, M.; Hirst, G.C.; Lomovskaya, O.; Griffith, D.C.; King, P.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Sabet, M.; et al. Discovery of a Cyclic Boronic Acid β -Lactamase Inhibitor (RPX7009) with Utility vs Class A Serine Carbapenemases. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3682–3692. [CrossRef] [PubMed]
19. Jorgensen, S.C.J.; Rybak, M.J. Meropenem and Vaborbactam: Stepping up the Battle against Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Pharmacotherapy* **2018**, *38*, 444–461. [CrossRef]
20. Br em, J.; Cain, R.; Cahill, S.; McDonough, M.A.; Clifton, L.J.; Jimenez-Castellanos, J.C.; Avison, M.B.; Spencer, J.; Fishwick, C.W.; Schofield, C.J. Structural basis of metallo- β -lactamase, serine- β -lactamase and penicillin-binding protein inhibition by cyclic boronates. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12406. [CrossRef]
21. Cahill, S.T.; Cain, R.; Wang, D.Y.; Lohans, C.T.; Wareham, D.W.; Oswin, H.P.; Mohammed, J.; Spencer, J.; Fishwick, C.W.; McDonough, M.A.; et al. Cyclic Boronates Inhibit All Classes of β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, 1–13. [CrossRef]
22. Geibel, B.; Dowell, J.; Dickerson, D.; Henkel, T. 1401. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of the Safety and Pharmacokinetics of Single and Repeat Doses of VNRX-5133 in Healthy Subjects. *Open Forum Infect. Dis.* **2018**, *5* (Suppl. 1), S431. [CrossRef]

23. Wang, X.; Zhao, C.; Wang, Q.; Wang, Z.; Liang, X.; Zhang, F.; Zhang, Y.; Meng, H.; Chen, H.; Li, S.; et al. In vitro activity of the novel β -lactamase inhibitor taniborbactam (VNRX-5133), in combination with cefepime or meropenem, against MDR Gram-negative bacterial isolates from China. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**. [CrossRef] [PubMed]
24. Krajnc, A.; Brem, J.; Hinchliffe, P.; Calvopina, K.; Panduwawala, T.D.; Lang, P.A.; Kamps, J.; Tyrrell, J.M.; Widlake, E.; Seward, B.G.; et al. Bicyclic Boronate VNRX-5133 Inhibits Metallo- and Serine- β -Lactamases. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8544–8556. [CrossRef] [PubMed]
25. Hamrick, J.C.; Docquier, J.D.; Uehara, T.; Myers, C.L.; Six, D.A.; Chatwin, C.L.; John, K.J.; Vernacchio, S.F.; Cusick, S.M.; Trout, R.E.L.; et al. VNRX-5133 (Taniborbactam), a Broad-Spectrum Inhibitor of Serine- and Metallo- β -Lactamases, Restores Activity of Cefepime in *Enterobacteriales* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, 1–19. [CrossRef] [PubMed]
26. Liu, B.; Trout, R.E.L.; Chu, G.-H.; McGarry, D.; Jackson, R.W.; Hamrick, J.C.; Daigle, D.M.; Cusick, S.M.; Pozzi, C.; De Luca, F.; et al. Discovery of Taniborbactam (VNRX-5133): A Broad-Spectrum Serine- and Metallo- β -lactamase Inhibitor for Carbapenem-Resistant Bacterial Infections. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 2789–2801. [CrossRef]
27. Jacoby, G.A. AmpC β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22*, 161–182. [CrossRef]
28. Jaurin, B.; Grundström, T.; Edlund, T.; Normark, S. The *E. coli* β -lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature* **1981**, *290*, 221–225. [CrossRef] [PubMed]
29. Nelson, E.C.; Elisha, B.G. Molecular Basis of AmpC Hyperproduction in Clinical Isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 957–959. [CrossRef] [PubMed]
30. Vila, J.; Sáez-López, E.; Johnson, J.R.; Römling, U.; Dobrindt, U.; Cantón, R.; Giske, C.G.; Naas, T.; Carattoli, A.; Martínez-Medina, M.; et al. *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40*, 437–463. [CrossRef] [PubMed]
31. Tooke, C.L.; Hinchliffe, P.; Krajnc, A.; Mulholland, A.J.; Brem, J.; Schofield, C.J.; Spencer, J. Cyclic boronates as versatile scaffolds for KPC-2 β -lactamase inhibition. *RCS Med. Chem.* **2020**, *11*, 491–496. [CrossRef]
32. Cahill, S.T.; Tyrrell, J.M.; Navratilova, I.H.; Calvopina, K.; Robinson, S.W.; Lohans, C.T.; McDonough, M.A.; Cain, R.; Fishwick, C.W.G.; Avison, M.B.; et al. Studies on the inhibition of AmpC and other β -lactamases by cyclic boronates. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2019**, *1863*, 742–748. [CrossRef] [PubMed]
33. Calvopina, K.; Hinchliffe, P.; Brem, J.; Heesom, K.J.; Johnson, S.; Cain, R.; Lohans, C.T.; Fishwick, C.W.G.; Schofield, C.J.; Spencer, J.; et al. Structural/mechanistic insights into the efficacy of nonclassical β -lactamase inhibitors against extensively drug resistant *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Mol. Microbiol.* **2017**, *106*, 492–504. [CrossRef] [PubMed]
34. Burns, C.J. Beta-lactamase inhibitors. PCT Patent WO 2010/130708 A1, 18 November 2010.
35. Reddy, R.K. Boronic acid derivatives and therapeutic uses thereof. PCT Patent WO 2016003929 A1, 7 January 2016.
36. Van Berkel, S.S.; Brem, J.; Rydzik, A.M.; Salimraj, R.; Cain, R.; Verma, A.; Owens, R.J.; Fishwick, C.W.G.; Spencer, J.; Schofield, C.J. Assay platform for clinically relevant metallo- β -lactamases. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6945–6953. [CrossRef] [PubMed]
37. Page, M.G. The kinetics of non-stoichiometric bursts of β -lactam hydrolysis catalysed by class C β -lactamases. *Biochem. J.* **1993**, *295 Pt 1*, 295–304. [CrossRef]
38. Dubus, A.; Wilkin, J.M.; Raquet, X.; Normark, S.; Frère, J.M. Catalytic mechanism of active-site serine β -lactamases: Role of the conserved hydroxy group of the Lys-Thr(Ser)-Gly triad. *Biochem. J.* **1994**, *301 Pt 2*, 485–494. [CrossRef]
39. Morrison, J.F.; Walsh, C.T. The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors. *Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol.* **1988**, *61*, 201–301.
40. Williams, J.W.; Morrison, J.F. The kinetics of reversible tight-binding inhibition. In *Methods Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1979; Volume 63, pp. 437–467.
41. Copeland, R.A.; Basavapathruni, A.; Moyer, M.; Scott, M.P. Impact of enzyme concentration and residence time on apparent activity recovery in jump dilution analysis. *Anal. Biochem.* **2011**, *416*, 206–210. [CrossRef]
42. McCoy, A.J.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Adams, P.D.; Winn, M.D.; Storoni, L.C.; Read, R.J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40 Pt 4*, 658–674. [CrossRef]

43. Powers, R.A.; Caselli, E.; Focia, P.J.; Prati, F.; Shoichet, B.K. Structures of Ceftazidime and Its Transition-State Analogue in Complex with AmpC β -Lactamase: Implications for Resistance Mutations and Inhibitor Design. *Biochemistry* **2001**, *40*, 9207–9214. [[CrossRef](#)]
44. Adams, P.D.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Hung, L.W.; Ioerger, T.R.; McCoy, A.J.; Moriarty, N.W.; Read, R.J.; Sacchettini, J.C.; Sauter, N.K.; Terwilliger, T.C. PHENIX: Building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2002**, *58 Pt 11*, 1948–1954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W.G.; Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66 Pt 4*, 486–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lahiri, S.D.; Mangani, S.; Durand-Reville, T.; Benvenuti, M.; De Luca, F.; Sanyal, G.; Docquier, J.D. Structural insight into potent broad-spectrum inhibition with reversible recyclization mechanism: Avibactam in complex with CTX-M-15 and *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 2496–2505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Lahiri, S.D.; Johnstone, M.R.; Ross, P.L.; McLaughlin, R.E.; Olivier, N.B.; Alm, R.A. Avibactam and class C β -lactamases: Mechanism of inhibition, conservation of the binding pocket, and implications for resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 5704–5713. [[CrossRef](#)]
48. Haenni, M.; Châtre, P.; Madec, J.-Y. Emergence of *Escherichia coli* producing extended-spectrum AmpC β -lactamases (ESAC) in animals. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 53. [[CrossRef](#)]
49. Inglis, S.R.; Woon, E.C.Y.; Thompson, A.L.; Schofield, C.J. Observations on the Deprotection of Pinenediol and Pinacol Boronate Esters via Fluorinated Intermediates. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 468–471. [[CrossRef](#)]
50. Hecker, S.J.; Reddy, K.R.; Lomovskaya, O.; Griffith, D.C.; Rubio-Aparicio, D.; Nelson, K.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Sabet, M.; Tarazi, Z.; et al. Discovery of Cyclic Boronic Acid QPX728, an Ultrabroad-Spectrum Inhibitor of Serine and Metallo- β -lactamases. *J. Med. Chem.* **2020**. [[CrossRef](#)]
51. Ebejer, J.-P.; Charlton, M.H.; Finn, P.W. Are the physicochemical properties of antibacterial compounds really different from other drugs? *J. Cheminform.* **2016**, *8*, 30. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Information

Bicyclic Boronates as Potent Inhibitors of AmpC, the Class C β -Lactamase from *Escherichia coli*

Pauline A. Lang¹, Anete Parkova^{2†}, Thomas M. Leissing^{1,†}, Karina Calvopiña¹, Ricky Cain^{3,†}, Alen Krajnc^{1,†}, Tharindi D. Panduwawala¹, Jules Philippe⁴, Colin W. G. Fishwick³, Peteris Trapencieris², Malcolm G. P. Page⁴, Christopher J. Schofield^{1,*} and Jürgen Brem^{1,*}

¹ Department of Chemistry, University of Oxford, Chemistry Research Laboratory, OX1 3TA Oxford, United Kingdom

² Latvian Institute of Organic Synthesis, LV-1006 Riga, Latvia; peteris@osi.lv (P.T.)

³ School of Chemistry, University of Leeds, LS2 9JT Leeds, United Kingdom; C.W.G.Fishwick@leeds.ac.uk (C.W.G.F.)

⁴ Jacobs University Bremen gGmbH, Life Sciences & Chemistry, 28759 Bremen, Germany; malcolm.page@antibiotic-research.ch (M.G.P.P.)

* Correspondence: christopher.schofield@chem.ox.ac.uk (C.J.S.); jurgen.brem@chem.ox.ac.uk (J.B.)

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors contributed equally to this work.

Table 1. Data collection and refinement statistics of Amp^{Cec} crystals.

Datasets	Amp ^{Cec} -Apo (PDB ID: 6T3D)	Amp ^{Cec} -Taniborbactam (PDB ID: 6YEN)	Amp ^{Cec} -CB3 (PDB ID: 6YPD)
Data Collection			
Beamline (Wavelength, Å)	DLS I03 (0.9763)	DLS I03 (0.9787)	DLS I03 (0.9762)
Detector	Eiger2 XE 16M	Pilatus 6M-F	Eiger2 XE 16M
Data Processing	Xia2 3dii	Xia2 autoPROC	dials
Space group	<i>P</i> 4 ₁ 3 2	<i>P</i> 4 ₁ 3 2	<i>P</i> 4 ₁ 3 2
Cell dimensions			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	139.2, 139.2, 139.2	137.3, 137.2, 137.2	139.0, 139.0, 139.0
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
No. of molecules/ASU	1	1	1
No. reflections	73865 (5399)*	83449 (4083)*	60941 (2948)*
Resolution (Å)	49.21-1.50 (1.54-1.50)*	97.04-1.42 (1.44-1.42)*	138.97-1.60 (1.63-1.60)*
<i>R</i> _{max} (I)	0.104 (6.300)*	0.135 (7.265)*	0.166 (4.538)*
I/ σ I	29.3 (1.2)*	26.6 (1.0)*	22.1 (1.3)*
CC-half	1.00 (0.51)*	1.0 (0.4)*	1.0 (0.7)*
Completeness (%)	100 (100)*	100 (100)*	100 (99.9)*
Multiplicity	76.6 (77.9)*	76.9 (78.6)*	77.3 (67.4)*
Wilson B value (Å ²)	23.97	21.32	23.35
Refinement			
	PHENIX	PHENIX	PHENIX
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.1582/0.1777	0.1442/0.1687	0.1709/0.1874
No. atoms			
- Enzyme	2871	2941	2919
- Bound Inhibitor	-	24	22
- Unbound Inhibitor	-	28	-
- Water	343	349	376
Average B-factors	34.5	28.4	31.0
- Enzyme	33.2	26.7	29.4
- Bound Inhibitor	-	33.6	57.0
- Unbound Inhibitor	-	51.2	-
- Water	44.7	39.4	40.2
R.m.s deviations			
- Bond lengths (Å)	0.007	0.008	0.009
- Bond angles (°)	0.820	1.132	0.979

*Highest resolution shell in parentheses.

Table 1. continued.

Datasets	AmpC _{EC} -CB2 (PDB ID: 6YEO)
Data Collection	
Beamline (Wavelength, Å)	DLS I24 (0.9686)
Detector	Pilatus3 6M
Data Processing	Xia2 dials
Space group	<i>P</i> 2 2 2 ₁
Cell dimensions	
<i>a, b, c</i> (Å)	100.7, 179.6, 99.7
α, β, γ (°)	90, 90, 90
No. of molecules/ASU	4
No. reflections	117532 (5616)*
Resolution (Å)	100.68-2.03 (2.06-2.03)*
<i>R</i> _{meas} (I)	0.368 (0.999)*
<i>I</i> / σ <i>I</i>	8.7 (2.7)*
CC-half	1.0 (0.6)*
Completeness (%)	100 (96.7)*
Multiplicity	13.0 (13.1)*
Wilson B value (Å ²)	24.11
Refinement	
<i>R</i> _{meas} / <i>R</i> _{free}	0.1715/0.2027
No. atoms	
- Enzyme	10950
- Bound Inhibitor	101
- Unbound Inhibitor	-
- Water	864
Average B-factors	29.1
- Enzyme	28.3
- Bound Inhibitor	34.7
- Unbound Inhibitor	-
- Water	36.0
R.m.s deviations	
- Bond lengths (Å)	0.002
- Bond angles (°)	0.612

*Highest resolution shell in parentheses.

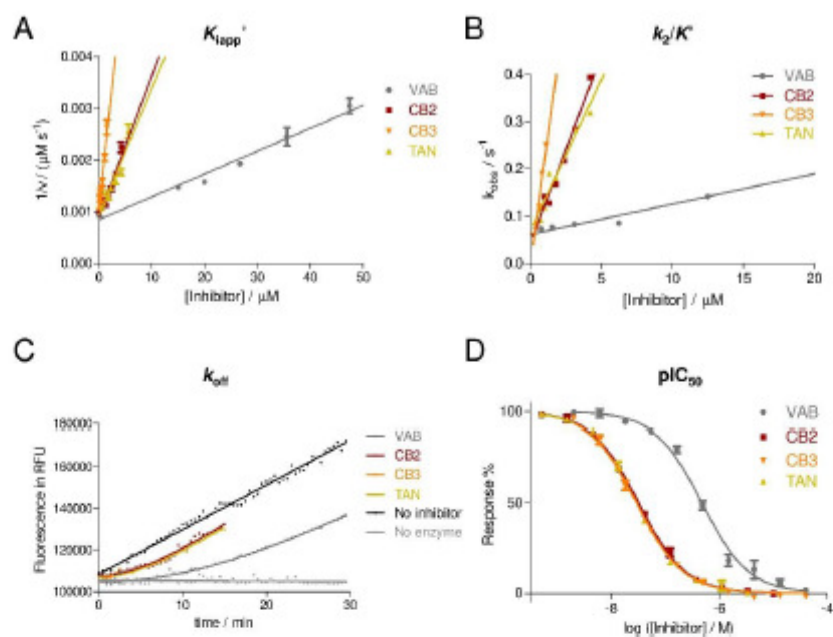


Figure 1. Kinetic characterisation of reversible AmpCac inhibition by cyclic boronates. (A) Determination of K_{app} value of AmpCac inhibition by cyclic boronates. **(B)** Pseudo first-order rate (k_2/K) determination for AmpCac (100 nM) with TAN, CB2, or CB3. **(C)** Dissociation after 'jump-dilution' of an AmpCac solution (10 μM) pre-incubated with cyclic boronates (10 μM for TAN, CB2 and CB3 and 100 μM for VAB) at room temperature for 30 min, then diluted 100,000 fold and assayed with FC-5[1] (25 μM). **(D)** Dose-response curves for AmpCac (500 pM) after 10 min inhibitor pre-incubation at room temperature, assayed using FC-5[1] (5 μM). Buffer: 50 mM Tris, pH 7.5, 0.01 % (*v/v*) Triton-X 100.

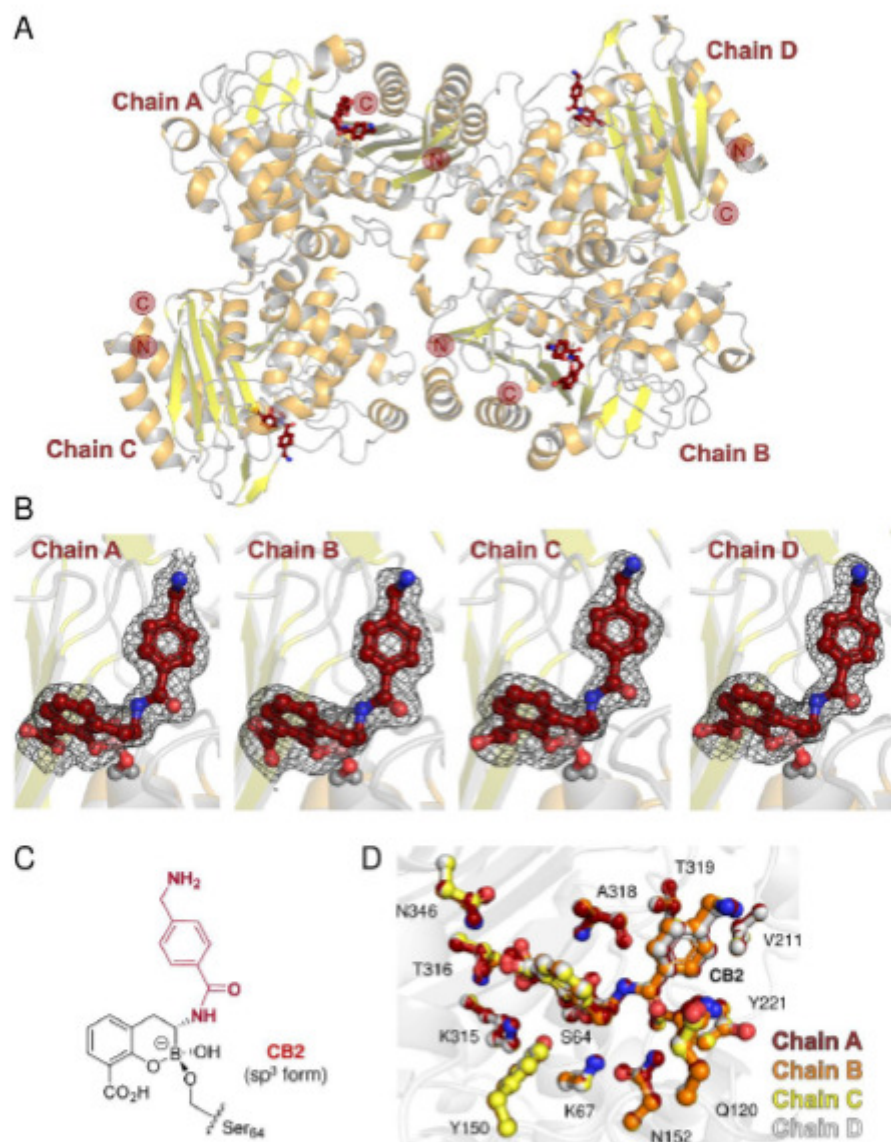


Figure 2. Views from a crystal structure of AmpC_{Ec} in complex with CB2. (A) Overview of the asymmetric unit (ASU) containing chains A-D. (B) mFo-DFc polder OMIT maps^[2] contoured at 3.0 σ around CB2. (C) Structure of bound CB2 in its sp³ form. (D) Overlay of color coded active site residues and ligands in chains A-D s in the ASU shows no differences in the orientations of these residues and CB2.

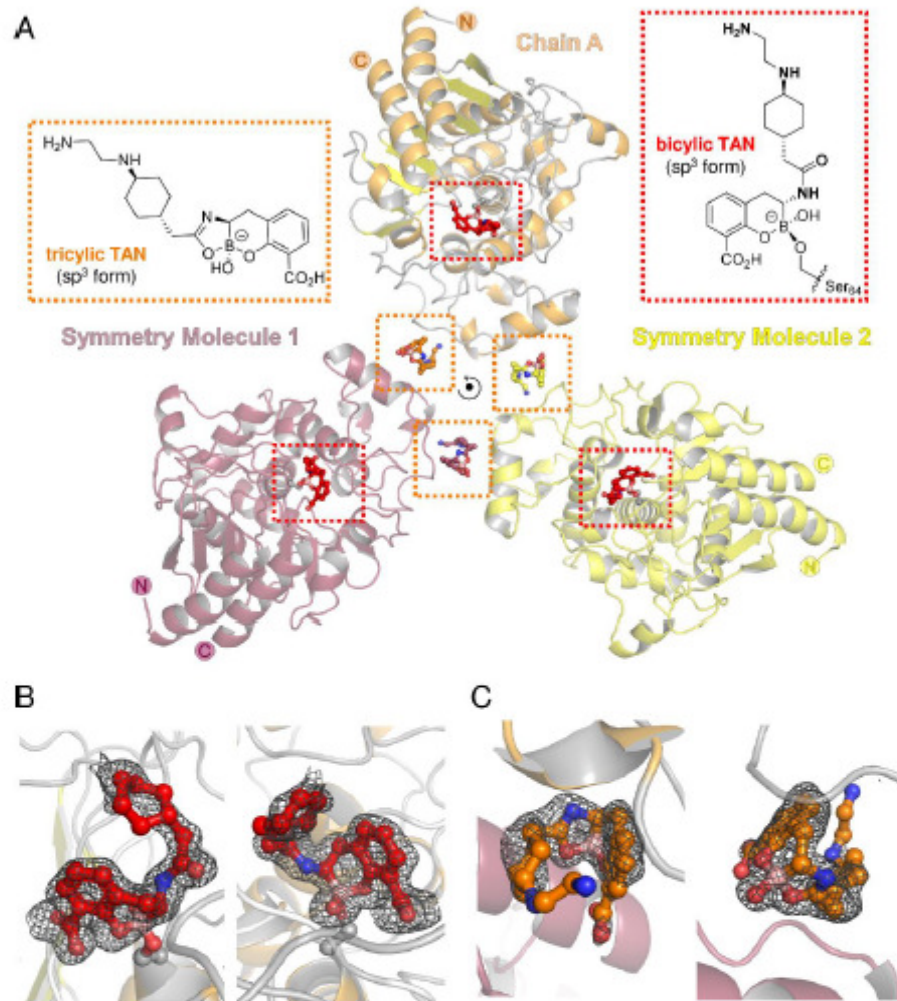


Figure 3. Views from a crystal structure of AmpC_{ec} in complex with TAN. (A) Overview of symmetry related molecules around the 3-fold rotation axis, showing bicyclic TAN (red) bonded to the nucleophilic Ser64 and the position of tricyclic TAN (color coded by AmpC_{ec} molecule) at the monomer interfaces. (B) Views of mFo-DFc polder OMIT maps[2] contoured at 3.0 σ and carved around bicyclic TAN bonded to Ser64. (C) Views of mFo-DFc polder OMIT maps[2] contoured at 2.5 σ around tricyclic TAN, which binds at the interface between AmpC molecules.

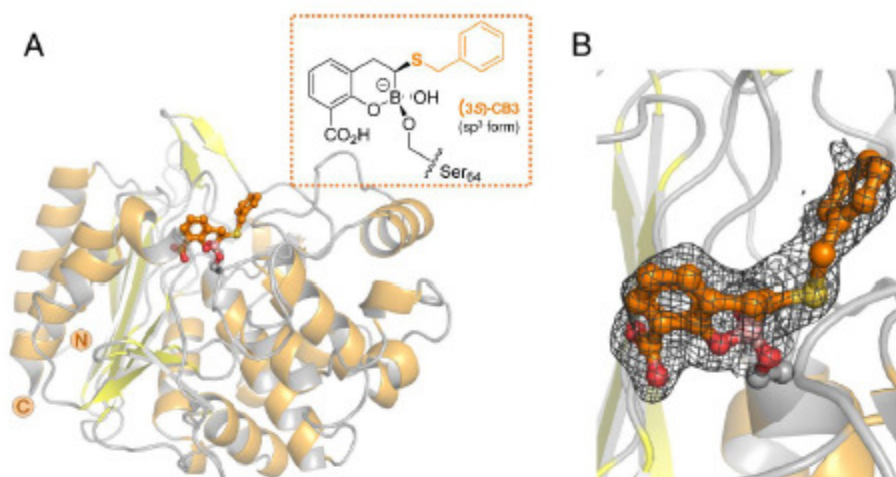


Figure 4. Views from a crystal structure of AmpC_C in complex with CB3. (A) Overview of AmpC_C fold, showing CB3 (orange) bound to active site. (B) mFo-DFc polder OMIT maps[2] contoured at 3.0 σ and carved around CB3 bonded to Ser64.

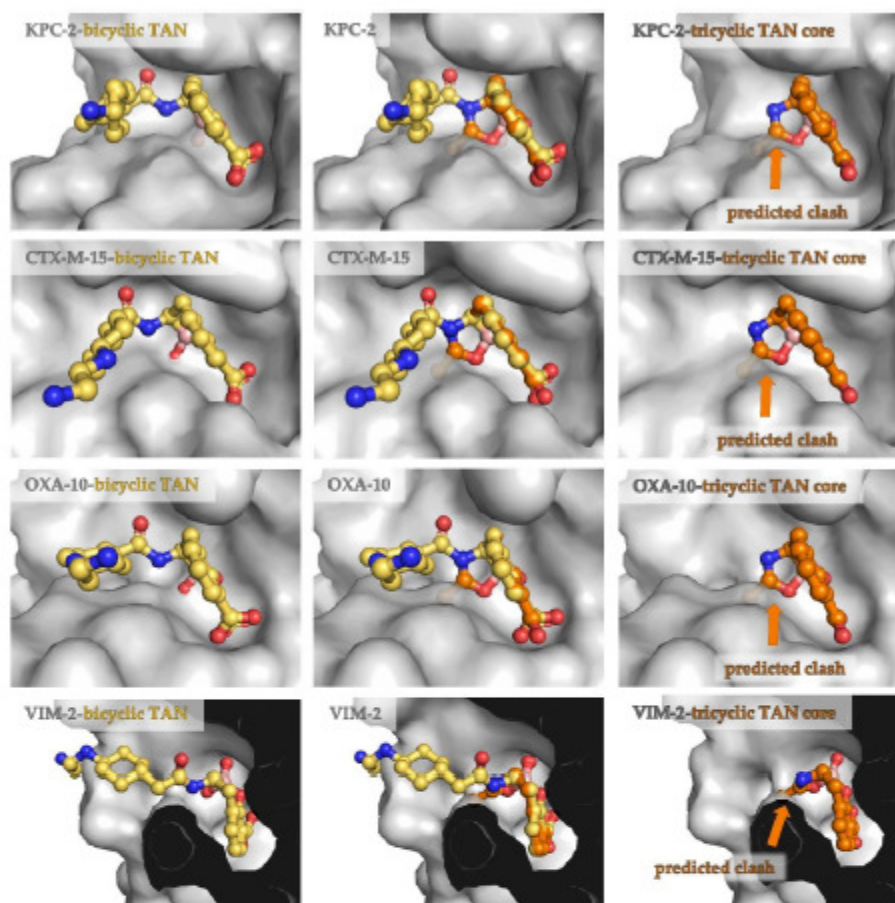


Figure 5. The tricyclic form of TAN likely cannot bind to some β -lactamases including members from all Ambler Classes. Overlays of the tricyclic TAN core (orange, as observed at Amp^{Cac} surface (Figure 4, PDB ID: 6YEN)) with bicyclic TAN complexes (yellow) as crystallographically observed at the active sites of KPC-2[3] (PDB ID 6TD1), CTX-M-15[4] (PDB ID 6SP6), OXA-10[5] (PDB ID 6RTN), and VIM-2[4] (PDB ID 6SP7) reveals a likely steric clash of the rigid tricycle in the shown active sites. Left column: Observed conformations of the bicyclic form of TAN at the β -lactamase active sites; Middle column: Overlays of the tricyclic TAN and bicyclic TAN forms at the indicated active sites; Right column: The putative steric clashes of tricyclic TAN in the indicated β -lactamase active sites based on the overlays in the middle column. Note, the flexible parts of the tricyclic TAN inhibitor sidechain are not shown, but would make a clear steric clash with the active site.

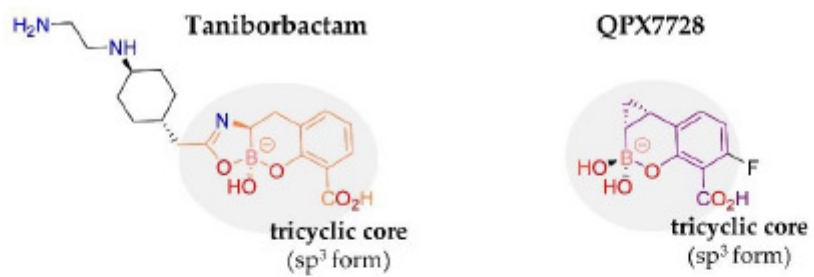


Figure 6. Structures of the tricyclic form of TAN and QPX7728. Shown are the tricyclic form of TAN as observed at AmpC_{6c} surface and QPX7728[6] which has a cyclopropyl ring fused to its bicyclic core.

References

1. van Berkel, S. S.; Brem, J.; Rydzik, A. M.; Salimraj, R.; Cain, R.; Verma, A.; Owens, R. J.; Fishwick, C. W. G.; Spencer, J.; Schofield, C. J., Assay platform for clinically relevant metallo- β -lactamases. *J Med Chem* 2013, 56, 6945–6953.
2. Liebschner, D.; Afonine, P. V.; Moriarty, N. W.; Poon, B. K.; Sobolev, O. V.; Terwilliger, T. C.; Adams, P. D., Polder maps: improving OMIT maps by excluding bulk solvent. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 2017, 73, 148–157.
3. Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Krajnc, A.; Mulholland, A. J.; Brem, J.; Schofield, C. J.; Spencer, J., Cyclic boronates as versatile scaffolds for KPC-2 β -lactamase inhibition. *RCS Med Chem* 2020, 1–7.
4. Liu, B.; Trout, R. E. L.; Chu, G.-H.; McGarry, D.; Jackson, R. W.; Hamrick, J. C.; Daigle, D. M.; Cusick, S. M.; Pozzi, C.; De Luca, F.; et al., Discovery of Taniborbactam (VNRX-5133): A Broad-Spectrum Serine- and Metallo- β -lactamase Inhibitor for Carbapenem-Resistant Bacterial Infections. *J Med Chem* 2020, 63, 2789–2801.
5. Krajnc, A.; Brem, J.; Hinchliffe, P.; Calvopina, K.; Panduwawala, T. D.; Lang, P. A.; Kamps, J.; Tyrrell, J. M.; Widlake, E.; Seward, B. G.; et al., Bicyclic Boronate VNRX-5133 Inhibits Metallo- and Serine- β -Lactamases. *J Med Chem* 2019, 62, 8544–8556.
6. Hecker, S. J.; Reddy, K. R.; Lomovskaya, O.; Griffith, D. C.; Rubio-Aparicio, D.; Nelson, K.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Sabet, M.; Tarazi, Z.; et al., Discovery of Cyclic Boronic Acid QPX7728, an Ultrabroad-Spectrum Inhibitor of Serine and Metallo- β -lactamases. *J Med Chem* 2020, 1–17.

3. Pielikums – Konferenču tēzes

Anete Parkova, Pēteris Trapencieris. Cyclic boronic acids as beta-lactamase inhibitors. Paul Walden 10th Symposium on Organic Chemistry

A. Parkova, C. J. Schofield, P. Trapencieris. Cyclic boronic acids as beta-lactamase inhibitors. International Conference on Organic Synthesis, Balticum Organicum Syntheticum

Cyclic Boronic Acids as beta-Lactamase Inhibitors

Anete Parkova

Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, Riga, LV-1006, Latvia
e-mail: anete@osi.lv

β -Lactamases enable resistance to almost all β -lactam antibiotics. The β -lactamase-catalysed hydrolysis of β -lactam antibiotics (BLAs) is of central importance in antibiotic resistance. Clavulanic acid is a β -lactam-based inhibitor of the class A serine β -lactamases (SBLs) and is widely used in combination with penicillins [1]. A pioneering work revealed that acyclic boronic acids act as 'transition state analogue' inhibitors of nucleophilic serine enzymes, including serine β -lactamases.

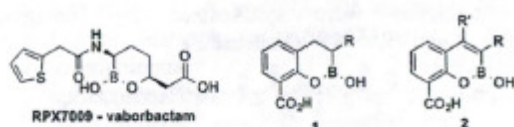
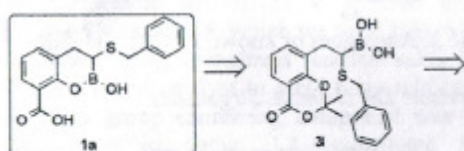


Figure 1. Known SBL inhibitor vaborbactam and target cyclic boronic acids.

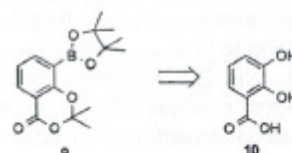
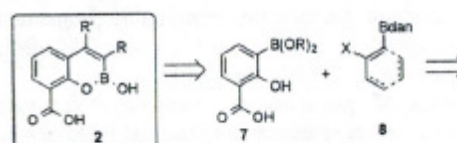
Since acyclic boronic acids are established as SBL/PBP (penicillin-binding-protein) inhibitors and the SBL inhibitor RPX7009 is in clinical trials [2], we have focused on the synthesis of cyclic boronic acids 1 and 2 (Figure 1).



Scheme 1. Retrosynthetic route to cyclic boronic acid 1 type derivatives.

Synthesis of cyclic boronic acid 1a starts with a protection of 3-methylsalicylic acid 6, bromination of methyl group with NBS, followed by Suzuki borylation with B_2Pin_2 and transesterification with (+)-pinandiol gave boronate 5. Matteson's homologation gives chlorinated compound 4, which

after S_N2 reaction with a nucleophile and deprotection of boronate in acidic conditions gives boronic acid 3. To get the target compound 1a, conditions for deprotection of acetonide protecting group still should be found.



Scheme 2. Retrosynthetic route to cyclic boronic acid 2 type derivatives.

For synthesis of cyclic boronic acids 2 two building blocks 7 and 8 should be synthesized, which further in Suzuki coupling reaction would give target boronic acids 2. Synthesis of building block 7 starts with protection of 2,3-dihydroxybenzoic acid 10 followed by conversion of phenol to triflate for borylation to afford boronate 9. At this stage, the borylation reaction conditions are under investigation.

Supervisor: Dr. chem. P. Trapencieris

ACKNOWLEDGEMENTS

7th FP project „Strengthening the research and innovative capacities of the Latvian Institute of Organic Synthesis, the leading Baltic regional centre for drug discovery” (InnovaBalt). Prof. Christopher J. Schofield and his group from University of Oxford, Chemistry Research Laboratory, UK

REFERENCES

- [1] Brem, J.; Cain, R.; Cahill, S.; McDonough, M. A.; Clifton, I. J.; Jiménez-Castellanos, J.-C.; Avison, M. B.; Spencer, J.; Fishwick, C.W.G.; Schofield, C. J. *Nature Comm.* 2016, 7, 12406.
- [2] Bush, K. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 2015, 46, 483.

Cyclic Boronic Acids as Beta-Lactamase Inhibitors

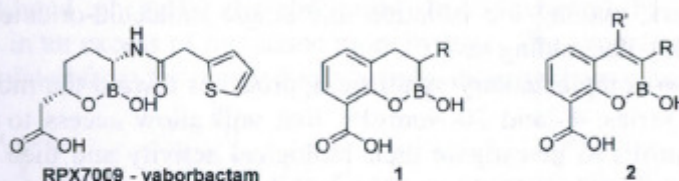
A. Parkova¹, C. J. Schofield² and P. Trapencieris¹

¹Department of Organic Chemistry, Latvian Institute of Organic Synthesis, Latvia

²Department of Chemistry, University of Oxford, UK

anete@osi.lv

β -Lactamases enable resistance to almost all β -lactam antibiotics (BLAs). Pioneering work revealed that acyclic boronic acids can act as “transition state analogue” inhibitors of nucleophilic serine enzymes, including serine β -lactamases (SBL). The β -lactamase-catalysed hydrolysis of BLAs is of central importance in antibiotic resistance¹.



Acyclic boronic acids are established as SBL/PBP (penicillin-binding-protein) inhibitors and SBL inhibitor RPX7009 (vaborbactam)² was discovered by *Rempex Pharmaceuticals*. In August 29, 2017 *Vabomere* (combination of vaborbactam with BLA meropenem) was approved by FDA for complicated urinary tract infections including pyelonephritis. Therefore we have focused our investigations on the synthesis of cyclic boronic acids **1** and **2**.

Acknowledgements: 7th FP project „Strengthening the research and innovative capacities of the Latvian Institute of Organic Synthesis, the leading Baltic regional centre for drug discovery” (*InnovaBalt*).

The Schofield group thanks the *Medical Research Council* and the *Wellcome Trust* for funding.

References:

1. Brem, J.; Cain, R.; Cahill, S.; McDonough, M.A.; Clifton, I.J.; Jiménez-Castellanos, J.-C.; Avison, M.B.; Spencer, J.; Fishwick, C.W.G.; Schofield, C.J. *Nat. Commun.*, **2016**, *7*, 12406-12414
2. Bush, K. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2015**, *46*, 483-493

Promocijas darbs "Potenciālu β -laktamāžu inhibitoru sintēze ciklisko borskābju esteru klasē" izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi un izmantoti tikai literatūras sarakstā norādītie informācijas avoti, kā arī iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autore: Anete Parkova

Paraksts: _____ /A. Parkova/

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai:

Zinātniskais vadītājs: Dr. chem., vadošais pētnieks Pēteris Trapencieris

Paraksts: _____ /P. Trapencieris/

Darbs iesniegts

LU Ķīmijas nozares Promocijas padomē 2021. gada 9. septembrī.

Promocijas padomes sekretāre: Vita Rudoviča

Paraksts: _____ /V. Rudoviča/

Darbs aizstāvēts Promocijas padomes sēdē :

2021. gada 16 decembrī, protokols Nr. _____

Promocijas padomes sekretāre: Vita Rudoviča

Paraksts: _____ /V. Rudoviča/