Informe final publicable de proyecto
Síntesis quimioenzimática de benzoimidazolinas y benzotiazolinas enantioméricamente puras: Enfoque biotecnológico a la preparación de nuevos inhibidores de Metalo-beta-Lactamasas

Código de proyecto ANII: FCE_3_2022_1_172465

Fecha de cierre de proyecto: 01/08/2025

IGLESIAS SANTOS, Cesar (Responsable Técnico - Científico)
RODRÍGUEZ SARAVIA, Magdalena (Investigador)
CABRERA CAETANO, Emanuel (Investigador)
LÓPEZ, Gonzalo (Investigador)
MAHLER TARRÍO, S. Graciela (Investigador)
RODRÍGUEZ GIORDANO, Sonia (Investigador)
SAIZ BIDEGAIN, Cecilia (Investigador)
VILLAMIL POCIÑA, Valentina (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\ FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

La resistencia bacteriana a los antibióticos es una amenaza global creciente, impulsada principalmente por enzimas como las metalo-beta-lactamasas (MBL), que inactivan antibióticos de última línea. Este proyecto buscó desarrollar nuevas moléculas inhibidoras de MBL, específicamente tiazolo-bencimidazolinas (TBIM) y tiazolo-benzotiazolinas (TBTZ), y obtenerlas en su forma enantioméricamente pura, dado que la quiralidad es clave para la actividad biológica y seguridad farmacológica.
El equipo de investigación sintetizó una biblioteca de nuevos heterociclos TBIM y evaluó una estrategia biotecnológica sostenible ("química verde") para separar sus enantiómeros (resolución cinética) utilizando células enteras de E. coli que expresan variantes de la enzima Monoamino Oxidasa N (MAO-N) derivada de Aspergillus niger. Los resultados demostraron que la variante MAO-N D11 es un biocatalizador eficaz para la resolución de TBIM, logrando obtener el enantiómero farmacológicamente relevante con una pureza óptica (exceso enantiomérico) de hasta el 94%.
Se combinaron herramientas experimentales y computacionales (docking y dinámica molecular) para elucidar el mecanismo de acción a nivel atómico, revelando que la selectividad de la enzima depende no solo de su sitio activo, sino también del túnel de acceso. Este proyecto generó nuevo conocimiento científico publicable, formó recursos humanos altamente calificados y estableció una metodología novedosa para la preparación de precursores de fármacos.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Químicas / Química Orgánica / Química Orgánica y Biocatálisis
Palabras clave: Biocatálisis / Monoamino Oxidasas / Inhibidores de MBL /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Los antibióticos beta-lactámicos (ABL) son la clase más importante de agentes antibacterianos, pero su eficacia está comprometida por la resistencia bacteriana. El mecanismo más relevante de resistencia es la producción de beta-lactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo beta-lactámico. Mientras que existen inhibidores clínicos para las serina-beta-lactamasas (SBL), actualmente no hay inhibidores aprobados para las metalo-beta-lactamasas (MBL), una clase de enzimas que utiliza iones de zinc para la catálisis y que puede degradar incluso a los carbapenemos, antibióticos de último recurso.
El diseño de inhibidores de MBL es un desafío debido a la diversidad estructural entre sus subclases (B1, B2, B3). El grupo de investigación cuenta con antecedentes en el diseño de heterociclos como tiazolidinas y benzoimidazolinas que actúan como inhibidores competitivos de MBL con valores de Ki en el rango micromolar. Sin embargo, estos compuestos se obtienen mediante síntesis química convencional como mezclas racémicas (mezcla de dos isómeros especulares). Estudios cristalográficos previos indicaron que solo uno de los enantiómeros (habitualmente el R,R) se une preferentemente a las enzimas diana como NDM-1 y VIM-2.
Por otro lado, la industria farmacéutica demanda procesos más sostenibles ("Química Verde") y la obtención de fármacos ópticamente puros. La biocatálisis, o el uso de enzimas para transformaciones químicas, ofrece ventajas de selectividad y bajo impacto ambiental. Las Monoamino Oxidasas (MAO), especialmente las variantes de Aspergillus niger obtenidas por evolución dirigida (MAO-N D5, D9, D11), han demostrado ser herramientas poderosas para la desracemización de aminas quirales.
Justificación La justificación de este proyecto radica en la urgente necesidad de:
1. Desarrollar nuevos inhibidores de MBL para combatir la resistencia antibacteriana.
2. Implementar métodos de síntesis asimétrica sostenibles que permitan obtener estos inhibidores como enantiómeros puros, cumpliendo con los estándares de seguridad y eficacia farmacológica.
3. Valorizar el uso de biocatalizadores (MAO) en sustratos no convencionales (heterociclos tricíclicos) para los cuales no existían reportes previos de resolución enzimática.
Objetivos El objetivo general fue la síntesis quimioenzimática y caracterización estructural de nuevas benzoimidazolinas (TBIM) y benzotiazolinas (TBTZ/BETZ) enantioméricamente puras como potenciales inhibidores de MBL.
Los objetivos específicos incluyeron:
1. Diseño y Síntesis: Preparar una biblioteca de análogos TBIM sustituidos en el anillo aromático para explorar la relación estructura-actividad.
2. Resolución Biocatalítica: Optimizar las condiciones de reacción (cosolventes, pH, tiempo) utilizando variantes de MAO-N (D5, D9, D11) para la resolución cinética de las mezclas racémicas.
3. Caracterización: Determinar la configuración absoluta del enantiómero aislado y elucidar el mecanismo de oxidación enzimática.
4. Estudios Computacionales: Utilizar docking y dinámica molecular para comprender las bases estructurales de la enantioselectividad observada.

Metodología/Diseño del estudio

El diseño del estudio fue multidisciplinario, integrando síntesis orgánica, microbiología/biocatálisis y química computacional.
1. Síntesis Química de Sustratos Se diseñó una ruta sintética para obtener los heterociclos racémicos TBIM (serie 2) y TBTZ (serie 1). La síntesis se basó en una reacción de doble condensación en un solo paso (one-pot) entre 1,4-ditiano-2,5-diol y diferentes 1,2-diaminoanilinas (para TBIM) o 2-aminotiofenoles (para TBTZ), utilizando metanol o etanol y catálisis ácida (p-TsOH). Los productos fueron purificados mediante cromatografía en columna y caracterizados por RMN.
2. Estrategia Biocatalítica
• Biocatalizador: Se utilizaron células enteras de E. coli transformadas para expresar las variantes de MAO-N (D5, D9, D11) y, en etapas posteriores, enzima purificada mediante cromatografía de afinidad (HisTrap).
• Screening y Optimización: Las reacciones de resolución cinética se llevaron a cabo a escala analítica en tampón fosfato (pH 7-7.8), utilizando borano-amoniaco como agente reductor no selectivo para intentar establecer una resolución cinética dinámica. Se evaluaron variables como la variante enzimática, el tiempo de reacción y el uso de cosolventes orgánicos (DMF, DMSO, etc.) para mejorar la solubilidad de los sustratos hidrofóbicos.
• Escalado: Se escaló la reacción bajo las condiciones óptimas para aislar los productos y determinar el rendimiento y pureza óptica a escala preparativa.
3. Análisis y Caracterización Estereoquímica El seguimiento de las reacciones y la determinación del exceso enantiomérico (%ee) se realizaron mediante HPLC quiral (columnas Chiralpak). Para la asignación de la configuración absoluta del enantiómero resultante, se combinaron dos métodos:
• Derivatización Química: Síntesis de tioésteres cristalinos para análisis por Difracción de Rayos X.
• Química Computacional: Cálculo teórico de la rotación óptica y espectros de Dicroísmo Circular Electrónico (ECD) utilizando Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) y TD-DFT para compararlos con los datos experimentales.
4. Estudios In Silico Se realizaron estudios de docking molecular y simulaciones de dinámica molecular (MD) de 100 ns. Se modeló la estructura de la enzima MAO-N D11 (reconstruyendo lazas faltantes) para analizar la interacción de los enantiómeros R,R y S,S con el sitio activo y el túnel de entrada de la enzima, calculando energías libres de unión (MM-GBSA/PBSA)

Resultados, análisis y discusión

Síntesis de la Biblioteca de Compuestos Se sintetizaron exitosamente 12 nuevas tiazolo-bencimidazolinas (TBIM 2a-g) y una tiazolo-benzotiazolina (TBTZ 1a) con rendimientos químicos de entre el 49% y el 85%. La introducción de sustituyentes en el anillo aromático de las diaminas de partida generó isómeros de posición (4- y 5-sustituidos), cuya proporción varió según la naturaleza electrónica del sustituyente, tal como se había previsto en el diseño experimental.
Resolución Enzimática y Optimización La evaluación inicial mostró que las variantes de MAO-N no fueron capaces de resolver el compuesto azufrado TBTZ 1a. Sin embargo, para las tiazolo-bencimidazolinas (TBIM), la variante MAO-N D11 mostró una excelente capacidad de resolución.
• Condiciones Óptimas: Se determinó que el uso de DMF al 5% como cosolvente era crucial para el éxito de la reacción. Bajo estas condiciones optimizadas, se logró aislar el enantiómero (+)-TBIM 2a con un exceso enantiomérico (ee) del 94% y un rendimiento del 44% (cercano al máximo teórico del 50% para una resolución cinética clásica).
• Efecto de Sustituyentes: El estudio del alcance de la reacción (sustratos 2b-g) reveló que la enzima es sensible al impedimento estérico y electrónico. El sustrato no sustituido (2a) dio los mejores resultados. Los sustituyentes voluminosos (como el naftilo en 2b) o fuertemente atractores de electrones anularon la actividad enzimática, lo que se correlacionó con estudios de docking que mostraron impedimentos en el túnel de entrada de la enzima.
Mecanismo y Limitaciones de la Desracemización Originalmente se planteó una resolución cinética dinámica (deracemización) para obtener un 100% de rendimiento teórico. Sin embargo, se aisló e identificó un producto secundario de oxidación, el compuesto (-)-6 (un tiazolo-bencimidazol completamente oxidado). Esto demostró que la enzima oxida la amina secundaria del heterociclo irreversiblemente bajo las condiciones probadas, impidiendo el ciclo de reducción química necesario para la deracemización completa. Este hallazgo también explicó por qué la serie TBTZ (que carece de esta amina secundaria susceptible a oxidación por MAO) no fue sustrato de la enzima.
Determinación de Configuración y Análisis Computacional Mediante la comparación de espectros ECD experimentales y teóricos, se asignó inequívocamente la configuración absoluta del enantiómero aislado (+)-2a como (R,R), lo cual es altamente relevante ya que estudios previos del grupo indicaban que esta configuración es la preferida para la inhibición de MBLs como NDM-1. Las simulaciones de dinámica molecular sugirieron que la selectividad enantiomérica no está controlada exclusivamente por el sitio activo (donde ambos enantiómeros pueden acomodarse), sino que el túnel de entrada de la enzima juega un papel crítico, actuando como un filtro estérico que afecta la velocidad de acceso de los enantiómeros.
Impactos Identificados
1. Científico: Se reportó por primera vez la resolución cinética enzimática de heterociclos TBIM, ampliando el espectro de sustratos aceptados por las enzimas MAO-N.
2. Formación de RRHH: El proyecto contribuyó directamente a la formación de posgrado (Doctorado y Maestría) de los integrantes del equipo (V. Villamil, G. López), cumpliendo con los objetivos de formación planteados.
3. Tecnológico: Se generó una ruta para obtener bloques de construcción quirales de alto valor agregado, con potencial aplicación en la industria farmacéutica para el desarrollo de antibióticos

Conclusiones y recomendaciones

1. El proyecto logró exitosamente la síntesis de una nueva familia de inhibidores potenciales de MBL (TBIM) y estableció una ruta biocatalítica novedosa para su resolución óptica.
2. La enzima MAO-N D11 fue identificada como el mejor biocatalizador, permitiendo obtener el enantiómero de interés farmacológico (R,R)-2a con alta pureza óptica (94% ee).
3. Se demostró que la metodología está limitada por el volumen de los sustituyentes en el anillo aromático; grupos voluminosos bloquean el acceso al sitio activo a través del túnel de la enzima.
4. El mecanismo de reacción implica la oxidación de la amina secundaria, generando un subproducto bencimidazólico que impide la deracemización completa pero ofrece una vía para obtener derivados oxidados también quirales.
5. La integración de herramientas computacionales permitió explicar la selectividad observada, destacando la importancia de la dinámica del túnel de acceso enzimático más allá del sitio catalítico.

Recomendaciones
• Ingeniería de Enzimas: Basándose en los hallazgos computacionales sobre el túnel de entrada, se recomienda realizar mutagénesis dirigida en los residuos que conforman este túnel para permitir la entrada de sustratos más voluminosos (como los derivados naftilo) y mejorar la generalidad del método.
• Exploración de Nuevas Enzimas: Dado que las TBTZ no fueron resueltas por MAO, se sugiere explorar otras oxidases o el uso de Iminoreductasas (IREDs) en modo oxidativo o en cascadas enzimáticas, tal como se planteó como alternativa en la propuesta original.
• Evaluación Biológica: Es imperativo completar la evaluación de la actividad inhibitoria de los enantiómeros puros aislados frente a un panel amplio de MBLs clínicas para validar su potencial terapéutico final.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Novel Kinetic Resolution of Thiazolo-Benzimidazolines Using MAO Enzymes	Villamil, Valentina Vairoletti, Franco Tijman, Ariel López, Gonzalo Lima, Alejandro Peixoto de Abreu Saiz, Cecilia Iglesias, César Mahler, Graciela	https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03223	https://hdl.handle.net/20.500.12008/41906	Finalizado
Póster	Síntesis enantioselectiva de benzo-bisheterociclos utilizando monoaminooxidasas de A. niger	Magdalena Rodríguez ; Graciela Mahler ; César Iglesias	https://www.enaqui9.pedeciba.edu.uy/libro-de-res%C3%BAmenes	https://hdl.handle.net/20.500.12008/54132	Finalizado
Resumen de conferencia publicado	Síntesis enantioselectiva de benzo-bisheterociclos utilizando monoaminooxidasas de Aspergillus niger	Rodríguez, Magdalena Mahler, Graciela Iglesias, César	https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/54134	https://hdl.handle.net/20.500.12008/54134	Finalizado

Referencias bibliográficas

1. Villamil, V., Vairoletti, F., Tijman, A., López, G., Peixoto de Abreu Lima, A., Saiz, C., Iglesias, C., & Mahler, G. (2023). Novel Kinetic Resolution of Thiazolo-Benzimidazolines Using MAO Enzymes. ACS Omega, 8(45), 42114–42125.
2. Rodríguez, M., Mahler, G., & Iglesias, C. Poster: Docking intermediario A en MAO-D11. Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. (Referenciado en el contexto de estudios computacionales del grupo).
4. Bussi, C., et al. (2024). Journal of Medicinal Chemistry, 67(5), 3795-3812.
5. Gaughran, F., et al. (2018). Chemical Reviews, 118(2), 801–838.
6. Mojica, M. F., et al. (2022). Chemical Biology & Drug Design, 99(2), 362-372.
7. Gonzales, M. N., et al. (2016). ACS Infectious Diseases, 1, 544–554.
8. Hinchliffe, P., et al. (2021). Chemical Science, 12, 2898–2908.
9. Singh, P., Varshnaya, R. K., Dey, R., & Banerjee, P. (2020). Donor-Acceptor Cyclopropanes as an Expedient Building Block Towards the Construction of Nitrogen-Containing Molecules: An Update. Advanced Synthesis & Catalysis, 362(7), 1447–1484. 10. Li, G., et al. (2020). Organic Letters, 22(9), 3367-3372.
11. Atkin, K. R., et al. (2008). Acta Crystallographica Section F, 64, 182–185.
12. Herter, S., et al. (2018). Journal of Biotechnology, 291, 35-40.
13. Batista, V. F., et al. (2018). ACS Catalysis, 8(12), 11889–11907.
14. Ghislieri, D., & Turner, N. J. (2014). Biocatalytic approaches to the synthesis of enantiomerically pure chiral amines. Topics in Catalysis, 57, 284–300.
15. Case, D. A., et al. (2022). Amber 2022. University of California, San Francisco.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional. (CC BY-NC)