

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE
Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte

RIGA TECHNICAL UNIVERSITY
Faculty of Material Science and Applied Chemistry

Samir KHER

Doktora studiju programmas "Ķīmija" doktorants

**“MALĀRIJAS PROTEĀZES PfSUB1
INHIBITORU IZSTRĀDE”**

Promocijas darba kopsavilkums

**“ DEVELOPMENT OF MALARIAL PROTEASE
PfSUB1 INHIBITORS”**

Summary of Doctoral Thesis

Zinātniskais vadītājs
Supervisor
Asoc. Prof. *Dr. chem.*
A. JIRGENSONS

Rīga 2014

SATURS

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS	3
Tēmas aktualitāte	3
Zinātniskā novitāte	4
Darba struktūra un apjoms	4
Darba aprobācija un publikācijas	5
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI	7
1. No peptīdiem atvasināti α -ketoamīdi kā PfSUB1 inhibitori	7
1.1. Konceptijas lietderība	7
1.2. No peptīdiem atvasinātu α -ketoamīdu struktūras - aktivitātes likumsakarības	7
1.3. Glutamīna sānu ķēde P ₁ pozīcijā	11
1.4. No peptīdiem atvasinātu α -ketoamīdu sintēze	12
2. Hinoksalīna atvasinājumi kā PfSUB1 inhibitori	13
3. Benzoksazinona atvasinājumi kā PfSUB1 inhibitori	16
SECINĀJUMI	16

CONTENTS

SUMMARY OF THE THESIS	19
Introduction	19
Scientific Novelty	20
Structure of the thesis	20
Publication and approbation of the thesis	21
MAIN RESULTS OF THE THESIS	23
1. Peptidic α -ketoamides as PfSUB1 inhibitors	23
1.1. Proof of Concept	23
1.2. Structure - Activity Relationships of peptidic α -ketoamides	23
1.3. Glutamine side chain in the P ₁ position	27
1.4. Synthesis of peptidic α -ketoamides	28
2. Quinoxaline derivatives as PfSUB1 inhibitors	30
3. Benzoxazinone derivatives as PfSUB1 inhibitors	32
CONCLUSIONS	33

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

Tēmas aktualitāte

Malārija ir postoša infekcijas slimība, kuru izraisa moskītu pārnēsāti plazmodija (*Plasmodium*) parazīti. Malārijas apdraudētos reģionos mīt aptuveni 40% pasaules iedzīvotāju un šī slimība ir viens no galvenajiem saslimšanas un mirstības cēloņiem jaunattīstības valstīs (Centrālamerikā, Dienvidamerikā, daudzos āzijas reģionos kā arī Āfrikā).¹ Malāriju uzskata par vienu no nabadzības cēloņiem jaunattīstības valstīs, jo šī infekcija palēnina to ekonomisko izaugsmi par 1.3% gadā.² Pašlaik malārijas ārstēšanai tiek lietotas vairākas sintētiskas un pussintētiskas zāļvielas, kas pieder hinolīnu, antifolātu un artemizininu grupām, kā arī dažas antibiotikas un Atovakvons (*Atovaquone*).² Kaut arī pieejamo pretmalārijas līdzekļu klāsts ir visai plašs, praktiski pret visiem preparātiem ir novērota rezistentu malārijas celmu parādīšanās. Malārijas skartajos apvidos rezistence turpina izplatīties, kas liek domāt, ka pašreizējie terapeitiskie līdzekļi tuvākajā nākotnē kļūs neefektīvi.³ Tā rezultātā ir pastiprinājušies centieni atrast pretmalārijas zāļvielas ar jaunu iedarbības mehānismu. Tostarp, kā viens no potenciālajiem zāļvielu mērķiem ir enzīms PfSUB1.

Plasmodium falciparum enzīms PfSUB1 ir subtilizīnam radniecīga serīna proteāze 1, kas pieder subtilizīnam līdzīgo serīna proteāžu saimei. Šī proteāze izsauc vakuolas un saimniekšūnas membrānas noārdīšanos, kā rezultātā no tās izplūst merozoīti. Līdz ar to, PfSUB1 ir būtiska loma parazīta dzīves ciklā, kas to padara par pievilcīgu mērķi jaunu pretmalārijas līdzekļu izstrādei.⁴⁻⁶

Mazmolekulāru PfSUB1 inhibitoru izveide ir saskārusies ar ievērojamām grūtībām. Vairāk kā 170,000 mazmolekulāru savienojumu skrīningā identificēta sarežģītas struktūras dabas viela MRT 12113, hinolilhidrazona atvasinājums, hlorizokumarīna atvasinājums JCP104. Samērā nesen, izveidoti peptīdiskie PfSUB1 inhibitori uz difluorostatīna bāzes.⁶⁻⁹ Laikā, kad uzsākām PfSUB1 inhibitoru meklējumus, literatūrā bija aprakstīti tikai savienojumi MRT 12113 and JCP104.

¹WHO | Factsheet on the World Malaria Report 2013

http://www.who.int/malaria/media/world_malaria_report_2013/en/ (accessed Apr 2, 2014).

²Wells, T. N. C.; Alonso, P. L.; Gutteridge, W. E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 879–891.

³Avery, M. A.; Choi, S.-R.; Mukherjee, P. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 161–171.

⁴Withers-Martinez, C.; Suarez, C.; Fulle, S.; Kher, S.; Penzo, M.; Ebejer, J.-P.; Koussis, K.; Hackett, F.; Jirgensons, A.; Finn, P.; Blackman, M. J. *Int. J. Parasitol.* **2012**, *42*, 597–612.

⁵Jones S. *Nature Rev. Microbiology*, 2008, *6*, 94-95

⁶Yeoh, S.; O'Donnell, R. A.; Koussis, K.; Dluzewski, A. R.; Ansell, K. H.; Osborne, S. A.; Hackett, F.; Withers-Martinez, C.; Mitchell, G. H.; Bannister, L. H.; Bryans, J. S.; Kettleborough, C. A.; Blackman, M. J. *Cell* **2007**, *131*, 1072–1083.

⁷Gemma, S.; Giovani, S.; Brindisi, M.; Tripaldi, P.; Brogi, S.; Savini, L.; Fiorini, I.; Novellino, E.; Butini, S.; Campiani, G.; Penzo, M.; Blackman M. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5317-5321

⁸Arastu-Kapur S.; Ponder E. L.; Fonović U. P.; Yeoh S.; Yuan F.; Fonović M.; Grainger M.; Phillips C.; Powers J.; C.; Bogyo M.; *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 203 - 213.

⁹Giovani S.; Penzo M.; Brogi S.; Brindisi M.; Gemma S.; Novellino E.; Savini L.; Blackman M. J.; Campiani G.; Butini S.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3582-3586.

Pētījuma mērķis un uzdevumi

Darba mērķi ir:

- a) jaunu malārijas proteāzes PfSUB1 inhibitoru atklāšana;
- b) to struktūras optimizācija nolūkā uzlabot inhibitoro aktivitāti;
- c) SAR pētījumi ar mērķi precizēt virtuālā dokinga metodes.

Inhibitoru meklējumi tika balstīti uz trim atšķirīgam pieejām:

- 1) racionālais dizains, kura pamatā ir PfSUB1 enzīma substrāta sekvenca, tajā iekļaujot ketoamīdu kā kovalento serīna "slazdu", sašķeļamās peptīdsaītes vietā;
- 2) virtuālas savienojumu bibliotēkas skrīnings uz PfSUB1 enzīmu un atlasīto trāpījumu sintētiska attīstīšana;
- 3) *Malaria Box* savienojumu bibliotēkas skrīnings uz PfSUB1 enzīmu un atlasīto trāpījumu sintētiska attīstīšana.

Zinātniskā novitāte

Pētījuma ietvaros īpaša uzmanība veltīta iedarbīgu un selektīvu PfSUB1 inhibitoru izveidei, kas būtu potenciāli pretmalārijas līdzekļi ar jaunu darbības mehānismu. Šis ir aktuāls pētījumu virziens, ņemot vērā pieaugošo malārijas rezistenci pret pašreiz lietotajām zālēm, kā arī ierobežoto zināmo SUB1 inhibitoru klāstu. Kā PfSUB1 inhibitori darba ietvaros tika attīstīti no peptīdiem atvasināti α -ketoamīdi, kas saistās ar proteāzi, veidojot atgriezenisko kovalento saiti starp inhibitora ketogrupu un enzīma katalītiskās triādes serīnu. Programmas ietvaros balstoties uz molekulārās dinamikas (MD) simulācijām, sintezēti 28 no peptīdiem atvasināti α -ketoamīdi un noteikta šo savienojumu PfSUB1 inhibēšanas spēja. Mūsu pētījumi, izmantojot visas trīs iepriekšminētās pieejas, apstiprina, ka PfSUB1 inhibēšana ir ļoti daudzsološs virziens jaunu pretmalārijas zāļu izveidē

Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs sagatavots kā tematiski vienotu pētījumu kopa, kas ietver no peptīdiem atvasinātus α -ketoamīdu, hinoksalīna atvasinājumus un benzoksazinona atvasinājumus kā potenciālus malārijas proteāzes PfSUB1 inhibitorus. Darbs satur sekojošas daļas: Ievads, literatūras apskats, rezultāti un to izvērtējums, no peptīdiem atvasināti α -ketoamīdi kā PfSUB1 inhibitori, dizains un koncepcijas pārbaude, no peptīdiem atvasinātu α -ketoamīdu struktūras - aktivitātes likumsakarības, uz benzoksazinona struktūras balstīta PfSUB1 virtuālā skrīninga trāpījumu attīstīšana, uz hinoksalīna struktūras balstītu *Malaria Box* skrīninga trāpījumu attīstīšana par PfSUB1 inhibitoriem, eksperimentālā daļa un secinājumi. Darbs satur pielikumu, kurā apkopotas zinātniskās publikācijas (publicētas vai pieņemtas publicēšanai). Promocijas darbs un publikācijas uzrakstīti angļu valodā, to kopējais apjoms ir 253 lpp.

Darba aprobācija un publikācijas

Promocijas darba rezultāti iekļauti 4 publikācijās:

1. Withers M. C.; Suarez C.; Fulle S.; **Kher S. S.**; Penzo M.; Ebejer J. P.; Koussis K.; Hackett F.; Jirgensons A.; Finn P.; Blackman M. J. Plasmodium subtilisin-like protease 1 (SUB1): Insights into the active-site structure, specificity and function of a pan-malaria drug target, *International Journal for Parasitology*, **2012**, 42, 597–612 (article belongs to special issue of Molecular Approaches to Malaria 2012)
2. **Kher S. S.**; Fulle S.; Penzo M.; Finn P.; Blackman M. J.; Jirgensons A. Substrate Derived Peptidic α -Ketoamides as Malarial Protease PfSUB1 Inhibitors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2014**, In Press, Corrected proof. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.07.086
3. **Kher S. S.**; Jirgensons A. Synthesis of β -amino- α -ketoamides, review article, *Current Organic Chemistry*, **2014**, 19, DOI: 10.2174/1385272819666140818223225
4. **Kher S. S.**; Fulle S.; Penzo M.; Ebejer J. P.; Finn P.; Blackman M. J.; Jirgensons A. Quinoxaline based inhibitors of malarial protease PfSUB1, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **2014**, accepted for publication.

Darba rezultāti prezentēti sekojošās konferencēs:

1. **Kher S. S.**; Fulle S.; Penzo M.; Martinez C. W.; Ebejer J. P.; Blackman M. J.; Finn P.; Jirgensons A. Structure - activity relationships of peptidic α -ketoamide based PfSUB1 inhibitors, Antimicrobial Drug Conference, June 10-12, **2013**: Madrid, Spain
2. Ebejer J. P.; Fulle S.; **Kher S. S.**; Penzo M.; Blackman M. J.; Jirgensons A.; Finn P. A Ligand-Based Virtual Screening Study to find novel PfSUB1 inhibitors, Antimicrobial Drug Conference, June 10-12, **2013**: Madrid, Spain
3. **Kher S. S.**; Jaudzems K.; Jirgensons A. Peptidic α -ketoamides with glutamine P₁ side chain, Heterocycles in Bio-organic chemistry, May 27-30, **2013**: Riga, Latvia
4. **Kher S. S.**; Fulle S.; Penzo M.; Martinez C. W.; Ebejer J. P.; Blackman M. J.; Finn P.; Jirgensons A. Peptidic α -ketoamide based PfSUB1 inhibitors, EFMC-ISMIC 2012 - 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry, Sept. 2-6, **2012**: Berlin, Germany

5. Penzo M.; **Kher S. S.**; Fulle S.; Martinez C. W.; Ebejer J. P.; Jirgensons A.; Finn P.; Blackman M. J. Design of new inhibitors of an essential malarial protease, 8th Annual Biomalpar Conference, 14-16 May, **2012**: Heidelberg, Germany
6. Fulle S.; Ebejer J. P.; **Kher S. S.**; Penzo M.; Martinez C. W.; Jirgensons A.; Blackman M. J.; Finn P. Substrate driven design of inhibitors of the malarial protease PfSUB1, 19th EuroQSAR Knowledge enabled Ligand Design, Aug. 26-30, **2012**: Viena, Austria
7. Penzo M.; **Kher S. S.**; Fulle S.; Martinez C. W.; Ebejer J. P.; Finn P.; Jirgensons A.; Blackman M. J. Substrate-based design of inhibitors of an essential malarial protease, 23rd Annual Molecular Parasitology Meeting, Sept. 23-27, **2012**: Woods Hole, MA, United States
8. **Kher S. S.**; Jirgensons A. Design and synthesis of peptidic α -ketoamide based PfSUB1 inhibitors, Paul Walden 7th symposium in organic chemistry, Sept. 12-13, **2011**: Riga, Latvia

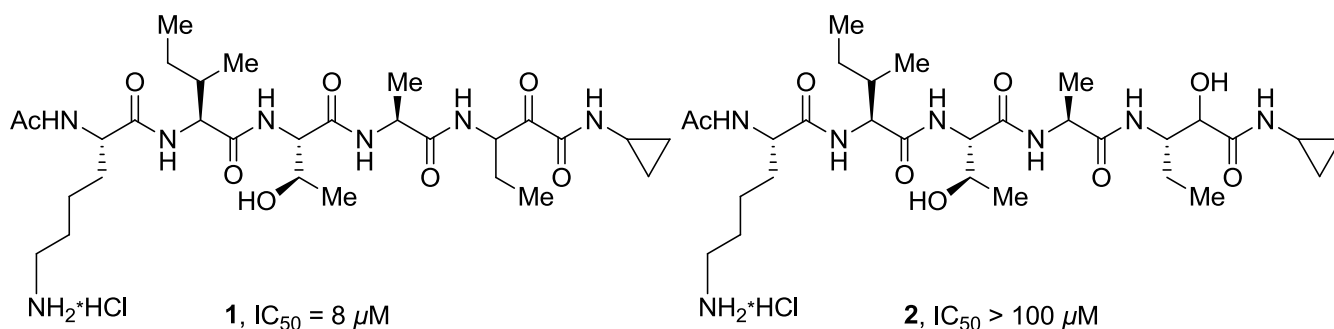
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

1. No peptīdiem atvasināti α -ketoamīdi kā PfSUB1 inhibitori

PfSUB1 ir serīna proteāze, kura substrāta sašķelšanai izmanto katalītisko triādi, kas sastāv no Ser₆₀₆, His₄₂₈ and Asp₃₇₂. *M. Blackman* grupas veiktajos substrāta specifiskuma pētījumos noskaidrota optimāla PfSUB1 substrāta sekvenču - KITAQ/DDEES. Mēs izstrādājām potenciālos PfSUB1 inhibitorus, kas balstīti uz KITAQ/DDEES substrāta sekvenci, to struktūrā sašķelamās peptīdsaites vietā iekļaujot ketoamīda funkciju. Ketoamīdi tika izvēlēti par kovalento struktūrelementu tāpēc, ka inhibitora modificēšana var tikt veikta gan SUB1 substrāta saistīšanās vietas "prim-" gan "ne-prim" daļā.

1.1. Konceptijas pārbaude

Lai pārbaudītu koncepciju, mēs ieguvām no peptīda atvasinātu α -ketoamīdu **1** un tā hidroksi-analogu **2**. Savienojumam **1** tika konstatēta PfSUB1 inhibēšanas spēja ($IC_{50} = 8 \mu M$). Taču tā analogs **2**, kurā ketoamīda grupējuma vietā ir aminospirts, neuzrādīja PfSUB1 inhibitoro aktivitāti koncentrācijās līdz pat $100 \mu M$.



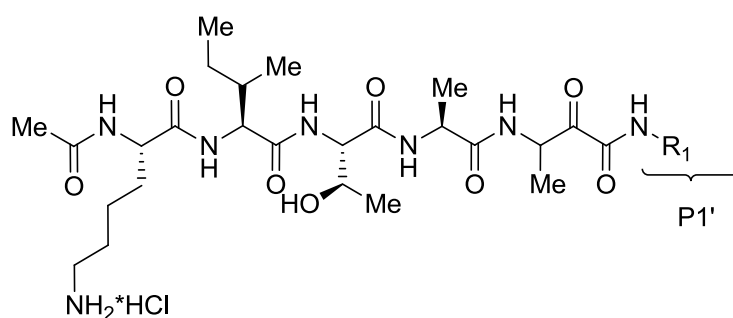
1. att. No peptīdiem atvasinātā α -ketoamīda **1** un tā hidroksi analoga **2** struktūras un PfSUB1 inhibitorā aktivitāte

1.2 No peptīdiem atvasinātu α -ketoamīdu struktūras - aktivitātes likumsakarības

Pēc koncepcijas pierādīšanas tika veikti plašāki SAR pētījumi nolūkā iegūt no peptīdiem atvasinātus α -ketoamīdus ar augstāku PfSUB1 inhibitoro aktivitāti.

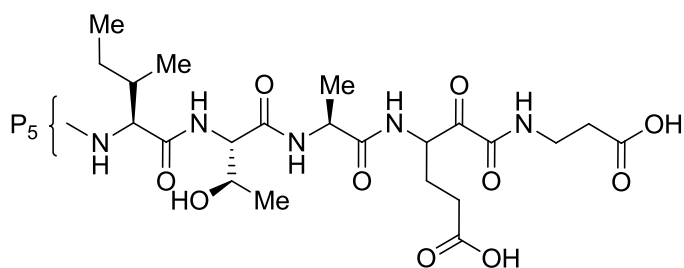
„Prim” daļas aizvietotāju izpēte lika secināt, ka optimālais terminālās karbonilgrupas aizvietotājs ir līdzīgs asparagīnskābes fragmentam enzīma substrātā (1. tabula, savienojumi **3-5**, **7-8**). Garākas vai īsākas ķēdes ievadīšana noveda pie aktivitātes pazemināšanās. Nepieciešamību pēc karboksilgrupas „prim” daļā pierāda amīdtipa analogi **6** un **9**, kuriem tika konstatēta ievērojama inhibitorās aktivitātes krišanās.

1. tabula. P₁' aizvietotāja modificēšana.



Sav.	R ₁ (P ₁ ')	IC ₅₀ (μM)
3		1.0
4		3.1
5		10
6		38
7		7.0
8		11
9	H	100

2. tabula. P₅ aizvietotāja modificēšana.

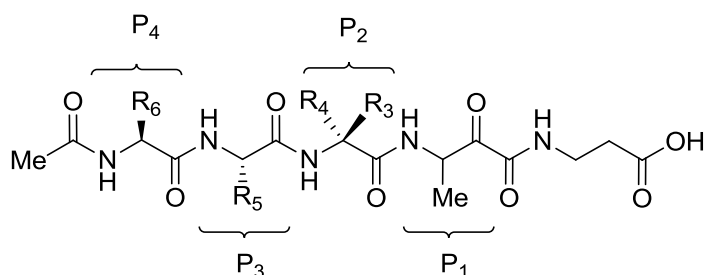


Sav. nr.	P ₅	IC ₅₀ (μM)
10	Ac-Lys*HCl	4.0
11	Ac-Ala	9.0
12	Ac	5.0 ± 0.1

PfSUB1 inhibitoru “ne-prim” daļas struktūras - aktivitātes likumsakarību pētījumi tika veikti, vadoties pēc molekulārās dinamikas (MD) simulāciju rezultātiem, kā arī ņemot vērā savienojuma 3

saistības veidu ar proteāzi, kas noskaidrots veicot dokinga eksperimentus. Šie pētījumi liecina, ka P₅ aizvietotājs nesniedz vērā ņemamu ieguldījumu saistības brīvajā enerģijā. Papildus pierādījumi mazsvarīgajai P₅ aizvietotāja lomai tika iegūti, sintezējot analogus ar α -Glu sānu ķēdi P₁ pozīcijā (2. tabula, savienojumi **10-12**). Tika konstatēts, ka acetil- vai acetilalanilgrupa acetillizīna vietā P₅ pozīcijā būtiski neietekmē savienojuma PfSUB1 inhibitoro aktivitāti.

3. tabula. P₂-P₄ aminoskābju nozīme no peptīdiem atvasinātajos α -ketoamīdu PfSUB1 inhibitoros.

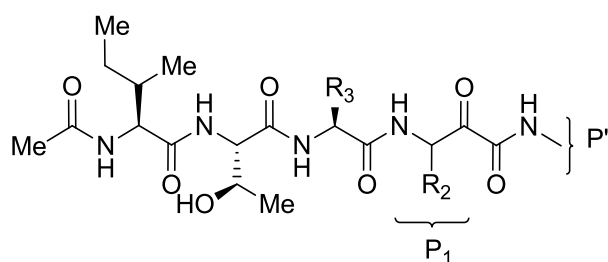


Sav. nr.	R ₃ , R ₄ (P ₂)	R ₅ (P ₃)	R ₆ (P ₄)	IC ₅₀ (μ M)
13	Me, H			2.5 $\pm$ 0.1
14	Me, Me			>50
15	CH ₂ CH ₂			>50
16	H, H			0.9 $\pm$ 0.1
17	Me, H	Me		30 $\pm$ 1
18	H, H		Me	>50

Tālākajos pētījumos tika noteiktas P₂₋₄ pozīciju struktūras - aktivitātes likumsakarības. Balstoties uz substrāta saistības modelēšanu un savienojuma **3** molekulāro dokingu (1. tabula), P₂ pozīcijā nepieciešama maza izmēra aminoskābe, kā alanīns vai glicīns. Šajā pozīcijā ievietojot citas nelielas aminoskābes, piemēram, α -Me-alanīnu vai 1-aminociklopropilkarbonskābi, tika iegūti neaktīvi savienojumi (3. tabula, savienojumi **14** un **15**). Turpretī alanīna vietā P₂ pozīcijā ievietojot glicīnu, tika iegūts savienojums **16** ar nedaudz paaugstinātu inhibitoro aktivitāti, salīdzinājumā ar analogu **13** (3.

tabula). Fragmentu P₃ un P₄ nozīme tika noskaidrota, aizvietojoš šīs aminoskābes ar alanīnu (3. tabula, savienojumi **17** un **18**). Saskaņā ar substrāta saistības un inhibitora **3** dokinga pētījumiem, P₃ sānu ķēde ir vērsta prom no substrāta piesaistes vietas enzīmā un mijiedarbojas ar šķīdinātāju. Savienojuma **17** pazeminātā inhibitorā aktivitāte ir izskaidrojama ar solvatācijas enerģētisko neizdevīgumu, ko izraisa polārās treonīna sānu ķēdes nomaiņa pret metilgrupu. Savukārt, izoleicīns P₄ pozīcijā, labi iederas hidrofoajā S₄ kabatā. Tā sānu ķēdes nomaiņa pret metilgrupu, domājams, izraisa enerģētiski izdevīgu Van der Vālsa mijiedarbību zudumu, kas izskaidro savienojuma **18** zemo aktivitāti.

4. tabula. P₁ sānu ķēdes modificēšana.



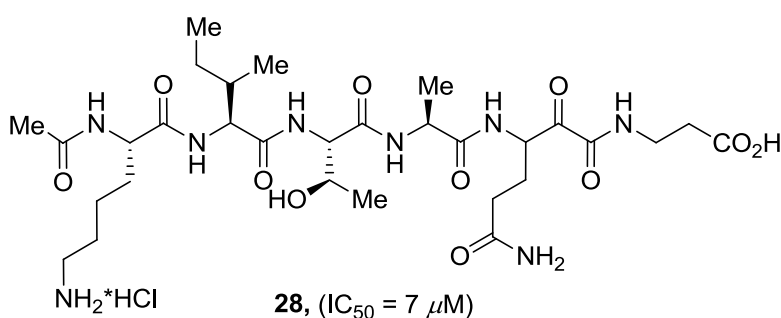
Cmpd.	R ₂ (P ₁)	R ₃ (P ₂)	P'	IC ₅₀ (μM)
19	Bn	Me		100
20	<i>n</i> -Pr			20 ± 3
21	Ph			>50
12				5.0 ± 0.1
22				>50
23				>50
24	Me	H		>50
25	Et			1.2 ± 0.1
26	-CH ₂ OH			4.0 ± 0.1
27	<i>n</i> -Pr			4.5 ± 0.1
16	Me			0.9 ± 0.1

Lai noskaidrotu P₁ sānu ķēdes nozīmi, tika izveidota neliela pentapeptīdu α-ketoamīdu analogu **19-27** sērija (4. tabula). Šajos pētījumos tika noskaidrots, ka S₁ kabatā ietilpst tikai nelieli aizvietotāji - P₁ pozīcijā etilaizvietotais savienojums **25** bija vienīgais, kas uzrādīja ar metilanalogu **16** salīdzināmu inhibitoro aktivitāti. Savienojums **22** ar *N,N'*-divaizvietotu glutamīna sānu ķēdi un savienojums **23** ar

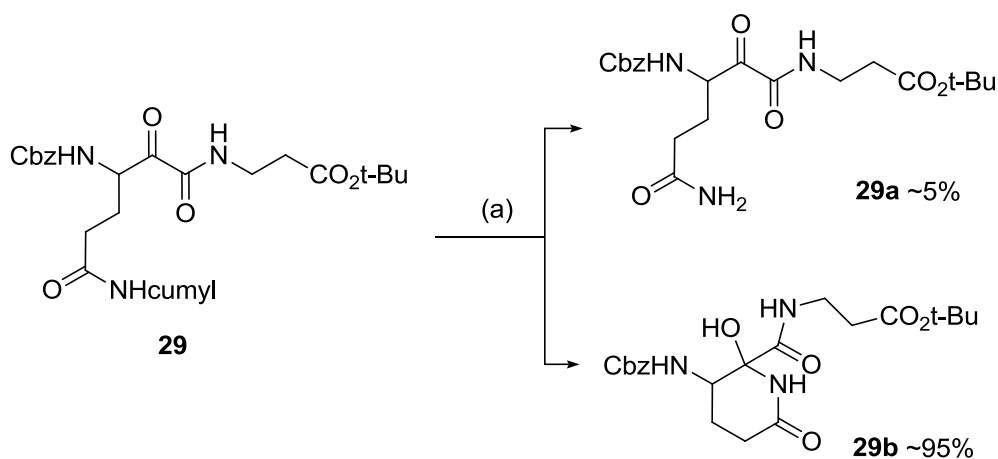
laktāma ciklā saslēgtu glutamīna sānu ķēdi tika izveidoti kā analogi, kas nespēj veidot ciklisko tautomēru, taču tie neuzrādīja PfSUB1 inhibitorā aktivitāti.

1.3 Glutamīna sānu ķēde P₁ pozīcijā

Atbilstoši optimālajai KITAQ/DDEES substrāta sekvencei, tika iegūts savienojums **28** (2. att.) ar glutamīna sānu ķēdi P₁ pozīcijā, taču tika konstatēts, ka glutamīna sānu ķēde nav savietojama ar elektrofilo ketogrupu. Pēc aizsarggrupu nošķelšanas šī savienojuma prekursorā, α -ketoamīdam raksturīgais α -protona signāls ¹H-KMR spektrā bija nobīdīts stiprākā laukā, kas liecināja par blakus esošās karbonilgrupas pazušānu.



2. att. α -Ketoamīds **28** ar glutamīna P₁ sānu ķēdi kā KITAQ substrāta “prim” daļas sekvences analogs.



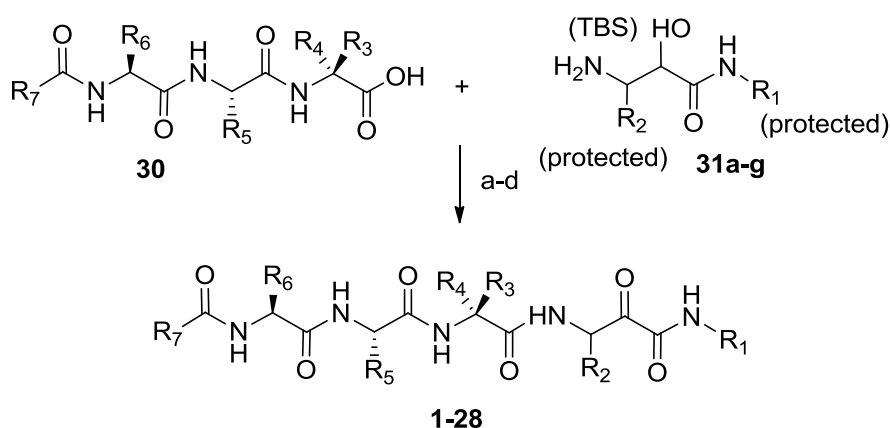
1. shēma. Modeļsavienojuma **29** ar neaizsargātu glutamīna sānu ķēdi sintēze. (a) TFA:DCM

Lai izpētītu glutamīna sānu ķēdi saturoša ketoamīda uzvedību, tika sintezēts strukturāli vienkāršāks modeļsavienojums **29**. Aizsarggrupu nošķelšana modeļsavienojumā **29** un iegūto savienojumu **29a,b** izpēte, izmantojot 2D KMR TOCSY un HMBC metodes, parādīja ka līdzsvars ir

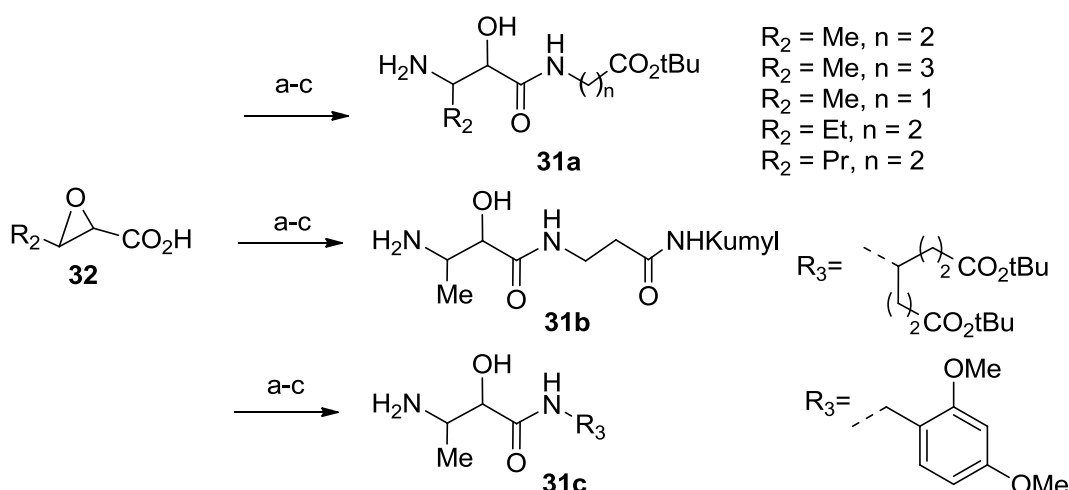
nobīdīts cikliskā tautomēra **29a** virzienā, un šķīdumā ir tikai ~5% savienojuma **29a**. Cikliskā tautomēra veidošanās ir sagaidāma arī savienojumā **28** un tas izskaidro negaidīti zemo šī savienojuma inhibitoro aktivitāti.

1.4 No peptīdiem atvasinātu α -ketoamīdu sintēze

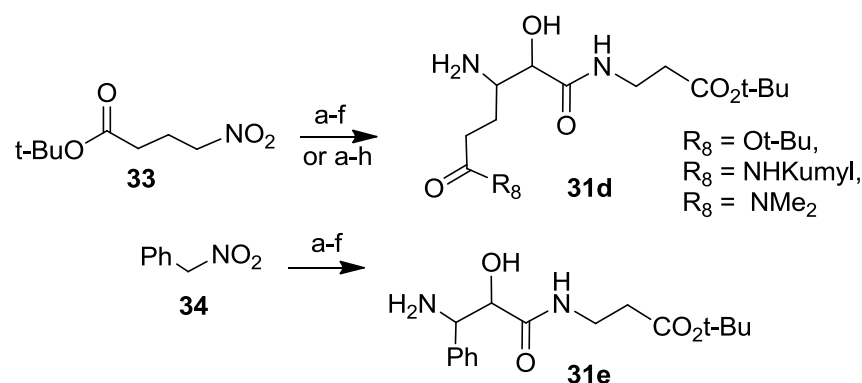
No peptīdiem atvasinātu α -ketoamīdu sintēzei kā pamatbūvbloki tika izmantoti peptīdi **30** un aminospirti **31a-g** (2. shēma). Savienojumi **30** tika iegūti šķīdās fāzes peptīdu sintēzē.



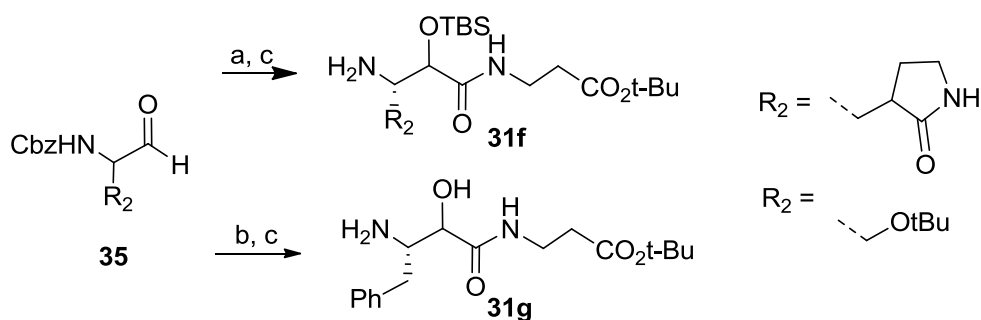
2. shēma. No peptīdiem atvasinātu α -ketoamīdu **1-28** sintēze no peptīdiem **30** un aminospirtiem **31a-g**. (a) EDC, HOBt, DIEA, DMF; (b) TBS aizsargātu savienojumu gadījumā, TBAF, THF; (c) DMP, NMP, (d) TFA:DCM (1:1) vai HCl/Et₂O.



3. shēma. Aminospirtu **31a-c** sintēze no epoksīdiem **32**. (a) NaN₃, Cu(NO₃)*3H₂O, H₂O; (b) O-aizsargāta aminoskābe vai N-aizsargāts aminoskābes amīds, vai R₃NH₂, EDC, HOBt, DIEA, DCM vai DMF; (c) bezūdens SnCl₂, TEA, MeOH. Kumil = α,α -dimetilbenzil-



4. shēma. Aminospirtu **31d-e** sintēze Anrī reakcijā. (a) etilglioksilāts, TEA, toluols; (b) Ra-Ni, H_2 , EtOH; (c) Cbz-Cl, 1 M NaHCO_3 ; (d) NaOH, dioksāns; (e) $\beta\text{-AlaOt-Bu}\cdot\text{HCl}$, EDC, HOBT, DIEA, DCM; (f) H_2 , Pd/C, EtOH. Ja $R_8 = \text{NH-kumil}$ vai NMe_2 , (g) TFA:DCM (1:1); (h) kumilamīns vai dimetilamīns, EDC, HOBT, DIEA, DCM.



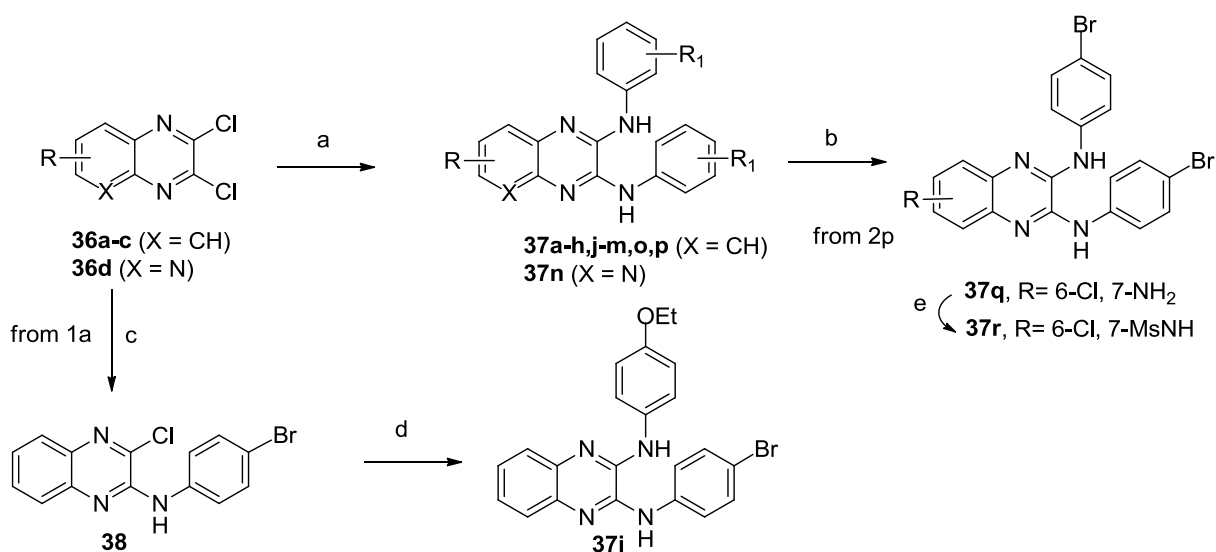
5. shēma. Aminospirtu **31f-g** sintēze, izmantojot aldehīdu **35** homologizēšanu ar MAC reaģentu vai izocianātu. (a) 2-(TBSO)malonnitrils, $\beta\text{-AlaOt-Bu}\cdot\text{HCl}$, 4-PP, Et_2O ; (b) *tert*-butil-3-izocianopropanoāts, TFA, piridīns, DCM; (c) H_2 , Pd/C, etanols.

Aminospirtu **31a-g** sintēzes metodes tika izvēlētas atkarībā no nepieciešamajiem aizvietotājiem. Aminospirtu **31a-c** gadījumā atslēgas stadija bija epoksīda cikla uzšķelšana ar azīdjonu (3. shēma). Savienojumi **31d-e** tika iegūti Anrī reakcijā no viegli pieejamiem nitrosavienojumiem **33**, **34** un etilglioksilāta (4. shēma). Aminoaldehīda **35** reakcijā ar MAC reaģentu un amīnu un tai sekojošā Cbz aizsarggrupas nošķelšanā tika iegūts *O*-TBS aizsargāts aminospirts **31f** (5. shēma). Aldehīda **35** un izocianopropionāta Passerini reakcijā un tai sekojošā aizsarggrupas nošķelšanā tika iegūts aminospirts **31g** (5. shēma).

2. Hinoksalīna atvasinājumi kā PfSUB1 inhibitori

Malaria Box bibliotēkas skrīnīgā uz PfSUB1 tika atrasts trāpījums **37a** ar zemu mikromolāru aktivitāti. Ar

mērķi uzlabot aktivitāti, kā arī noskaidrot struktūras – aktivitātes likumsakarības, 2,3-dihlorhinoksalīnu **36a-c** un aza-analoga **36d** reakcijā ar aizvietotiem anilīniem, tika iegūti vairāki 2,3-bis(fenilamino)hinoksalīni **37a-r** (6. shēma). Mērķa savienojumu iegūšanai tika izmantota modificēta literatūras metode, kurā izejvielas tiek karsētas DMSO. Tas ļāva ievērojami saīsināt reakcijas laiku kā arī vienkāršot produkta izdalīšanu. 6-Hlor-7-nitroaizvietotais hinoksalīns **37p** tika pārvērsts atbilstošajā aminoatvasinājumā **37q**, no kura, savukārt, tika iegūts mezilaminoatvasinājums **37r** (6. shēma). Asimetriski aizvietotais hinoksalīns **37i** tika iegūts divās stadijās. Vispirms dihlorhinolīna **36a** reakcijā ar 4-bromanilīnu pēc zināmas metodes tika iegūts starpsavienojums **38**, kuram reaģējot ar 4-etoksianilīnu, tika iegūts mērķsavienojums **37i**.

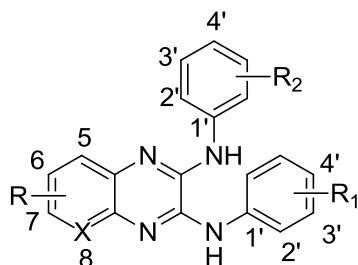


6. shēma. Reaģenti un apstākļi 2,3-bis(fenilamino)hinoksalīnu **37a-r** sintēzei: (a) aizvietots PhNH₂, DMSO, 130 °C; (b) kat. Pd/C, H₂, EtOH, ist.t; (c) 4-BrPhNH₂, AlCl₃, DCE, 80 °C; (d) 4-EtOPhNH₂, DMSO, 130 °C; (e) MeSO₂Cl, Py, DCM, ist.t.

Savienojumu **37a-r** inhibitorā aktivitāte tika noteikta enzimatiskajā PfSUB1 testā. Fenilaminogrupu 4. pozīcijas aizvietotāju variēšana parādīja, ka savienojumu aktivitātes nodrošināšanai šajās pozīcijās nepieciešamas lipofīlas grupas, vēlams, broms vai joda atomi (savienojumi **37a-d**). Savienojumi **37e-h**, kuriem šie aizvietotāji bija neliela izmēra, bija neaktīvi. Arī hinoksalīna atvasinājums **37i**, kurā viena fenilaminogrupa ir bromaizvietota, bet otra - etoksiaizvietota, bija neaktīvs, kas liecina par lielu lipofīlu aizvietotāju nepieciešamību abās molekulas pozīcijās. Savienojumu grupa **37j-m** tika izmantota, lai noskaidrotu fenilaminogrupu 3. pozīcijas aizvietotāja ietekmi. Analogs **37j** ar hlora atomu šajā pozīcijā un broms atomu 4. pozīcijā uzrādīja līdzīgu aktivitāti kā izejas savienojums **37a**. Arī fenoksiaizvietotais savienojums **37k** uzrādīja salīdzināmu aktivitāti, savukārt metil- un metoksianalogi **37l,m** bija neaktīvi. Tika veikti arī hinoksalīna gredzena modifikāciju pētījumi, izmantojot savienojumus **37n-r**. Hinoksalīna **37a** aza-analogs **37n** bija mazāk aktīvs. Hlora vai nitrogrupas ievadīšana hinoksalīna 6. un 7. pozīcijās pazemināja aktivitāti (savienojumi **37o,p**). Savukārt, nitrogrupu aizvietoja ar aminogrupu vai mezilaminogrupu

(savienojumi **37q,r**) aktivitāti atkal paaugstināja, kas norāda uz būtisku aizvietotāju elektronisko īpašību ietekmi.

6. tabula. Hinoksalīnu **37a-r** aizvietotāju ietekme uz to PfSUB1 inhibitoro aktivitāti.

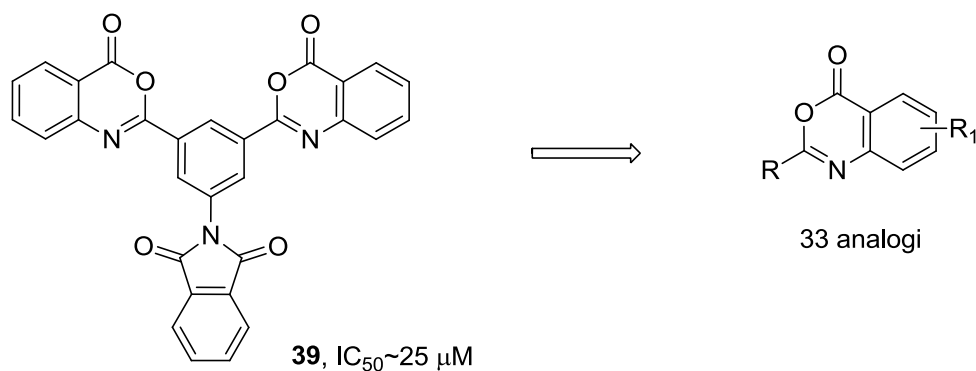


37a-m,o-r (X = CH); **470n** (X = N)

N.p.k.	Sav.nr.	R	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM)
1	37a	H	4'-Br	4'-Br	10 ± 2
2	37b	H	4' -I	4' -I	18 ± 2
3	37c	H	4' -(pyrrol-1-yl)	4' -(pyrrol-1-yl)	33 ± 4
4	37d	H	4' -(CO ₂ Me)	4' -(CO ₂ Me)	50 ± 3
5	37e	H	H	H	>50
6	37f	H	4' -F	4' -F	>50
7	37g	H	4' -Me	4' -Me	>50
8	37h	H	4' -Et	4' -Et	>50
9	37i	H	4' -Br	4' -OEt	>50
10	37j	H	3' -Cl-, 4' -Br	3' -Cl-, 4' -Br	14±1
11	37k	H	3' -OPh	3' -OPh	22 ± 4
12	37l	H	3' -Me	3' -Me	>50
13	37m	H	3',5' -diMeO	3',5' -diMeO	>50
14	37n	H	4' -Br	4' -Br	36 ± 4
15	37o	6-NO ₂	4' -Br	4' -Br	30 ± 2
16	37p	6-Cl-,7-NO ₂	4' -Br	4' -Br	40 ± 6
17	470q	6-Cl, 7-NH ₂	4' -Br	4' -Br	17 ± 1
18	470r	6-Cl, 7-MsNH	4' -Br	4' -Br	11 ± 2

2. Benzoksazinona atvasinājumi kā PfSUB1 inhibitori

Savienojumu bibliotēku virtuālā skrīninga rezultātā ir atrasts benzoksazinona klases savienojums: 5186907, kuram piemīt PfSUB1 inhibitorā aktivitāte. Ar mērķi izveidot benzoksazinona atvasinājumus kā PfSUB1 inhibitorus, tika sintezēta šī savienojuma analoģu sērija, un noteikta to enzimatiskā aktivitāte. 2-Aril, 2-NH-aril un 2-NH₂ benzoksazinoni tika iegūti, antranilskābei reaģējot, ar benzoilhlorīdu, izocianātu vai fenilhlorformiātu, un bromciānu, attiecīgi,



3. att. Savienojuma 5186907 struktūra

Neviens no iegūtajiem savienojumiem neuzrādīja PfSUB1 inhibēšanas spēju. Lai atrastu PfSUB1 inhibitoru šajā savienojumu klasē, nepieciešami tālāki pētījumi.

SECINĀJUMI

1. PfSUB1 inhibitora meklējumiem izmantotas trīs paralēlas pieejas:
 - (a) *Malaria Box* skrīninga trāpījuma MPT109 struktūras attīstīšana;
 - (b) virtuālā skrīningā skrīninga trāpījuma 5186907 struktūras attīstīšana;
 - (c) no peptīdiem atvasinātu α -ketoamīdu sintēze, balstoties uz PfSUB1 substrātu specifiskumu.
2. α -Ketoamīda fragmenta iekļaušana malārijas proteāzes PfSUB1 peptīda atpazīšanas sekvencē (KITAQ/DDEES) ir rezultatīva pieeja atgriezenisku kovalentu PfSUB1 inhibitoru izveidei.

3. No peptīdiem atvasinātu ketoamīdu inhibitoro aktivitāti nosaka serīnu saistošais fragments (ketoamīda funkcija), kā arī peptīda daļas saistība ar enzīmu tā substrāta saistīšanas vietas „prim” un „ne-prim” daļās.

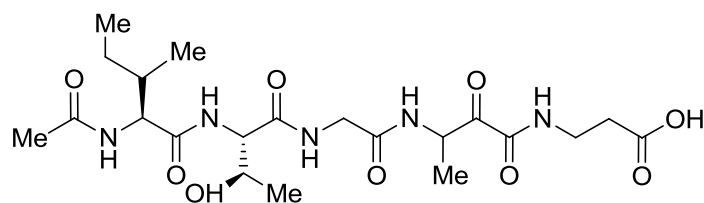
4. No peptīdiem atvasinātu ketoamīdu mijiedarbībai ar enzīmu „ne-prim” daļā nozīmīgākās ir P₁-P₄ aminoskābes. Aminoskābe P₅ pozīcijā nenoīmīgi ietekmē inhibitoro aktivitāti.

5. „Prim” daļā, negatīvi lādētas karbonskābes fragmenta ievadīšana paaugstina savienojuma aktivitāti, domājams, pateicoties mijiedarbībai ar Lys₄₆₅ enzīma S₁' kabatā. Optimālais savienotājposms ar galējo karboksilgrupu ir strukturāli tuvs asparagīnskābes fragmentam, kas atrodas enzīma substrāta P₁' pozīcijā.

6. Struktūras - aktivitātes likumsakarību pētījumos noskaidrots, ka P₁ pozīcijā vēlami aizvietotāji, kas nav lielāki par etilgrupu. P₂ pozīcijā glicīns nodrošina augstāku aktivitāti, nekā alanīns. Treonīns P₃ pozīcijā padara savienojuma saistību enerģētiski izdevīgāku, pateicoties hidrofilai sānu ķēdei, kas vērsta uz šķīdinātāju, savukārt izoleicīns P₄ pozīcijā nodrošina hidrofobo mijiedarbību, kas svarīga savienojuma inhibitorajai aktivitātei.

7. Glutamīna sānu ķēde, kas atrodama optimālā enzīma substrāta P₁ pozīcijā, nav savietojama ar elektrofilo ketoamīda funkciju cikliskā tautomēra veidošanās dēļ. Tā rezultātā nav iespējama šīs sānu ķēdes iekļaušana ketoamīdu tipa inhibitoru struktūrā, un tas norāda uz nepieciešamību izveidot konformacionāli ierobežotus savienojuma analogus.

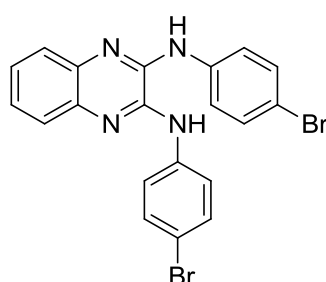
8. No pārbaudītā peptīdu α -ketoamīdu analogu klāsta visaktīvākais inhibitors ir savienojums **16** (IC₅₀=0.9 $\pm$ 0.2 μ M), kas ir viens no labākajiem pašreiz zināmajiem PfSUB1 inhibitoriem. Šis savienojums ir izmantojams tālākos pētījumos par PfSUB1 kā potenciālu pretmalārijas bioloģisko mērķi, kā arī to var izmantot kā lidersavienojumu pretmalārijas zāļu vielu meklējumos.



16, (IC₅₀ = 0.9 $\pm$ 0.2 μ M)

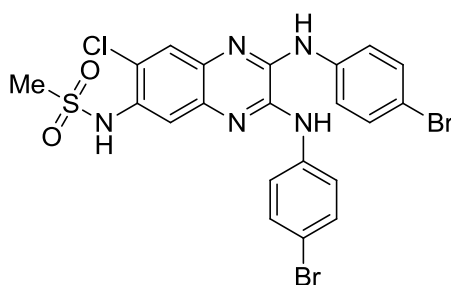
9. Balstoties uz virtuālā PfSUB1 inhibitoru skrīningā atrasta trāpījuma **39** (5186907) struktūru, izveidota neliela strukturāli daudzveidīgu benzoksazinonu bibliotēka (33 savienojumi), taču neviens no šiem savienojumiem neuzrādīja PfSUB1 inhibitoro aktivitāti.

10. *Malaria Box* savienojumu bibliotēkas skrīningā identificēta jauna PfSUB1 inhibitoru klase - 1,3-bis(fenilamino)hinoksalīni. Aktīvais savienojums **37a** uzrādīja aktivitāti mikromolāru koncentrāciju līmenī. Tas liecina, ka PfSUB1, iespējams, nav šī savienojuma iedarbības primārais mērķis, taču tas var kalpot kā daudzsološs sākumpunkts mazmolekulāru PfSUB1 inhibitoru izstrādei, ņemot vērā šī savienojuma spēju penetrēt caur parazīta šūnu membrānām.



37a, $IC_{50} = 10 \pm 2 \mu M$

11. Sākotnējās aktīvās struktūras optimizācija noveda pie savienojuma **37r**, kura aktivitāte ir tuva savienojuma **37a** aktivitātei, taču sasniegt augstāku aktivitāti neizdevās. Tomēr pētījumu rezultātā noskaidrotās struktūras - aktivitātes likumsakarības dod iespēju izveidot *in silico* modeli hinoksalīna analogu saistībai ar enzīmu PfSUB1, kas veicinātu uzlabotu mazmolekulāru PfSUB1 inhibitoru izstrādi.



37r, $IC_{50} = 11 \pm 2 \mu M$

SUMMARY OF THE THESIS

Introduction

Malaria is a devastating disease caused by *plasmodium* parasite carried by mosquitoes. Approximately 40% of the world's population lives in the area at the risk of malaria and it is one of the main causes of morbidity and mortality in many developing countries (Central-south America, many parts of Asia, and Africa)¹. Malaria is recognized as one of the reasons of poverty in developing countries and infection caused by malaria reduced their economic growth by 1.3% per year.² Currently, number of synthetic and semisynthetic drugs from Quinoline, Antifolate, Artemisinin groups as well as number of antibiotics and Atovaquone are used in clinics for the treatment of malaria.² However, startling spread of drug-resistant malaria to practically all currently available drugs have been observed. Resistance in regions threatened by malaria continues to spread, indicating current therapeutic agents will be practically ineffective in the near future.³ This has reinforced the search for new drugs with a novel mode of action and PfSUB1 inhibition could be targeted to overcome the resistance with established chemotherapies.

Plasmodium falciparum subtilisin-like serine protease 1 (PfSUB1) belongs to the subtilisin-like family of serine proteases that leads to rupture of the vacuole and host cell membrane, causing merozoites egress. Therefore PfSUB1 appears to play a critical role in the life cycle of the parasite and hence an attractive target for the development of novel antimalarial drugs.⁴⁻⁶

However, the development of small molecule inhibitors for PfSUB1 has turned out to be a difficult task. Screening of a collection of >170,000 low molecular weight compounds resulted in the identification of a structurally complex natural product MRT 12113, quinolyhydrazone derivative, chloroisocoumarin derivative JCP104, difluorostatone based micromolar level PfSUB1 inhibitors.⁶⁻⁹ At the time we started the search for PfSUB1 inhibitors only compounds MRT 12113 and JCP104 were reported in literature.

¹WHO | Factsheet on the World Malaria Report 2013

http://www.who.int/malaria/media/world_malaria_report_2013/en/ (accessed Apr 2, 2014).

²Wells, T. N. C.; Alonso, P. L.; Gutteridge, W. E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 879–891.

³Avery, M. A.; Choi, S.-R.; Mukherjee, P. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 161–171.

⁴Withers-Martinez, C.; Suarez, C.; Fulle, S.; Kher, S.; Penzo, M.; Ebejer, J.-P.; Koussis, K.; Hackett, F.; Jirgensons, A.; Finn, P.; Blackman, M. J. *Int. J. Parasitol.* **2012**, *42*, 597–612.

⁵Jones S. *Nature Rev. Microbiology*, 2008, *6*, 94-95

⁶Yeoh, S.; O'Donnell, R. A.; Koussis, K.; Dluzewski, A. R.; Ansell, K. H.; Osborne, S. A.; Hackett, F.; Withers-Martinez, C.; Mitchell, G. H.; Bannister, L. H.; Bryans, J. S.; Kettleborough, C. A.; Blackman, M. J. *Cell* **2007**, *131*, 1072–1083.

⁷Gemma, S.; Giovani, S.; Brindisi, M.; Tripaldi, P.; Brogi, S.; Savini, L.; Fiorini, I.; Novellino, E.; Butini, S.; Campiani, G.; Penzo, M.; Blackman M. J. *Bioorg. med. chem. lett.* **2012**, *22*, 5317-5321

⁸Arastu-Kapur S.; Ponder E. L.; Fonović U. P.; Yeoh S.; Yuan F.; Fonović M.; Grainger M.; Phillips C.; Powers J.; C.; Bogyo M.; *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 203 - 213.

⁹Giovani S.; Penzo M.; Brogi S.; Brindisi M.; Gemma S.; Novellino E.; Savini L.; Blackman M. J.; Campiani G.; Butini S.; *Bioorg. med. chem. lett.* **2014**, *24*, 3582-3586.

Aims and Objectives

Aims of the thesis are

- a) discovery of novel malarial protease PfSUB1 inhibitors;
- b) structural optimisation to improve inhibitory activity;
- c) SAR study to refine virtual docking methods.

Inhibitor discovery was based on three different strategies:

- 1) rational design based on PfSUB1 substrate sequence by incorporating ketoamide as a covalent trap instead of scissile bond of peptide;
- 2) screening of virtual library against PfSUB1 and synthetic development of screening hits;
- 3) screening of *Malaria Box* library against PfSUB1 and synthetic development of hits.

Scientific Novelty

Emphasis was directed to develop potent and selective PfSUB1 inhibitors as potential anti-malarial agents with a novel mechanism of action due to a cause of growing drug-resistance malaria, much undeveloped research field, limited and low active known SUB1 inhibitors. Peptidic α -ketoamides were developed as PfSUB1 inhibitors; it is binding to the protease by forming a reversible covalent bond between the keto group of the inhibitor and the serine of the catalytic triad. Accordingly a Series of 28 peptidic α -ketoamides designed on a basis of molecular dynamics (MD) simulations were synthesized and their PfSUB1 inhibition was determined. Our investigations on all three approaches corroborate that it is a break through to move this field towards the development of novel antimalarial drugs.

Structure of the thesis

The thesis is presented as a set of thematically unified research on peptidic α -ketoamides, quinoxaline derivatives, and benzoxazinone derivatives as potential malarial protease PfSUB1 inhibitors. The thesis consists the following parts: Introduction, literature review, results and discussions, peptidic α -ketoamide as PfSUB1 inhibitors, design and proof of concept, structure activity relationship of peptidic α -ketoamides, developement of benzoxazinone based PfSUB1 virtual screening hit, developement of quinoxaline based PfSUB1 inhibitors from malaria box, experimental section and conclusions. It also includes anex containing scientific publications (published/accepted for publication). The thesis and publications are written in English and constitute a total 253 pages.

Publication and approbation of the thesis

Results of the thesis are discussed in 4 publications

1. Withers M. C.; Suarez C.; Fulle S.; **Kher S. S.**; Penzo M.; Ebejer J. P.; Koussis K.; Hackett F.; Jirgensons A.; Finn P.; Blackman M. J. Plasmodium subtilisin-like protease 1 (SUB1): Insights into the active-site structure, specificity and function of a pan-malaria drug target, *International Journal for Parasitology*, **2012**, 42, 597–612 (article belongs to special issue of Molecular Approaches to Malaria 2012)
2. **Kher S. S.**; Fulle S.; Penzo M.; Finn P.; Blackman M. J.; Jirgensons A. Substrate Derived Peptidic α -Ketoamides as Malarial Protease PfSUB1 Inhibitors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2014**, In Press, Corrected proof. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.07.086
3. **Kher S. S.**; Jirgensons A. Synthesis of β -amino- α -ketoamides, review article, *Current Organic Chemistry*, **2014**, 19, DOI: 10.2174/1385272819666140818223225
4. **Kher S. S.**; Fulle S.; Penzo M.; Ebejer J. P.; Finn P.; Blackman M. J.; Jirgensons A. Quinoxaline based inhibitors of malarial protease PfSUB1, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **2014**, accepted for publication.

Results of the thesis are presented at following conferences

1. **Kher S. S.**; Fulle S.; Penzo M.; Martinez C. W.; Ebejer J. P.; Blackman M. J.; Finn P.; Jirgensons A. Structure - activity relationships of peptidic α -ketoamide based PfSUB1 inhibitors, Antimicrobial Drug Conference, June 10-12, **2013**: Madrid, Spain
2. Ebejer J. P.; Fulle S.; **Kher S. S.**; Penzo M.; Blackman M. J.; Jirgensons A.; Finn P. A Ligand-Based Virtual Screening Study to find novel PfSUB1 inhibitors, Antimicrobial Drug Conference, June 10-12, **2013**: Madrid, Spain
3. **Kher S. S.**; Jaudzems K.; Jirgensons A. Peptidic α -ketoamides with glutamine P₁ side chain, Heterocycles in Bio-organic chemistry, May 27-30, **2013**: Riga, Latvia
4. **Kher S. S.**; Fulle S.; Penzo M.; Martinez C. W.; Ebejer J. P.; Blackman M. J.; Finn P.; Jirgensons A. Peptidic α -ketoamide based PfSUB1 inhibitors, EFMC-ISMIC 2012 - 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry, Sept. 2-6, **2012**: Berlin, Germany

5. Penzo M.; **Kher S. S.**; Fulle S.; Martinez C. W.; Ebejer J. P.; Jirgensons A.; Finn P.; Blackman M. J. Design of new inhibitors of an essential malarial protease, 8th Annual Biomalpar Conference, 14-16 May, **2012**: Heidelberg, Germany
6. Fulle S.; Ebejer J. P.; **Kher S. S.**; Penzo M.; Martinez C. W.; Jirgensons A.; Blackman M. J.; Finn P. Substrate driven design of inhibitors of the malarial protease PfSUB1, 19th EuroQSAR Knowledge enabled Ligand Design, Aug. 26-30, **2012**: Viena, Austria
7. Penzo M.; **Kher S. S.**; Fulle S.; Martinez C. W.; Ebejer J. P.; Finn P.; Jirgensons A.; Blackman M. J. Substrate-based design of inhibitors of an essential malarial protease, 23rd Annual Molecular Parasitology Meeting, Sept. 23-27, **2012**: Woods Hole, MA, United States
8. **Kher S. S.**; Jirgensons A. Design and synthesis of peptidic α -ketoamide based PfSUB1 inhibitors, Paul Walden 7th symposium in organic chemistry, Sept. 12-13, **2011**: Riga, Latvia

MAIN RESULTS OF THE THESIS

1. Peptidic α -ketoamides as PfSUB1 inhibitors

PfSUB1 is serine protease which uses the catalytic triad comprising of Ser₆₀₆, His₄₂₈ and Asp₃₇₂ to cleave the substrate. The best substrate sequence for PfSUB1, KITAQ/DDEES was determined in substrate specificity studies by previous studies of Blackman's group. We designed the potential PfSUB1 inhibitors based on KITAQ/DDEES substrate sequence by incorporating ketoamide instead of the scissile bond. Ketoamide was selected as a covalent warhead because the inhibitor can be derived on both prime and non-prime sites of SUB1 substrate binding cleft.

1.1. Proof of Concept

To obtain the proof of the concept we initially prepared peptidic α -ketoamide **1** and its hydroxy analogue **2**. Peptidic α -ketoamide **1** inhibited PfSUB1 with an inhibitory potency ($IC_{50} = 8 \mu M$). Compound **2**, in which the ketoamide group was replaced by an amino alcohol group, showed no inhibitory activity against PfSUB1 at concentrations up to $100 \mu M$.

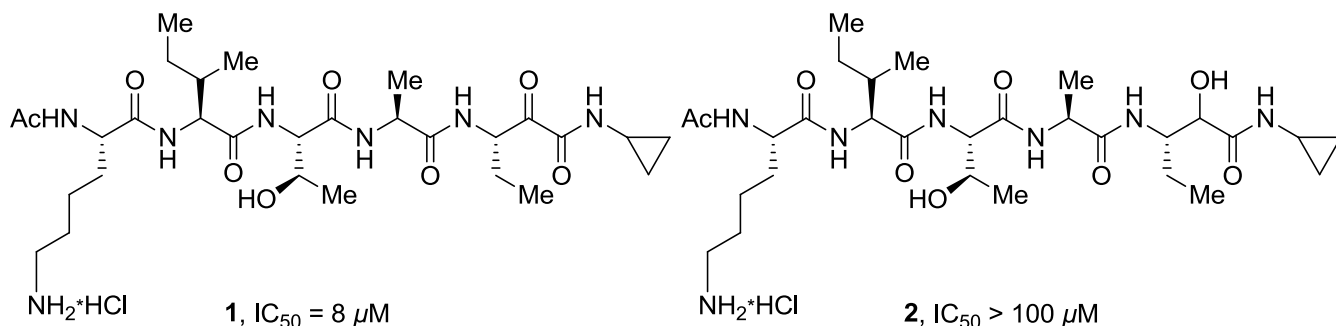


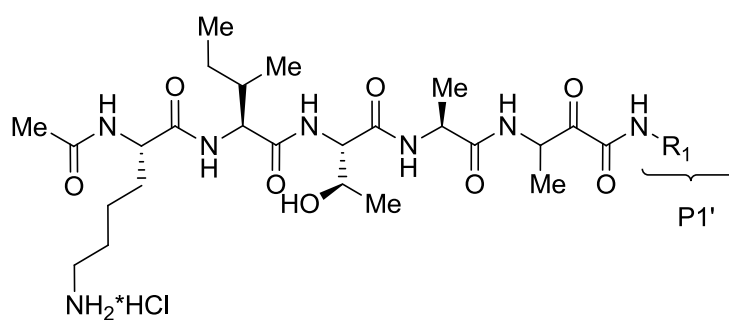
Figure 1. Structure and PfSUB1 inhibitory activity for peptidic α -ketoamides **1** and its hydroxy analogue **2**

1.2 Structure - activity relationships of peptidic α -ketoamides

After the proof of concept was obtained, we performed broader SAR investigations to obtain more active peptidic α -ketoamides as PfSUB1 inhibitors.

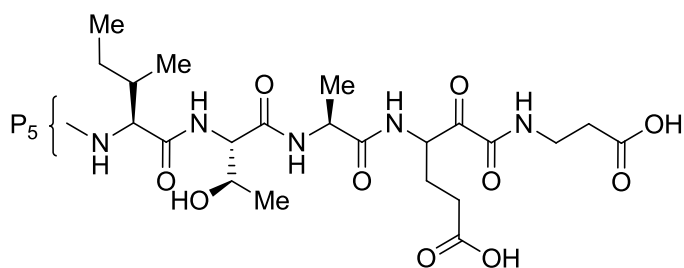
The studies of prime-side substituents demonstrated that, the optimal linker to the terminal carboxyl group resembles an aspartic acid residue (Table 1, compounds **3-5**, **7-8**). Introduction of a shorter or longer chain resulted in decreased activity. The requirement for a carboxylic group at the prime side terminus was confirmed by amide analogue **6**, **9** that showed a considerable decrease in inhibitory activity.

Table 1. Modifications of P₁' substituent.



Comp.	R ₁ (P ₁ ')	IC ₅₀
3		1.0
4		3.1
5		10
6		38
7		7.0
8		11
9	H	100

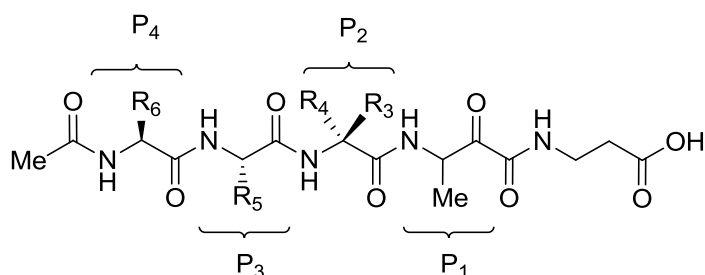
Table 2. Modifications of P₅ substituent.



Comp.	P ₅	IC ₅₀ (μ M)
10	Ac-Lys*HCl	4.0
11	Ac-Ala	9.0
12	Ac	5.0 $\pm$ 0.1

The SAR of prime side components in PfSUB1 inhibitors was investigated guided by results obtained from molecular dynamics (MD) simulations of PfSUB1 bound to different substrates and the binding mode of compound **3** obtained by docking calculations. These studies indicated that P₅ substituent might not provide an important contribution to the binding free energy. Additional evidence of inconsequential role for P₅ substituent was obtained from the series of peptidic α -ketoamides with α -Glu side chain in P₁ position (Table 2, compounds **10-12**). It was observed that acetyl or acetyl alanine instead of acetyl lysine residues in P₅ position does not affect the PfSUB1 inhibitory activity considerably.

Table 3. Importance of P₂-P₄ amino acids in peptidic α -ketoamide PfSUB1 inhibitors.

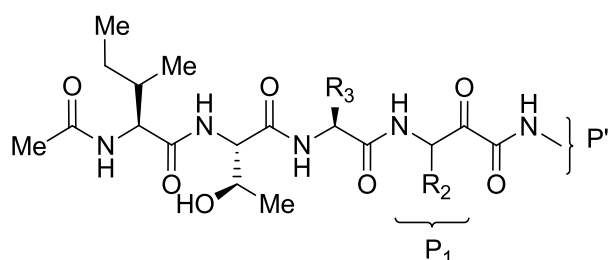


Cmpd.	R ₃ , R ₄ (P ₂)	R ₅ (P ₃)	R ₆ (P ₄)	IC ₅₀ (μ M)
13	Me, H			2.5 $\pm$ 0.1
14	Me, Me			>50
15	CH ₂ CH ₂			>50
16	H, H			0.9 $\pm$ 0.2
17	Me, H	Me		30 $\pm$ 1
18	H, H		Me	>50

SAR around P₂₋₄ positions was further investigated. Based on modeling of substrate binding and molecular docking of **3** (Table 1), the P₂ position appears restricted to small amino acids such as alanine or glycine. Other small acids such as α -Me-alanine and 1-aminocyclopropylcarboxylic acid were incorporated instead of alanine, but this resulted in inactive compounds (Table 3, compounds **14**

and **15**). In contrast, incorporation of glycine instead of alanine in P₂ position was beneficial leading to compound **16** with slightly increased inhibitory activity compared to analogue **13** (Table 3). The importance of the P₃ and P₄ residues was investigated by substitution with alanine (Table 3, compounds **17** and **18**). According to substrate binding and inhibitor **3** docking studies, the side chain of P₃ points away from the binding site towards the solvent. The decreased inhibitory activity of **17** can be explained by an increased solvation penalty resulting from replacing the polar threonine side chain with a methyl group. On the other hand, the isoleucine in P₄ is well accommodated by the hydrophobic S₄ pocket. Changing its side chain to methyl group likely results in loss of favourable Van der Waals interactions, explaining the low potency of compound **18**.

Table 4. Investigation of P₁ side chains.



Cmpd.	R ₂ (P ₁)	R ₃ (P ₂)	P'	IC ₅₀ (μM)
19	Bn	Me		100
20	<i>n</i> -Pr			20 ± 3
21	Ph			>50
12				5.0 ± 0.1
22				>50
23				>50
24	Me			>50
25	Et	H		1.2 ± 0.1
26	-CH ₂ OH			4.0 ± 0.1
27	<i>n</i> -Pr			4.5 ± 0.1
16	Me			0.9 ± 0.1

A limited series of pentapeptidic α -ketoamide analogues **19-27** were prepared to explore the importance of the P₁ side chain (Table 4). These studies showed that the S₁ sub pocket can

accommodate only small substituents. Only the ethyl group in the P₁ position in compound **25** produced a similar level of inhibitory activity as the methyl analogue **16**. Compound **22** bearing an *N,N'*-disubstituted glutamine side chain and compound **23** with its glutamine side chain constrained in the lactam cycle were prepared as analogues restricted to form a cyclic tautomers; however these were inactive as PfSUB1 inhibitors.

1.3 Glutamine side chain in the P₁ position

Compound **28** (Figure 2) which bears glutamine side chain in P₁ position as in preferred KITAQ/DDEES substrate sequence was prepared. However, it was found out that the glutamine side chain is incompatible with the electrophilic keto group. Characteristic α -proton signal of α -ketomide was shifted up-field after protecting groups in a precursor were cleaved indicating the disappearance of adjacent carbonyl group.

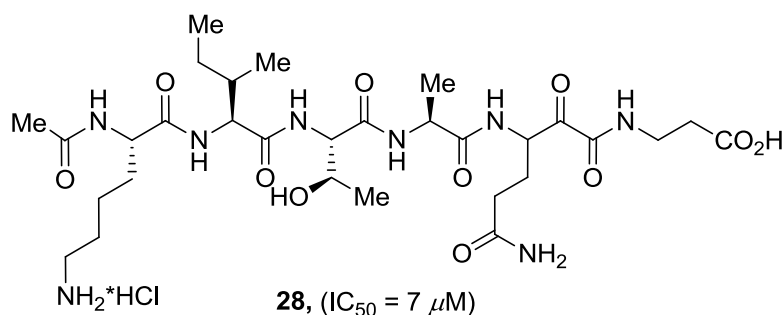
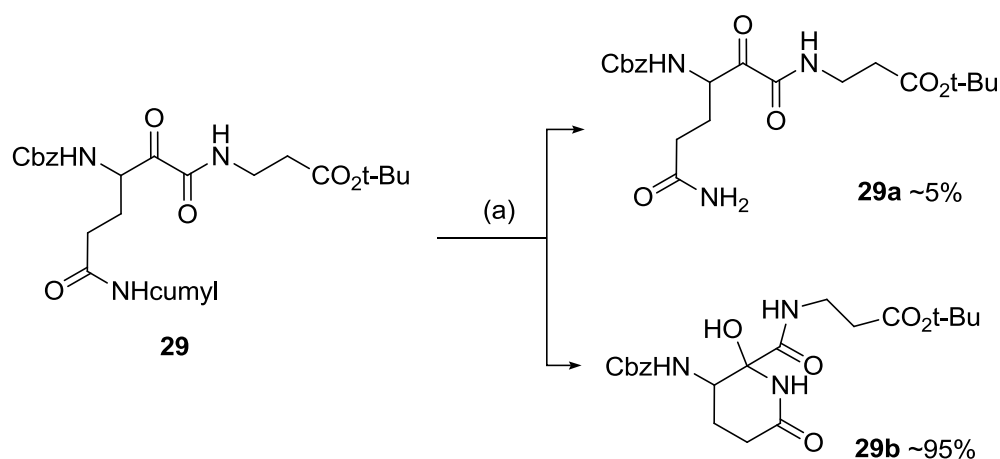


Figure 2. α -Ketomide **28** bearing glutamine P₁ side chain as an analogue of KITAQ substrate prime side sequence.

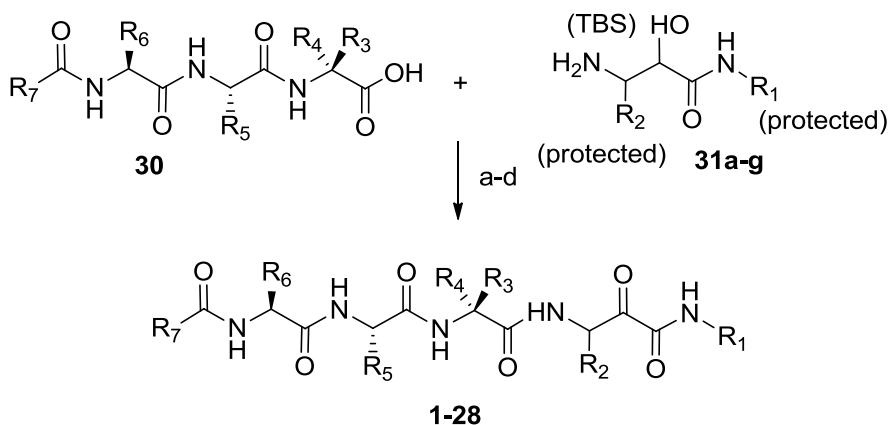


Scheme 1. Synthesis of model α -ketoamide **29** with a deprotected glutamine side chain. (a) TFA:DCM

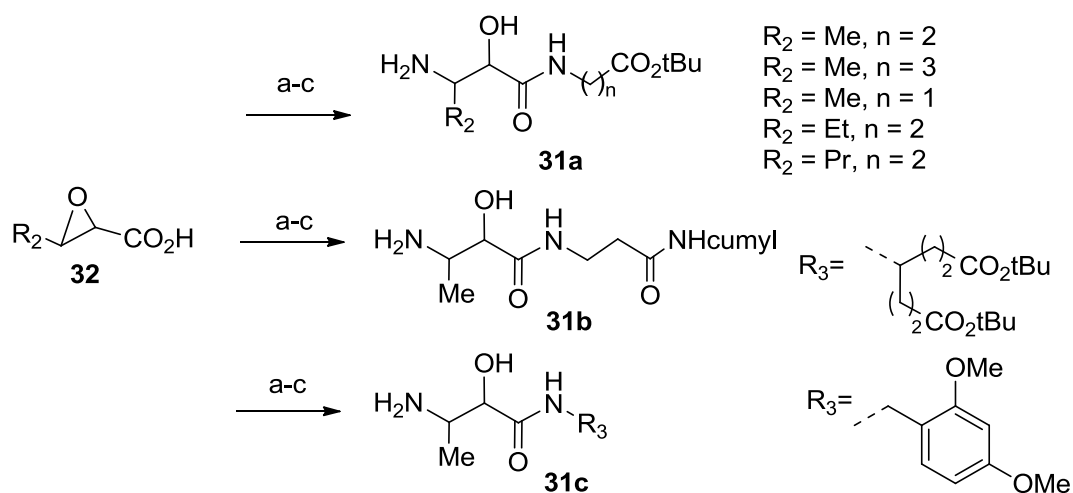
The structurally simplified model compound **29** was prepared. Compound **29a,b** were investigated by 2D NMR using TOCSY and HMBC methods which revealed that the equilibrium is shifted to a cyclic tautomer of **29b** and only ~5% of **29a** was present in the solution. The formation of cyclic tautomer is expected also in the case of compound **28** which may explain its unexpectedly low enzyme inhibitory activity.

1.4 Synthesis of peptidic α -ketoamides

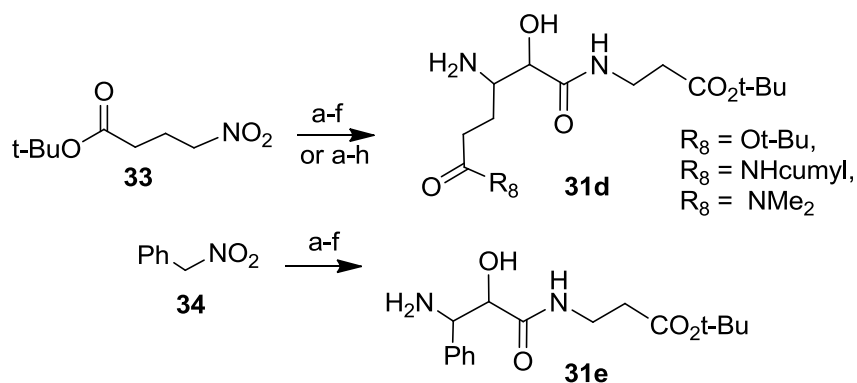
The synthesis of peptidic α -ketoamides involved peptides **30** and amino alcohols **31a-g** as principal building blocks (Scheme 2). Peptides **30** were prepared by using solution phase peptide synthesis. Amino alcohols **31a-g** were prepared by using different methods depending on substitution pattern. Azidolysis of epoxide **32** was used as a key step to prepare amino alcohols **31a-c** (Scheme 3). The Henry reaction of readily accessible nitro compounds **33** and **34** with ethyl glyoxylate was used to make amino alcohols **31d-e** (Scheme 4). The reaction of amino aldehydes **35** with the MAC reagent and amine followed by deprotection of Cbz gave O-TBS protected amino alcohols **31f** (Scheme 5). The Passerini reaction of aldehyde **35** with isocyanopropionate followed by deprotection provided amino alcohol **31g** (Scheme 5).



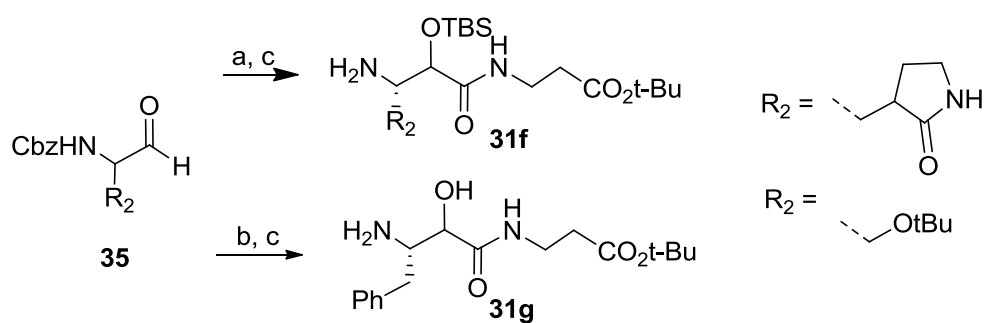
Scheme 2. Synthesis of peptidic α -ketoamides **1-28** from peptides **30** and amino alcohols **31a-g**. (a) EDC, HOBt, DIEA, DMF; (b) if TBS protected, TBAF, THF; (c) DMP, NMP, (d) TFA:DCM (1:1) or HCl in Et₂O.



Scheme 3. Synthesis of amino alcohols **31a-c** using epoxide **32** azidolysis. (a) NaN_3 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, H_2O ; (b) *O*-protected amino acid or *N*-protected amide of amino acid or R_3NH_2 , EDC, HOBT, DIEA, DCM or DMF; (c) anhydrous SnCl_2 , TEA, MeOH. Cumyl = α, α -dimethylbenzyl.



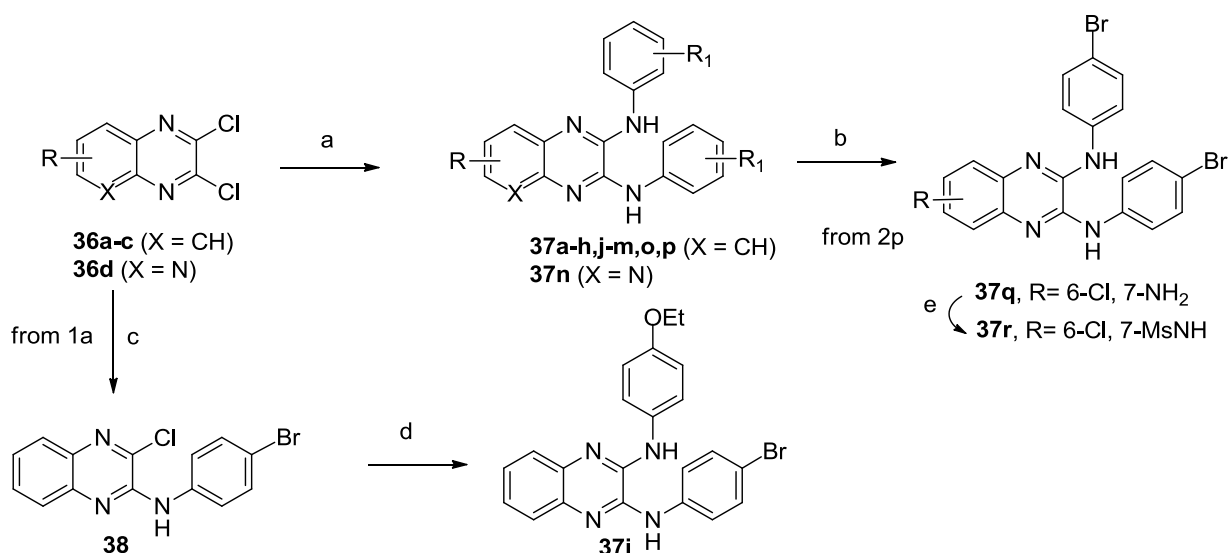
Scheme 4. Synthesis of amino alcohols **31d-e** using Henry reaction. (a) ethyl glyoxalate, TEA toluene; (b) Ra-Ni , H_2 , EtOH; (c) Cbz-Cl , 1 M NaHCO_3 ; (d) NaOH , dioxane; (e) $\beta\text{-AlaOt-Bu-HCl}$, EDC, HOBT, DIEA, DCM; (f) H_2 , Pd/C, EtOH. For $R_8 = \text{NHcumyl}$ or NMe_2 , (g) TFA:DCM (1:1); (h) cumylamine or dimethylamine, EDC, HOBT, DIEA, DCM.



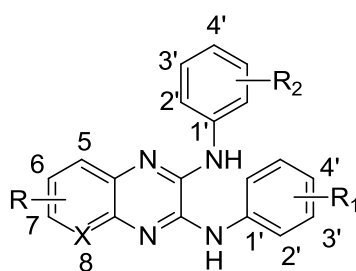
Scheme 5. Synthesis of amino alcohols **31f-g** using homologation of aldehydes **35** with MAC reagent or isocyanate. (a) 2-(TBSO)malononitrile, β -AlaOt-Bu-HCl, 4-PP, Et₂O; (b) *tert*-butyl-3-isocyanopropionate, TFA, pyridine, DCM; (c) H₂, Pd/C, ethanol.

2. Quinoxaline derivatives as PfSUB1 inhibitors

A series of 2,3-bis(phenylamino)quinoxalines **37a-r** was prepared by reaction of 2,3-dichloroquinoxalines **36a-c** and aza-analogue **36d** with substituted anilines. (Scheme 6). Modified literature procedure was applied by heating the components in DMSO that considerably shortened the reaction time and also simplified the work-up. 6-Chloro-7-nitro-substituted quinoxaline **37p** was transformed to amino derivative **37q** which was further converted to mesylamino derivative **37r** (Scheme 6). Non-symmetrically substituted quinoxaline derivative **37i**, was prepared by reacting dichloroquinoline **36a** with 4-bromoaniline according to the known procedure. The resulting intermediate **38** was subjected to the reaction with 4-ethoxyaniline to give the target compound **37i**.



Scheme 6. Reagents and Conditions for Synthesis of 2,3-bis(phenylamino)quinoxalines **37a-r**: (a) subst. PhNH₂, DMSO, 130 °C; (b) cat. Pd/C, H₂, EtOH, rt; (c) 4-BrPhNH₂, AlCl₃, DCE, 80 °C; (d) 4-EtOPhNH₂, DMSO, 130 °C; (e) MeSO₂Cl, Py, DCM, rt.

Table 6. Substitution pattern and PfSUB1 inhibitory activity of quinoxalines **37a-r**.**37a-m, o-r** (X = CH); **470n** (X = N)

No.	Comp.	R	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μ M)
1	37a	H	4'-Br	4'-Br	10 $\pm$ 2
2	37b	H	4' -I	4' -I	18 $\pm$ 2
3	37c	H	4' -(pyrrol-1-yl)	4' -(pyrrol-1-yl)	33 $\pm$ 4
4	37d	H	4' -(CO ₂ Me)	4' -(CO ₂ Me)	50 $\pm$ 3
5	37e	H	H	H	>50
6	37f	H	4' -F	4' -F	>50
7	37g	H	4' -Me	4' -Me	>50
8	37h	H	4' -Et	4' -Et	>50
9	37i	H	4' -Br	4' -OEt	>50
10	37j	H	3' -Cl-, 4' -Br	3' -Cl-, 4' -Br	14 $\pm$ 1
11	37k	H	3' -OPh	3' -OPh	22 $\pm$ 4
12	37l	H	3' -Me	3' -Me	>50
13	37m	H	3',5' -diMeO	3',5' -diMeO	>50
14	37n	H	4' -Br	4' -Br	36 $\pm$ 4
15	37o	6-NO ₂	4' -Br	4' -Br	30 $\pm$ 2
16	37p	6-Cl-, 7-NO ₂	4' -Br	4' -Br	40 $\pm$ 6
17	37q	6-Cl, 7-NH ₂	4' -Br	4' -Br	17 $\pm$ 1
18	37r	6-Cl, 7-MsNH	4' -Br	4' -Br	11 $\pm$ 2

Inhibitory activity for the compounds **37a-r** was tested in enzymatic PfSUB1 assay. Variations of substituents at the 4th position of phenylamino group revealed that lipophilic groups, preferentially bromine

and iodine, are required for activity (compounds **37a-d**). Compounds **37e-h** bearing small substituents in the 4th position were inactive. Quinoxaline derivative **37i** with bromine at one phenylamino group and ethoxy substituent in another phenylamino group was also inactive implying the importance of bulky lipophilic substituents at both sides. Impact of substituents at the 3rd position of phenylamino groups was explored with limited set of compounds **37j-m**. An analogue **37j** with chlorine in 3rd position and bromine in 4th position showed similar activity to the original hit **37a**. Compound **37k** containing phenoxy substituents showed some activity while methyl and methoxy analogues **37l,m** were inactive. Quinoxaline ring modifications were also briefly explored with compounds **37n-r**. Aza-analogue **37n** of quinoxaline **37a** was less active. Introduction of chlorine and nitro groups in 6th and 7th position of quinoxaline ring decreased activity (compounds **37o,p**). Replacement of the nitro group with the amino group or mesylamino group (compounds **37q,r**) restored the activity indicating the importance of electronic factors of substituents.

3. Benzoxazinone derivatives as PfSUB1 inhibitors

Virtual screening of compound libraries has resulted in benzoxazinone class hit: 5186907 with micromolar PfSUB1 activity. With an aim to develop benzoaxazinones as PfSUB1 inhibitors, a series of analogues was synthesized and tested for PfSUB1 enzymatic activity. 2-Aryl, 2-NH-aryl, 2-NH₂ benzoxazinones were prepared using reaction of anthranilic acid with benzoyl chloride, isocyanate or phenyl chloroformate, and with bromocyan, respectively.

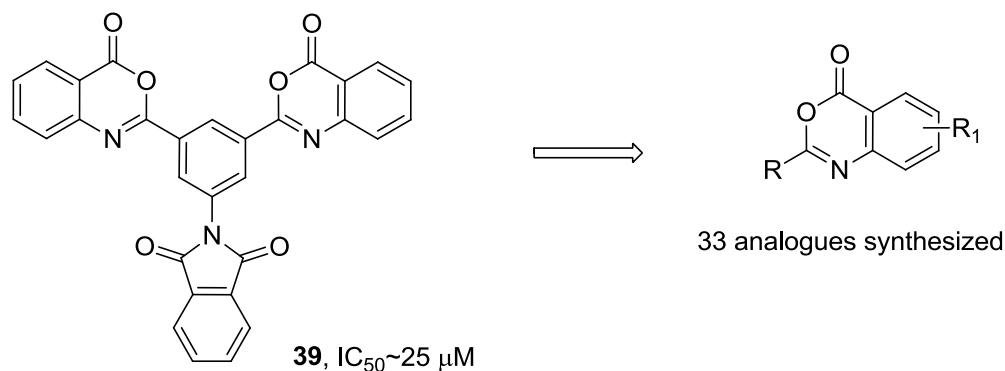
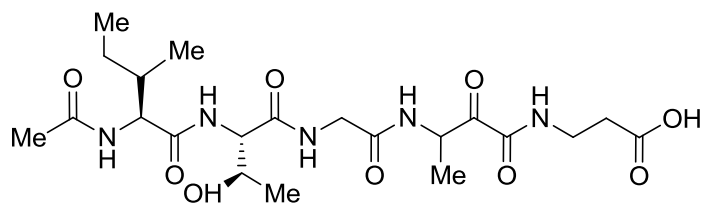


Figure 3. Structure of 5186907

None of the compounds displayed detectable PfSUB1 inhibition. Additional investigation and larger library of compounds are needed to find inhibitor for this type of compounds.

CONCLUSIONS

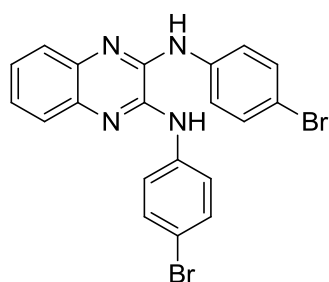
1. Three parallel approaches used to discover PfSUB1 inhibitor were:
 - (a) Development of *malaria box* hit compound MPT109
 - (b) Development of virtual screened hit compound 5186907
 - (c) Synthesis of substrate specificity of PfSUB1 based peptidic α -ketoamides
2. Incorporation of α -ketoamide into the peptide sequence (KITAQ/DDEES) recognized by malarial protease PfSUB1 is a successful approach to develop reversible covalent PfSUB1 inhibitors.
3. The inhibitory activity of peptidic ketoamides is determined by the serine trap (ketoamide) and enzyme binding interactions provided by peptide part at both prime and non-prime sides in active site of the enzyme.
4. The most important interactions of peptidic ketoamides at non-prime side of the enzyme are provided by P₁-P₄ amino acids. Aminoacid in P₅ position has little impact on inhibitory activity.
5. At the prime side, an installation of negatively charged carboxylic acid was found to improve the activity, likely via interaction with Lys₄₆₅ in the S₁' sub-pocket of enzyme. The optimal linker to the terminal carboxyl group resembles an aspartic acid residue that is also in P₁' position of preferred enzyme substrate.
6. SAR studies showed a preference for small size substituents limited to an ethyl group in the P₁ position. In the P₂ position, glycine is preferred over alanine. Threonine in P₃ appears to provide a solvent-exposed hydrophilic side chain that minimizes solvation penalty, whereas isoleucine in P₄ appears to make crucial hydrophobic interactions important for inhibitory activity.
7. Glutamine side chain which is present in P₁ amino acid of preferred enzyme substrate is not compatible with electrophilic ketogroup of analogues ketoamide due to formation of cyclic tautomer. This prevents the direct incorporation of this side chain in P₁ position of ketoamide inhibitors and indicates the need for development of conformationally constrained analogues.
8. From the series of peptidic α -ketoamides the most active inhibitor was compound **16** (IC₅₀=0.9 $\pm$ 0.2 μ M) which is among the best currently available PfSUB1 inhibitors. This is a useful tool compound to study the role of PfSUB1 as a potential antimalarial target and can be used as lead compound for antimalarial drug discovery.



16, ($IC_{50} = 0.9 \pm 0.2 \mu M$)

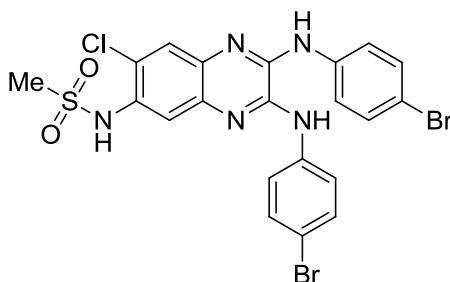
9. A small library of structurally diverse benzoxazinones (33 compounds) were prepared as potential covalent PfSUB1 inhibitors based on virtual screening hit **39** (5186907). None of the compounds displayed detectable PfSUB1 inhibition.

10. 1,3-Bis(phenylamino)quinoxalines have been identified as a novel class PfSUB1 inhibitors by screening of *Malaria Box* compound collection. The hit compound **37a** displayed activity in micromolar range. This indicates that PfSUB1 is likely not the primary target for activity of this compound in cell models. Nevertheless, it can serve as promising starting point to develop non-peptidic PfSUB1 inhibitors considering its ability to penetrate cell membranes of the parasite.



37a, $IC_{50} = 10 \pm 2 \mu M$

11. The preliminary hit optimization resulted in compound **37r** with similar activity of hit compound **37a**, however no improvement of activity was reached. Nevertheless, SAR obtained is very useful to create *in silico* model for binding of quinoxaline based inhibitors into the active site of PfSUB1 facilitating the development of improved non-peptidic inhibitors.



37r, $IC_{50} = 11 \pm 2 \mu M$