

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE
Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte

RIGA TECHNICAL UNIVERSITY
Faculty of Materials Science and Applied Chemistry

Dace RASIŅA

Doktora studiju programmas „Ķīmija” doktorante
Student of the Doctoral Study Programme “Chemistry”

MALĀRIJAS ASPARTILPROTEINĀŽU INHIBITORU IZVEIDE

Promocijas darba kopsavilkums

**DEVELOPMENT OF MALARIAL ASPARTIC
PROTEASE INHIBITORS**

Summary of the Doctoral Thesis

Zinātniskais vadītājs (supervisor)
profesors *Dr. chem.*
A. JIRGENSONS

RTU Izdevniecība / RTU Press
2016

Rasiņa D. Malārijas aspartilproteīnāžu inhibitoru izveide.
Promocijas darba kopsavilkums.– R.: RTU Izdevniecība,
2016.– 57 lpp.

Rasina D. Development of Malarial Aspartic Protease
Inhibitors. Summary of the Doctoral Thesis. – R.:
RTU Press, 2016. – 57 p.

Iespiests saskaņā ar RTU promocijas padomes “P-01”
2016. gada 10. novembra sēdes protoklu Nr. 1.

Printed in accordance with the Resolution of RTU
Promotion Council “P-01” as of 10 November 2016,
Minutes No. 1.

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Reģionālās attīstības fonda projekta
2014/0019/2DP/2.1.1.1.0/14/APIA/VIAA/062 atbalstu.

The present research has been supported by the European Regional Development Fund
Project 2014/0019/2DP/2.1.1.1.0/14/APIA/VIAA/062.

ISBN 978-9934-10-900-3

**PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS
RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ
ĶĪMIJAS ZINĀTŅU DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI**

Promocijas darbs ķīmijas zinātņu doktora grāda iegūšanai tiek aizstāvēts 2016. gada 22. decembrī plkst. 14.00 Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātē, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Profesors *Dr. habil. chem.* Raimonds Valters
Latvijas Zinātņu akadēmija

Profesors *Dr. chem.* Edgars Sūna
Latvijas Universitāte

Docente *Dr. chem.* Māra Plotniece
Rīgas Tehniskā universitāte

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājis šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē ķīmijas zinātņu doktora grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Dace Rasiņa (paraksts)

Datums: 2016. gada __. _____

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā, tajā ir ievads, literatūras apskats, rezultātu izvērtējums, eksperimentālā daļa, secinājumi, izmantotās literatūras saraksts, 25 attēli, 26 tabulas, divi pielikumi, kopā 124 lappuses. Literatūras sarakstā ir 99 avoti.

SATURS/ CONTENT

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS	6
Problēmas būtība un aktualitāte	6
Pētījuma mērķis un uzdevumi.....	8
Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti	8
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI	9
1. Fragmentu skrīnings	9
2. Sākotnējā fragmenta 1 optimizēšana	10
3. 3-Pozīcijā aizvietotu 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēte	11
4. Enzīma-liganda ko-kristāla analīze.....	13
5. 5-Pozīcijā aizvietotu 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēte	14
6. 8-Pozīcijā aizvietotu 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēte	16
7. 7-Pozīcijā aizvietotu 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēte	17
8. 2-Aminohinazolīn-4(3H)-onu atvasinājumu sintēze.....	21
8.1. Tetrahidrofurfurilamīna atvasinājumu sintēze	22
8.2. Antranilskābju sintēze no izaftīniem.....	24
8.3. Antranilskābju atvasinājumu iegūšana C-H aktivēšanas reakcijās	24
SECINĀJUMI	26
GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS	30
Introduction	30
Aim and Tasks	32
Scientific Novelty and Main Results	32
MAIN RESULTS OF THE THESIS	33
1. Fragment Screening	33
2. Initial Optimisation of Fragment Hit 1	34

3. SAR of the 3-Position Substituents of 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones.....	35
4. Analysis of the Enzyme-Protein Co-crystal Structure	37
5. SAR of the 5-Position Substituents of 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones.....	38
6. SAR of the 8-Position Substituents of 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones.....	39
7. SAR of the 7-Position Substituents of 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones.....	40
8. Synthesis of 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones	44
8.1. Synthesis of Tetrahydrofurfurylamine Derivatives.....	45
8.2. Synthesis of Anthranilic Acid Derivatives from Isatins.....	47
8.3. Synthesis of Anthranilic Acid Derivatives Using C-H Activation Reaction	47
CONCLUSIONS	49
PUBLIKĀCIJAS/PUBLICATIONS.....	52
LITERATŪRAS SARAĶSTS/ REFERENCES	54

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Problēmas būtība un aktualitāte

Malārija ir viena no vissenākajām un postošākajām cilvēces slimībām, ko izraisa četras *Anopheles* moskītu pārnēsātas *Plasmodium* parazītu sugas. Galvenie slimības simptomi ir nogurums, galvassāpes, drudzis, vemšana, smagākos gadījumos var iestāties koma vai pat nāve. Slimība ir izplatīta tropu un subtropu klimatiskajās joslās, līdz ar to aptuveni puse pasaules iedzīvotāju dzīvo saslimšanas riska zonās. 2015. gadā reģistrēti ap 214 miljonu saslimšanas gadījumu, no kuriem gandrīz pusmiljons bija ar letālām sekām [1].

Senākās un plašāk lietotās antimalārijas zāļvielas ir hinīns un artemisinīns, kas izolētas no Āzijas tautas medicīnā izmantotajiem augiem. Papildus tiem attīstīta virkne citu sintētisko zāļvielu, diemžēl lielākajai daļai šo vielu ir zināms tikai vispārīgs darbības mehānisms nevis konkrētais bioloģiskais mērķis [2–4]. Pēdējās desmitgadēs klīniskos pētījumus sasniedz uz jauniem kemotipiem balstīti zāļvielu kandidāti, kas atrasti, skrīnējot molekulas tieši uz parazītu, un ir atklāti arī jauni iespējamo zāļvielu bioloģiskie mērķi [5–6]. Kopš 2000. gada malārijas izraisīto nāves gadījumu skaits ir samazināts par 60 %, savukārt saslimšanu skaits – par 37 % [1].

Slimības apkarošanas centienus apdraud rezistentās malārijas izplatīšanās, pret kuru daudzos reģionos neefektīvi ir jau praktiski visi zināmie preperāti. Pašlaik vienīgie līdzekļi rezistentās malārijas ārstēšanai ir artemisinīnu kombinācijas, taču nesen vairākos reģionos ir reģistrēta rezistentā malārija arī pret šīs grupas medikamentiem, norādot uz akūtu nepieciešamību radīt jaunas, rezistences brīvas zāļvielas [1]. Rezistences brīvas zāļvielas priekšnoteikums ir tās iedarbība uz tādiem molekulārajiem mērķiem, uz kuriem neiedarbojas pašlaik izmantotās pretmalārijas zāļvielas. Kā šādi molekulārie mērķi izstrādātājā darbā ir izvēlētas malārijas aspartilproteināzes – plazmepsīni [3].

P. Falciparum genomā iekodēti 10 plazmepsīni (Plm). Gremošanas plazmepsīni (Plm I, Plm II, Plm IV) un histo-aspartilproteināze (HAP jeb Plm III) darbojas eritrocītos, kur tie degradē hemoglobīnu mazākos peptīdos, lai iegūtu augšanas un vairošanās procesam nepieciešamās aminoskābes. Gremošanas plazmepsīni I–IV ir visvairāk pētīti, un tos ir salīdzinoši viegli ekspresēt, nodrošinot proteīnu bioloģiskajiem un strukturālajiem pētījumiem. Šie četri enzīmi ir savstarpēji līdzīgi, to aminoskābju sekvenca sakrīt no 60 % līdz 79 %, un visi tiek uzskatīti par potenciāliem zāļvielu mērķiem [3,5,7–12].

Bez gremošanas plazmepsīniem identificēti vēl seši Plm subtipi (V, VI, VII, VIII, IX, un X). Atšķirībā no gremošanas plazmepsīniem, to nozīme ir mazāk izprasta. No ne-gremošanas plazmepsīniem tikai Plm V ir pieejama rentgenstruktūra (4ZL4) un noskaidrota funkcija organismā, kas veicinājis pētījumus Plm V inhibitoru izveidē [13–15]. Pēc sekvences homologijas vislīdzīgākie gremošanas plazmepsīniem ir Plm IX un X.

Līdzšinējie pētījumi parāda, ka gremošanas Plm I–IV inhibitori samazina parazīta augšanu, taču tikai viena Plm subtipa inhibēšana nav pietiekama, lai nogalinātu parazītu. Turklāt ne vienmēr tiek novērota korelācija starp izolēta enzīma inhibēšanu un iedarbību uz parazīta augšanu šūnu testos. Viens no skaidrojumiem tam ir Plm I–IV spēja savstarpēji kompensēt cita darbību. Otrs iespējamais iemesls ir tas, ka patiesais kritiskais bioloģiskais mērķis varētu būt kāds no strukturāli līdzīgajiem ne-gremošanas Plm subtipiem [3,16,17].

Lai izveidotu Plm inhibitorus ar samazinātiem blakus efektiem, uzmanība jāpievērš selektivitātei pret cilvēka aspartilproteināzēm – katepsīnu D un E. Lai arī aminoskābju sekvence Plm II un Cat D sakrīt tikai par aptuveni 35 %, enzīmu kristālstruktūras norāda uz līdzību abu enzīmu aktīvajā kabatā.

Šobrīd zināmos Plm inhibitorus var iedalīt divās grupās pēc to struktūras – peptidomimētiskie un nepeptidomimētiskie. Vairums peptidomimētisko inhibitoru uzrāda zemāku selektivitāti pret Cat D un vājāku aktivitāti šūnu testos. Ir publicētas vairākas rentgenstruktūras ar peptidomimētiskajiem inhibitoriem un Plm II, kas parāda, ka šie inhibitori saistās ar enzīmu tā slēgtajā konformācijā, kur enzīma kustīgais vārsts nosedz katalītisko kabatu. Pēdējo divdesmit gadu laikā ir atklāti arī vairāki nepeptidomimētisko inhibitoru kemotipi, kas visbiežāk uzrāda augstu selektivitāti pret Cat D. Rentgenstruktūras ar nepeptidomimētiskajiem inhibitoriem norāda, ka tie saistās ar atvērtu enzīma konformāciju, kur vārsts nenosedz katalītisko kabatu. Atvērtajā enzīma konformācijā veidojas papildu sub-kabata, kurai optimālas ir inhibitoru struktūrā iestrādātas alkilvirknes. Tiek uzskatīts, ka tieši šī īpašība nodrošina nepeptidomimētisko inhibitoru augsto selektivitāti [3,5,7–12].

Pētījuma mērķis un uzdevumi

Promocijas darba mērķis ir jaunu nepeptidomimētisko plazmepsīnu inhibitoru izveide.

Izvirzītie uzdevumi

- Veikt fragmentu bibliotēkas skrīningu, ar kodolmagnētiskās rezonanses metodi nosakot fragmentu saistīšanos malārijas aspartilproteināzi – plazmepsīnu II.
- Sintētiski pilnveidot izvēlēto fragmentu līdz inhibitoram ar IC_{50} vērtību vismaz 100 nM. Izstrādāt un piemērot sintēzes metodi savienojuma analogu iegūšanai.
- Noteikt jauno savienojumu inhibitoro aktivitāti uz plazmepsīniem I, II, IV un katepsīnu D. Perspektīvākajiem inhibitoriem noteikt citotoksicitātes rādītājus un *P. Falciparum* augšanas inhibēšanas spēju asinsšķīnu testos.
- Veikt struktūras-aktivitātes likumsakarību analīzi un izmantot iegūtos rezultātus jaunu inhibitoru struktūras plānošanā.

Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

Fragmentu skrīninga rezultātā noteicām 10 plazmepsīna II inhibitorus, kas balstīti uz jaunām bāzes struktūrām. No tiem 2-aminohinazolīn-4(3H)-ona atvasinājums tika izvēlēts tālākai attīstīšanai. Izmantojot molekulārās modelēšanas sniegto informāciju, pirmajā optimizācijas ciklā ieguvām savienojumus ar uzlabotu Plm inhibitoro aktivitāti. Vienam no tiem ieguvām inhibitora-enzīma ko-kristāla rentgenstruktūru, kas norādīja, ka saistīšanās notiek enzīma atvērtajā konformācijā, un deva norādes par savienojuma optimizēšanas iespējām. Veicām struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēti 2-aminohinazolīn-4(3H)-ona 3., 5. un 7. pozīcijas aizvietotājiem. Ieguvām selektīvu plazmepsīna IV inhibitoru. Rezultātā izstrādājām plazmepsīnu inhibitoru sēriju, kuru skaitā efektīvākie ligandi ir ar nanomolāru inhibitoro aktivitāti enzimatiskajos testos, vidēji 1 μ M inhibēšanas spēju *P. Falciparum* augšanas testos. Iegūtie inhibitori ir ar zemu citotoksicitāti, turklāt uzrāda labu selektivitāti pret cilvēka aspartilproteināzi – katepsīnu D. Iegūtie rezultāti norāda, ka 2-aminohinazolīn-4(3H)-oniem ir augsts potenciāls pretmalārijas zāļvielu izveidei.

PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

1. Fragmentu skrīnings

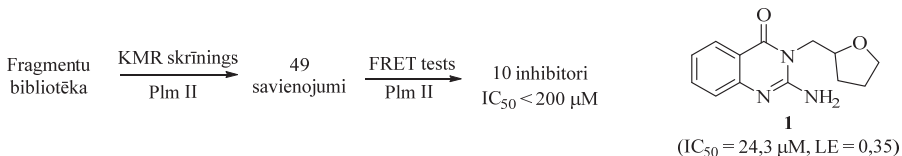
Fragmentu identifikācijai¹ tika izmantota komerciāli pieejama strukturāli atšķirīgu *ChemBridge* fragmentu bibliotēka (1000 fragmentu), kurā savienojumi atbilst *Astex Ro3* likumiem [18]. Fragmentu saistīšanās tika noteikta ar malārijas aspartilproteīnāzi – plazmepsīnu II (Plm II). Skrīningam tika izvēlēta KMR metode, kas ļauj identificēt relatīvi vājas mijiedarbības starp proteīnu un tā ligandu, reģistrējot fragmentu spektru [19,20].

Vienā KMR paraugā tika analizēti seši savienojumi jeb fragmenti. Pēc references spektru uzņemšanas tika pievienots Plm II un atkārtoti uzņemti spektri. Lai pārliecinātos, ka novērotā mijiedarbība starp fragmentu un proteīnu notiek proteīna aktīvajā kabatā, tika veikti izspiešanas eksperimenti, paraugam pievienojot zināmu Plm II inhibitoru – pepstatīnu A un atkārtoti uzņemot spektrus.

Lai izvairītos no viltus pozitīviem rezultātiem, tika veikti trīs dažādi KMR eksperimenti: 1) STD (*Saturation Transfer Difference*)[21]; 2) T₁ρ KMR eksperiments [22]; 3) *WaterLOGSY (Ligand Observed via Gradient Spectroscopy)* [23,24]. Savienojumi, kas skrīninga kokteiļos uzrādīja selektīvu saistību vismaz divos KMR eksperimentos, tika individuāli pārbaudīti atkārtoti.

No izmantotās *ChemBridge* fragmentu bibliotēkas 24 savienojumi bija nešķīstoši un skrīningam nederīgi. Skrīninga rezultātā 842 savienojumi neuzrādīja saistību ar enzīmu, 85 uzrādīja nespecifisku saistīšanos, savukārt 49 uzrādīja saistīšanos enzīma aktīvajā kabatā.

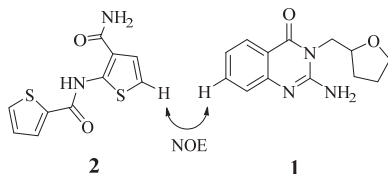
Fragmentu skrīningā atrastajiem 49 savienojumiem tika noteikta inhibitorā aktivitāte uz enzīmu. IC₅₀ vērtību 24–200 μM uzrādīja 10 savienojumi. 2-Aminohinazolīn-4(3H)-ons **1**, kurš uzrādīja visaugstāko inhibitoro aktivitāti un ligandu efektivitāti tika izvēlēts tālākai attīstīšanai (1. att.).



1. att. Fragmentu skrīninga shematisks attēlojums.

¹Sadarbībā ar LOSI Fizikāli Organiskās Ķīmijas laboratoriju K. Jaudzema vadībā.

Lai noskaidrotu, vai fragmentus ir iespējams apvienot, tika veikti KMR eksperimenti, nosakot fragmentu saistību pa pāriem. Tika noskaidrots, ka savienojumi **1** un **2**, saistās atšķirīgās vietās enzīma aktīvajā kabatā. Turklāt starp **1** H-7 un **2** H-5 tika novērota NOE sadarbība divdimensionālajā ^1H - ^1H NOESY spektrā, kas norāda, ka tie atrodas relatīvi tuvu viens otram (2. att.).

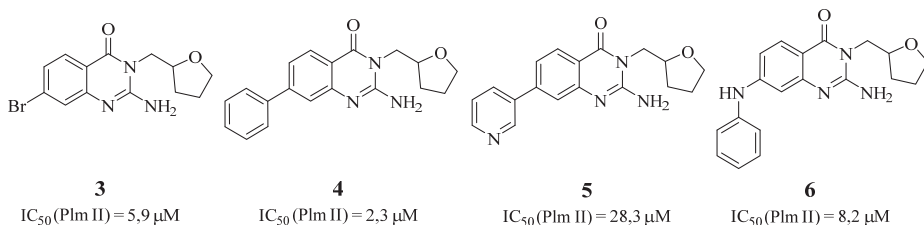


2. att. NOE spektrā novērotā **1** un **2** savstarpējā mijiedarbība enzīma aktīvajā kabatā.

Diemžēl nevienu no abiem fragmentiem neizdevās sakristalizēt ar enzīmu un noskaidrot konkrētu mijiedarbības veidu vai to relatīvo novietojumu, lai saprastu, kā un ar kādu linkeru fragmentus apvienot. Taču iegūtā informācija norādīja, ka 2-aminohinazolīn-4(3H)-ona **1** 7-pozīcija vērsta kādas enzīma kabatas virzienā un ir papildināma ar aizvietotājiem – tiofēna **2** bioizostēriem.

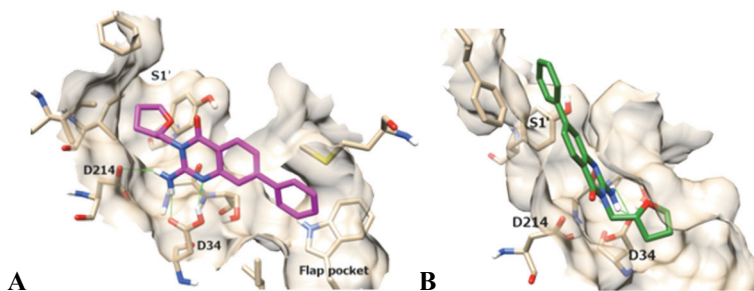
2. Sākotnējā fragmenta **1** optimizēšana

Tika iegūti četri 7-pozīcijā aizvietoti savienojuma **1** analogi (3. att.). Aplūkojot iegūto savienojumu Plm II inhibitoro aktivitāti, redzams, ka 7-brom-2-aminohinazolīn-4(3H)-ons **3** uzrāda četras reizes lielāku inhibitoro aktivitāti ($\text{IC}_{50} = 5,9 \mu\text{M}$), salīdzinot ar skrīningā atrasto fragmentu **1**. Bromīda nomaina pret fenilgrupu ļauj iegūt pat 10 reizes aktīvāku savienojumu **4** ($\text{IC}_{50} = 2,3 \mu\text{M}$).



3. att. Savienojuma **1** analogi un to Plm II inhibitorā aktivitāte.

Uzlabotais fragments **4** tika izmantots tālākai inhibitoru attīstīšanai. Lai noskaidrotu tālākos optimizēšanas virzienus, savienojuma **4** iespējamais saistības veids Plm II aktīvajā centrā tika noteikts, izmantojot molekulāro modelēšanu.² Modelēšanai tika izmantotas divas PDB piejamās Plm II kristālstruktūras: 2BJU – atvērtā un 1LEE – aizvērtā konformācijā. Datormodelēšanas pētījumos ieguvām divus enerģētiski izdevīgākos saistības veidus: a) tetrahidrofurānil- (THF) grupa vērsta S1' kabatas virzienā atvērtajā enzīma konformācijā (4. A att.); b) 7-fenilgrupa vērsta S1' kabatas virzienā slēgtajā enzīma konformācijā (4. B att.). Abi modeļi norādīja, ka 2-aminohinazolīn-4(3H)-ona N1 atoms un 2-aminogrupa veido ūdeņraža saites ar Asp34 un Asp214 sānu ķēdēm, kas veic enzīma katalītisko funkciju.



4. att. Savienojuma **4** molekulārais modelis Plm II aktīvajā centrā:
(A) atvērtā un (B) slēgtā enzīma konformācijā.

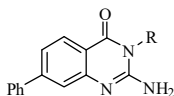
Izvērtējot abus iegūtos modeļus, redzam, ka lipofīlas grupas pievienošana THF gredzenam varētu uzlabot inhibitora saistīšanos spēju: **A** gadījumā lipofīlais aizvietotājs būtu vērsts S1' kabatā, kuras virsmu veido enzīma Ph294 un Tyr192 atlikumi. Savukārt **B** gadījumā lipofīlais aizvietotājs mijiedarbotos ar enzīma kabatā izvietoto Trp41 atlikumu.

3. 3-Pozīcijā aizvietotu 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēte

Apskatot Plm inhibitoro aktivitāti 3-pozīcijā aizvietotiem (THF gredzenā modificētiem) 2-aminohinazolīn-4(3H)-oniem, redzam, ka savienojums **7a**, kas satur nepiesātinātu furāna ciklu, uzrāda līdzīgu IC₅₀ vērtību kā piesātinātais analogs **4** (1. tab.). Tomēr jāņem vērā, ka zāļvielu izveidošanai piesātinātais furāna cikls ir piemērotāks, jo ir ķīmiski un metaboliski stabilāks [25].

²Sadarbībā ar LOSI Fizikāli Organiskās Ķīmijas laboratoriju K. Jaudzema vadībā.

1. tabula. 3-Aizvietotu 2-aminohinazolīn-4(3H)- onu Plm inhibitorā aktivitāte.



N. p. k.	R	IC ₅₀ (μM)			
		Plm II	Plm I	Plm IV	Cat D
1	<i>rac</i> -4	2,3	—	—	—
2 ^a	7a	3,2	—	—	—
3	<i>rac</i> -7b	52,0	—	—	—
4 ^a	7c ^b	12,5	52,0	20,0	>200
5	<i>rac</i> -7e	2,9	2,4	1,1	9,0
6	2 <i>S</i> ,5 <i>S</i> -7e	2,3	4,3	3,0	17,0
7	<i>rac</i> -7f	0,57	1,3	0,6	13,8
8	2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -7f	0,34	1,2	0,5	4,6
9	2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> -7f	3,0	4,6	2,7	22,0
10	<i>rac</i> -7g	2,5	3,7	1,3	19,5
11	<i>rac</i> -7h	11,5	—	—	—
12	7i ^b	3,0	—	—	—
13 ^a	<i>rac</i> -7j	1,6	2,3	1,5	25,0
14 ^a	<i>rac</i> -7k	5,3	2,0	3,0	9,0
15 ^a	7d ^b	4,0	6,4	2,0	20,0

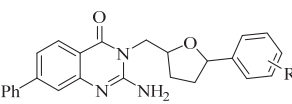
^asavienojums iegūts sadarbībā ar O. Borysov; ^bdiastereomēru maisījums

Pievienojot fenilgrupu tetrahidrofurāna 4-pozīcijā (**7c**), novēro inhibitorās aktivitātes samazināšanos, salīdzinot ar neaizvietoto analogu **4**. Savukārt, izvērtējot 5-aizvietotus tetrahidrofurāna analogus **7e-k**, redzams, ka 5-fenil-aizvietots analogs **7f** ir 10 reizes aktīvāks Plm II inhibitors par optimizēto fragmentu **4**. Salīdzinot abus diastereomērus **7f** un **7e**, redzams, ka *cis*-novietoti aizvietotāji tetrahidrofurānā (**7f**) ļauj sasniegt labāku aktivitāti, salīdzinot ar *trans*-izomēru (**7e**). No abiem *cis*-konfigurācijas enantiomēriem izomērs *2R,5S-7f* uzrādīja augstāku inhibitoro aktivitāti salīdzinājumā ar tā *2S,5R-7f* enantiomēru.

Citi THF 5-pozīcijā aizvietotie analogi **7g-k** (1. tab.) ir vājāki Plm II inhibitori, jo, visticamāk, neveido izdevīgas mijiedarbības ar enzīma kabatā esošajām aminoskābēm vai veido repulsīvu stērisko mijiedarbību ar enzīmu.

Jāpiebilst, ka analogos **7c-g,j-k** netika novērota izteikta selektivitāte starp Plm subtipiem (I, II un IV), taču būtiski, ka šie savienojumi uzrāda vērā ņemamu selektivitāti pret cilvēka proteināzi katepsīnu D (CatD/ Plm ≈ 10).

Aktīvākā savienojuma **7f** atvasinājumi **8** ar aizvietotajiem aromātiskajā gredzenā (5. att.) uzrādīja zemāku Plm II inhibēšanas spēju neatkarīgi no aizvietotāja novietojuma un elektroniskajiem efektiem. Secinājām, ka, visticamāk, pat salīdzinoši nelieli aizvietotāji veido repulsīvu stērisko mijiedarbību ar enzīma virsmu, un tas noved pie aktivitātes samazināšanās. Šie rezultāti norādīja, ka tālākiem pētījumiem jāizmanto **7f** atvasinājumi bez aizvietotajiem.

	Plm II (μM)
	R = <i>p</i> -F ₃ C; IC ₅₀ = 2,4
	R = <i>p</i> -MeO; IC ₅₀ = 11,0
	R = <i>p</i> -F; IC ₅₀ = 3,5
	R = <i>p</i> -Cl; IC ₅₀ = 1,9
	R = <i>p</i> -Ph; IC ₅₀ = 50,0
	R = <i>p</i> -F, <i>m</i> -MeO; IC ₅₀ = 2,0
	R = <i>m</i> -Me; IC ₅₀ = 8,8
	R = <i>m</i> -MeO; IC ₅₀ = 17,0
	R = <i>m</i> -Cl; IC ₅₀ = 7,5
	R = <i>o</i> -Me; IC ₅₀ = 7,0

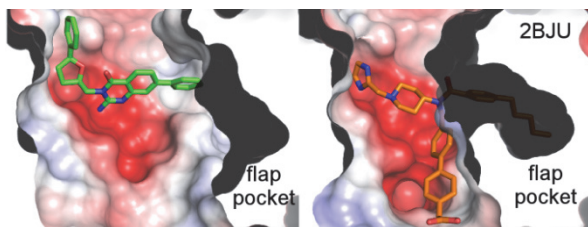
5. att. Savienojuma **7f** atvasinājumi **8** un to Plm II inhibitorā aktivitāte.

4. Enzīma-liganda ko-kristāla analīze

Projekta sadarbības partneriem prof. K. Tāra vadībā veiksmīgi izdevās iegūt savienojuma *rac-7f* ko-kristālu ar Plm II. Kristalizācijas mēģinājumiem tika izmantots savienojums *rac-7f*, kas ir racemāts. Iegūtie ko-kristāla elektronu blīvuma attēli pieļauj abu enantiomēru iespējamību, taču, ņemot vērā enantiomēru atšķirīgās aktivitātes, enzīma liganda kompleksa vizualizācijā uzrādīts aktīvākais enantiomērs (6. att.).

Ko-kristāla rentgenstruktūranalīze parādīja, ka ligands **7f** saistās ar enzīmu tā atvērtajā konformācijā (6. att.). Šajā konformācijā kustīgā vārsta daļa ieņem stāvokli, kurā enzīma aktīvais centrs ir atsegts un vārsta atvērsšanās rezultātā veidojas papildus kabata (*flap pocket* – vārsta kabata) [26]. Līdz šim atvērtas konformācijas ko-kristāli literatūrā bija zināmi vienīgi ar ligandiem, kas satur *n*-alkilgrupas, kuras ieņem vārsta kabatu [26–29]. Mūsu liganda gadījumā vārsta kabata ir neaizpildīta, un tā ir platāka par līdz šim publicētajām (6. att.).

Iegūtie ko-kristāla rentgenstruktūras analīzes dati norāda, ka hinazolīnona *N*1 atoms un aminogrupa veido H-saites ar enzīma katalītiskā centra aspartātiem (Asp34 un Asp214). *N*-(5-Fenil-2-tetrahidrofurānil)metil-aizvietotājs vērsts S1' kabatā un mijiedarbojas ar enzīma Tyr192, Phe294 un Ile300 atlikumiem, savukārt 7-fenilgrupa veido hidrofobas mijiedarbības ar Ile123 un π - π mijiedarbības ar enzīma Trp41 atlikumu.

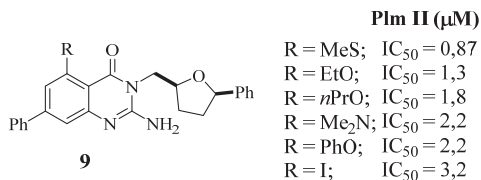


6. att. Enzīma – liganda ko-kristāla rentgenstruktūranalīzes datorvizualizācija. Mūsu izveidotais inhibitors *rac*-**7f** (zaļš) un literatūrā aprakstītais inhibitors ar *n*-pentilgrupu (brūns, PDB ID: 2BJU) enzīma aktīvajā kabatā.

Iegūtā ko-kristāla rentgenstruktūras analīze sniedza vērtīgas norādes uz savienojuma tālākās optimizēšanas iespējām: 1) apskatot 6. att. redzams, ka 2-aminohinazolīnona 5-pozīcijā iespējams pievienot aizvietotājus; 2) aizvietotāji no hinazolīnona 8-pozīcijas varētu tikt ievirzīti S1 kabatā (līdzīgi kā 2BJU molekulas bifenil-grupa 6. attēlā); 3) savienojums būtu papildināms ar aizvietotājiem hinazolīnona 7-pozīcijā, kas aizpildītu vārsta kabatu.

5. 5-Pozīcijā aizvietotu 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēte

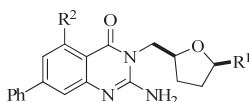
Savienojumi **9**, kas 5-pozīcijā satur aizvietotas oksi, amino, merkaptogrupas vai jodu, uzrādīja samērā līdzīgu Plm inhibitoru aktivitāti un, salīdzinot ar izejas inhibitoru **7f** (R =H), netika novērots nedz būtisks aktivitātes uzlabojums, nedz kritums (7. att.). Visticamāk, šie aizvietotāji neveido nozīmīgas mijiedarbības ar enzīmu.

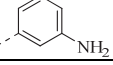
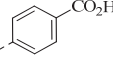
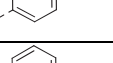
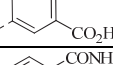
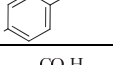


7. att. 5-Aizvietoto 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu **9** Plm II inhibitorā aktivitāte.

Izvērtējot 5-aizvietotu-2-aminohinazolīn-4(3H)-onu **10a-g** un **11a, d, g** bioloģiskās aktivitātes datus (2. tab.), redzams, ka visi savienojumi uzrāda sub-mikromolāru aktivitāti. Turklāt var novērot vairākas būtiskas sakarības. Pirmkārt, gadījumos, kad THF aizvietotājs ir R¹ = H (**10a-g**), selektivitāte pret Cat D pārsniedz 100 reizes, turpretim, ja aizvietotājs R¹ = Ph (**11a, d, g**) selektivitāte saglabājas robežās no 10 līdz 50 reizēm.

2. tabula. 5-Aizvietoto 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu Plm inhibitorā aktivitāte.



N. p. k.		R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM)			
				Plm II	Plm I	Plm IV	Cat D
1	<i>rac-7f</i>	Ph	H	0,57	1,3	0,6	13,8
2	<i>rac-10a</i>	H		0,96	1,6	2,4	n.a.
3	<i>rac-11a</i>	Ph		0,77	1,5	0,95	13,3
4	<i>rac-10b</i>	H		0,55	2,8	1,8	68,0
6	<i>rac-10c</i>	H		0,82	2,0	1,0	93,0
7	<i>rac-10d</i>	H		0,33	3,5	1,4	100,0
8	<i>rac-11d</i>	Ph		0,28	0,6	0,5	20,0
9	<i>rac-10e</i>	H		0,5	1,0	1,5	98,0
10	<i>rac-10f</i>	H		0,6	3,4	2,5	n.a.
12	<i>rac-10g</i>	H		0,5	11,5	6,0	n.a.
13	<i>rac-11g</i>	Ph		0,4	1,0	0,6	11,0

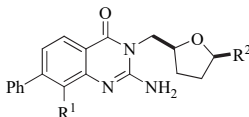
Otrkārt, 5-aizvietotie savienojumi **10a/11a**, **10d/11d**, **10g/11g**, kuros THF aizvietotājs $R^1 = H$ vai Ph, uzrāda līdzvērtīgu bioloģisko aktivitāti (2. tab.). Tas ir pretstatā iepriekš novērotajam, kur pāreja no **4** ($R^1 = H$) uz **7f** ($R^1 = Ph$) deva aktivitātes pieaugumu līdz četrām reizēm (1. tab., 1./7. rinda). Iespējams, ka 5-pozīcijas aizvietotāju dēļ notiek visas molekulas izbīde enzīma aktīvajā kabatā, kas līdz ar to ietekmē arī THF grupas novietojumu. Tā rezultātā fenil-aizvietotājs pie THF vairs neveido π - π mijiedarbību ar S1' kabatā esošo fenilalanīnu, ko izjūt kā kritumu liganda aktivitātē jeb šajā gadījumā IC_{50} vērtība ir vienāda gan ar Ph, gan bez Ph aizvietotāja.

Šādi rezultāti pieļauj iespēju Plm inhibitoru izveidē izmantot neaizvietotu THF-grupu ($R^1 = H$), kas ļautu uzlabot savienojumu polaritāti un samazināt to lipofilitāti, vienlaikus saglabājot savienojumu aktivitāti un uzlabojot selektivitāti pret Cat D.

6. 8-Pozīcijā aizvietotu 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēte

Hipotēze par aizvietotāju virzīšanu enzīma S1 kabatā no hinazolīnonu 8-pozīcijas ar alkil- vai O-alkil-tiltiņu neapstiprinājās. Savienojumi (**12a,b** un **13b**) ar salīdzinoši maziem aizvietotājiem kā -OMe, -Me un garāku alkilvirkni (**12c**) bija vājāki Plm inhibitori kā 8-pozīcijā neaizvietots analogs **7f** (3. tab.).

3. tabula. 8-Aizvietotu-2-aminohinazolīn-4(3H)-onu Plm inhibitorā aktivitāte.



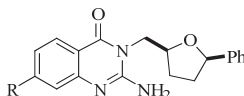
N. p. k.		R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM)			
				Plm II	Plm I	Plm IV	Cat D
1	<i>rac</i> -12a	OMe	Ph	3,2	7,2	2,2	12,0
2	<i>rac</i> -12b	Me	Ph	100,0	n.a.	5,0	100,0
3	<i>rac</i> -13b		H	4,3	32,0	5,0	80,0
4	<i>rac</i> -12c	nPent	Ph	100,0	73,0	28,0	97,0

Interesanti, ka, salīdzinot $R_1 = \text{Me}$ grupu saturošu savienojumu **12b** ($R^2 = \text{Ph}$) un **13b** ($R^2 = \text{H}$) Plm II inhibitoro aktivitāti, redzams pilnīgi pretējs efekts Ph grupas pievienošanai pie THF cikla. Atšķirībā no iepriekšējās inhibitoru sērijas inhibēšanas konstantes palielinās gandrīz simtkārtīgi. Visticamāk, aizvietotāji 8-pozīcijā veido stēriski repulsīvu mijiedarbību ar enzīmu un būtiski izmaina inhibitora novietojumu.

7. 7-Pozīcijā aizvietotu 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēte

Kristālstruktūras analīze rāda, ka aminohinazolīnona 7-pozīcija atrodas pie ieejas vārsta kabatā un te ir iespēja variēt ar aizvietotājiem, kas piepildītu vārsta kabatu (6. att.). Atbilstoši izvirzītajai hipotēzei savienojumi ar alkilvirknēm 7-pozīcijā (**14c–f**) ir labi plazmepsīnu inhibitori, īpaši **14e** un **14f**, kas ir aktīvāki par izejas inhibitoru **7f** (4. tab.). Taču šo savienojumu gadījumā tiek zaudēta selektivitāte pret Cat D. Tas ir negaidīts rezultāts, jo tiek uzskatīts, ka katepsīnam D nav vai arī tas viegli neveido atvērto konformāciju un vārsta kabatu, kā arī literatūrā zināmie plazmepsīnu inhibitori ar vārsta kabatu aizpildošām alkilvirknēm uzrāda augstu selektivitāti pret Cat D [26–29]. Savienojumus **14e** un **14f** interesanti būtu tālāk attīstīt par Cat D inhibitoriem, bet tas neietilpa mūsu pētījuma uzdevumos.

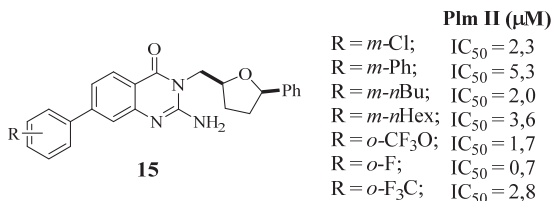
4. tabula. 7-Aizvietotu-2-aminohinazolīn-4(3H)-onu Plm inhibitorā aktivitāte.



N. p. k.	R	IC ₅₀ (μM)				
		Plm II	Plm I	Plm IV	Cat D	
1	<i>rac-7f</i>		0,57	1,30	0,60	13,8
2	<i>rac-14a</i>		0,50	1,10	0,40	4,3
3	<i>rac-14b</i>		0,80	—	—	—
4	<i>rac-14c</i>		0,80	0,38	1,20	4,3
5	<i>rac-14d</i>		0,40	0,30	0,60	3,0
6	<i>rac-14e</i>		0,12	0,085	0,26	0,5
7	<i>rac-14f</i>		0,088	0,08	0,11	0,4

Tā kā 2-aminohinazolīn-4(3H)-oni ar 7-pozīcijā pievienoto alkilgrupu zaudē selektivitāti, turpinājām pilnveidot **7f** struktūru un ieguvām savienojumus ar dažādiem aizvietotājiem pie 7-fenilgrupas. Turklāt, ņemot vērā, ka iepriekšējie rezultāti nedeva viennozīmīgu pārlicību par Ph-THF grupas nepieciešamību, paralēli ieguvām arī analogus ar neaizvietotu THF.

Inhibitori **15**, kuriem hinazolīnona 7-fenilgrupas satur *meta*- un *orto*-aizvietotājus, uzrādīja nelielu inhibitorās aktivitātes kritumu (8. att.). Veicot šo savienojumu molekulāro modelēšanu Plm II struktūrā, tika noskaidrots, ka *m*-aizvietotājiem ir maz vietas Plm II kabatā un tie veido repulsīvu mijiedarbību ar enzīma virsmu.



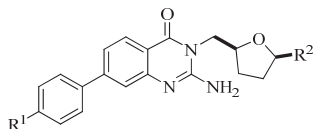
8. att. *Orto*- un *meta*- aizvietotu 7-fenil-2-aminohinazolīn-4(3H)-onu Plm II inhibitorā aktivitātē.

Apskatot inhibitorus **16**, kas satur *para*- pozīcijā aizvietotu 7-fenilgrupu, var novērot, ka pietiekami garas alkilvirknes pievienošana (**16i** un **16k**) uzlabo savienojumu inhibēšanas konstantes līdz pat trīs reizēm (5. tab. 9., 11. rinda), salīdzinot ar izejas inhibitoru **7f**. Jāuzsver, ka šie savienojumi uzrāda līdzvērtīgas IC₅₀ vērtības starp Plm subtipiem, turklāt selektivitāte pret Cat D saglabājas robežās no 10 līdz 50 reizēm.

Citu hidroforu aizvietotāju pievienošana 7-pozīcijas fenilgrupai *para*- stāvoklī (5. tab.) deva vājākus vai līdzvērtīgi aktīvus Plm II inhibitorus.

Interesantus rezultātus uzrādīja inhibitori ar fenil-alkil aizvietotājiem pie 7-pozīcijas fenilgrupas inhibitoros **16s** un **16t**. Tie ir samērā vāji Plm I un Plm II inhibitori, bet spēcīgi Plm IV inhibitori. Šāds rezultāts norāda, ka Plm IV vārsta kabatā var novietoties lielāki aizvietotāji kā Plm I vai Plm II. Šie bija pirmie inhibitori iegūto 2-aminohinazolīnonu rindā, kuriem novērojām izteiktu selektivitāti starp Plm subtipiem ar samērā līdzīgu aminoskābju sekvenci. Arī literatūrā atrodama vārsta kabatas aizvietotāju salīdzinošā analīze un ir novērots, ka lielākā nozīme ir alkilvirknes garumam [30].

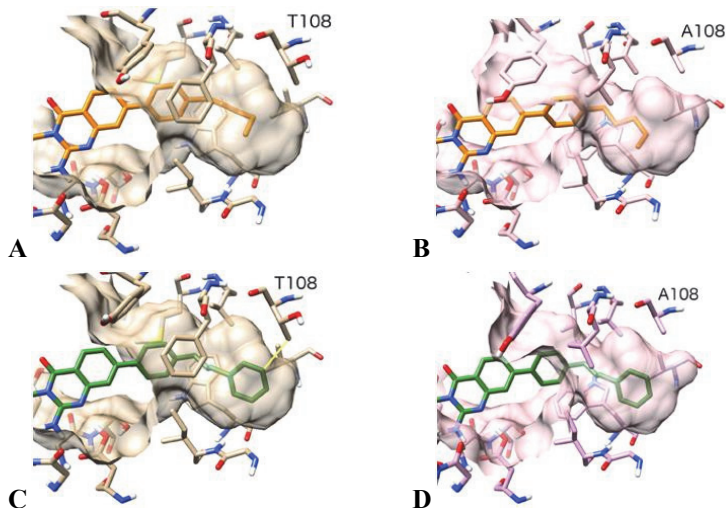
5. tabula. *Para*- aizvietotu 7-fenil-2-aminohinazolīn-4(3H)-onu inhibitorā aktivitāte.



N. p. k.	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM)			
			Plm II	Plm I	Plm IV	Cat D
1 <i>rac</i> -16a	F ₃ C	H	1,30	–	–	–
2 16b ^a		Ph	3,10	1,40	2	8,4
3 <i>rac</i> -16c	CF ₃ O	H	0,60	–	–	–
4 <i>rac</i> -16d		Ph	0,55	0,60	0,7	9,5
5 <i>rac</i> -16e	NH ₂ OC	H	n.a.	–	–	–
6 <i>rac</i> -16f	MeO	H	3,90	–	–	–
7 <i>rac</i> -16g	Et	H	2,30	–	–	–
8 16h ^a		Ph	2,00	1,30	1,30	5,2
9 <i>rac</i> -16i	<i>n</i> Bu	Ph	0,23	0,30	0,20	2,2
10 <i>rac</i> -16j ^b	<i>n</i> Pent	H	0,50	0,20	0,18	–
11 <i>rac</i> -16k		Ph	0,15	0,30	0,10	5,0
12 <i>rac</i> -16l ^b	<i>c</i> Hex	Ph	2,40	0,50	0,80	8,6
13 <i>rac</i> -16m ^b		Ph	10,7	9,40	1,20	100
14 <i>rac</i> -16n ^b		Ph	0,40	0,48	0,30	3,2
15 <i>rac</i> -16o ^b		Ph	0,60	1,40	0,40	n.a.
16 <i>rac</i> -16p ^b		Ph	2,00	2,00	0,70	n.a.
17 <i>rac</i> -16r ^b		H	0,70	1,30	0,10	–
18 <i>rac</i> -16s ^b		Ph	10,0	3,20	0,13	6,0
19 <i>rac</i> -16t ^b		Ph	32,0	6,50	0,40	91
20 <i>rac</i> -16u ^b		Ph	12,0	36,0	2,00	52
21 <i>rac</i> -16v ^b		Ph	0,42	1,30	0,80	5,0

^adiastereomēru maisījums; ^bsavienojums iegūts sadarbībā ar O. Borysov

Lai iegūtu skaidrojumu savienojumu **16s** un **16t** selektivitātei starp Plm subtipiem, tika izveidots Plm IV homologijas modelis,³ izmantojot pieejamo Plm II struktūru (2BJU) kā templātu (Plm IV atvērtas konformācijas kristālstruktūra nav zināma). Iegūtais modelis parādīja (9. att., B, D), ka Plm IV gadījumā vārsta kabata ir plašāka, jo Plm II Thr108 atlikuma vietā ir Ala108 atlikums, kas atvieglo inhibitoru **16s** un **16t** Ph-alkilgrupas ievietošanos.



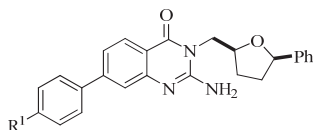
9. att. Plm II un Plm IV vārsta kabatas salīdzinājums: (A) Plm II un **16k**, (B) Plm IV un **16k**, (C) Plm II un **16s** – ar dzeltenu līniju norādīta sadursmes vieta, (D) Plm IV un **16s**.

Sākotnēji izvirzītais mērķis pilnveidot skrīningā atrasto struktūru **1** līdz inhibitoram ar IC₅₀ vērtību vismaz 100 nM tika sasniegts.

Izvēlētiem, aktīvākajiem Plm inhibitoriem **16j,k,s,t** tika noteikta spēja inhibēt *P. Falciparum* augšanu asinsšūnu testā (6. tab.). Šajā testā savienojumi uzrādīja aptuveni ~1 μM inhibēšanas konstanti. Savienojumi **16j** un **16k** ir spēcīgi visu triju plazmepsīnu inhibitori, savukārt **16s** un **16t** ir selektīvi Plm IV inhibitori. Savukārt *P. Falciparum* augšanas inhibēšanā visi uzrādīja līdzīgas vērtības, līdz ar to var izvirzīt hipotēzi, ka Plm IV un (vai) tam strukturāli līdzīgākie (Plm IX, Plm X) varētu būt galvenie izstrādāto inhibitoru bioloģiskie mērķi, kas atbildīgi par parazīta augšanas inhibēšanu asinsšūnu testos.

³Sadarbībā ar LOSI Fizikāli Organiskās Ķīmijas laboratoriju K. Jaudzema vadībā.

6. tabula. *P. Falciparum* 3D7 augšanas inhibēšana un citotoksicitātes rādītāji.



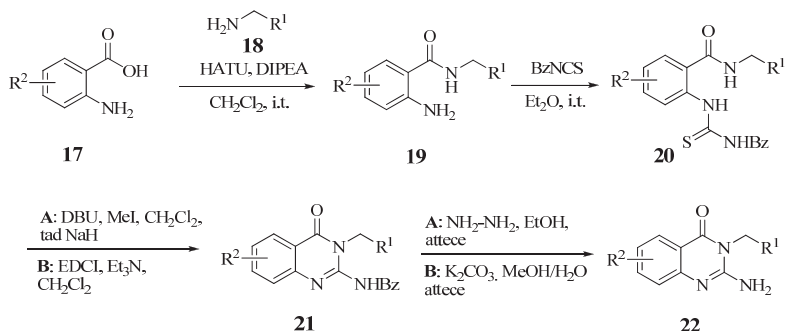
R^1		<i>n</i> Bu- <i>rac</i> - 16j	<i>n</i> Pent- <i>rac</i> - 16k	 <i>rac</i> - 16s	 <i>rac</i> - 16t
<i>P. Falciparum</i> 3D7 augšanas inhibēšana ^a	EC₅₀ (μ M)	0,9	1,1	1,2	3,9
Citotoksicitāte ^b	EC₅₀ (μ M)	2205	2139	13	>1888

^a Noteikts, izmantojot *SYBR Green I* testu ar inkubācijas laiku 96 h; ^b noteikta uz *Swiss Albino* peļu embriju šūnām (3T3).

Noteicām arī izvēlēto inhibitoru citotoksicitāti embriju šūnu augšanas testos. Savienojumi bija praktiski netoksiski, izņemot savienojumu **16s**. Iegūtie rezultāti šūnu testos norāda, ka 2-aminohinazolīn-4(3H)-oniem ir augsts potenciāls antimalārijas zāļvielu izveidei.

8. 2-Aminohinazolīn-4(3H)-onu atvasinājumu sintēze

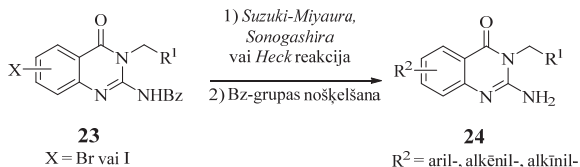
2-Aminohinazolīn-4(3H)-oni tika sintezēti no antranilskābju amīdiem **19**, kas reakcijā ar benzoilizotiocinātu veidoja tiourīnvielas starpproduktus **20**. Starpsavienojumi **20** tika ciklizēti par attiecīgajiem 2-aminohinazolīn-4(3H)-oniem **21**, aktivējot tiolu ar divām metodēm: a) izmantojot DBU kā bāzi alkilēšanai ar MeI un NaH amīda deprotonēšanai; b) izmantojot Et₃N un EDCI kā aktivējošo reagentu.



1. shēma. 2-Aminohinazolīn-4(3H)-onu iegūšanas vispārīgā shēma.

Benzoilgrupas nošķelšana savienojumā **21** tika veikta, izmantojot hidrazīna hidrātu etanolā (1. shēma, metode A) vai K_2CO_3 , vārot metanolā (metode B).

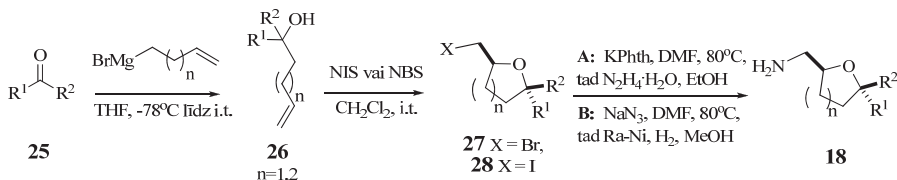
No 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu būvblokiem **23**, kas iegūti no bromīdu vai jodīda funkciju saturošām antranilskābēm, tika iegūta analoģu sērija **24**, modificējot halogēnu pēdējās sintēzes stadijās, izmantojot *Suzuki-Miyaura*, *Sonogashira* vai *Heck* reakcijas (2. shēma).



2. shēma. 2-Aminohinazolīn-4(3H)-onu modificēšana pēdējās stadijās.

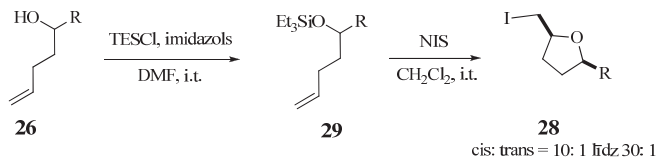
8.1. Tetrahidrofurfurilamīna atvasinājumu sintēze

3-Aizvietotu 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu atvasinājumu sintēzei nepieciešamie amīni **18** tika iegūti no aldehīdiem vai ketoniem **25**, kas reakcijā ar Grinjāra reaģentu deva spirtus **26** (3. shēma). Tie NIS vai NBS veicinātā ciklizēšanā veidoja attiecīgos bromīdus **27** vai jodīdus **28** kā diastereomēru maisījumu, kurā *trans* diastereomērs ir pārākumā (*cis*: *trans* = no 1: 1 līdz 1: 4). Iegūtie jodīdi **28** tika pārvērsti par attiecīgajiem amīniem **18**, sākumā veicot halogēna nomainīšanu pret azīdu un tad starpproduktu reducējot ar Ra-Ni un H_2 (3. shēma (B)), savukārt bromīdi **27** tika transformēti par amīniem, izmantojot Gabriela metodi (3. shēma (A)).



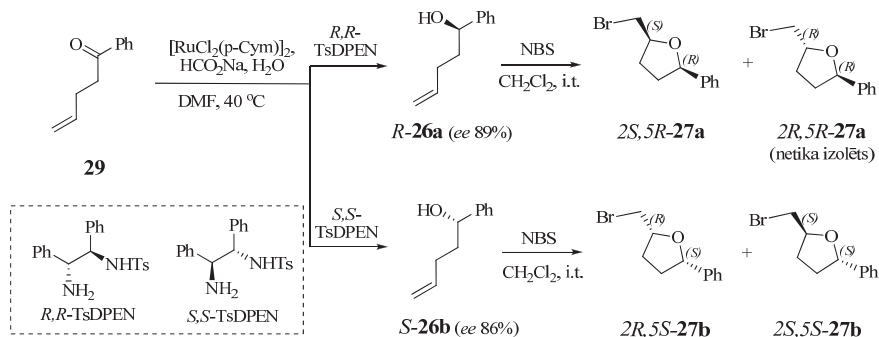
3. shēma. Tetrahidrofurfurilamīnu **18** iegūšana.

Selektīvai *cis*- diastereomēru iegūšanai tika izmantota modificēta literatūras procedūra [31]. Ciklizējot TES aizsargātus spirtus **29**, attiecīgie jodīdi **28** tika iegūti ar augstu diastereoselektivitāti (4. shēma). Pēc produktu hromatogrāfiskas attīrīšanas tika iegūti tīri *cis*- diastereomēri, kas transformēti par attiecīgajiem amīniem pēc 3. shēmā aprakstītās pieejas.



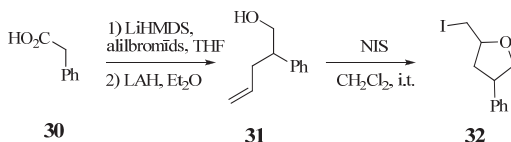
4. shēma. Diastereoselektīva 2-(jodmetil)tetrahydrofurānu **28** iegūšana.

Enantiobagātināti tetrahydrofurānu atvasinājumi **2S,5S-27b**, **2R,5S-27b** un **2S,5R-27a** tika sintezēti no ketona **29**, ko reducē, izmantojot *Noyori* metodi ar hirāliem rutēnija-diamīnu kompleksiem (*R,R*- un *S,S*-TsDPEN) kā katalizatoriem un nātrija formiātu kā hidrīda avotu (5. shēma) [32,33]. Iegūtie enantiobagātinātie spirti **R-26a** un **S-26b** tika ciklizēti ar NBS un diastereomērie bromīdi **27** tika hromatogrāfiski atdalīti.



5. shēma. Enatiobagātinātu 2-(brommetil)tetrahydrofurānu iegūšana.

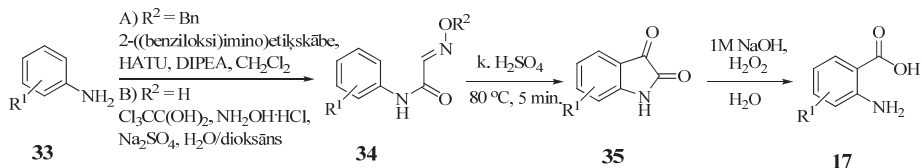
Jodīds **32** tika iegūts kā diastereomēru maisījums no feniletikskābes **30**, to alkilējot ar alilbromīdu un tad reducējot ar LAH līdz spirtam **31** (6. shēma) [34]. Spirts **31** tālāk tika ciklizēts par attiecīgo jodīdu **32**, izmantojot NIS (*cis*: *trans* = 10: 3), un no jodīda **32** tika iegūts nepieciešamais amīns pēc 3. shēmā aprakstītās metodes.



6. shēma. 4-Fenilaizvietota tetrahydrofurāna **32** iegūšana.

8.2. Antranilskābju sintēze no izatīniem

5- un 8-aizvietotu 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu sintēzei nepieciešamās antranilskābes **17** tika iegūtas no izatīniem **35**, kas sintezēti pēc *Sandmeyer* metodes (7. shēma) [35]. Šim nolūkam attiecīgie anilīni **33** tika transformēti par starpproduktiem **34**, acilējot ar 2-(benziloksi)imino)etiķskābi [36] (metode A) vai izmantojot reakciju ar hlorālhidrātu un hidroksilamīna hidrohlorīdu (metode B).



7. shēma. Izatīnu un antranilskābju iegūšana.

8.3. Antranilskābju atvasinājumu iegūšana C-H aktivēšanas reakcijās

2-Aminohinazolīn-4(3H)-onu 5-pozīcijas modificēšanai nepieciešamo 6-jod-antranilskābju atvasinājumu **42** iegūšanai tika veikti C-H aktivēšanas pētījumi.

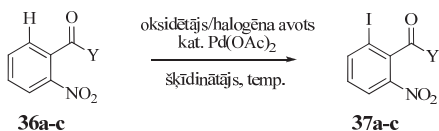
No literatūras zināms, ka benzoscābes [37], dažādi benzamīdu atvasinājumi, piemēram, *N*-tozilbenzamīdi [38–40] un *N*-alkilbenzamīdi [41–44], tiek sekmīgi izmantoti kā virzošās grupas C-H aktivēšanas reakcijās. Tomēr jāatzīmē, ka benzamīdu *N*-alkilgrupu klāsts zināmajos piemēros ir diezgan ierobežots.

Sākotnēji kā modeļsubstrāts C-H aktivēšanas/ jodēšanas apstākļu piemeklēšanai tika izvēlēta 2-nitrobenzoscābe (**36a**) (7. tab., 1. rinda). Diemžēl, variējot katalizatoru un oksidētāju daudzumus, kā arī reakciju laiku un šķīdinātājus, pilnu izejvielas konversiju neizdevās panākt.

Kā subtrātu izmantojot *N*-mezilbenzamīdu **36b** (7. tab., 2. rinda), izdevās optimizēt reakcijas apstākļus (2 ekviv. NIS, 10 mol% Pd(OAc)₂, DMF, 100 °C, 24h) un panākt pilnu izejvielas konversiju par produktu. Diemžēl produkts **37b** tika izolēts tikai ar vidēju iznākumu (53 %), jo polaritātes dēļ to ir grūti atdalīt no reakcijas maisījuma.

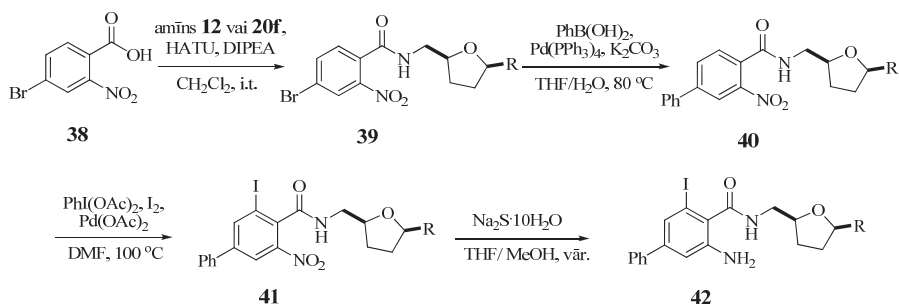
N-Alkil-2-nitrobenzamīdu **36c** (7. tab., 3. rinda) *orto*-jodēšana jau piemeklētajos – labākajos C-H aktivēšanas apstākļos (1 ekviv. PhI(OAc)₂ un I₂, 10 mol% Pd(OAc)₂, DMF, 100 °C, 24h) bija sekmīga. To starpā arī Plm inhibitoru sintēzei nepieciešamais *N*-CH₂-THF benzamīds veidoja atbilstošo jodēšanas produktu ar labu iznākumu (86 %).

7. tabula. C-H aktivēšanas pētījumu īss kopsavilkums.



N. p. k.	Izejviela	Konversija ^a , %	Secinājumi
1		36–66	nepilna konversija, nevar atdalīt no izejvielas
2		0–100	zems izdalītais iznākums, problemātiska Ms grupas nošķelšana
3		24–86	produkts hromatogrāfiski izdalāms, atgūstot izejvielu

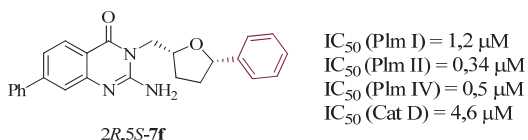
Balstoties uz izstrādāto 6-jod-antranilskābes atvasinājumu iegūšanu C-H aktivēšanas reakcijā, tika iegūti 6-jod-antranilskābes amīdi **42** (8. shēma). Sākumā komerciāli pieejamā 4-brom-2-nitrobenzoscābe (**38**) tika transformēta par nepieciešamajiem amīdiem **40**. No tiem C-H aktivēšanas/jodēšanas reakcijā tika iegūti jodētie starpprodukti **41**, kuriem nitrogrupa tika reducēta ar nātrija sulfīdu. Iegūtie antranilskābju amīdi **42** transformēti par attiecīgajiem 2-aminohinazolīn-4(3H)-oniem pēc iepriekš izstrādātās metodes (1. un 2. shēma).



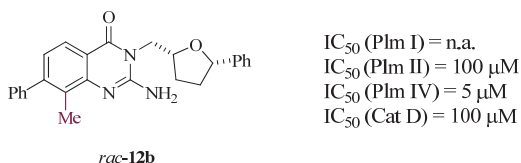
8. shēma. 6-Jod-antranilskābju amīdu **42** iegūšana.

SECINĀJUMI

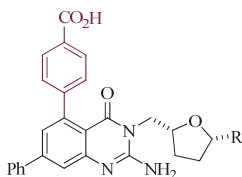
- 1) Ar kodolmagnētiskās rezonanses fragmentu skrīninga metodi identificētie 2-aminohinazolīn-4(3H)-oni ir jauna plazmepsīnu I, II un IV inhibitoru klase ar labu selektivitāti pret Katepsīnu D.
- 2) Iegūta liganda-plazmepsīna II ko-kristāla rentgenstruktūra, kas norāda, ka 2-aminohinazolīn-4(3H)-oni saistās ar atvērtas konformācijas enzīmu, kur 2-aminogrupa un 1*N* veido ūdeņraža saites ar enzīma katalītiskajiem aspartāta atlikumiem.
- 3) Veicot modifikācijas 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu trešās pozīcijas aizvietotājiem, noskaidrots, ka augstāku inhibēšanas spēju uzrāda savienojumi ar *N*-(5-feniltetrahidrofurānīl)metil-grupu. Fenilgrupa vērsta S1' kabatā un veido π - π mijiedarbības ar Phe294.



- 4) Labāku inhibitoro aktivitāti uzrāda 2-aminohinazolīn-4(3H)-oni ar *cis*-konfigurācijas aizvietotājiem tetrahidrofurānā. No abiem *cis*-konfigurācijas enantiomēriem izomērs 2*R*,5*S*- uzrāda augstāku inhibitoro aktivitāti salīdzinājumā ar tā 2*S*,5*R*- enantiomēru.
- 5) Aizvietotāju ievadīšana 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu astotajā pozīcijā izraisa inhibitorās aktivitātes samazināšanos.



- 6) 2-Aminohinazolīn-4(3H)-onu piektā pozīcija vērsta šķīdinātāja virzienā un augstāku inhibitoro aktivitāti uzrāda savienojumi ar skābes funkciju.

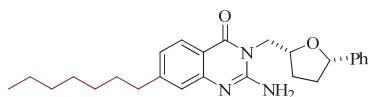


R = H; *rac*-**10d**
R = Ph; *rac*-**11d**

R = H	R = Ph
IC ₅₀ (Plm I) = 3,5 μM	IC ₅₀ (Plm I) = 0,6 μM
IC ₅₀ (Plm II) = 0,33 μM	IC ₅₀ (Plm II) = 0,28 μM
IC ₅₀ (Plm IV) = 1,4 μM	IC ₅₀ (Plm IV) = 0,5 μM
IC ₅₀ (Cat D) = 100 μM	IC ₅₀ (Cat D) = 20 μM

- 7) Piekajā pozīcijā aizvietotu 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēte norāda, ka inhibitoru izstrādē ir iespējams izmantot neaizvietotu 3-tetrahidrofurfuril-grupu. Šīs atvasinājumu sērijas pārstāvji uzrāda uzlabotu selektivitāti pret katepsīnu D, un aizvietotas/neizvietotas tetrahidrofurānil-grupas savienojumi uzrāda līdzvērtīgas plazmepsīnu inhibitorās aktivitātes.

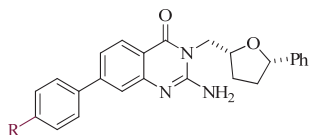
- 8) 7-Alkil-2-aminohinazolīn-4(3H)-oni uzrāda augstu plazmepsīnu inhibitoro aktivitāti, taču tiek zaudēta selektivitāte pret katepsīnu D, kas ir netipiski nepeptidomimētiskajiem inhibitoriem ar iestrādātu vārsta kabatu aizpildošu alkil-grupu.



rac-**14e**

IC ₅₀ (Plm I) = 0,085 μM
IC ₅₀ (Plm II) = 0,12 μM
IC ₅₀ (Plm IV) = 0,26 μM
IC ₅₀ (Cat D) = 0,5 μM

- 9) 7-(*p*-Alkil)fenil-2-aminohinazolīn-4(3H)-oni ir aktīvi plazmepsīnu I, II, IV inhibitori, savukārt 7-(*p*-fenilalkil)fenil-2-aminohinazolīn-4(3H)-oni ir selektīvi plazmepsīna IV inhibitori. Izveidotais Plm IV molekulārais modelis parāda, ka Plm IV gadījumā vārsta kabata ir plašāka, kas ļauj tajā izvietot *p*-fenilalkil grupas un dod iespēju iegūt Plm IV selektivitāti starp citiem gremošanas plazmepsīnu subtipiem.



R = *n*Pent; *rac*-**16k**
R = Ph-C₆H₅; *rac*-**16s**

R = <i>n</i> Pent	R = Ph-C ₆ H ₅
IC ₅₀ (Plm I) = 0,3 μM	IC ₅₀ (Plm I) = 3,2 μM
IC ₅₀ (Plm II) = 0,15 μM	IC ₅₀ (Plm II) = 10,0 μM
IC ₅₀ (Plm IV) = 0,10 μM	IC ₅₀ (Plm IV) = 0,13 μM
IC ₅₀ (Cat D) = 5,0 μM	IC ₅₀ (Cat D) = 6,0 μM
EC ₅₀ (Pf) = 1,1 μM	EC ₅₀ (Pf) = 1,2 μM

- 10) Parazīta augšanas inhibēšana asinsšūnu testos vislabāk korelē ar plazmepsīnu IV inhibēšanas spēju. Tas norāda, ka vai nu tieši Plm IV no gremošanas plazmepsīniem ir kritiskais zāļu vielu mērķis, vai arī Plm IV ir labs modeļproteīns strukturāli līdzīgo ne-gremošanas plazmepsīnu IX, X inhibitoru izveidei.
- 11) 3-Aizvietotu-2-aminohinazolīn-4(3H)-onu atvasinājumu iegūšanai ērta un vispārīga pieeja ietver amīda veidošanu no antranilskābes un 2-aminometil-tetrahidofurāna būvblokiem ar sekojošu anilīna aminogrupas transformāciju par tiourīnvielu un cikla saslēgšanu.
- 12) *O*-TES aizsargātu nepiesātinātu spirtu iekšmolekulāra oksijodēšanas reakcija ar *N*-jodsukcīnimīdu iefektīva literatūras metodes modifikācija diastereoselektīvai *cis*-2-(jodmetil)-5-feniltetrahidrofurānu un *cis*-2-(jodmetil)-5-izopropil-tetrahidrofurānu iegūšanai (*cis*: *trans* līdz 30:1).
- 13) Palādijs katalizēta C-H aktivēšanas/jodēšanas reakcija ir ērta metode 6-jod-2-nitrobenzamīdu iegūšanai, kas ir nepieciešami kā būvbloki 5-jod-2-aminohinazolīn-4(3H)-onu konstruēšanai un ļauj vaikt 2-aminohinazolīn-4(3H)-onu piektās pozīcijas modificēšanu sintēzes pēdējās stadijās.

DOCTORAL THESIS
PROPOSED TO RIGA TECHNICAL UNIVERSITY FOR THE PROMOTION
TO THE SCIENTIFIC DEGREE OF DOCTOR OF CHEMICAL SCIENCES

To be granted the scientific degree of Doctor of Chemical Sciences, the present Doctoral Thesis will be defended at a public session on 22 December 2016 at the Faculty of Materials Science and Applied Chemistry of Riga Technical University, 3 Paula Valdena Street, Room 272.

OFFICIAL REVIEWERS

Professor, *Dr. habil. chem.* Raimonds Valters
Latvian Academy of Sciences

Professor, *Dr. chem.* Edgars Suna
University of Latvia

Assistant Professor, *Dr. chem.* Mara Plotniece
Riga Technical University

DECLARATION OF ACADEMIC INTEGRITY

I hereby declare that the Doctoral Thesis submitted for the review to Riga Technical University for the promotion to the scientific degree of Doctor of Chemical Sciences is my own and does not contain any unacknowledged material from any source. I confirm that this Thesis has not been submitted to any other university for the promotion to other scientific degree.

Dace Rasina

Date:

GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS

Introduction

Malaria is one of the most devastating infectious diseases caused by *Plasmodium* parasites and transmitted by the mosquitos *Anopheles*. The main symptoms of malaria are fever and vomiting but in the worst cases it can lead to deep coma or even death. The disease is spread in tropical and subtropical regions thus around half of world population lives in the infection risk zones. According to the WHO estimates, around 214 million cases of malaria occurred in 2015 and almost half million had a lethal outcome [1].

The oldest and commonly used antimalarial drugs are quinine and artemisinin, natural products isolated from the plants that were used for the treatment of malaria symptoms for centuries. Currently, numbers of synthetic antimalarial drugs have been developed; however, for most of them the exact mechanism of action and the biological target are not known. In the past decades, new chemotypes of antimalarials have been identified by screening compounds *in vitro* and in cell assays on parasite strains [2–4].

As a consequence of Malaria eradication efforts, since 2000 mortality caused by malaria has been reduced by 60 % [1]. Nevertheless, the parasite strains resistant to currently available antimalarial drugs are spreading. To date, the only effective treatment of resistant malaria is based on artemisinin combination therapy; however, recently appearance of resistance also to this group of medicines has been registered in several regions [1]. This indicates the urgent need for antimalarial agents with novel mechanism of action, acting on yet unexplored molecular targets [1]. Malarial aspartic proteases – plasmepsins (Plm) are considered to be promising biological targets [3] and were selected as objects of this research project for the development of new inhibitors as potential antimalarial drugs.

There are 10 plasmepsin subtypes encoded in the *P. falciparum* genome. Digestive plasmepsins (Plm I, Plm II, Plm IV) and histo-aspartic protease (HAP or Plm III) are involved in cleavage of hemoglobin to provide amino acids for protein biosynthesis. Digestive plasmepsins are the most studied subtypes; methods for expression are well defined providing material for biological and structural research. Plm I-IV shares high sequence similarity (70 % to 79 %), and all are considered to be potential drug targets [3,5,7–12].

Apart from digestive plasmepsins, there are six additional Plm subtypes (V, VI, VII, VIII, IX, and X). The role and mechanism of Plms V-X are less known. Recent investigations have established the function of Plm V showing that it is essential for parasite survival [13–15]. Plasmepsin subtypes Plm IX and X share the highest sequence homology with the digestive plasmepsins, while Plm V is more distant. Thus, it may be possible that digestive plasmepsin inhibitors can also inhibit Plm IX and X.

Previous studies demonstrate that inhibitors of digestive Plms I-IV suspend the parasite growth; however, the knockout studies have indicated that hemoglobin digestion by plasmepsins has redundant mechanisms thereby inhibition of only one subtype is not enough to kill the parasite. Furthermore, correlation between enzymatic assays of digestive plasmepsin inhibition and parasite growth tests is not always observed indicating that the crucial biological target might be one of structurally similar non-digestive plasmepsin subtypes [3,16,17].

Selectivity of Plm inhibitors against human aspartic proteases – Cathepsin D and E (Cat D and Cat E) is an important requirement to provide Plm inhibitors with fewer side effects. Although sequence homology of Plm II and Cathepsin D is about 35 %, the X-ray structures indicate high similarity in the enzyme active centre.

Plm inhibitors can be divided into two groups – peptidomimetic and non-peptidomimetic. Peptidomimetic inhibitors mainly show lower selectivity against Cat D and are less effective in cell assays compared to nonpeptidomimetic inhibitors. The X-ray structures of peptidomimetic inhibitors with Plm indicate that these inhibitors bind to closed enzyme conformation where the catalytic site is covered by a flexible loop called a flap. In recent years, several series of non-peptidomimetic plasmepsin inhibitors have been discovered. Many of these inhibitors bind to the enzyme open-flap conformation where the flap opening presents an additional flap pocket. Flap pocket can be occupied by the chemical groups, typically alkyl chains of the inhibitor to provide higher selectivity over other aspartic proteases [3,16,17,5,7–12].

Aim and Tasks

The aim of the Doctoral Thesis is to develop novel nonpeptidomimetic plasmepsin inhibitors.

In order to achieve the aim, the following tasks have been set:

- To perform NMR fragment based screening on plasmepsin II.
- To develop and apply the method for the synthesis of selected compound and its derivatives. To improve selected hit to the inhibitor with IC₅₀ value at least 100 nM.
- To determine inhibitory activities of new compounds on plasmepsin I, II, IV and Cathepsin D. To determine cytotoxicity and *P. Falciparum* growth inhibition for the most promising inhibitors.
- To analyse structure-activity relationships and use SAR observations in the structure-based design of new inhibitors.

Scientific Novelty and Main Results

NMR fragment screening provided 10 new structures of the potential plasmepsin II inhibitors. 2-Aminoquinazolin-4(3H)-one was selected for the further optimisation. Derivatives of 2-aminoquinazolin-4(3H)-one were synthesised using information from molecular modelling and SAR. Co-crystal of inhibitor with Plm II was obtained and the X-ray structure of the complex was solved, indicating that inhibitor bound to open flap enzyme conformation, and this provided directions for the further optimisation. Structure-activity relationships were explored for 3rd, 5th and 7th position substituents of 2-aminoquinazolin-4(3H)-one. Selective plasmepsin IV inhibitor was obtained. In conclusion, series of digestive plasmepsin inhibitors were developed where the best compounds showed a nanomolar inhibitory activity in enzymatic assays, around 1 μ M inhibition activity in *P. Falciparum* growth test, low cytotoxicity and good selectivity against human aspartic protease – Cathepsin D. The obtained results indicated that 2-aminoquinazolin-4(3H)-one based plasmepsin inhibitors have high potential for the development of new anti-malarial drugs.

MAIN RESULTS OF THE THESIS

1. Fragment Screening

NMR-based fragment screening⁴ was performed using commercially available ChemBridge fragment library, containing 1000 Astex Ro3 [18] compliant compounds. NMR-based method was selected as one of the most sensitive method that allowed identifying relatively weak interactions between ligand and enzyme by recording spectra of the fragment [19,20]. Fragments were screened against malarial aspartic protease – Plasmepsin II (Plm II).

The screening was done with mixtures of six fragments and spectra were recorded for every sample in the absence and presence of Plm II. Binding specificity of all binders was evaluated by competition experiments with pepstatin A, which is was a potent aspartic protease inhibitor. Three different spectra were recorded for every sample to avoid false positive results: 1) STD (*Saturation Transfer Difference*); [21] 2) $T_1\rho$ [22] and 3) WaterLOGSY (*Ligand Observed via Gradient Spectroscopy*) [23,24]. Fragments that showed binding to the Plm II by at least two NMR techniques were retested as single compounds.

Fragment screening revealed 85 unspecific fragments and 49 fragment hits that bound to the Plm II active site. Those hits were further tested in enzymatic assays, which disclosed 10 compounds showing measurable inhibitory activity ($IC_{50} = 24\text{ }\mu\text{M}$ to $200\text{ }\mu\text{M}$). 2-Aminoquinazolin-4(3H)-one **1** with the highest potency and ligand efficiency was selected for further development (Fig. 1).

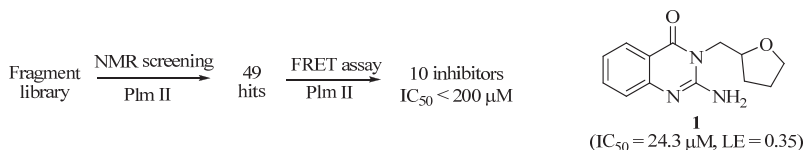


Fig. 1. Summary of fragment screening and fragment hit **1**.

NMR competition experiments in pairs with other fragment hits were performed to find fragments that could be further linked or merged with the 2-aminoquinazolin-4(3H)-one **1**. It was found that fragment **1** and **2** did not share the same binding site; moreover, an interligand NOE was observed between H-7 of fragment **1** and H-5 of fragment **2** in the ^1H - ^1H NOESY spectrum, indicating the close proximity of two fragments **1** and **2** (Fig. 2).

⁴in collaboration with LIOS Department of Physical Organic Chemistry (K. Jaudzems)

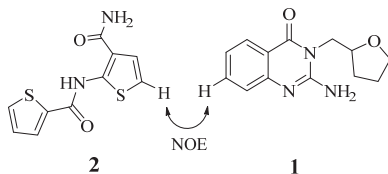


Fig. 2. The observed interligand NOE of fragment hits **1** and **2** in enzyme active site.

All attempts to co-crystallise fragment **1** with Plm II failed and exact binding mode of the hit could not be obtained by X-ray crystallography. However, NOE experiment gave a hint that there was an additional pocket around 7-position of the fragment **1** that could be optimised by substituents – bioisosters of thiophene.

2. Initial Optimisation of Fragment Hit 1

Initial optimisation of hit **1** provided four analogues **3-6** with substituents at 7-position (Fig. 3). Attachment of bromide function at 7-position gave compound **3** with 4-fold increased activity ($IC_{50} = 5.9 \mu M$) compared to hit **1** from NMR-screening. Exchange of bromide to phenyl group as a bioisoster of thiophene resulted in even more active inhibitor **4** with 10-fold increased potency against Plm II ($IC_{50} = 2.3 \mu M$).

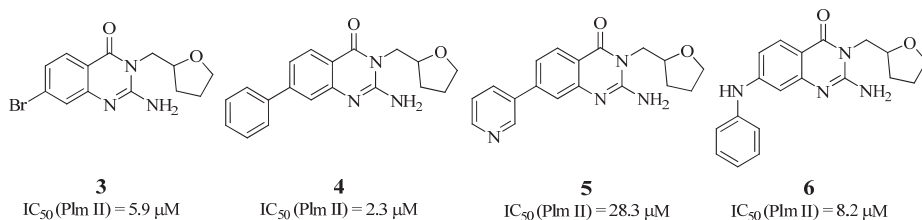


Fig. 3. Analogues of hit **1** and their Plm II inhibitory activities.

Improved fragment **4** was selected as a base structure for further development of Plm inhibitors and it was docked⁵ in the Plm II active site to determine the possible binding mode. Two available X-ray structures of the Plm II (2BJU – open and 1LEE – closed flap) were used and both provided high-quality binding modes where: a) tetrahydrofurfuryl- (THF) group was directed to S1' pocket in the open flap conformation (Fig. 4A) and b) the molecule was rotated 180° and 7-phenyl group was directed to S1' pocket in closed flap conformation (Fig. 4B). Both models indicated hydrogen-bond interaction between N1 and 2-amino groups of the 2-aminoquinazolin-4(3H)-one **4** and catalytic Asp34–Asp214 dyads.

⁵in collaboration with LIOS Department of Physical Organic Chemistry (K. Jaudzems)

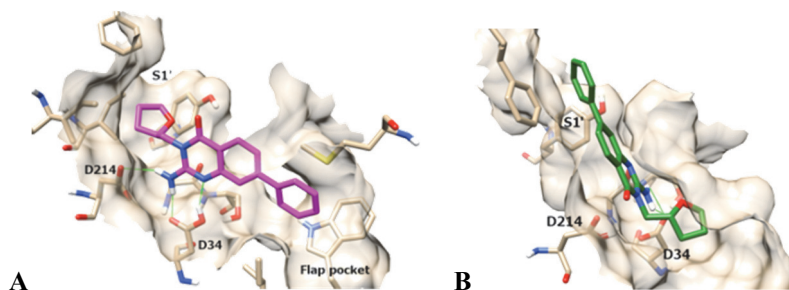


Fig. 4. The obtained binding modes of compound **4** in the Plm II active site: (A) open and (B) closed flap conformation.

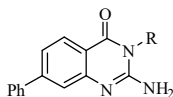
Both structures suggested that addition of any lipophilic substituent to the THF functionality might improve binding potency in compound **4**: A) lipophilic substituent would occupy S1' pocket and interact with Ph294 and Tyr192 dyads, and B) it would explore S1 pocket and interact with Trp41 dyad.

3. SAR of the 3-Position Substituents of 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones

Addition of lipophilic substituents to the THF-group and modifications at 3-position of 2-aminoquinazolin-4(3H)-one provided analogues **7a-k** (Table 1). From these series compound **7a** bearing unsaturated furan moiety showed similar IC₅₀ values to the saturated analogue **4**. Still, saturated furan functionality is more appropriate in the development of inhibitors due to the chemical and metabolic stability [25].

Phenyl group at 4-position of the THF-group resulted in less active compound **7c**, while compound **7f** with *cis*-phenyl group at the 5-position of the THF group was found to be the most potent Plm II inhibitor. The corresponding *trans*-diastereomer **7e** was considerably less potent. Both enantiomers of the active diastereomer **7f** were prepared and enantiomer *2R,5S-7f* was found to be a 10-fold better inhibitor than *2S,5R-7f*. Other analogues with substituents at the 5-position of the THF group (**7g-k**) showed decreased potency compared to inhibitor **7f**. Most probably the favourable interactions with amino acid dyads were not formed or the obtained analogues (**7g-k**) clashed with the surface of the enzyme.

It should be noted that in the above-mentioned series no selectivity between Plm subtypes (I, II and IV) was observed, although compounds **7c-g,j-k** displayed considerable selectivity for Plm II *versus* Cat D – human aspartic protease: Cat D/Plm II $\approx$ 10 (Table 1).

Table 1. Inhibitory Activities of 3-Substituted 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones

Entry		R	IC ₅₀ (μM)			
			Plm II	Plm I	Plm IV	Cat D
1	<i>rac-4</i>		2.3	-	-	-
2 ^a	7a		3.2	-	-	-
3	<i>rac-7b</i>		52.0	-	-	-
4 ^a	7c^b		12.5	52.0	20.0	>200
5	<i>rac-7e</i>		2.9	2.4	1.1	9.0
6	<i>2S,5S-7e</i>		2.3	4.3	3.0	17.0
7	<i>rac-7f</i>		0.57	1.3	0.6	13.8
8	<i>2R,5S-7f</i>		0.34	1.2	0.5	4.6
9	<i>2S,5R-7f</i>		3.0	4.6	2.7	22.0
10	<i>rac-7g</i>		2.5	3.7	1.3	19.5
11	<i>rac-7h</i>		11.5	-	-	-
12	7i^b		3.0	-	-	-
13 ^a	<i>rac-7j</i>		1.6	2.3	1.5	25.0
14 ^a	<i>rac-7k</i>		5.3	2.0	3.0	9.0
15 ^a	7d^b		4.0	6.4	2.0	20.0

^aprepared in collaboration with O. Borysov; ^bmixture of diastereomers

Different substituents in the aromatic ring of the most potent compound **7f** provided weaker inhibitors **8** (Fig. 5). More likely, even relatively small substituents clash with the enzyme and that results in decrease of potency. The obtained results indicate that unsubstituted phenyl derivative should be used in further studies.

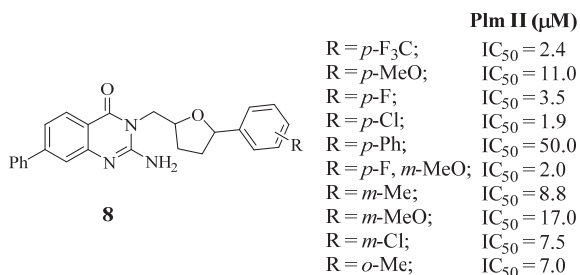


Fig. 5. Derivatives of the most potent inhibitor **7f** and their inhibitory activities.

4. Analysis of the Enzyme-Protein Co-crystal Structure

A co-crystal of inhibitor *rac*-**7f** with Plm II was successfully obtained and the X-ray structure of the complex was established in collaboration with prof. K. Tārs. The inhibitor molecule *rac*-**7f** is racemic and the electron density maps are well-defined for both enantiomers; however, *2R,5S*-**7f** enantiomer is used to visualise the complex as it showed higher activity in enzymatic assays.

The X-ray structure revealed that ligand **7f** bound to the Plm II in the open-flap conformation (Fig. 6 – green). In the open conformation, the active centre of the enzyme is uncovered and flap provides additional pocket – flap pocket [26]. The open-flap conformation has been previously reported only with inhibitors containing *n*-alkyl chains that fill in the flap pocket. However, complex with **7f** presents an open, unoccupied flap pocket that is wider than in the previously reported crystal structures.

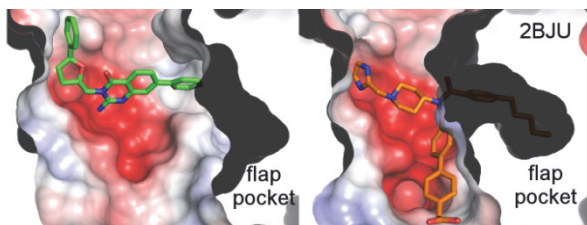


Fig. 6. X-ray structures of inhibitor – Plm II complex: compound *rac*-**7f** (green) and published compound bearing *n*-pentyl group (cyan, PDB ID 2BJU).

The co-crystal structure is in agreement with the docking results indicating that N1 and 2-amino groups form hydrogen bonds with the catalytic Asp34–Asp214 dyads.

The *N*-(5-phenyl-2-tetrahydrofuran-2-yl)methyl moiety interacts with the Tyr192, Phe294 and Ile300 residues in the S1' pocket, and 7-phenyl group forms hydrophobic interaction with Ile123 as well as an edge-to-face aromatic interaction with Trp41 located at the entrance of the flap pocket.

The obtained X-ray structure provided worthwhile information for the further optimisation possibilities: 1) 5-position of 2-aminoquinazolinone is pointed towards solvent molecules and there is free space for the addition of the substituent; 2) substituents of 8-position might be directed in S1 pocket (by analogy with 2BJU bi-phenyl group); 3) the flap pocket could be targeted by introducing hydrophobic groups (*n*-alkyl chains) in 7-position of 2-aminoquinazolinone scaffold.

5. SAR of the 5-Position Substituents of 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones

Compounds **9** containing substituted oxy-, amino-, sulphide group or iodide in the 5th position of 2-aminoquinazolinone showed potencies comparable to 2-aminoquinazolinone **7f** (R=H) without essential activity improvement or drop (Fig. 7).

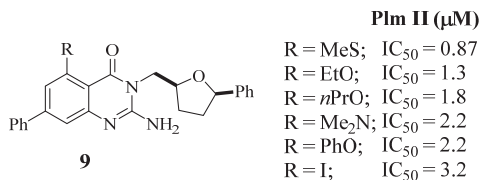
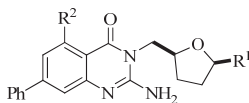


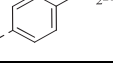
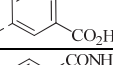
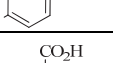
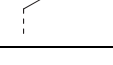
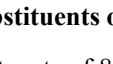
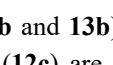
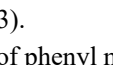
Fig. 7. SAR of 5-substituted 2-aminoquinazolin-4(3H)-ones.

Other derivatives **10a-g** and **11a,d,g** gave sub-micromolar IC₅₀ values (Table 2). Furthermore, the obtained results allowed making a preliminary conclusion on structure-activity relationship of 5-substituted compounds.

First, selectivity over Cat D is more than 100-fold when R¹ = H (**10a-g**), whereas if R¹ = Ph (**11a,d,g**) selectivity maintains between 10 to 50-fold over Cat D.

Second, inhibitors bearing phenyl group on THF ring (R¹ = Ph) **10a,d,g** show similar values to unsubstituted THF derivatives (R¹ = H) **11a,d,g**. This is opposite to the previously observed case where addition of phenyl in compound **4** gave four times more active compound **7f** (Table 1, entries 1 and 7). Probably substitution in 5-position shifts all molecules and it affects also THF group disturbing π-π interaction of phenyl and phenylalanine in S1' that results in the drop of activity. Those observations provide a possibility to use unsubstituted THF to improve selectivity by keeping potencies.

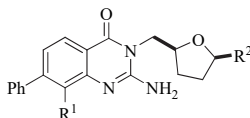
Table 2. Inhibitory Activities of 5-Substituted 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones

Entry	<i>rac</i>	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM)			
				Plm II	Plm I	Plm IV	Cat D
1	<i>rac-7f</i>	Ph	H	0.57	1.3	0.6	13.8
2	<i>rac-10a</i>	H		0.96	1.6	2.4	n.a.
3	<i>rac-11a</i>	Ph		0.77	1.5	0.95	13.3
4	<i>rac-10b</i>	H		0.55	2.8	1.8	68.0
6	<i>rac-10c</i>	H		0.82	2.0	1.0	93.0
7	<i>rac-10d</i>	H		0.33	3.5	1.4	100.0
8	<i>rac-11d</i>	Ph		0.28	0.6	0.5	20.0
9	<i>rac-10e</i>	H		0.5	1.0	1.5	98.0
10	<i>rac-10f</i>	H		0.6	3.4	2.5	n.a.
12	<i>rac-10g</i>	H		0.5	11.5	6.0	n.a.
13	<i>rac-11g</i>	Ph		0.4	1.0	0.6	11.0

6. SAR of the 8-Position Substituents of 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones

The hypothesis that substituents of 8-position might be directed to S1 pocket was not proven. Compounds (**12a,b** and **13b**) containing relatively small groups like MeO-, Me- or longer alkyl chain (**12c**) are weaker Plm inhibitors compared to the 8-unsubstituted compounds (Table 3).

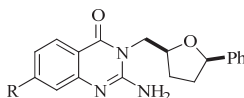
Intriguingly, that addition of phenyl moiety to compounds containing R¹ = Me group **12b** (R² = Ph) and **13b** (R² = H) gave exactly the opposite effect – an increase in IC₅₀ values almost 100 times compared to the previously observed decrease. Likely, substituents at 8-position make steric repulsion with protein and change position of the inhibitor.

Table 3. Inhibitory Activities of 8-Substituted 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones

Entry		R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM)			
				Plm II	Plm I	Plm IV	Cat D
1	<i>rac</i> -12a	OMe	Ph	3.2	7.2	2.2	12.0
2	<i>rac</i> -12b	Me	Ph	100.0	n.a.	5.0	100.0
3	<i>rac</i> -13b		H	4.3	32.0	5.0	80.0
4	<i>rac</i> -12c	<i>n</i> Pent	Ph	100.0	73.0	28.0	97.0

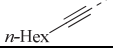
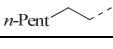
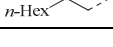
7. SAR of the 7-Position Substituents of 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones

Different substituents were introduced to 7-position of 2-aminoquinazolin-4(3H)-ones to target flap pocket of the enzyme (Table 4). All 7-substituted compounds (**14a-f**) are potent Plm inhibitors. Compounds **14e** and **14f** containing alkyl moiety give even better inhibitory activities than starting inhibitor **7f** but selectivity over Cat D is lost. This is an unexpected result as it is considered that Cat D does not make open conformation and flap pocket as well as it is known that Plm inhibitors with alkyl chains filling flap pocket typically are very selective towards Cat D [26–29]. Compounds **14e** and **14f** would be interesting to develop as Cat D inhibitors but that is outside the scope of the present research.

Table 4. Inhibitory Activities of 7-Substituted 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones

Entry		R	IC ₅₀ (μM)			
			Plm II	Plm I	Plm IV	Cat D
1	<i>rac</i> -7f		0.57	1.30	0.60	13.8
2	<i>rac</i> -14a		0.50	1.10	0.40	4.3
3	<i>rac</i> -14b		0.80	-	-	-

Table 4. (continued)

Entry	R	IC ₅₀ (μM)			
		Plm II	Plm I	Plm IV	Cat D
4	<i>rac</i> - 14c 	0.80	0.38	1.20	4.3
5	<i>rac</i> - 14d 	0.40	0.30	0.60	3.0
6	<i>rac</i> - 14e 	0.12	0.085	0.26	0.5
7	<i>rac</i> - 14f 	0.088	0.08	0.11	0.4

As 7-alkyl substituted 2-aminoquinazolin-4(3H)-ones provided unselective inhibitors, we proceed with **7f** scaffold. Besides, as previous results did not convince of the necessity of phenyl group at THF, both substituted and unsubstituted analogues were examined.

Inhibitors **15** with *meta*- or *ortho*- substituted 7-phenyl group showed a slight drop in potencies (Fig. 8). Later molecular modelling proved that *meta*-substituents make steric clash with the enzyme.

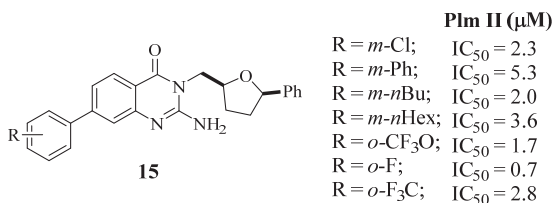
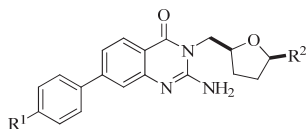


Fig. 8. Inhibitory activities of *ortho*- and *meta*-substituted 7-phenyl-2-aminoquinazolin-4(3H)-ones.

The introduction of the alkyl substituents at the *para*-position of the 7-phenyl group (**16i** and **16k**) improved the Plm II inhibitory activity up to 3 times (Table 5, entries 9, 11). Those compounds showed no selectivity between Plm subtypes and selectivity over Cat D maintaining between 10- to 50-fold.

Other results were obtained for phenyl-alkyl substituents at 7-position (Table 5, entries 18, 19). Compounds **16s** and **16t** are weak Plm II inhibitors, but potent and selective Plm IV inhibitors. This indicates that flap pocket of Plm IV has different structural requirements for the groups occupying this position. Previous selectivity between Plm subtypes demonstrated mainly with different length of alkyl-chains [30].

Table 5. Inhibitory Activities of *Para*-substituents of 7-Phenyl-2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones



Entry	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM)			
			Plm II	Plm I	Plm IV	Cat D
1	<i>rac</i> -16a	H	1.30	-	-	-
2	16b ^a	Ph	3.10	1.40	2	8.4
3	<i>rac</i> -16c	H	0.60	-	-	-
4	<i>rac</i> -16d	Ph	0.55	0.60	0.7	9.5
5	<i>rac</i> -16e	H	n.a.	-	-	-
6	<i>rac</i> -16f	H	3.90	-	-	-
7	<i>rac</i> -16g	H	2.30	-	-	-
8	16h ^a	Ph	2.00	1.30	1.30	5.2
9	<i>rac</i> -16i	Ph	0.23	0.30	0.20	2.2
10	<i>rac</i> -16j ^b	H	0.50	0.20	0.18	-
11	<i>rac</i> -16k	Ph	0.15	0.30	0.10	5.0
12	<i>rac</i> -16l ^b	Ph	2.40	0.50	0.80	8.6
13	<i>rac</i> -16m ^b	Ph	10.7	9.40	1.20	100
14	<i>rac</i> -16n ^b	Ph	0.40	0.48	0.30	3.2
15	<i>rac</i> -16o ^b	Ph	0.60	1.40	0.40	n.a.
16	<i>rac</i> -16p ^b	Ph	2.00	2.00	0.70	n.a.
17	<i>rac</i> -16r ^b	H	0.70	1.30	0.10	-
18	<i>rac</i> -16s ^b	Ph	10.0	3.20	0.13	6.0
19	<i>rac</i> -16t ^b	Ph	32.0	6.50	0.40	91
20	<i>rac</i> -16u ^b	Ph	12.0	36.0	2.00	52
21	<i>rac</i> -16v ^b	Ph	0.42	1.30	0.80	5.0

^amixture of diastereomers; ^bprepared in collaboration with O. Borysov.

To explore possible reasons for the high selectivity of compound **16s**, a homology model of open-flap Plm IV was built using the 2BJU structure of Plm II as a template⁶ (X-ray structure of Plm IV is not known). The resulting model suggests that the flap pocket of Plm IV is slightly more spacious at depth than that of Plm II due to a Thr108 to Ala108 mutation that allows more bulkier 3-phenylpropyl group of compound **16s** to fit in the flap pocket (Fig. 9).

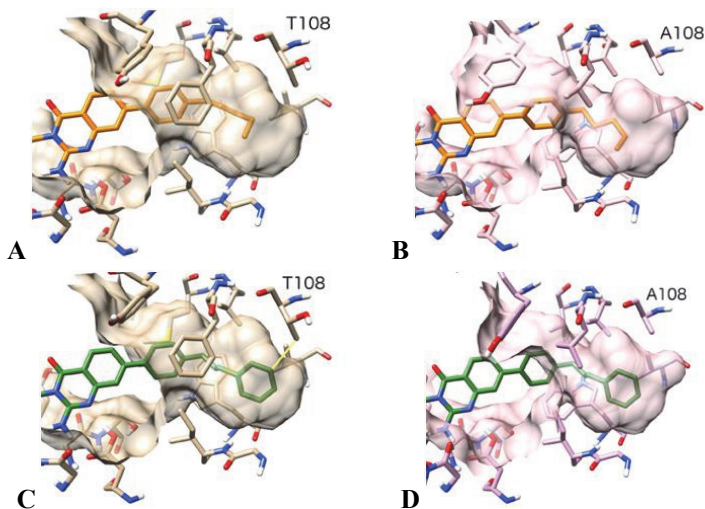


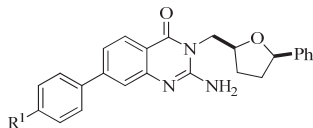
Fig. 9. Comparison of Plm II and Plm IV flap pockets: (A) Plm II and **16k**, (B) Plm IV and **16k**, (C) Plm II and **16s** – putative clash highlighted in yellow, (D) Plm IV and **16s**.

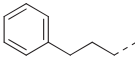
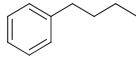
The aim to improve hit structure **1** to potent inhibitor with at least 100 nM inhibitory activity was achieved.

The most active Plm inhibitors **16j,k,s,t** were selected for testing their capacity to inhibit growth of *P. Falciparum* clone 3D7 in an *in vitro* growth assay (Table 6). All the compounds displayed inhibition potency close to 1 μ M. Compounds **16j** and **16k** are strong Plm I, I and IV, but **16s** and **16t** are selective Plm IV inhibitors. All compounds were active in cell-based assay and as all of them are inhibitors of Plm IV, it can be speculated that Plm IV and/or nondigestive plasmepsins structurally similar to Plm IV (e.g., Plm IX and X) might be the critical targets to achieve parasite growth inhibition.

⁶in collaboration with LIOS Department of Physical Organic Chemistry (K. Jaudzems).

Table 6. Growth Inhibition of *P. Falciparum* 3D7 Clone and Cytotoxicity Values of Selected 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones



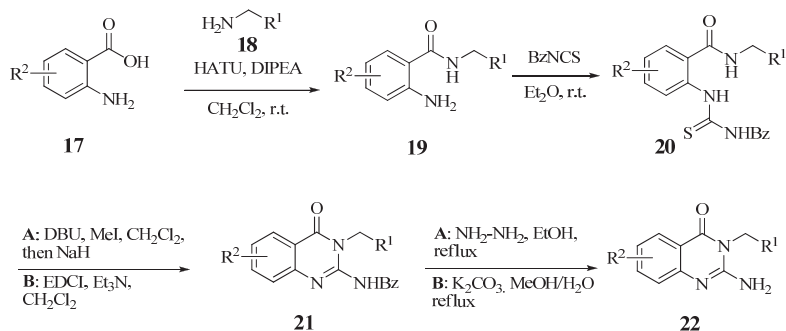
R¹		<i>n</i> Bu-	<i>n</i> Pent-		
		<i>rac</i> - 16j	<i>rac</i> - 16k	<i>rac</i> - 16s	<i>rac</i> - 16t
<i>P. Falciparum</i> 3D7 growth inhibition ^a	EC₅₀ (μM)	0.9	1.1	1.2	3.9
Cytotoxicity ^b	EC₅₀ (μM)	2205	2139	13	>1888

^aThe EC₅₀ values were determined using SYBR Green I assay with the incubation time 96 h; ^bmeasured using Mouse Swiss Albino embryo fibroblasts (3T3).

In addition, cytotoxicity of compounds was determined in mouse embryo cell assay and the results obtained indicated that most of the active Plm inhibitors displayed low toxicity, except compound **16s**. Thus, the 2-aminoquinazolin-4(3H)-one derivatives are a promising class of compounds for the development of novel antimalarial agents.

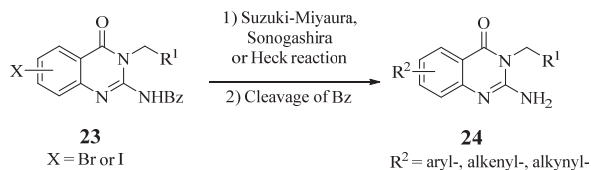
8. Synthesis of 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones

2-Aminoquinazolin-4(3H)-one derivatives **22** were synthesised from anthranilic acid derivatives **17** (Scheme 1). Anthranilic acid amides **19** were subjected to the reaction with benzoylisothiocyanate and resulting intermediates **20** were converted to corresponding 2-aminoquinazolin-4(3H)-ones by two methods: a) alkylation of thiol with MeI and NaH as the base for amide deprotonation or b) using EDCI as activation reagent for the thiol function. Cleavage of benzoyl group in compounds **21** with hydrazine hydrate or K₂CO₃ gave final products **22**.



Scheme 1. General approach to the synthesis of the 2-aminoquinazolin-4(3H)-one derivatives.

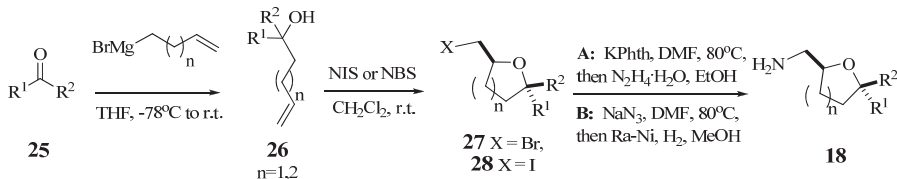
2-Aminoquinazolin-4(3H)-one building blocks **23**, containing bromide or iodide function allowed providing series of analogues **24** at the final stage of synthesis using *Suzuki-Miyaura*, *Sonogashira* or *Heck* coupling reactions (Scheme 2).



Scheme 2. Modification of 2-aminoquinazolin-4(3H)-one building blocks.

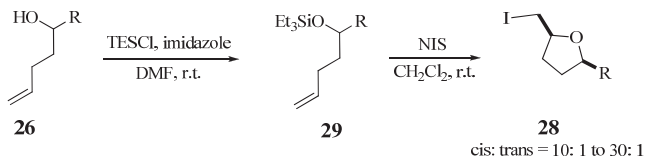
8.1. Synthesis of Tetrahydrofurfurylamine Derivatives

Synthesis of amines **18** was performed according to Scheme 3. Addition of *Grignard* reagent to aldehydes or ketones **25** provided alcohols **26**. NBS- or NIS-promoted cyclization gave disubstituted tetrahydrofuran derivatives **27** or **28** as a mixture of diastereomers (*trans*: *cis* = 4:1 to 1:1). Halomethyl tetrahydrofuran derivatives **27** or **28** were converted to amines **18** in two steps either using *Gabriel* synthesis or *via* formation of azide followed by reduction.



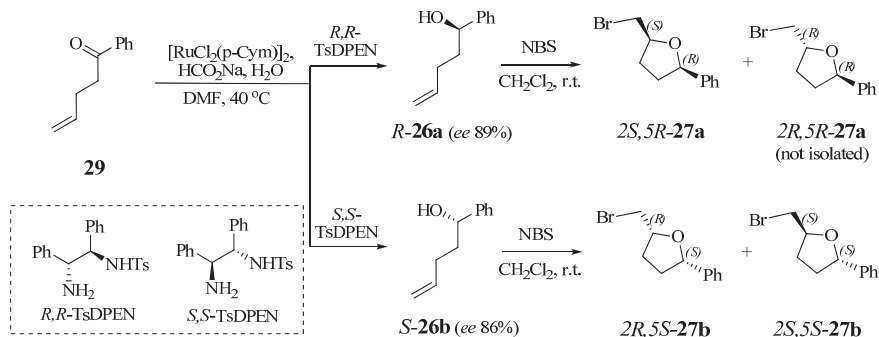
Scheme 3. Synthesis of amines **18**.

Modified literature procedure [31] was applied for the diastereoselective synthesis of *cis*-iodomethyl tetrahydrofurans **28** (Scheme 4). Homo allyl alcohols **26** were converted to silylethers and subsequent NIS-promoted cyclization gave the desired intermediates **28** in high diastereomeric excess in favour of the *cis*-isomer. Iodides **28** were converted to the corresponding amines according to Scheme 3.



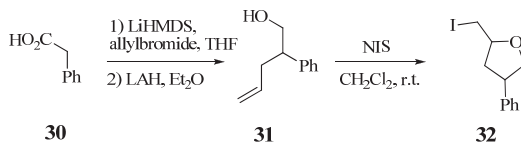
Scheme 4. Diastereoselective synthesis of 2-(iodomethyl)tetrahydrofurans **28**.

Enantioenriched bromides *2S,5S*-**27b**, *2R,5S*-**27b** and *2S,5R*-**27a** were synthesised from alcohols *R*- and *S*-**26b** (Scheme 5), prepared by *Noyori* asymmetric transfer hydrogenation using chiral Ru-diamine complexes. After non-diastereoselective cyclisation of alcohols *R*-**26a** and *S*-**26b**, resulting 2-bromomethyl tetrahydrofuran diastereomers were separated and converted to the amines by the described procedure (Scheme 3).



Scheme 5. Synthesis of enantioenriched 2-(bromomethyl)tetrahydrofurans.

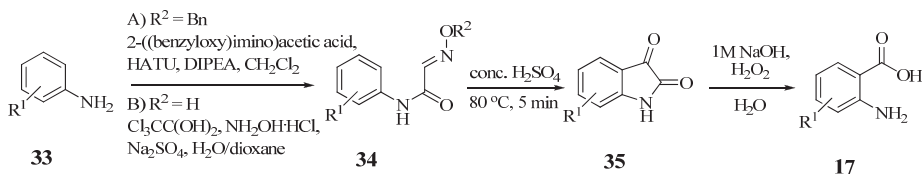
Alcohol **31** was prepared according to the described two-step procedure from phenylacetic acid [34] that included alkylation with allylbromide and subsequent reduction with LAH (Scheme 6). NIS-promoted cyclisation afforded iodide **32** as a mixture of diastereomers (*cis:trans* = 10: 3).



Scheme 6. Synthesis of 2-(iodomethyl)-4-phenyltetrahydrofuran **32**.

8.2. Synthesis of Anthranilic Acid Derivatives from Isatins

3- and 6-substituted anthranilic acids **17** were synthesised according to Scheme 7 using *Sandmeyer* methodology [36]. Corresponding anilines **33** were transformed to intermediates **34** by acylation with 2-((benzyloxy)imino)acetic acid (route A) [36] or using reaction with chloralhydrate and hydroxylamine (route B). Intermediates **34** were further transformed to isatins **35** that gave required acids **17** after oxidative cleavage (Scheme 7).



Scheme 7. Synthesis of anthranilic acids *via Sandmeyer* isatin approach.

8.3. Synthesis of Anthranilic Acid Derivatives Using C-H Activation Reaction

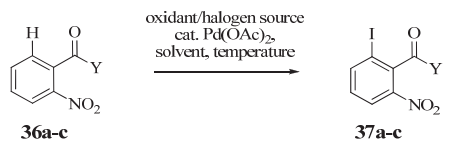
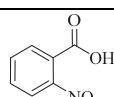
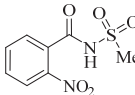
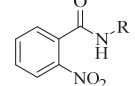
5-Iodoanthranilic acid derivatives were synthesised using C-H activation and the best substrate and conditions were examined (Table 7). Benzoic acids [37], different benzamides, e.g., *N*-tosylamides [38–40] and *N*-alkylbenzamides [41–44] can be used as directing groups in C-H activation reactions. However, the scope of *N*-alkylbenzamides is limited to a few examples.

For initial C-H activation/iodation experiments we used 2-nitrobenzoic acid (**36a**) as the model compound (Table 7, entry 1). Unfortunately, we were not able to achieve full conversion exploring different amounts of catalyst or oxidant or changing reaction time or solvent.

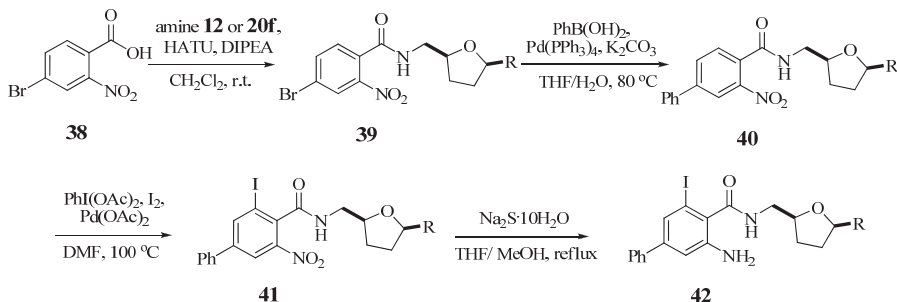
The best conditions (2 equiv. NIS or 1 equiv. $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ with I_2 , 10 mol% $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, DMF, 100 °C, 24h) were found using *N*-mesylbenzamide **36b** (Table 7, entry 2). Under optimised conditions, the substrate was fully converted to the product; however, isolated yield was only 53 % because of the complication during the isolation process.

Different *N*-alkylbenzamides were tested under the optimised conditions; required *N*-CH₂-THF benzamide gave the corresponding product in good yield (86 %).

Table 7. Short Summary of C-H Activation Studies

			
Entry	Substrate 36	Conversion ^a , %	Conclusions
1		36 to 66	average conversion, inseparable mixture of product/substrate
2		0 to 100	low isolated yield, problematic cleavage of Ms group
3		24 to 86	products separation by column chromatography, recovery of starting material

6-Iodo-anthranilic amides **42** were prepared based on developed C-H activation procedure (Scheme 8). After amide bond formation and subsequent *Suzuki* reaction, commercially available 4-bromo-2-nitrobenzoic acid **38** gave amides **40**. C-H activation provided intermediates **41** that gave corresponding anthranilic amide derivatives **42** after nitro group reduction with sodium sulfide.

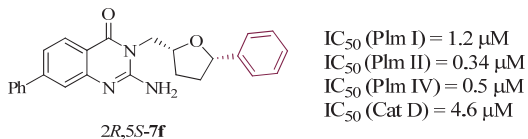


Scheme 8. Synthesis of 6-iodoanthranilic amides **42**.

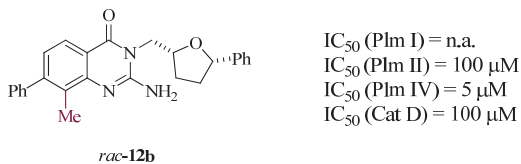
Obtained amides **42** were transformed to the corresponding 2-aminoquinazolin-4(3H)-ones according to Schemes 1 and 2.

CONCLUSIONS

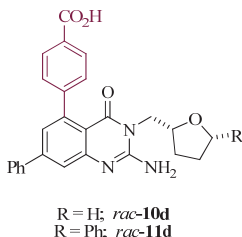
- 1) Nuclear magnetic resonance fragment screening provided a new class of plasmepsin I, II and IV inhibitors based on 2-aminoquinazolin-4(3H)-one scaffold with good selectivity over Cathepsin D.
- 2) Ligand-plasmepsin II co-crystal structure was solved indicating that 2-aminoquinazolin-4(3H)-ones interacted with enzyme in open conformation where 2-amino group and 1*N* formed hydrogen bonding with catalytic aspartate dyads.
- 3) Modifications at 3rd position of 2-aminoquinazolin-4(3H)-ones demonstrated that the highest inhibitory activities were shown by compounds with *N*-(5-phenyltetrahydrofuran)methylgroup. Phenyl moiety occupied S1' pocket and made favourable π - π interactions with Phe294.



- 4) 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones with *cis*-configuration substituents on tetrahydrofuran displayed higher inhibitory activities. Of both enantiomers of the active *cis*-diastereomer, enantiomer *2R,5S*- showed better inhibitory activity than *2S,5R*-enantiomer.
- 5) Introduction of substituents at 8th position of 2-aminoquinazolin-4(3H)-ones resulted in the drop of inhibitory activity.

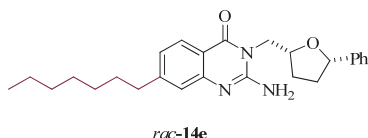


- 6) The 5th position of 2-aminoquinazolin-4(3H)-ones was exposed to the solvent and carboxylic acid in this position was the best function to achieve higher plasmepsin inhibitory potency.



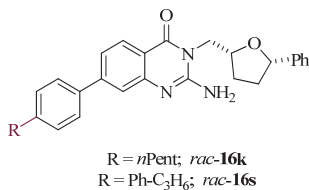
R = H	R = Ph
IC ₅₀ (Plm I) = 3.5 μM	IC ₅₀ (Plm I) = 0.6 μM
IC ₅₀ (Plm II) = 0.33 μM	IC ₅₀ (Plm II) = 0.28 μM
IC ₅₀ (Plm IV) = 1.4 μM	IC ₅₀ (Plm IV) = 0.5 μM
IC ₅₀ (Cat D) = 100 μM	IC ₅₀ (Cat D) = 20 μM

- 7) Structure-activity relationship of 5-substituted 2-aminoquinazolin-4(3H)-ones indicated that unsubstituted 3-tetrahydrofurfuryl-group could be used in inhibitor structure as selectivity over Cathepsin D was increased and both substituted and unsubstituted tetrahydrofuran-yl-compounds showed similar plasmepsin inhibition.
- 8) 7-Alkyl-2-aminoquinazolin-4(3H)-ones are potent plasmepsin inhibitors though selectivity over Cathepsin D is lost, which is unusual for non-peptidomimetic inhibitors with alkyl-group as the flap pocket substituents.



IC ₅₀ (Plm I) = 0.085 μM
IC ₅₀ (Plm II) = 0.2 μM
IC ₅₀ (Plm IV) = 0.26 μM
IC ₅₀ (Cat D) = 0.5 μM

- 9) 7-(*p*-Alkyl)phenyl-2-aminoquinazolin-4(3H)-ones are potent plasmepsin I, II, IV inhibitors with good selectivity against Cathepsin D whereas 7-(*p*-phenylalkyl)phenyl-2-aminoquinazolin-4(3H)-ones are selective plasmepsin IV inhibitors. Homology model of Plm IV suggested that the flap pocket of Plm IV was more spacious and could accommodate phenyl group, which allowed obtaining selectivity between digestive plasmepsin subtypes.



R = <i>n</i> Pent	R = Ph-C ₃ H ₆
IC ₅₀ (Plm I) = 0.3 μM	IC ₅₀ (Plm I) = 3.2 μM
IC ₅₀ (Plm II) = 0.15 μM	IC ₅₀ (Plm II) = 10.0 μM
IC ₅₀ (Plm IV) = 0.10 μM	IC ₅₀ (Plm IV) = 0.13 μM
IC ₅₀ (Cat D) = 5.0 μM	IC ₅₀ (Cat D) = 6.0 μM
EC ₅₀ (Pf) = 1.1 μM	EC ₅₀ (Pf) = 1.2 μM

- 10) Parasite growth inhibition correlates with plasmepsin IV inhibitory potencies indicating that either digestive Plm IV is the crucial biological target or Plm IV is a good model protein for structurally similar non-digestive plasmepsins IX and X.
- 11) General method for the synthesis of 3-substituted-2-aminoquinazolin-4(3H)-ones involves amide formation from antranilic acids and 2-aminomethyltetrahydrofuran building blocks with subsequent transformation of aniline moiety into thiourine derivative and ring closure.
- 12) Modification of the literature procedure provided the method for the diastereoselective synthesis of *cis*-2-(iodomethyl)-5-phenyltetrahydrofuran and *cis*-2-(iodomethyl)-5-isopropyl-tetrahydrofuran from corresponding *O*-TES substituted unsaturated alcohol and *N*-iodosuccinimide (*cis: trans* up to 30:1).
- 13) Palladium catalysed C-H activation/ iodination reaction is a convenient method for the synthesis of 6-iodo-2-nitrobenzamides that are important building blocks for the synthesis of 5-iodo-2-aminoquinazolin-4(3H)-ones and allow modifying the 5th position in the last steps of the synthesis.

PUBLIKĀCIJAS/PUBLICATIONS

Promocijas darba rezultāti izklāstīti vienā zinātniskā oriģinālpublikācijā un vienā patentā. Results of the thesis are discussed in 1 original research article and 1 patent.

Zinātniskās publikācijas/ Scientific publications:

Rasina D., Otikovs M., Leitans J., Recacha R., Borysov O. V., Kanepe-Lapsa I., Domraceva I., Pantelejevs T., Tars K., Blackman M.J., Jaudzems K., Jirgensons A. Fragment-Based Discovery of 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones As Novel Class Nonpeptidomimetic Inhibitors of the Plasmepsins I, II, and IV. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (1), 374–387.

Patenti/ Patents:

D. Rasina, A. Jirgensons, K. Jaudzems, M. Otikovs, I. Domraceva, I. Kanepe-Lapsa Novel substituted 2-aminoquinazolin-4(3H)-one derivatives as malarial aspartic protease inhibitors PCT/IB2013/059782, **2013**.

Darba rezultāti prezentēti šādās konferencēs/ Results of the Doctoral Thesis were presented at the following conferences:

- 1) D. Rasina, M. Otikovs, J. Leitans, R. Recacha, O. Borysov, I. Kanepe-Lapsa, T. Pantelejevs, K. Tars, M. J. Blackman, K. Jaudzems, A. Jirgensons. 2-Aminoquinazolin-4-ones as novel plasmepsin inhibitors, Drug Discovery Conference, 27–29 August **2015**, Riga, Latvia, PP51.
- 2) D. Rasina, M. Otikovs, J. Leitans, R. Recacha, O. Borysov, I. Kanepe-Lapsa, T. Pantelejevs, K. Tars, M. J. Blackman, K. Jaudzems, A. Jirgensons. Fragment based discovery of 2-aminoquinazolin-4-ones as novel anti-malarial agents targeting plasmepsins, Drug Discovery Conference, 27–29 August **2015**, Riga, Latvia, OP37.
- 3) D. Rasina, A. Jirgensons 6-Substituted anthranilic acids *via* C-H activation. Application for the synthesis of 2-aminoquinazolinones. International Conference on Organic Synthesis, Balticum Organicum Syntheticum (BOS2014), 6–9 July **2014**, Vilnius, Lithuania.

- 4) D. Rasina, M. Otikovs, K. Jaudzems, A. Jirgensons Fragment-based discovery of 2-amino-quinazolin-4-one as novel scaffold for malarial aspartic protease inhibitors. XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2014), 7–11 September **2014**, Lisbon, Portugal.
- 5) Rasina D., Otikovs M., Jaudzems K., Jirgensons A. Fragment based approach for identification of novel plasmepsin II inhibitors by NMR. 14th Tatrahedron Symposium, 25–28 June **2013**, Vienna, Austria.
- 6) Otikovs M.; Rasina D.; Jaudzems, K. Fragment-based Approach to the Discovery of Novel Plasmepsin II Inhibitors by NMR Screening and Molecular Modelling. 8th Paul Walden Symposium on Organic Chemistry, 13–14 May **2013**, Riga, Latvia.
- 7) Otikovs M., Jaudzems K., Jirgensons A., Liepiņš E. Fragment-Based Drug Discovery of Plasmepsin II Inhibitor. EAST-NMR Regional Meeting: NMR Complementary Tools for Chemistry and Biology Research, 15–17 June **2011**, Riga, Latvia, pp. 20.

LITERATŪRAS SARAKSTS / REFERENCES

- 1) *World Malaria Report 2015*; World Health Organization: Geneva, 2015.
- 2) Wells, T. N. C.; Alonso, P. L.; Gutteridge, W. E. New Medicines to Improve Control and Contribute to the Eradication of Malaria. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, 8 (11), 879–891.
- 3) Ersmark, K.; Samuelsson, B.; Hallberg, A. Plasmepsins as Potential Targets for New Antimalarial Therapy. *Med. Res. Rev.* **2006**, 26 (5), 626–666.
- 4) Wiesner, J.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. New Antimalarial Drugs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42 (43), 5274–5293.
- 5) Gardner, M. J. *et al.* Genome Sequence of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*. *Nature* **2002**, 419 (6906), 498–511.
- 6) Hoffman, S. L.; Subramanian, G. M.; Collins, F. H.; Venter, J. C. *Plasmodium*, Human and Anopheles Genomics and Malaria. *Nature* **2002**, 415 (6872), 702–709.
- 7) Neafsey, D. E. Genome Sequencing Sheds Light on Emerging Drug Resistance in Malaria Parasites. *Nat. Genet.* **2013**, 45 (6), 589–590.
- 8) Khan, S. M.; Waters, A. P. Malaria Parasite Transmission Stages: An Update. *Trends Parasitol.* **2004**, 20 (12), 575–580.
- 9) Coombs, G. H.; Goldberg, D. E.; Klemba, M.; Berry, C.; Kay, J.; Mottram, J. C. Aspartic Proteases of *Plasmodium Falciparum* and Other Parasitic Protozoa as Drug Targets. *Trends Parasitol.* **2001**, 17 (11), 532–537.
- 10) Banerjee, R.; Liu, J.; Beatty, W.; Pelosof, L.; Klemba, M.; Goldberg, D. E. Four Plasmepsins Are Active in the *Plasmodium Falciparum* Food Vacuole, Including a Protease with an Active-Site Histidine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99 (2), 990–995.
- 11) Berry, C. New Targets for Antimalarial Therapy: The Plasmepsins, Malaria Parasite Aspartic Proteinases. *Biochem. Educ.* **1997**, 25 (4), 191–194.
- 12) Dame, J. B.; Yowell, C. A.; Omara-Opyene, L.; Carlton, J. M.; Cooper, R. A.; Li, T. Plasmepsin IV, the Food Vacuole Aspartic Proteinase Found in All *Plasmodium* Spp. Infecting Man. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, 130 (1), 1–12.
- 13) Sleebs, B. E.; Gazdik, M.; O'Neill, M. T.; Rajasekaran, P.; Lopaticki, S.; Lackovic, K.; Lowes, K.; Smith, B. J.; Cowman, A. F.; Boddey, J. A. Transition State Mimetics of the *Plasmodium* Export Element Are Potent Inhibitors of Plasmepsin V from *P. Falciparum* and *P. Vivax*. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (18), 7644–7662.
- 14) Hodder, A. N.; Sleebs, B. E.; Czabotar, P. E.; Gazdik, M.; Xu, Y.; O'Neill, M. T.; Lopaticki, S.; Nebl, T.; Triglia, T.; Smith, B. J.; Lowes, K.; Boddey, J. A.; Cowman, A. F. Structural Basis for Plasmepsin V Inhibition That Blocks Export of Malaria Proteins to Human Erythrocytes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, 22 (8), 590–596.

- 15) Sleebs, B. E. *et al.* Inhibition of Plasmepsin V Activity Demonstrates Its Essential Role in Protein Export, PfEMP1 Display, and Survival of Malaria Parasites. *PLoS Biol.* **2014**, *12* (7), e1001897.
- 16) Liu, J.; Gluzman, I. Y.; Drew, M. E.; Goldberg, D. E. The Role of *Plasmodium Falciparum* Food Vacuole Plasmepsins. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (2), 1432–1437.
- 17) J. Meyers, M.; E. Goldberg, D. Recent Advances in Plasmepsin Medicinal Chemistry and Implications for Future Antimalarial Drug Discovery Efforts. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12* (5), 445–455.
- (18) Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H. A “Rule of Three” for Fragment-Based Lead Discovery? *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (19), 876–877.
- 19) Lepre, C. A.; Moore, J. M.; Peng, J. W. Theory and Applications of NMR-Based Screening in Pharmaceutical Research. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (8), 3641–3676.
- 20) Lepre, C. A. Chapter Nine – Practical Aspects of NMR-Based Fragment Screening. In *Methods in Enzymology*; Kuo, L. C., Ed.; Fragment-Based Drug Design Tools, Practical Approaches, and Examples; Academic Press, 2011; Vol. 493, pp 219–239.
- 21) Mayer, M.; Meyer, B. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38* (12), 1784–1788.
- 22) Hajduk, P. J.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. One-Dimensional Relaxation- and Diffusion-Edited NMR Methods for Screening Compounds That Bind to Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (50), 12257–12261.
- 23) Dalvit, C.; Fogliatto, G.; Stewart, A.; Veronesi, M.; Stockman, B. WaterLOGSY as a Method for Primary NMR Screening: Practical Aspects and Range of Applicability. *J. Biomol. NMR* **2001**, *21* (4), 349–359.
- 24) Dalvit, C.; Pevarello, P.; Tatò, M.; Veronesi, M.; Vulpetti, A.; Sundström, M. Identification of Compounds with Binding Affinity to Proteins via Magnetization Transfer from Bulk Water. *J. Biomol. NMR* **2000**, *18* (1), 65–68.
- 25) Dalvie, D. K.; Kalgutkar, A. S.; Khojasteh-Bakht, S. C.; Obach, R. S.; O'Donnell, J. P. Biotransformation Reactions of Five-Membered Aromatic Heterocyclic Rings. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15* (3), 269–299.
- 26) Huizing, A. P.; Mondal, M.; Hirsch, A. K. H. Fighting Malaria: Structure-Guided Discovery of Nonpeptidomimetic Plasmepsin Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (13), 5151–5163.
- 27) Zürcher, M.; Diederich, F. Structure-Based Drug Design: Exploring the Proper Filling of Apolar Pockets at Enzyme Active Sites. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (12), 4345–4361.

- 28) Zürcher, M.; Gottschalk, T.; Meyer, S.; Bur, D.; Diederich, F. Exploring the Flap Pocket of the Antimalarial Target Plasmepsin II: The “55 % Rule” Applied to Enzymes. *ChemMedChem* **2008**, *3* (2), 237–240.
- 29) Boss, C.; Corminboeuf, O.; Grisostomi, C.; Meyer, S.; Jones, A. F.; Prade, L.; Binkert, C.; Fischli, W.; Weller, T.; Bur, D. Achiral, Cheap, and Potent Inhibitors of Plasmepsins I, II, and IV. *ChemMedChem* **2006**, *1* (12), 1341–1345.
- 30) Zürcher, M.; Hof, F.; Barandun, L.; Schütz, A.; Schweizer, W. B.; Meyer, S.; Bur, D.; Diederich, F. Synthesis of Exo-3-Amino-7-azabicyclo[2.2.1]heptanes as a Class of Malarial Aspartic Protease Inhibitors: Exploration of Two Binding Pockets. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009* (11), 1707–1719.
- 31) Fujioka, H.; Maehata, R.; Wakamatsu, S.; Nakahara, K.; Hayashi, T.; Oki, T. Stereoselective Synthesis of *Cis*-2,5-Disubstituted THFs: Application to Adjacent Bis-THF Cores of Annonaceous Acetogenins. *Org. Lett.* **2012**, *14* (4), 1054–1057.
- 32) Hashiguchi, S.; Fujii, A.; Takehara, J.; Ikariya, T.; Noyori, R. Asymmetric Transfer Hydrogenation of Aromatic Ketones Catalyzed by Chiral Ruthenium(II) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (28), 7562–7563.
- 33) Zhang, B.; Xu, M.-H.; Lin, G.-Q. Catalytic Enantioselective Synthesis of Chiral Phthalides by Efficient Reductive Cyclization of 2-Acylarylcarboxylates under Aqueous Transfer Hydrogenation Conditions. *Org. Lett.* **2009**, *11* (20), 4712–4715.
- 34) Kim, D.*et al.* Design, Synthesis, and SAR of Heterocycle-Containing Antagonists of the Human CCR5 Receptor for the Treatment of HIV-1 Infection. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (24), 3103–3106.
- 35) Luppi, G.; Monari, M.; Corrêa, R. J.; de A. Violante, F.; Pinto, A. C.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Garden, S. J.; Tomasini, C. The First Total Synthesis of (*R*)-Convolutamydine A. *Tetrahedron* **2006**, *62* (51), 12017–12024.
- 36) Klein, L. L.; Tufano, M. D. Synthesis of Substituted Isatins. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (8), 1008–1011.
- 37) Mei, T.-S.; Giri, R.; Mangel, N.; Yu, J.-Q. PdII-Catalyzed Monoselective Ortho Halogenation of C-H Bonds Assisted by Counter Cations: A Complementary Method to Directed Ortho Lithiation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (28), 5215–5219.
- 38) Péron, F.; Fossey, C.; Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Cailly, T.; Fabis, F. Room-Temperature Ortho-Alkoxylation and -Halogenation of *N*-Tosylbenzamides by Using Palladium(II)-Catalyzed C-H Activation. *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20* (24), 7507–7513.
- 39) Zhu, C.; Falck, J. R. *N*-Acylsulfonamide Assisted Tandem C-H Olefination/Annulation: Synthesis of Isoindolinones. *Org. Lett.* **2011**, *13* (5), 1214–1217.

- 40) Zhu, C.; Xie, W.; Falck, J. R. Rhodium-Catalyzed Annulation of N-Benzoylsulfonamide with Isocyanide through C-H Activation. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17* (45), 12591–12595.
- 41) Schröder, N.; Wencel-Delord, J.; Glorius, F. High-Yielding, Versatile, and Practical [Rh(III)Cp*]-Catalyzed Ortho Bromination and Iodination of Arenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (20), 8298–8301.
- 42) Yu, D.-G.; Gensch, T.; de Azambuja, F.; Vásquez-Céspedes, S.; Glorius, F. Co(III)-Catalyzed C-H Activation/Formal S_N-Type Reactions: Selective and Efficient Cyanation, Halogenation, and Allylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (51), 17722–17725.
- 43) Sun, X.; Shan, G.; Sun, Y.; Rao, Y. Regio- and Chemoselective C-H Chlorination/Bromination of Electron-Deficient Arenes by Weak Coordination and Study of Relative Directing-Group Abilities. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (16), 4440–4444.
- 44) Wang, X.-C.; Hu, Y.; Bonacorsi, S.; Hong, Y.; Burrell, R.; Yu, J.-Q. Pd(II)-Catalyzed C-H Iodination Using Molecular I₂ as the Sole Oxidant. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (28), 10326–10329.