



RĪGAS TEHNISKĀ  
UNIVERSITĀTE

**Elīna Līdumniece**

## **MALĀRIJAS ENZĪMU INHIBITORU IZVEIDE**

Promocijas darba kopsavilkums

## **DEVELOPMENT OF MALARIAL ENZYME INHIBITORS**

Summary of the Doctoral Thesis



RTU Izdevniecība  
RTU Press  
Rīga 2023

# RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte  
Organiskās ķīmijas tehnoloģijas institūts

## RIGA TECHNICAL UNIVERSITY

Faculty of Materials Science and Applied Chemistry  
Institute of Technology of Organic Chemistry

### Elīna Līdumniece

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

# MALĀRIJAS ENZĪMU INHIBITORU IZVEIDE DEVELOPMENT OF MALARIAL ENZYME INHIBITORS

## Promocijas darba kopsavilkums

## Summary of the Doctoral Thesis

Zinātniskais vadītājs  
profesors *Dr. chem.* Aigars JIRGENSONS  
Scientific supervisor  
Professor *Dr. chem.* Aigars JIRGENSONS

RTU Izdevniecība / RTU Press  
Rīga 2023 / Riga 2023

## **Pateicības**

Īpašs paldies manam vīram Ģirtam Līdumniekam, manai omai Dominikai Balodei, kā arī manai mammai Vizmai Petrovai par neizsīkstošu atbalstu, rūpēm, iedrošinājumu un nezūdošu ticību maniem spēkiem!

Paldies maniem kolēģiem OSM grupā par idejām un ieteikumiem!

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā ar Eiropas Reģionālā attīstības fonda (vienošanās nr. 1.1.1.1/16/A/290) un Latvijas Zinātnes padomes (projekta nr. lzp-2020/1-0327) atbalstu.

## **Acknowledgements**

My sincere gratitude to my husband Ģirts Līdumnieks, to my granny Dominika Balode, to my mom Vizma Petrova for endless support, care, encouragement and believing in me.

Thanks to my colleagues of the OSM group for ideas and suggestions.

This work was conducted in Latvian Institute of Organic Synthesis and was funded by European Regional Development Fund (agreement No. 1.1.1.1/16/A/290) and Latvian Council of Science (grant No. lzp-2020/1-0327).

Līdumniece E. Malārijas enzīmu inhibitoru izveide.  
Promocijas darba kopsavilkums.  
Rīga: RTU Izdevniecība, 2023. – 53 lpp.

Līdumniece, E. Development of Malarial Enzyme Inhibitors.  
Summary of the Doctoral Thesis.  
Riga: RTU Press, 2023. – 53 p.

Iespiests saskaņā ar RTU promocijas  
padomes “P-01” 2023. gada  
27. februāra lēmumu, protokols Nr. 04030-9.1/38

Published in accordance with the decision  
of the Promotion Council “P-01” of  
February 27, 2023, Minutes No. 04030-9.1/38

<https://doi.org/10.7250/9789934229107>  
ISBN 978-9934-22-910-7 (pdf)

**PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI  
RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ**

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2023. gada 25. maijā Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātē, Rīgā, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

**OFICIĀLIE RECENZENTI**

Vadošais pētnieks *Dr. chem.* Pāvels Arsenjans,  
Latvijas Organiskās sintēzes institūts, Latvija

Asociētā profesore *Dr. chem.* Māra Plotniece,  
Rīgas Tehniskā universitāte, Latvija

Profesors *Dr. Gabriele Costantino*,  
Parmas Universitāte, Itālija

**APSTIPRINĀJUMS**

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Elīna Līdumniece ..... (paraksts)

Datums .....

Promocijas darbs ir uzrakstīts angļu valodā, tajā ir ievads, literatūras apskats, rezultātu izvērtējums, eksperimentālā daļa, secinājumi, izmantotās literatūras saraksts, 29 attēli, 14 shēmas, septiņas tabulas, divi pielikumi, kopā 126 lappuses.

## SATURS/CONTENTS

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS .....	6
Tēmas būtība un aktualitāte .....	6
Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti .....	9
Darba aprobācija un publikācijas.....	9
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI .....	11
1. Peptīdisku $\alpha$ -ketoamīdu inhibitoru sintēze un SUB1 inhibēšanas spēja.....	11
2. Peptīdisku borskābju sintēze un SUB1 inhibēšanas spēja .....	14
2.1 P1 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju sintēze .....	14
2.2 P1 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju PfsUB1 inhibēšanas spēja .....	17
2.3 P3 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju sintēze .....	18
2.4 P3 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju PfsUB1 inhibēšanas spēja .....	20
2.5 P5 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju sintēze .....	21
2.6 P5 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju PfsUB1 inhibēšanas spēja .....	21
2.7 P5 un P1 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju sintēze .....	22
2.8 P5 un P1 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju PfsUB1 inhibēšanas spēja.....	24
SECINĀJUMI .....	26
GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS.....	29
Introduction.....	29
Scientific novelty and main results.....	32
Approbation of the thesis.....	32
MAIN RESULTS OF THE THESIS .....	34
1. Synthesis and inhibitory potency of peptidic $\alpha$ -ketoamide inhibitors .....	34
2. Synthesis and inhibitory potency of peptidic boronic acid inhibitors .....	36
2.1 Synthesis of the peptidic boronic acids with a modified P1 position.....	37
2.2 Inhibitory potency of the peptidic boronic acids with a modified P1 position..	40
2.3 Synthesis of the peptidic boronic acids with a modified P3 position.....	41
2.4 Inhibitory potency of the peptidic boronic acids with a modified P3 position..	43
2.5 Synthesis of the peptidic boronic acids with a modified P5 position.....	44
2.6 Inhibitory potency of the peptidic boronic acids with a modified P5 position..	45
2.7 Synthesis of the peptidic boronic acids with a modified P5 and P1 position....	46
2.8 Inhibitory potency of the peptidic boronic acids with a modified P5 and P1 position .....	48
CONCLUSIONS .....	50
LITERATŪRAS SARAKSTS/REFERENCES .....	52

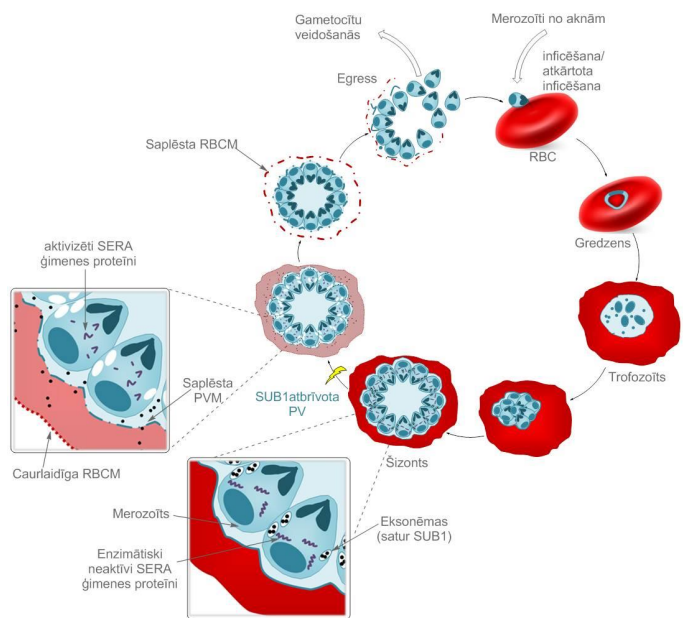
# PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

## Tēmas būtība un aktualitāte

Malārija ir akūta slimība, ko izraisa *Anopheles* moskītu pārnēsāti *Plasmodium* parazīti. Saskaņā ar jaunāko Malārijas ziņojumu<sup>1</sup> 2020. gadā reģistrēts aptuveni 241 miljons saslimšanas gadījumu, no kuriem apmēram 627 000 bija ar letālām sekām.

Mikrobu patogēnu ezīmi ir labi zināmi zāļvielu mērķi, sākot ar uz bakteriālajām transpeptidāzēm mērķētām beta-laktāmus saturošām antibiotikām līdz pat vairākām pret vīrusu zāļvielām, kas mērķētas uz proteāzēm un apgriezto transkriptāzi. Patogēnie viensūņi, piemēram, *Plasmodium* sugas, kas izraisa malāriju, nav izņēmums. Vēsturiski divas veiksmīgākās pretmalārijas zāļvielas (pirimetamīns un proguanils) ir mērķētas uz dihidrofolāta reduktāzi.<sup>2</sup> Diemžēl rezistence uz antifolātu zāļvielām pašlaik ir plaši izplatīta, kā arī bažas rada jaunākās ziņas par rezistences veidošanos pret galvenajām malārijas ārstēšanas metodēm, tostarp artemizīnīna kombinēto terapiju (ACTs).<sup>3</sup> Līdz ar to ir pieaugoša nepieciešamība papildināt pretmalārijas zāļvielu klāstu ar jaunām zāļvielām, kas aptur parazīta dzīves ciklu, izmantojot jaunus darbības mehānismus.

Visas malārijas klīniskās slimības izpausmes izraisa parazīta cikliska vairošanās cilvēka sarkanajās asinsšūnās (RBC, 1. att.). Parazīta attīstības formas, ko sauc par merozoītiem, inficē eritrocītus un parazitiskās vakuolas (PV) iekšienē strauji pārveidojas par trofozoītiem. Aptuveni 48 stundu laikā šūnās esošais parazīts palielinās, tiek pakļauts šūnu dalīšanās procesam un sadalās 16 vai vairāk jaunizveidotos merozoītos. Pēc tam tie lītiskā procesā, ko sauc par egresu, izklūst no inficētās asinsšūnas, lai turpinātu ciklu, inficējot jaunus eritrocītus, vai arī pārveidojas par gametocītiem. Pēdējo trīs dekāžu darbā noskaidrots, ka egresu regulē parazīta enzīmu darbību secība, kura centrā ir no kalcija joniem atkarīga serīna proteāze SUB1. Visu *Plasmodium* sugu genomos ir atrodams viens SUB1 ortologs, arī gēnu defektu funkciju pētījumos parādīts, ka SUB1 ir svarīgs enzīms parazīta izdzīvošanai. SUB1 tiek ekspresēts kā enzīmātiski neaktīvs zīmogēns, kas pakļaujas vismaz diviem proteolītiskiem šķelšanas procesiem.<sup>4</sup> Vispirms tas tiek pakļauts autokatalītiskam šķelšanas procesam, veidojot p54 formu (54 kDa formu), tad otrā šķelšanas solī no p54 tiek veidota nobriedusī p47 forma (47 kDa forma). Šo procesu veicina plazmepsīns X, kas ir parazīta aspartilproteāze.<sup>5</sup>



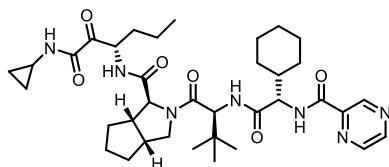
1. att. *P. falciparum* asins posma dzīves cikls, un SUB1 loma merozoītu egresā.

Sākotnēji enzīms SUB1 tiek noglabāts merozoītu sekrēcijas organelās, ko sauc par eksonēmām, tad tiek atbrīvots un nonāk parazitiskās vakuolas iekšienē tieši pirms egresa. Tur enzīms šķel tā substrātus, kas rezultējas ar sašķeltu parazitiskās vakuolas un sarkanās asinsšūnas membrānu (1. att.). Zināms, ka proteīnkināze G ir nepieciešama, lai SUB1 izkļūtu no eksonēmām.<sup>6</sup> Ir identificēti vairāki SUB1 substrāti, tostarp merozoītu virsmas proteīni un proteīni no serīna bagātas antigēnu ģimenes (SERA).<sup>7</sup> Ģenētiski modificēti parazīti, kas nesatur SUB1, nav spējīgi sašķelt ne PV, ne eritrocītu membrānas, kas izraisa ieslodzīto parazītu bojāeju. Var paredzēt, ka mazmolekulāri SUB1 inhibitori varētu līdzīgi bloķēt egresu un novērst parazītu vairošanos.

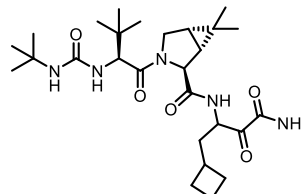
Pēdējās dekādēs zāļvielu atklāšanā tiek lietota mērķtiecīga un struktūras vadīta pieeja, kas fokusēta uz konkrētu proteīnu un tā darbības mehānismu.<sup>8</sup> Atgriezenisku kovalentu saistošo grupu izmantošana medicīnas ķīmijā ir sekmējusi kovalento inhibitoru izveidi.<sup>9</sup> Viena no zināmajām elektrofilajām saistošajām grupām, kas ir mērķēta uz enzīmu/proteīnu hidoksilgrupām, ir  $\alpha$ -ketoamīdi. Uz  $\alpha$ -ketoamīdiem balstīti inhibitori, saistoties ar proteāzes aktīvā centra serīnu, veido hemiketālus. Šī pieeja izmantota, lai radītu divas FDA apstiprinātas zāļvielas – *Telaprevir* un *Boceprevir* –, kas paredzētas hepatīta C ārstēšanai. Diemžēl abas nesen tika apturētas to toksicitātes un nepietiekamās efektivitātes dēļ, norādot uz izaicinājumiem kovalento inhibitoru attīstīšanai par zāļvielām.<sup>9</sup> Racionālā dizaina rezultātā, balstoties dabisko substrātu sekvencē, ir izveidoti arī SUB1 inhibitori, kas satur  $\alpha$ -



ketoamīdus. Tie uzrāda spēju inhibēt SUB1 proteolītisko aktivitāti, tomēr neuzrāda aktivitāti šūnu testos, visticamāk, savienojumu polārās dabas dēļ.

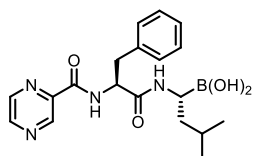


*Telaprevir*

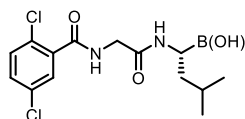


*Boceprevir*

Serīna un treonīna proteāžu inhibitoru izveidē kā “kaujas galviņas” ir izmantotas arī borskābes. Enzīmu aktīvo centru serīnu un treonīnu hidroksilgrupas saistās ar borskābēm, veidojot āta kompleksu, kas imitē tetraedrisko enzīmātiskās reakcijas pārejas stāvokli.<sup>9</sup> FDA ir apstiprinājusi vairākus peptīdisku borskābju inhibitorus kā zāļvielas, piemēram, *Bortezomib* un *Ixazomib*, kas abi paredzēti multiplās mielomas ārstēšanai. Bez šiem diviem piemēriem sastopami arī citi borskābes saturoši enzīmu inhibitori.<sup>10</sup>

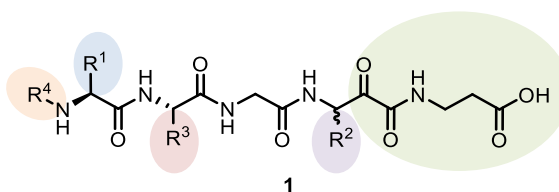


*Bortezomib*



*Ixazomib*

**Promocijas darba mērķis ir**, balstoties un iepriekš atrasto ketoamīda **1** struktūru, izveidot nākamās paaudzes inhibitorus ar uzlabotu SUB1 inhibēšanas spēju un parazīta augšanas inhibēšanas spēju šūnu testos.



Lai sasniegtu darba mērķi, **noteikti šādi darba uzdevumi:**

- ✓ apkopot visus literatūrā publicētos SUB1 inhibitoru atklāšanas mēģinājumus;
- ✓ izstrādāt sintēzes metodes peptīdisku borskābju iegūšanai, kuros borskābes kalpo kā atgriezeniska kovalenta serīna atlikuma saistošā grupa SUB1 katalītiskajā centrā;
- ✓ izstrādāt sintēzes metodes peptīdisko  $\alpha$ -ketoamīdu un borskābju iegūšanai ar iespēju mainīt dažādus  $R^{1-4}$  aizvietotājus;

- ✓ noteikt sintezēto savienojumu SUB1 inhibēšanas spēju un parazītu augšanas inhibēšanu šūnu testos, kā arī izvērtēt to selektivitāti pret zīdītāju serīna un treonīna proteāzēm;
- ✓ veikt struktūras–aktivitātes likumsakarību izpēti un izmantot iegūtos rezultātus jaunu SUB1 inhibitoru struktūras plānošanā.

### Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

Šī promocijas darba ietvaros izstrādātais pētījums apraksta izstrādātās sintētiskās metodes, kas ļauj iegūt SUB1 inhibitorus – peptīdiskās borskābes. Sintētiskie virzieni ļāva iegūt dažādas peptīdiskās borskābes ar modificētām P1, P3 un P5 pozīcijām. Tika noteikta iegūto inhibitoru spēja inhibēt SUB1, to spēja inhibēt parazīta vairošanos asinsšūnās, kā arī inhibitoru *in vitro* selektivitāte pret citām serīna un treonīna proteāzēm (sadarbībā ar profesora *M. Blackman* grupu *Francis Crick* institūtā). Pētījuma rezultātā iegūta virkne ar savienojumiem, kam piemīt zema nanomolāra SUB1 inhibēšanas aktivitāte enzīmātajos testos, kā arī vairāki no tiem uzrādīja zemu mikromolāru inhibēšanas spēju *P. falciparum* parazīta augšanas testos.

### Darba aprobācija un publikācijas

Promocijas darba galvenie rezultāti apkopoti vienā zinātniskajā oriģinālpublikācijā, apskatrakstā un patenta pieteikumā. Pētījuma rezultāti prezentēti septiņās konferencēs.

#### Zinātniskās publikācijas

1. **Lidumniece, E.**; Withers-Martinez, C.; Hackett, F.; Collins, C. R.; Perrin, A. J.; Koussis, K.; Bisson, C.; Blackman, M. J.; Jirgensons, A. Peptidic boronic acids are potent cell-permeable inhibitors of the malaria parasite egress serine protease SUB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2021**, *118*, e2022696118 (IF(2021): 12.779).
2. **Lidumniece, E.**; Withers-Martinez, C.; Hackett, F.; Blackman, M. J.; Jirgensons, A. Subtilisin-like Serine Protease 1 (SUB1) as an Emerging Antimalarial Drug Target: Current Achievements in Inhibitor Discovery. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 12535–12545 (IF(2021): 8.039).

#### Patenta pieteikums

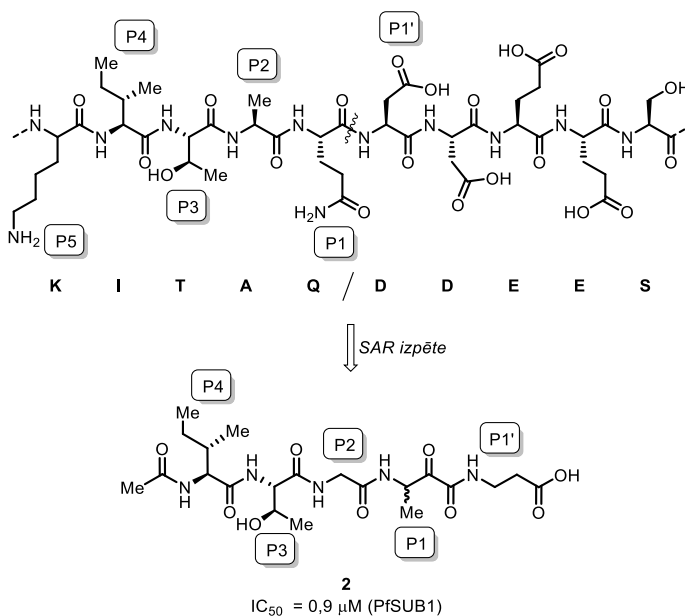
Jirgensons, A.; **Lidumniece, E.**; Withers-Martinez, C.; Blackman, M. J.; Finn, P. W. Novel boronic acid containing peptidomimetics as malarial serine protease inhibitors. WO2021/001697, **2021**.

Zinātniskās konferences, kurās prezentēti darba rezultāti

1. **Petrova, E.**; Jirgensons, A. Synthesis of Peptidic  $\alpha$ -Ketoamide Analogues of Known PfSUB1 Inhibitor. 10th Paul Walden Symposium on Organic Chemistry, June 15–16, **2017**, Riga, Latvia.
2. **Lidumniece, E.**; Jirgensons, A. Peptidic  $\alpha$ -ketoamides as PfSUB1 Inhibitors. Balticum Organicum Syntheticum (BOS 2018), July 1–4, **2018**, Tallinn, Estonia.
3. **Lidumniece, E.**; Jirgensons, A. Peptidic  $\alpha$ -ketoamides as an inhibitors of PfSUB1. VIII EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, September 1–5, **2019**, Athens, Greece.
4. **Lidumniece, E.**; Jirgensons, A. Peptidic boronic acids as inhibitors of PfSUB1. 12th Paul Walden Symposium on Organic Chemistry, October 28–29, **2021**, Riga, Latvia.
5. **Lidumniece, E.**; Withers-Martinez, C.; Blackman, M. J.; Jirgensons, A. New peptidic boronic acid containing inhibitors of malarial subtilisin-like serine protease (SUB1). Balticum Organicum Syntheticum (BOS 2022), July 3–6, **2022**, Vilnius, Lithuania.
6. **Lidumniece, E.**; Withers-Martinez, C.; Blackman, M. J.; Jirgensons, A. Substrate based inhibitors of malarial subtilisin-like serine protease containing boronic acid warhead. 2<sup>nd</sup> Drug Discovery Conference, September 22–24, **2022**, Riga, Latvia.
7. **Lidumniece, E.**; Withers-Martinez, C.; Blackman, M. J.; Jirgensons, A. Rationally designed inhibitors of malarial subtilisin-like serine protease containing boronic acid warhead. ACS Publications Symposium: Biological and Medicinal Chemistry, March 6–8, **2023**, Bonn, Germany.

## PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

Iepriekšējie pētījumi mūsu grupā rezultējās ar SUB1 inhibitoriem, kas balstīti uz šīs proteāzes dabiskā substrāta SERA4 šķelšanas vietu 1. Dekapeptīdā (KITAQ↓DDEES), kas atbilst substrāta aminoskābju sekvencei, šķelšanas vieta tika aizvietota ar  $\alpha$ -ketoamīda funkcionālo grupu. Padziļinātu struktūras–aktivitātes likumsakarību pētījumu rezultātā tika identificēts savienojums **2**, kas uzrādīja zemu mikromolāru rekombinantā PfSUB1 inhibēšanas spēju (2. att.).<sup>11</sup>



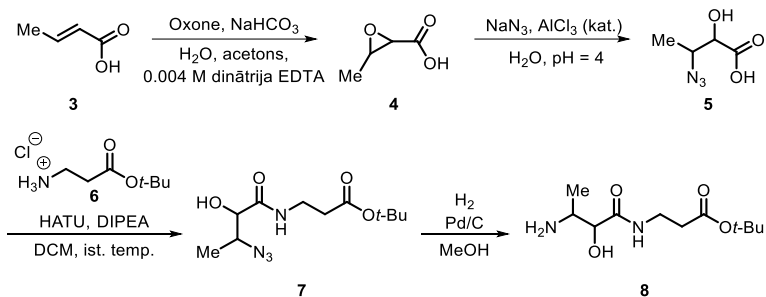
2. att. SUB1 inhibitors **2**, kas atvasināts no dabiskā substrāta.

Diemžēl savienojums **2** un līdzīgi  $\alpha$ -ketoamīdi neuzrādīja aktivitāti šūnu testos, kas skaidrojams ar inhibitoru pārlietu polāro dabu. Karbonskābes fragments, kas inhibitoros tika ieviests, lai mīļiedarbotos ar bāzisko S' kabatas virsmu aktīvajā centrā un imitētu endogēno PfSUB1 substrātu, visticamāk, ir atbildīgs par šo savienojumu vājo membrānas caurlaidību. Substrātu skenēšanas metodes uzrādīja S4 kabatas hidrofobo dabu,<sup>12</sup> tāpēc tika nolemts modificēt savienojumu **2**, ieviešot lipofilus aizvietotājus inhibitora P4 pozīcijā.

### 1. Peptīdisku $\alpha$ -ketoamīdu inhibitoru sintēze un SUB1 inhibēšanas spēja

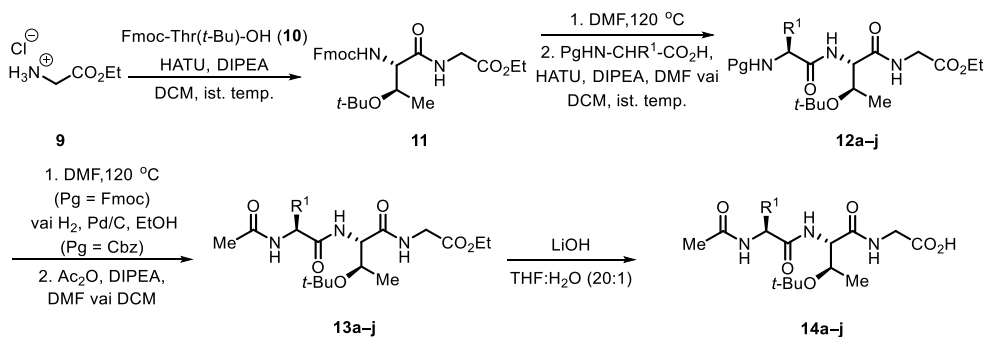
Dažādi aizvietotu (P4 pozīcijā) inhibitoru sintēzei nepieciešamais amīds **8** tika iegūts no *trans*-krotonskābes (**3**) pēc iepriekš aprakstītas metodes.<sup>11</sup> Sākotnēji tā tika epoksidēta par 2,3-epoksisviestskābi (**4**), izmantojot Oxone<sup>®</sup> (1. shēma). AlCl<sub>3</sub> katalizēta epoksīda

atvēršana ar nātrija azīdu deva  $\beta$ -azido- $\alpha$ -hidroksisviestskābi (**5**), kas tālāk tika pakļauta amīdсайtes veidošanas reakcijai ar  $\beta$ -alanīna *tert*-butilestera hidrohlorīdu (**6**). Azīda reducēšana ar Pd/C, H<sub>2</sub> deva amīnu **8**, kas tika lietots nākamajās reakcijās bez papildus attīrīšanas.



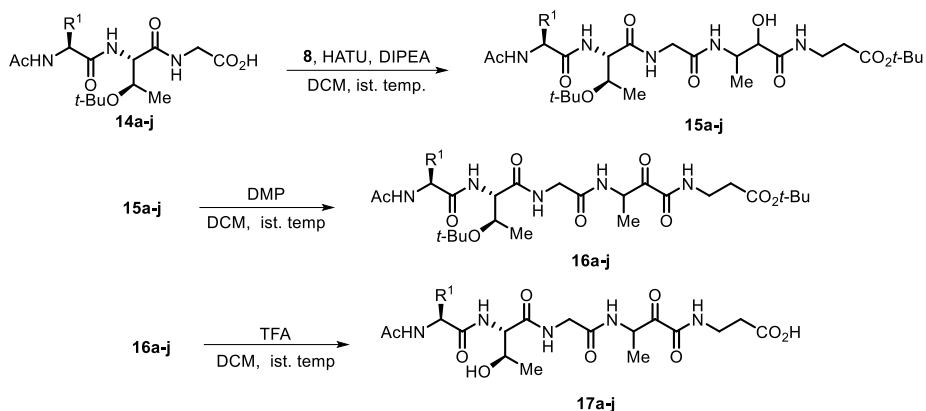
1. shēma. Amīna **8** sintēzes ceļš.

Inhibitoru peptīdiskās daļas sintēze tika sākta ar *N*-Fmoc, *O*-*tert*-butil- aizsargātu L-treonīnu (**10**), kas pakļauts amīdсайtes veidošanas reakcijai ar glicīna etilestera hidrohlorīdu (**9**), lai iegūtu amīdu **11** (2. shēma). Savienojums **11** tika pakļauts Fmoc- grupas šķelšanas apstākļiem, tad iegūtais amīns sametināts ar dažādām dabiskām un nedabiskām aminoskābēm, lai iegūtu savienojumus **12a-j**. Tālākas aizsarggrupas šķelšanas un acilēšana ceļā iegūtie starpprodukti **13a-j** pēc hidrolīzes deva galaproduktus **14a-j**.



2. shēma. Peptīdiskās daļas **14a-j** sintēze.

Būvbloki **14a-j** un **8** tika sametināti, izmantojot HATU, lai iegūtu produktus **15a-j** (3. shēma). Pēc oksidēšanas ar DMP un aizsarggrupu šķelšanas ar TFA tika iegūti galaprodukti **17a-j** kā diastereomēru maisījumus.



Visu sintezēto savienojumu proteolītiskās inhibēšanas spējas tika noteiktas,<sup>a</sup> novērojot fluorogēna peptīdiska substrāta SERA4st1F-6R12 šķelšanu rekombinanta PfSUB1 klātienē. Sākotnējie rezultāti liecināja, ka inhibitori, kas satur fenil- vai cikloheksilalanīnu (**17i**, **17j**, 1. tab., 9., 10. aile) P4 pozīcijā, uzrāda samazinātu inhibēšanas spēju. Arī inhibitors **17e** (1. tab., 5. aile) ar ciklopropilglicīnu šajā pozīcijā uzrāda vidēju aktivitāti, jo, iespējams, tas neveido nozīmīgas mijiedarbības ar enzīma hirdofobo S4 kabatu. Lielākā daļa pārējo savienojumu (1. tab., 1.–4., 7., 8. aile) uzrādīja vidēju līdz labu inhibēšanas spēju pie 10  $\mu$ M koncentrācijas, taču vislabāko aktivitāti uzrādīja savienojums **17f** ar ciklopentilglicīna sānu ķēdi (6. aile).

1. tabula

$\alpha$ -Ketoamīdu **17a–j** inhibēšanas spēja<sup>a</sup>

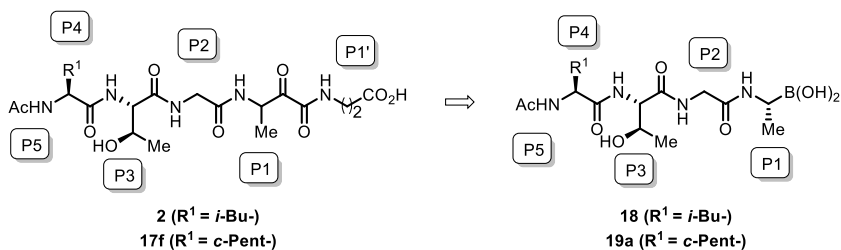
Nr.	R <sup>1</sup>	rPfSUB1 inhibēšanas pakāpe pie 10 $\mu$ M, %	Nr.	R <sup>1</sup>	rPfSUB1 inhibēšanas pakāpe pie 10 $\mu$ M, %
1.		78	6.		97
2.		71	7.		75
3.		73	8.		56
4.		78	9.		38
5.		45	10.		23

<sup>a</sup> Sadarbībā ar M. J. Blackman, C. Withers-Martinez un kolēģiem, *Malaria Biochemistry Laboratory, The Francis Crick Institute*; viens mērījums katram savienojumam.

IC<sub>50</sub> vērtība savienojumam **17f** ir  $370 \pm 3,35$  nM, kas ir divas reizes labāka, salīdzinot ar izejas inhibitoru **2**.

## 2. Peptīdisku borskābju sintēze un SUB1 inhibēšanas spēja

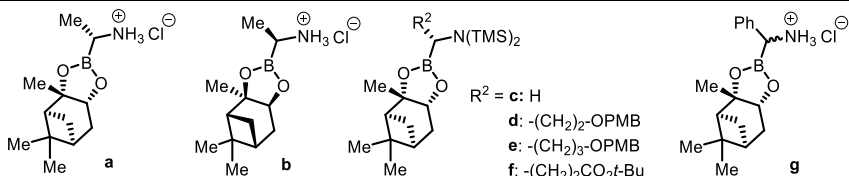
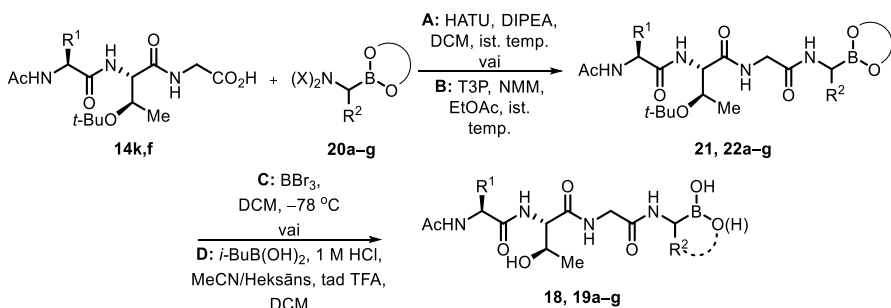
Borskābes ir efektīvas serīnu saistošās grupas, un tās var tikt iekļautas atgriezenisku kovalentu serīna proteāžu inhibitoru struktūrā.<sup>10,13,14</sup> Tas mudināja izmantot šo struktūras elementu SUB1 inhibitoru izveidē.  $\alpha$ -Ketoamīda daļa savienojumos **2**, **17f** ( $R^1 = 2$ -butil- vai ciklopentil-) tika nomainīta uz borskābes fragmentu, un savienojumi **18**, **19a** tika izvēlēti kā pamatstruktūras turpmākām modifikācijām P1, P3 un P5 pozīcijās (3. att.).



3. att. Potenciālie SUB1 inhibitori ar borskābes fragmentu  $\alpha$ -ketoamīda vietā.

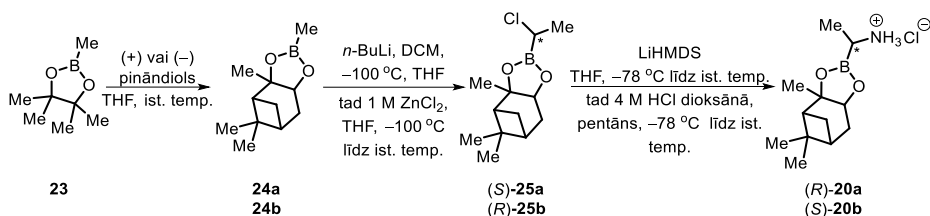
### 2.1 P1 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju sintēze<sup>15</sup>

Lai novērtētu struktūras–aktivitātes likumsakarības, tika sintezēti dažādi peptīdisku borskābju atvasinājumi, kas saturēja vaļējus un cikliskus borskābju fragmentus P1 pozīcijā (4. shēma). Būvbloki **14k,f** un **20a–g** tika sametināti, izmantojot HATU (**A**) vai T3P (**B**), lai iegūtu savienojumus **21**, **22a–g**. Aizsarggrupas tika nošķeltas ar  $\text{BBr}_3$  (**C**) vai ar izobutilborskābi, kam sekoja apstrāde ar TFA (**D**), lai iegūtu borskābes **18**, **19a–g**.



4. shēma. Peptīdisku borskābju atvasinājumu sintēze ar modificētu P1 pozīciju.

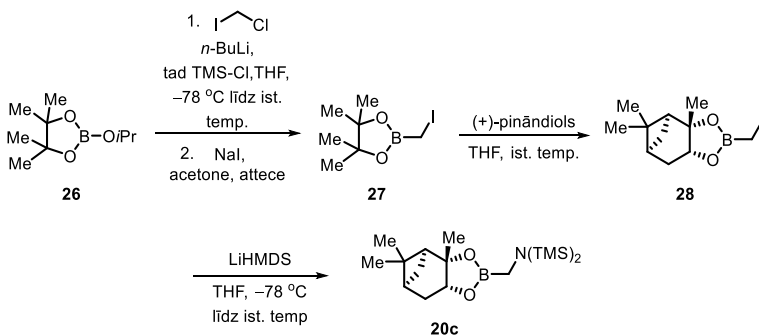
Borskābju fragmentu **20a–g** sintēze ir parādīta nākamajās shēmās. Lai sintezētu attiecīgo  $\alpha$ -aminoborskābes atvasinājumu **20a**, kam ir L-aminoskābes stereoķīmija, tika izmantota Matesona (*Matteson*) homologēšana<sup>16</sup> (5. shēma). Metilborskābes pinakola esteris (**23**) tika pārvērsts par (+)-pināndiola esterī **24a**, kas tālāk pie  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  reaģēja ar *in situ* ģenerētu dihlorometilītiiju. Cinka(II) hlorīda veicināta āta kompleksa pārgrupēšanās ļāva iegūt  $\alpha$ -hlorborskābes esterī **25a**. Sekojoša  $\text{S}_{\text{N}}2$  reakcija ar LiHMDS deva *N,N*-bis-TMS aizsargātu  $\alpha$ -aminoborskābes esterī, kas pēc apstrādes ar 4 M HCl dioksānā veidoja būvbloku **20a**.



5. shēma. Borskābes fragmentu saturošu būvbloku **20a,b** sintēze.

Otra stereoizomēra **20b** iegūšanai tika izmantota tā pati metode (5. shēma), taču šajā gadījumā tika izmantots (–)-pināndiols, lai pagatavotu hirālu borskābes esterī **24b**. Tas tika pārvērsts par hlorīdu (*R*)-**25b**, veidojot būvbloku **20b**, kurā aizvietotāju novietojums līdzinās D-aminoskābes stereoķīmijai.

Lai optimizētu būvbloku **20c–f** sintēzi, tika iegūts atslēgās savienojums **28** (6. shēma). Izopropoksiborskābes pinakola esteris (**26**) tika pakļauts homologēšanas reakcijai ar *in situ* veidotu hlormetilītiiju. Saskaņā ar GC-MS analīzēm šī reakcija deva maisījumu, kurā I-/Cl- aizvietotie produkti bija attiecībā 1 : 5. Sausais atlikums tika pakļauts reakcijai ar NaI acetona, lai nodrošinātu pilnu konversiju par **27**. Pāresterificēšanas reakcija deva starpsavienojumu **28**, no kura tālākā reakcijā ar LiHMDS tika iegūts būvbloks **20c**.



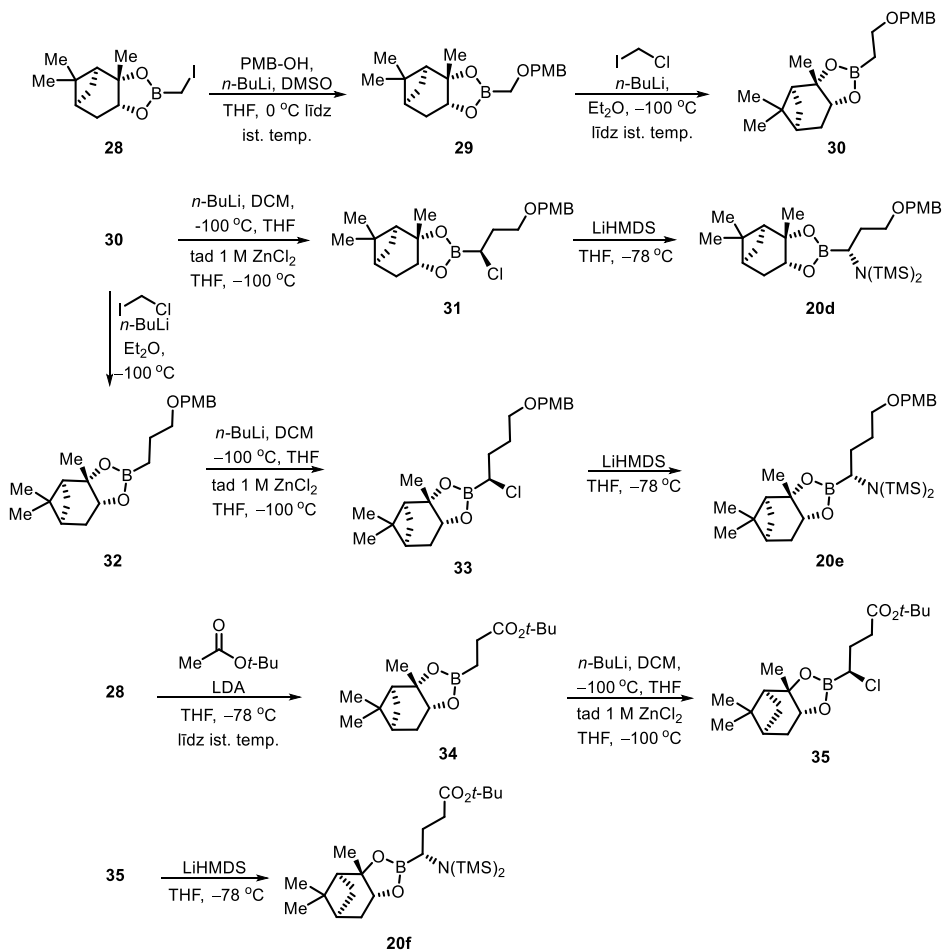
6. shēma. Borskābes fragmentu saturoša būvbloka **20c** sintēze.



*p*-Metoksibenzilspirts pēc deprotonēšanas ar *n*-BuLi tika pievienots būvblokam **28**, lai iegūtu aizvietošanas produktu **29** (7. shēma). Tālākās oglekļa virknes pagarināšanas reakcijas, kā arī iegūtā hlorīda **31** aizvietošana ietvēra iepriekš apskatītās reakcijas. Lai izvairītos no vērtīgā būvbloka zudumiem, tika nolemts to izmantot turpmākajās reakcijās kā bis-TMS aizvietotu amīnu **20d**.

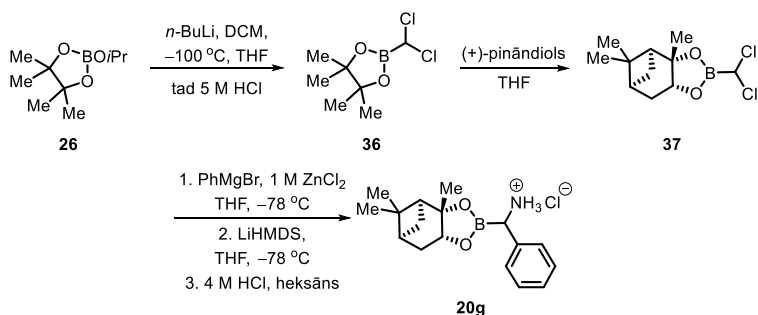
Savienojuma **20d** homologs **20e** tika iegūts pēc iepriekš aprakstītajām metodēm no savienojuma **30** (7. shēma).

Arī būvbloka **20f** sintēze tika sākota no savienojuma **28**, kas tika pakļauts reakcijai ar deprotonētu *tert*-butilacetātu (7. shēma). Reakcijā iegūtais borskābes pināndiola esteris **34** tika pakļauts Matesona homologēšanai un sekojošai S<sub>N</sub>2 reakcijai ar LiHMDS, lai iegūtu bis-TMS aizsargātu amīnu **20f**.



7. shēma. Borskābes fragmentu saturošu būvbloku **20d-f** sintēze.

Pēdējo būvbloku **20g** sākotnēji tika mēģināts iegūt pēc iepriekš izstrādātās Matesona homologēšanas procedūras, taču tā izrādījās neveiksmīga pieeja, tāpēc šoreiz nācās sintēzes ceļu mainīt (8. shēma). Alternatīvā pieeja ietvēra *in situ* ģenerētu dihlormetillitiija pievienošanas izopropoksiborskābes pinakola esterim (**26**), lai rezultātā iegūtu borskābes esterī **36**. Pāresterificēšana deva savienojumu **37**, kas tika pakļauts trīs soļu sekvencei, iegūstot būvbloku **20g** kā diastereomēru maisījumu (1 : 2).



8. shēma. Borskābes fragmentu saturoša būvbloka **20g** sintēze.

## 2.2 P1 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju PfSUB1 inhibēšanas spēja<sup>a</sup>

Apmainot  $\alpha$ -ketoamīda funkcionālo grupu savienojumā **2** pret borskābes fragmentu, tika iegūts savienojums **18**, kas uzrādīja aptuveni septiņas reizes lielāku inhibēšanas potenciālu kā ketoamīds **17f** (2. tab., 1. aile). Savienojot labāko zināmo peptīda daļu no  $\alpha$ -ketoamīdu sērijas (ciklopentil- P4 pozīcijā) un borskābes fragmentu, tika iegūts substrāts **19a**, kas uzrādīja zemu nanomolāru inhibēšanas spēju (2. tab., 2. aile). D-aminoskābes stereoķīmija borskābes fragmentā (**19b**, 2. tab., 3. aile) un metil- grupas zaudēšana (**19c**, 2. tab., 4. aile) rezultējās ar samazinātu inhibitoro aktivitāti. Paplašinot borskābju fragmentu klāstu ar dažāda garuma alkil- un aril- aizvietotājiem, varēja novērot, ka lielākoties tas neuzlabo inhibēšanas spēju, izņemot savienojumu ar hidroksietil- grupu (**19d**, 2. tab., 5. aile).

Izvēlētajiem aktīvākajiem inhibitoriem tika noteikta arī spēja inhibēt *P. falciparum* parazītu augšanu asinsšūnu testā (2. tab.). Lai gan savienojumi **18**, **19a** un **19c** uzrādīja  $\sim 2\ \mu\text{M}$  inhibēšanas konstanti, tomēr šie dati neuzrādīja korelāciju starp  $\text{IC}_{50}$  un  $\text{EC}_{50}$  vērtībām. Tika secināts, ka, iespējams, šiem savienojumiem ir nepietiekama membrānas caurlaidība, tādējādi tiem ir limitēta pieeja SUB1 enzīmam.

<sup>a</sup> Sadarbībā ar M. J. Blackman, C. Withers-Martinez un kolēģiem, *Malaria Biochemistry Laboratory, The Francis Crick Institute*.

Peptīdisko borskābju SUB1 inhibēšanas spēja enzimatiskajā reakcijā un šūnu testā.

Nr.	Struktūra	IC <sub>50</sub> nM (rPfSUB1)	EC <sub>50</sub> (μM) (parazīta augšana)
1. 18		69,4 ± 1,2	1,8 ± 0,6
2. 19a		9,3 ± 0,5	2,3 ± 1,4
3. 19b		60,1 ± 2,1	18,4 ± 1,8
4. 19c		54,3 ± 1,1	1,9 ± 0,4
5. 19d		4,6 ± 0,1	15,0 ± 3,6
6. 19e		204,2 ± 7,5	N.D.
7. 19f		18,7 ± 1,3	N.D.
8. 19g		112,0 ± 2,3	N.D.

IC<sub>50</sub> vērtības noteiktas, balstoties uz rPfSUB1- vadītas fluorogēnā substrāta šķelšanas reakciju katra inhibitora klātienē. Vērtības (± standartnovirze) ir aprēķinātas, ņemot vērā vidējo no trim atsevišķiem mērījumiem.

EC<sub>50</sub> vērtības (± standartnovirze) noteiktas, izmantojot SYBR Green 1 testu ar inkubāciju 96 h (divi eritrocitiskie augšanas cikli); N.D., nav noteikts.

### 2.3 P3 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju sintēze

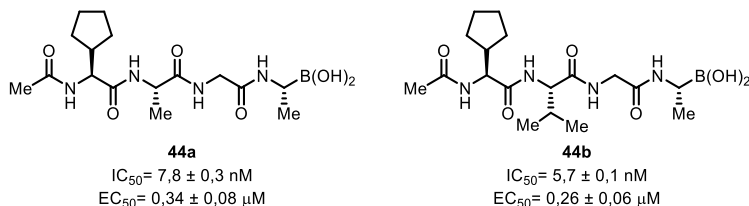
Lai noskaidrotu tālākos optimizēšanas virzienus, tika noteikts savienojuma **19a** sasitības veids enzīma aktīvajā centrā, izmantojot molekulāro modelēšanu<sup>a</sup> (4. att.). Šie pētījumi liecināja, ka savienojuma P3 pozīcijas sānu ķēde iestiepjas šķīdinātāja apgabalā,

<sup>a</sup> Sadarbībā ar M. J. Blackman, C. Withers-Martinez un kolēģiem, *Malaria Biochemistry Laboratory, The Francis Crick Institute.*



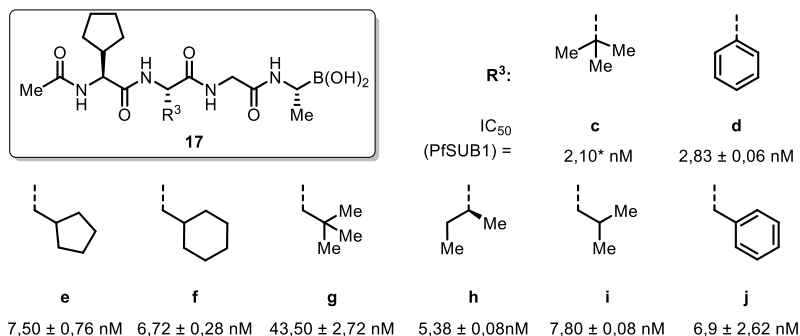
## 2.4 P3 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju PfSUB1 inhibēšanas spēja

Pirmie divi iegūtie inhibitori ar alanīna un valīna sānu ķēdēm P3 pozīcijā (savienojumi **44a** un **44b**) uzrādīja nanomolāru aktivitāti, kas bija salīdzināma ar inhibitoru **19a**, kam ir treonīna sānu ķēde (5. att.). Šie savienojumi uzrādīja arī submikromolāru aktivitāti šūnu testos, kas iepriekš nebija novērots šajā savienojumu klasē.<sup>15</sup>



5. att. PfSUB1 inhibitori ar augstu aktivitāti enzimatiskajos testos un parazīta augšanas testos.

Tika noteikta arī pārējo modificēto borskābju spēja inhibēt PfSUB1 (6. att.). Rezultāti uzrādīja, ka savienojums **44g** bija vismazāk aktīvs, savukārt vairāki savienojumi ar leicīna, ciklopentil-, cikloheksil- un fenilalanīna sānu ķēdēm (**44i,e,f,j**) uzrādīja līdzīgu spēju inhibēt SUB1. Peptīdiskās borskābes ar *tert*-butilglicīna (**44c**), fenilglicīna (**44d**) un izoleicīna (**44h**) sānu ķēdēm P3 pozīcijā bija nedaudz efektīvāki SUB1 inhibitori.



\*viens mērījums

6. att. P3 pozīcijā modificētu inhibitoru **44c–j** SUB1 inhibitorā aktivitāte.<sup>a,b</sup>

Savienojums **44b** tika pārbaudīts arī uz vairākiem zīdītāju serīna enzīmiem, piemēram, tripsīnu, himotripsīnu un elastāzi.<sup>a</sup> Tika noteikts, ka tas ir vairāk nekā 100 reīzu aktīvāks pret PfSUB1, salīdzinot ar iepriekš minētajiem enzīmiem. Mikroskopiska nobriedušu šizontu kultūru izpēte atklāja, ka pēc 4 h inkubēšanas ar savienojumiem **44a** un **44b** 10 μM

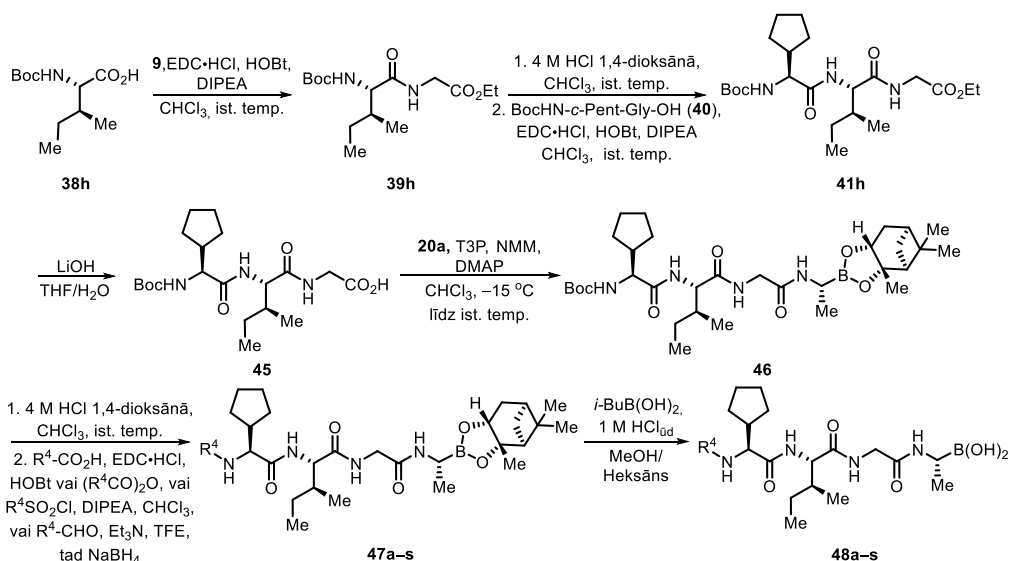
<sup>a</sup> Sadarbībā ar M. J. Blackman, C. Withers-Martinez un kolēģiem, *Malaria Biochemistry Laboratory, The Francis Crick Institute.*

<sup>b</sup> Vidējā vērtība no diviem atsevišķiem mērījumiem (± standartnovirze).

koncentrācijā, netika novērots jaunizveidoto merozoītu egress no inficētajām šūnām, apstiprinot savienojumu SUB1 inhibēšanas ietekmi uz parazīta dzīves ciklu.<sup>15</sup>

## 2.5 P5 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju sintēze

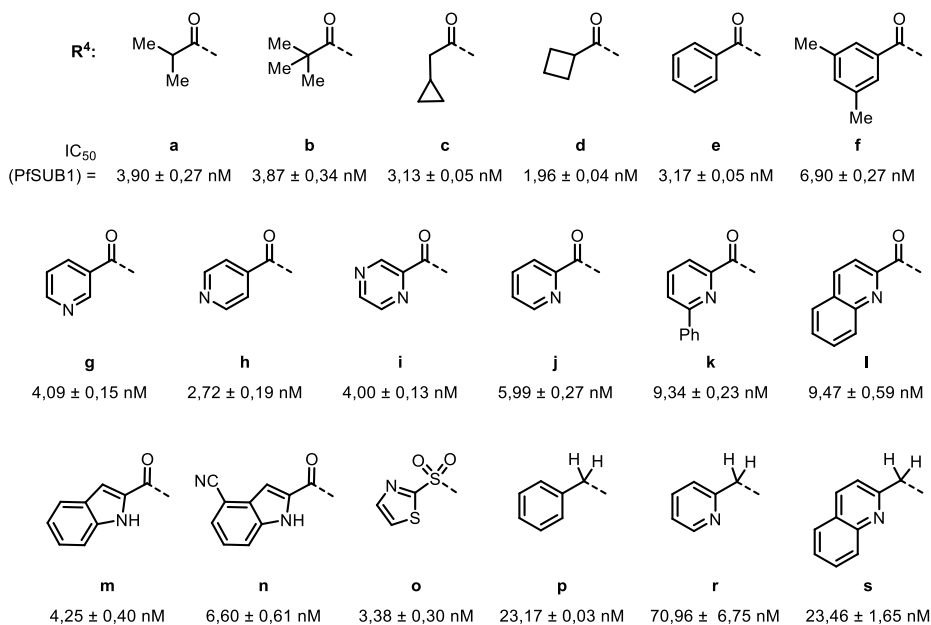
Apvienojot iepriekš noskaidrotās SAR likumsakarības, tika sintezēta virkne ar P5 modificētām peptīdiskajām borskābēm (10. shēma). Sākotnēji tika iegūta skābe **45** pēc iepriekš aprakstītās procedūras (9. shēma). Sekojošā sametināšana ar būvbloku **20a** tika veikta pēc nedaudz atšķirīgas procedūras.<sup>17</sup> Atslēgas savienojums **46** pēc aizsarggrupas nošķelšanas tika pakļauts acilēšanai, sulfonilēšanai vai reducējošai aminēšanai. Pēdējā soli tika iegūtas peptīdiskās borskābes **48a–s** kā iepriekš, pāresterificējot pināndiola esteru ar izobutilborskābi.



## 2.6 P5 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju PfSUB1 inhibēšanas spēja<sup>a</sup>

Savienojumu **48a–s** PfSUB1 inhibēšanas spēja redzama 7. attēlā. Rezultāti liecina, ka savienojumi ar dažādām *N*-acil- grupām – alifātiskām, aromātiskām, heteroaromātiskām – uzrāda zemu nanomolāru aktivitāti, kas ir salīdzināma ar inhibitora **44h** aktivitāti. Interesanti, ka arī sulfonilētais analogs **48o**, kam ir mazāka peptīdiskā daba, uzrādīja līdzīgu spēju inhibēt SUB1. Kad karbonilgrupa P5 pozīcijā tika aizstāta ar metilēngrupu, savienojumu SUB1 inhibēšanas spēja kritās (**48e** un **48p**; **48j** un **48r**; **48l** un **48s**).

<sup>a</sup> Sadarbībā ar M. J. Blackman, C. Withers-Martinez un kolēģiem, *Malaria Biochemistry Laboratory, The Francis Crick Institute.*



7. att. Savienojumu **48a–s** PfSUB1 inhibēšanas spēja.<sup>a</sup>

Diemžēl savienojumi **48f,k,l** 500 nM koncentrācijā uzrādīja cilvēka 20S proteasomas inhibēšanu,<sup>b</sup> lai gan SUB1 inhibēšanas spējas IC<sub>50</sub> (PfSUB1) vērtības bija līdzīgas savienojumam **44b**, kas iepriekš uzrādīja augstu selektivitāti pret SUB1. Šie rezultāti liecināja, ka P5 modifīcēšana var samazināt SUB1 inhibēšanas selektivitāti attiecībā pret cilvēka 20S proteasomu.

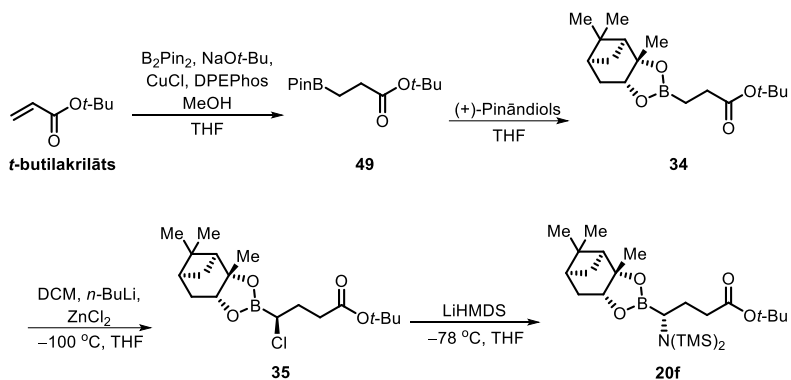
## 2.7 P5 un P1 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju sintēze

Lai uzlabotu savienojumu selektivitāti, tika nolemts inhibitoru struktūrā iekļaut selektivitāti uzlabojošus stuktūrelementus. Par pamatu nākamo inhibitoru dizainam kalpoja savienojums **19f**, kuram P1 pozīcijā atrodas glutamīnskābes sānu ķēde. Šis savienojums iepriekš uzrādīja vērā ņemamu selektivitāti pret SUB1, salīdzinot ar cilvēka 20S proteasomas inhibēšanu.

Būvbloka **20f** sintēzei šoreiz tika izvēlēta cita pieeja (11. shēma), kas bija ātrāka un daudz produktīvāka. *tert*-Butilakrilāts tika pakļauts vara(I) katalizētai β-borilēšanas reakcijai,<sup>18</sup> kas ļāva iegūt produktu **49** ar augstu iznākumu. Pēc pāresterificēšanas un Matesona homologēšanas iegūtais hlorīds **35** tika pārvērsts par bis(trimetilsilil)amīna atvasinājumu **20f**.

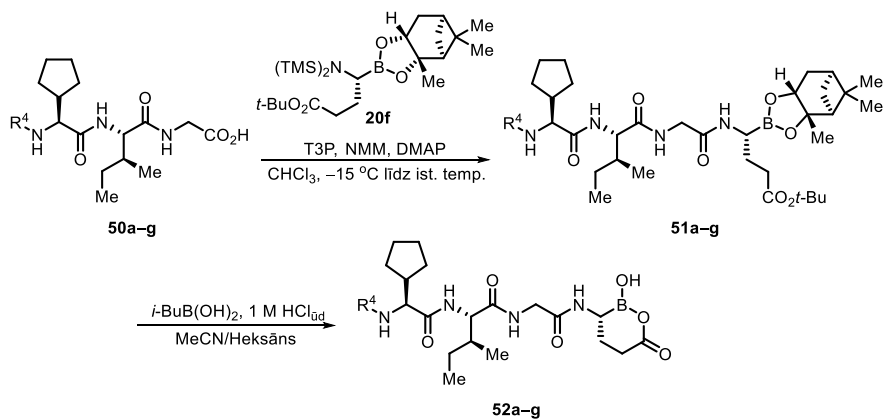
<sup>a</sup> Vidējā vērtība no diviem atsevišķiem mērījumiem (± standartnovirze).

<sup>b</sup> Sākotnējie rezultāti; sadarbībā ar M. J. Blackman, C. Withers-Martinez un kolēģiem, *Malaria Biochemistry Laboratory, The Francis Crick Institute*.



11. shēma. Alternatīva pieeja borskābes fragmentu saturoša būvbloka **20f** sintēzei.

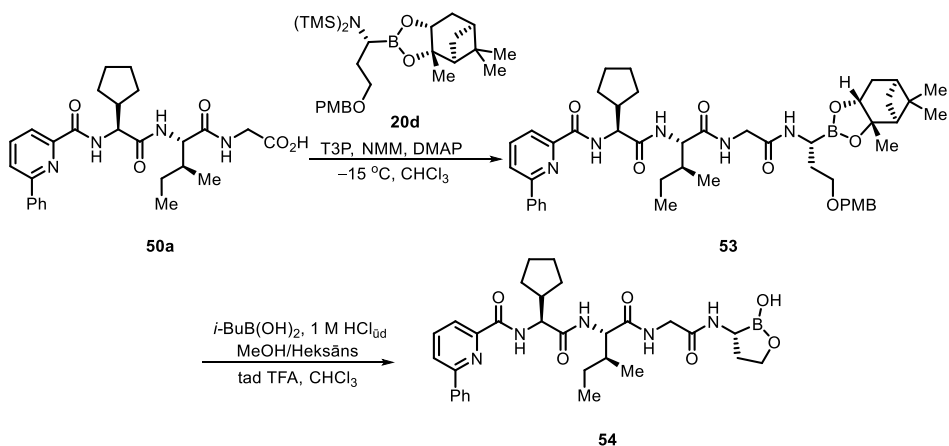
Iegūtais būvbloks **20f** tika sametināts ar iepriekš sintezētiem peptīdiem **50a–g**, kam modificēta P5 pozīcija, lai iegūtu starpproduktus **51a–g** (12. shēma). Šie savienojumi tālāk tika pakļauti pāresterificēšanas reakcijai, lai iegūtu peptīdiskās borskābes **52a–g**, turklāt reakcijas laikā tika nošķelts *tert*-butil-esteris.



12. shēma. Borskābju **52a–g** iegūšana.

Peptīds **50a** tika sametināts arī ar iepriekš iegūto būvbloku **20d**, kas saturēja PMB-aizsargātu hidroksietil- aizvietotāju, lai iegūtu savienojumu **53**, kas pēc pāresterificēšanas un PMB grupas nošķelšanas ar TFA deva galaproduktu **54** (13. shēma).

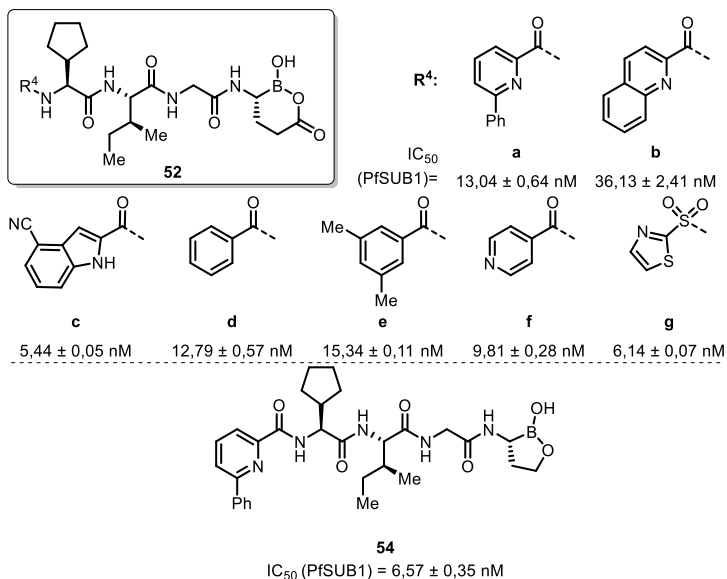




13. shēma. Savienojuma **54** iegūšana.

## 2.8 P5 un P1 pozīcijā modificētu peptīdisku borskābju PfSUB1 inhibēšanas spēja

Savienojumu **52a–g** un **54** PfSUB1 inhibēšanas spēja redzama 8. attēlā.<sup>a</sup> Lielākoties šie savienojumi uzrādīja samazinātu aktivitāti, salīdzinot ar attiecīgajiem savienojumiem, kam modificēta tikai P5 pozīcija, taču jāatzīmē, ka savienojumu SUB1 inhibēšanas spēja joprojām bija nanomolārā līmenī. Attiecīgi savienojums **54** uzrādīja nedaudz uzlabotu PfSUB1 inhibēšanas spēju, salīdzinot ar savienojumu **48k**.

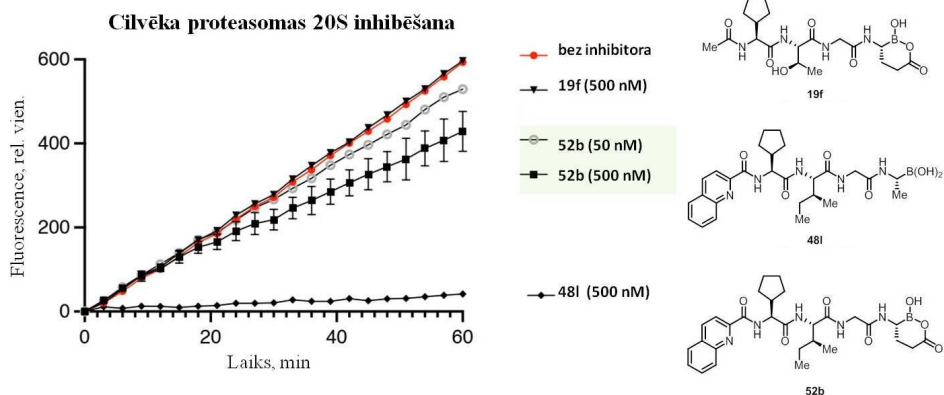


8. att. Savienojumu **52a–s** un **54** rPfSUB1 inhibēšanas spēja.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Sadarbībā ar *M. J. Blackman, C. Withers-Martinez* un kolēģiem, *Malaria Biochemistry Laboratory, The Francis Crick Institute*.

<sup>b</sup> Vidējā vērtība no diviem atsevišķiem mērījumiem (± standartnovirze).

Glutamīnskābes fragmenta ietekme P1 pozīcijā tika novērtēta cilvēka proteasomas inhibēšanas testā.<sup>a</sup> References savienojums **19f** praktiski neinhibēja šo enzīmu kompleksu, savukārt modificētais savienojums **48l** uzrādīja augstu inhibēšanas spēju (9. att.). Apvienojot modificēto peptīdisko daļu no viena savienojuma un borskābes fragmentu no otra, tas rezultējās savienojumā **52b**, kas uzrādīja nedaudz zemāku PfsUB1 inhibēšanas spēju, taču šādā veidā tika ievērojami samazināta cilvēka proteasomas inhibēšana pie 50 nM un 500 nM koncentrācijām.



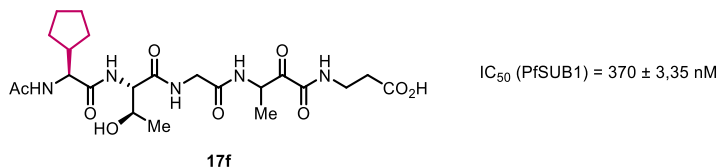
9. att. Savienojumi ar modificētu P5 un P1 pozīciju cilvēka proteasomas inhibēšanas testā.

Savienojuma **52b** rezultāti šajos testos apstiprināja, ka ir nepieciešams savienojumu struktūrā iekļaut selektivitāti uzlabojošu struktūrelementu, kas balstīts enzīma dabiskajos substrātos. Turklāt sekojošajos parazitāru augšanas testos šis savienojums uzrādīja traucētu merozoītu egresu no inficētajām asinsšūnām.

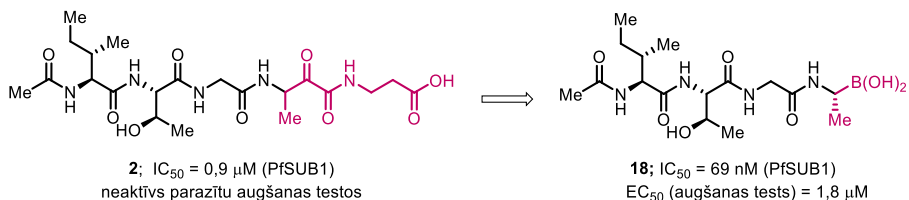
<sup>a</sup> Sākotnējie rezultāti; sadarbībā ar M. J. Blackman, C. Withers-Martinez un kolēģiem, *Malaria Biochemistry Laboratory, The Francis Crick Institute*.

## SECINĀJUMI

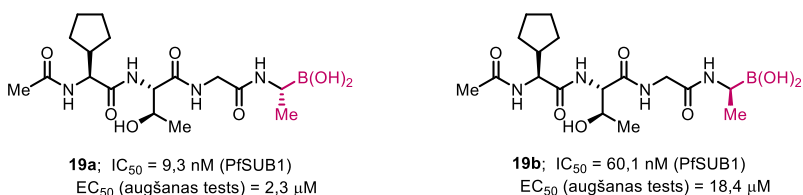
1. SUB1 inhibitori, kas veidoti balstoties uz peptīdu sekvenci dabiskajos substrātos, ir aktīvāki, salīdzinot ar inhibitoriem, kas atrasti savienojumu bibliotēku skrīningā.
2. Peptīdiskais  $\alpha$ -ketoamīds **17** ar ciklopentil- grupu P4 pozīcijā uzrāda visaugstāko SUB1 inhibēšanas spēju, apstiprinot enzīma S4 kabatas augsto hidrofobo dabu.



3. Ketoamīda fragmenta maiņa uz borskābi peptīdiskajos SUB1 inhibitoros deva iespēju izveidot savienojumus ar nanomolāru aktivitāti. Izvēlētas peptīdiskās borskābes nomāca parazitāru vairošanos arī asinsšūnu testos.

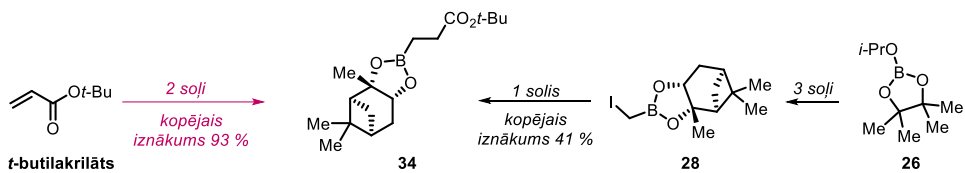


4. Aizvietotājiem P1 pozīcijā borskābēs **19** jāatbilst L-aminoskābju stereokīmija, lai iegūtu aktīvākus PfsUB1 inhibitorus.



5. Lipofīli aizvietotāji peptīdisku borskābju P3 pozīcijā nodrošina nepieciešamās hidroforās sadarbības ar enzīma S3 kabatu, tādējādi tiek iegūti savienojumi ar uzlabotām PfsUB1 inhibēšanas spējām un submikromolāru aktivitāti parazitāru augšanas šūnu testos.
6. Savienojumi **48** ar dažādām *N*-acil- un *N*-sulfonil- grupām uzrādīja nanomolāru SUB1 inhibēšanas spēju, norādot, ka šajā pozīcijā var tikt ievadīts plašs klāsts ar alifātiskiem, aromātiskiem un heteroaromātiskiem aizvietotājiem, taču savienojumi ar metilēngrupu karbonilgrupas vietā P5 pozīcijā uzrādīja samazinātu SUB1 inhibēšanas spēju.
7. Glutamīnskābes sānu ķēdes ievadīšana peptīdisku borskābju P1 pozīcijā palielina SUB1 inhibēšanas selektivitāti attiecībā pret cilvēka proteasomu.

8. Vara katalizēta *tert*-butilakrilāta β-borilēšana un sekojoša pāresterificēšana ir daudz efektīvāka pieeja savienojuma **34** iegūšanai, salīdzinot ar iepriekš izmantoto pieeju, kurā tas tika sintezēts no atslēgas savienojuma **28**.



9. Visefektīvākais reaģents peptīdiskās daļas sametināšanai ar α-aminoborskābes būvbloku ir propānfosforskābes anhidrīds, tā izmantošana samazina blakusprodukta veidošanos.

**DOCTORAL THESIS PROPOSED TO RIGA TECHNICAL UNIVERSITY FOR  
THE PROMOTION TO THE SCIENTIFIC DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCE**

To be granted the scientific degree of Doctor of Sciences (Ph. D.), the present Doctoral Thesis has been submitted for the defense at the open meeting of RTU Promotion Council on May 25, 2023 at the Faculty of Materials Science and Applied Chemistry of Riga Technical University, 3 Paula Valdena Street, Room 272.

**OFFICIAL REVIEWERS**

Senior Researcher Dr. chem. Pāvēls Arsenjans  
Latvian Institute of Organic Synthesis, Latvia

Asoc. Professor Dr. chem. Māra Plotniece  
Riga Technical University, Latvia

Professor Dr. Gabriele Costantino  
University of Parma, Italy

**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 Science (Ph. D.) is my own. I confirm that this Doctoral Thesis has not been submitted to any other university for the promotion to a scientific degree.

Elīna Līdumniece ..... (signature)

Date .....

The Doctoral Thesis has been written in English. It consists of introduction, literature review, results and discussion, experimental part, conclusions, references, 29 figures, 14 schemes, 7 tables, 2 appendices; total number of pages is 126.

# GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS

## Introduction

Malaria is an acute febrile disease caused by *Plasmodium* parasites and spread to people through the bites of infected *Anopheles* mosquitoes. According to the latest malaria report<sup>1</sup> in 2020 there were estimated 241 million cases of malaria and 627 000 of deaths caused by this infectious disease.

Enzymes of microbial pathogens are well-established drug targets, from the bacterial transpeptidase targets of beta-lactam antibiotics to the protease and reverse transcriptase targets of several anti-viral drugs. Pathogenic protozoa such as the *Plasmodium* species that cause malaria are no exception, and two of the historically most successful antimalarial drugs (pyrimethamine and proguanil) target the parasite dihydrofolate reductase.<sup>2</sup> However, resistance to these antifolate drugs is now widespread and reports of the emergence of parasite resistance to other front-line antimalarial therapeutics, including artemisinin-based combinations (ACTs), are of great concern.<sup>3</sup> There is a widely accepted need to strengthen the antimalarial drug pipeline by the identification of new classes of antimalarial drugs with new modes of action.

All the clinical manifestations of malaria are caused by cycles of parasite proliferation within red blood cells (Fig. 1). Specialised developmental forms called merozoites invade the red cell and rapidly transform within a parasitophorous vacuole (PV) into feeding forms called trophozoites. Over a period of around 48 hours in the case of the most virulent *Plasmodium* species, *Plasmodium falciparum*, the intracellular parasite enlarges, undergoes nuclear division, and finally segments to form 16 or more daughter merozoites. These are released from the host cell in a lytic process called egress to allow the merozoites to invade fresh red cells and repeat the cycle. Research over the past 3 decades has revealed that egress is regulated by a parasite enzyme pathway, with a central role for a calcium-dependent serine protease called SUB1. A single orthologue of SUB1 is found in the genomes of all known *Plasmodium* species, and gene disruption studies have shown that SUB1 is essential for parasite survival. SUB1 is synthesized as an enzymatically inactive zymogen, which undergoes at least two proteolytic processing events.<sup>4</sup> First, autocatalytic cleavage forms p54 (54-kDa form), then a second processing step produces the mature p47 (47-kDa form) from p54. The second processing event is mediated by plasmepsin X, a parasite aspartic protease.<sup>5</sup>

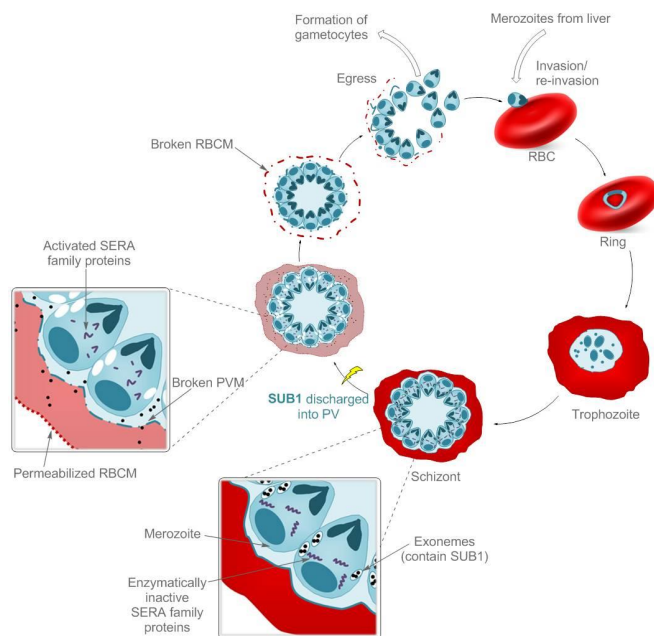
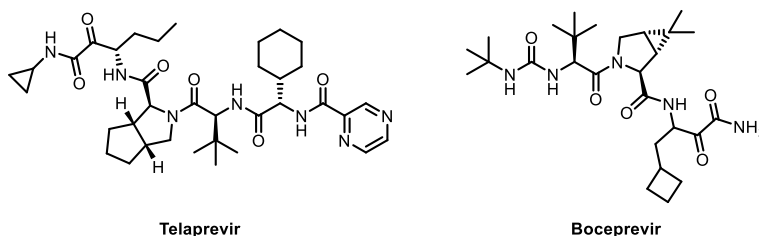


Fig. 1. The asexual blood stage life cycle of *P. falciparum* and the role of SUB1 in egress.

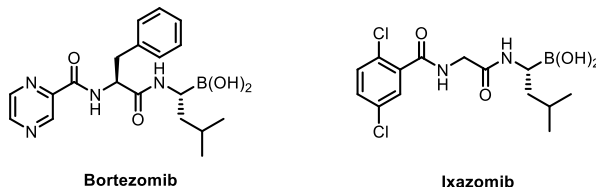
SUB1 is initially stored in a set of merozoite secretory organelles called exonemes and then discharged into the PV lumen just prior to egress in order to encounter and precisely cleave its substrates, leading ultimately to rupture of the PV and red blood cell (RBC) membranes (Fig. 1). A cGMP-dependent parasite protein kinase G (PKG) is required for discharge of SUB1 from exonemes.<sup>6</sup> Multiple substrates of SUB1 have been identified, including merozoite surface proteins and a set of soluble PV proteins called the serine-rich antigen (SERA) family.<sup>7</sup> In genetically SUB1-null parasites, rupture of neither the PV nor RBC membrane occurs, leading eventually to death of the trapped parasites, so small-molecule inhibitors of SUB1 are anticipated to similarly block egress and prevent parasite replication.

Over recent decades, target-based and structure-guided approaches have been applied in drug discovery. Rather than identifying active compounds in cell-based assays first and establishing their target and mechanism of action afterwards, target-based discovery focuses on a specific protein and mechanism of action.<sup>8</sup> Applying reversible covalent warheads in drug design has led to covalent enzyme inhibitors that serve as powerful therapeutics, as well as molecular probes with striking target selectivity.<sup>9</sup> One of the known electrophilic warheads that targets hydroxyl groups in proteins/enzymes is  $\alpha$ -ketoamide. And  $\alpha$ -ketoamide-based inhibitors form hemiketals when attacked by serine proteases. This approach

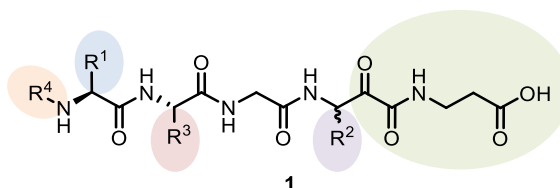
gave two FDA approved drugs, Telaprevir and Boceprevir; both for treatment of hepatitis C. Unfortunately, both have been recently suspended due to toxicity and less optimal efficacy, highlighting the challenges for reversible covalent inhibitors.<sup>9</sup> Rationally designed  $\alpha$ -ketoamide inhibitors derived from SUB1 natural substrate have showed proof-of-concept to inhibit the proteolytic activity of SUB1, yet, overall these inhibitors showed no anti-parasite activity in cell based assays, presumably due to the polar nature of these compounds.



Hydroxyl groups in proteins and enzymes, such as the side chains of serine and threonine, can be bound also to boronic acid warhead by forming ate complex, which mimics the tetrahedral transition state.<sup>9</sup> This has made an impact in medicinal chemistry, yielding FDA approved peptidic boronic acid inhibitors, Bortezomib and Ixazomib; both are proteasome inhibitors used for treatment of multiple myeloma. Besides these, there are also other boron-based enzyme inhibitors.<sup>10</sup>



The **aim of the Thesis** is to optimize structure **1** in order to develop next generation inhibitors with improved inhibitory potency against SUB1 and inhibition of parasite replication in cell based models.



To achieve the aim of the Doctoral Thesis, **the following tasks were set:**

- ✓ to summarize all the published SUB1 inhibitor discovery efforts;



- ✓ to develop the methods for the synthesis of peptidic derivatives containing boronic acids as warheads for reversible covalent binding to serine residue in the catalytic center of SUB1;
- ✓ to develop the methods for the synthesis of the peptidic ketoamide and boronic acid based inhibitors enabling the installation of different R<sup>1-4</sup> groups;
- ✓ to determine SUB1 inhibitory potency and parasite growth inhibition in cell-based assays of synthesized compounds as well as to evaluate the selectivity *versus* inhibition of mammalian serine and threonine proteases;
- ✓ to analyze structure-activity relationships (SAR) of the synthesized compounds and to use these observations for the design of new SUB1 inhibitors.

### **Scientific novelty and main results**

The research presented in the Thesis describes the development of synthesis methods to obtain peptidic boronic acid SUB1 inhibitors. The established synthetic routes enabled an access of various peptidic boronic acids with modified P1, P3 and P5 positions. The newly synthesized inhibitors were evaluated for their ability to inhibit SUB1 as well as for their antimalarial potency in cell based assays and *in vitro* selectivity counter screen tests (in collaboration with Prof. Michael Blackman's group at the Francis Crick Institute). The research has resulted in a series of compounds with low nanomolar inhibitory potency in SUB1 enzymatic assays several of which displayed sub-micromolar inhibitory potency in *P. falciparum* parasite growth tests.

### **Approbation of the Thesis**

Scientific publications:

1. **Lidumniece, E.**; Withers-Martinez, C.; Hackett, F.; Collins, C. R.; Perrin, A. J.; Koussis, K.; Bisson, C.; Blackman, M. J.; Jirgensons, A. Peptidic boronic acids are potent cell-permeable inhibitors of the malaria parasite egress serine protease SUB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2021**, *118*, e2022696118 (IF(2021): 12.779)
2. **Lidumniece, E.**; Withers-Martinez, C.; Hackett, F.; Blackman, M. J.; Jirgensons, A. Subtilisin-like Serine Protease 1 (SUB1) as an Emerging Antimalarial Drug Target: Current Achievements in Inhibitor Discovery. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 12535–12545 (IF(2021): 8.039)

Patent application:

Jirgensons, A.; **Lidumniece, E.**; Withers-Martinez, C.; Blackman, M. J.; Finn, P. W. Novel boronic acid containing peptidomimetics as malarial serine protease inhibitors. WO2021/001697, **2021**.

Results of the Thesis were presented at the following conferences:

1. **Petrova, E.**; Jirgensons, A. Synthesis of Peptidic  $\alpha$ -Ketoamide Analogues of Known PfSUB1 Inhibitor. 10th Paul Walden Symposium on Organic Chemistry, June 15–16, **2017**, Riga, Latvia.
2. **Lidumniece, E.**; Jirgensons, A. Peptidic  $\alpha$ -ketoamides as PfSUB1 Inhibitors. Balticum Organicum Syntheticum (BOS 2018), July 1–4, **2018**, Tallinn, Estonia.
3. **Lidumniece, E.**; Jirgensons, A. Peptidic  $\alpha$ -ketoamides as an inhibitors of PfSUB1. VIII EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, September 1–5, **2019**, Athens, Greece.
4. **Lidumniece, E.**; Jirgensons, A. Peptidic boronic acids as inhibitors of PfSUB1. 12th Paul Walden Symposium on Organic Chemistry, October 28–29, **2021**, Riga, Latvia.
5. **Lidumniece, E.**; Withers-Martinez, C.; Blackman, M. J.; Jirgensons, A. New peptidic boronic acid containing inhibitors of malarial subtilisin-like serine protease (SUB1). Balticum Organicum Syntheticum (BOS 2022), July 3–6, **2022**, Vilnius, Lithuania.
6. **Lidumniece, E.**; Withers-Martinez, C.; Blackman, M. J.; Jirgensons, A. Substrate based inhibitors of malarial subtilisin-like serine protease containing boronic acid warhead. 2nd Drug Discovery Conference, September 22–24, **2022**, Riga, Latvia.
7. **Lidumniece, E.**; Withers-Martinez, C.; Blackman, M. J.; Jirgensons, A. Rationally designed inhibitors of malarial subtilisin-like serine protease containing boronic acid warhead. ACS Publications Symposium: Biological and Medicinal Chemistry, March 6–8, **2023**, Bonn, Germany.

## MAIN RESULTS OF THE THESIS

In the previous studies of our group, a SUB1 inhibitor was developed, which was based on SUB1 natural substrate SERA4 cleavage site 1 decapeptide sequence (KITAQ↓DDEES) where the scissile bond was replaced with  $\alpha$ -ketoamide substructure (Fig. 2). Studies of structure activity relationships led to an analogue **2** that possessed sub-micromolar inhibitory potency against recombinant PfSUB1.<sup>11</sup>

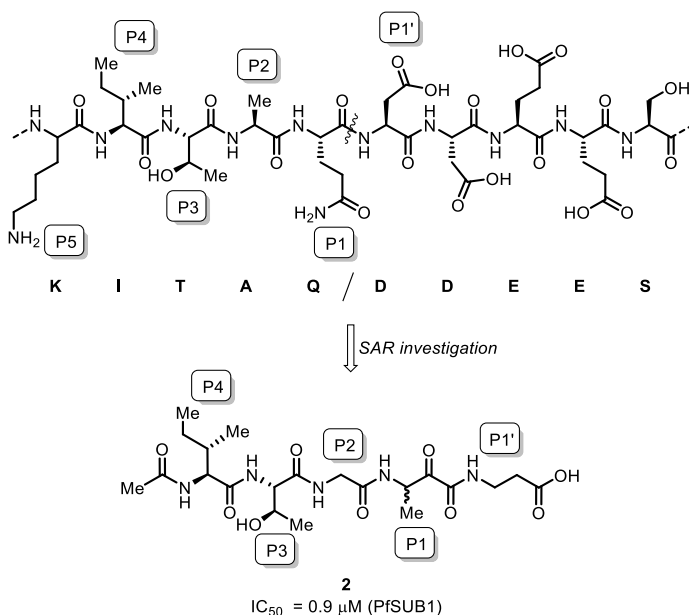


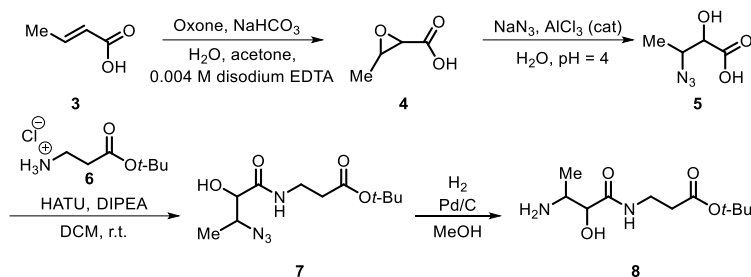
Fig. 2. Sub-micromolar ketoamide inhibitor **2** derived from SUB1 natural substrate.

Unfortunately, compound **2** and related  $\alpha$ -ketoamides showed no anti-parasite activity in cell based assays. This was perhaps unsurprising due to the polar nature of these compounds, including the presence of a carboxylic acid moiety, which was designed to mimic endogenous PfSUB1 substrate by interacting with the basic S' surface of the PfSUB1 active-site cleft. The polar inhibitors like **2** presumably had poor membrane-permeability properties. In our work we decided to modify the structure of compound **2** at P4 position, as the previous substrate scanning studies<sup>12</sup> showed that hydrophobic substituents are preferred at this position.

### 1. Synthesis and inhibitory potency of peptidic $\alpha$ -ketoamide inhibitors

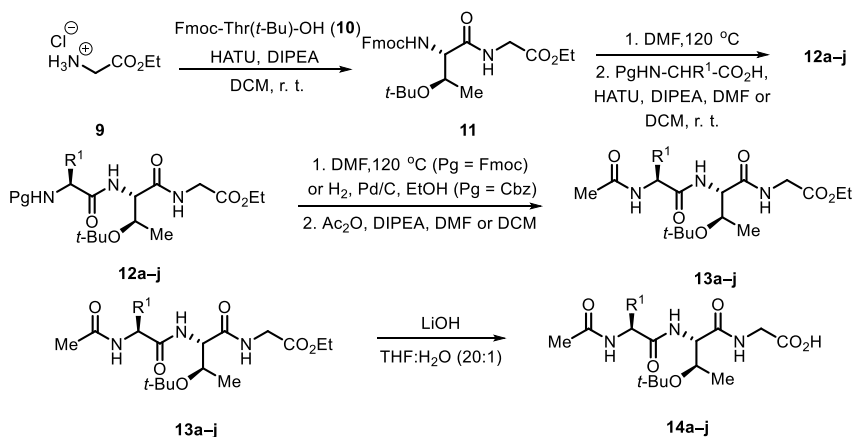
The synthesis of peptidic  $\alpha$ -ketoamide inhibitors with modified P4 position were performed in analogy to the described literature procedures.<sup>11</sup> First, building block **8** was

prepared starting from *trans*-crotonic acid (**3**) (Scheme 1). In the presence of oxone it was epoxidized to 2,3-epoxybutyric acid (**4**). AlCl<sub>3</sub> catalyzed epoxide opening reaction with sodium azide gave  $\alpha$ -hydroxy, $\beta$ -azidobutyric acid (**5**), which was subjected to the coupling with  $\beta$ -alanine *tert*-butyl ester hydrochloride (**6**). Azide reduction with Pd/C, H<sub>2</sub> gave amine **8**, which was used in the next reaction step without purification.



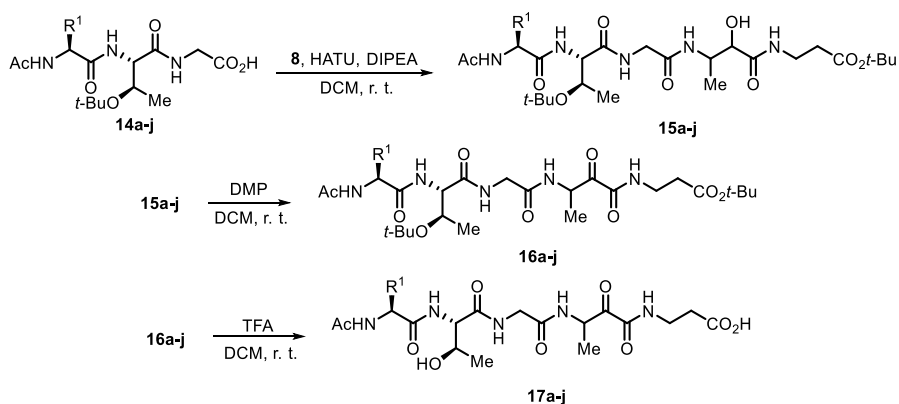
Scheme 1. The synthesis of amine **8**.

Non-prime peptidic part of the inhibitors was synthesized by coupling *N*-Fmoc-,*O*-*tert*-butyl-protected L-threonine (**10**) with glycine ethyl ester hydrochloride (**9**) to form amide **11** (Scheme 2). Compound **11** was submitted to Fmoc- cleavage and resulting amine was coupled with different natural and non-natural amino acids to get intermediates **12a-j**. Further cleavage of protecting group and acylation gave intermediates **13a-j**, which were hydrolyzed providing acids **14a-j**.



Scheme 2. The synthesis of peptidic scaffolds **14a-j**.

Building blocks **14a-j** and **8** were coupled by using HATU as a coupling agent to provide products **15a-j** (Scheme 3). After oxidation of hydroxyl group with DMP and cleavage of *tert*-butyl groups with TFA, the final compounds **17a-j** were obtained as a mixture of diastereomers.



Scheme 3. The synthesis of  $\alpha$ -ketoamides **17a–j** from peptidic scaffolds **14a–j**.

Proteolytic potency<sup>a</sup> of all synthesized compounds (see Table 1) was tested by monitoring the cleavage of the peptidic fluorogenic substrate SERA4st1F-6R12 in the presence of recombinant PfSUB1. Results indicated that inhibitors bearing phenyl or cyclohexylalanine (**17i** and **17j**, Table 1, entries 9 and 10) at P4 position showed reduced potency, also the inhibitor **17e** with cyclopropylglycine (Table 1, entry 5) at P4 showed poor inhibition, presumably due to insufficient interaction with hydrophobic S4 pocket. Most of all other tested compounds (Table 1, entries 1–4, 7, 8) showed moderate to very good activity at 10  $\mu$ M concentration, particularly when isoleucine was replaced with cyclopentylglycine **17f** (entry 6).

Table 1

Inhibitory Potency of  $\alpha$ -ketoamides **17a–j**<sup>a</sup>

Entry	R <sup>1</sup>	Degree of rPfSUB1 inhibition at 10 $\mu$ M, %	Entry	R <sup>1</sup>	Degree of rPfSUB1 inhibition at 10 $\mu$ M, %
1.	<b>17a</b>	78	6.	<b>17f</b>	97
2.	<b>17b</b>	71	7.	<b>17g</b>	75
3.	<b>17c</b>	73	8.	<b>17h</b>	56
4.	<b>17d</b>	78	9.	<b>17i</b>	38
5.	<b>17e</b>	45	10.	<b>17j</b>	23

An IC<sub>50</sub> value for compound **17f** was determined to be 370  $\pm$  3.35 nM, it was a 2-fold increase compared to the parent inhibitor **2**.

<sup>a</sup> Single measurement for each compound; in collaboration with M. J. Blackman, C. Withers-Martinez *et al.*, Malaria Biochemistry Laboratory, The Francis Crick Institute.

## 2. Synthesis and inhibitory potency of peptidic boronic acid inhibitors

Boronic acids are known as efficient warheads for covalent reversible inhibitors of serine proteases,<sup>10,13,14</sup> which prompted us to investigate them as substructures for SUB1 inhibitors.  $\alpha$ -Ketoamide moiety in compounds **2**, **17f** ( $R^1 = 2$ -butyl or cyclopentyl) was replaced with boronic acid moiety (Fig. 3), and the compounds **18**, **19a** were selected as a base for further development of PfSUB1 inhibitors by modifying P1, P3 and P5 positions.

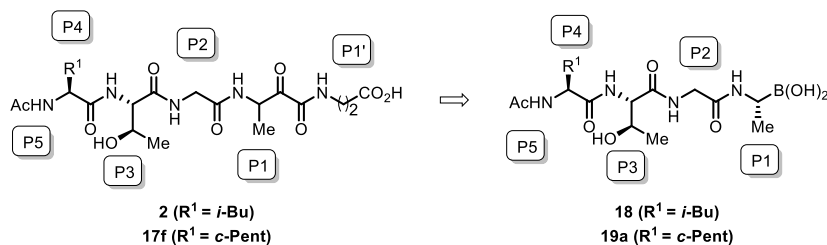
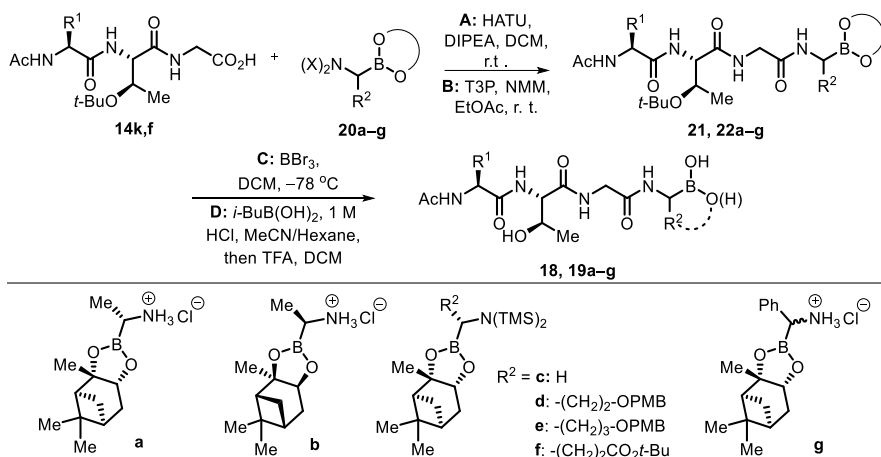


Fig. 3. Boronic acid covalent reversible serine binding group as an alternative to  $\alpha$ -ketoamide.

### 2.1 Synthesis of the peptidic boronic acids with a modified P1 position<sup>15</sup>

To evaluate SAR of P1 amino acid side chain, boronic acid derivatives were synthesized bearing different cyclic or acyclic boronic acid moieties at P1 position (Scheme 4). Building blocks **14k,f** and **20a–g** were coupled by using HATU (**A**) or T3P (**B**) to provide the products **21**, **22a–g**. Protecting groups were cleaved either by  $\text{BBr}_3$  (**C**) or by treatment with isobutylboronic acid followed by TFA (**D**) to get free boronic acids **18**, **19a–g**.

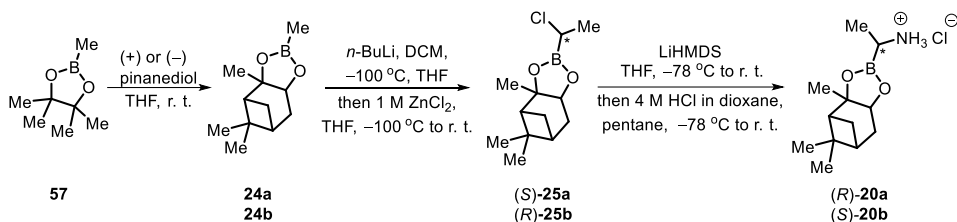


Scheme 4. Synthesis of the peptidic boronic acids with a modified P1 position.

The synthesis of boronic acid building blocks **20a–g** was performed as described in the following schemes. To synthesize the corresponding  $\alpha$ -amino boronic acid derivative

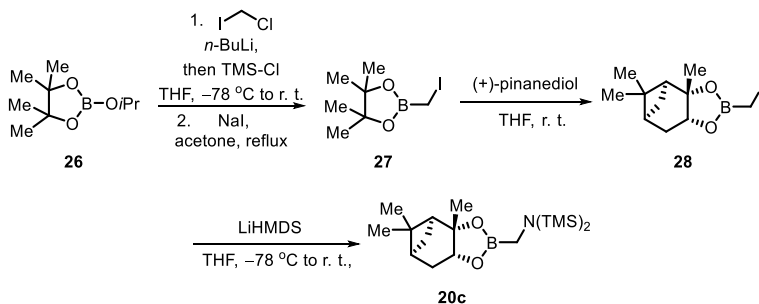
**20a** that resembles L-alanine stereochemistry, the Matteson homologation<sup>16</sup> was used (Scheme 5). First, methylboronic acid pinacol ester (**23**) was converted to (+)-pinanediol ester **24a**. Second, dichloromethyl lithium species was generated *in situ* at  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  and to this the boronic ester **24a** was added. Zinc(II) chloride promoted rearrangement of the intermediate ate-complex gave the desired  $\alpha$ -chloro boronic acid ester **25a**. This was subjected to  $\text{S}_{\text{N}}2$  reaction with LiHMDS to give bis-TMS protected  $\alpha$ -amino boronic acid ester. After addition of 4 M HCl in dioxane, the desired building block **20a** was isolated.

To obtain the stereoisomer **20b** the same pathway as described above was employed (Scheme 5), but (–)-pinanediol was used to prepare a chiral boronic ester **24b**. It was transformed to chloride (*R*)-**25b**, which was used to make the compound **20b** where  $\alpha$ -amino boronic acid moiety resembles D-alanine stereochemistry.



Scheme 5. The synthesis of boronic acid containing building blocks **20a,b**.

To optimize the synthesis of the building blocks **20c–f**, the key intermediate **28** was prepared (Scheme 6). Isopropoxyboronic acid pinacol ester (**26**) was subjected to homologation with chloromethyl lithium species. According to GC-MS analysis the reaction mixture contained iodo-/chloro-substituted products in a 1 : 5 ratio, thus, the crude product was treated with NaI in acetone to get a full conversion to product **27**. Transesterification reaction led to an intermediate **28**, which was converted to a building block **20c** by the treatment with LiHMDS.

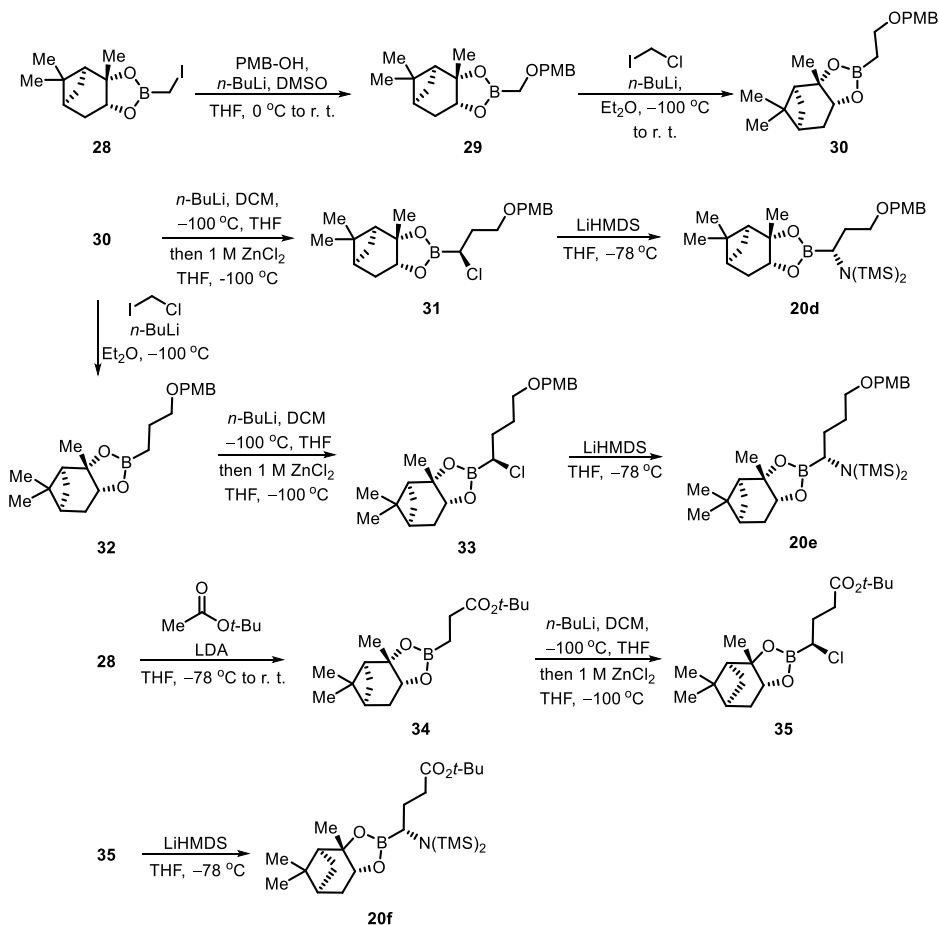


Scheme 6. The synthesis of boronic acid containing building blocks **54c**.

*p*-Methoxybenzyl alcohol was deprotonated with *n*-BuLi and then added to the building block **28** to get substitution product **29** (Scheme 7). Further homologation reactions and conversion of chloride **31** to bis-TMS protected amine **20d** was performed as previously described. To avoid the loss of valuable building block, it was decided to use the compound in the coupling step as an *N,N*-bis-TMS protected intermediate **20d**.

Homologue **20e** was obtained from compound **30** by the same homologation and substitution sequence described (Scheme 7).

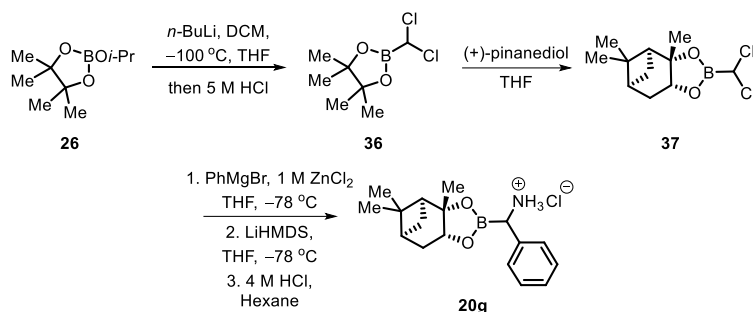
To obtain amino boronic acid building block **20f** containing a carboxylic acid moiety in the side chain, the synthesis was started with deprotonated *tert*-butyl acetate and iodomethaneboronate **28** (Scheme 7). The Matteson homologation gave  $\alpha$ -chloro boronic acid ester **35** in excellent yield, which was then converted to bis-TMS protected amine **20f**.



Scheme 7. The synthesis of boronic acid containing building blocks **20d-f**.



Finally, the compound **20g** containing a phenyl group alpha to the boronic acid was synthesized. Unfortunately, the previously used Matteson homologation was not successful. Alternative method was applied (Scheme 8), which involved the use of isopropoxyboronic acid pinacol ester (**26**) and *in situ* generated dichloromethyl lithium species to provide boronate **36**. Transesterification gave compound **37**, which was used in 3 steps sequence to obtain **20g** as a mixture of diastereomers (1 : 2 ratio).



Scheme 8. The synthesis of boronic acid containing building blocks **54g**.

## 2.2 Inhibitory potency of the peptidic boronic acids with a modified P1 position<sup>a</sup>

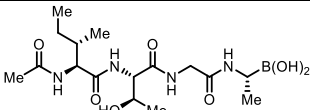
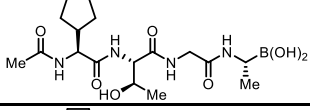
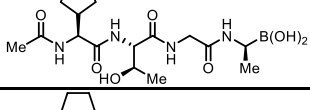
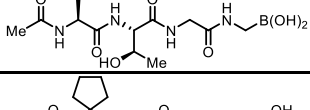
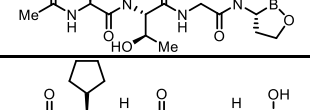
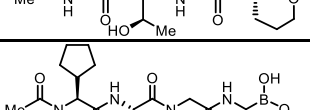
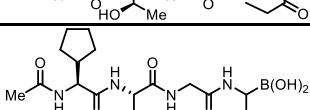
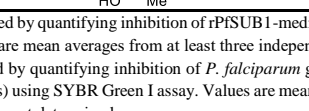
When  $\alpha$ -ketoamide functionality in compound **2** was replaced with boronic acid, it resulted in compound **18**, which showed  $\sim$ sevenfold increase in PfSUB1 inhibitory potency compared to the best  $\alpha$ -ketoamide **17f** (Table 2, entry 1). Combination of the known features from the  $\alpha$ -ketoamide series (cyclopentane at P4) and boronic acid moiety resulted in **19a** displaying low nanomolar potency (entry 2). Boronic acid epimer **19b** and removal of the methyl side chain at the P1 sub-site (**19c**, Table 2, entry 4) resulted in the decreased potency. Exploring extended alkyl or phenyl substituents at the P1 sub-site (compounds **19d–g**, Table 2, entries 5–8) met with only limited success, only boronic acid **19d** bearing a hydroxyethyl substituent displayed increased potency compared to **19a**.

Selected most active inhibitors were tested for their capacity to inhibit growth of *P. falciparum* parasites (Table 2). Compounds **18**, **19a** and **19c** displayed inhibition potency close to 2  $\mu$ M, however, there was a poor correlation between IC<sub>50</sub> and EC<sub>50</sub> values. It was concluded that this set of compounds suffered from poor access to PfSUB1 within the intracellular parasite.

<sup>a</sup> In collaboration with M. J. Blackman, C. Withers-Martinez *et al.*, Malaria Biochemistry Laboratory, The Francis Crick Institute.

Table 2

## Inhibitory Potency and Growth Inhibition of Peptidic Boronic Acid Inhibitors

Entry	Structure	IC <sub>50</sub> nM (rPfSUB1)	EC <sub>50</sub> (μM) (parasite growth)
1. 18		69.4 ± 1.2	1.8 ± 0.6
2. 19a		9.3 ± 0.5	2.3 ± 1.4
3. 19b		60.1 ± 2.1	18.4 ± 1.8
4. 19c		54.3 ± 1.1	1.9 ± 0.4
5. 19d		4.6 ± 0.1	15.0 ± 3.6
6. 19e		204.2 ± 7.5	N.D.
7. 19f		18.7 ± 1.3	N.D.
8. 19g		112.0 ± 2.3	N.D.

IC<sub>50</sub> values were determined by quantifying inhibition of rPfSUB1-mediated proteolytic cleavage of a fluorogenic peptide substrate. Values are mean averages from at least three independent measurements ± SD.

EC<sub>50</sub> values were obtained by quantifying inhibition of *P. falciparum* growth in vitro over a period of 96 h (two erythrocytic growth cycles) using SYBR Green I assay. Values are mean averages from at least three independent measurements ± SD. N.D., not determined.

### 2.3 Synthesis of the peptidic boronic acids with a modified P3 position

To explore further possibilities to optimize the inhibitors, a molecular modelling was used. The docking of a compound **19a** into X-ray crystal structure derived model of PfSUB1<sup>a</sup> (Fig. 4) revealed that the P3 side chain of the bound inhibitor **19a** is extended into solvent

<sup>a</sup> In collaboration with M. J. Blackman, C. Withers-Martinez *et al.*, Malaria Biochemistry Laboratory, The Francis Crick Institute.

area, with no significant contacts with the molecular surface of the PfSUB1 catalytic domain. However, the docking results showed a potential for modifying and/or extending the P3 amino acid side chain in order to promote hydrophobic interactions with the S3 pocket (L461 residue).

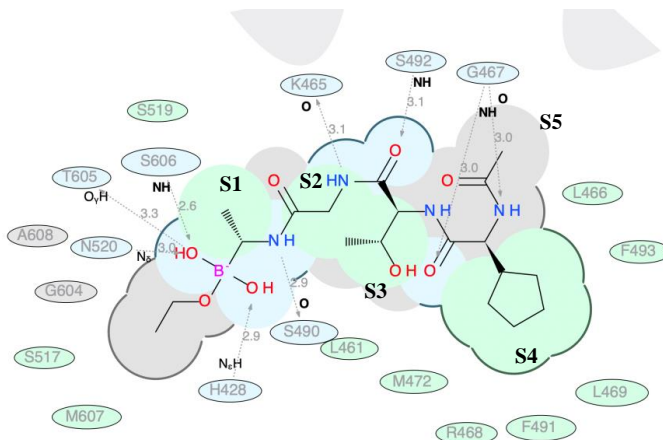
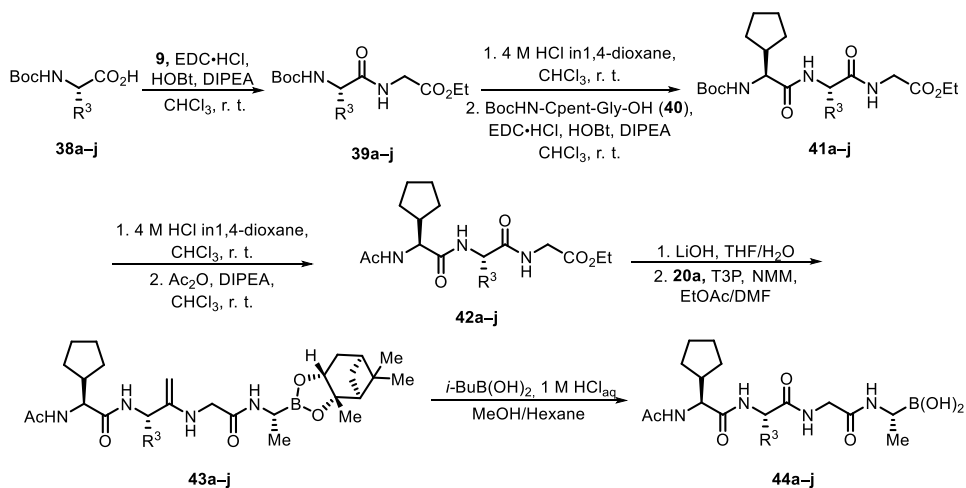


Fig. 4. Compound **19a** into X-ray crystal structure derived model of PfSUB1.

The synthesis of inhibitors was performed according to Scheme 9. EDC·HCl, HOBT and DIPEA activating system was used to incorporate different lipophilic amino acid residues in the structure of inhibitors. Boc group in compounds **39a–j** was cleaved with HCl and followed by coupling with an *N*-Boc-cyclopentyl glycine (**40**) to give the intermediates **41a–j**. Deprotection of Boc group and acetylation gave tripeptides **42a–j**. Hydrolysis of the ester group and coupling of the resulting acid with an  $\alpha$ -amino boronic acid ester building block **20a** gave the desired intermediates **43a–j**. The last step involved the transesterification reaction with isobutylboronic acid to get boronic acids **44a–j**.



## 2.4 Inhibitory potency of the peptidic boronic acids with a modified P3 position<sup>a</sup>

The first two examples with alanine and valine side chains at the P3 position (compounds **44a** and **44b**) showed low nanomolar potency, which was similar to inhibitor **19a** with threonine side chain. Importantly, both compounds **44a** and **44b** with more lipophilic side chains showed increased sub-micromolar potency to inhibit the parasite growth in cell based assays (Fig. 5).<sup>15</sup>

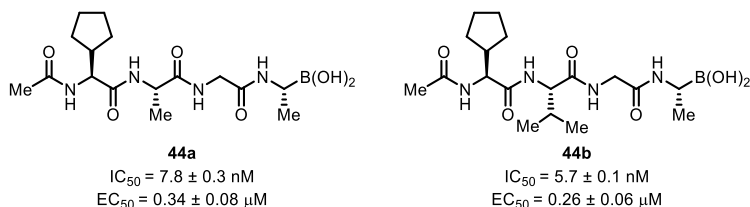


Fig. 5. Inhibitors of PfSUB1 with activity in cell based parasite growth and egress assays.

The inhibitory potency of peptidic boronic acids **44c-j** were determined (Fig. 6). The results indicated that the least active inhibitor was **44g**. Compounds bearing leucine, cyclopentyl, cyclohexyl or phenylalanine side chains (**44i,e,f,j**) showed similar potency to inhibit SUB1. Peptidic boronic acids possessing *tert*-butylglycine (**44c**), phenylglycine (**44d**) and isoleucine (**44h**) side chains at P3 position were slightly better SUB1 inhibitors.

<sup>a</sup> In collaboration with M. J. Blackman, C. Withers-Martinez *et al.*, Malaria Biochemistry Laboratory, The Francis Crick Institute.

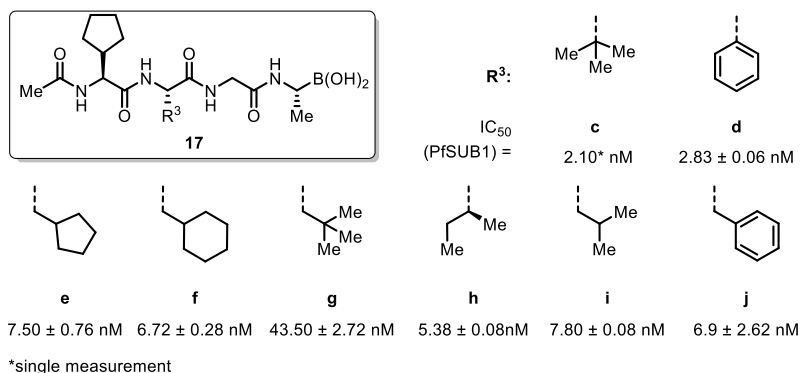


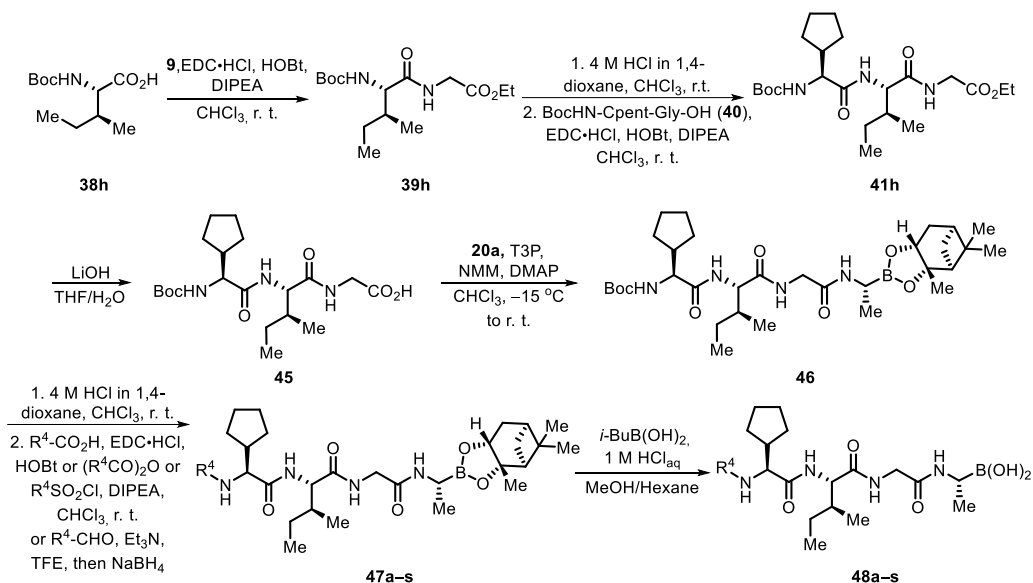
Fig. 6. Inhibitory potency of peptidic boronic acids **17c–j**.<sup>a</sup>

Examination of the inhibitory potency of compound **44b** against the mammalian trypsin-family serine proteases trypsin, chymotrypsin, and elastase revealed a high degree of selectivity for PfSUB1<sup>a</sup> (>>100-fold). Furthermore, *P. falciparum* cultures containing highly mature schizonts were supplemented with compounds **44a** and **44b** at 10  $\mu\text{M}$  concentration. Microscopic examination of the cultures revealed schizonts arrested by these compounds, confirming inhibition of schizont rupture.<sup>15</sup>

## 2.5 Synthesis of the peptidic boronic acids with a modified P5 position

Combining all the known SAR results from previous modifications a set of new inhibitors with different *N*-capping groups (P5 position) was synthesized (Scheme 10). First, compound **45** was obtained using previously described peptide synthesis, which involved the same coupling procedure as in Scheme 9. Slightly different method for coupling of an acid **45** with  $\alpha$ -amino boronic acid building block **20a** was applied.<sup>17</sup> The key intermediate **46** was deprotected and either coupled with an acid, acylated, sulfonylated or substituted to *N*-monoalkylated amine via reductive amination. The last step to give products **48a–s** was carried out as described before by using transesterification reaction with isobutylboronic acid.

<sup>a</sup> Values are mean average from two independent measurements  $\pm$  SD.



Scheme 10. The synthesis of peptidic boronic acids **48a–s**.

## 2.6 Inhibitory potency of the peptidic boronic acids with a modified P5 position<sup>a</sup>

PfSUB1 inhibitory potency for compounds **48a–s** is shown in the Fig. 7. The results indicated that compounds with *N*-acyl groups bearing aliphatic, aromatic and heteroaromatic substituents at P5 position displayed inhibitory potency at low nanomolar range comparable to the parent inhibitor **44h**. Interestingly, sulfonlated analogue **48o** with less peptidic nature gave similar activity compared to acylated analogues. When carbonyl group was replaced with methylene group, the SUB1 inhibitory potency decreased (**48e** vs **48p**; **48j** vs **48r**; **48l** vs **48s**).

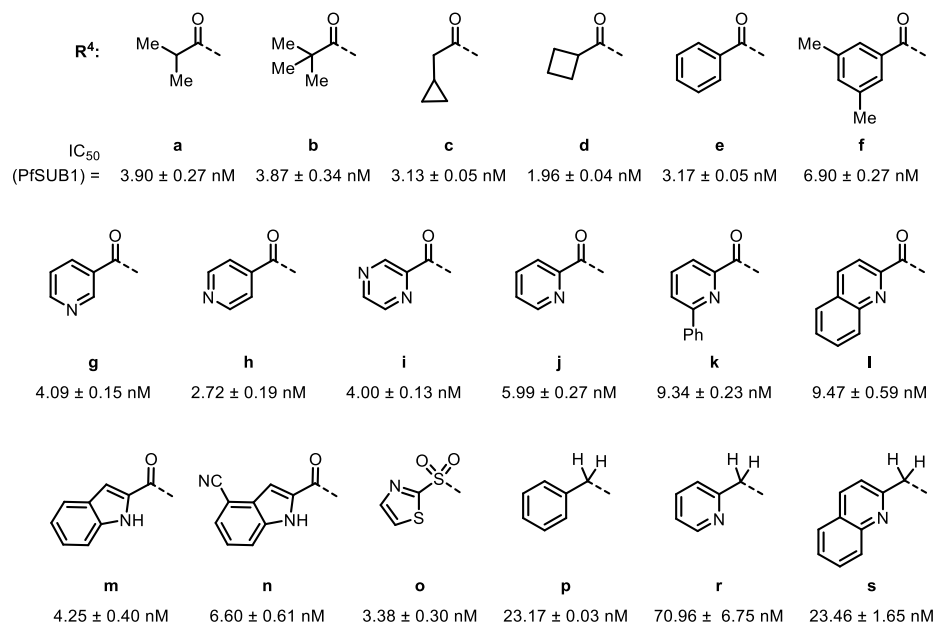


Fig. 7. Inhibitory potencies of peptidic boronic acids **48a-s**.<sup>a</sup>

Unfortunately, compounds **48f,k,l** at 500 nM concentration demonstrated increased inhibition of human proteasome<sup>b</sup> although their IC<sub>50</sub> (PfSUB1) values were similar to compound **44b**, which showed high selectivity against SUB1. These results suggested that modification at P5 position can lead to decreased selectivity.

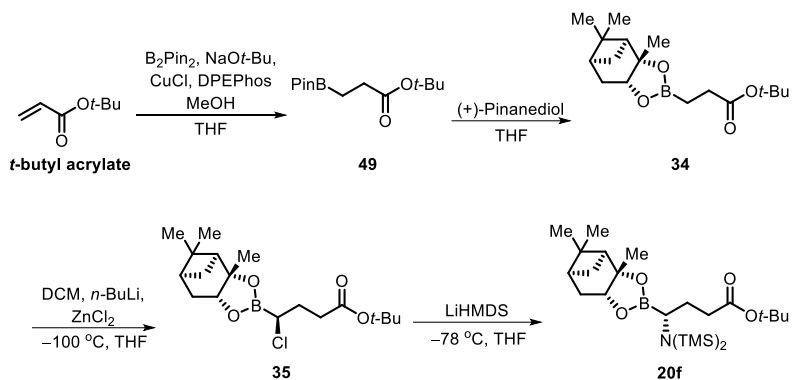
## 2.7 Synthesis of the peptidic boronic acids with a modified P5 and P1 position

To improve selectivity for inhibition of SUB1 and to avoid the off-target effects against human proteasome, the selectivity inducing features from previous SAR studies were taken into account. The base for the design of the next set of inhibitors was compound **19f** containing glutamic acid at P1 position, which showed remarkable SUB1 inhibition selectivity versus proteasome inhibition.

Even though the key amino boronic acid building block **20f** was synthesized, an alternative, more productive synthetic pathway was developed (Scheme 11). *tert*-Butyl acrylate formed β-borylated product **49** in excellent yield in the presence of copper(I) catalyst.<sup>18</sup> After transesterification and the Matteson homologation the desired chloride **35** was obtained, which was transformed to bis(trimethylsilyl)amine derivative **20f**.

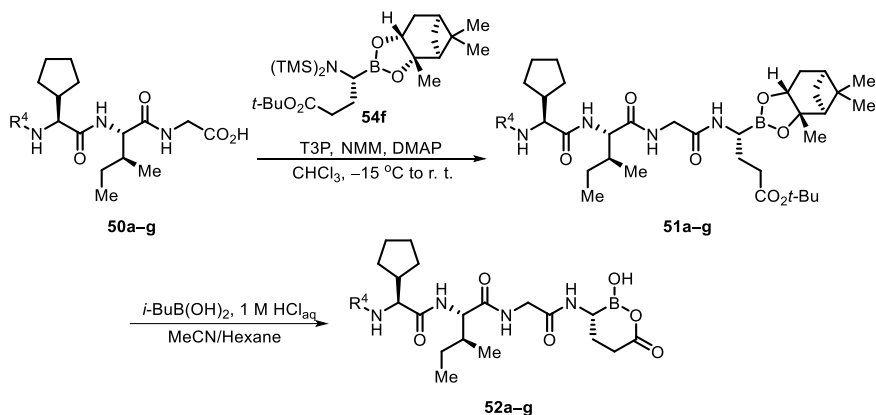
<sup>a</sup> Values are mean average from two independent measurements ± SD.

<sup>b</sup> Preliminary results.



Scheme 11. Alternative route to boronic acid building block **20f**.

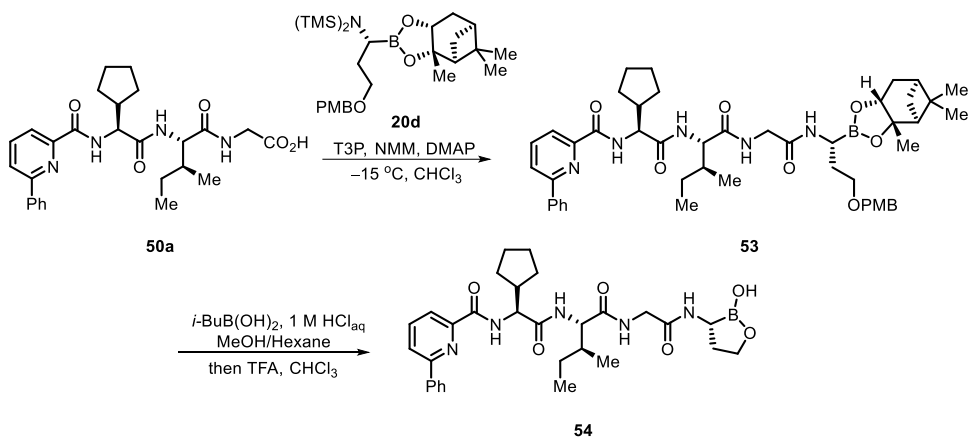
The building block **20f** was used in the coupling reaction with previously synthesized peptides **50a–g** with modified P5 position to give intermediates **51a–g** (Scheme 12). Finally, these compounds were subjected to transesterification reaction with isobutyl boronic acid to get the final products **52a–g**, also *tert*-butyl ester was cleaved in these conditions.



Scheme 12. The synthesis of peptidic boronic acids **52a–g**.

Peptidic building block **50a** was also coupled with boronic acid building block **20d** containing PMB-protected hydroxyethyl substituent to give compound **53**, which after transesterification and PMB cleavage with TFA yielded cyclic boronic acid **54** (Scheme 13).





Scheme 13. The synthesis of peptidic boronic acid **54**.

## 2.8 Inhibitory potency of the peptidic boronic acids with a modified P5 and P1 position

The PfSUB1 inhibitory potencies<sup>a</sup> of compounds **52a–g** and **54** are presented in Fig. 8. In general, potency is decreased compared to series of compounds **48** with the same substituent at P5 position; however the inhibitory potencies are still in low nanomolar concentrations.

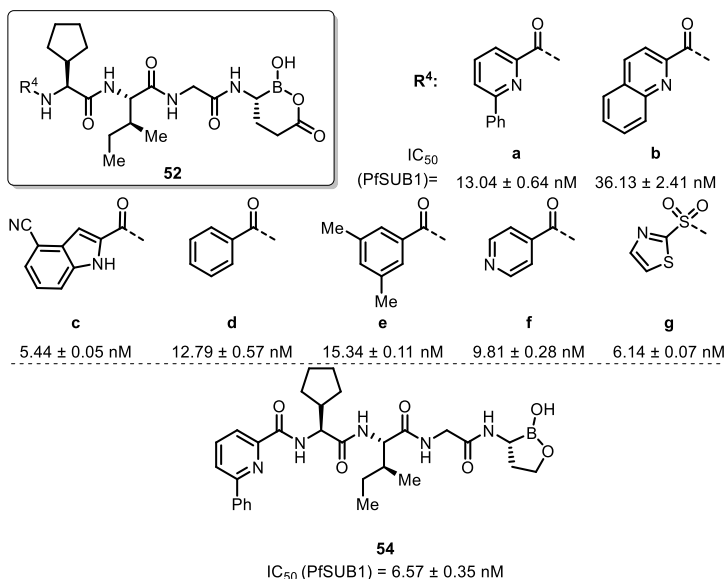


Fig. 8. Inhibitory potencies of peptidic boronic acids **52a–g** and **54**.<sup>b</sup>

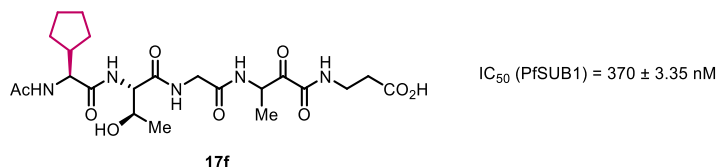
<sup>a</sup> In collaboration with M. J. Blackman, C. Withers-Martinez *et al.*, Malaria Biochemistry Laboratory, The Francis Crick Institute.

<sup>b</sup> Values are mean average from two independent measurements  $\pm$  SD.

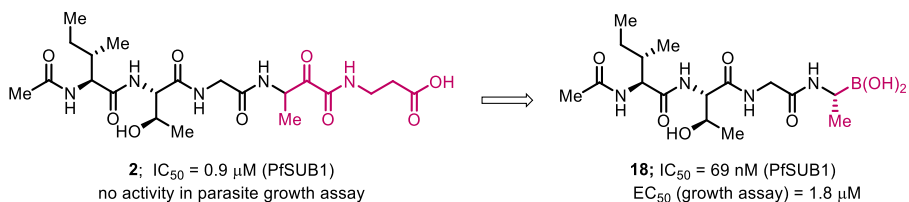


## CONCLUSIONS

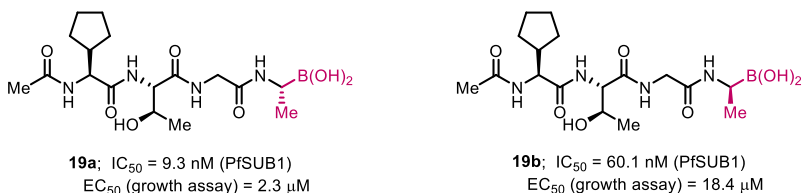
1. Rationally designed SUB1 inhibitors based on the peptidic sequence of natural substrates of SUB1 are more potent compared to inhibitors found by screening of compound libraries.
2. Peptidic  $\alpha$ -ketoamide **17** bearing cyclopentyl substituent at P4 position shows the highest SUB1 inhibitory potency, confirming the hydrophobic nature of S4 pocket on the enzyme.



3. Replacement of ketoamide warhead to boronic acid in peptidic SUB1 inhibitors enabled inhibitory potency at nanomolar level. Selected peptidic boronic acids suppressed parasite replication in cell based assay.

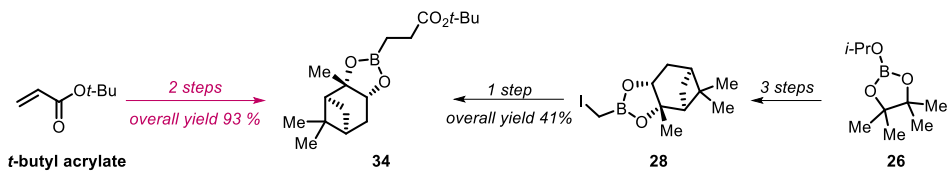


4. Substituents at P1 position of peptidic boronic acids **19** require the stereochemistry that resembles L-amino acid stereochemistry to obtain more potent inhibitors of PfSUB1.



5. Substitution of P3 amino acid side chain with more lipophilic residues in peptidic boronic acids provides the necessary hydrophobic interactions with the S3 pocket resulting in derivatives, which possess improved PfSUB1 inhibitory and sub-micromolar potency in cell based parasite growth assay.
6. Compounds **48** with different *N*-acyl groups and *N*-sulfonyl group at P5 position (*N*-capping group) show low nanomolar inhibitory potency, implying that a wide variety of substituents could be installed at this position. On the contrary, compounds without carbonyl group at P5 position show decreased potency.
7. The introduction of glutamic acid side chain at P1 of peptidic boronic acids decreases the off-target effect against human proteasome.

8. Copper catalyzed  $\beta$ -borylation of *t*-butyl acrylate and subsequent transesterification was more effective route towards key intermediate **34** compared to the initial attempt to synthesize it from intermediate **28**.

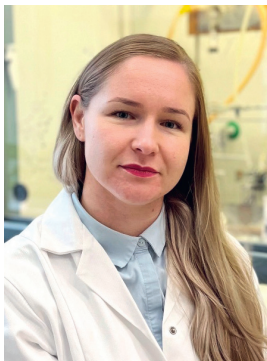


9. The most efficient reagent for coupling of peptidic scaffold with  $\alpha$ -amino boronic acid building block was propanephosphonic anhydride minimizing protodeboronated by-product formation.

## LITERATŪRAS SARAKSTS/REFERENCES

- (1) World malaria report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- (2) Sirawaraporn, W. Dihydrofolate Reductase and Antifolate Resistance in Malaria. *Drug Resist. Updat.* **1998**, *1*, 397–406.
- (3) Nsanjabana, C. Resistance to Artemisinin Combination Therapies (ACTs): Do Not Forget the Partner Drug! *Trop. Med. Infect. Dis.* **2019**, *4*, 26.
- (4) Sajid, M.; Withers-Martinez, C.; Blackman, M. J. Maturation and Specificity of Plasmodium Falciparum Subtilisin-like Protease-1, a Malaria Merozoite Subtilisin-like Serine Protease. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 631–641.
- (5) Pino, P.; Caldelari, R.; Mukherjee, B.; Vahokoski, J.; Klages, N.; Maco, B.; Collins, C. R.; Blackman, M. J.; Kursula, I.; Heussler, V.; Brochet, M.; Soldati-Favre, D. A Multistage Antimalarial Targets the Plasmepsins IX and X Essential for Invasion and Egress. *Science* **2017**, *358*, 522–528.
- (6) Collins, C. R.; Hackett, F.; Strath, M.; Penzo, M.; Withers-Martinez, C.; Baker, D. A.; Blackman, M. J. Malaria Parasite CGMP-Dependent Protein Kinase Regulates Blood Stage Merozoite Secretory Organelle Discharge and Egress. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003344.
- (7) Yeoh, S.; O'Donnell, R. A.; Koussis, K.; Dluzewski, A. R.; Ansell, K. H.; Osborne, S. A.; Hackett, F.; Withers-Martinez, C.; Mitchell, G. H.; Bannister, L. H.; Bryans, J. S.; Kettleborough, C. A.; Blackman, M. J. Subcellular Discharge of a Serine Protease Mediates Release of Invasive Malaria Parasites from Host Erythrocytes. *Cell* **2007**, *131*, 1072–1083.
- (8) Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. The Resurgence of Covalent Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 307–317.
- (9) Bandyopadhyay, A.; Gao, J. Targeting Biomolecules with Reversible Covalent Chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *34*, 110–116.
- (10) Krajnc, A.; Lang, P. A.; Panduwawala, T. D.; Brem, J.; Schofield, C. J. Will Morphing Boron-Based Inhibitors Beat the  $\beta$ -Lactamases? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *50*, 101–110.
- (11) Kher, S. S.; Penzo, M.; Fulle, S.; Finn, P. W.; Blackman, M. J.; Jirgensons, A. Substrate Derived Peptidic  $\alpha$ -Ketoamides as Inhibitors of the Malarial Protease PfSUB1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4486–4489.

- (12) Koussis, K.; Withers-Martinez, C.; Yeoh, S.; Child, M.; Hackett, F.; Knuepfer, E.; Juliano, L.; Woehlbier, U.; Bujard, H.; Blackman, M. J. A Multifunctional Serine Protease Primes the Malaria Parasite for Red Blood Cell Invasion. *EMBO J.* **2009**, *28*, 725–735.
- (13) Fu, H.; Fang, H.; Sun, J.; Wang, H.; Liu, A.; Sun, J.; Wu, Z. Boronic Acid-Based Enzyme Inhibitors: A Review of Recent Progress. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 3271–3280.
- (14) Diaz, D. B.; Yudin, A. K. The Versatility of Boron in Biological Target Engagement. *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 731–742.
- (15) Lidumniece, E.; Withers-Martinez, C.; Hackett, F.; Collins, C. R.; Perrin, A. J.; Koussis, K.; Bisson, C.; Blackman, M. J.; Jirgensons, A. Peptidic Boronic Acids Are Potent Cell-Permeable Inhibitors of the Malaria Parasite Egress Serine Protease SUB1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2021**, *118*, e2022696118.
- (16) Matteson, D. S.; Sadhu, K. M.; Peterson, M. L. 99% Chirally Selective Syntheses via Pinanediol Boronic Esters: Insect Pheromones, Diols, and an Amino Alcohol. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 810–819.
- (17) Castulik, J.; Zabadal, M. Process for Making Bortezomib and Intermediates for the Process. **2012**, WO2012/048745.
- (18) Mun, S.; Lee, J.-E.; Yun, J. Copper-Catalyzed  $\beta$ -Boration of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Carbonyl Compounds: Rate Acceleration by Alcohol Additives. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4887–4889.



**Elīna Līdumniece** dzimusi 1990. gadā Smiltēnē, augusi Rankā. Latvijas Universitātē ieguvusi dabaszinātņu bakalaura grādu ķīmijā (2013) par tēmu "4,5,6,7-Tetrahidro-1*H*-indazola atvasinājumu sintēze azīdu-alkīnu ciklopievienošanas reakcijās" un dabaszinātņu maģistra grādu ķīmijā (2015), aizstāvot darbu "*N*-Acilsulfonamīdi kā virzošās grupas rutēnija katalizētās anelēšanas reakcijās" (izstrādāts *Dr. chem. A. Jirgensona* vadībā).

Paralēli studijām strādā Latvijas Organiskās sintēzes institūtā Organiskās sintēzes metodoloģijas grupā. Galvenais pētījumu virziens – jaunu SUB1 inhibitoru izveide, kam nākotnē būtu potenciāls kļūt par jaunām pretmalārijas zālēm. Līdzšinējie zinātniskā darba rezultāti publicēti trīs starptautiski citējamos žurnālos, impaktfaktors līdz pat 12,779 (*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*), kā arī prezentēti vairākās starptautiskās konferencēs.

**Elīna Līdumniece** was born in 1990 in Smiltene and grew up in Ranka. In 2013, she earned a Bachelor's degree of Natural Sciences in Chemistry from University of Latvia with Bachelor Thesis "Synthesis of 4,5,6,7-tetrahydro-1-*H*-indazole derivatives in azide-alkyne cycloaddition reactions". In 2015, she received a Master's degree of Natural Sciences in Chemistry from LU with Master Thesis "*N*-Acyl sulfonamides as directing groups in ruthenium catalyzed annulation reactions" (supervisor *Dr. chem. A. Jirgensons*).

Elīna Līdumniece is currently a research assistant with Latvian Institute of Organic Synthesis (Organic Synthesis Methodology Group). Her research interests are focused on the development of new inhibitors of SUB1 that could potentially lead to new anti-malarial compounds. She is a co-author of 3 scientific publications submitted to international journals (*IF* up to 12,779 for *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*) and has presented her work at several international conferences.