



Doctoral Thesis

De novo design, synthesis and in vitro evaluation of new non-peptidic inhibitors of the malarial enzyme plasmepsin II

Author(s):

Carcache, David A.

Publication Date:

2002

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004471091> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH NO. 14866

***De novo* Design, Synthesis and *In vitro* Evaluation
of New Non-Peptidic Inhibitors
of the Malarial Enzyme Plasmeprin II**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

David A. Carcache

Dipl. Chem. University of Neuchâtel
born August 17 1975 in La Chaux-de-Fonds, NE

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. François Diederich, examiner
Prof. Dr. Erick M. Carreira, co-examiner

Zurich 2002

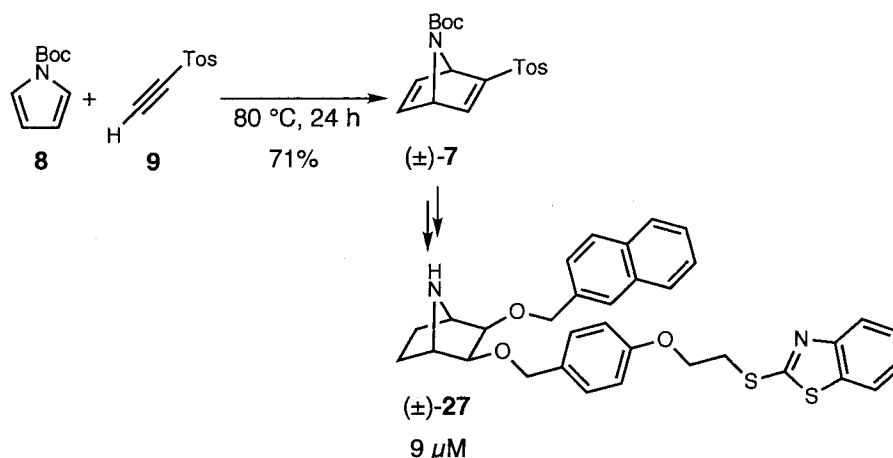
ABSTRACT

Malaria, caused by a parasite from the genus *Plasmodium*, remains one of the most widespread infectious diseases in the world, despite the effort of thousands of researchers. The increasing resistance shown by the parasite to available drugs necessitates the development of new medicines with novel modes of action. Rational drug design has taken center stage in this effort, wherein molecular modeling and recognition strategies are used, concomitantly, to identify inhibitors capable of reducing or eliminating enzymatic activity. Plasmepsin II, an aspartic protease involved in the parasite's catabolization of the hemoglobin present in the host's red blood cells, has been identified as a key target for our drug design strategies.

Roche scientists described recently a new class of renin inhibitors whose binding is accompanied by a major induced-fit adaptation within the enzyme active site. Upon complexation of such inhibitors, the flap located over the catalytic dyad is moved away, unlocking a deep hydrophobic pocket. Based on these observations and the amino acid sequence homology of plasmepsin II with human renin, we hypothesized that the same conformational change might be operative upon substrate binding in *both* enzymes. Therefore, we modeled this important alteration of shape within the binding site on the available crystal structure of plasmepsin II. Turning to molecular modeling, we carefully considered these conformational changes in the design of a new class of inhibitors.

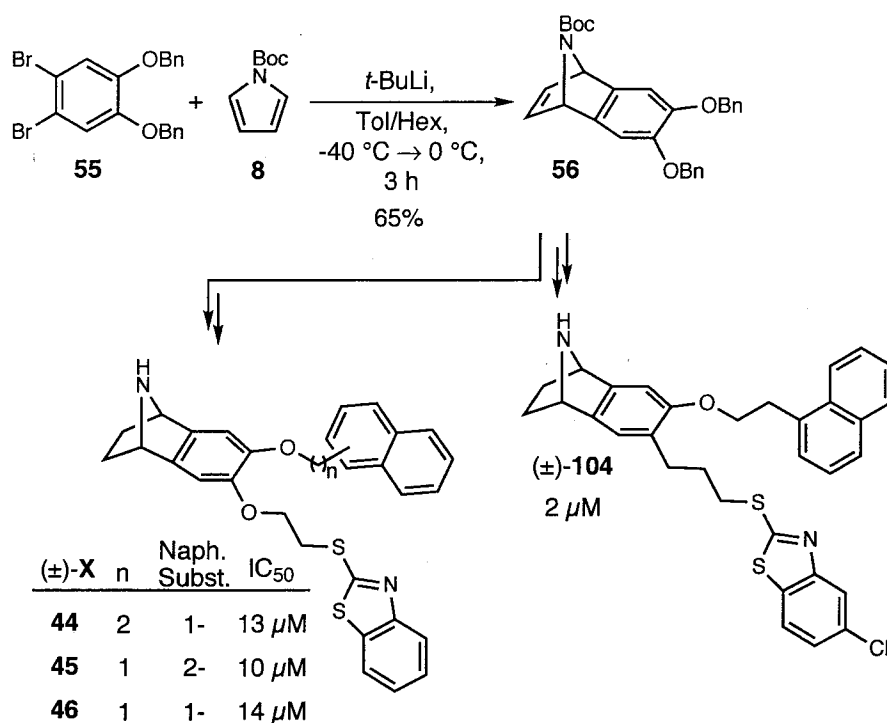
The first class of inhibitors developed in the course of this work is based on a 7-azabicyclo[2.2.1]heptane scaffold. Positioning of the core in the active site of plasmepsin II arises from hydrogen bonding between the secondary amine nitrogen and the two Asp residues of the catalytic dyad. Substitutions at C2 and C3 of the central scaffold provide two vectors pointing into the S1/S3 and flap pockets which allowed the design of inhibitors showing good geometrical and electrostatic complementarity with the S1/S3 and the flap pocket. A new synthetic pathway was developed toward the inhibitors designed, whose key step involved a Diels-Alder reaction between activated pyrrole **8** and alkyne **9**, leading to the bicyclic scaffold (\pm)-**7**. Subsequent reduction of the sulfone group and functionalization of the core furnished inhibitors displaying promising biological

activities. Compound (\pm)-**27**, the best inhibitor prepared relying on this scaffold, exhibited an IC_{50} value of 9 μ M.



Nevertheless, despite the promising binding potency of this first class of plasmepsin II inhibitors, the rather long synthetic route required for the preparation of inhibitors prompted us to investigate other central scaffolds which could be more straightforwardly synthesized. Extensive molecular modeling showed that the 11-azatricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-2(7),3,5-triene tricycle would take a similar orientation in the active site of plasmepsin II to the first scaffold developed. Furthermore, the more rigid core would increase the overall preorganization of the inhibitors which should diminish the entropy loss associated with binding of inhibitors with floppy substituents.

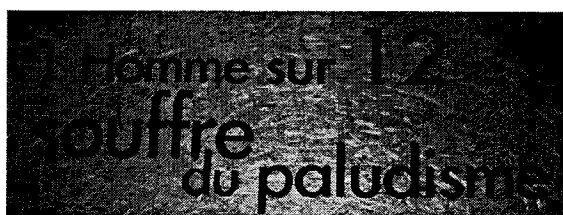
Consequently, the suitability of the newly designed scaffold was first validated by synthesizing analogues of (\pm)-**27**. A new straightforward synthetic route was developed toward the inhibitors based on the new tricyclic scaffold, providing compounds (\pm)-**44**-(\pm)-**46** exhibiting comparable biological activities to (\pm)-**27**. The key step of this second synthetic pathway relies on another Diels-Alder reaction between the benzyne species, generated *in situ* from **55**, and protected pyrrole **8**, affording the tricycle **56**. Several successive cycles of design, synthesis, and biological assays allowed the enhancement of the binding affinity, leading to (\pm)-**104** (IC_{50} = 2 μ M), which represents the best inhibitor prepared in the course of this work.



The preorganization, as well as the shape and electrostatic complementarity between the inhibitors and plasmepsin II have been centrally considered in the successive cycles of design. Most of the predictions made by molecular modeling analysis, turned out to be validated by the biological assays. This good agreement between the computational part of the project and the IC₅₀ measured tends to confirm that plasmepsin II undergoes major induced-fit adaptation around its active site upon complexation of adequate inhibitors. Ultimate validation of the binding mode proposed will be achieved by X-ray crystallography.

RESUMÉ

Malgré les efforts de milliers de chercheurs, la malaria, causée par des parasites du gène *Plasmodium*, demeure l'une des maladies infectieuses les plus meurtrières sur notre planète. De plus, la résistance toujours plus accrue des parasites à la plupart des traitements connus nécessite le développement urgent de nouveaux médicaments avec des modes d'action novateurs. Durant la dernière décennie, l'utilisation du design rationnel d'inhibiteurs capables de diminuer ou d'éliminer totalement l'activité d'une enzyme spécifique s'est largement généralisée. La plasmepsine II, une protéase aspartique parasitaire impliquée dans le catabolisme de l'hémoglobine humaine a été identifiée comme une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapies contre la malaria.



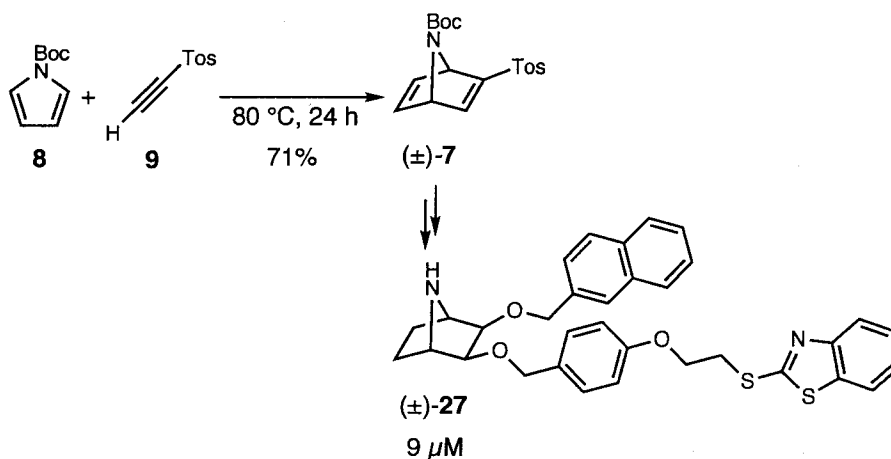
Expo02, Arteplage de Neuchâtel, Palais de l'équilibre.

Des chercheurs de *Roche* ont récemment découvert une nouvelle classe d'inhibiteurs de la rénine, une protéase aspartique humaine impliquée dans la régulation de la pression sanguine. La complexation de ces inhibiteurs induit une importante altération du site actif de la rénine. Le motif en épingle à cheveux situé au dessus de la dyade catalytique, également appelé « flap », est poussé vers l'extérieur, ce qui entraîne l'ouverture d'une nouvelle poche hydrophobe dans le site actif. En se basant sur ces observations et sur la grande homologie de la séquence d'acides aminés de la plasmepsine II avec celle de la rénine, nous avons postulé qu'un changement conformationnel similaire à celui observé dans la rénine pourrait également se produire dans le site actif de la plasmepsine II. Les modifications observées dans le site actif de la rénine ont donc été modélisées sur la structure aux rayons X de la plasmepsine II. Cette structure modélisée a ensuite été utilisée pour le design d'une nouvelle classe d'inhibiteurs de la plasmepsine II.

La première série d'inhibiteurs développée au cours de ce travail est basée sur un bicyclic 7-azabicyclo[2.2.1]heptane. Le positionnement de ce noyau dans le site actif de la

plasmepsine II, résulte de la formation de deux ponts hydrogène entre l'amine secondaire du bicyclic et les deux aspartates de la dyade catalytique. La substitution sur les positions C2 et C3 du noyau central offre deux vecteurs pointant en direction de la poche S1/S3 et de la poche « flap ». En se basant sur les principes de la reconnaissance moléculaire, des inhibiteurs montrant une bonne complémentarité géométrique et électrostatique ont été créés par ordinateur.

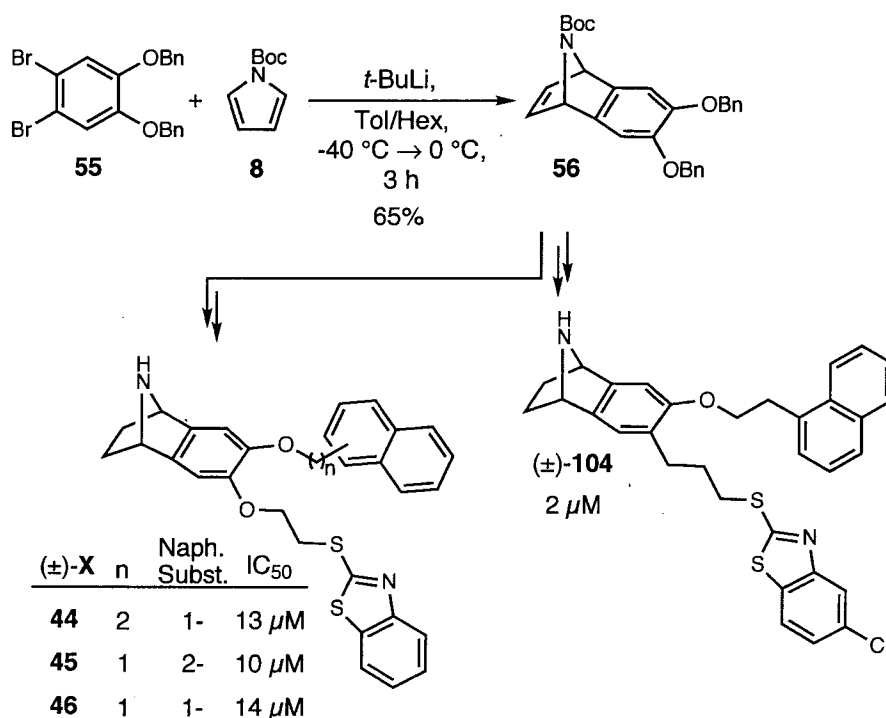
Une nouvelle voie synthétique a été développée, afin de préparer les inhibiteurs conçus virtuellement, qui repose sur une réaction clef de Diels-Alder entre le pyrrole protégé **8** et l'alcyne **9**, produisant le noyau bicyclique (\pm)-**7**. La réduction subséquente de la sulfone et la fonctionnalisation du noyau central ont permis la préparation de différents inhibiteurs, montrant une activité biologique prometteuse. Le composé (\pm)-**27**, le meilleur inhibiteur synthétisé basé sur le noyau 7-azabicyclo[2.2.1]heptane, présente une valeur IC_{50} de $9\mu\text{M}$.



Cependant, malgré l'activité biologique prometteuse des membres de cette première classe d'inhibiteurs, la voie synthétique relativement longue nécessaire à la préparation de ces composés nous a poussé à considérer d'autres noyaux centraux qui pourraient être synthétisés plus directement. Une étude approfondie du site actif de la structure modélisée de la plasmepsine II a montré qu'un tricyclic 11-azatricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-2(7),3,5-triène pourrait prendre une orientation similaire au premier noyau développé dans ce travail, à l'intérieur du site actif de la plasmepsine II. De plus, la plus grande rigidité de ce second noyau devrait augmenter la préorganisation générale des inhibiteurs, ce qui devrait

diminuer la perte d'entropie associée à la complexation d'inhibiteurs portant des substituants très flexibles.

Par conséquent, l'efficacité de ce second noyau pour la synthèse d'inhibiteurs a été initialement vérifiée en synthétisant des analogues de (\pm)-**27**. Une nouvelle voie de synthèse a été développée afin de préparer les inhibiteurs (\pm)-**44**-(\pm)-**46**, qui sont basés sur le nouveau noyau tricyclique. Ces trois premiers inhibiteurs ont démontré une activité biologique comparable à (\pm)-**27**, confirmant de ce fait le potentiel de ce nouveau noyau. L'étape clef de la nouvelle synthèse développée repose sur une réaction de Diels-Alder entre une espèce benzyne, générée *in situ* à partir de **55**, et le pyrrole protégé **8**, fournissant le tricycle **56**. Plusieurs cycles de design, de synthèse et de tests biologiques ont permis d'améliorer l'activité biologique des inhibiteurs jusqu'à $2\mu\text{M}$ ((\pm)-**104**), ce qui représente le meilleur inhibiteur préparé au cours de ce travail.



La préorganisation, ainsi que la complémentarité géométrique et électrostatique entre les inhibiteurs et la plasmepsine II ont été considérées minutieusement durant les cycles successifs de design. La plupart des prédictions faites sur base des études de modélisation moléculaire ont été validées par les essais biologiques. La bonne corrélation entre la partie

« design » de ce projet et les valeurs IC_{50} mesurées tend à confirmer que le site actif de la plasmepsine II subit d'importantes altérations de son site actif lors du processus de complexation avec des inhibiteurs appropriés, comparable a ceux observés dans le site actif de la rénine. Cependant, la validation définitive de ce mode de complexation proposé devra être faite par cristallographie aux rayons X.