



Doctoral Thesis

Structure-based design, synthesis, and in vitro evaluation of bisubstrate inhibitors for catechol O-methyltransferase (COMT)

Author(s):

Masjost, Birgit

Publication Date:

2000

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004017216> →

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. 13719

STRUCTURE-BASED DESIGN, SYNTHESIS, AND *IN VITRO* EVALUATION OF BISUBSTRATE INHIBITORS FOR CATECHOL *O*-METHYLTRANSFERASE (COMT)

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

Presented by

BIRGIT MASJOST

Dipl. Chem. Westfälische Wilhelms-Universität Münster
born in Ahlen, Germany, October 18, 1971

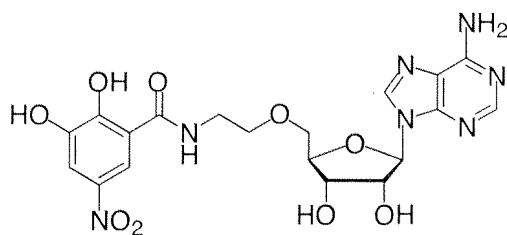
accepted on the recommendation of
Prof. Dr. François Diederich, examiner
Prof. Dr. Donald Hilvert, co-examiner
Dr. Roland Jakob-Roetne, co-examiner

Zurich 2000

ABSTRACT

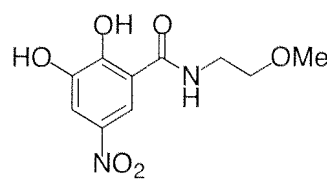
Inhibition of the enzyme catechol *O*-methyltransferase (COMT) is an important approach for developing new therapeutic treatments for Parkinson's disease. COMT is a well studied enzyme. It catalyzes methyl group transfer from the cofactor *S*-adenosylmethionine (SAM) to the hydroxy group of catechol-type substrates such as dopamine. Its biological function in plants, animals, and human beings has been elucidated to a good extent, and the kinetics of the mechanism of methylation have been studied in detail. X-ray crystal structures have been solved for recombinant COMT in the apo form and cocrystallized with SAM, Mg²⁺ ions, and 3,5-dinitrocatechol.

In this thesis, we designed and synthesized a new class of COMT inhibitors which are bisubstrate inhibitors according to their inhibition mechanism. Previously, only single-substrate analog inhibitors of COMT were known. The lead structure **7** was developed employing computer-aided structure-based design. A synthetic pathway was developed for **7** that allows facile introduction of different chemical functionalities into the molecule. A key step in the synthesis was the nucleosidation reaction for the coupling of natural and modified bases to the ribose moiety in a regio- and stereoselective fashion. *In vitro* kinetic studies on the inhibitory activity of **7** were performed revealing that **7** occupies both the substrate and cofactor binding sites with K_i values of $0.55 \pm 0.1 \mu\text{M}$ and $0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$, respectively. It exhibits competitive kinetics with regard to SAM and noncompetitive kinetics with regard to catechol substrates. For comparison, the same kinetic studies were carried out on catechol **14**. It shows a competitive inhibition mechanism for the catechol binding site and uncompetitive inhibition of the cofactor binding site as would be expected for a derivative of benzene-1,2-diol which does not bind to the SAM binding site. Cocrystallization of the bisubstrate inhibitor **7** and COMT is currently underway to further clarify the exact complexation mode.



7

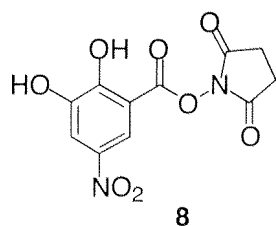
IC₅₀ (without preincubation) = 4 μM
 IC₅₀ (with preincubation) = 2 μM



14

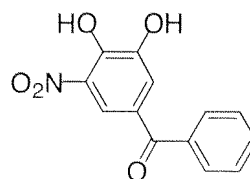
IC₅₀ (without preincubation) = 26 μM
 IC₅₀ (with preincubation) = 25 μM

N-Succinimidyl 2,3-dihydroxy-5-nitrobenzoate **8**, a precursor in the synthesis of **7** exhibited a surprisingly high inhibitory activity. Therefore, its inhibition mechanism was determined and found to be competitive with the substrate for an incubation time of one minute with COMT and noncompetitive with the substrate after 15 min preincubation of **8** with the enzyme. Such an inhibition mechanism was observed with tight-binding inhibitors like Tolcapone (Tasmar[®]), which is a pharmaceutical used in the therapy of Parkinson's disease. In this respect, the *N*-succinimidyl functionality in **8** seems to be a good replacement for the *ortho* nitro group in catecholic inhibitors combined with an electron-withdrawing group in *para* position. If stable analogs of **8** exhibited the same inhibitory activity, these compounds could be interesting follow-ups for Tolcapone.



8

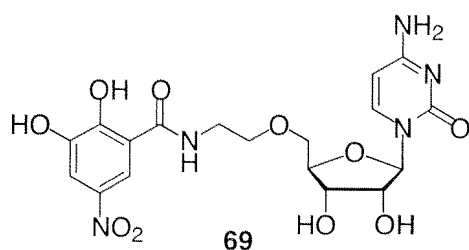
IC₅₀ (without preincubation) = 106 nM



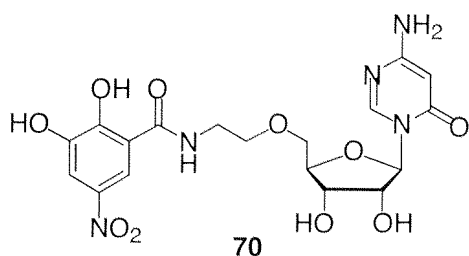
Tolcapone (Tasmar[®]); IC₅₀ = 36 nM

Structural variations were introduced into lead **7** to determine how much each chemical functionality contributes to its binding affinity for COMT, and to investigate different subunits for the binding sites, which were designed by molecular modeling, in order to enhance the inhibitory potency of the lead. We synthesized and tested two molecules (**69** and **70**), containing pyrimidine bases, with regard to their binding in the base pocket. These molecules were more than 100-fold less active than the lead **7**. The molecules **107**, **108**, and **109** with alkanediyl and 3-azaalkanediyl chains between adenine and catechol rather than ribose which is a subunit of **7** were synthesized to study the structural influence of the ribose and its function as a H-bond donor. Compounds **107**, **108**, and **109** were found to be 25-50

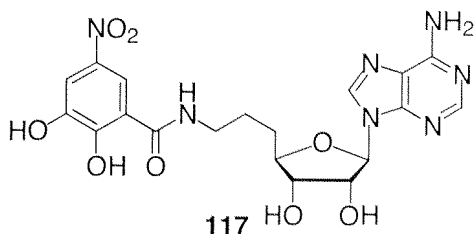
times less active than the lead. To investigate whether the catechol moiety in the lead **7** coordinates to the Mg^{2+} ion, compound **88**, which does not contain a nitro group on the catechol moiety, was synthesized. It exhibited a more than 100-fold decrease in inhibitory activity, confirming that the lead does bind to the Mg^{2+} ion. In order to study the influence of the length of the connecting bridge between ribose and catechol, molecule **117** was synthesized, which lacks one oxygen atom between ribose and catechol as compared to **7**, and found to be about six times more potent than the original lead. Inhibitor **117** exhibits a more rigid scaffold than the lead preventing a collapse of the aromatic side chains, which is favorable for binding to the enzyme in terms of entropy. NOE conformational studies on **7**, **69**, and **117** in solution revealed that in all three molecules the bases have the anti-conformation which is favorable for binding to the base pocket. In compound **69** a hydrophobic collapse of the two terminal chromophores is observed and reorganizational energy is required for binding, which accounts for the decrease in binding affinity of **69** compared to **7** and **117**. *In vitro* assays were carried out on all compounds, and kinetic studies were performed to gain insight into the inhibition mechanisms and structure-activity relationships.



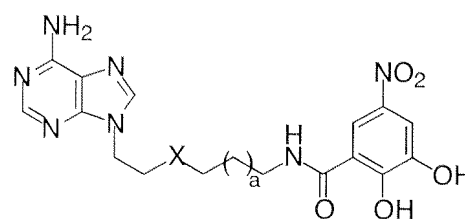
IC_{50} (without preincubation) = 522 μ M



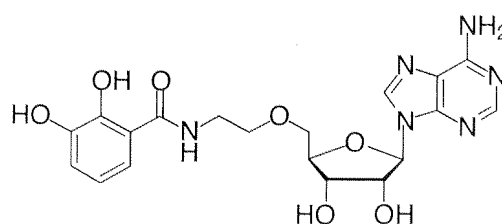
IC_{50} (without preincubation) > 100 μ M



IC_{50} (without preincubation) = 600 nM



	X	a	IC_{50}
107	CH ₂	1	55 μ M
108	NH	1	77 μ M
109	NH	2	86 μ M



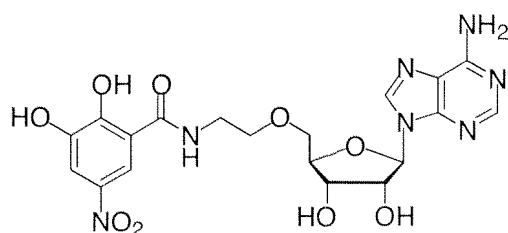
IC_{50} (without preincubation) > 100 μ M

ZUSAMMENFASSUNG

Inhibitoren des Enzyms Catechol-*O*-methyltransferase (COMT) werden als Pharmazeutika gegen die parkinsonsche Krankheit eingesetzt.

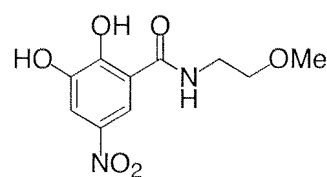
COMT katalysiert den Methylgruppentransfer von dem Kofaktor *S*-Adenosylmethionin (SAM) auf die Hydroxygruppe catecholischer Substrate wie z.B. Dopamin. Die biologische Bedeutung des in Pflanzen, Tieren und Menschen vorkommenden Enzyms sowie der Mechanismus der Methylierungsreaktion sind gut erforscht. Die Kristallstrukturen der Apoform des Enzyms und kokristallisiert mit SAM, Mg²⁺ Ionen und 3,5-Dinitrocatechol von rekombinantem COMT sind bekannt.

In dieser Arbeit beschreiben wir den Entwurf und die Synthese von neuartigen Inhibitoren von COMT, welche nach ihrem Bindungsmechanismus an das Enzym als Bisubstratinhibitoren bezeichnet werden können. Die bekannten, im nanomolaren Bereich an das Enzym bindenden Inhibitoren sind Catecholanaloge. Die Leitstruktur **7** wurde mit Hilfe von Computer-gestütztem, stukturbasierten Design gefunden. Der für **7** ausgearbeitete Syntheseweg ermöglicht es, auch andere chemische Funktionalitäten in das Molekül einzuführen. Ein Schlüsselschritt in der Synthese war die Nukleosidierungsreaktion, mit der verschiedene natürliche und modifizierte Basen regio- und stereoselektiv mit der Riboseuntereinheit verknüpft wurden. *In vitro* durchgeführte kinetische Studien mit der Verbindung **7** zeigten, dass diese die Substrat- und die Kofaktorbindestelle im Enzym besetzt, wobei K_i Werte von $0.55 \pm 0.1 \mu\text{M}$, bzw. $0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$ gemessen wurden. Im Vergleich dazu ergab sich in analogen Kinetikexperimenten mit der catecholischen Vergleichsverbindung **14**, dass diese kompetitiv zum Substrat an die catecholische Bindetasche bindet und unkompetitiv zum Kofaktor SAM ist. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen für eine substratanaloge, catecholische Verbindung, die nicht in die Kofaktorbindetasche bindet. Um zusätzliche Informationen über die genauen Wechselwirkungen zwischen **7** und den Aminosäuren im aktiven Zentrum von COMT zu erhalten, werden derzeit Versuche zur Kokristallisation der Verbindung mit rekombinantem COMT unternommen.



7

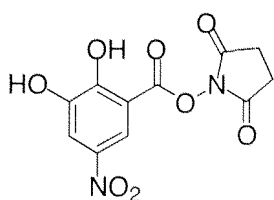
IC₅₀ (ohne Präinkubation) = 4 μM
 IC₅₀ (mit Präinkubation) = 2 μM



14

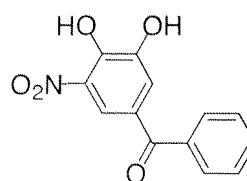
IC₅₀ (ohne Präinkubation) = 26 μM
 IC₅₀ (mit Präinkubation) = 25 μM

Der 2,3-Dihydroxy-5-nitrobenzoesäure-*N*-succinimidylester (**8**), eine Vorstufe in der Synthese von **7**, zeigte überraschend eine Inhibitionswirkung im nanomolaren Bereich. Bei der Bestimmung des Inhibitionsmechanismus fanden wir, dass **8** COMT kompetitiv zum Substrat hemmt bei einer Inkubationszeit von einer Minute mit dem Enzym. Dagegen ist die Hemmung nichtkompetitiv zum Substrat, wenn Enzym und Inhibitor 15 min zusammen vorinkubiert werden. Ein solches kinetisches Verhalten wurde bei hochaffinen Inhibitoren wie z.B. Tolcapone (Tasmar[®]) gefunden, welches bereits als Medikament in der Parkinsontherapie am Menschen eingesetzt wird. In diesem Zusammenhang könnte die *N*-Succinimidylester-Funktionalität ein Ersatz für die Nitrogruppe in catecholischen Inhibitoren sein, wenn sich in *para* Position ein elektronenziehender Substituent befindet, und stabile Analoge von **8** könnten interessante Leitstrukturen für Nachfolger von Tolcapone werden.



8

IC₅₀ (ohne Präinkubation) = 106 nM

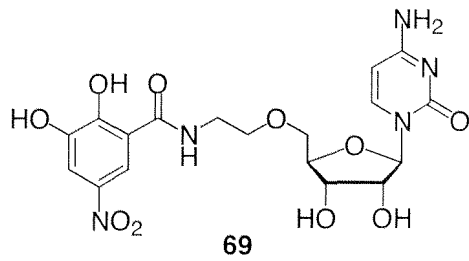


Tolcapone (Tasmar[®]); IC₅₀ = 36 nM

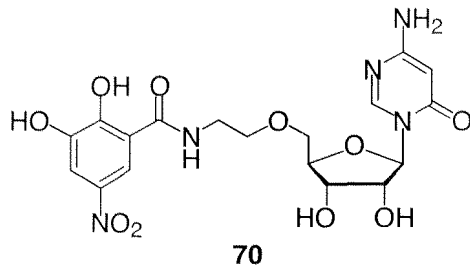
Im folgenden wurden Strukturvarianten der Leitstruktur **7** synthetisiert, um abschätzen zu können, wieviel jeder einzelne Teil der Verbindung zur Inhibitorstärke beiträgt und um einen Einblick zu bekommen, welche anderen Struktureinheiten in die jeweiligen Bindetaschen passen, um so die Aktivität der Leitstruktur zu verbessern. Es wurden zwei Moleküle **69** und **70** synthetisiert, welche Pyrimidinbasen enthalten. Diese Moleküle waren 100 mal weniger aktiv als die Leitstruktur **7**. Die Verbindungen **107**, **108** und **109**, die Alkandiy- und 3-Azaalkandiyketten zwischen Adenin und Ribose enthalten, wurden synthetisiert, um den strukturellen Einfluss der Ribose und ihre Bedeutung als Wasserstoffbrückenbildner im Hemmer **7** zu

untersuchen. In den entsprechenden Enzymtests zeigte sich, dass **107**, **108** und **109** 25-50 mal schwächere Inhibitoren sind als **7**. Um herauszufinden, ob die catecholische Untereinheit von **7** im aktiven Zentrum von COMT mit den Hydroxygruppen an das Mg^{2+} Ion bindet, wurde das analoge Molekül **88** ohne Nitrogruppe synthetisiert, welches eine 100-fach niedrigere Aktivität hatte als **7**. Dieses Ergebnis ist ein starker Hinweis dafür, dass die Leitstruktur **7** in die catecholische Bindetasche von COMT bindet.

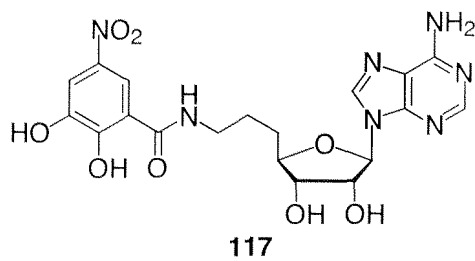
Um den Einfluss der "Brückenlänge" für das Verbindungsstück zwischen Ribose und Catechol zu studieren, haben wir die Verbindung **117** synthetisiert, die wegen des fehlenden Sauerstoffs eine im Vergleich zu **7** kürzere Brücke hat. Wie sich in den Enzymtests zeigte, ist **117** sechs mal aktiver als die Leitstruktur **7**. Wegen der kürzeren Brückenlänge verliert **117** konformationelle Freiheitsgrade gegenüber **7**, weil das Zusammenfallen der aromatischen Seitenarme verhindert wird, d.h. bei der Bindung an das Enzym ist der Entropieverlust geringer. Die Verbindungen **7**, **69** und **117** wurden mit Hilfe von NOE spektroskopischen Untersuchungen auf ihre Konformation in Lösung untersucht. In allen drei Molekülen ist die Base in der richtigen anti Orientierung (anti bzgl. der Ribose), um in die Basentasche zu binden entsprechend den "Modelling" Voraussagen. Beim Molekül **69** wurde ein hydrophober Kollaps gefunden, d.h. ein Zusammenfallen der aromatischen Seitenarme, so dass der freie Zustand des Moleküls stabilisiert ist und zusätzlich Energie aufgewandt werden muss, um das Molekül in eine für die Bindung an das Enzym günstige Konformation zu bringen, welches ein Grund für die geringe Affinität dieser Verbindung zum Enzym sein könnte verglichen mit **7** und **117**. Mit allen Verbindungen wurden *in vitro* Enzymtests durchgeführt und zum Teil wurde die Inhibitionskinetik bestimmt, um mehr über den Inhibitionsmechanismus und die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für Bisubstratinhibitoren des Typs **7** zu erfahren.



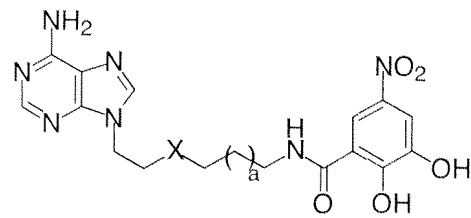
IC_{50} (ohne Präinkubation) = 522 μ M



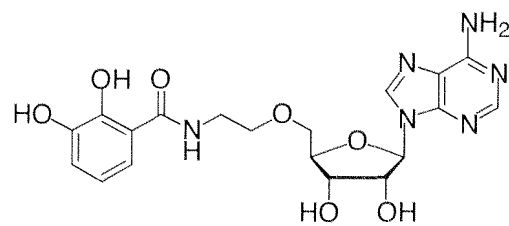
IC_{50} (ohne Präinkubation) > 100 μ M



IC_{50} (ohne Präinkubation) = 600 nM



	X	a	IC_{50}
107	CH ₂	1	55 μ M
108	NH	1	77 μ M
109	NH	2	86 μ M



IC_{50} (ohne Präinkubation) > 100 μ M