



Doctoral Thesis

A dual approach towards antimalarials structure-based design of IspE inhibitors and optimization of 1,3- diiminoisoindoline carbonylhydrazides

Author(s):

Mombelli, Paolo

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007329035> →

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. 20361

**A Dual Approach towards Antimalarials:
Structure-based Design of IspE Inhibitors and
Optimization of 1,3-Diiminoisoindoline Carbohydrazides**

A dissertation submitted to the

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

Presented by

Paolo Mombelli

M.Sc. Chemie, ETH Zurich

Born February 24th, 1983

Swiss citizen

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. François Diederich, examiner

Prof. Dr. Jeffrey W. Bode, co-examiner

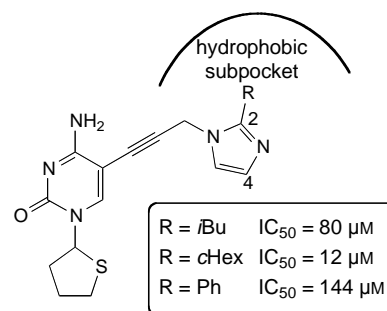
Zurich 2012

Summary

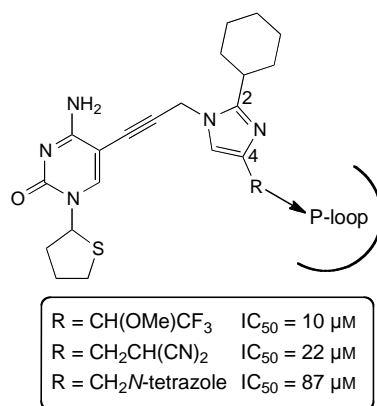
The discovery of lead compounds with new mechanisms of action is an urgent need in the fight against malaria. This can be done through the identification of novel molecular targets and subsequent rational design of inhibitors, or by screening larger libraries of compounds for their *in vitro* activity on the whole parasite in cultivated red blood cells.

Being absent in humans, the enzymes of the mevalonate-independent biosynthetic route to isoprenoids have been shown to be promising antimalarial targets. One of them is the ATP-dependent kinase IspE, a central enzyme of the non-mevalonate pathway. Using structure-based design, inhibitors for IspE from *Escherichia coli* were designed with different strategies in order to address specific pockets of its highly polar active site.

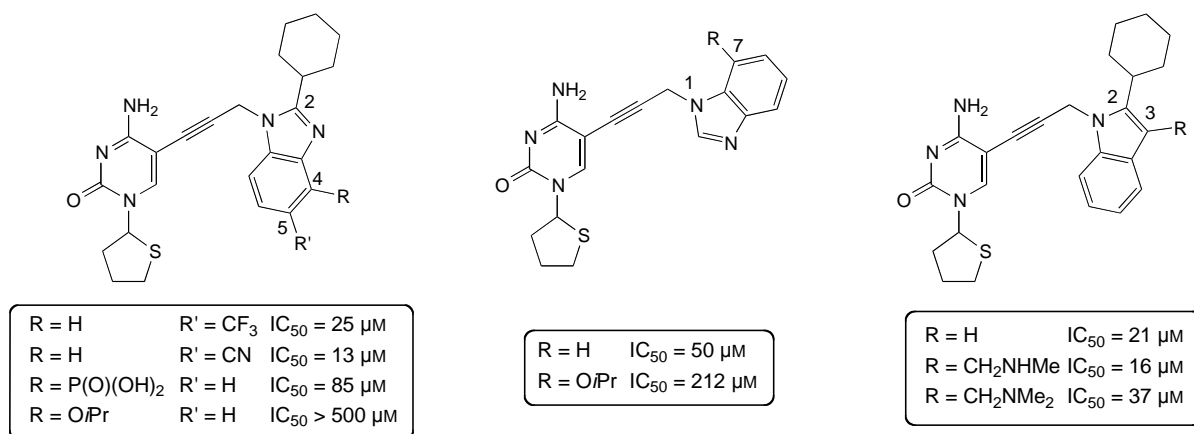
Initially, ligands were developed to target the cytidine-binding pocket with a previously used cytosine scaffold and the phosphate-binding region (P-loop) with a tetrazole moiety. However, the compounds were inactive against the enzyme, most likely for being too flexible and not anchored strongly enough into the active site. In a second design cycle, the binding to a previously discovered hydrophobic subpocket was optimized, showing that alicyclic residues fit better to the small cavity than acyclic aliphatic ones. Providing an ideal balance of shape complementarity and flexibility, the derivative bearing a cyclohexyl ring with a 1,2-disubstituted imidazole moiety as the central core was found to have the highest affinity, with an IC_{50} value of 12 μM .



With the cyclohexyl ring anchoring the ligands in the hydrophobic subpocket, the P-loop was then addressed with an additional vector bearing nitriles, a trifluoromethyl group, or small heterocycles as phosphate surrogates. The trifluoromethyl derivative (IC_{50} = 10 μM) was found to bind slightly better than the nitrile-bearing counterparts. More polar residues, such as a tetrazole ring, gave significantly less active ligands (IC_{50} = 87 μM), probably due to the flexibility of the methylene linker, which allows polar phosphate mimics to benefit from water solvation instead of entering the P-loop.



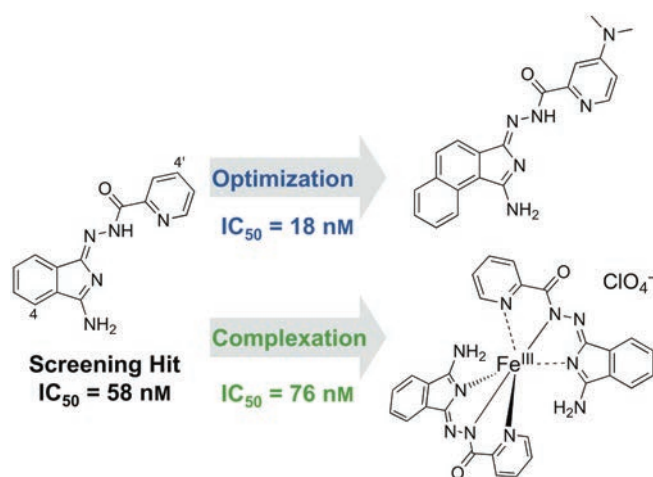
Using a more rigid benzimidazole central core, the phosphate surrogate was attached directly to the central platform. This conformational restriction prevents readaptation of the ligand system and the phosphate mimic from orienting toward the solvent on one hand, but also from maximizing beneficial and minimizing unfavorable contacts with the enzyme on the other. Rigidity of the ligand system also requires high precision in the design; thus, a trifluoromethyl group seems suboptimally oriented and partially solvated, thereby inducing a loss in binding affinity ($IC_{50} = 25 \mu\text{M}$), whereas the ligand bearing a slightly more polar nitrile group was found to have higher affinity ($IC_{50} = 13 \mu\text{M}$). Accordingly, also a very polar phosphate moiety was tolerated ($IC_{50} = 85 \mu\text{M}$), which is notable, considering the dramatic difference in partitioning (lower $\log D$ value) and the fact that the ligands bearing alkoxy substituents were found to be completely inactive.



Finally, analysis of the X-ray crystal structures of IspE led to the identification of two structural water molecules in the highly polar methylerythritol binding site. A series of 1,7-disubstituted benzimidazole scaffolds, accessed through regioselective alkylation, showed that displacement of such water molecules is unfavorable if the H-bonds of the water molecule are not replaced. Indeed, indole-based inhibitors bearing an amine functional group were able to displace the water molecule without substantial loss in activity ($IC_{50} = 16\text{--}37 \mu\text{M}$).

A library of inhibitors of the non-mevalonate pathway identified at BASF in the context of herbicide projects was screened for antimalarial activity in a whole-parasite assay. A 1,3-diiminoisoindoline carbohydrazide, originally a moderate inhibitor of plant IspE, was discovered in cell-based assays as a potent inhibitor of the *in vitro Plasmodium falciparum* growth, with a remarkable IC_{50} value of 58 nM. During the course of the optimization

process, IspE was revealed not to be the molecular target of this compound class. However, due to the high *in vitro* potency, optimization of the lead compound was considered worthwhile and performed based on the cell-based structure–activity data. The very short and efficient synthetic protocols for this class of compounds facilitated the preparation of a larger library of derivatives of the initial hit with activities in the nanomolar IC₅₀-range, allowing an extensive study of the structure–activity relationship as well as the establishment of a cytotoxicity profile of the inhibitors. Initial results showed that only compounds bearing both the isoindoline and the pyridine moieties inhibit *Plasmodium falciparum* growth in the nanomolar range. This potency was maintained or slightly improved by the introduction of electron-donating functional groups, preferentially on C(4) and C(4') positions of the isoindole and pyridine moieties, respectively. The combination of differently substituted isoindoline and pyridine scaffolds resulted in compounds with potencies difficult to predict. Thus, combining a benzoisoindoline scaffold with a 4-*N,N*-dimethylaminopyridine moiety yielded the most potent compound of the library. With an IC₅₀ value of 18 nM, it displayed *in vitro* potency comparable to that of chloroquine, one of the most used antimalarial drug. Only weak *in vivo* activity in mice was determined for the hydrochlorate salt of this compound, presumably due to low solubility and bioavailability of the isoindolines. Some of the active compounds also displayed strong growth inhibition of L-6 cells, which is an indicator of cytotoxicity.



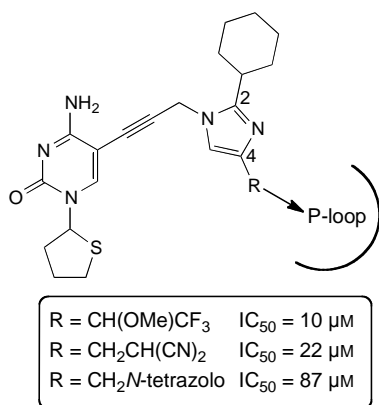
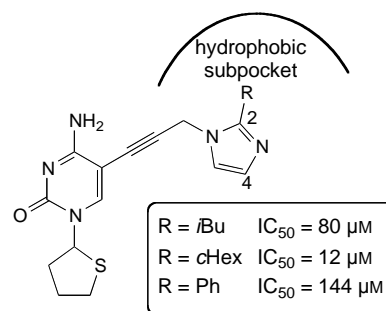
Being highly preorganized, the diiminoisoindoline carbohydrazides were shown to act as tridentate ligands and to form kinetically stable 2:1 complexes with iron(III). The complexes also displayed interesting antiplasmodial activity, often comparable to that of the respective free ligands. When the screening hit was used as ligand, the complex showed a remarkable reduction in the growth inhibition of L-6 cells.

Riassunto

La ricerca di composti attivi con nuovi meccanismi d'azione è un bisogno urgente nella lotta per debellare la malaria. Gli strumenti per sviluppare nuovi meccanismi terapeutici sono l'identificazione di nuovi processi molecolari e il susseguente design razionale d'inibitori o lo screening di vaste librerie di composti testandone l'attività contro la proliferazione del parassita nelle culture di eritrociti.

Gli enzimi coinvolti nella via biosintetica non mevalonato-dipendente degli isoprenoidi sono target promettenti per lo sviluppo di terapie contro la malaria. Tra questi vi è anche IspE, una chinase ATP-dipendente ed enzima centrale del processo biosintetico indipendente dal mevalonato. Nuove classi di inibitori dell'enzima IspE del batterio *Escherichia coli* sono state sviluppate usando un design razionale basato sulle conoscenze strutturali dell'enzima e specificatamente del suo sito attivo di natura polare.

Gli inibitori sono stati inizialmente sviluppati usando il derivato della citosina già descritto in precedenza in modo da occupare la tasca della citidina, mentre un gruppo tetrazolico avrebbe occupato il sito di riconoscimento del fosfato, detto P-loop. Questi composti non hanno tuttavia mostrato attività verso l'enzima, probabilmente poiché troppo flessibili e non sufficientemente ancorati al suo sito attivo. L'affinità per una tasca a carattere idrofobo descritta in precedenza è stata ottimizzata durante il design della seconda generazione di inibitori. Gruppi funzionali aliciclici si sono dimostrati maggiormente affini rispetto a sostituenti alifatici aciclici usando un anello imidazolo 1,2-disostituito quale motivo centrale. Grazie ad un equilibrio ottimale tra complementarità e flessibilità, un anello cicloesilico si è dimostrato il più appropriato, assicurando al composto corrispondente

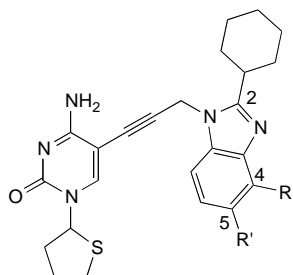


un valore di inibizione IC₅₀ pari a 12 μM.

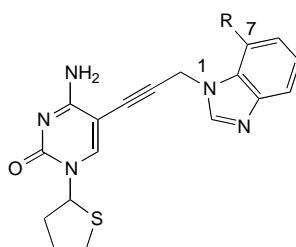
Mantenendo l'anello cicloesilico ancorato alla tasca idrofobica, un nuovo vettore portante gruppi nitrile, trifluorometile o piccoli anelli eterociclici è stato introdotto per occupare il P-loop. Il derivato sostituito con un gruppo trifluorometile (IC₅₀ = 9.9 μM) si è rivelato sensibilmente più potente rispetto ai corrispondenti derivati nitrili. Derivati caratterizzati da gruppi più polari, come ad esempio un anello

tetrazolico, si sono dimostrati meno attivi ($IC_{50} = 87 \mu M$), probabilmente a causa della flessibilità del link metilene, che permette loro un orientamento non ottimale esponendo il gruppo funzionale al solvente piuttosto che nel P-loop.

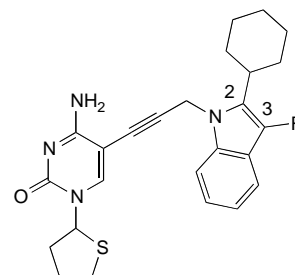
I nuovi composti basati su un gruppo benzimidazolico quale motivo centrale permettono al surrogato del fosfato di essere direttamente legato ad esso. La restrizione conformazionale di questa classe di inibitori impedisce qualsiasi riorientamento del legante, evitando di conseguenza un'esposizione del surrogato del fosfato verso il solvente da una parte, ma anche l'eventuale ottimizzazione di interazione favorevoli con l'enzima dall'altra. Un legante più rigido richiede allo stesso tempo una maggiore precisione nella fase di design, cosicché ad esempio un gruppo trifluorometile non perfettamente orientato e parzialmente esposto al solvente ha indotto una perdita d'attività ($IC_{50} = 25 \mu M$), mentre il composto derivato nitrile si è rivelato maggiormente affine ($IC_{50} = 13 \mu M$). Considerando un coefficiente di partizione altamente sfavorevole, anche il composto derivato con un gruppo funzionale molto polare quale un fosfato ha mostrato una discreta attività inibitoria ($IC_{50} = 85 \mu M$). Gli analoghi composti derivati con gruppi funzionali eterici, invece, non hanno rivelato affinità verso l'enzima.



R = H	R' = CF ₃	$IC_{50} = 25 \mu M$
R = H	R' = CN	$IC_{50} = 13 \mu M$
R = P(O)(OH) ₂	R' = H	$IC_{50} = 85 \mu M$
R = O ⁻ Pr	R' = H	$IC_{50} > 500 \mu M$



R = H	$IC_{50} = 50 \mu M$
R = O ⁻ Pr	$IC_{50} = 212 \mu M$

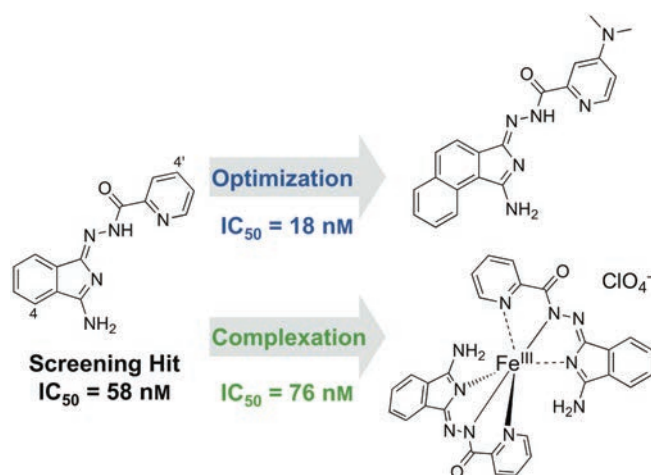


R = H	$IC_{50} = 21 \mu M$
R = CH ₂ NHMe	$IC_{50} = 16 \mu M$
R = CH ₂ NMe ₂	$IC_{50} = 37 \mu M$

Inoltre, l'attenta analisi delle diverse strutture cristallografiche disponibili dell'enzima ha rilevato la presenza di due molecole d'acqua che rivestono un ruolo strutturale nella tasca polare del metileritritolo. Una serie di composti benzimidazolo 1,7-disostituito derivati, accessibili sinteticamente tramite alchilazione regioselettiva, ha mostrato che la sostituzione di tali molecole d'acqua è energeticamente svantaggiosa se i legami ad idrogeno di esse con l'enzima non vengono sostituiti appropriatamente. A conferma di ciò, in inibitori indolici sostituiti con gruppi amminici la molecola d'acqua è stata rimpiazzata senza perdite

sostanziali d'inibizione grazie alla formazione di nuovi legami ad idrogeno ($IC_{50} = 16\text{--}37 \mu\text{M}$).

Una libreria di composti attivi identificati da BASF quali inibitori degli enzimi del processo di biosintesi degli isoprenoidi indipendente dal mevalonato è stata analizzata per l'attività contro la malaria in un test sulla proliferazione del parassita. Un derivato 1,3-diiminoisindolino idrazinico, noto per una discreta inibizione dell'enzima IspE delle piante, è stato scoperto essere un potente inibitore della proliferazione *in vitro* del parassita *Plasmodium falciparum*. Tuttavia, ulteriori studi hanno dimostrato che IspE non è l'enzima responsabile per tale inibizione. L'ottimizzazione di questo inibitore è quindi proseguita basandosi sui valori della proliferazione del parassita *in vitro*. L'efficacia della sintesi di questa classe di composti ha facilitato la preparazione di una nuova libreria di derivati con valori d'inibizione nell'ordine di grandezza nanomolare, permettendone lo studio dettagliato della relazione struttura-attività nonché lo studio del profilo di tossicità. Risultati preliminari avevano mostrato che solo composti isoindolinici e piridinici inibiscono la proliferazione di *Plasmodium falciparum* nell'ordine di grandezza nanomolare. Questo livello di attività ha potuto essere mantenuto o, in alcuni casi, anche migliorato con l'introduzione di gruppi funzionali donatori di elettroni, preferibilmente in posizioni C(4) e rispettivamente C(4') dell'isoindolino e della piridina. La combinazione di vari gruppi isoindolo- e piridino-derivati ha rilevato valori difficilmente prevedibili. Ad esempio, combinando un gruppo benzoisoindolinico con un gruppo 4-*N,N*-dimetilamminopiridinico si è ottenuto il composto più attivo della serie, il cui valore di inibizione IC_{50} pari a $18 \mu\text{M}$ è comparabile al valore di attività *in vitro* della cloroquina, per lungo tempo uno dei trattamenti principali per la malaria. L'analisi *in vivo* nei topi del sale idrocloruro del composto più attivo della libreria ha rilevato una bassa attività, da ricondurre probabilmente ad una ridotta solubilità in acqua e conseguente ridotta biodisponibilità. Questa classe di composti rivela una potente inibizione della proliferazione di cellule L-6, un indicatore di citotossicità.



Essendo altamente preorganizzati, i derivati del 1,3-diiminoisoindolino idrazide sono stati usati come ligandi tridentati per la formazione di complessi 2:1 di ferro(III), stabili a condizioni fisiologiche. I complessi hanno mostrato interessanti attività inibitorie della proliferazione di *Plasmodium falciparum*, spesso nello stesso ordine di grandezza dei rispettivi ligandi liberi. Usando il composto rivelato dallo screening quale ligando, i complessi si sono dimostrati meno attivi nell'inibire le cellule L-6, assicurando una maggiore selettività.