



Doctoral Thesis

**New antimalarials and herbicides
inhibitors of the enzymes 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-
erythritol synthase (IspD) and serine hydroxymethyltransferase
(SHMT)**

Author(s):

Seet, Michael

Publication Date:

2013

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-009980589> →

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. 21268

**New Antimalarials and Herbicides:
Inhibitors of the Enzymes 4-Diphosphocytidyl-2C-
methyl-D-erythritol Synthase (IspD) and Serine
Hydroxymethyltransferase (SHMT)**

A dissertation submitted to the

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

Presented by

Michael Seet

Dipl.-Chemiker, Philipps-Universität Marburg (Germany)

born 06.12.1982

citizen of the Federal Republic of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. François Diederich, examiner

Prof. Dr. Gisbert Schneider, co-examiner

Zurich 2013

Abstract

Infectious diseases like malaria display a severe threat to mankind, while the number of anti-malaria drugs is very limited. An annual worldwide number of almost 500 million clinical cases and the rising emergence of multi-drug resistant pathogens underline the necessity of new drug development with novel mode of action.

IspD (4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase) is an enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. This pathway was discovered in the 1990s and is fundamentally different to the formerly known mevalonate-depending route to isoprenoids. Whereas the latter can be found in plants and mammals, the former occurs predominantly in bacteria, some algae, plants, and in certain protozoa such as the malaria parasite *Plasmodium*, but is completely absent in humans. Thus, the enzymes of the non-mevalonate pathway are highly interesting targets for antimalarials, antibiotics, and also herbicides.

The aim of the first part of this thesis was to develop, synthesize, and evaluate new potential inhibitors of IspD by combining high-throughput screening and lead optimization via molecular modeling. Since the non-mevalonate pathway is on the interface between herbicidal and antiplasmodial research, a set of herbicidal inhibitors of IspD identified at BASF SE in Ludwigshafen, Germany, was investigated for antimalarial activity in a whole-parasite cell-based assay. From the substance cluster of the so-called pyrrolopyrazines, lead (\pm)-**132** was developed with a cell-based EC_{50} value against *P. falciparum* of 52 nM and a selectivity index as compared to mammalian muscle cells of 40. While being a moderate inhibitor of IspD, off-target predictions revealed that (\pm)-**132** likely acts as a kinase inhibitor, which could be experimentally proven on a set of several human kinases. These results represent the discovery of new potent antimalarials stemming from a herbicidal project.

Another substance class found to be active on IspD of the plant *A. thaliana* is the cluster of the so-called azolopyrimidines. Co-crystal structure analyses of the binding mode of these compounds revealed a formerly undiscovered allosteric

pocket in the enzyme. Lead optimization efforts resulted in an improved target IC₅₀ value of 35 nM for nitrile **49**. Several target active analogs additionally showed herbicidal activity in the greenhouse, underlining that this substance class has the potential to introduce a new MOA for herbicides. Moreover, this is the first time that IspD inhibitors with a known binding mode are described.

The discovery of the allosteric pocket in IspD induced further investigations for new potential ligands in this binding site. It was shown that derivatives of the natural product pentabromopseudiline are potent allosteric IspD inhibitors. A co-crystal structure showing a different binding mode as compared to the azolopyrimidines ligands gave experimental evidence for the remarkably high flexibility of the allosteric pocket. Mutational studies underlined this observation, proving that the allosteric site in *A. thaliana* IspD is a highly interesting drug target. Further efforts were undertaken to address the substrate binding site of IspD. Due to the high polarity of the CTP-binding region, this project proved to be remarkably challenging. For the identification of new ligands, two strategies were pursued: A structure-based *de novo* design approach and a virtual screen. While in the *de novo* design project no active ligands were discovered, the virtual screen revealed a cluster of catecholothiazoles as potential new leads with low double-digit micromolar activity.

The second part of this thesis focused on the enzyme serine hydroxymethyltransferase (SHMT). This enzyme is part of the folate cycle and occurs in plants, as well as in *Plasmodium*. An extensive research program at BASF SE revealed leads from the so-called pyrazolopyran substance class with activities in the sub-nanomolar range against *A. thaliana* SHMT. In this project, it was shown that like in the case of IspD, this activity can be transferred to develop new, highly potent antimalarials like compound (\pm)-**254** that exhibits a cell-based EC₅₀ value of 2.8 nM.

Zusammenfassung

Infektionskrankheiten wie die Malaria stellen eine ernsthafte Bedrohung für die Menschheit dar. Eine weltweite jährliche Anzahl von nahezu 500 Mio. klinischen Fällen und das vermehrte Auftreten multiresistenter Pathogene unterstreichen die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Medikamente mit neuartigem Wirkmechanismus.

IspD (4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritolsynthase) ist ein Enzym des mevalonatunabhängigen Biosynthesewegs von Isoprenoiden. Dieser Syntheseweg wurde in den 1990er Jahren entdeckt und unterscheidet sich grundlegend von der zuvor bekannten mevalonatabhängigen Route. Während letzterer Weg in Pflanzen und Säugetieren zu finden ist, tritt der erstere vornehmlich in Bakterien, manchen Algen, Pflanzen und gewissen Protozoen, wie dem Malariaerreger *Plasmodium* auf, nicht jedoch im Menschen. Demzufolge stellen die Enzyme des mevalonatunabhängigen Biosynthesewegs hochinteressante Ziele für Malariawirkstoffe, Antibiotika und auch Herbizide dar.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, potentielle neue Inhibitoren für IspD durch eine Kombination aus Hochdurchsatz-Screening und Optimierung mittels molekularen Modellierens zu entwickeln, diese herzustellen und zu evaluieren. Da der mevalonatunabhängige Biosyntheseweg eine Schnittstelle zwischen Herbizid- und Malariaforschung darstellt, wurde eine Zusammenstellung herbizider IspD-Inhibitoren, die bei der BASF SE in Ludwigshafen identifiziert wurde, auf Aktivität gegen Malaria in einem zellbasierten Testverfahren geprüft. Aus der Substanzgruppe der sogenannten Pyrrolopyrazine wurde Leitstruktur (\pm)-**132** entwickelt mit einem zellbasierten EC_{50} -Wert gegenüber *P. falciparum* von 52 nM sowie einem Selektivitätsindex gegenüber Muskelzellen aus Säugetieren von 40. Obwohl (\pm)-**132** nur ein moderater IspD-Inhibitor ist, haben Zielstrukturvorhersagen ergeben, dass Kinasen das wahrscheinlichste Ziel sind, was experimentell bestätigt werden konnte. Diese Ergebnisse repräsentieren die Entwicklung neuer Malariawirkstoffe, die aus einem Herbizidprojekt stammen.

Eine weitere Substanzklasse, die auf IspD der Pflanze *A. thaliana* aktiv ist, sind die sogenannten Azolopyrimidine. Kokristallstrukturanalysen haben einen Bindungsmodus in einer zuvor unentdeckten allosterischen Tasche des Enzyms aufgedeckt. Leitstrukturoptimierungen resultierten schließlich in einem verbesserten IC₅₀-Wert am Enzym von 35 nM für Nitril **49**. Einige Verbindungen zeigten zudem herbizide Wirkung im Gewächshaus, was das Potential dieser Substanzklasse unterstreicht, einen neuen Wirkmechanismus in die Herbizidforschung einzuführen. Zudem wurden zum ersten Mal IspD-Hemmer mit bekanntem Bindungsmodus beschrieben.

Die Entdeckung der allosterischen Tasche hat weitere Nachforschungen für neue Liganden in dieser Bindestelle induziert. So konnte gezeigt werden, dass Derivate des marinen Naturstoffs Pentabrompseudilin potente allosterische IspD-Inhibitoren sind. Kokristallstrukturanalysen, die einen anderen Bindungsmodus als den der Azolopyrimidine ergaben, lieferten den experimentellen Beweis für die bemerkenswert hohe Flexibilität der allosterischen Tasche. Dies wurde durch Mutationsstudien weiter untermauert und zeigt, dass die allosterische Bindestelle in *A. thaliana* IspD ein hochinteressantes Ziel für Wirkstoffe ist. Darüber hinaus wurden weitere Arbeiten unternommen, um die Substratbindestelle von IspD zu adressieren, was sich aber auf Grund der hohen Polarität der CTP-Bindestelle als ausgesprochen schwierig herausstellte. Um auf diese Weise neue Liganden zu finden, wurden zwei Strategien verfolgt: ein strukturbasiertes *de novo* Design und ein virtuelles Screening. Während im *de novo* Design-Projekt keine aktiven Liganden entdeckt wurden, ergab das virtuelle Screening die Substanzklasse der Katecholothiazole als potentielle neue Leitstrukturen mit zweistellig-mikromolarer Aktivität.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Enzym Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT). Dieses Enzym ist Bestandteil des Folsäurestoffwechsels und findet sich sowohl in Pflanzen wie auch in *Plasmodium*. Ein umfangreiches Forschungsprogramm bei der BASF SE brachte Leitstrukturen der sogenannten Pyrazolopyran-Substanzklasse hervor mit Aktivitäten im subnanomolaren Bereich gegen SHMT von *A. thaliana*. In diesem Projekt wurde gezeigt, dass wie im Falle von IspD die Aktivität übertragen werden kann und

somit neue, hochaktive Malariawirkstoffe wie Verbindung (\pm)-254 mit einem zellbasierten EC₅₀-Wert von 2.8 nM entwickelt werden können.