



Doctoral Thesis

## **Allosteric Inhibitors of the Enzyme IspD of the Non-Mevalonate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis**

**Author(s):**

Schwab, Anatol

**Publication Date:**

2017

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000216917> →

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. 24660

**Allosteric Inhibitors of the Enzyme IspD of the  
Non-Mevalonate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**Anatol Otto Rudolf Georg Schwab**

MSc ETH Interdisciplinary Sciences

born on 23.04.1989

citizen of Austria

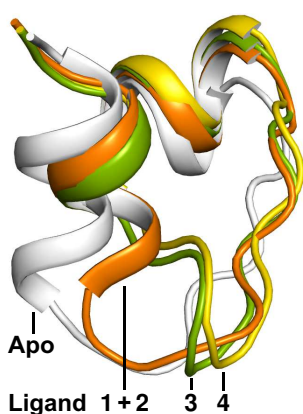
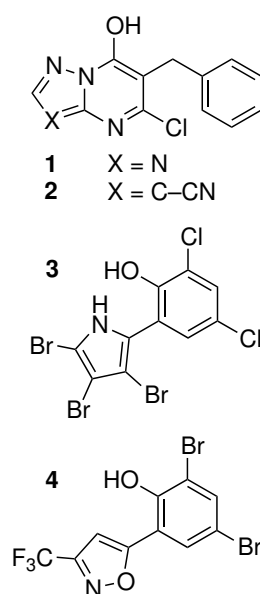
accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. François Diederich, examiner  
Prof. Dr. Gisbert Schneider, co-examiner

Zurich 2017

## Summary

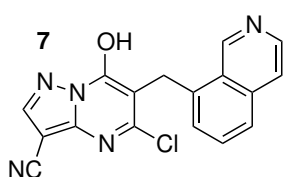
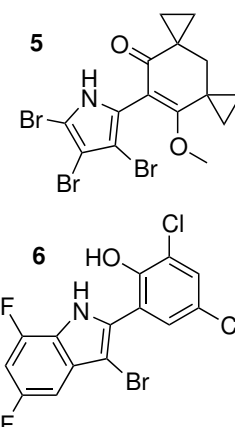
Malaria is a major burden and cause of death in developing countries with over 200 million cases reported worldwide each year. The emergence of multi drug resistant malaria parasites, in particular against the widely used artemisinin based therapy, requires a timely response. The development of drugs with new modes of action is among the most efficient way in combating resistance and necessitates the exploitation of new molecular targets of the malaria parasite.

The discovery of the non-mevalonate pathway of isoprenoid synthesis has opened up a diverse set of molecular targets for the treatment of malaria but also for antibacterial agents and herbicides. This pathway fundamentally differs from the mevalonate-dependent pathway by which humans and mammals derive isoprenoids, and therefore promises a good selectivity for new treatments. Of the seven enzymes comprising the non-mevalonate pathway, IspD stands out due to its allosteric regulatory site. Inhibition through allosteric sites is highly advantageous as inhibitors do not need to compete with substrates present at high concentrations. Preceding work has established azolopyrimidines ( $IC_{50}$  (1) = 0.18  $\mu M$ ,  $IC_{50}$  (2) = 0.029  $\mu M$ ) and the ion chelating pseudilins ( $IC_{50}$  (3) = 40  $\mu M$  and 5.8  $\mu M$  with  $Cd^{2+}$ ) as allosteric inhibitors of IspD of *Arabidopsis thaliana* (*AtIspD*) and has elucidated their binding mode.



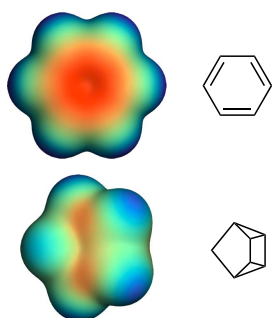
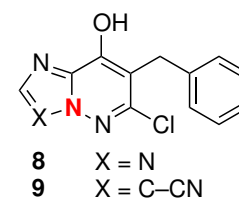
A more detailed insight into the allosteric mechanism was given by the discovery of phenylisoxazole ligand 4 ( $IC_{50}$  = 9.2  $\mu M$ ) and mutation studies on the enzyme. Binding of allosteric ligands leads to unwinding of an alpha helix and a large displacement of a loop region of the enzyme. The loop is displaced to a different extent depending on the ligand class, and the side chains of aspartate residues 261 and 262 of the loop were found to mediate inhibition, likely by coulombic repulsion of the substrate. New allosteric ligands to investigate the specific requirements for allosteric inhibition were designed and synthesized, based on the structural information and mechanistic understanding of the allosteric mechanism.

Substitution of the dichlorophenol of pseudilin **3** by a motif that replaces the halogens by spirocyclopropanes highlighted the contribution of halogen bonding interactions of **3** with the enzyme ( $IC_{50}$  (**5**) = 98  $\mu\text{M}$ ). Difluoroindoles such as **6** ( $IC_{50}$  = 60  $\mu\text{M}$ ) provide a replacement for the potentially unstable tribromopyrrole of the pseudilins. Unlike the lead structure **3**, binding of **6** however occurs independent of metal ions.



The characteristic allosteric loop conformation of each ligand class has raised the question if the conformation of the displaced loop is linked to the degree of inhibition and if different conformations are possible for a given ligand class. Low activity of the extended azolopyrimidine ligand **7** designed to stabilize a loop conformation as observed for pseudilin **3**, suggests specificity of a loop conformation to their ligand class.

A common feature of inhibitors **1-4** is the acidic hydroxy moiety which allows the ligand to bind the enzyme in an anionic form at physiological pH. The effect of ligand acidity on binding affinity was shown by ligand **8** ( $IC_{50}$  = 2.9  $\mu\text{M}$ ) and **9** ( $IC_{50}$  = 0.13  $\mu\text{M}$ ), which are isomeric to the lead structures **1** and **2**. The shifted nitrogen of the heterocyclic scaffold results in a less acidic ligand, while shape and binding interactions are unaffected. The higher  $pK_a$  values of **8** and **9** correlate with lower inhibition and have identified ligand acidity as a key component for the design of new inhibitors.

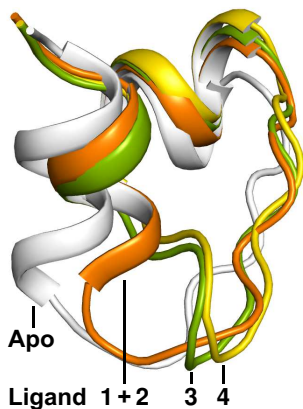
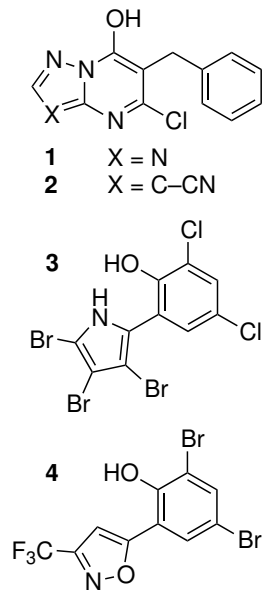


The azolopyrimidine ligand class has shown a strong impact of small substituents on the benzyl group on inhibition. As a consequence, the allosteric pocket of *AtIspD* was recognized as a responsive environment to evaluate bioisosteres of benzene. DFT calculations have identified quadricyclane as an isostere of benzene which, unlike other aliphatic replacements, also mimics its quadrupole moment. In this context, the norbornadiene–quadricyclane photoswitch is proposed as a compact switching element for photopharmacological applications.

## Zusammenfassung

Malaria stellt eine schwerwiegende Belastung und Todesursache in Entwicklungsländern dar, für die weltweit jährlich mehr als 200 Millionen Erkrankungen verzeichnet werden. Eine Zunahme von Malariaerregern mit mehrfachen Resistenzen, vor allem gegen die weit verbreitete Artemisinin-basierte Therapie, erfordert ein rasches Handeln. Die Entwicklung von Medikamenten mit neuartigen Wirkungsmechanismen ist eine der effektivsten Methoden gegen Resistenzen und verlangt die Erforschung neuer molekularer Ziele im Malariaparasiten.

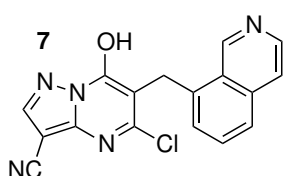
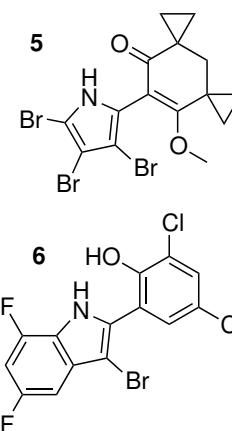
Die Entdeckung des mevalonatunabhängigen Isoprenoidsynthesewegs hat eine diverse Gruppe von Zielproteinen aufgezeigt, die attraktiv zur Behandlung von Malaria, bakteriellen Krankheitserregern oder für die Herbizidentwicklung sind. Dieser Biosyntheseweg unterscheidet sich fundamental von der mevalonatabhängigen Isoprenoidsynthese des Menschen und anderen Säugetieren und verspricht daher eine gute Selektivität für neue Behandlungsmethoden. IspD sticht aus den sieben Enzymen des mevalonatunabhängigen Isoprenoidsynthesewegs hervor, da es über eine allosterische Bindungsstelle verfügt. Die Inhibition von Enzymen durch einen allosterischen Mechanismus ist besonders vorteilhaft, da Inhibitoren nicht mit den Substraten in Konkurrenz stehen, die oft in hohen Konzentrationen vorliegen. In vorhergehenden Arbeiten wurden Azolopyrimidine ( $IC_{50}$  (1) = 0.18  $\mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (2) = 0.029  $\mu\text{M}$ ) und Pseudiline, welche über ein Metallion binden ( $IC_{50}$  (3) = 40  $\mu\text{M}$  und 5.8  $\mu\text{M}$  mit  $\text{Cd}^{2+}$ ), als allosterische Inhibitoren von IspD aus *Arabidopsis thaliana* (*AtIspD*) identifiziert und deren Bindungsmodus aufgeklärt.



Mutationsstudien am Enzym sowie die Entdeckung des Phenylisoxazol-Liganden 4 ( $IC_{50}$  = 9.2  $\mu\text{M}$ ) führten zu einem detaillierten Verständnis des allosterischen Mechanismus. Die Bindung von allosterischen Liganden geht mit dem Aufdrehen einer  $\alpha$ -Helix und der starken Verschiebung einer Schleifenstruktur des Enzyms einher.

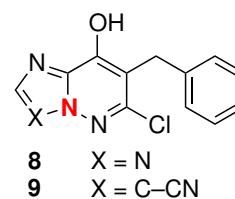
In Abhängigkeit der Ligandenklasse findet die Verschiebung der Schleife zu einem unterschiedlichen Ausmass statt, und die Seitenketten der Aspartate 261 und 262 vermitteln die Hemmung des Enzyms durch Coulomb-Abstossung des Substrats.

Um Anforderungen zu identifizieren, die eine allosterische Inhibition ermöglichen, wurden neue Liganden entworfen und synthetisiert. Der Prozess dazu wurde durch strukturelle Daten und dem mechanistischen Verständnis der Inhibition geleitet. Der Ersatz des Dichlorphenols von Pseudilin **3** durch ein Gerüst, das die Halogene durch Spirocyclopropane ersetzt, zeigt dass die Halogenbrückenbindung am Dichlorphenol einen wesentlichen Beitrag zur Enzymbindung liefert. Difluorindole wie in **6** erlauben, das wenig stabile Tribromopyrrol der Pseudiline zu ersetzen. Im Gegensatz zur Leitstruktur **3** bindet **6** unabhängig von Metallionen.

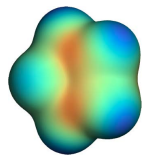
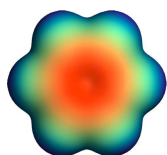


Die charakteristische Konformation der allosterischen Schleife jeder Ligandenklasse hat die Frage aufgeworfen, ob das Ausmass der Enzymhemmung mit der Konformation der Schleife zusammenhängt und ob für eine Ligandenklasse auch andere Schleifenkonformationen möglich sind. Der ausgedehnte Azolopyrimidin Ligand **7** wurde entworfen, um eine Konformation der Schleife, wie sie für Pseudilin **3** beobachtet wird, zu stabilisieren. Die aussergewöhnlich geringe Aktivität dieses Liganden lässt vermuten, dass Schleifenkonformationen spezifisch für die jeweilige Ligandenklasse sind.

Ein gemeinsames Merkmal der Inhibitoren **1-4** ist eine saure Hydroxygruppe, wodurch der Ligand bei physiologischem pH als Anion das Enzym binden kann. Der Einfluss der Ligandenacidität wurde durch Ligand **8** ( $IC_{50} = 2.9 \mu M$ ) und **9** ( $IC_{50} = 0.13 \mu M$ ) gezeigt,



die strukturisomer zu den Leitstrukturen **1** und **2** sind. Der im heterozyklischen Gerüst verschobene Stickstoff bewirkt eine Reduktion der Säurestärke, während Form und Bindungsinteraktionen unverändert bleiben. Der höhere  $pK_a$ -Wert von **8** und **9** korreliert mit einer geringeren Inhibitionswirkung und zeigt die Ligandenacidität als Schlüsselkomponente für die Entwicklung neuer Inhibitoren auf.



Die Azolopyrimidin-Ligandenklasse zeigt starke Aktivitätsunterschiede für kleine Substituenten an der Benzylgruppe. Folglich kann die allosterische Bindungstasche von *AtIspD* als empfindliche Umgebung zur Erprobung von Bioisosteren des Benzolsubstituenten dienen. DFT-Berechnungen haben ergeben, dass Quadricyclan im Gegensatz zu anderen aliphatischen Benzol-Isosteren auch dessen Quadrupolmoment nachahmt. In diesem Zusammenhang wird der Norbornadien-Quadricyclan-Photoschalter für die photopharmakologische Anwendung vorgestellt.