

Dissertation ETH No. 13592

**Random Synthesis and Biological
Characterization of Nucleoside Analogs –
New Perspectives for Drug Discovery**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Ulrich Kessler

Pharmacist (Dipl. pharm. ETH)
ETH Zürich

born December 14th, 1968
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. G. Folkers, examiner
Prof. Dr. P. A. Schubiger, co-examiner
Dr. L. Scapozza, co-examiner

2000

SUMMARY

Contemporary pharmaceutical research is confronted with the challenge of finding lead structures directed at the plethora of new targets arising from advances in molecular biology. High-throughput screening technologies are already in place to accommodate them enabling rapid testing of millions of drug candidates. Thus, preparation of compound collections with broad molecular diversity becomes the rate-limiting factor and simultaneously a major challenge in the overall drug discovery process. Although combinatorial chemistry creates a multitude of chemically diverse compounds leading to libraries of steadily increasing size, its power is restrained by the availability of suitable building blocks and success of subsequent chemical reactions. Hence, libraries from classical combinatorial chemistry are highly biased towards compounds that are straightforward to synthesize resulting in the absence of complex structural motifs. Since the alternative source of molecular diversity, isolation of natural products, does not provide a sufficient number of compounds, there is an immediate demand for the development of innovative approaches creating large numbers of new unusual chemical entities.

The main aspect of this work was to verify, whether γ -irradiation of aqueous organic systems is a suitable tool for generation of molecular diverse random libraries. The study comprised chemical analysis of irradiated solutions of building block mixtures, bioactivity screening and rational optimization of hit structures.

Our investigations were prompted by a demand for novel fraudulent substrates of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV 1 TK). The enzyme represents a typical target for drug discovery purposes and catalyzes the phosphorylation of thymidine (dT) in the presence of adenosine triphosphate (ATP) and magnesium ions. TK established itself as major tool in different applications such as gene therapeutical treatment of cancer and AIDS, as control system in allogeneic bone marrow transplantation and AIDS vaccine, as expression reporter gene and is an important target in antiviral therapy. HSV 1 TK exhibits broad substrate diversity, while human cellular TK shows a rather high substrate specificity. This difference between viral and cellular TK is the crucial molecular basis for therapeutic approaches.

We designed a small directed library containing binary mixtures of six nucleobases and four alcohols in aqueous solution. These building blocks are not only typical motifs of previously synthesized combinatorial libraries and generally considered to be drug-like, but also represent key pharmacophores of probable TK substrates. The solutions were irradiated at high doses of γ -ray in a ^{60}Co -source and mixtures of radiolysis products were subsequently analyzed through high performance liquid chromatography-mass spectrometry. The number of fusion products detected was more than ten-fold compared to classical combinatorial synthesis was detected and the procedure proved to be well reproducible.

Crude irradiated solutions were screened for potential HSV 1 TK substrates by indirect measurement of enzyme activity in terms of adenosine diphosphate (ADP) formation during incubation with TK in presence of ATP. Two active principles were identified, isolated and further characterized. One compound displays a new, unusual sugar mimic. Isotope experiments revealed that it is formed by linkage of two thymine and methanol molecules each via generation of three carbon-carbon bonds in a single reaction.

Kinetic inhibition measurements showed that both hits exhibit good binding affinity and high specificity towards the viral enzyme. However, antiviral tests did not show any antiviral or cytotoxic effects. To ensure that the hit compounds do not affect proliferation of cells, we established an assay based on human non small lung cancer cells. In contrast to ganciclovir, a potent antiviral drug, our compounds did not influence proliferation of normal or TK-transfected cells even at high concentrations. Thus, we decided to utilize them as starting points for rational design of a novel precursor of a non-toxic reporter probe for *in vivo* imaging of HSV 1 TK gene expression via positron emission tomography (PET).

The structures of both ligands in complex with the enzyme were solved at 2.2Å resolution. The detailed insight into the binding mechanism enabled us to create a new lead structure containing an additional side chain suitable for fast and simple labeling with fluorine-18, a positron emitting radioisotope. The compound was synthesized and evaluated for its TK substrate properties. Like its predecessors the novel lead molecule exhibits high specificity to viral TKs and good binding affinity while lacking cytotoxicity towards normal and TK-

transfected cells. The crystal structure of the enzyme ligand complex refined to 2.5Å resolution indicated that labeling of one side chain with fluorine-18 still allows phosphorylation of the compound.

In conclusion, γ -irradiation of aqueous organic systems was successfully utilized as a novel source of molecular diversity for drug discovery. Random synthesis and screening of a focussed library of nucleoside analogs led to the identification of two new hits. Optimization of these structures via cocrystallization with the target and subsequent rational design resulted in a novel lead compound for *in vivo* PET imaging of HSV 1 TK gene expression. The combination of library synthesis, screening and rational design perfectly illustrates the suitability of our approach for drug discovery.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Arzneimittelforschung der Gegenwart sieht sich mit der Herausforderung konfrontiert, Leitverbindungen für eine Fülle neuer biologischer Zielstrukturen, die dem ständigen Fortschritt auf dem Gebiet der Molekularbiologie entspringen, zu finden. Neue Technologien für das Massenscreening stehen bereit, um diese aufzugreifen und das rasche Testen von Millionen potentieller Arzneistoffe zu ermöglichen. Im Zuge dieser Entwicklung ist die Herstellung von Substanzbibliotheken mit breiter molekularer Vielfalt zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und somit zum zentralen Problem bei der Entdeckung neuer pharmakologisch wirksamer Stoffe geworden. Obwohl die kombinatorische Chemie eine Vielzahl chemisch unterschiedlicher Verbindungen in Bibliotheken ständig wachsender Grösse generiert, sind ihre Möglichkeiten durch die Verfügbarkeit geeigneter Molekülbausteine und Reaktionen eingeschränkt. Aus diesem Grund sind Bibliotheken der klassischen kombinatorischen Chemie stark auf Verbindungen konzentriert, die leicht zu synthetisieren sind und deshalb einen Mangel an komplexen strukturellen Motiven aufweisen. Da die alternative Quelle molekularer Diversität, die Isolierung von Naturstoffen, keine ausreichende Zahl an neuen Verbindungen hervorbringt, besteht ein dringender Bedarf an innovativen Ansätzen, die zur Synthese einer grossen Zahl neuartiger Substanzen führen.

Das Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit bestand in der Abklärung der Frage, ob γ -Bestrahlung von wässrigen Lösungen bzw. Suspensionen organischer Verbindungen ein geeignetes Mittel zur Herstellung molekular diverser Zufallsbibliotheken darstellt. Die Studie umfasste die chemische Analyse bestrahlter Lösungen unterschiedlicher Chemikalien, das Screening auf Bioaktivität und die rationale Optimierung der sogenannten 'Hits'.

Antrieb der Untersuchungen war unser Bedarf an neuen Substraten der Herpes Simplex Typ 1 Thymidin Kinase (HSV 1 TK). Das Enzym repräsentiert ein typisches Zielobjekt der Arzneistoffforschung und katalysiert die Phosphorylierung von Thymidin (dT) unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) in Anwesenheit von Magnesiumionen. TK ist Bestandteil vielfältiger therapeutischer Anwendungen, in diesem Zusammenhang sei neben ihrer

Rolle in der antiviralen Therapie auf die gentherapeutische Behandlung von Krebs und AIDS, die Kontrollfunktion bei Knochenmarkstransplantationen und AIDS-Impfstoffen und den Einsatz als Reporteragen hingewiesen. HSV 1 TK akzeptiert eine Vielfalt von Substraten, während humane zelluläre TK eine ausgesprochen hohe Substratspezifität aufweist. Dieser Unterschied ist die molekulare Basis für die genannten therapeutischen Ansätze.

Wir entwarfen eine kleine zielgerichtete Bibliothek aus binären Mischungen von sechs Nucleobasen und vier Alkoholen in wässriger Lösung. Diese Molekülbausteine sind nicht nur charakteristische Motive bereits synthetisierter kombinatorischer Bibliotheken und werden allgemein als arzneistoffähnlich angesehen, sondern stellen gleichzeitig Schlüsselemente möglicher TK-Substrate dar. Die Lösungen wurden in einer ^{60}CO -Quelle mit hochdosierter γ -Strahlung behandelt und anschliessend mit Hilfe von Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie analysiert. Dabei wurde im Vergleich zu klassischen kombinatorischen Syntheschemata eine zehnfach höhere Zahl an Additionsprodukten detektiert. Das Verfahren erwies sich als gut reproduzierbar.

Die nicht weiter aufbereiteten bestrahlten Lösungen wurden auf potentielle Substrate der HSV 1 TK gemustert. Dies erfolgte durch indirekte Messung der Enzymaktivität in Form von Adenosindiphosphatbildung während der Inkubation mit TK in Anwesenheit von ATP. Zwei aktive Substanzen wurden identifiziert, isoliert und charakterisiert. Eine der Verbindungen beinhaltet eine neue ungewöhnliche 'Zuckerersatzkomponente'. Isotopenexperimente deckten auf, dass die Substanz durch Verbindung von je zwei Thymin- und Methanolmolekülen unter Ausbildung drei neuer C-C-Verknüpfungen in einer einzigen Reaktion entsteht.

Kinetische Konkurrenzexperimente zeigten, dass beide 'Hits' gute Bindungsaffinität und hohe Spezifität für das virale Enzym aufweisen. *In vitro* Tests offenbarten weder antivirale noch zytotoxische Aktivitäten. Um sicherzustellen, dass die Verbindungen die Zellproliferation nicht beeinträchtigen, etablierten wir einen auf humanen Lungentumorzellen basierenden Assay. Im Gegensatz zu Ganciclovir, einem potenten Virustatikum, hatten auch hohe Konzentrationen unserer Substanzen keine Auswirkung auf das Zellwachstum.

Deshalb entschlossen wir uns, sie als Ausgangspunkt für das rationale Design der Vorstufe eines nicht toxischen Tracers zum *in vivo*-Monitoring von HSV 1 TK Genexpression mittels Positronenemmissions-tomographie zu nutzen.

Die Kristallstrukturen beider Liganden im Komplex mit dem Enzym wurden mit einer Auflösung von 2.2 Å gelöst. Der detaillierte Einblick in den Bindungsmechanismus ermöglichte uns den Entwurf einer neuen Leitstruktur. Diese enthält eine zusätzliche Seitenkette, die der schnellen und einfachen Markierung mit Fluor-18, einem Positronen emittierenden Radioisotop, zugänglich ist. Die Substanz wurde synthetisiert und bezüglich ihrer biologischen Eigenschaften evaluiert. Wie seine Vorläufer zeigt sie hohe Spezifität und gute Affinität zur viralen Kinase, aber keinerlei zytotoxische Wirkung auf normale oder TK-transfizierte Tumorzellen. Die Kristallstruktur des Enzym-Ligand-Komplexes wurde bis zu einer Auflösung von 2.5 Å verfeinert und deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung der Verbindung auch nach der Markierung einer Seitenkette mit Fluor-18 möglich ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die γ -Bestrahlung wässriger Lösungen organischer Moleküle erfolgreich als neuartige Quelle molekularer Vielfalt genutzt werden konnte. Zufallssynthese und Screening einer zielgerichteten Bibliothek von Nukleosidanaloga führte zur Identifizierung zweier 'Hits'. Die Optimierung dieser Strukturen durch Cokristallisation mit dem Protein und nachfolgendes rationales Design resultierte in einer neuen Leitverbindung für das *in situ* PET-Monitoring von HSV 1 TK Genexpression. Die Kombination von Synthese, Screening und rationaler Weiterentwicklung illustriert die Anwendbarkeit unserer Methode im Rahmen der Wirkstoffsuche auf eindrucksvolle Weise.