

# Identifizierung von Pyrrolopyrazinen als polypotente Liganden mit Antimalariawirkung\*\*

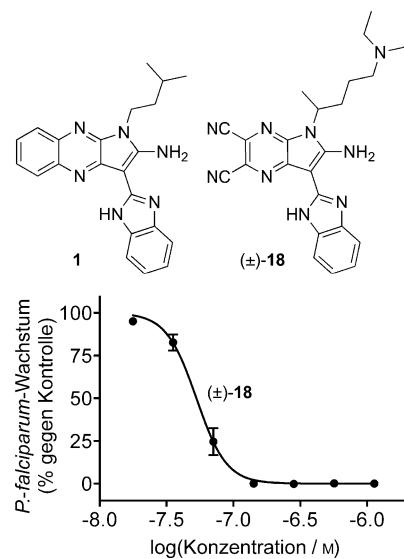
Daniel Reker, Michael Seet, Max Pillong, Christian P. Koch, Petra Schneider, Matthias C. Witschel, Matthias Rottmann, Céline Freymond, Reto Brun, Bernd Schweizer, Boris Illarionov, Adelbert Bacher, Markus Fischer, François Diederich und Gisbert Schneider\*

**Abstract:** Pyrrolopyrazine wurden als potente Multi-Target-Antimalaria-Wirkstoffe identifiziert. Die wirksamsten Substanzen haben EC<sub>50</sub>-Werte im niedrigen nanomolaren Bereich gegen *Plasmodium falciparum* im erythrozytischen Stadium und *Plasmodium-bergei*-Leberschizonten bei vernachlässigbarer HepG2-Zytotoxizität. Der Wirkungsmechanismus wurde mit Computerverfahren zur Vorhersage möglicher makromolekularer Targets aufgedeckt. So konnte eine funktionelle Ähnlichkeit zwischen Bindetaschen in nicht homologen Proteinen erkannt und die beobachtete antiparasitäre Aktivität mit der Inhibition von IspD und der von mehreren Kinasen verknüpft werden. Essentielle *P. falciparum*-Kinasen wurden als mögliche Targets der neuen Leitstrukturen identifiziert. Die Ergebnisse bestätigen unser Konzept der liganden- und strukturgestützten Target-Vorhersage, erweitern die bioinformatische Methodik zur Proteomanalyse und eröffnen Möglichkeiten zur Entschlüsselung polypharmakologischer Effekte bioaktiver chemischer Wirkstoffe.

Malaria ist eine der großen Bedrohungen der öffentlichen Gesundheit, und die zunehmende Verbreitung von Resistenzen gegen Antimalaria-Wirkstoffe unterstreicht die Notwendigkeit, Medikamente mit innovativen Wirkmechanismen zu entwickeln.<sup>[1–3]</sup> Wir berichten hier über die Identifizierung neuer Antimalaria-Wirkstoffe mit nanomolarer Wachstumshemmung von *Plasmodium falciparum* und demonstrieren den effektiven Einsatz von Computerverfahren zur Entschlüsselung des zugrunde liegenden Wirkmechanismus. Mithilfe von sequenz- und strukturbasierten bioinformatischen Methoden haben wir zuerst menschliche Protein-Targets identifiziert, um anschließend die vermutlichen *P. falciparum*-Targets durch die Identifizierung orthologer Proteine zu bestimmen und experimentell zu überprüfen.<sup>[4–7]</sup>

Ursprünglich wurde das Pyrrolochinolin **1** (Abbildung 1) in einem Hochdurchsatz-Screening bei der BASF entdeckt. Dieses Screening zielte darauf ab, neue niedermolekulare Inhibitoren des Herbizid-Targets 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritolsynthase (IspD) von *Arabidopsis thaliana* zu finden.<sup>[8,9]</sup> Eine große Zahl an Derivaten wurde synthetisiert und getestet, aber keine der nachfolgenden Verbindungen inhibierte *Arabidopsis-thaliana*-IspD mit IC<sub>50</sub>-Werten im submikromolaren Bereich. Dennoch entschieden wir uns, die moderate Aktivität der Treffer für eine mögliche

Ursprünglich wurde das Pyrrolochinolin **1** (Abbildung 1) in einem Hochdurchsatz-Screening bei der BASF entdeckt. Dieses Screening zielte darauf ab, neue niedermolekulare Inhibitoren des Herbizid-Targets 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritolsynthase (IspD) von *Arabidopsis thaliana* zu finden.<sup>[8,9]</sup> Eine große Zahl an Derivaten wurde synthetisiert und getestet, aber keine der nachfolgenden Verbindungen inhibierte *Arabidopsis-thaliana*-IspD mit IC<sub>50</sub>-Werten im submikromolaren Bereich. Dennoch entschieden wir uns, die moderate Aktivität der Treffer für eine mögliche



**Abbildung 1.** Strukturen der Referenzverbindung **1** ( $IC_{50}(A. thaliana\text{-}IspD) = 1.6 \mu\text{M}$ ) und der Leitstruktur **(±)-18** sowie die konzentrationsabhängige Wachstumshemmung von Parasiten des resistenten *P. falciparum*-Stamms NF54 durch **(±)-18**; ungehemmtes Parasitenwachstum fungierte als Kontrolle (= 100%);  $n = 4$  (aus zwei unabhängigen Experimenten mit je zwei technischen Replikaten). Die aufgetragenen Werte sind arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (standard error of the mean, SEM).

[\*] D. Reker,<sup>[+]</sup> Dr. M. Seet,<sup>[+]</sup> M. Pillong, Dr. C. P. Koch, Dr. P. Schneider, Dr. B. Schweizer, Prof. Dr. F. Diederich, Prof. Dr. G. Schneider  
Departement Chemie und Angewandte Biowissenschaften  
ETH Zürich, Vladimir-Prelog-Weg 3-4, 8093 Zürich (Schweiz)  
E-Mail: gisbert.schneider@pharma.ethz.ch

Dr. M. C. Witschel  
BASF SE, Boschstraße 14, 67056 Ludwigshafen (Deutschland)

Dr. M. Rottmann, C. Freymond, Prof. Dr. R. Brun  
Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut  
Socinstrasse 57, 4051 Basel (Schweiz)  
und

Universität Basel, Petersplatz 1, 4003 Basel (Schweiz)

Dr. B. Illarionov, Prof. Dr. A. Bacher, Prof. Dr. M. Fischer  
Universität Hamburg, Hamburg School of Food Science  
Institut für Lebensmittelchemie  
Grindelallee 117, 20146 Hamburg (Deutschland)

Dr. P. Schneider, Prof. Dr. G. Schneider  
inSili.com GmbH, Segantiniweg 3, 8049 Zürich (Schweiz)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[\*\*] Wir danken Dr. Case McNamara für Unterstützung und Diskussion sowie Dr. Michael D. Wörle für die Röntgenstrukturanalyse. Diese Arbeit wurde durch den ETH Forschungsrat, F. Hoffmann-La Roche Ltd (Basel), BASF SE (Ludwigshafen) und die OPO Stiftung Zürich finanziert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201311162> zu finden.

Antimalaria-Anwendung zu nutzen, da IspD auch für das Überleben von *Plasmodium* spp. essentiell ist.<sup>[10]</sup> Pflanzen und Apicomplexa können Isoprenoide mithilfe des Methylerythritolphosphatwegs anstelle des klassischen Mevalonatwegs synthetisieren. IspD ist daher ein interessantes Antimalaria-Target, da es ein essentielles Enzym ist und es kein Homologes im Menschen gibt.

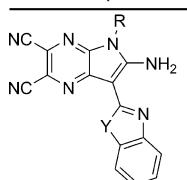
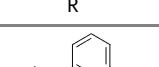
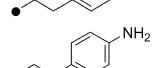
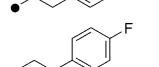
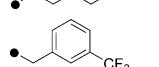
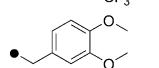
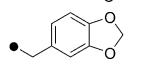
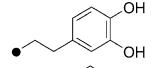
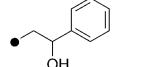
Mangels der Verfügbarkeit eines direkten Inhibierungstests für *Plasmodium*-IspD testeten wir Verbindung **1** in einem phänotypischen Erythrozyten-Assay gegen den resistenten *P.falciparum*-Stamm NF54. Wir beobachteten die nahezu vollständige Inhibition (>99%) des parasitären Wachstums bei einer Wirkstoffkonzentration von  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , die einem EC<sub>50</sub>-Wert von ungefähr 200 nM entspricht. Die weitere chemische Optimierung des ursprünglichen Treffers führte zu einer verbesserten Wachstumshemmung, wenn das Chinoxalingerüst durch ein Dicyanpyrazin ersetzt wurde. Insgesamt wurden 32 Derivate synthetisiert. Die Ergebnisse für die Verbindungen **2**–**33** offenbaren deren beachtliches Potenzial als Antimalaria-Wirkstoffe (Tabelle 1). Die Synthese aller Derivate folgte einem zweistufigen Verfahren (Schema 1). Das kommerziell verfügbare Pyrazinderivat **34** wurde durch die Acetonitrilderivate **35**–**37** substituiert, um **38**–**40** herzustellen. Die Bildung des Pyrrolrings erfolgte dabei durch Reaktion mit einem primären Amin unter basischen Bedingungen.<sup>[11,12]</sup>

Im zellbasierten Assay erwiesen sich alle Pyrrolopyrazine als stark aktiv gegen *P.falciparum*, mit EC<sub>50</sub>-Werten im niedrigen nanomolaren Bereich. Die Zytotoxizität der Verbindungen wurde anhand von myogenen Rattenzellen (L6) als Säugetiermodellsystem bestimmt. Wir definierten einen Selektivitätsindex (SI) als den Quotienten der gemessenen EC<sub>50</sub>-Werte in L6-Zellen und in *Plasmodium*. Generell beobachteten wir niedrige Zytotoxizität bei akzeptabler Aktivität gegen *Plasmodium* für die Verbindungen mit aromatischen Seitenketten, während Derivate mit basischen Seitenketten am aktivsten waren. Die Pyrrolopyrazine ( $\pm$ )-**18** und ( $\pm$ )-**20** zeigten starke antiplasmidale Aktivität mit EC<sub>50</sub>-Werten im zweistelligen nanomolaren Bereich (Tabelle 1). Die ausgewählte Leitstruktur ( $\pm$ )-**18** (*P.falciparum*-NF54-EC<sub>50</sub>=53 nM;  $\Delta p\text{EC}_{50}=0.02$  log-Einheiten; Abbildung 1) enthält eine zu Chloroquin ähnliche Seitenkette, hat eine angemessene Selektivität (SI=40) und bemerkenswerte lipophile Ligandeneffizienz<sup>[13,14]</sup> (LLE=4.0). Wir haben diese Leitverbindung auch gegen *P.falciparum* des Chloroquin-resistenten K1-Stamms getestet und einen EC<sub>50</sub>-Wert von 40 nM ( $\Delta p\text{EC}_{50}=0.75$  log-Einheiten) gemessen. Die Substanz zeigte auch starke Aktivität gegen *P.berghei*-Leberschizonten (EC<sub>50</sub>= $0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) und wies keine Zytotoxizität gegenüber HepG2-Zellen in einem Zeitrahmen von 48 h auf.

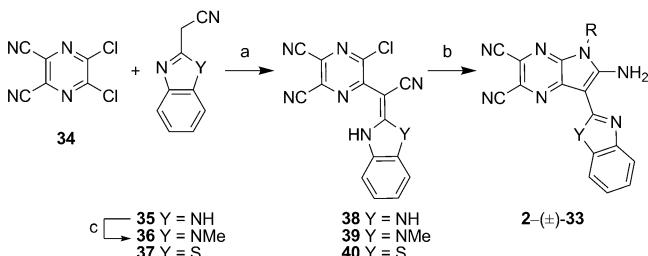
**Tabelle 1:** Struktur, Antimalaria-Aktivität (NF54-Stamm) und Zytotoxizität (L6-Zellen) der Pyrrolopyrazine **2**–( $\pm$ )-**33**. SI: Selektivitätsindex, LLE: lipophile Ligandeneffizienz.

	R	Y	EC <sub>50</sub> [μM] (NF54)	EC <sub>50</sub> [μM] (L6)	SI	LLE
<b>2</b>		NH	0.25	85	348	3.5
<b>3</b>		NH	0.28	3	11	5.3
<b>4</b>		NH	>100	>100	n.a.	n.a.
<b>5</b>		NH	0.29	4	13	3.6
<b>6</b>		NH	0.16	174	1093	3.6
<b>7</b>		NMe	4.80	188	39	1.7
<b>8</b>		NH	0.25	148	591	3.7
<b>9</b>		NH	1.27	187	148	3.1
<b>10</b>		NH	0.26	141	625	3.1
<b>11</b>		NH	0.41	80	198	3.0
<b>12</b>		NH	0.28	143	519	2.7
<b>13</b>		NH	0.19	52	273	2.9
<b>14</b>		NH	0.22	40	182	2.8
<b>15</b>		NH	0.14	6	42	5.6
<b>16</b>		NH	0.10	1	14	5.3
<b>17</b>		NH	0.09	1	11	4.7
( $\pm$ )- <b>18</b>		NH	0.05	2	40	4.0
( $\pm$ )- <b>19</b>		NMe	0.34	12	37	2.8
( $\pm$ )- <b>20</b>		S	0.04	9	210	3.2
<b>21</b>		NH	0.30	>100	>820	5.0
<b>22</b>		S	0.59	18	30	3.8
<b>23</b>		NH	0.12	4	34	6.0
<b>24</b>		NH	0.74	81	109	3.1
<b>25</b>		NH	0.36	42	116	3.3

Tabelle 1: (Fortsetzung)

		R	Y	EC <sub>50</sub> [μM] (NF54)	EC <sub>50</sub> [μM] (L6)	SI	LLE
26			NH	0.28	55	194	3.3
27			NH	0.53	158	301	3.7
28			NH	0.32	129	401	3.1
29			NH	0.18	13	72	2.6
30			NH	1.98	100	51	2.9
31			NH	0.32	53	158	3.6
32			NH	5.23	22	4	2.6
(±)-33			NH	0.44	16	36	3.8

bekannten Targets der Trainingsmoleküle mit gleicher Clusterzugehörigkeit statistisch bestimmt. Diesen Ansatz haben wir bereits in früheren Studien validiert, um sowohl neue Targets für alte Medikamente<sup>[21,22]</sup> als auch Targets für Verbindungen aus kombinatorischen Bibliotheken zu identifizieren.<sup>[23]</sup> Eine statistische Analyse von Substanzähnlichkeiten wurde dabei verwendet, um relevante Ähnlichkeiten zwischen (±)-18 und den weiteren Molekülen des Clusters zu erkennen und die Vorhersagen bezüglich ihrer Fehlerwahrscheinlichkeit einzustufen.<sup>[20]</sup> Retrospektive Studien zeigten, dass dieses Bewertungsschema außergewöhnlich leistungsfähig ist, um richtige Vorhersagen zu treffen. Dies ist in der durchschnittlichen ROC AUC (receiver-operator characteristic area-under-the-curve)<sup>[24]</sup> von  $0.78 \pm 0.14$ , die in einer zehnfachen Kreuzvalidierungsstudie für 212 Target-Familien gemessen wurde, ersichtlich (Tabelle S13 der Hintergrundinformationen). Die Berechnung von Hintergrundwahrscheinlichkeiten ermöglichte uns die Bestimmung konservativer *p*-Werte.<sup>[25]</sup> Die Target-Vorhersagen für (±)-18 mit *p* < 0.1 (Fehlerwahrscheinlichkeit < 10 %) sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Vorhersage favorisiert eindeutig Kinasen als potenzielle Targets. Dieses Ergebnis ist im Einklang



**Schema 1.** Allgemeine Synthesestrategie. a) DMF, 40°C, 3–4 h; b) RNH<sub>2</sub>, NEt<sub>3</sub>, DMF, 50–70°C, 2–23 h; c) Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 40°C, 10 h.

Die beobachtete Diskrepanz zwischen der erwarteten Aktivität der Verbindungen im niedrigen mikromolaren Bereich, abgeleitet von der Aktivität gegen *A.-thaliana*-IspD, und den gemessenen niedrigen nanomolaren EC<sub>50</sub>-Werten gegen *Plasmodium* lässt auf einen anderen oder zusätzlichen Wirkungsmechanismus schließen. Zur Identifizierung weiterer makromolekularer Targets nutzten wir daher eine computerbasierte Target-Vorhersage für unsere Leitstruktur (±)-18. Dafür verwendeten wir eine selbstorganisierende Karte (Kohonen-Netz, SOM),<sup>[15]</sup> die mithilfe von 11827 diversen Wirkstoffen und Leitstrukturen trainiert wurde. Diese Trainingsdaten sind mit ihren bekannten Bioaktivitäten für insgesamt 673 makromolekulare Strukturen aus 212 Target- und Aktivitätsfamilien beschrieben.<sup>[16–18]</sup> Die SOM gruppiert Moleküle bezüglich ihrer pharmakophoren Eigenschaften in so genannte „Cluster“ mit funktionell ähnlichen Verbindungen.<sup>[19,20]</sup> (±)-18 wurde ebenfalls auf diese Karte projiziert, und seine möglichen Targets wurden unter Zuhilfenahme der

**Tabelle 2:** Hochrangige (*p*-Wert < 10 %) vorhergesagte Targets und Target-Klassen für (±)-18.

Rang	vorhergesagtes Target	<i>p</i> -Wert [%]
1	Thrombin-Rezeptor	7.2
2	Serin/Threonin-Kinase	8.7
3	Adenosinkinase	9.1
4	Tyrosinkinase	9.6
5	Wachstumshormon-Releasing-Peptid-Rezeptor	9.7
6	DNA-Topoisomerase	9.9

mit einer Studie von Volovenko und Mitarbeitern,<sup>[26]</sup> die auf der Grundlage eines antiproliferativen Effekts von Pyrrolopyrazinen deren Bindung an die Hinge-Region mehrerer Kinasen postulierten.

Um die vorhergesagte Kinasehemmung biochemisch zu überprüfen, untersuchten wir (±)-18 sowie die ausgewählten Analoga 6, 8 und 16 zunächst in einem humanen Kinase-Panel (Cerep Express Diversity Kinase Profile; Tabelle 3). (±)-18 hemmte die Aktivität von 21 der 48 getesteten Kinasen bei einer Konzentration von 10 μM um mehr als 50 %. Das basische Derivat 16 zeigte einen leicht schwächeren Gesamteffekt (17/48), und die Pyrrolopyrazine 6 und 8, mit aromatischen Seitenketten und schwächerer antiplasmoidal Aktivität, zeigten keine Kinasehemmung. IC<sub>50</sub>-Werte wurden für (±)-18 gegen die vier am stärksten gehemmten Kinasen (mit ≥ 99 % Wirksamkeit) bestimmt. Einstellig mikromolare Werte bestätigen die Target-Vorhersage, besonders für die Insulin-Rezeptor-Tyrosinkinase (IRK): 2.5 μM, Serin/Threonin-Kinase RAF-1: 2.3 μM, Tyrosinkinase Src: 2.3 μM und die

**Tabelle 3:** Hemmung von humanen Kinasen durch die Pyrrolopyrazine **6**, **8**, **16** und  $(\pm)$ -**18** in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  ( $n=2$ ). Aufgelistet sind diejenigen Kinasen, für die mindestens 50% Hemmung beobachtet wurde (Interf.: Interferenz mit dem Assay).

Kinase	Verbindung			
	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	$(\pm)$ - <b>18</b>
Abl	—	—	78	—
Akt1/PKB $\alpha$	—	Interf.	92	74
CDK2	—	—	76	—
CHK1	—	—	71	—
CHK2	—	—	—	91
CK1 $\alpha$	—	—	97	73
c-Met	—	Interf.	82	88
EGFR	—	—	—	88
EphA2	—	—	91	—
FGFR2	—	—	77	95
FGFR3	—	—	—	70
IKK $\alpha$	—	—	80	94
IRK (InsR)	—	—	81	99
JAK3	—	—	77	Interf.
Lck-Kinase	—	—	—	78
MKK6	—	—	—	88
MNK2	—	Interf.	—	92
MST4	—	—	80	92
Pim2	—	Interf.	78	96
PKA	—	—	—	83
PKC $\beta$ 2	—	—	59	95
RAF-1	—	—	—	100
SGK1	—	—	84	91
SIK	—	—	—	91
Src	—	—	95	99
TrkA	—	—	98	99

Tropomyosin-Rezeptor-Kinase TrkA:  $1.0 \mu\text{M}$  (SEM < 1 log-Einheit für alle  $\text{IC}_{50}$ -Werte; Abbildung 2 A). Diese biochemischen Befunde bestätigen die Vorhersage, dass Pyrrolopyrazine potente Kinasehemmer sein können und stützen unsere Arbeitshypothese, dass die beobachtete antiplasmatische Aktivität von  $(\pm)$ -**18** zumindest teilweise durch Multi-target-Effekte erklärt werden kann.

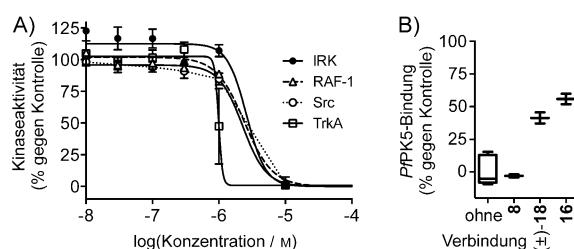
Die gemessene Hemmung von humanen Kinasen bietet jedoch nur eine indirekte Erklärung für die beobachtete Antimalaria-Aktivität, da keine *Plasmodium*-Homologen der gehemmten Kinasen beschrieben sind. Andererseits kann die kinasehemmende Eigenschaft eine mögliche Erklärung für die beobachtete Zytotoxizität ( $\text{EC}_{50}=2 \mu\text{M}$  für  $(\pm)$ -**18**; Ta-

belle 1) sein, da myogene Rattenzellen Homologe mit mehr als 90% Sequenzidentität zu den gehemmten Kinasen exprimieren und wir eine niedrigere Zytotoxizität für ausgewählte Derivate ohne messbare Kinasehemmung beobachten.

Zur Entschlüsselung der möglichen *P.falciparum*-Target-Kinasen führten wir zuerst eine umfassende sequenzbasierte Suche durch (Tabelle S14 der Hintergrundinformationen). Dafür nutzten wir das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST),<sup>[27]</sup> um lokale Alignments zwischen den vollständigen Aminosäuresequenzen der vier am stärksten gehemmten humanen Kinasen (IRK, RAF-1, Src, TrkA) und allen plasmatischen Proteinen für die *P.falciparum*-Stämme 37D und IT aus der PlasmoDB-Datenbank (v9.3) zu erstellen. Wir konzentrierten uns dabei auf lokale Sequenzmotive in *Plasmodium*-Proteinen, die von allen vier genutzten humanen Kinasen gefunden wurden, um so potenziell eine gemeinsame Bindetasche zu identifizieren. Dieser Konsensus-Ansatz lieferte insgesamt 36 Subsequenzen aus 30 *Plasmodium*-Proteinen mit statistisch signifikanten maximalen Erwartungswerten (E-Wert: die Zahl der Treffer, die man zufällig erwarten würde)  $< 10^{-5}$  in allen vier Suchanfragen. Bemerkenswerterweise gehört die Hälfte dieser Treffer zu Kinasefamilien, die in Gen-Knockout-Studien als essentiell für den Parasiten entdeckt und als Targets für innovative Antimalaria-Therapien vorgeschlagen wurden, z. B. NimA („never in mitosis“ A) sowie verschiedene Calcium- und Cyclin-abhängige Kinasen.<sup>[28]</sup>

Als eine konsequente Erweiterung dieser sequenzbasierten Analyse führten wir eine strukturbasierte Suche nach übereinstimmenden Bindetaschen durch. Da wir eine Hemmung von mehreren Kinasen beobachtet hatten, konzentrierten wir uns auf die Nukleotidbindetasche der vier humanen Kinasen, die von  $(\pm)$ -**18** komplett gehemmt wurden (PDB-IDs:<sup>[29]</sup> 3omv für RAF-1, 4aoj für TrkA, 4ibm für IRK, 2src für Src). Diese verglichen wir mit allen sieben *P.falciparum*-Kinasen, für die Röntgenstrukturen in der Protein Data Bank (PDB) verfügbar waren (PDB-IDs: 1ltk, 1v0p, 1z6g, 2w41, 2wwf, 2yog, 3q5i). Die Software PoLiMorph<sup>[30]</sup> vergleicht die Form und Eigenschaften von Kavitäten in Proteinoberflächen, indem sie ihre Volumina durch verzweigte dreidimensionale Graphen („pocket graphs“) darstellt und Knoten in den Graphen hinsichtlich lokaler Wasserstoffbrücken, hydrophober und elektrostatischer Potentiale wie auch nach ihrer Oberflächenzugänglichkeit einfärbt. Die Graphen werden anschließend mithilfe eines deterministischen Algorithmus verglichen, um paarweise Ähnlichkeiten zu erhalten.<sup>[31]</sup> Signifikante Taschenähnlichkeit wurde für *PfPK5*<sup>[32]</sup> mit den humanen RAF-1-, TrkA- und IRK-Kinasen beobachtet. Anschließend verglichen wir *PfPK5* mit seinem humanen Homologen CDK2 in der Cyclin-aktivierten (PDB-ID: 1fin) und inaktiven (PDB-ID: 4fko) Form (Abbildung S3 der Hintergrundinformationen). Beide Vergleiche zeigten signifikante Ähnlichkeiten zwischen den Taschen auf, und beide CDK2-Taschen haben vergleichbare Ähnlichkeiten zu den anderen ausgewählten humanen Kinasen (Tabelle S15 der Hintergrundinformationen).

Aufgrund der berechneten Taschenähnlichkeit, der Identifizierung von *PfPK5* auch in der sequenzbasierten Suche



**Abbildung 2.** A) Konzentrationsabhängige Hemmung von humanen Kinasen durch  $(\pm)$ -**18** ( $n=2$ ); positive Kontrolle: Staurosporin. B) qPCR-Signal von DNA-markierter *P.falciparum*-Proteinkinase 5 (*PfPK5*) nach Hinzufügen von  $30 \mu\text{M}$  der Testverbindung ( $n=2$  technische Replikate), um den immobilisierten Referenzliganden zu verdrängen. Die Werte sind arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

und der moderaten Hemmung von **16** und ( $\pm$ )-**18** (76 bzw. 26% Hemmung bei 10  $\mu\text{M}$ ,  $n = 2$ ) gegen die human-homologe CDK2-Kinase entschieden wir uns dazu, ( $\pm$ )-**18**, **8** und **16** in einer kompetitiven Bindungsstudie auf die Bindung an *PfPK5* zu testen. Sowohl **16** als auch ( $\pm$ )-**18** zeigten eine moderate, aber signifikante Bindung an *PfPK5* bei einer Testkonzentration von 30  $\mu\text{M}$ , während für die negative Kontrolle **8** kein Effekt beobachtet wurde. Bemerkenswerterweise hatte keine der drei Verbindungen einen Effekt auf *PfCDPK1* als Kontrolle (nicht gezeigt). Dieser Befund bestätigt unsere computerbasierte Target-Vorhersage und spricht für das Binden unserer Leitstruktur im aktiven Zentrum von *PfPK5*. Wir betonen, dass die vorläufigen Bindungsdaten die Relevanz von *PfPK5*-Hemmung durch ( $\pm$ )-**18** *in vivo* nicht eindeutig belegen. Durch eine Quantifizierung der Histon-H1-Phosphorylierung in Parasiten sowie mithilfe von In-vitro-Evolutionsstudien können vermutlich weitere Hinweise gewonnen werden.<sup>[33]</sup>

Das anfänglich im Hochdurchsatz-Screen gefundene Pyrrolopyrazin zeigte bemerkenswerte Antimalaria-Aktivität. Die Optimierung der zellbasierten Aktivität führte zur Leitstruktur ( $\pm$ )-**18** mit Aktivität im niedrigen nanomolaren Bereich. Modernste liganden-, sequenz- und strukturbasierte Rechnermethoden wurden eingesetzt, um schlussendlich essentielle plasmodiale Kininasen als mögliche Targets dieser Molekülklasse zu identifizieren. Tatsächlich wurde Multitarget-Hemmung als ein resistenzrobuster Wirkmechanismus für Antimalaria-Wirkstoffe empfohlen,<sup>[34]</sup> und die hier identifizierte Kinase *PfPK5* wurde zuvor als Kandidat für effiziente Multitarget-Wirkstoffe vorgeschlagen. Unsere Studie zeigt auf, dass die auf chemischen Strukturen beruhende Target-Identifizierung sowohl biochemische Proteomanalysen als auch die chemische Genetik ergänzen und inspirieren kann. Die Vorhersagemethode erfasst subtile funktionale Beziehungen zwischen Ligandenklassen und bietet damit einen ergänzenden Ansatz und eine neue Sichtweise auf Ligand-Target-Zusammenhänge.

## Experimentelles

Ligandenbasierte Target-Vorhersage: Bioaktive Referenzstrukturen (Collection of Bioactive Reference Compounds, COBRA v.11.10)<sup>[16]</sup> und die Leitstruktur ( $\pm$ )-**18** wurden vorverarbeitet mithilfe der „wash“-Funktion der „Molecular Operating Environment“ (MOE 2011.10)-Software,<sup>[35]</sup> mit den Optionen „disconnect salts“, „remove ion pairs“, „deprotonate strong acids“, „remove minor components“, „protonate strong bases“ und „add hydrogen“. Die Moleküle wurden danach als topologische Pharmakophormuster dargestellt („CATS2“-Deskriptor) und mithilfe einer SOM gruppiert, wie zuvor beschrieben.<sup>[17,20]</sup> Eine Computeranalyse berechnete die Ähnlichkeiten der Medikamente zu ( $\pm$ )-**18 bezüglich ihrer pharmakophoren Eigenschaften und transformierte diese in Falsch-Positiv-Wahrscheinlichkeiten mithilfe der paarweisen Ähnlichkeiten zwischen Molekülen der COBRA-Datenbank, die mit unterschiedlichen Targets annotiert sind. Die Berechnung von durchschnittlichen Falsch-Positiv-Wahrscheinlichkeiten lieferte eine Bewertung der Vorhersagen bezüglich der Konfidenz. Details sind in Lit. [22] beschrieben.**

Kinaseassays: In-vitro-Experimente für humane Kininasen wurden von Cerep im Auftrag durchgeführt (86600 Celle l'Evescault, Frankreich; <http://www.cerep.fr>). Kompetitive Bindungsstudien für

selektierte Verbindungen mit *PfPK5* (KINOMEscan-Assays) wurden von DiscoverX im Auftrag durchgeführt (San Diego, CA, USA; <http://www.discoverx.com>).

Eingegangen am 23. Dezember 2013,  
veränderte Fassung am 6. März 2014  
Online veröffentlicht am 4. Juni 2014

**Stichwörter:** Computerchemie · Isoprenoidsynthase · Kinasen · Medizinische Chemie · Target-Vorhersage

- [1] WHO World Malaria Report **2012**, [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/).
- [2] a) C. J. Murray, L. C. Rosenfeld, S. S. Lim, K. G. Andrews, K. J. Foreman, D. Haring, N. Fullman, M. Naghavi, R. Lozano, A. D. Lopez, *Lancet* **2012**, *379*, 413–431; b) B. Greenwood, T. Mutabingwa, *Nature* **2002**, *415*, 670–672; c) J. Sachs, P. Malaney, *Nature* **2002**, *415*, 680–685.
- [3] M. Bassetti, M. Merelli, C. Temperoni, A. Astilean, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2013**, *12*, 22.
- [4] D. Plouffe, A. Brinker, C. McNamara, K. Henson, N. Kato, K. Kuhne, A. Nagle, F. Adrián, J. T. Matzen, P. Anderson, T. Nam, N. S. Gray, A. Chatterjee, J. Janes, S. F. Yan, R. Trager, J. S. Caldwell, P. G. Schultz, Y. Zhou, E. A. Winzeler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9059–9064.
- [5] K. Jensen, D. Plichta, G. Panagiotou, I. Kouskoumvekaki, *Mol. BioSyst.* **2012**, *8*, 1678–1685.
- [6] F.-J. Gamo, L. M. Sanz, J. Vidal, C. Cozar, E. Alvarez, J.-L. Lavandera, D. E. Vanderwall, D. V. S. Green, V. Kumar, S. Hasan, J. R. Brown, C. E. Peishoff, L. R. Cardon, J. F. Garcia-Bustos, *Nature* **2010**, *465*, 305–310.
- [7] A. Spitzmüller, J. Mestres, *PLoS Comput. Biol.* **2013**, *9*, e1003257.
- [8] V. Illarionova, J. Kaiser, E. Ostrozhenskova, A. Bacher, M. Fischer, W. Eisenreich, F. Rohdich, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8824–8834.
- [9] A. Bacher, M. H. Zenk, W. Eisenreich, F. Fellermeier, M. Fischer, S. Hecht, S. Herz, K. Kis, H. Lüttgen, F. Rohdich, S. Sagner, C. A. Schuhr, J. Wungsintawekul, WO 2001011055, 2001.
- [10] a) M. J. Gardner, N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson, S. Bowman, I. T. Paulsen, K. James, J. A. Eisen, K. Rutherford, S. L. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M.-S. Chan, V. Nene, S. J. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Pertea, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M. W. Mather, A. B. Vaidya, D. M. A. Martin, A. H. Fairlamb, M. J. Fraunholz, D. S. Roos, S. A. Ralph, G. I. McFadden, L. M. Cummings, G. M. Subramanian, C. Mungall, J. C. Venter, D. J. Carucci, S. L. Hoffman, C. Newbold, R. W. Davis, C. M. Fraser, B. Barrell, *Nature* **2002**, *419*, 498–511; b) W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 1401–1426; c) M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565–574; d) M. Witschel, M. Rottmann, M. Kaiser, R. Brun, *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1805.
- [11] Y. M. Volovenko, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1998**, *34*, 171–173.
- [12] Y. M. Volovenko, G. G. Dubinina, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1999**, *9*, 1089–1095.
- [13] G. M. Keserü, G. M. Makara, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 203–212.
- [14] M. M. Hann, G. M. Keserü, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, *11*, 355–365.
- [15] T. Kohonen, *Biol. Cybern.* **1982**, *43*, 59–69.
- [16] P. Schneider, G. Schneider, *QSAR Comb. Sci.* **2003**, *22*, 713–718.
- [17] P. Schneider, Y. Tanrikulu, G. Schneider, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 258–266.

- [18] G. Schneider, Y. Tanrikulu, P. Schneider, *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 213–218.
- [19] G. Schneider, W. Neidhart, T. Giller, G. Schmid, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3068–3070; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2894–2896.
- [20] M. Reutlinger, C. P. Koch, D. Reker, N. Todoroff, P. Schneider, T. Rodrigues, G. Schneider, *Mol. Inf.* **2013**, *32*, 133–138.
- [21] a) R. Steri, P. Schneider, A. Klenner, M. Rupp, M. Schubert-Zsilavecz, G. Schneider, *Mol. Inf.* **2013**, *29*, 287–292; b) J. Lötsch, G. Schneider, D. Reker, M. J. Parnham, P. Schneider, G. Geisslinger, A. Doehring, *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 742–753.
- [22] D. Reker, T. Rodrigues, P. Schneider, G. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 4067–4072.
- [23] S. Renner, M. Hechenberger, T. Noeske, A. Böcker, C. Jatzke, M. Schmuker, C. G. Parsons, T. Weil, G. Schneider, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5432–5435; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5336–5339.
- [24] T. A. Alonzo, M. S. Pepe, *Methods Mol. Biol.* **2007**, *404*, 89–116.
- [25] P. Baldi, R. Nasr, *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 1205–1222.
- [26] G. G. Dubinina, M. O. Platonov, S. M. Golovach, P. O. Borysko, A. O. Tolmachov, Y. M. Volovenko, *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 727–737.
- [27] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410.
- [28] L. Solyakov, J. Halbert, M. M. Alam, J.-P. Semblat, D. Dorin-Semblat, L. Reininger, A. R. Bottrill, S. Mistry, A. Abdi, C. Fennell, Z. Holland, C. Demarta, Y. Bouza, A. Sicard, M.-P. Nivez, S. Eschenlauer, T. Lama, D. C. Thomas, P. Sharma, S. Agarwal, S. Kern, G. Pradel, M. Graciotti, A. B. Tobin, C. Doerig, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 565.
- [29] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
- [30] F. Reisen, M. Weisel, J. M. Krieg, G. Schneider, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 6498–6510.
- [31] M. Weisel, J. M. Krieg, G. Schneider, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 556–563.
- [32] L. S. Brinen, T. J. Stout, *Structure* **2003**, *11*, 1309–1310.
- [33] a) K. Le Roch, C. Sestier, D. Dorin, N. Waters, B. Kappes, D. Chakrabarti, L. Meijer, C. Doerig, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8952–8958; b) C. W. McNamara, M. C. Lee, C. S. Lim, S. H. Lim, J. Roland, A. Nagle, O. Simon, B. K. Yeung, A. K. Chatterjee, S. L. McCormack, M. J. Manary, A. M. Zeeman, K. J. Dechering, T. R. Kumar, P. P. Henrich, K. Gagaring, M. Ibanez, N. Kato, K. L. Kuhen, C. Fischli, M. Rottmann, D. M. Plouffe, B. Bursulaya, S. Meister, L. Rameh, J. Trappe, D. Haasen, M. Timmerman, R. W. Sauerwein, R. Suwanarusk, B. Russell, L. Renia, F. Nosten, D. C. Tully, C. H. Kocken, R. J. Glynne, C. Bodenreider, D. A. Fidock, T. T. Diagana, E. A. Winzeler, *Nature* **2013**, *504*, 248–253.
- [34] C. Doerig, O. Billker, T. Haystead, P. Sharma, A. B. Tobin, N. C. Waters, *Trends Parasitol.* **2008**, *24*, 570–577.
- [35] MOE, The Chemical Computing Group Inc, Montreal, Canada, v2011, **2013**.