



Doctoral Thesis

**Resorcylic lactone L-783277 as a new lead structure for kinase inhibition
total synthesis and SAR studies**

Author(s):

Hofmann, Tatjana

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005826434> →

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. 18336

**Resorcylic Lactone L-783277 as a New Lead
Structure for Kinase Inhibition –
Total Synthesis and SAR Studies**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

For the degree of
Doctor of Sciences ETH Zurich

Presented by
Tatjana Hofmann

Dipl. Chem. Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Born March 29, 1978
Citizen of the Federal Republic of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, examiner
Prof. Dr. P. August Schubiger, co-examiner

Zurich, 2009

Abstract

The inhibition of disease-relevant kinases leads to interference with cellular signaling pathways or cell cycle progression and represents a new paradigm in modern drug discovery. In particular, several kinase inhibitors have been successfully developed in recent years for the clinical treatment of different types of cancers. While most of these agents are low-molecular-weight synthetic molecules based on different types of heteroaromatic or urea scaffolds, a number of naturally occurring resorcylic acid lactones (RALs) have recently emerged as alternative new lead structures for kinase inhibition. Most of the members of this family of natural products exhibit a *cis*-enone moiety as part of their macrolactone ring. A 1,4-addition of an active site cysteine residue to the β -carbon of the α,β -unsaturated carbonyl system is responsible for the high potency kinase inhibition of these compounds. One of the most potent representatives is L-783277 (**6**) which is depicted in Fig. 1.

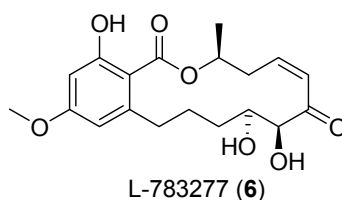


Figure 1. Resorcylic lactone L-783277 (**6**).

Total syntheses have been successfully achieved for several RALs. However, no efforts on the total synthesis of **6** had been reported before our own work, although **6** is a highly potent inhibitor of the Ser/Thr kinase Mek1 ($IC_{50} = 4$ nM).

The goal of this research project was the development of an efficient enantioselective synthesis of **6** and the characterization of its biological activity with respect to the selectivity of kinase inhibition and its effects on human cancer cells. In a second step, the chemistry developed for the preparation of **6** was planned to be used for the synthesis of a limited number of analogs for SAR and biophysical studies.

The initial approach to **6** had to be abandoned due to instability of advanced intermediates. Thus, it was impossible to cleave the ester group in **173** or **177** (Fig. 2) under conditions that did not lead to the destruction of the molecule. The investigation of different ester groups or different protecting groups for the C4'/C5' hydroxyl groups did not allow to overcome the lack of chemical stability of these advanced intermediates.

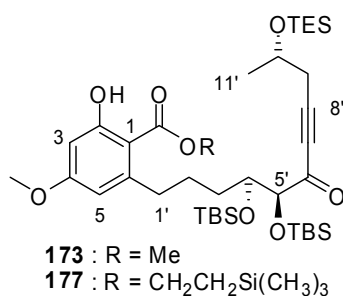


Figure 2. Advanced intermediates **173** and **177**.

As illustrated in Fig. 3, a new strategy was developed, which successfully led to the natural product L-783277 (**6**). The design of the second generation approach was based on the convergent assembly of three key intermediates **129R**, **191** and **176**, which were assembled through addition of the lithiated alkyne **129R** to aldehyde **191**, followed by *Suzuki* coupling of **176** with the MOM-protected addition product **192**. The resulting protected linear precursor for the macrolactonization, **194**, was partially hydrogenated, transformed into the respective seco-acid and cyclized under *Mitsunobu* conditions. One of the key features of this strategy towards **6** was the late introduction of the ketone moiety at C6' through selective allylic oxidation of the deprotected intermediate **198**.

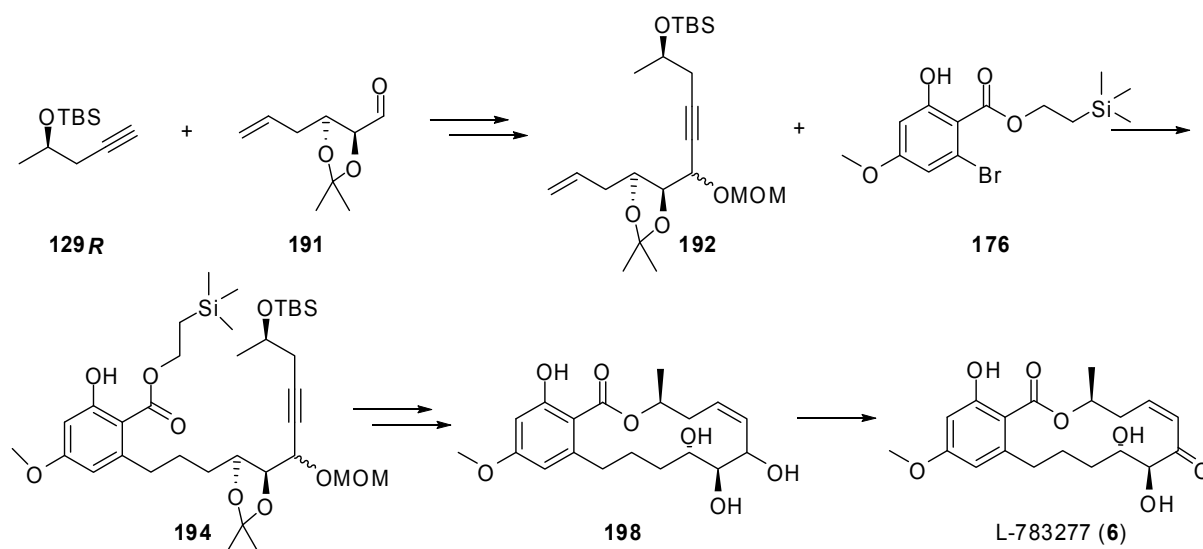


Figure 3. Successful synthetic approach to L-783277 (**6**).

Only one of the diastereomers **198** (which arise as a consequence of the non-selective addition of the lithiated alkyne **129R** to aldehyde **191**) was cleanly converted into the final product by selective allylic oxidation. As a consequence the enantioselective coupling of key intermediates **129R** and **191** was developed, leading to an enantioselective and highly efficient total synthesis of the natural product **6**. In addition, a third approach that aims at ring closure based on the *Still-Gennari* reaction has been investigated.

Based on the synthetic approach developed for **6** the total syntheses of two selected analogs of **6** have been successfully accomplished (Fig. 4). The dideoxy analog **D6**

lacks the C4' and C5' hydroxyl groups, while the phenyl analog **P6** exhibits a phenylene moiety instead of a *Z*-configured double bond between C7' and C8'.

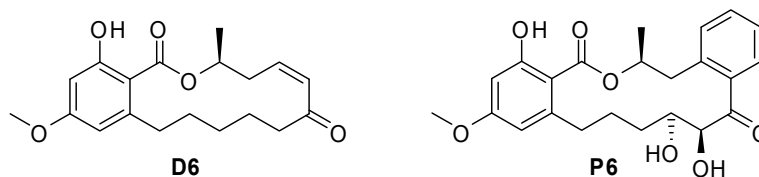


Figure 4. Selected analogs of L-783277 (**6**).

6 and its dideoxy analog **D6** were tested against a panel of 34 kinases (collaboration with Dr. Dorian Fabbro, Novartis Institute for Biomedical Research, Basel). L-783277 (**6**) effectively inhibits VEGFR-2, Mek2, PDGFR α and MK5, with IC₅₀ values of 8 nM, 15 nM, 87 nM and 640 nM, respectively. These kinases are known to be involved in cancer relevant and inflammatory signaling pathways of cells. Moreover, **6** inhibited Erk2, Tyk2 and cKit with μ M IC₅₀ values, while IC₅₀ values for all other kinases tested were above 10 μ M. Interestingly, **D6** also inhibited VEGFR-2, but with approx. 60-fold lower potency than **6**.

Additionally, **6** was tested in proliferation experiments using primary lymphatic endothelial cells, (collaboration with Prof. Michael Detmar and Benjamin Vigl, ETH Zurich), whose proliferation was induced by VEGF-A. In these experiments the proliferation of cells could be effectively inhibited by **6**.

In *in vitro* capillary-tube formation studies (collaboration with Prof. James Lorens and Dr. Lasse Evensen, University of Bergen) **6** showed an inhibitory effect on tube formation of human umbilical vein endothelial cells.

In conclusion, we have accomplished the first total synthesis of the resorcylic lactone kinase inhibitor L-783277 (**6**) in an enantioselective and highly efficient manner. Based on the chemistry developed for the preparation of **6**, we have completed the total syntheses of two selected analogs. First results of the biological activity of **6** and analog **D6** show selective inhibition of a subset of kinases, which are involved in inflammation and cancer-relevant signaling pathways. The applicability of our approach to analog synthesis has been proven. Our strategy thus grants access to novel analog structures for SAR and biophysical studies around this potent lead structure for anticancer and anti-inflammatory drug discovery.

Zusammenfassung

Die Hemmung krankheitsrelevanter Kinasen beeinflusst zelluläre Signalwege oder den Ablauf des Zellzyklus und bildet einen neuen Ansatz in der modernen Arzneimittelforschung. Insbesondere im Bereich der Onkologie sind in den letzten Jahren einige Kinasehemmer erfolgreich für die klinische Anwendung entwickelt worden. Die meisten dieser Verbindungen sind niedermolekulare synthetische Moleküle, bei denen es sich in der Regel um Heteroaromaten oder Harnstoffderivate handelt. Daneben sind einige natürlich vorkommende resorzyklische Laktone (RALs) als neue und alternative Strukturen für die Hemmung von Kinasen in Erscheinung getreten. Die meisten Mitglieder dieser Naturstofffamilie besitzen ein Z-Enon als Teil ihres Laktonringes. Für die hohe Wirksamkeit der Kinasehemmung dieser Verbindungen ist eine 1,4-Addition eines Cysteins im aktiven Zentrum des Proteins an den β -Kohlenstoff des α,β -ungesättigten Carbonylsystems verantwortlich. Ein hochpotenter Vertreter dieser Gruppe ist L-783277 (**6**), dessen Struktur in Abbildung 1 gezeigt ist.

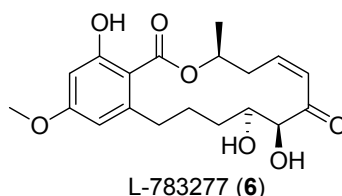


Abbildung 1: Struktur von L-783277 (**6**), ein Vertreter der resorzyklischen Laktone.

Für einige Vertreter der resorzyklischen Laktone wurden erfolgreich Totalsynthesen entwickelt. Obwohl **6** ein sehr potenter Kinasehemmer der Ser/Thr-Kinase Mek1 (IC_{50} = 4 nM) ist, wurden zu diesem Vertreter der RALs noch keine synthetischen Arbeiten veröffentlicht.

Das Ziel dieses Forschungsprojektes war es, eine effiziente und enantio-selektive Totalsynthese von **6** zu entwickeln. Desweiteren sollte die biologische Aktivität von **6** im Hinblick auf seine Kinasehemmung und seine Wirkung auf Krebszellen näher charakterisiert werden. Basierend auf der entwickelten Synthesestrategie für **6**, sollte anschließend eine gewisse Anzahl von Analogstrukturen für SAR und biophysikalische Studien synthetisiert werden.

Die zunächst verfolgte Synthesestrategie für die Totalsynthese von **6** musste aufgrund unzureichender Stabilität fortgeschrittener Zwischenprodukte aufgegeben werden. So war die Spaltung der Estergruppe in den Verbindung **173** und **177** (Abbildung 2) nicht möglich und entsprechende Versuche führten unter verschiedenen Reaktionsbedingungen immer wieder zur Zersetzung der Moleküle. Trotz der Verwendung anderer Estergruppen und unterschiedlicher Schutzgruppenstrategien für die C4'- und C5'-Hydroxylgruppen, konnte die chemische Labilität dieser fortgeschrittenen Zwischenprodukte nicht überwunden werden.

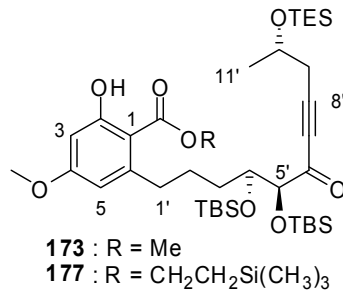


Abbildung 2: Intermediate **173** und **177**.

Abbildung 3 zeigt die Synthesestrategie, die schließlich zur erfolgreichen Total-synthese des Naturstoffs L-783277 führte. Das Synthesedesign der zweiten Generation basierte auf der konvergenten Verknüpfung der drei Bausteine **129R**, **191** und **176**. Die Addition des lithiierten Alkins **129R** an den Aldehyd **191** lieferte das Schlüsselintermediat **192**. In der anschließenden *Suzuki* Kupplung mit **176** wird das Intermediat **194** gebildet. Dieser vollständig geschützte lineare Vorläufer der Makro-laktonisierung wurde zunächst teilweise hydriert, in die entsprechende Hydroxysäure überführt und dann mittels einer *Mitsunobu* Reaktion zyklisiert. Einer der Schlüsselschritte dieser Synthesestrategie ist das späte Einführen des Ketons in die C6'-Position durch selektive allylische Oxidation des entschützten Zwischenprodukts **198**.

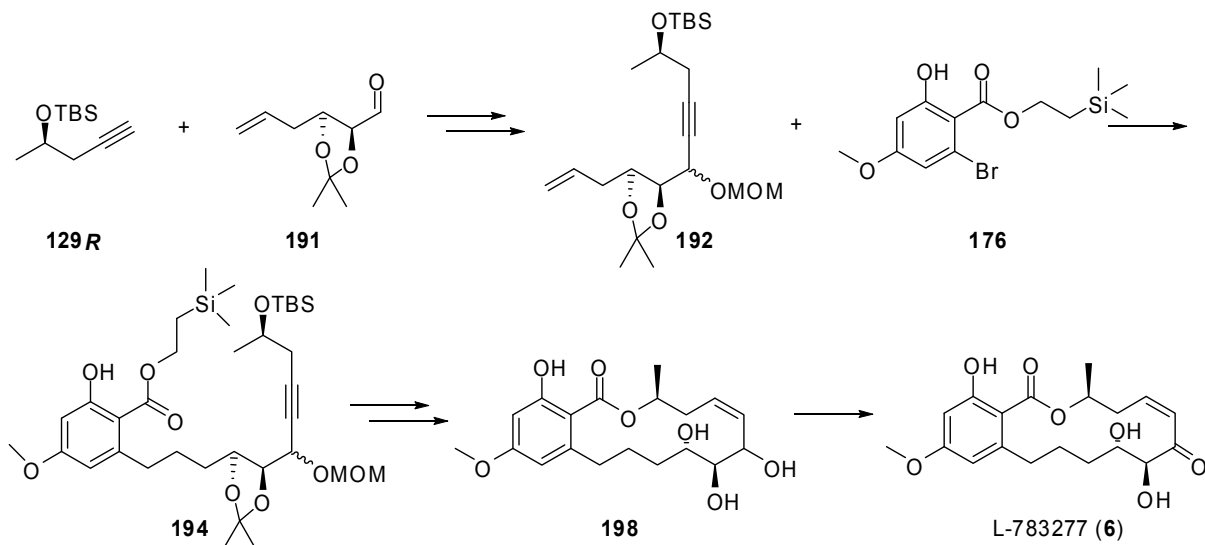


Abbildung 3: Erfolgreiche Synthese des Naturstoffs L-783277 (**6**).

Nur eines der beiden möglichen Diastereomere von **198** (welche aufgrund der unselektiven Addition des lithiierten Alkins **129R** an den Aldehyd **191** entstehen), konnte ohne erheblichen Anteil an Nebenprodukten durch allylische Oxidation zur Endverbindung umgesetzt werden. Aus diesem Grund wurde die enantioselektive Kupplung der Bausteine **129R** und **191** entwickelt. Dies ermöglichte die enantioselektive und sehr effiziente Totalsynthese des Naturstoffs **6**. Zusätzlich wurde eine weitere Ringschlussmethode basierend auf der *Still-Gennari* Reaktion in Hinblick auf ihre Anwendbarkeit für die Synthese von **6** untersucht, wobei dieses Projekt noch nicht abgeschlossen wurde.

Basierend auf der entwickelten Totalsynthese von **6** wurden zwei seiner Analoga erfolgreich synthetisiert (Abbildung 4). Das Dideoxyanalogon **D6** besitzt keine Hydroxylgruppen in der C4' und C5' Position, während das Phenylanalogon **P6** anstatt der Z-konfigurierten Doppelbindung einen mit der C7'-C8' Bindung annelierten Phenylrest aufweist.

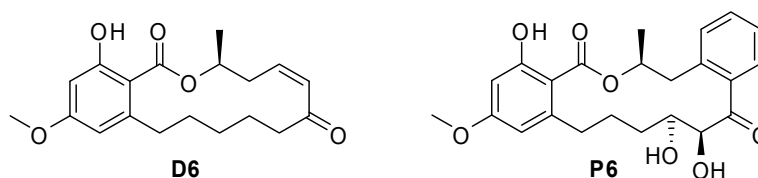


Abbildung 4: Ausgewählte Analoga von L-783277 (**6**).

6 und sein Dideoxyanalogon **D6** wurden gegen eine Reihe von 34 Kinasen getestet, (in Zusammenarbeit mit Dr. Dorian Fabbro, Novartis Institut für Biomedizinische Forschung, Basel). **6** hemmt VEGFR-2, Mek2, PDGFR α and MK5 mit IC₅₀ Werten von 8 nM, 15 nM, 87 nM bzw. 640 nM. Es ist bekannt, dass diese Kinasen in bestimmten Signalwegen von Zellen bei Krebs und auch bei entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Darüber hinaus weist **6** gegen Erk2, Tyk2 und cKit IC₅₀ Werte im unteren mikromolaren Bereich auf. Für alle anderen getesteten Kinasen wurden IC₅₀ Werte von über 10 μ M ermittelt. Interessanterweise inhibiert ebenfalls **D6** VEGFR-2, wenn auch mit einer 60-fach geringeren Aktivität als **6**.

Zusätzlich wurde **6** in Zellproliferationsexperimenten mit primären lymphatischen Endothelzellen untersucht (in Zusammenarbeit mit Prof. Michael Detmar und Benjamin Vigl, ETH Zürich), wobei das Wachstum der Zellen durch VEGF-A induziert wurde. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Zellwachstum durch **6** wirksam reduziert werden konnte.

In sogenannten *in vitro* "capillary tube formation" Studien (in Zusammenarbeit mit Prof. James Lorens und Dr. Lasse Evensen, Universität Bergen) zeigte **6** eine inhibierende Wirkung auf die Gefäßbildung von menschlichen Nabelschnur-endothelzellen.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die erste Totalsynthese des resorzyklischen Kinasehemmers L-783277 (**6**) erfolgreich realisiert werden konnte und dies in einer enantioselektiven und sehr effizienten Weise. Basierend auf der entwickelten Synthesestrategie, wurden zwei Analoga erfolgreich synthetisiert. Erste Studien zur biologischen Aktivität von **6** und dem Analogon **D6** zeigen eine selektive Inhibierung gewisser Kinasen, die in entzündungs- und krebsrelevanten Zellsignalwegen eine Rolle spielen. Die Anwendbarkeit unserer Synthesestrategie für die Herstellung von Analogstrukturen konnte gezeigt werden. Somit ermöglicht die von uns entwickelte Strategie den Zugang zu Analogstrukturen für SAR und biophysikalische Studien als eine mögliche Grundlage für die Entwicklung neuer Wirkstoffe in der Onkologie und gegen Entzündungskrankheiten.