



Doctoral Thesis

Total synthesis and biological activity of new functionalized epothilones for prodrug design and tumor targeting

Author(s):

Dietrich, Silvia Anthoine

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006234875> →

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. 19063

Total Synthesis and Biological Activity of New Functionalized Epothilones for Prodrug Design and Tumor Targeting

A dissertation submitted to
ETH Zurich

For the degree of
Doctor of Sciences ETH Zürich

Presented by

Silvia Anthoine Dietrich

Laurea in Chimica
Universita' degli Studi di Genova
Born January 16, 1979
Citizen of Italy

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, examiner
Prof. Dr. Dario Neri, co-examiner

Zürich, 2010

Abstract

Epothilones (**Fig. 1**) are a highly potent class of antiproliferative natural products, which exert their activity through stabilization of cellular microtubules, leading to mitotic arrest and apoptotic cell death in cancer cells. These compounds display potent effects on tubulin polymerization *in vitro* and they inhibit tumor growth in animal models *in vivo*, including models of multi-drug-resistant human tumors. Since their discovery in 1987 and the elucidation of their mechanism of action in 1995, the epothilones have been the subject of intense research activities, which have led to a broad-based empirical understanding of their structure-activity-relationships. They have served as successful lead structures for anticancer drug discovery and several epothilone-derived agents have entered clinical trials in humans; one of these analogs (Ixempra®) has been introduced into clinical cancer treatment in 2008, marking the most tangible result of epothilone-directed research to date.

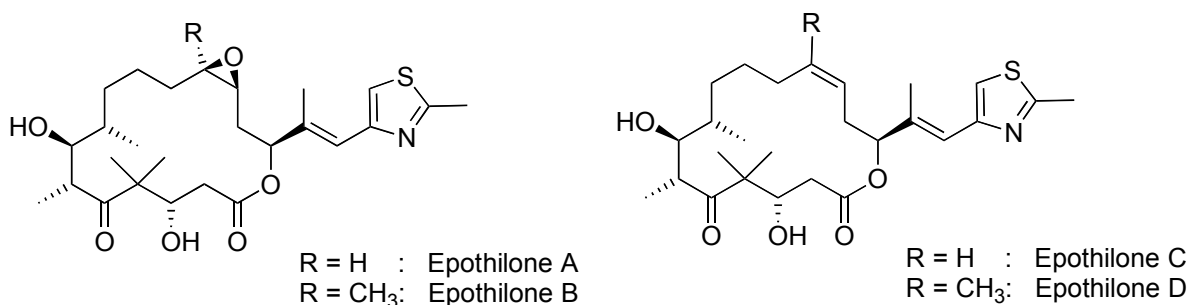


Fig. 1

Like many other antiproliferative agents, however, epothilones lack any intrinsic selectivity for cancer cells over normal ones; this is the cause of side effects, which ultimately reduce the dose of epothilones that may be administered to patients. The therapeutic effectiveness of epothilones would benefit greatly, if they could be modified to preferentially kill tumor cells, thus widening their therapeutic window. A promising method to do so is the conjugation of an epothilone with a tumor-targeting moiety, which may deliver the drug preferentially to tumor cells or their immediate environment. Such targeting agents may be

conjugated to the epothilone structure either irreversibly or through an enzymatically cleavable linker, i.e. through a prodrug approach.

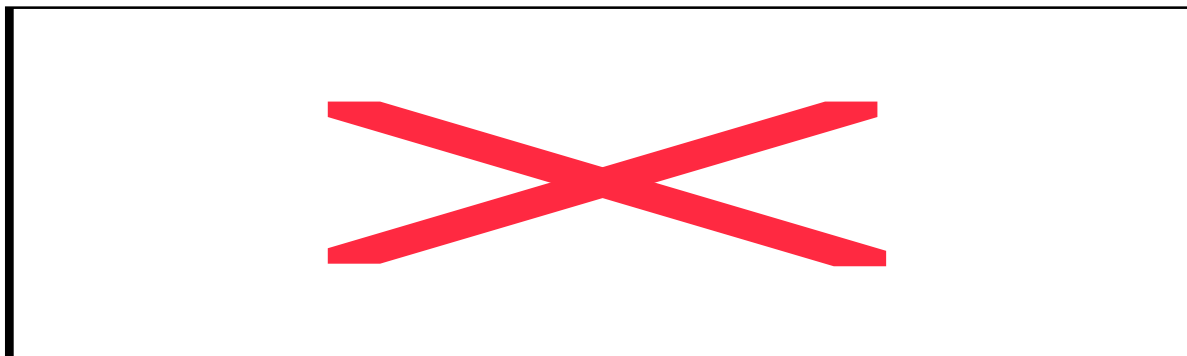


Fig. 2

In this context we have devised and synthesized novel modified epothilone analogs **A-1 - A-3**, (**Fig.2**) which in their aromatic side chain bear additional functional groups (compared to natural epothilones) that enable conjugation with various tumor-targeting moieties; evaluation of the biological activity of derivatives **A-1- A-3** has been performed in a tubulin polymerization assay and in cytotoxicity assays against several human cancer cell lines.

Synthesis of **A-1 - A-3** has been achieved through the preparation of building blocks **A-4** and **A-5** (**Fig. 3**), which have been connected *via* a palladium-mediated Suzuki-Miyaura coupling; a Yamaguchi macrolactonization has then been used to close the 16-membered ring.

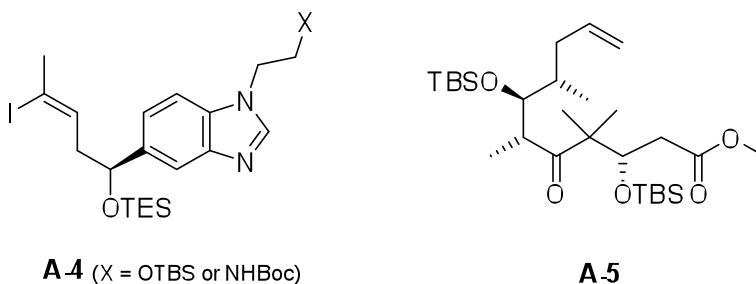


Fig. 3

A synthesis of **A-1** in hundred-mg amounts has been completed and the resulting material has been used to prepare conjugates of **A-1** with folic acid. The latter was chosen as a targeting device to exploit its preferential cellular uptake pathway through the folate receptor (FR). The FR is practically absent from most healthy tissues, but overexpressed in certain types of epithelial cancers.

Two conjugates of **A-1** with folic acid have been synthesized, derivatives **A-6** and **A-7** (**Fig. 4**); the former includes a linker which is expected to be stable in the cellular environment, while the latter contains a dipeptide moiety susceptible to cleavage by the enzyme cathepsin B, which is overexpressed in several types of tumors. Conjugate **A-7** is then expected to behave as a prodrug and release free **A-1** after cellular uptake. Biological evaluation of **A-6** and **A-7** is ongoing.

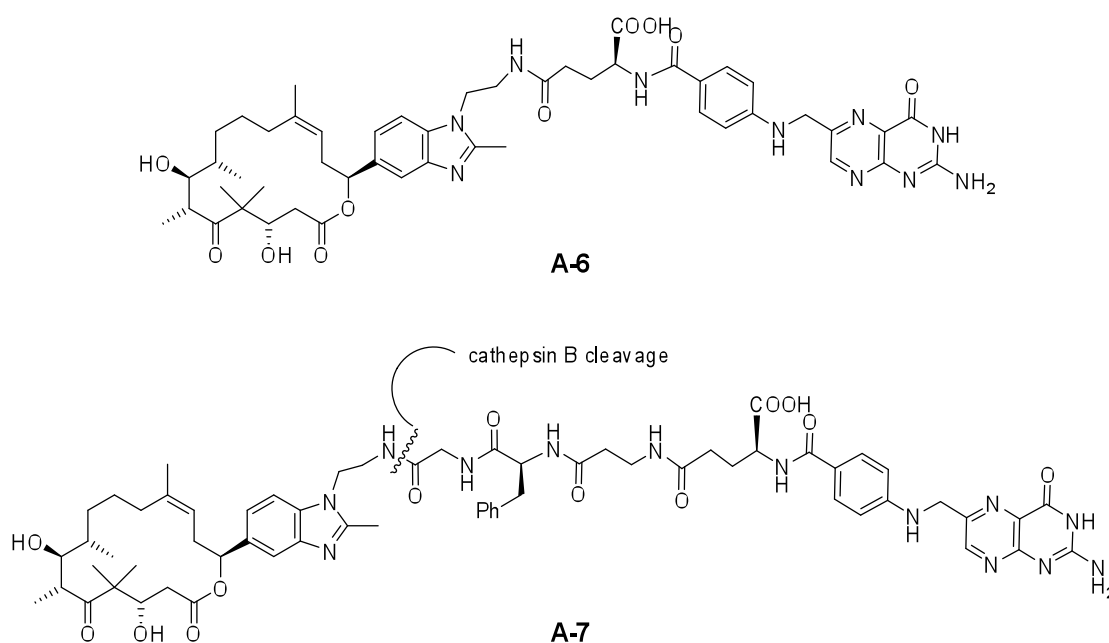


Fig. 4

Riassunto

Gli epotiloni (**Fig. 1**) sono una classe di composti naturali dalla potente attivita' antiproliferativa; essi esercitano la loro azione attraverso la stabilizzazione dei microtubuli cellulari, provocando l'arresto mitotico e l'apoptosi nelle cellule colpite. Questi composti hanno un potente effetto sulla polimerizzazione della tubulina *in vitro* e inibiscono la crescita di tumori *in vivo* in modelli animali, compresi modelli di tumori umani multiresistenti ai farmaci. Dalla loro scoperta nel 1987 e dopo la dimostrazione del loro meccanismo d'azione nel 1995, gli epotiloni sono stati oggetto di intense attivita' di ricerca, che hanno portato a un'estesa comprensione empirica delle relazioni struttura-attivita' in questa classe di composti. Essi sono stati utilizzati con successo come strutture 'lead' per la ricerca di agenti anticancro, e diversi farmaci basati sugli epotiloni sono stati oggetto di studi clinici; uno di questi (Ixempra®) e' stato introdotto nella pratica clinica nel 2008, segnando il risultato finora piu' tangibile della ricerca basata sugli epotiloni.

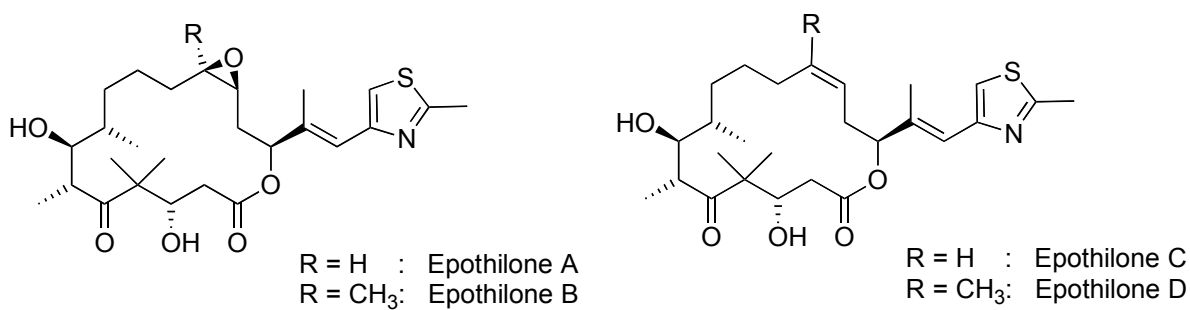


Fig. 1

Come molti altri farmaci antiproliferativi, tuttavia, gli epotiloni non possiedono alcuna selettivita' verso le cellule tumorali rispetto a quelle normali; questo causa effetti collaterali, che in ultima analisi riducono la dose di epotilone che puo' essere somministrata al paziente. L'efficacia terapeutica degli epotiloni verrebbe significativamente accresciuta se essi potessero essere modificati in modo da attaccare preferenzialmente le cellule tumorali, ampliando cosi' la finestra terapeutica di questi farmaci. Un metodo promettente per fare cio' e' la coniugazione di un epotilone con un secondo agente, che interagisca preferenzialmente con le cellule tumorali e sia in grado di far accumulare il farmaco al loro interno o nelle loro immediate vicinanze. Questa seconda molecola puo' venire legata

all'epotilone in maniera irreversibile, oppure attraverso un legame che si presti a scissione enzimatica, realizzando cioè un profarmaco.

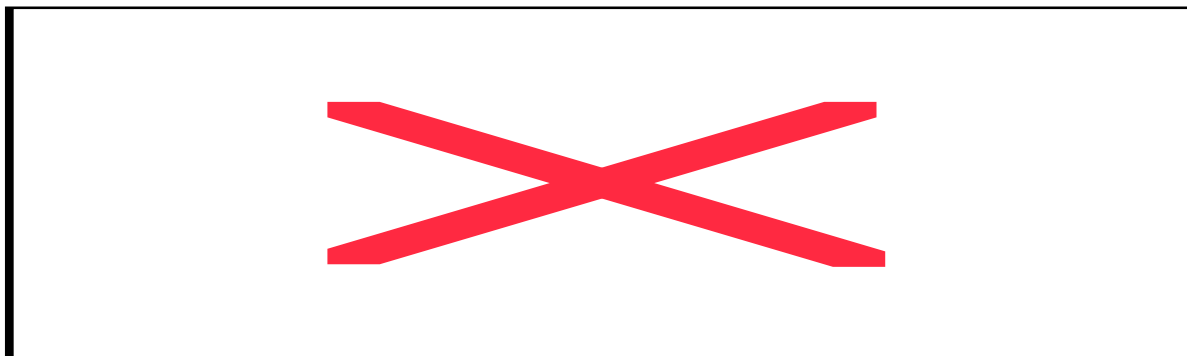


Fig. 2

In questo scenario abbiamo progettato e sintetizzato i nuovi epotiloni **A-1 - A-3**, (**Fig.2**) che recano nella loro catena laterale aromatica gruppi funzionali aggiuntivi (rispetto agli epotiloni naturali), che permettono la coniugazione con varie molecole; la valutazione dell'attività biologica dei derivati **A-1 - A-3** è stata effettuata attraverso un saggio di polimerizzazione della tubulina e in saggi di citotossicità su varie linee cellulari tumorali umane.

La sintesi di **A-1 - A-3** è stata realizzata attraverso la preparazione degli intermedi **A-4** e **A-5** (**Fig. 3**), che sono stati uniti per mezzo di una reazione di accoppiamento Suzuki-Miyaura mediata dal palladio; una macrolattonzizzazione di Yamaguchi è stata poi utilizzata per chiudere il ciclo a sedici membri dell'epotilone.

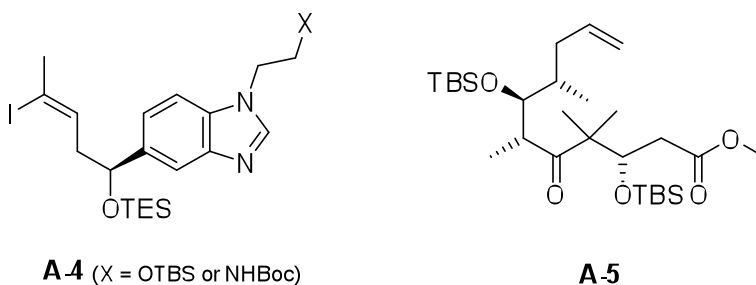


Fig. 3

La sintesi di **A-1** e' stata completata su diverse centinaia di milligrammi di materiale, che e' stato utilizzato per preparare coniugati di **A-1** con l'acido folico. Quest'ultimo e' stato scelto per sfruttare il percorso preferenziale di endocitosi attraverso il recettore del folato (FR). FR e' praticamente assente dalla maggior parte dei tessuti sani, ma e' sovraespresso in vari tipi di tumore.

Due coniugati di **A-1** con l'acido folico sono stati sintetizzati, i derivati **A-6** e **A-7** (**Fig. 4**); il primo e' caratterizzato da un legame che ci si aspetta sia stabile all'interno delle cellule, mentre il secondo comprende un dipeptide suscettibile di scissione da parte dell'enzima catepsina B, che e' sovraespresso in diversi tipi di tumore. E' previsto quindi che il coniugato **A-7** si comporti come un profarmaco e rilasci **A-1** dopo l'ingresso nelle cellule tumorali. La valutazione dell'attivita' biologica di **A-6** e **A-7** e' in corso.

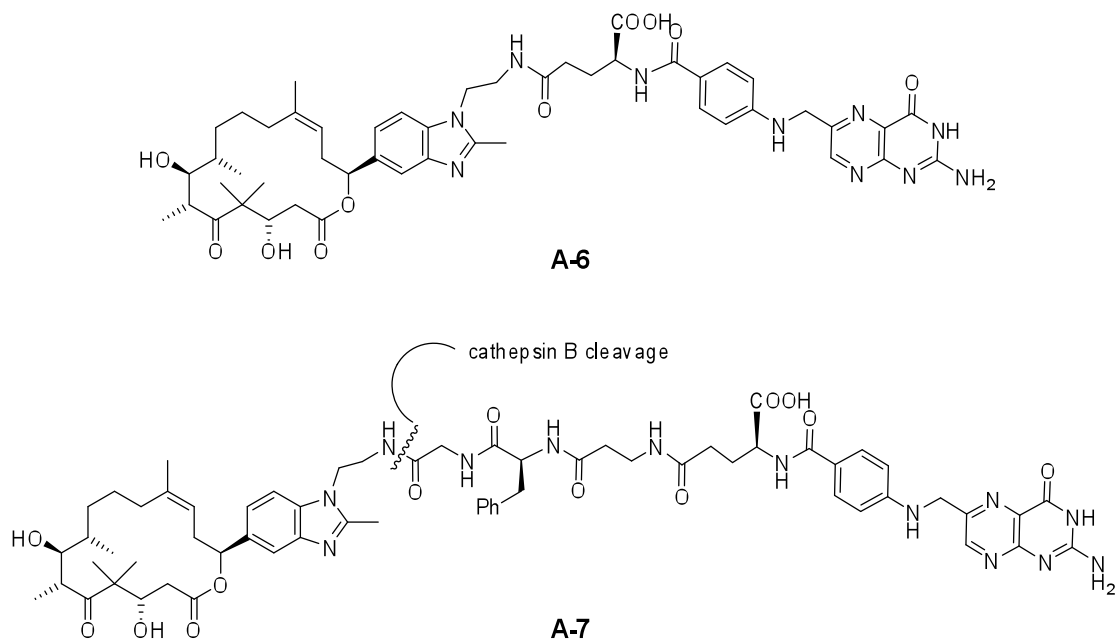


Fig. 4