

Diss. ETH No. 20376

**Stereoselective Synthesis and Biological Assessment
of Simplified Analogs of Peloruside A**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Christoph Werner Wullschleger
MSc ETH in Chemistry

born on December 28th, 1982

Citizen of
Vordemwald AG, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, examiner
Prof. Dr. Hans-Jürg Borschberg, co-examiner

2012

Abstract

Peloruside A (**1**) is a polyoxygenated, polyketide-based 16-membered macrolide that was isolated from the marine sponge *Mycale hentscheli* by Northcote and co-workers in 2000 (Figure 1). It shows potent paclitaxel-like microtubule-stabilizing activity, is cytotoxic at nanomolar concentrations (IC₅₀ value against HeLa cells of 7 nM) and arrests the cell cycle in the G₂/M phase, which induces apoptosis in human cancer cell lines. Importantly, peloruside A (**1**) does not bind to the taxol site on β -tubulin, which stands in marked contrast to most other members of the class of microtubule-stabilizing agents (*e.g.* taxol and the epothilones).

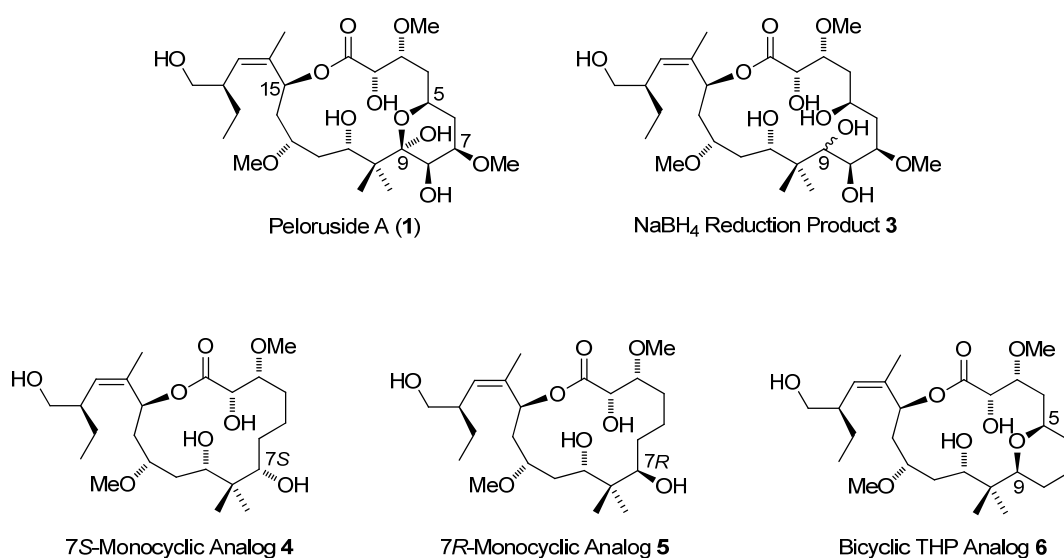
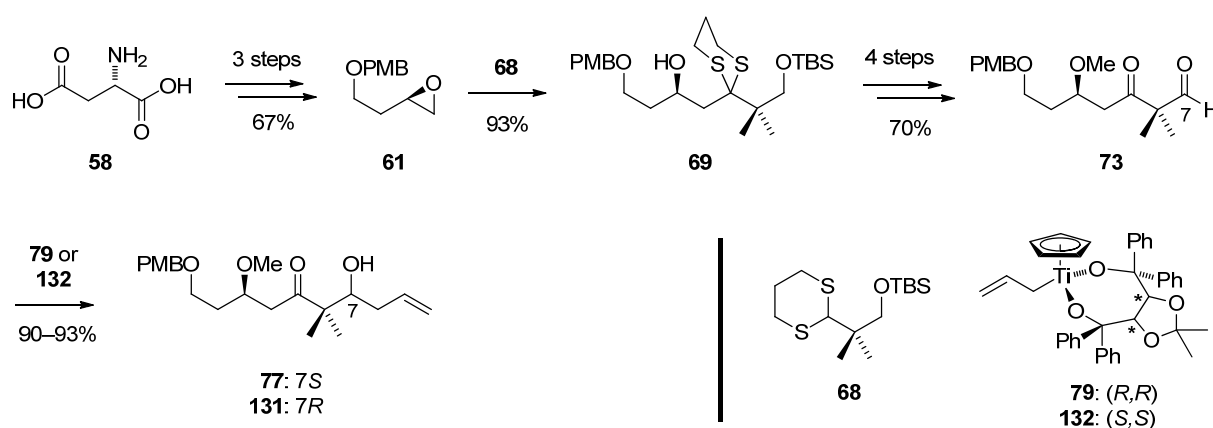


Figure 1: Structures of natural product peloruside A (**1**), its NaBH₄ reduction product **3**, the three structurally simplified peloruside A analogs **4**, **5** and **6**, which are the subject of this Ph. D. thesis.

At the outset of this Ph. D. project, virtually no structure-activity-relationship (SAR) work had been performed on peloruside A (**1**); the only analog that had been investigated at that time was the NaBH₄ reduction product **3**, which was found to retain significant antiproliferative activity, despite the loss of the pyranose ring (IC₅₀ value of 221 nM against HeLa cells). This result suggested that even major structural changes in the macrolactone scaffold of **1** do not completely abolish the ability to interact with microtubules and to inhibit the growth of human cancer cells. In light of this finding we initiated a program that aimed at the exploration of SAR of peloruside A (**1**) as it relates to the importance of the pyranose ring in the bicyclic

core structure and its particular substitution pattern, with the ultimate objective to discover structurally simplified peloruside A analogs that still retain potent biological activity. To this end, analogs **4**, **5** and **6** (Figure 1) were targeted for stereoselective synthesis in order to investigate their biological activities in different cancer cell lines.

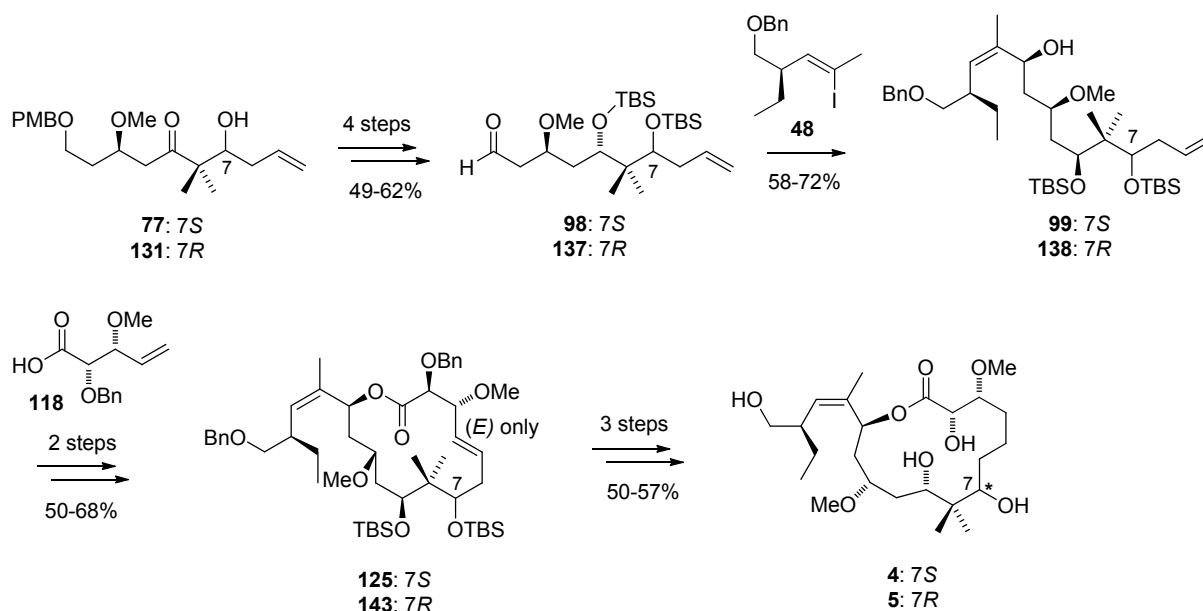
The syntheses of the target compounds **4**, **5** and **6** are summarized in Schemes 1–3. In all three cases, the first phase of the syntheses involved the development of enantioselective routes towards the diastereomeric homoallylic alcohols **77** and **131**, respectively, as the advanced precursors for target structures **4/6** and **5** (Scheme 1). An initial epoxide ring opening in **61**, which is accessible from natural (*S*)-aspartic acid (**58**) in three steps, with dithiane **68** provided intermediate **69** in excellent yield. A subsequent four-step reaction sequence then afforded β -keto aldehyde **73**, whose treatment with **79** (or its enantiomer **132**) under *Duthaler-Hafner* allyltitanation conditions afforded the desired intermediates.



Scheme 1: Synthesis towards the advanced precursor **77** (for **4** and **6**) and **131** (for **5**), respectively.

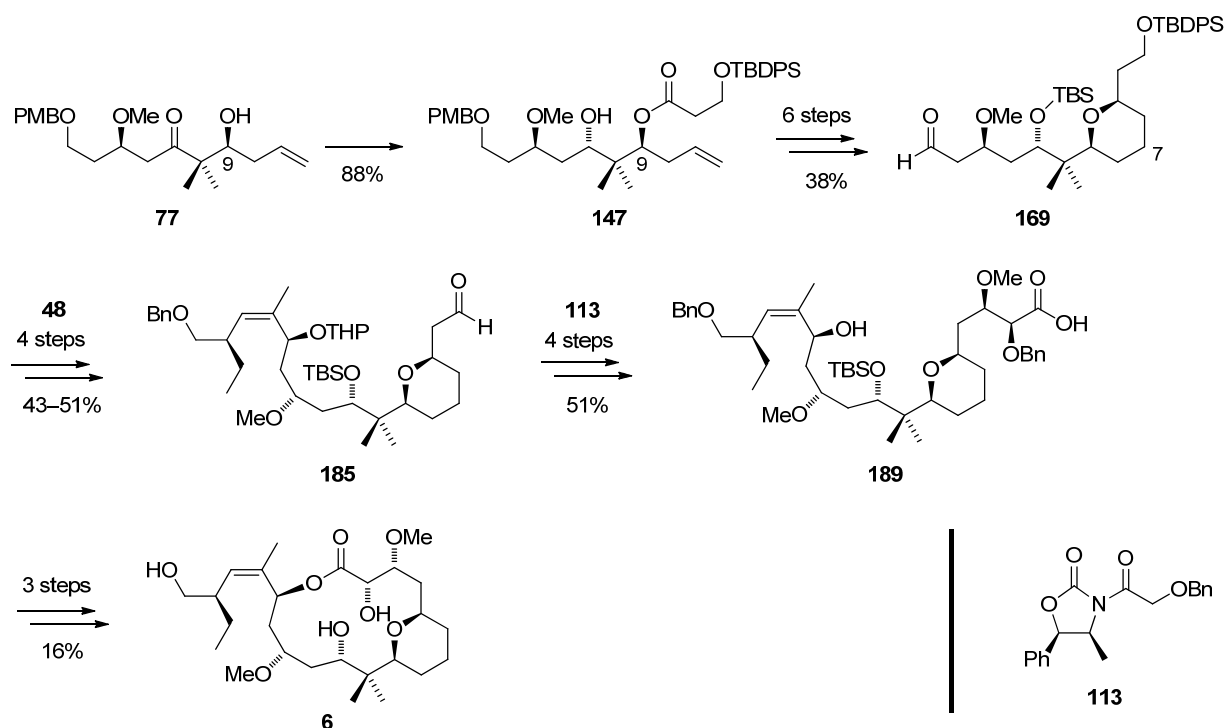
Directed 1,3-reduction of β -hydroxy ketone **77** (1,3-*anti*) and **131** (1,3-*syn*) afforded the corresponding reduction products stereoselectively (Scheme 2). These were further converted into the fully blocked aldehydes **98** and **137**, respectively, which served as coupling partner in a highly diastereoselective addition reaction with the side chain moiety **48**. The final steps towards monocyclic analogs **4** and **5** entailed *Yamaguchi* esterification of carboxylic acid **118** with allylic alcohols **99** and **138**, respectively, which was followed by ring closure through RCM. Selective

diimide reduction of the endocyclic double bond in **125** and **143**, which were obtained as the only isolable cyclization products, followed by global deprotection finally afforded both target compounds in only 19 steps for the longest linear sequence and 4.0–5.7% overall yield for **4**, and 3.7% for **5**.



Scheme 2: Synthesis of the simplified monocyclic peloruside A analogs **4** and **5**.

The construction of the bicyclic peloruside A analog **6** also took advantage of homoallylic alcohol precursor **77** (Scheme 3). In this case, the selective 1,3-*anti* reduction was performed under *Evans-Tishchenko* conditions, which led to **147**, due to concomitant esterification of the 9-OH group. After TBS protection of the resulting free secondary hydroxyl group and reductive acetylation, the α -acetoxy ether intermediate was directly submitted to a high-yielding *Prins* cyclization with CeCl_3/LiI , which afforded **169** after subsequent hydrodeiodination at C7 and liberation of the aldehyde functionality. Further key steps towards **6** are the selective addition of the side chain vinyl iodide **48** to **169**, a completely stereoselective carbon chain extension in **185** through an *Evans* aldol reaction with **113**, and a *Yamaguchi* macrolactonization of *seco*-acid **189**. Final global deprotection then gave bicyclic THP analog **6** in 27 steps for the longest linear sequence and in 0.45–0.54% overall yield.



Scheme 3: Synthesis of the simplified bicyclic peloruside A analog **6**.

All three peloruside analogs **4**, **5**, and **6** possess microtubule-stabilizing properties, as they significantly reduce the critical concentration for tubulin assembly. The assessment of their *in vitro* antiproliferative activity revealed **6** to be the most active analog, with IC_{50} values in the range of 124–247 nM. Quite remarkably, both monocyclic analogs showed cancer cell growth inhibition in the μM range, with **5** being more active than **4**; the former showed single digit μM IC_{50} values in all cell lines investigated, while the latter had an IC_{50} of 1.60 μM in A2780 cells (ovarian), but the IC_{50} 's against MCF-7 (breast) and HCT116 (colon) cells were above 20 μM . It is thought that the THP ring in analog **6** ensures the overall conformation of the macrocycle to be similar to that in tubulin-bound peloruside A (**1**). Nevertheless, the activity of **6** still differs from natural peloruside A (**1**) by a factor of 17 (for the most sensitive cell line), thus indicating that the pyranose ring as such is not the only essential structural element for tubulin binding and the high antiproliferative activity of the natural product. It remains to be investigated which of the substituent(s) not present in analog **6** (on C7, C8, and C9) is (are) responsible for the loss in activity relative to natural **1**.

Zusammenfassung

Pelorusid A (**1**) ist ein sauerstoffreiches, 16-gliedriges polyketidisches Makrolakton, welches im Jahre 2000 von *Northcote* und Mitarbeitern aus dem Meeresschwamm *Mycale hentscheli* isoliert wurde (Abb. 1). Dieser Naturstoff zeigt potente Paclitaxel-ähnliche Mikrotubuli-stabilisierende Aktivität, wirkt zytotoxisch bei nanomolaren Konzentrationen (IC_{50} -Wert gegen HeLa-Zellen von 7 nM) und arretiert den Zellzyklus in der G₂/M Phase, wodurch in menschlichen Krebszellen die Apoptose ausgelöst wird. Dabei ist hervorzuheben, dass Pelorusid A (**1**) im Gegensatz zu den meisten Vertretern der Gruppe der Mikrotubuli-stabilisierenden Substanzen (wie z.B. Taxol und die Epothilone) nicht an der Taxol-Stelle des β -Tubulins bindet.

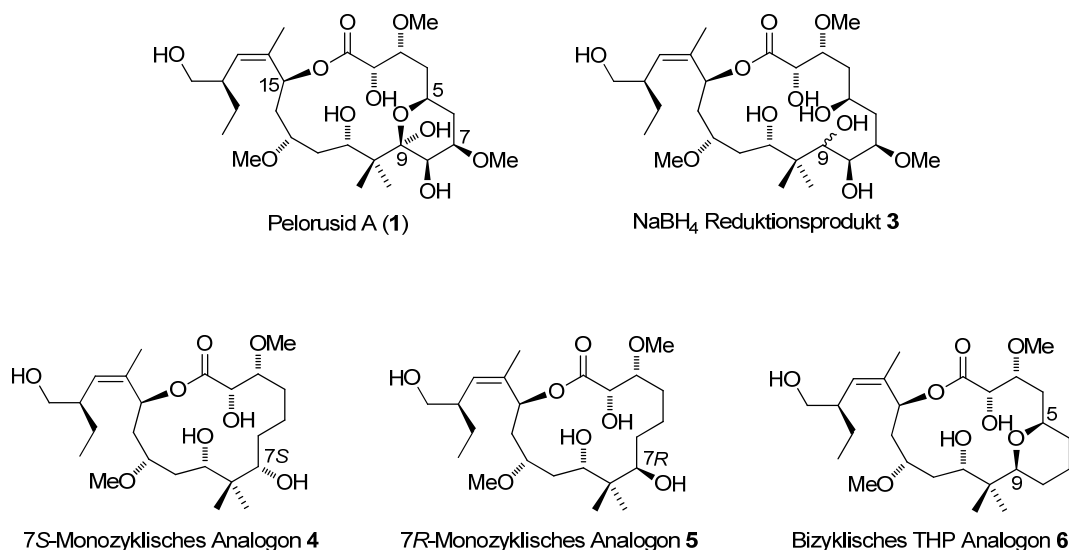
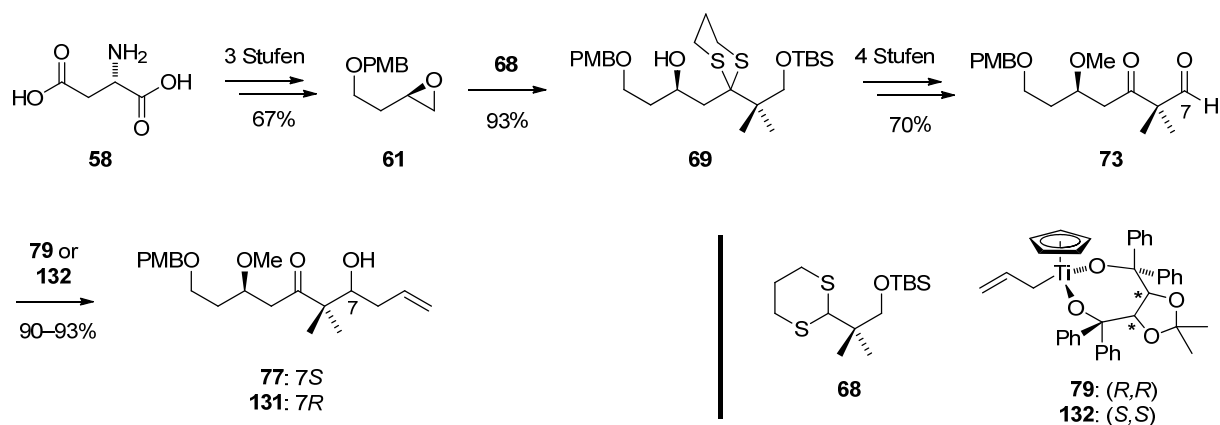


Abbildung 1: Strukturen des Naturstoffs Pelorusid A (**1**), seines NaBH₄ Reduktionsproduktes **3**, sowie der drei strukturell vereinfachten Pelorusid A Analoga **4**, **5** und **6**, welche Gegenstand dieser Doktorarbeit sind.

Bei Beginn dieser Doktorarbeit waren praktisch keine Arbeiten über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Pelorusid A (**1**) bekannt; das NaBH₄ Reduktionsprodukt **3** war das einzige Analogon, welches bis zu jenem Zeitpunkt untersucht worden war, wobei **3** trotz des Verlustes des Pyranose-Rings eine erhebliche antiproliferative Aktivität zeigt (IC_{50} -Wert von 221 nM gegenüber HeLa-Zellen). Dieses Resultat deutete darauf hin, dass sogar noch weitreichendere strukturelle Änderungen am Grundgerüst des Makrolaktone **1** nicht automatisch zum Verlust der Fähigkeit

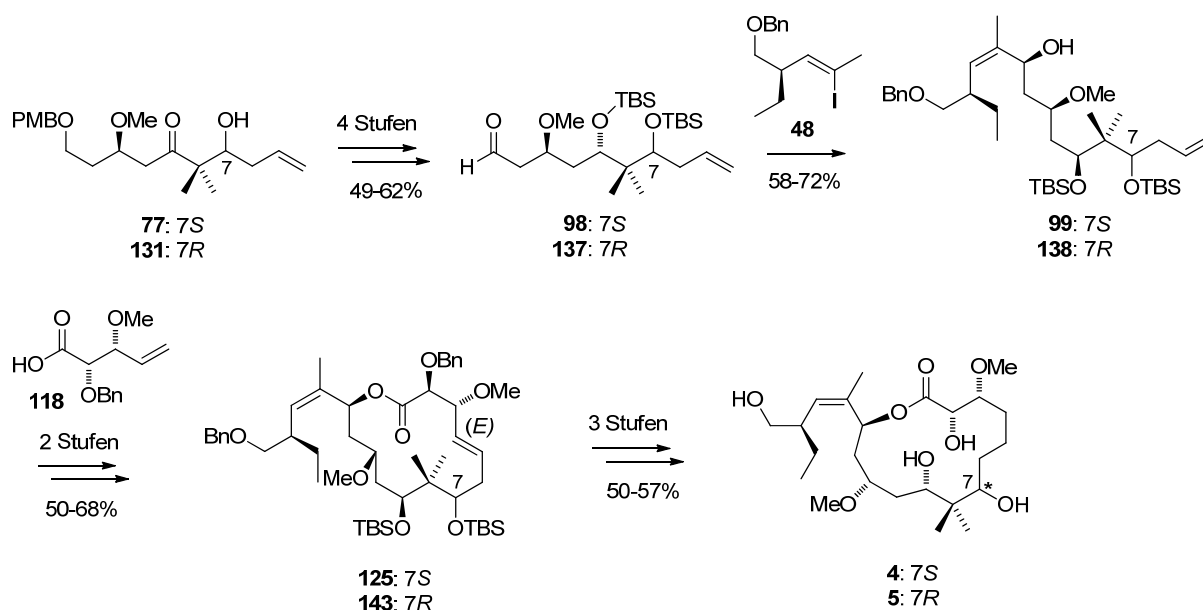
führen, mit Mikrotubuli zu interagieren und das menschliche Krebszellwachstum zu hemmen. Angesichts dieser Erkenntnis haben wir ein Forschungsprogramm in die Wege geleitet, welches darauf abzielte, die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Pelorusid A (**1**) bezüglich der Bedeutung des Pyranose-Rings und dessen spezifischen Substitutionsmusters genauer zu untersuchen. Dabei sollte die Entwicklung strukturell vereinfachter Pelorusid A Analoga, welche die potente biologische Aktivität des Naturstoffs beibehalten, das oberste Ziel darstellen. Zu diesem Zweck wurde die stereoselektive Synthese der Analoga **4**, **5** und **6** (Abb. 1) zum Ziel gesetzt, deren biologische Aktivität dann in unterschiedlichen Krebszelllinien untersucht werden sollte.

Die Synthesen der Zielmoleküle **4**, **5** und **6** sind in den *Schemata* 1-3 zusammengefasst. Der erste Teil der Synthesen beinhaltet in allen drei Fällen die Ausarbeitung enantioselektiver Synthesewege zu den diastereomeren homoallylischen Alkoholen **77** und **131**, welche fortgeschrittene Vorstufen der Zielstrukturen **4/6** bzw. **5** darstellen (*Schema 1*). Die Synthesen gehen von Epoxid **61** aus, welches aus natürlicher (*S*)-Asparaginsäure in drei Stufen zugänglich ist und dessen Ringöffnung mit Dithian **68** den sekundären Alkohol **69** in ausgezeichneter Ausbeute liefert. Eine anschließende vierstufige Reaktionssequenz führte zum β -Ketoaldehyd **73**, dessen Umsetzung mit **79** (oder dessen Enantiomeren **132**) unter *Duthaler-Hafner* Allyltitanierung-Bedingungen zu den gewünschten Zwischenprodukten **77** und **131** führte.



Schema 1: Synthese der fortgeschrittenen Vorläufer **77** (für **4** und **6**) und **131** (für **5**).

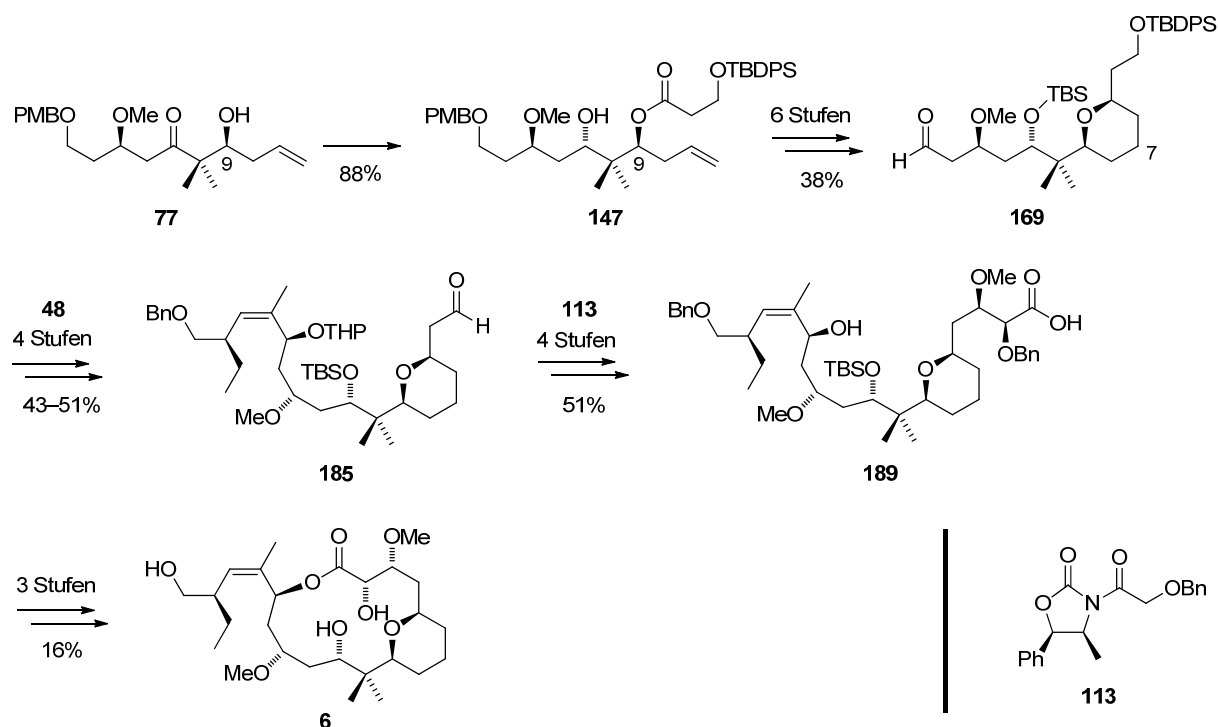
Eine gerichtete 1,3-Reduktion der β -Hydroxyketone **77** (1,3-*anti*) und **131** (1,3-*syn*) ergab die entsprechenden Reduktionsprodukte mit hoher Stereoselektivität (Schema 2). Letztere wurden dann weiter zu den komplett geschützten Aldehyden **98** und **137** umgesetzt, welche als Kupplungspartner in einer hochgradig diastereoselektiven Additionsreaktion mit dem Seitenketterest **48** dienten. Die letzten Stufen auf dem Weg zu den monozyklischen Analoga **4** und **5** waren eine *Yamaguchi*-Veresterung von Carbonsäure **118** mit den allylischen Alkoholen **99** bzw. **138**, welcher der Ringschluss mittels Ringschlussmetathese (RCM) folgte. Der selektiven Diimid-Reduktion der endozyklischen Doppelbindung in **125** und **143**, welche als ausschliessliche Zyklisierungsprodukte isoliert wurden, folgte die globale Entschützung, was schliesslich die beiden Zielverbindungen **4** und **5** in Gesamtausbeuten von 4.0–5.7% bzw. 3.7% über nur 19 Stufen für die längste lineare Reaktionssequenz lieferte.



Schema 2: Synthese der vereinfachten monozyklischen Pelorusid A Analoga **4** und **5**.

Der Aufbau des bicyklischen Pelorusid A Analogons **6** gelang ebenfalls ausgehend vom homoallylischen Alkohol **77** als Vorläufer (Schema 3). Die selektive 1,3-*anti* Reduktion wurde in diesem Fall unter *Evans-Tishchenko* Bedingungen durchgeführt, die aufgrund gleichzeitiger Veresterung der 9-OH Gruppe den partiell geschützten Alkohol **147** lieferte. Die resultierende freie sekundäre Hydroxylgruppe

wurde anschliessend als TBS-Ether geschützt. Die nachfolgende reduktive Acetylierung lieferte einen α -Acetoxyether, der in sehr guten Ausbeuten in einer *Prins*-Zyklisierung (mit CeCl_3/LiI) umgesetzt werden konnte. Dies führte nach Hydrodeiodinierung an C7 und der Freisetzung der Aldehydfunktion zur Isolierung von **169**. Weitere Schlüsselschritte in Richtung **6** beinhalten die selektive Addition der Seitenkette als Vinylidid **48** an **169**, eine vollständig stereoselektive Kohlenstoffketten-Verlängerung in **185** durch eine *Evans*-Aldol Reaktion mit **113** und eine *Yamaguchi*-Makrolaktonisierung der *Seco*-Säure **189**. Die abschliessende globale Entschützung führte dann zum bizyklischen THP Analogon **6**, das über 27 Stufen für die längste lineare Reaktionssequenz mit einer Gesamtausbeute von 0.45–0.54% erhalten wurde.



Scheme 3: Synthese des vereinfachten bizyklischen Pelorusid A Analogons **6**.

Alle drei Pelorusid Analoga **4**, **5** und **6** besitzen Mikrotubuli-stabilisierende Eigenschaften, da sie die kritische Konzentration für die Tubulinpolymerisation signifikant reduzieren. Die Bestimmung der antiproliferativen Aktivität *in vitro* machte deutlich, dass **6** mit IC_{50} -Werten von 124–247 nM das aktivste Analogon ist. Beide monozyklischen Analoga zeigten bemerkenswerterweise eine Hemmung des

Krebszellenwachstums im μM Bereich, wobei **5** eine höhere Aktivität als **4** aufweist. Ersteres Analogon zeigt in allen untersuchten Zelllinien IC_{50} -Werte im einstelligen μM Bereich; dagegen zeigt letzteres zwar gegenüber A2780 Zellen (Ovarialkarzinom) einen IC_{50} -Wert von $1.60 \mu\text{M}$, die IC_{50} -Werte gegen MCF-7 (Brustkarzinom) und HCT116 (Dickdarmkarzinom) Zellen liegen jedoch oberhalb von $20 \mu\text{M}$. Grund für die hohe antiproliferative Aktivität von Analogon **6** dürfte die Beibehaltung des THP-Rings sein, wodurch die Gesamt-Konformation des Makrozyklus derjenigen von Tubulin-gebundenem Pelorusid A (**1**) ähnlich ist. Die Aktivität von **6** unterscheidet sich trotzdem noch von jener des natürlichen Pelorusid A (**1**) um einen Faktor von 17 (für die empfindlichste Zelllinie), was darauf hindeutet, dass der Pyranose-Ring als solcher für die Tubulin-Bindung und die hohe antiproliferative Aktivität des Naturstoffs nicht das einzige unverzichtbare Strukturelement darstellt. Es bleibt abzuklären, welche(r) der im Vergleich zum Naturstoff in Analogon **6** fehlenden Substituenten (an C7, C8 und C9) für den Aktivitätsverlust gegenüber natürlichem **1** verantwortlich sind (ist).