

Pyridomycin as lead for new antituberculosis agents and synthesis of hypermodified epothilone A analogs

Doctoral Thesis

Author(s):

Horlacher, Oliver Philip

Publication date:

2014

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010186540>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH No. 21961

**Pyridomycin as Lead for New Antituberculosis Agents
and Synthesis of Hypermodified Epothilone A
Analog**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

OLIVER PHILIP HORLACHER

MSc ETH Zurich

Born on 12.09.1985

Citizen of Aarau AG und Uster ZH, Switzerland

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, examiner
Prof. Dr. Jonathan Hall, co-examiner

2014

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a frequently fatal disease that caused more than 1.3 million deaths in 2012. TB was considered to be well contained in the 1960s, but recent decades have witnessed a resurgence of the disease, even in industrialized countries, due to comorbidity with AIDS and the emergence of multi- and extensively drug-resistant (MDR, XDR) strains of the causative pathogen *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). These developments were paralleled by a decline in TB-directed drug discovery efforts; thus, as of today, only one TB drug with a novel mode of action (Sirturo®) has been launched in the past 50 years. However, current combination therapy is insufficient to eliminate XDR *Mtb*, and, as a consequence, there is an urgent need for the development of new anti-TB agents that can shorten the duration of treatment (current standard first-line therapy of TB extends over six months) and/or are active against MDR and XDR bacteria.

Pyridomycin (**1**) (*Figure I*) is a bacterial natural product that was first isolated from the *Streptomyces* strain 6706 in 1953. Only a single total synthesis of **1** has been reported in the literature; significant difficulties were encountered in that work with regard to the establishment of the enol-ester double bond between C2 and C1', a problem that could not be solved in a fully satisfactory manner.

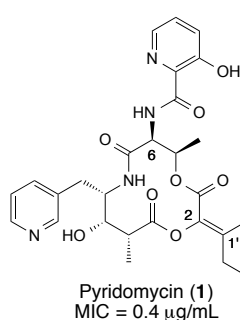
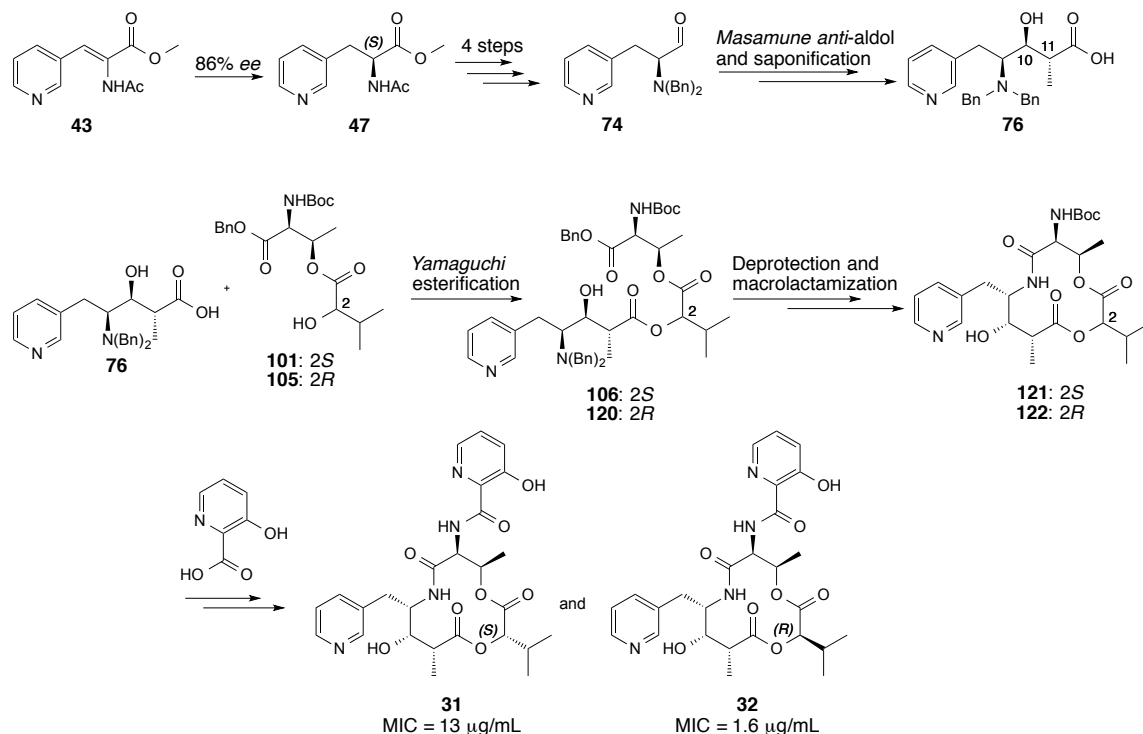


Figure I The natural product pyridomycin (**1**)

The compound was shown to exhibit significant *in vitro* antimycobacterial activity (MIC = 0.4 µg/mL) and low systemic toxicity in mice, however, the molecular target of **1** was unknown at the outset of this thesis. Attracted by these findings, we decided to explore the potential of **1** as a lead compound for the discovery of novel anti-TB agents. To overcome the synthetic limitations encountered with regard to the C2,C1'-double

bond, and to clarify whether the enol-ester motif was a prerequisite for the activity of the compound, 2,1'-dihydropyridomycin analogs **31** and **32** were synthesized from the common western fragment **76** and the individual (*S*)- and (*R*)-configured eastern fragments **101** and **105** (Scheme 1). With the target of **1** unknown, no predictions were possible with regard to the more favorable configuration of the new chiral center at C2 of dihydropyridomycins (if any), and both configurations needed to be addressed. The synthesis of acid **76** started with an *Erlenmeyer* azlactone reaction of 3-pyridine carboxaldehyde and *N*-acetylglycine to provide (*Z*)-configured ester **43**. The (*S*)-configuration of **47** was installed by an enantioselective hydrogenation in 86% *ee* using Rh[(COD)((*R,R*)-DIPAMP)]BF₄ as a catalyst. Transformation to aldehyde **74** then set the stage for the *Masamune anti*-aldol reaction, as a key step to install the *anti*-configured stereocenters C10 and C11 (followed by the removal of the *Masamune* auxiliary in a saponification reaction). Acid **76** could then be esterified with the eastern fragments **101/105** (obtained from the esterification of Boc-L-Thr-OBn with *O*-TBS-protected (*S*)-/(*R*)-hydroxyisovaleric acid) using the *Yamaguchi* esterification reagents and a strictly defined low temperature regimen.



Scheme 1 Summary of the synthesis of 2,1'-dihydropyridomycins **31** and **32**

Hydrogenolytic global deprotection was followed by the efficient macrocyclization of the linear depsipeptide via HATU/DIEA-mediated amide formation. Finally, the Boc-group was removed with TFA and 3-hydroxypicolinic acid was coupled to the free amine, delivering analogs **31/32**.

In parallel efforts, it was tried to develop a new total synthesis of natural **1**, but, due to difficulties with the synthesis of the enol-ester motif, this part of the project was abandoned in favor of a larger number of 2,1'-dihydropyridomycin analogs.

Intriguingly, the assessment of the antimycobacterial activity of dihydropyridomycins **31** and **32** revealed that C2-(*R*)-isomer **32** retained most of the activity of natural **1** (MIC = 1.6 µg/mL, 4-fold loss in potency). On the basis of this finding, the presence of an enol-ester moiety is not a critical requirement for the antimycobacterial activity of pyridomycin-derived structures. At the same time, a clear activity difference was apparent between **31** and **32**, with the former being 32-fold less potent against *Mtb* H37Rv (MIC = 13 µg/mL) than **1** (8-fold potency difference to **32**), thus pointing to the importance of the configuration of the newly created chiral center at C2.

In parallel to the synthetic work, our collaborators Prof. *Stewart Cole* and Dr. *Ruben Hartkoorn* of the EPFL identified the mycobacterial target of pyridomycin to be the NADH-dependent enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase InhA. Furthermore, they characterized the binding mode of **1** and **32** to InhA by X-ray crystallography. Partially guided by the structural findings, we gradually enlarged the C2-(*R*)-substituent of the analogs in size and attached putatively potency enhancing N6-acyl substituents, which were designed *in silico* by *Jens Kunze* at the ETHZ. Gratifyingly, the 2,1'-dihydropyridomycin analog with the C2-cyclohexyl substituent (**149**, MIC = 0.8 µg/mL) (*Figure II*) was found to be equipotent to **1**. However, the analogs carrying the *in silico*-designed acyl residues did not provide significant antimycobacterial activity.

Additionally, *in vitro* metabolic stability assays were carried out by Dr. *Reiner Aichholz* of the Novartis Institutes for Biomedical Research Basel, which demonstrated that **1** and **32** were readily hydroxylated if exposed to mouse and/or human liver microsomes. The observed poor metabolic stability of **1** and **32** prompted us to substitute the natural hydroxypicolinyl N6-substituent by putatively metabolically more stable acyl residues (analog **229** and **230**) (*Figure II*).

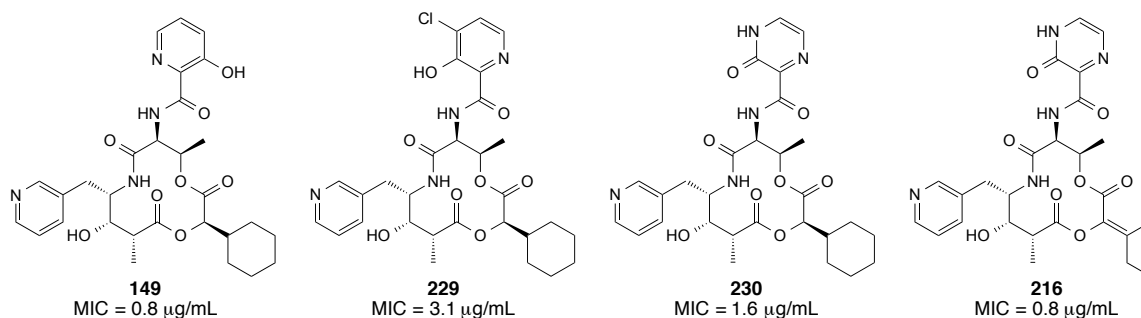


Figure II Pyridomycin analogs **149**, **229**, **230** and **216** synthesized in this thesis

Gratifyingly, the metabolic stability of 2,1'-dihydropyridomycin analogs could be improved by the attachment of electron-deficient acyl moieties at N6, while the antimycobacterial activity of the respective compounds was retained (MIC = 3.1 µg/mL (**229**) and 1.6 µg/mL (**230**)). As an alternative to the total synthesis of the natural product **1**, the semisynthetic analog **216** bearing a 3-oxo-3,4-dihydropyridinyl moiety at N6 was synthesized after selective cleavage of the N6-amide bond in the natural product **1** (*Figure II*). Out of the 23 pyridomycin analogs synthesized, compounds **229**, **230** and **216** represent the most promising lead candidates developed in this thesis.

The second project presented in this thesis concerns the synthesis of hypermodified epothilone A analogs (*Figure III*) for the generation of antibody-drug conjugates (ADCs). Epothilones (Epos) are naturally occurring microtubule-stabilizers that inhibit the growth of human cancer cells at low nM concentrations. While several Epo-derived compounds are investigated in clinical trials, the lactam analog of Epo B (Ixempra®) has been approved for the treatment of breast cancer.

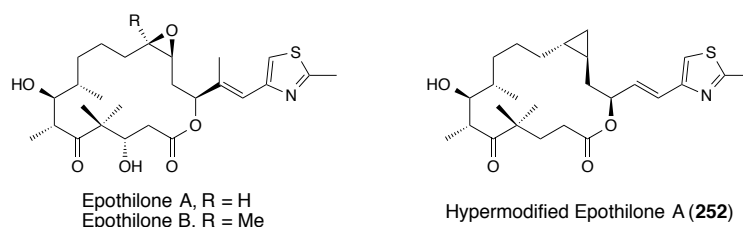
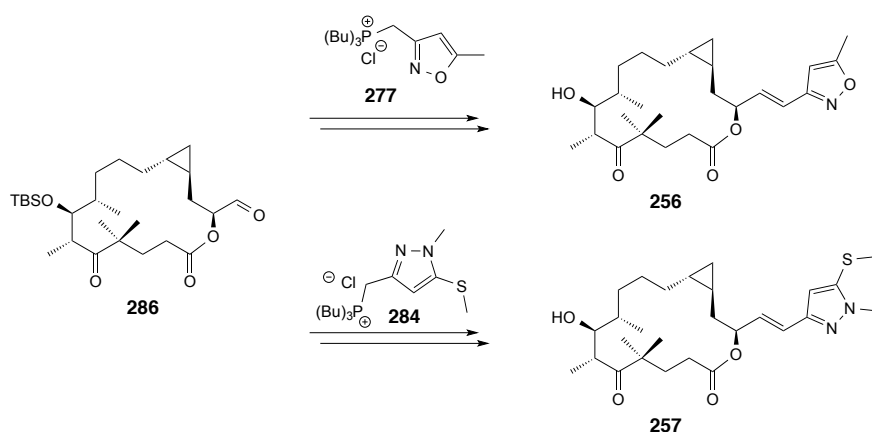


Figure III Naturally occurring epothilones A and B, as well as the hypermodified epothilone A (**252**)

A major drawback of Epos, and cytotoxic agents in general, is their lack of specificity for cancer cells. Therefore, increasing the compounds' tumor cell selectivity would significantly improve their therapeutic potential. In this context, the objective of this

project was to generate Epo-derived analogs which are active at low nM/sub-nM concentrations and readily accessible by total synthesis for the construction of ADCs. Hypermodified Epo A **252** (*Figure III*) had been previously synthesized in our group, and, due to its simplified structure compared to natural Epos, it can be obtained very efficiently. However, its activity ($IC_{50} = 103$ nM against the human lung cancer cell line A459) had to be improved by at least two orders of magnitude in order to be potent enough for the generation of ADCs.



Scheme II Synthesis of hypermodified epothilone A analogs **256** and **257**

For this purpose, two heterocycles (**277** and **284**), which had proven to be potency enhancing in other Epo analogs, were synthesized and coupled to the aldehyde functionality of hypermodified Epo A scaffold **286** in a *Wittig* reaction (*Scheme II*). Analogs **256** and **257** showed IC_{50} values of 0.29 nM (**256**) and 0.07 nM (**257**), respectively, against the human lung cancer cell line A549. They should thus be of sufficient potency for a potential use as drug payloads in ADCs.

ZUSAMMENFASSUNG

Tuberkulose (TB) ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, an der 2012 über 1.3 Millionen Menschen starben. Während man in den 1960er Jahren glaubte, die Krankheit unter Kontrolle zu haben, häufen sich in jüngster Zeit Krankheitsfälle sowohl in der Dritten, als auch in der Ersten Welt. Die Sterblichkeit wird durch Koinfektionen mit HIV und durch das Auftreten von mehrfach, sowie umfassend medikamentenresistenten (engl.: multi-/ extensively drug-resistant, MDR/XDR) Stämmen des Erregers *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) signifikant erhöht. Gleichzeitig nahmen die Anstrengungen in der Entwicklung neuer Medikamente in den vergangenen Jahrzehnten deutlich ab: lediglich ein Medikament mit einem neuartigen Wirkmechanismus (Sitruro®) wurde in den letzten 50 Jahren zugelassen. Die heutige Kombinationstherapie ist gegen XDR *Mtb* nur sehr beschränkt wirksam, weshalb die Entwicklung neuer Tuberkulosemedikamente, welche die Therapiedauer verkürzen und/oder gegen MDR/XDR Bakterien wirksam sind, dringend nötig ist.

Pyridomycin (**1**) (*Abb. 1*) ist ein bakterieller Naturstoff, der erstmals 1953 aus dem *Streptomyces* Stamm 6706 isoliert wurde. In der einzigen literaturbekannten Totalsynthese von **1** wurde über grosse Schwierigkeiten bei der Einführung der Enolester-Doppelbindung zwischen C2 und C1' berichtet; ein Problem, welches nicht zufriedenstellend gelöst werden konnte.

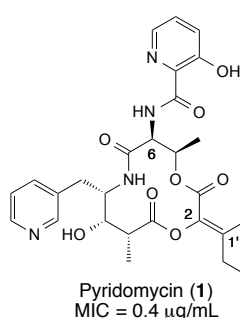
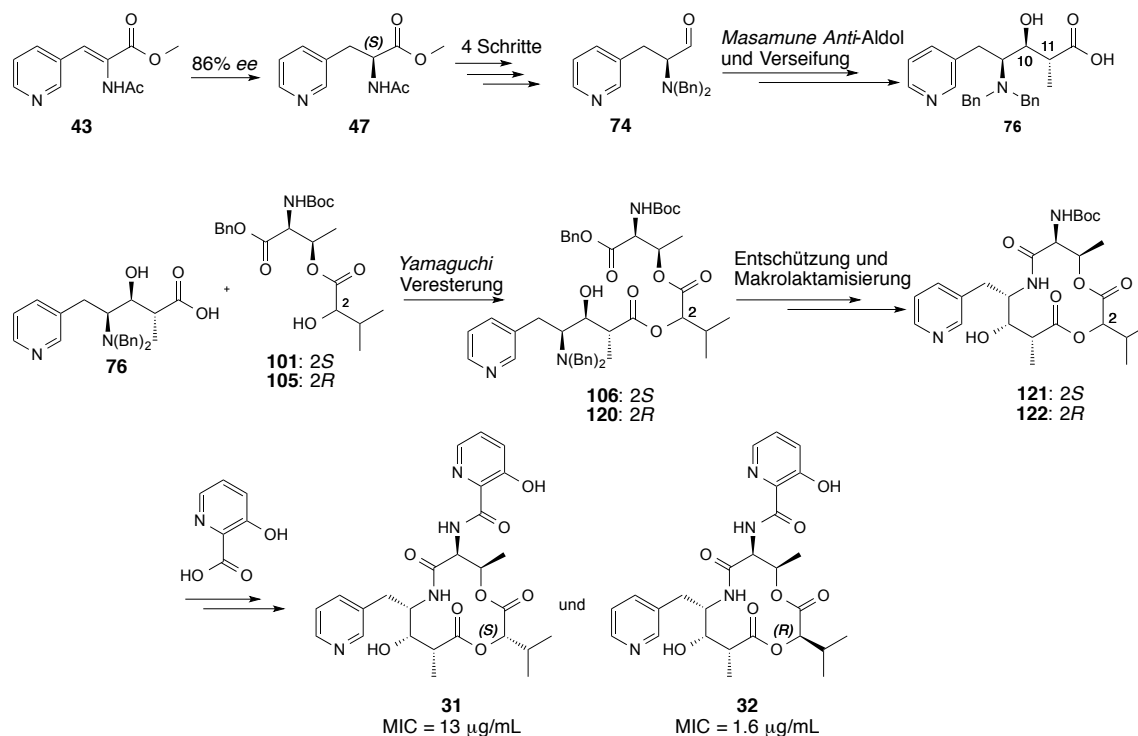


Abb. 1 Pyridomycin (**1**)

Pyridomycin wies *in vitro* eine signifikante antimycobakterielle Aktivität auf und zeigte ausserdem in Mäusen nur eine geringe systemische Toxizität; allerdings war das molekulare Ziel von **1** zu Beginn dieser Dissertation unbekannt. Die erwähnten Merkmale veranlassten uns, das Potential von **1** als Leitstruktur für die Entwicklung neuer anti-TB Medikamente zu erkunden. Um die Probleme bei der Einführung der

Doppelbindung zwischen C2 und C1' zu umgehen, und um herauszufinden, inwiefern die Enolester-Gruppierung eine Voraussetzung für die antimycobakterielle Aktivität von **1** darstellt, wurden die 2,1'-Dihydropyridomycin-Analoga **31** und **32** aus dem gemeinsamen westlichen Fragment **76** und dem jeweiligen (*S*)- bzw. (*R*)-konfigurierten östlichen Fragment **101** bzw. **105** synthetisiert (*Schema I*). Da das molekulare Ziel von **1** nicht bekannt war, konnte weder vorhergesagt werden, ob eine spezifische Konfiguration an C2 bevorzugt wäre, noch welche Konfiguration ((*S*) oder (*R*)) die günstigere wäre; dementsprechend wurden beide Analoga hergestellt. Die Synthese der Säure **76** begann mit einer *Erlenmeyer* Azlacton Reaktion von 3-Pyridincarboxaldehyd mit *N*-Acetylglycin zum (*Z*)-konfigurierten Ester **43**. Die (*S*)-Konfiguration des Esters **47** wurde durch eine enantioselektive Hydrierung mit Rh[(COD)((*R,R*)-DIPAMP)]BF₄ als Katalysator in 86% *ee* etabliert. Nach der Umwandlung des Esters **47** zum Aldehyd **74**, wurde als Schlüsselschritt für die Einführung der C10/C11 Stereozentren eine *Masamune Anti-Aldol* Reaktion durchgeführt (das Auxiliar wurde nach der Aldol-Reaktion in einer Verseifung abgespalten). Unter Verwendung der *Yamaguchi*-Reagenzien wurde die Säure **76** bei strikter Temperaturkontrolle mit den östlichen Fragmenten **101** bzw. **105** verestert (diese wurden durch eine Veresterung von Boc-L-Thr-OBn mit den *O*-TBS-geschützten (*S*)- bzw. (*R*)-Hydroxyisovaleriansäuren gewonnen).



Scheme 1 Zusammenfassung der Synthese der 2,1-Dihydropyridomycin Analoga **31** und **32**

Anschliessend wurden die Benzylschutzgruppen mittels einer Hydrogenolyse entfernt und der Ring durch eine HATU/DIEA-vermittelte Amidkupplung geschlossen. Die Endprodukte **31** und **32** wurden nach Entfernung der Boc-Gruppe und der Kopplung von 3-Hydroxypicolinsäure an die freie Aminogruppe erhalten.

Parallel zur Synthese der C2,C1'-gesättigten Analoga, wurde ausserdem versucht, eine neue Totalsynthese des Naturstoffs **1** zu entwickeln. Unglücklicherweise konnte keine befriedigende Methode zum Aufbau der Enolester-Gruppierung gefunden werden, weshalb das Ziel einer Totalsynthese von **1** zu Gunsten der Herstellung einer grösseren Zahl von 2,1'-Dihydropyridomycin-Analoga aufgegeben wurde.

Interessanterweise zeigten die Messungen zur Aktivität der Dihydropyridomycine **31** und **32**, dass das (*R*)-konfigurierte Analogon **32** ähnlich aktiv war wie der Naturstoff **1** (MIC = 1.6 µg/mL, 4-facher Aktivitätsverlust). Somit stellt die Enolester-Gruppierung keine zwingende Voraussetzung für die antimycobakterielle Aktivität von Pyridomycin-basierten Verbindungen dar. Ferner war ein signifikanter Unterschied zwischen den Aktivitäten von **31** und **32** zu beobachten: verglichen mit **1**, ist die (*S*)-konfigurierte Verbindung **31** 32-mal weniger aktiv gegen *Mtb* H37Rv (MIC = 13 µg/mL), während zu **32** ein 8-facher Unterschied besteht. Dementsprechend ist die Konfiguration am C2 bezüglich der Aktivität der Verbindungen von Bedeutung.

Parallel zu unseren synthetischen Arbeiten konnten Prof. *Stewart Cole* und Dr. *Ruben Hartkoorn* an der EPFL die NADH-abhängige Enoyl-[Acyl-Trägerprotein] Reduktase InhA als mycobakterielles Ziel von Pyridomycin identifizieren. Des weiteren konnten sie den Bindungsmodus von **1** und **32** an InhA mittels einer Röntgenkristallstruktur charakterisieren. Wir entschieden uns, den C2-(*R*)-Substituenten schrittweise zu vergrößern und (von *Jens Kunze*, ETHZ) *in silico* entworfene N6-Acylreste an den Makrozyklus zu koppeln, um die Aktivität der jeweiligen Analoga zu erhöhen. Dabei zeigte sich, dass das C2-Cyclohexyl Analogon **149** beinahe equipotent mit dem Naturstoff war (MIC = 0.8 µg/mL) (*Abb. II*). Dagegen wies keines der *in silico* entworfenen Analoga eine signifikante antimycobakterielle Aktivität auf.

Zusätzlich zu den Aktivitätsmessungen wurden von Dr. *Reiner Aichholz* vom Novartis Institut für Biomedizinische Forschung Basel metabolische Stabilitätsmessungen durchgeführt. Diese zeigten, dass sowohl **1**, als auch **32** durch tierische (Maus) und/oder menschliche mikrosomale Leberenzyme rasch hydroxyliert wurden. Um diesen Abbauprozessen entgegenzuwirken, wurde der natürliche N6-Substituent durch potentiell metabolisch stabilere Acylreste ersetzt (Verbindungen **229** und **230**) (*Abb. II*).

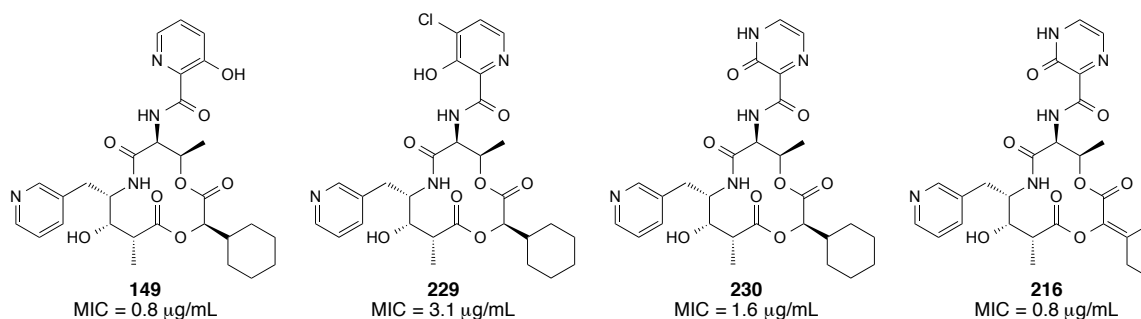


Abb. II Pyridomycin Analoga **149**, **229**, **230** und **216**, welche in dieser Dissertation synthetisiert wurden

Erfreulicherweise konnte die metabolische Stabilität der 2,1'-Dihydropyridomycin-Analoga durch den Einbau elektronenarmer N6-Acylreste erhöht werden, während deren antimycobakterielle Aktivität erhalten blieb (MIC = 3.1 µg/mL (**229**) und MIC = 1.6 µg/mL (**230**)). Als Alternative zur Totalsynthese von **1** wurde das semisynthetische Analogon **216**, welches einen 3-Oxo-3,4-dihydropyridazinyl-Rest an N6 trägt, hergestellt. Dafür wurde die N6-Amidbindung im Naturstoff selektiv mittels Zn in HCl/H₂O gespalten und die elektronenarme Säure an das freie Amin gekoppelt. Von den 23 Pyridomycin-Analoga, die in dieser Dissertation synthetisiert wurden, sind **229**, **230** und **216** die vielversprechendsten Leitstrukturen.

Der zweite Teil dieser Dissertation hatte die Synthese von hypermodifizierten Epothilon A Analoga zum Ziel (*Abb. III*), welche zur Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (AWKs) dienen sollen. Epothilone (Epos) sind Mikrotubuli-stabilisierende Naturstoffe, die das Wachstum menschlicher Krebszellen im tief nM Konzentrationsbereich inhibieren. Einige Epo-basierte Wirkstoffe werden in klinischen Studien untersucht, wobei das Lactam-Analogon von Epo B (Ixempra®) für die Behandlung von Brustkrebs zugelassen ist.

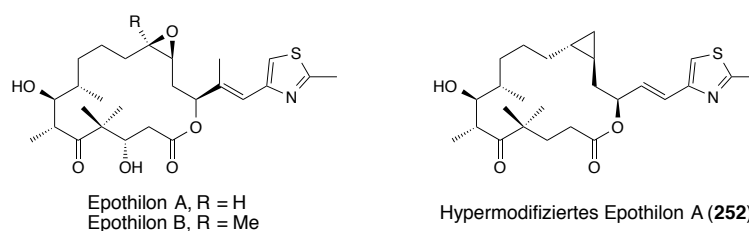
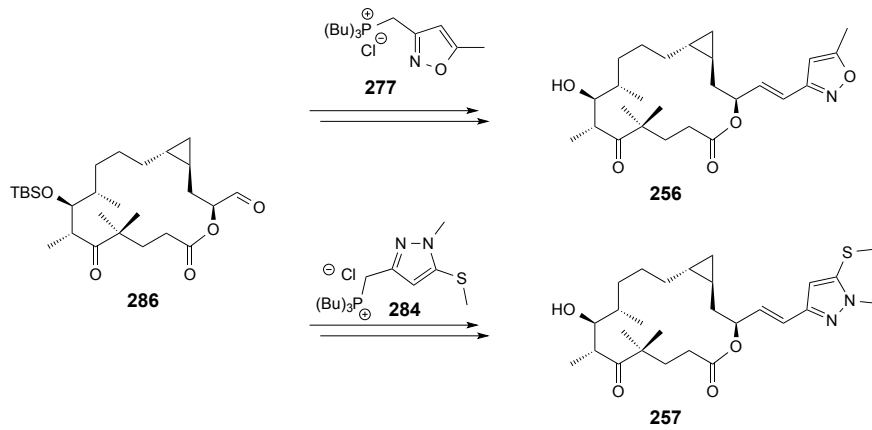


Abb. III Die natürlich vorkommenden Epothilone A und B, sowie das hypermodifizierte Epothilone A (252)

Ein grosser Nachteil der Epos, und von Zytostatika im Allgemeinen, ist die nicht vorhandene Spezifität für Krebszellen. Deshalb würde das therapeutische Potential dieser Verbindungen erheblich verbessert werden, wenn die Selektivität für Krebszellen erhöht würde. In diesem Zusammenhang war es das Ziel des Projekts, Epo-basierte Verbindungen herzustellen, die aktiv genug (bei tiefer oder sub-nM Konzentration) und synthetisch gut zugänglich sind, um AWKs zu erstellen. Das hypermodifizierte Epo A **252** (*Abb. III*) war bereits früher in unserer Gruppe hergestellt worden und ermöglicht aufgrund seiner vereinfachten Struktur im Vergleich zu Epo A eine einfachere Synthese. Die zytotoxische Aktivität ($IC_{50} = 103 \text{ nM}$ gegen die menschliche Lungenkrebszelllinie A459) ist allerdings nicht ausreichend für die Herstellung von AWKs.



Schema II Synthese der hypermodifizierten Epothilone A Analoga **256** und **257**

Um die Aktivität zu verbessern, wurden zwei Heterozyklen (**277** und **284**), die bereits bei anderen Epos zu erhöhten Aktivitäten geführt hatten, synthetisiert und in einer *Wittig* Reaktion an die Aldehydfunktion des hypermodifizierten Epo A Gerüsts **286** gekoppelt (*Schema II*). Die Verbindungen **256** und **257** wiesen im Vergleich zu **252** eine wesentlich höhere zytotoxische Aktivität auf (IC_{50} Werte von 0.29 nM (**256**) und 0.07 nM (**257**) gegen menschliche A549 Lungenkrebszellen) und sollten damit für die Herstellung von AWKs geeignet sein.