



Doctoral Thesis

Total synthesis of natural mycolactones and of mycolactone analogs and conjugates for structure-toxicity-relationship studies and the selection of antibodies

Author(s):

Gersbach, Philipp Rolf

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007558380> →

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. 20494

**Total Synthesis of Natural Mycolactones and of Mycolactone
Analogues and Conjugates for Structure-Toxicity-Relationship
Studies and the Selection of Antibodies**

A dissertation submitted to

ETH Zurich

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

Philipp Rolf Gersbach

Dipl. Natw. ETH Zurich

Born August 29th, 1980

Citizen of Wallbach AG, Switzerland

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, examiner

Prof. Dr. Dario Neri, co-examiner

2012

Summary

Mycolactones are a group of 12-membered macrolides which exhibit apoptosis-inducing and immunosuppressive properties (Figure A). Mycolactones A/B (**Ia/b**), C (**II**) and D (**III**) are causally involved in infections with the human pathogen *Mycobacterium ulcerans*, which leads to a necrotizing skin disease known as Buruli ulcer (BU). Structurally, all known mycolactones are based on a conserved extended core structure (Figure A); variations have only been found in the poly-unsaturated fatty acid side chain attached to C5-O.

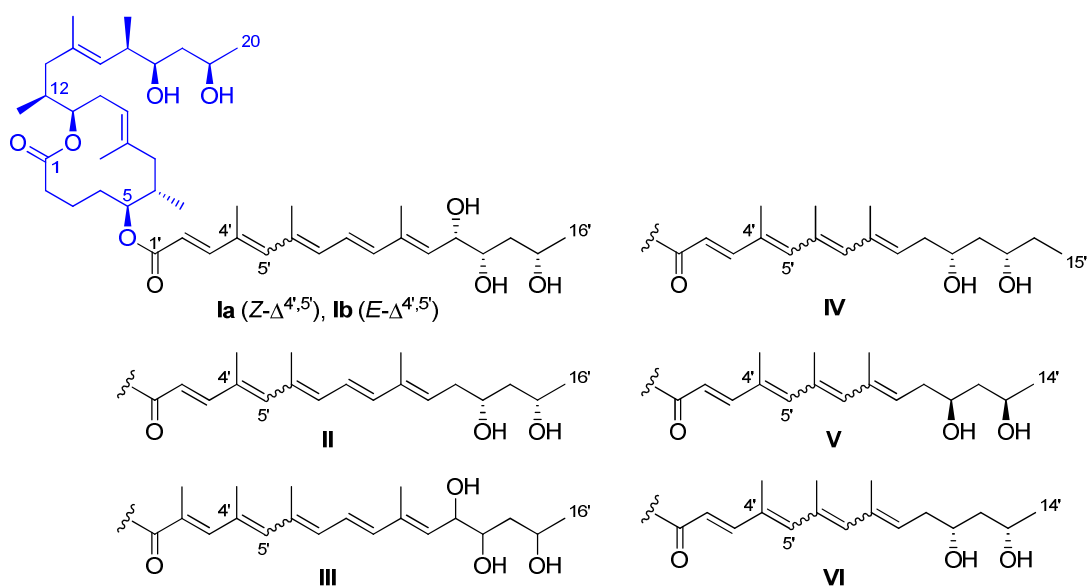


Figure A. The structures of natural mycolactones A/B (**Ia/b**), C (**II**), D (**III**), E (**IV**), F (**V**), and *dia*-F (**VI**). The conserved extended core structure common to all mycolactones is colored blue. The structure of **III** has not been fully elucidated.

The primary goal of this thesis was to provide different mycolactones in pure form and sufficient amounts for extensive biological evaluation. In addition, analog structures were to be devised in order to (i) establish a limited structure-toxicity relationship study on mycolactones, (ii) elucidate their cellular target(s) and (iii) generate monoclonal antibodies for therapeutic as well as diagnostic purposes. To this end, a novel efficient and highly stereoselective synthesis of the extended core structure **XI** was devised (Figure B). The synthesis of **XI** involved esterification of the advanced key intermediates **VII** and **VIII** followed by installation of the *E* double bond at C8 via ring-closing metathesis (RCM) and displacement of the tosylate group at C13 by iodide to give core lactone **IX**. The subsequent coupling reaction under modified Suzuki conditions with vinyl iodide **X** (thereby constructing the C13–C14 bond) proceeded to extended core structure **XI**.

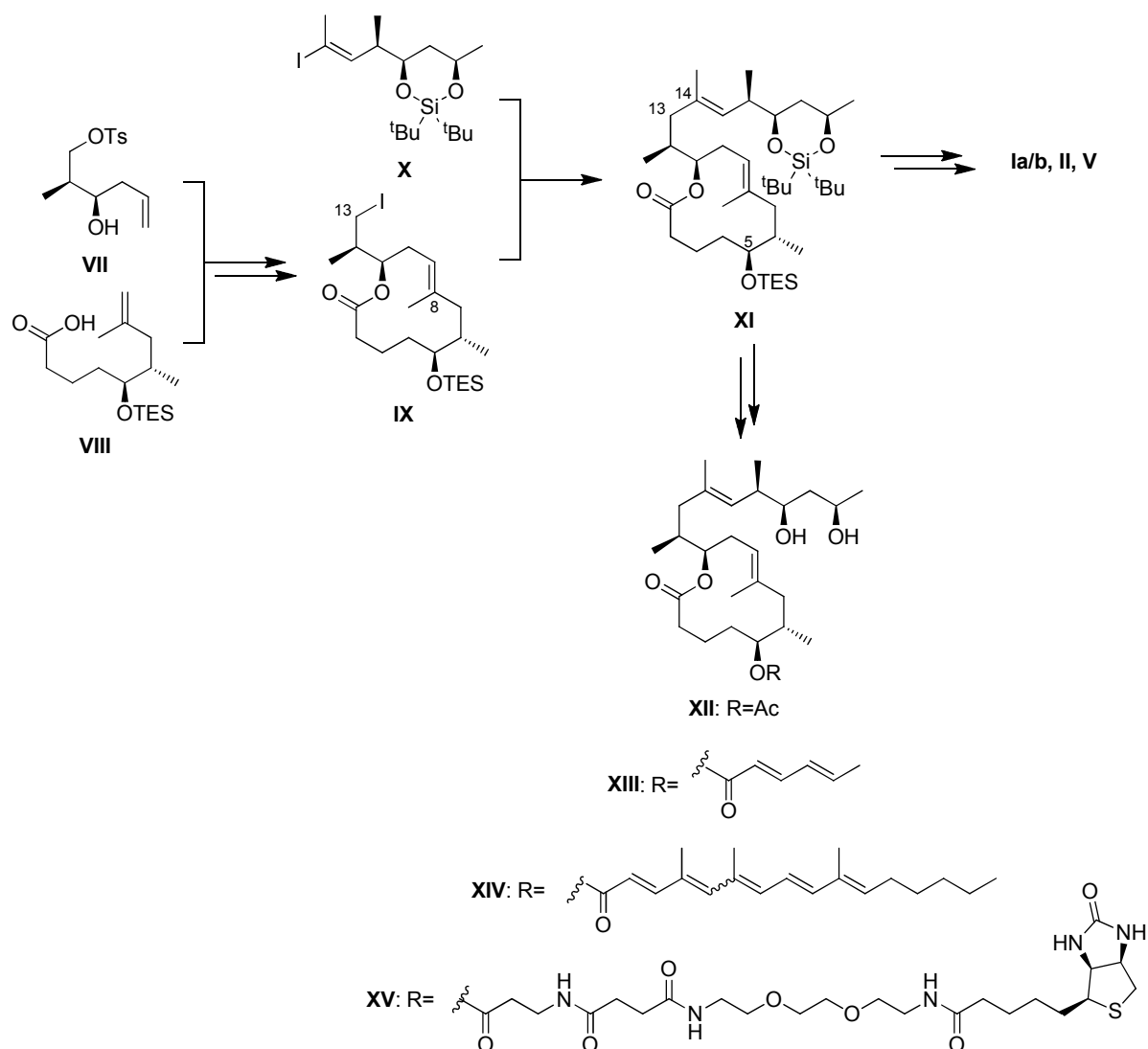


Figure B. Synthesis of mycolactones **Ia/b**, **II**, **V** and mycolactone analogs **XII-XV**.

In a four-step reaction sequence, involving selective C5-O deprotection of **XI**, esterification with the respective fatty acid and final two-step protecting group removal, **XI** was elaborated into natural mycolactones **Ia/b**, **II** and **V** (Figure B). Additionally, installation of an acetyl, sorbyl and a fully deoxygenated side chain in an analogous fashion resulted in simplified analogs **XII**, **XIII** and **XIV**, respectively. Removal of the TES group from **XI** followed by esterification with β -alanine and subsequent amide bond formation, to introduce a polyethylene glycol (PEG) linker attached to a biotin probe, gave analog **XIV**.

Additionally, a set of analogs featuring unnatural C20 modifications was synthesized from vinyl iodide **XVII** (Figure C); the latter was obtained from (*S*)-2-((4-methoxybenzyloxy)methyl)oxirane (**XVI**) in 11 steps. Coupling of **XVII** and alkyl iodide **IX** under previously established modified Suzuki conditions gave core structure **XVIII**, which

Zusammenfassung

Mycolactone sind eine Gruppe von cyclischen Polyketiden, die Apoptose auslösen und immunsuppressiv wirken (Abbildung A). Mycolactone A/B (**Ia/b**), C (**II**) und D (**III**) spielen eine wichtige Rolle bei der Infektion von Menschen mit *Mycobacterium ulcerans*, die eine als Buruli-Ulcer (BU) bezeichnete schwere Hauterkrankung auslösen. Alle bekannten Mycolactone weisen eine gemeinsame, konservierte Kernstruktur auf (Abbildung A). Strukturelle Unterschiede wurden bisher nur in der mehrfach ungesättigten Seitenkette an C5-O gefunden.

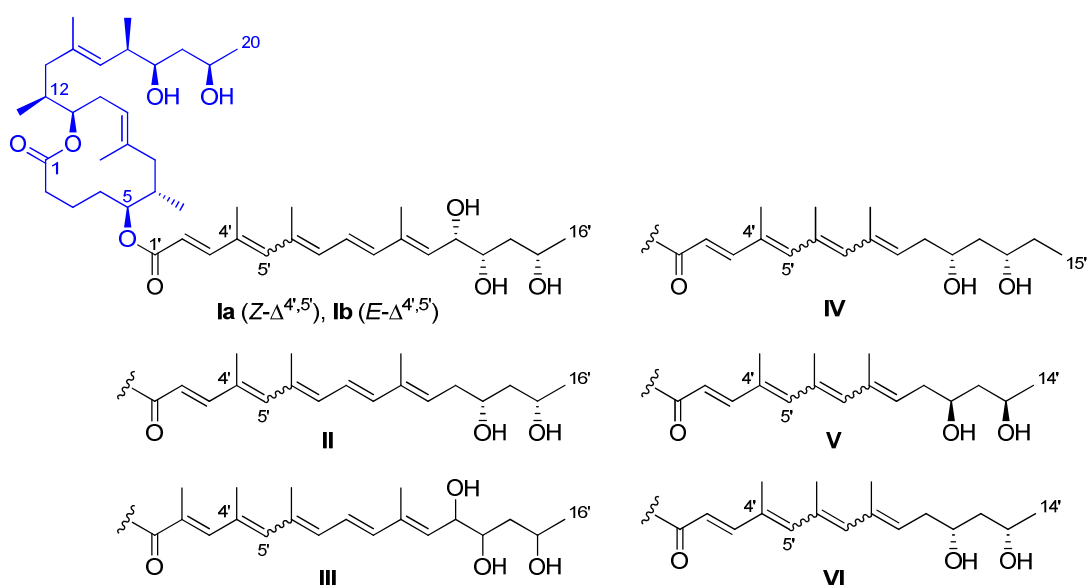


Abbildung A. Die Strukturen von Mycolacton (**Ia/b**), C (**II**), D (**III**), E (**IV**), F (**V**), und *dia*-F (**VI**). Die bei allen Mycolactonen konservierte erweiterte Kernstruktur ist blau hervorgehoben. Die Struktur von **III** wurde bisher nicht vollständig aufgeklärt.

Das Ziel dieser Dissertation war es, verschiedene Mycolactone rein und in ausreichender Menge für umfangreiche biologische Tests herzustellen. Zusätzlich wurden Mycolacton-Analoga synthetisiert um (i) erste Informationen zu Struktur-Toxizität-Beziehungen zu erhalten, (ii) Werkzeuge für das Auffinden der zellulären Zielstruktur(en) und die Aufklärung der molekularen Wirkmechanismen der Mycolactone bereitzustellen und (iii) monoklonale Antikörper zu generieren, die potentiell als Therapeutika, hauptsächlich aber für diagnostische Zwecke einsetzbar wären. Um diese Ziele zu erreichen wurde eine neue, effiziente und stereoselektive Synthese der erweiterten Kernstruktur **XI** entwickelt (Abbildung B). Für die Synthese von **XI** mussten zuerst die beiden Schlüsselfragmente **VII** und **VIII** verestert werden. Anschliessend wurde die *E*-Doppelbindung an C8 mittels Ringschlussmetathese

eingeführt und die Tosylatgruppe an C13 durch Iodid ersetzt, um zum Lacton **IX** zu gelangen. Durch eine nachfolgende Kupplungsreaktion unter modifizierten Suzuki-Bedingungen wurde die C13–C14 Bindung geknüpft, was die Synthese der erweiterten Kernstruktur **XI** abschloss.

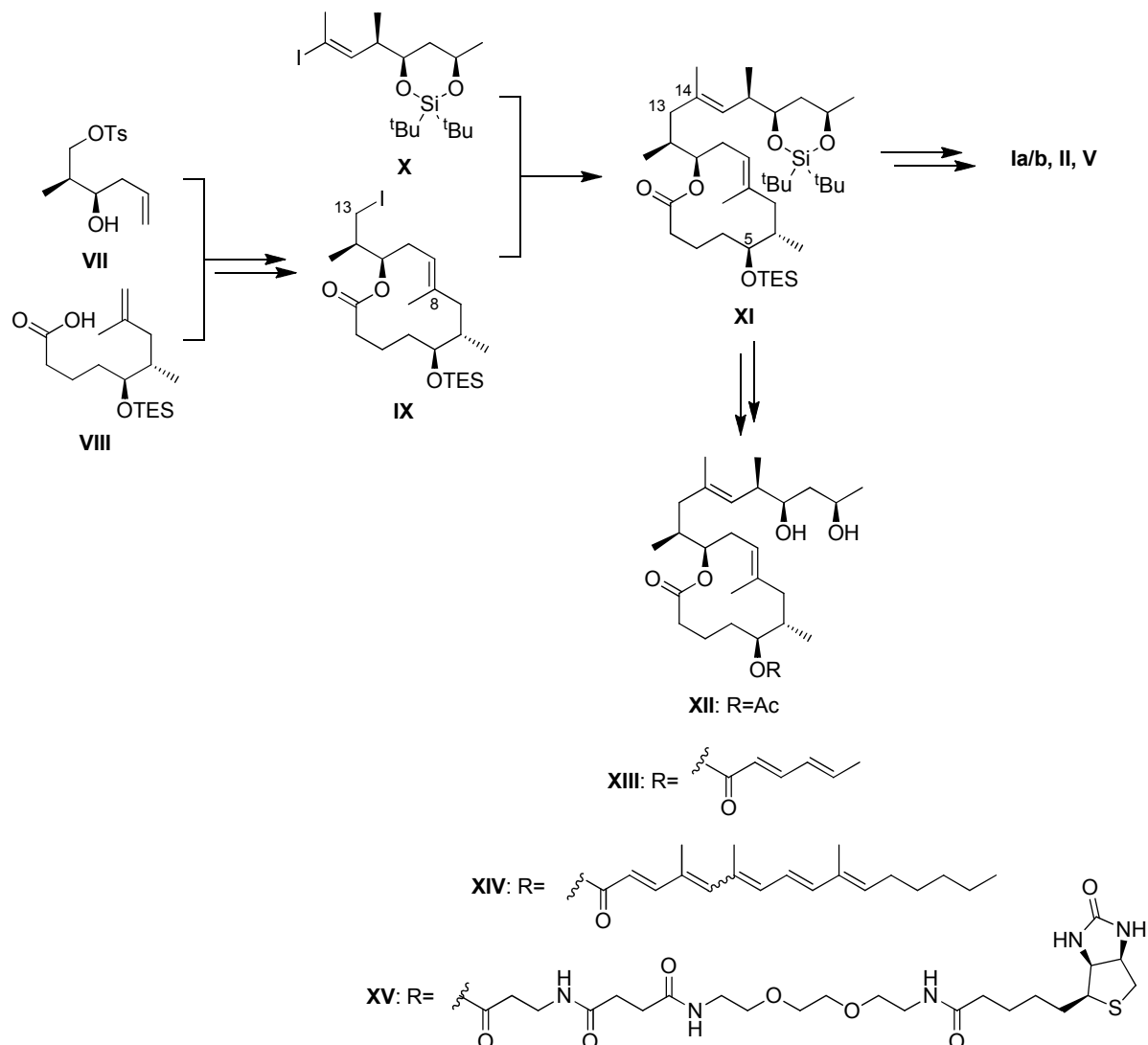


Abbildung B. Synthesen der Mycolactone **Ia/b**, **II**, **V** und der Mycolacton-Analoga **XII-XV**.

Ausgehend von Verbindung **XI** wurde in einer vierstufigen Reaktionssequenz über eine selektive C5-O-Desilylierung, eine Veresterung mit der entsprechenden Fettsäure und einem abschliessenden, zweistufigen Entschützungsverfahren die natürlichen Mycolactone **Ia/b**, **II** und **V** erhalten (Abbildung B). In gleicher Weise wurden zusätzlich die vereinfachten Analoga **XII**, **XIII** und **XIV** hergestellt, deren C5-OH Gruppe mit einem Acetyl- und Sorbylrest sowie mit einer vollständig desoxygenierten Fettsäuregruppierung an C5-O verestert ist. Die Entfernung der TES Schutzgruppe von **XI**, Veresterung der freien C5-OH

Gruppe mit Fmoc- β -Alanin und eine anschliessende Amidierungsreaktion (nach Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe) führten zum Biotin-modifizierten Analogon **XIV**.

Zusätzlich wurde eine Gruppe von Analoga synthetisiert, deren C-verknüpfte Seitenkette an C20 modifiziert ist (Abbildung C). Dafür wurde das Vinylidiodid **XVII** über 11 Schritte ausgehend von (*S*)-2-((4-Methoxybenzyloxy)methyl)oxiran (**XVI**) hergestellt. Eine Kupplungsreaktion von **XVII** mit dem Alkylidiodid **IX** unter den etablierten modifizierten Suzuki-Bedingungen lieferte dann Kernstruktur **XVIII**, die ihrerseits als Vorläufer für die Analoga **XIX**, **XX** und **XXI** diente. Analogon **XXI** ist über eine Carbamateinheit an C20 und eine Polyethylenglycol-Kette genau wie **VIV** mit einem Biotin-Rest verbunden.

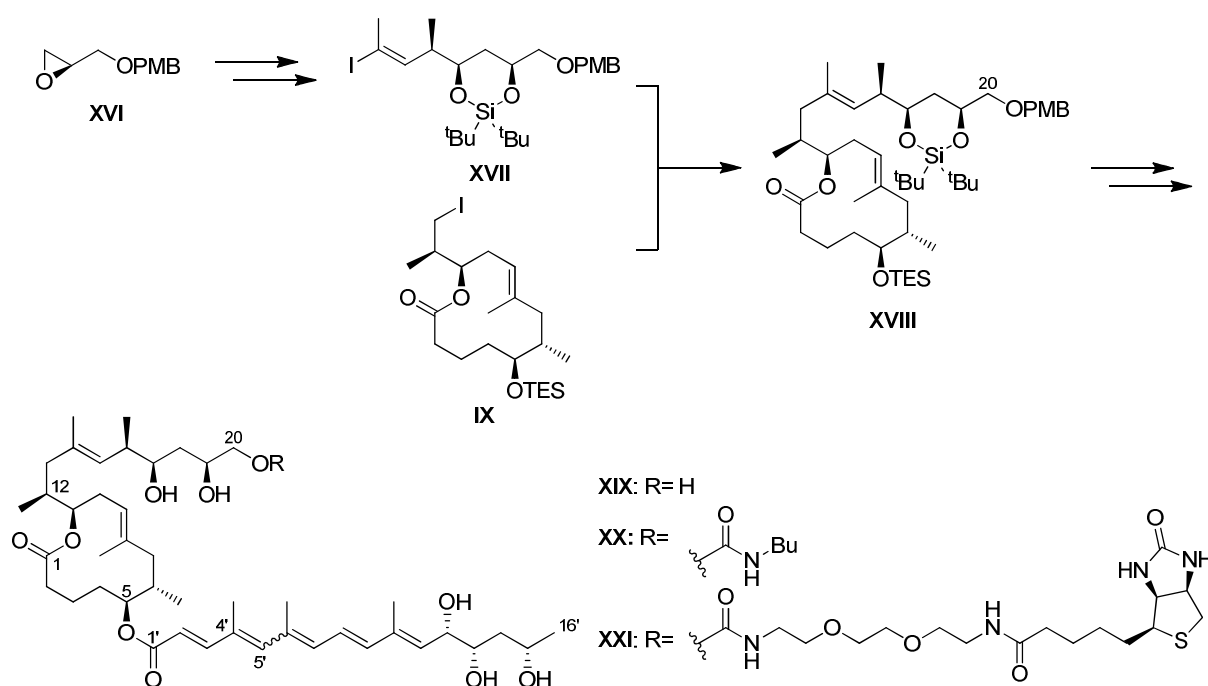


Abbildung C. Synthesen der Mycolacton-Analoga **XX-XXII**.

Mycolactone **Ia/b**, **II** und **V** sowie die Analoga **XII-XIV**, **XIX** und **XX** wurden auf ihre *in vitro* Zytotoxizität gegenüber L929 Maus-Fibroblasten getestet (Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. G. Pluschke am Schweizerischen Tropen- und Public Health-Institut, Basel). Aus den erhaltenen Daten lassen sich erste Schlussfolgerungen im Hinblick auf Struktur-Toxizitäts-Beziehungen der Mycolactone ableiten. Demnach führen C20-Modifikationen zu keinen grösseren Aktivitätseinbussen. Dagegen ist das Hydroxylierungsmuster in der mehrfach ungesättigten Seitenkette entscheidend für die biologische Aktivität der Mycolactone.

Zusätzlich wurden mittels der Phagen-Display-Technologie monoklonale Antikörper gewonnen, die Analogon **XV** spezifisch erkennen (Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. D. Neri, ETH Zürich). Die Tatsache, dass solche Antikörper generiert werden können, stellt einen wichtigen Schritt in Richtung der Entwicklung von Diagnostika zur frühzeitigen Erkennung einer BU-Erkrankung dar. Zusätzlich sind die Analoga **XV** und **XXI** wichtige Werkzeuge auf dem Weg zur Identifizierung der zellulären Zielstrukturen der Mycolactone, was letztendlich zu einer Aufklärung des Wirkmechanismus dieser bakteriellen Toxine führen würde.