

DISS. ETH NO. 21140

**Synthesis and Biological Profiling of Epothilone Analogs and of an
Epothilone Peptide Conjugate for Tumor Targeting**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Fabienne Zdenka Gaugaz

MSc Pharm. Sc. ETH Zürich
Eidg. Dipl. Apothekerin ETH Zürich
Born January 2nd, 1984
citizen of Bofflens VD, Genève GE and Czech Republic

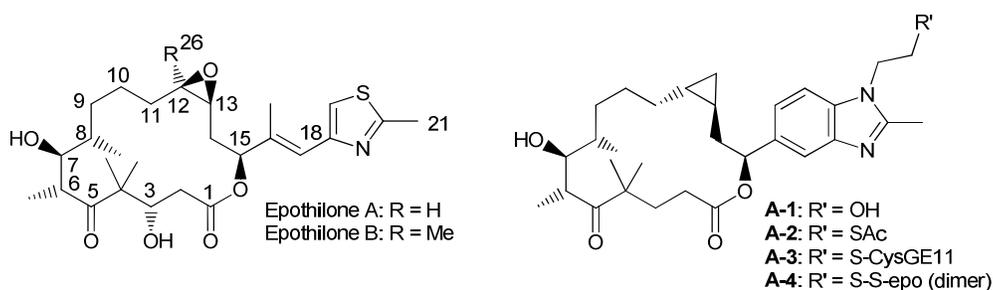
accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, examiner
Prof. Dr. Dario Neri, co-examiner

Zürich, 2013

Abstract

Epothilones are 16-membered macrolactones which were isolated from the myxobacterium *Sorangium cellulosum* strain So ce90. They are potent antiproliferative agents in vitro and in vivo and retain their potency in multidrug resistant models. Their biological activity is mediated by the stabilization of microtubules, which are important proteins of the cytoskeleton, i. e. by a taxol-like mechanism. The stabilization of microtubules leads to cell-cycle arrest in the G₂/M phase of the cell cycle and subsequently to apoptosis. Several epothilones entered clinical trials over the past ten years and ixabepilone, the epothilone B lactam, was successfully launched by BMS in 2007.

As many cytotoxic agents, the epothilones do not discriminate between normal and cancer cells, which leads to numerous undesirable effects. Their therapeutic utility would greatly benefit from an increase in tumor cell selectivity. This issue was addressed within this thesis and in a first step led to the development of epothilone analogs with an easily addressable attachment site for targeting moieties.



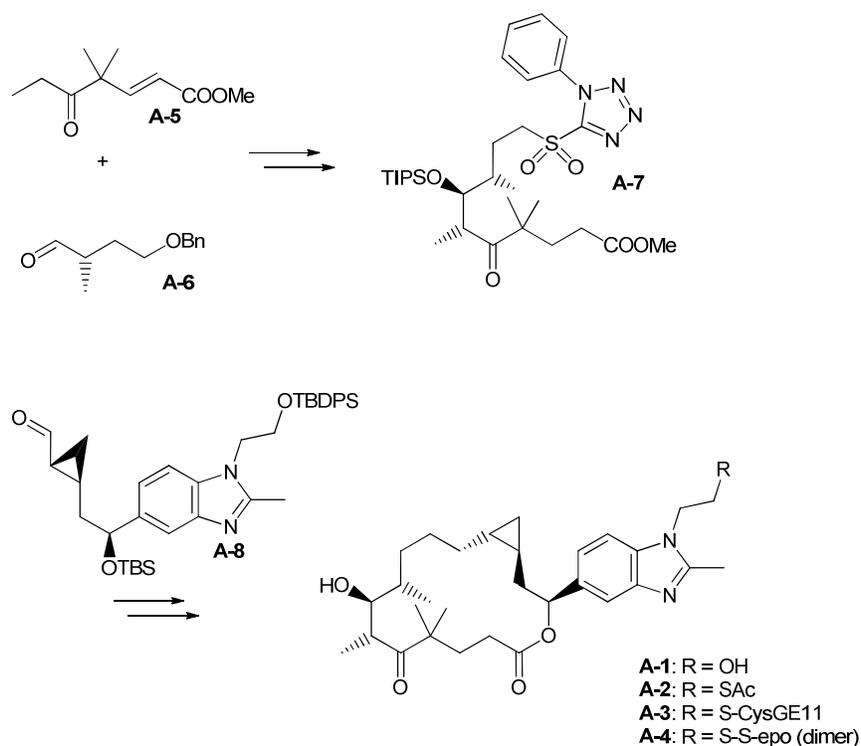
The epoxide ring was replaced by a metabolically more stable trans-cyclopropane moiety. The side chain was rigidified using a benzimidazole moiety, which has been shown to enhance the antiproliferative activity of other epothilone analogs. The benzimidazole system was substituted with a hydroxyethyl group for the attachment of the targeting moiety. In addition, the hydroxyl group at C3 was removed, which facilitated the synthesis.

The epidermal growth factor receptor (EGFR) was to be investigated as a target to achieve selectivity for cancer cells. The EGFR is overexpressed in numerous types of solid tumors such as colorectal, bladder or breast carcinoma. The peptide GE11 – YHWYGYTPQNVI – was previously identified to selectively bind to EGFR and to internalize upon binding. Therefore, GE11 was selected as a targeting moiety for epothilone analogs; a cysteine residue was introduced at the N-terminus of GE11 to allow conjugation to a thiol bearing epothilone analog.

The epothilone GE11 conjugate **A-3** was expected to be internalized upon binding to EGFR. The disulfide was expected to be reduced in the endosome and the epothilone to be released. The epothilone peptide conjugate **A-3** should be essentially inactive in cells not overexpressing EGFR, while it should exhibit its full antiproliferative activity in cells overexpressing EGFR.

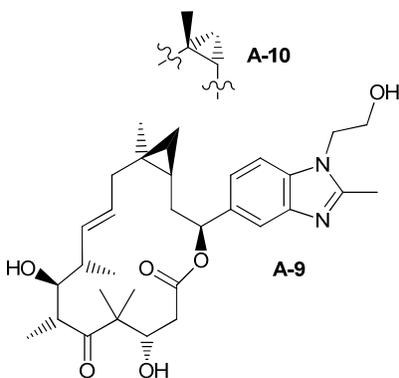
The synthesis of epothilone analogs **A-1** – **A-4** is summarized in Scheme A-1. The synthesis of the western part of the new epothilone analogs relied on an aldol reaction between keto ester **A-5** and α -chiral aldehyde **A-6**. The eastern building block **A-8** was developed from 4fluoro3nitro benzoic acid in 29% yield over 12 steps and took advantage of a Brown allylation to install the stereocenter at C15, a cross metathesis to provide the required E-configured double bond, and of a highly

diastereoselective Charett cyclopropanation to obtain the trans-cyclopropyl moiety. Both building blocks **A-7** and **A-8** were joined by a Julia-Kocienski olefination in 72% yield and the ring was closed with a Yamaguchi macrolactonization. Deprotection gave access to epothilone **A-1**, while subsequent Mitsunobu reaction with thioacetic acid followed by deprotection provided thioacetate epothilone **A-2**. Cleavage of the acetate provided epothilone **A-4** as a homodisulfide. Activation of **A-2** as a mixed disulfide allowed conjugation with the CysGE11 peptide to provide conjugate **A-3** in 36% after HPLC.

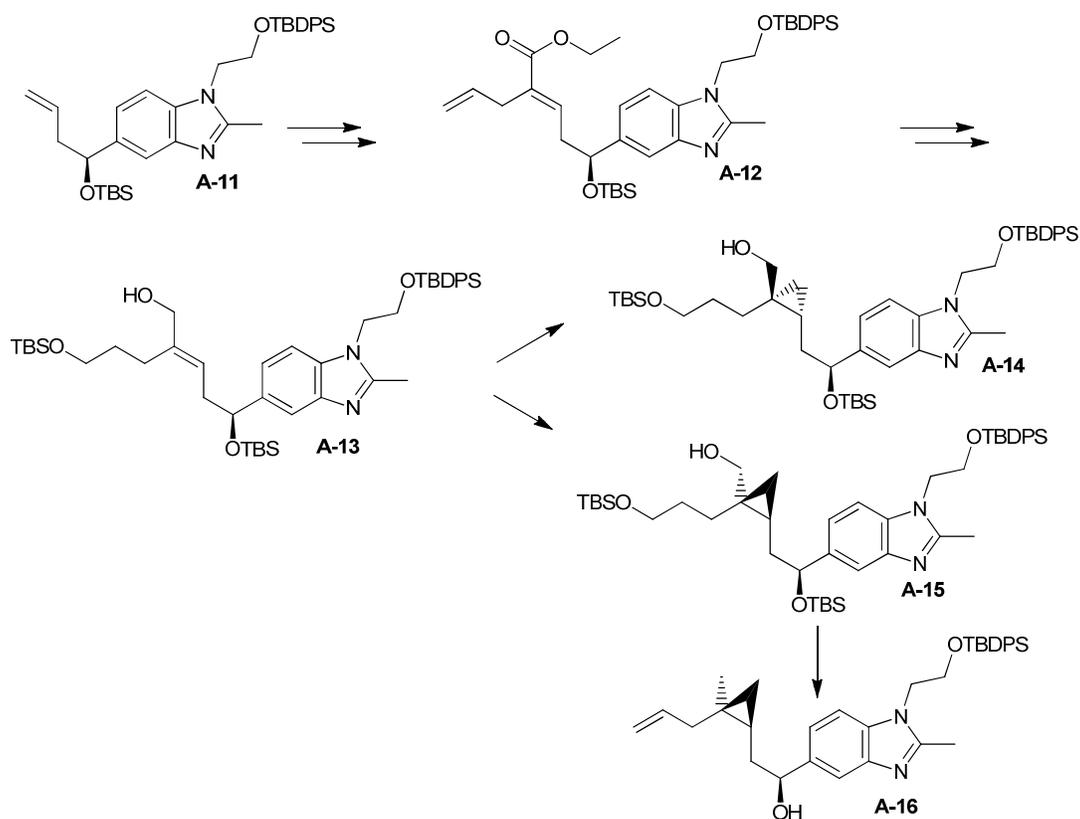


Scheme A-1: Summary of the total synthesis of trans-cyclopropyl epothilone analogs **A-1** – **A-4**

A further aim of this thesis was the investigation of the influence of the configuration of the C12 and C13 stereocenters in cyclopropane-based epothilone analogs on biological activity, as it was unclear whether the unnatural configuration would lead to a complete loss of cytotoxic activity. This research was also based on target structures that incorporate an additional functionality, such that they would, in principle, also be suited for conjugation with tumor-targeting moieties. While it was first attempted to synthesize the corresponding aminoethyl analogs, synthetic difficulties led to the redefinition of the target structures towards the corresponding hydroxyethyl analogs **A-9** and **A-10**.

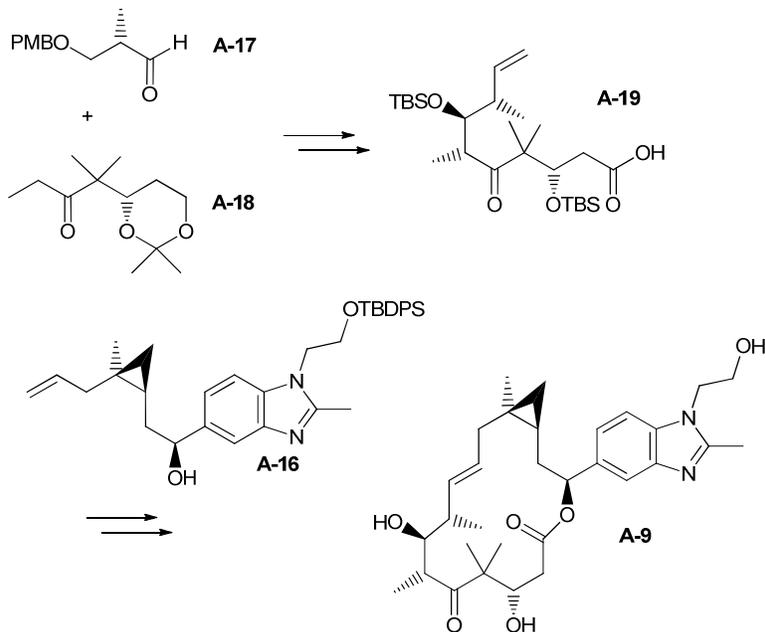


The key step in the synthesis of the western building block for these analogs was again an aldol reaction, this time between Schinzer ketone **A-18** and α -chiral aldehyde **A-17** (Scheme A-2). The initial steps in the synthesis of the eastern fragment up to the Brown allylation to install the C15 stereocenter were identical to the approach described for the above trans-cyclopropyl analogs. A Wittig reaction was then used to introduce the C12-C13 E-double bond to produce olefin **A-12**. As the cyclopropanation of the trisubstituted double bond in presence of the terminal olefin moiety was not effective, the terminal double bond was hydroborated and protected to be re-introduced later by Grieco-Sharpless olefination. The allylic alcohol **A-13** was the common precursor for the Charette cyclopropanation, where two different ligands were used to provide the desired diastereomers **A-14** and **A-15** (Scheme A-2).



Scheme A-2: Summary of the synthesis of the eastern building block of side chain-modified cyclopropyl epothilone B analogs

After dehalogenation and Grieco-Sharpley olefination, the eastern building block **A-16** could be esterified with the western fragment **A-19** under Yamaguchi conditions in quantitative yield. A ring closing metathesis then provided the macrolactone ring in 57%, which gave rise to the 12R,13S-configured cyclopropyl epothilone **A-9** and, analogously, to the 12S,13R-configured derivative **A-10**.



Scheme A-3: Summary of the total synthesis of side chain modified cyclopropyl epothilone B analog epothilone **A-9**

Epothilones **A-1** and **A-9** proved to be strong cytotoxic agents with a high binding affinity for microtubules. Their IC_{50} values in 7 different cell lines ranged from 2 to 40 nM. The derivative **A-2** was about 10 fold less potent than **A-1**.

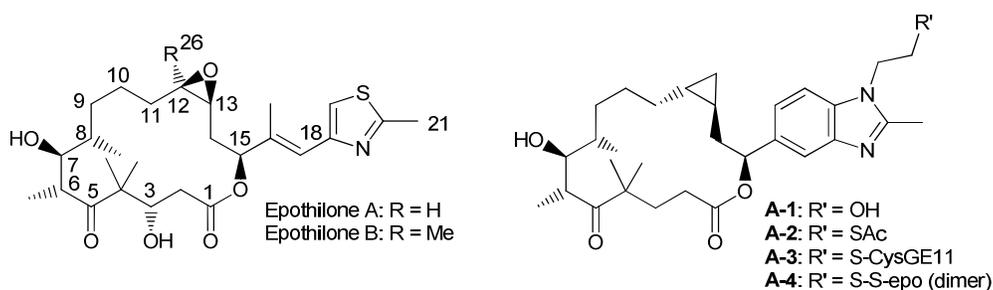
Conjugate **A-3** was readily cleaved by glutathione but was stable in cell culture medium. It showed a stronger cytotoxic activity in A431 cells than in SW480 (IC_{50} 87 and 209 nM), which proportionally express less EGFR. In HEK293 cells, which do not express EGFR, the IC_{50} amounted to 36 nM, which was thought to be due to the reduction of the disulfide bond by the glutathione effluxed by those cells. **A-4** was used as a non-targeted control in these assays and showed 10 nM IC_{50} in both A431 and SW480 cells.

Large differences were found in the cytotoxicity of the 12R,13S and 12S,13R epothilone analogs **A-9** and **A-10**. The unnaturally configured **A-10** had IC_{50} values in the micromolar range in 39 cell lines (20 to 1000 fold higher than for **A-9**) and had only a very low affinity for microtubules. Immunofluorescence experiments showed short microtubule bundles similar to those observed with **A-9**, albeit at much higher concentrations. The natural 12R,13S configuration proved to be crucial for the microtubule-stabilizing activity of the cyclopropyl epothilone B analog **A-9**, however it cannot be concluded from this study that there is or is not a different cellular target than microtubules based on the cytotoxic activity of **A-10**.

Résumé

Les épothilones sont des macrolactones à 16 chaînons qui ont été isolés des fermentations de la myxobactérie *Sorangium cellulosum* de souche So ce90. Leur cytotoxicité in vitro et in vivo, de même que contre des modèles multirésistants est remarquable. Leur mécanisme d'action est basé sur la stabilisation des microtubules, qui sont d'importantes protéines du cytosquelette, et ceci d'une manière similaire au taxol. La stabilisation des microtubules a pour conséquence l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M, puis l'apoptose. Plusieurs épothilones sont entrées en études cliniques et l'une d'entre elles, ixabepilone, le lactame de l'épothilone B, a été commercialisée par BMS en 2007.

Comme beaucoup d'agents cytotoxiques, les épothilones ne font pas la différence entre les cellules normales et les cellules cancéreuses, ce qui conduit à de nombreux effets indésirables. Leur utilité thérapeutique bénéficierait grandement d'une augmentation de la sélectivité pour les cellules cancéreuses. Ce problème a été abordé dans le cadre de cette thèse et a conduit au développement d'analogues d'épothilones avec un site d'attachement accessible pour des ligands de ciblage.



L'époxide a été remplacé par un trans-cyclopropane, plus stable métaboliquement. La chaîne latérale a été rigidifiée par l'insertion d'un benzimidazole, qui avait démontré une augmentation de la cytotoxicité dans d'autres analogues d'épothilones. Le benzimidazole porte un groupe hydroxyéthyle pour l'attachement de ligands de ciblage. D'autres modifications incluent la déhydroxylation à la position C3 du macrocyle, qui facilite considérablement la synthèse.

Le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) est la cible choisie pour augmenter la spécificité envers les cellules cancéreuses dans ce projet. EGFR est surexprimé dans de nombreux types de tumeurs solides, comme par exemple les tumeurs colorectales, de la vessie ou du sein. Le peptide GE11 – YHWYGYTPQNVI – a été identifié comme ligand spécifique d'EGFR et est internalisé après avoir été reconnu par le récepteur. Une cystéine a été introduite à l'extrémité N-terminale du peptide GE11 pour pouvoir le conjuguer avec un analogue d'épothilone portant un thiol.

Il est anticipé que le conjugué de l'épothilone et du peptide GE11 **A-3** sera internalisé après s'être lié à EGFR. Le disulfure sera réduit dans l'endosome et l'épothilone sera libérée. Le conjugué **A-3** devrait être inactif dans les cellules qui n'expriment pas EGFR mais devrait être fortement cytotoxique pour les cellules surexprimant EGFR.

Le schéma A-4 résume la synthèse des analogues **A-1** à **A-4**. L'épothilone a été divisée en une partie occidentale et une partie orientale. Le fragment occidental est construit à partir de l'aldéhyde α -chiral **A-6** et du céto-ester **A-5** qui sont couplés par une réaction aldol. La partie orientale A-8 a été synthétisée à partir de l'acide 4fluoro3nitro benzoïque en 29% de rendement et 12 étapes. Une allylation de Brown permet l'installation du centre stéréogène en C15. Une métathèse croisée est

utilisée pour installer la double liaison de configuration E, qui est ensuite cyclopropanée en utilisant la procédure diastéréosélective de Charette. Les fragments **A-7** et **A-8** sont couplés par une oléfination de Julia-Kocienski avec 72% de rendement et le cycle a été formé par une macrolactonisation de Yamaguchi. La déprotection du macrocycle a fourni l'épothilone **A-1**, tandis qu'une réaction de Mistunobu avec l'acide thioacétique suivie de la déprotection a fourni l'analogue **A-2**. Le clivage de l'acétate a fourni l'épothilone **A-4** sous forme de disulfure, tandis que l'activation d'**A-2** comme disulfure mixte a permis sa conjugaison avec le peptide CysGE11 pour obtenir le conjugué **A-3** avec un rendement de 36% après HPLC.

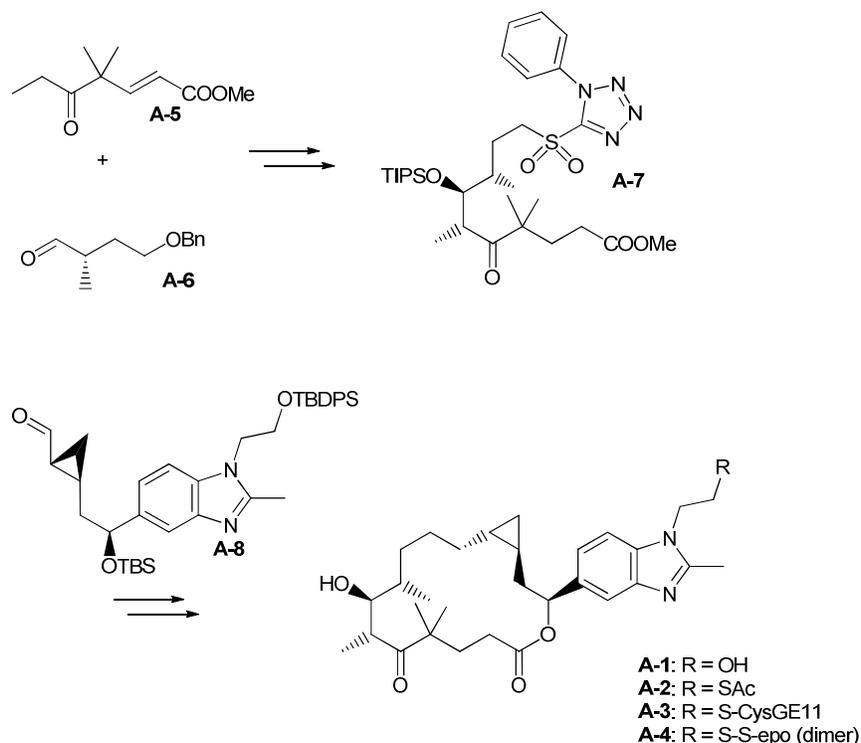
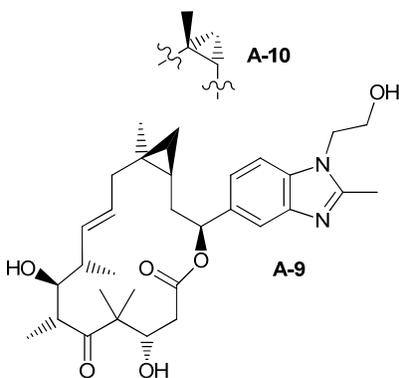


Schéma A-4: Résumé de la synthèse totale des dérivés d'épothilones **A1-A4**

Le but suivant de cette thèse était l'étude de l'influence de la configuration du cyclopropane en C12-C13 sur l'activité biologique des épothilones, puisqu'une incertitude existait quant à la perte totale d'activité de la configuration non-naturelle. Cette recherche est basée sur des structures comportant également un site d'attachement pour des groupes fonctionnels supplémentaires et seraient en principes aptes à être conjuguée avec des ligands ciblant les cellules cancéreuses. Le composé comportant une chaîne latérale aminoéthyle était le premier objectif, mais des difficultés synthétiques ont conduit à une redéfinition des priorités en faveur du composé avec une chaîne latérale hydroxyéthyle.



L'étape clé conduisant à la synthèse de la partie occidentale était à nouveau une réaction aldol, cette fois entre la cétone de Schinzer **A-18** et l'aldéhyde α -chiral **A-17**. Les premières étapes de la synthèse du fragment oriental jusqu'à l'allylation de Brown sont identiques à l'approche décrite ci-dessus. Une réaction de Wittig a permis l'introduction de l'alcène en C12-C13, fournissant l'alcène de configuration E **A-12**. La cyclopropanation de l'alcène trisubstitué en présence d'un alcène terminal étant ineffective, l'alcène terminal a été hydroboré et protégé pour être réintroduit plus tard par oléfination de Grieco-Sharpless. L'alcool allylique **A-13** était le précurseur commun de la cyclopropanation de Charette, où deux ligands différents ont été utilisés pour générer le diastéréomère désiré (**A-14** et **A-15**, schéma A-5).

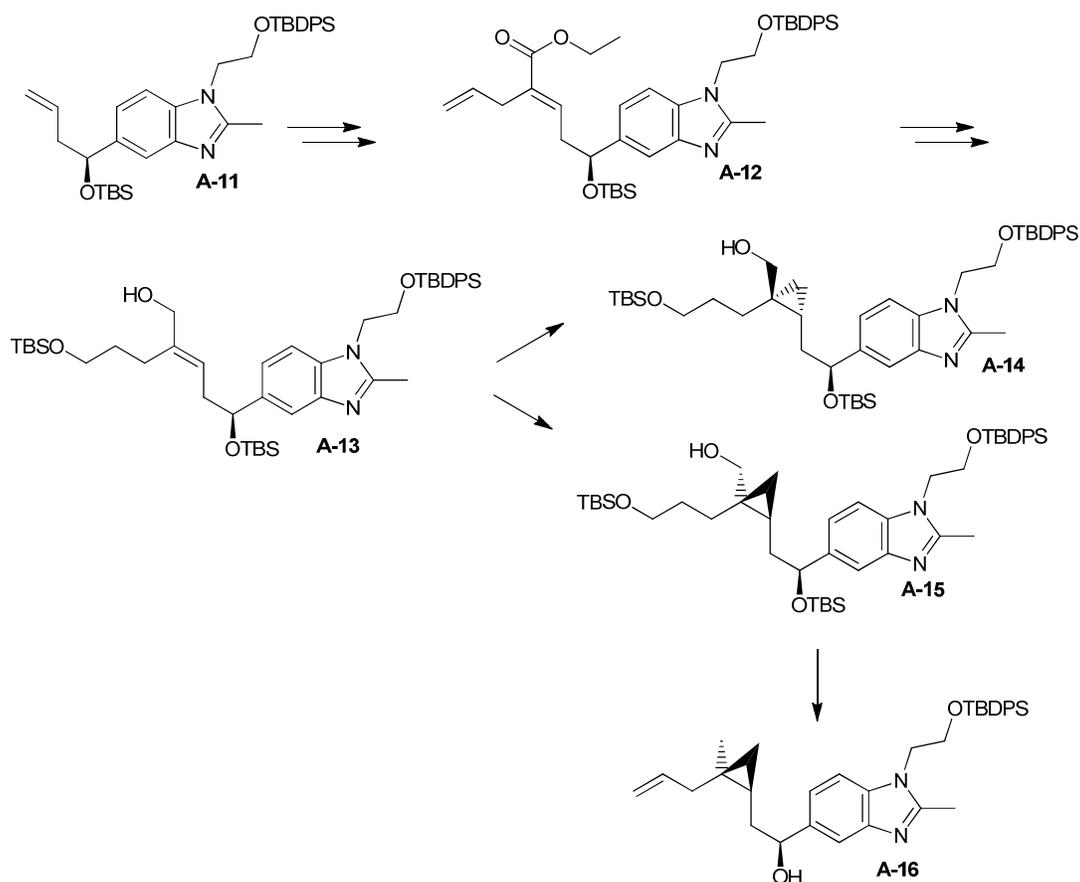


Schéma A-5: Résumé de la synthèse du fragment oriental

Après déhalogénération et oléfination de Grieco-Sharpless, le fragment oriental **A-16** a été esterifié avec le fragment occidental **A-19** avec la procédure de Yamaguchi de manière quantitative (schéma A-6). Une métathèse de fermeture de cycle a fourni le macrocycle en 57%. La déprotection a ensuite fourni l'analogue d'épothilone de configuration 12R,13S (**A-9**) et de manière similaire la configuration 12S,13R (**A-10**).

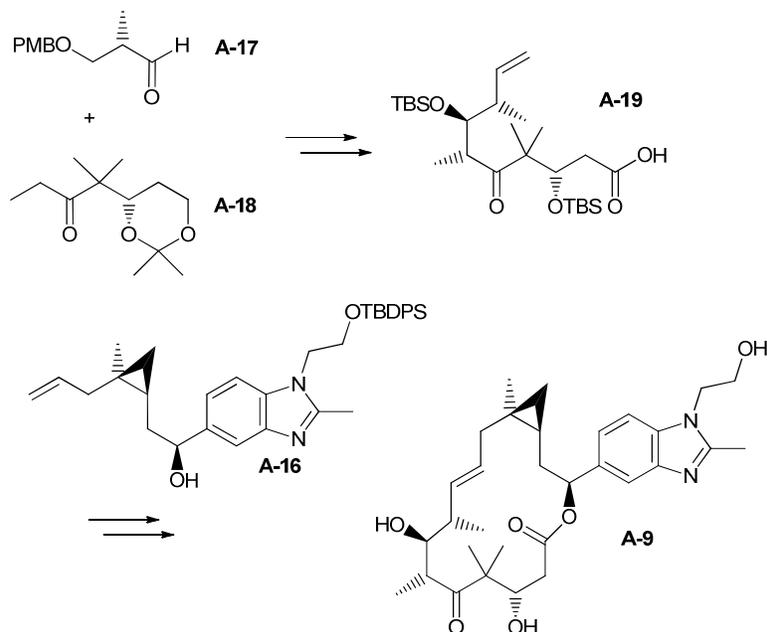


Schéma A-6: Résumé de la synthèse totale de l'analogue **A-9**

Les épothilones **A-1** et **A-9** ont démontré une forte cytotoxicité ainsi qu'une haute affinité de liaison pour les microtubules. Leurs IC_{50} dans sept lignées cellulaires varient entre 2 et 40 nM. Le dérivé **A-2** était dix fois moins puissant qu'**A-1**.

Le conjugué **A-3** a été rapidement clivé par le glutathion mais était stable en milieu de culture cellulaire. Il a démontré une cytotoxicité plus élevée dans des cellules A431 que dans des cellules SW480 (IC_{50} 87 et 209 nM), ces dernières exprimant proportionnellement moins d'EGFR. Dans des cellules HEK293, qui n'expriment pas EGFR, l' IC_{50} s'est élevé à 36 nM, ce qui a été attribué à une plus haute concentration d'espèces réductives effluxées par cette lignée cellulaire dans le milieu extracellulaire. **A-4** a été utilisé comme contrôle négatif dans ces expériences et a démontré une cytotoxicité constante dans les cellules A431 et SW480, avec 10 nM.

De grande différences de cytotoxicité ont été observées pour les analogues de configuration 12R,13S et 12S,13R **A-9** et **A-10**. **A-10**, avec sa configuration non-naturelle, avait des valeurs d' IC_{50} micromolaires dans 39 lignées cellulaires - de 20 à 1000 fois plus élevées que celles d'**A-9** - et n'avait que peu d'affinité pour la tubuline. Des fagots de microtubules courts similaires à ceux causés par **A-9** ont été observés lors d'expériences d'immunofluorescence avec **A-10**, bien qu'à des concentrations nettement plus élevées. La configuration naturelle 12R,13S est cruciale pour une rétention de la stabilisation des microtubules par les épothilones, mais cette étude ne permet pas d'exclure ou de confirmer l'existence d'une cible différente des microtubules se basant sur la cytotoxicité d'**A-10**.