

Diss. ETH No. 21597

**Total Synthesis of Cyclopropyl-Epothilone B Analogs**  
**and**  
**Studies Towards the Total Synthesis of Michaelide E**

A dissertation submitted to

ETH Zurich

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

**Raphael Schiess**

M.Sc. ETH Zurich

Born August 6<sup>th</sup> 1978

Citizen of Herisau AR, Switzerland

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, examiner

Prof. Dr. Antonio Togni, co-examiner

2013

## Abstract

Epothilones (Figure 1) are naturally occurring microtubule-stabilizers that inhibit the growth of human cancer cells at nM or even sub-nM concentrations. Based on their attractive preclinical profile the epothilones have served as important lead structures in the search for improved anticancer drugs. These efforts have led to the identification of nine epothilones that were investigated in clinical trials, with the approval of the epothilone B lactam ixabepilone (Ixempra<sup>®</sup>) for the treatment of breast cancer as the most tangible result.

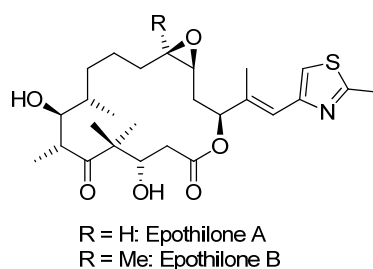


Figure 1: Naturally occurring epothilones; Epo A and Epo B.

As for other cytotoxic anticancer agents epothilones do not discriminate between cancer and normal cells, thus, increasing their tumor cell selectivity would significantly improve their therapeutic potential. Before this background it was one of the objectives of this PhD thesis to provide new functionalized epothilone analogs for the construction of epothilone-based antibody-drug conjugates (ADC) with enhanced tumor selectivity. In order to ensure maximum potency and metabolic stability, these analogs were derived from 12,13-cyclopropyl Epo B as the parent structure, with modifications easily addressable for antibody attachment located in the heterocyclic part of the C15 side chain (Figure 2).

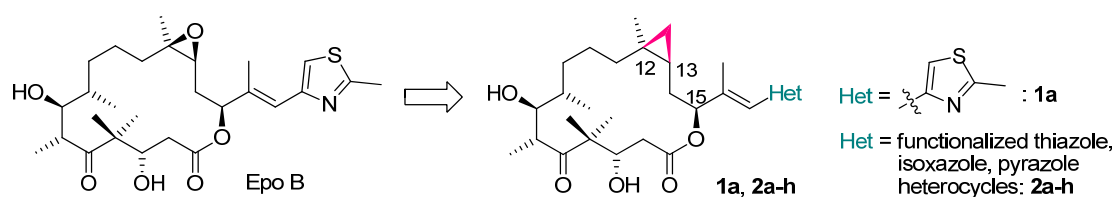
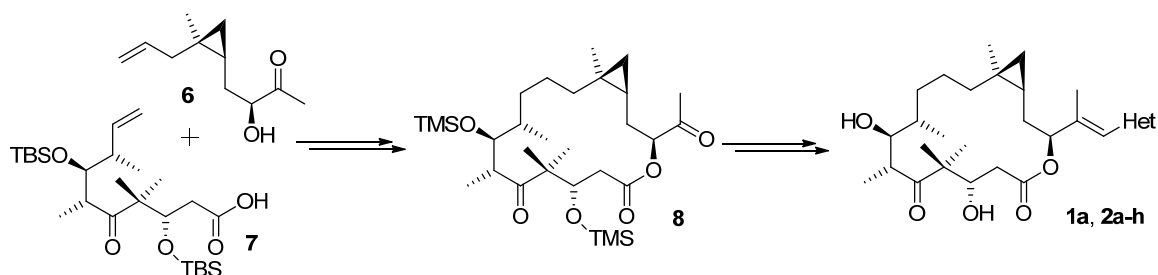


Figure 2: Target structures **1a**, **2a-h** as the active drug cargo for the construction of ADC's.

As a first step towards the development of cyclopropyl-epothilone-based ADC's an efficient synthetic route to cyclopropyl-Epo B (**1a**) and side chain-modified analogs **2a-h** was established. Target structures **1a** and **2a-h** were accessed through a convergent approach, which comprised the assembly of the key building blocks **6** and **7** via an esterification/ring-closing metathesis sequence to obtain the macrocyclic core with a truncated side that was amenable to elaboration into cyclopropyl-epothilone B (**1a**) (thus completing the first total

synthesis of this analog) and side chain-modified variants (**2a-h**) by *Wittig*-type chemistry (Scheme 1). All target structures could thus be accessed from a single advanced intermediate.



Scheme 1: Convergent synthesis of target structures **1a** and **2a-h**.

Cyclopropyl-epothilone B (**1a**) showed similar antiproliferative activity against human cancer cell lines as natural Epo B. Likewise, several functionalized derivatives **2a-h** showed  $IC_{50}$  values for the *in vitro* inhibition of human cancer cell growth in the low nM range, which makes them potential candidates for the construction of epothilone-based ADC.

In addition to the synthesis of **1a** and **2a-h**, an optimized synthesis was elaborated for the potent hypermodified Epo A analog **3a**, which had been previously identified in the group and which could potentially be conjugated to tumor-targeting antibodies through the selective acylation of the C7 hydroxy group. Key steps of the optimized route towards **3a** are a *syn*-aldol addition to install the stereocenters at C6 and C7, *Julia-Kocienski* olefination to establish the C10/C11 bond, *Shiina* macrocyclization, and a late stage introduction of the heterocycles by means of *Wittig* olefination (Figure 3).

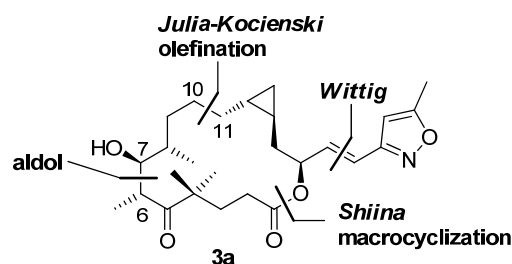
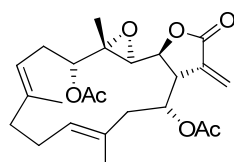


Figure 3: Structure of hypermodified Epo A (**3a**) and key retrosynthetic disconnections.

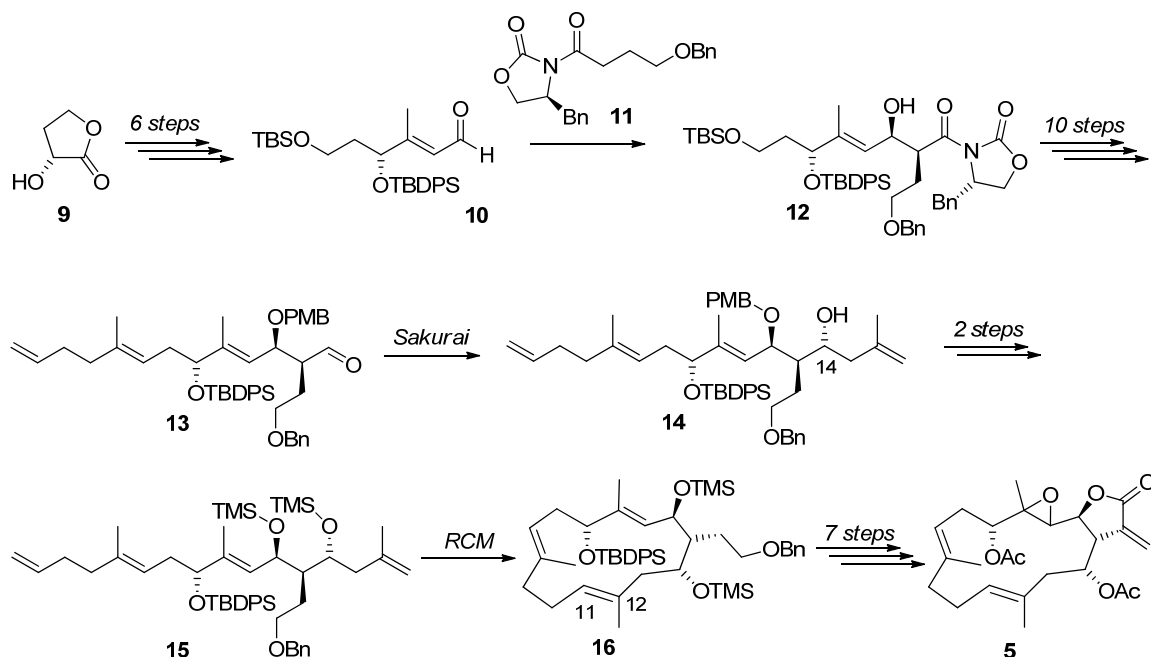
The second part of this thesis describes studies towards the total synthesis of michaolide E (**4**) (Figure 4), a new highly cytotoxic member of the cembranolide family of natural products. **4** has been isolated from the soft coral *Lobophytum michaelae* and demonstrated to inhibit the growth of the human colon adenocarcinoma cell line HT-29 with an  $IC_{50}$  value of 115 nM and the mouse lymphocytic leukemia line P-388 with an  $IC_{50}$  of 16 nM.



Michaelide E (4)

Figure 4: Structure of michaelide E (4).

To date, no total synthesis of michaelide E (4) has been reported and no structure-activity studies been described. It was an objective of this thesis to establish an efficient and stable synthesis of this interesting natural product in order to provide a starting point for the exploration of michaelide E (4) as a potential lead structure for anticancer drug discovery. The synthesis discussed in this thesis was based on the following key transformations (Scheme 2): (1) An *Evans syn*-aldol reaction between aldehyde **10** and imide **11** to provide the desired aldol product **12** as a single isomer; (2) a highly selective *Sakurai* addition with aldehyde **13** to establish the C14 stereocenter; (3) ring-closing metathesis (RCM) to construct the 14-membered macrocycle **16**, and regioselective lactonization (Scheme 2).



Scheme 2: Synthesis towards michaelide E (4).

Unfortunately, the spectral data of the product **5** obtained after directed epoxidation and final methenylation  $\alpha$  to the lactone carbonyl did not correspond with those reported for natural michaelide E (4). At this point we assume that this is a consequence of the formation of the wrong epoxide isomer; however, based on the currently available data it cannot be excluded that the structure of the natural product may have been misassigned.

## Zusammenfassung

Die Epothilone (Abbildung 1) sind Naturstoffe mit ausgeprägten Effekten auf das zelluläre Mikrotubuligerüst und einer daraus resultierenden potenten Hemmwirkung auf das Wachstum humaner Krebszellen und Tumore. Aufgrund ihrer interessanten biologischen Aktivität wurden die Epothilone zu vielversprechenden Leitstrukturen auf dem Gebiet der Krebsmittelforschung und bis zum heutigen Tag wurden neun Epothilone in klinischen Studien geprüft. Eine dieser Verbindungen, das Epothilon B Analogon Ixabepilone (Ixempra®), wurde 2007 für die Behandlung von Brustkrebs zugelassen.

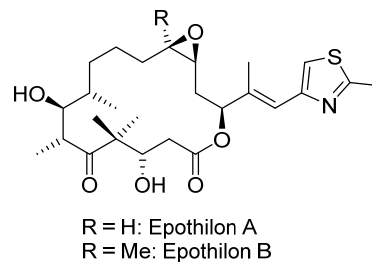


Abbildung 1: Natürlich vorkommende Epothilone; Epo A und Epo B.

Grundsätzlich führt jedoch die fehlende Selektivität der Epothilone gegenüber Krebszellen und die damit verbundenen unerwünschten Nebenwirkungen zu Limitierungen bei deren therapeutischer Anwendung. Eine Möglichkeit dieses Problem zu lösen besteht im Versuch einer zielgerichteten Wirkstoffabgabe im Tumor, wie sie z. B. mittels der Anwendung von Antikörper-Wirkstoff Konjugaten erreicht werden kann. In diesem Kontext ist es ein Ziel dieser Doktorarbeit neue funktionalisierte Epothilon-Analoga herzustellen, welche die Herstellung von Antikörper-Wirkstoff Konjugaten erlauben sollten. Um eine hohe Wirksamkeit und gute metabolische Stabilität dieser Analoga zu gewährleisten, wurden diese als Derivate des 12,13-Cyclopropyl Epo B konzipiert, wobei eine leichte Verknüpfbarkeit mit einem Antikörper durch eine Funktionalisierung der Heterozyklen in der Seitenkette erreicht werden sollte (Abbildung 2).

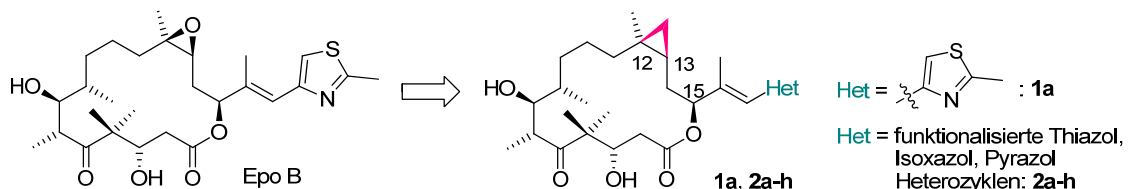
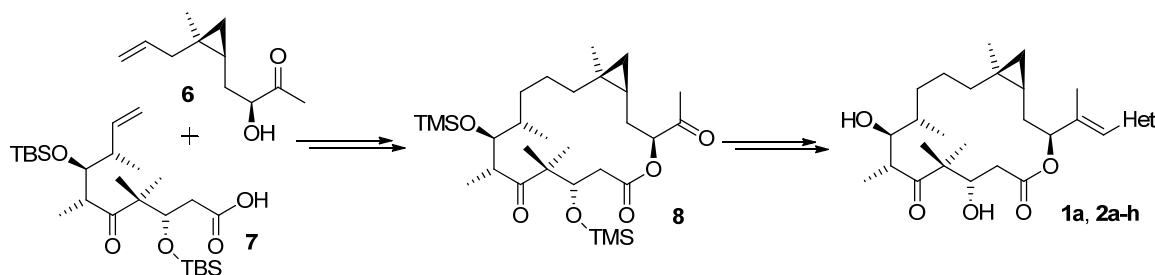


Abbildung 2: Zielstrukturen **1a** und **2a-h**, welche als Wirkstoff für die Bildung von Antikörper-Wirkstoff Konjugaten dienen.

Um eine praktische Grundlage für die Herstellung der entsprechenden Antikörper-Wirkstoff Konjugate zu schaffen, wurde zuerst eine effiziente Synthese des Cyclopropyl-Epo B (**1a**) und entsprechender seitenkettenmodifizierter Analoga **2a-h** ausgearbeitet. Diese Zielstrukturen wurden über eine konvergente Synthese hergestellt, welche auf der Veresterung des sekundären Alkohols (**6**) und der Säure (**7**) basiert (Schema 1) und in einer nachfolgenden Macrozyklisierung über eine Ringschluss-Metathese zur Bildung des makrozyklischen Grundgerüst beruht. Das so erhaltene makrozyklische Methylketon wurde dann mittels einer *Wittig* Reaktion in Cyclopropyl-Epo B oder durch *Wittig*- wie *HWE* Reaktionen in die entsprechenden seitenkettenmodifizierten Derivate überführt. Diese Strategie führte zur erstmaligen Totalsynthese des Cyclopropyl-Epo B (**1a**).



Schema 1: Konvergente Synthese von Zielstrukturen **1a** und **2a-h**.

Cyclopropyl-Epo B (**1a**) zeigt eine ähnlich potente antiproliferative Aktivität gegenüber Krebszellen wie das natürliche Epo B. Die verschiedenen funktionalisierten Derivate **2a-h** hemmen das Wachstum humaner Krebszellen ebenfalls mit  $IC_{50}$  Werten im tiefen nanomolaren Bereich und kommen somit als mögliche Wirkstoffkomponenten für Antikörper-Wirkstoff Konjugate in Betracht.

Zusätzlich zur Synthese der obigen Cyclopropyl-Epo B Analoga wurde eine optimierte Synthese des hochpotenten, hypermodifizierten Epo A Analogons **3a** (Abbildung 3) ausgearbeitet, welches bereits früher in der Forschungsgruppe untersucht worden war. Analogon **3a** kann über die sekundäre Alkoholgruppierung an C7 mit einem Linker modifiziert und dann mit Antikörpern verbunden werden. Die Schlüsselschritte der optimierten Synthese von **3a** sind eine *syn*-Aldol Addition zum Aufbau der Stereozentren an C6 und C7, eine *Julia-Kocienski* Olefinierung zur Bildung der C10/C11 Bindung, ein Ringschluss über eine *Shiina* Makrolaktonisierung und die Einführung der Heterozyklen über eine *Wittig* Reaktion am Schluss der Synthese.

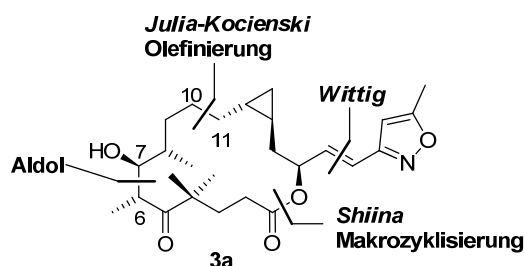
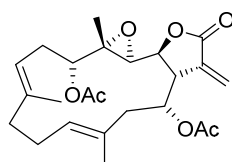


Abbildung 3: Struktur von hypermodifiziertem Epo A (**3a**) und Schlüsselschritte der Retrosynthese.

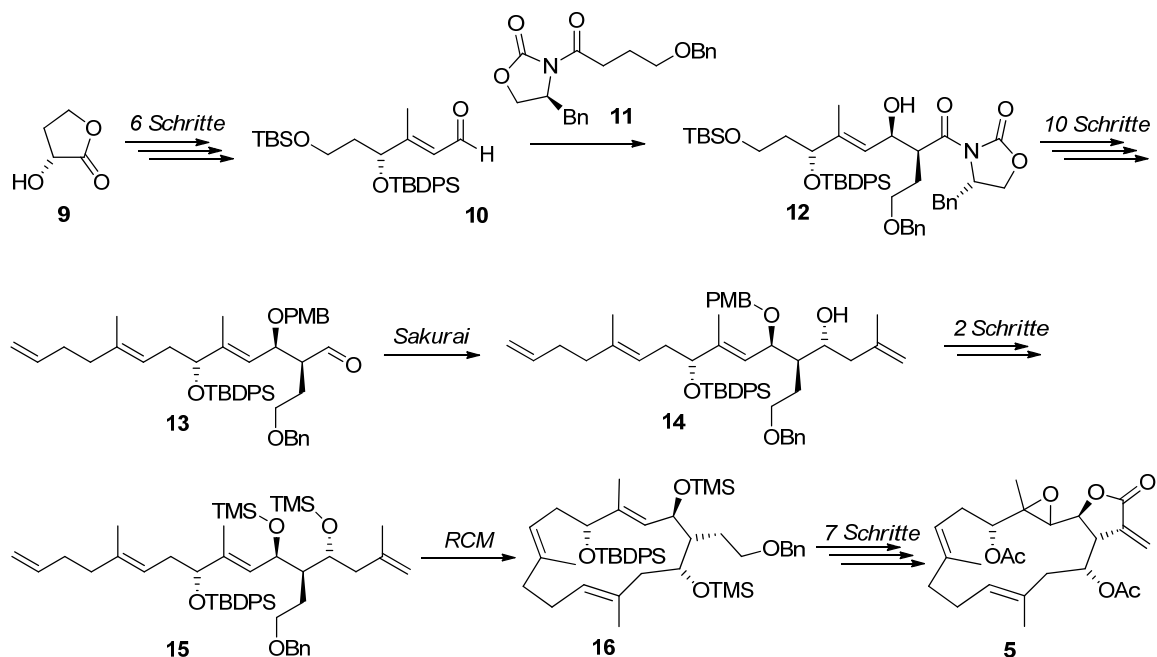
Der zweite Teil dieser Doktorarbeit beschreibt erste Studien zur Totalsynthese von Michaelid E (**4**) (Abbildung 4), einem neuen cytotoxischen Naturstoff aus der Familie der Cembranolide. **4** wurde aus der Weichkoralle *Lobophytum michaelae* isoliert und hemmt das Wachstum der humanen Kolonkarzinom Krebszelllinie HT-29 und der murinen Lymphknoten Krebszelllinie P-388 IC<sub>50</sub> Werten von 115 nM bzw. 16 nM.



Michaelid E (**4**)

Abbildung 4: Struktur von Michaelid E (**4**).

Bis heute wurde keine Totalsynthese von Michaelid E (**4**) veröffentlicht und es wurden keine SAR Studien beschrieben. Es war ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit eine effiziente und stabile Synthese dieses interessanten Naturstoffs auszuarbeiten, welche als Basis für die Erforschung von Michaelid E (**4**) als Leitstruktur für die Wirkstoffforschung gegen Krebs dienen soll. Die in dieser Arbeit beschriebene Synthese umfasst folgende wichtige Transformationen (Schema 2): (1) Eine *Evans syn*-Aldol Addition zwischen dem  $\alpha$ -chiralen Aldehyd **10** und dem Imid **11** lieferte das gewünschte Aldolprodukt **12** als einziges Isomer; (2) eine selektive *Sakurai* Addition an Aldehyd **13** ermöglichte den Aufbau des Stereozentrums an C14; (3) eine Ringschluss-Metathese zur Bildung des Makrozyklus **16**; und (4) eine regioselektive Lactonisierung (Schema 2).

Schema 2: Synthese von Michaelide E (**4**).

Leider stimmten die spektroskopischen Daten des Produkts **5**, welches nach der gerichteten Epoxidierung und abschliessenden Methenylierung  $\alpha$  zur Carbonylgruppe des Lactonrings erhalten wurde, nicht mit den Daten für das natürliche Michaelid E (**4**) überein. Wir nehmen zum jetzigen Zeitpunkt an, dass die Ursache für diese Abweichung auf die Bildung des unerwünschten Epoxidisomers zurückzuführen ist. Jedoch kann aufgrund der vorliegenden Daten ein Fehler in der Strukturzuordnung des Naturstoffs nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.