

Diss. ETH 12948

**Azaenediynes:
on the Way to pH-Selective Antitumor Drugs**

A dissertation
submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

Johannes Hoffner

Dipl. Chem. ETH

born in Schramberg

from Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Peter Chen, examiner
Prof. Dr. Bernhard Jaun, co-examiner

Zürich 1998

1 Summary

Naturally occurring enediyne antibiotics, which have been isolated from microorganisms, are exceedingly potent cytotoxines with demonstrated activity against tumors. However, their high toxicity prevents their use as anti-tumor drugs in humans. They have a unique mechanism of action. After binding to DNA, the enediyne moiety undergoes Bergman rearrangement to form a *para*-benzyne (1,4-didehydrobenzene) biradical, which is able to abstract hydrogen atoms from deoxyribose in DNA, leading to lethal double strand breaks. Model studies showed that *para*-benzyne **2** is in an equilibrium with the initial enediyne **1** and the "opposite" enediyne **1'**. The thermodynamic sink of this reaction is benzene formed from the abstraction of two hydrogen atoms from the solvent. In biradicals the unpaired electrons can interact via through bond coupling, leading to a stabilization of the singlet biradical. This energy gain (singlet-triplet gap) determines the reactivity of the biradical. The larger the singlet-triplet gap, the higher is the activation barrier for radical reactions e.g. hydrogen abstraction. The triplet is chosen as a model for the non-interacting biradical. By substituting one carbon atom in *para*-benzyne with a nitrogen atom, one obtains *para*-pyridyne (2,5-didehydropyridine). Calculations suggested that the singlet-triplet gaps in *para*-pyridyne **5** (17 kJ/mol) and *para*-pyridinium **6** (7 kJ/mol) are significantly different.

We prepared azaenediynes **9**, **10**, and **11** by adding specific copper/lithium couples of phenylacetylene to alkynyl oxime arene sulfonates. **9** and **10** were mixtures of *cis*- and *trans*- isomers which could not be separated at room temperature. The activation barrier for the *cis/trans* isomerization of **10** was determined by ¹H-NMR experiments to be about 51 kJ/mol (12 kcal/mol). Upon heating, all three azaenediynes underwent Bergman cyclization to the corresponding *para*-pyridynes, which ring opened to the corresponding nitriles as the thermodynamic sink. The Bergman rearrangement of **10** required an activation barrier of 97.6 ± 6.0 kJ/mol (23.1 ± 1.5 kcal/mol) and a pre-exponential factor $\log_{10} A = 9.7 \pm 0.9$.

Our studies showed that, indeed, the reactivity of *para*-pyridyne can be changed upon protonation. Azaenediyne **9** was thermolyzed in diisopropylether. The solvent served as a model for C(4') in deoxyribose. **9** rearranged to the *para*-pyridyne **72** and subsequently to the nitrile **68**. No radical product that derived from *para*-pyridyne could be seen. As the *para*-pyridyne biradical is not in an equilibrium with the nitrile, hydrogen abstraction is competing with the irreversible ring opening to the nitrile. The biradical would have to be intercepted when it is first formed from the azaenediyne. Thermolysis of **9** in diisopropylether with 2.5 eq. of HBF₄ resulted in loss of material. When, however, **9** was thermolyzed in acidic, buffered (2-fluoropyridine) medium, pyridine **84** could be observed in small amounts. Twofold hydrogen abstraction by *para*-pyridinium **73** from diisopropylether leads to the formation of **84**. As the activation barrier for the hydrogen abstraction can be estimated by the addition of the activation barrier for hydrogen abstraction by the non-interacting biradical and the singlet-triplet gap, these experimental results can be explained by the lower singlet-triplet gap of the protonated biradical **6** in comparison to that of the unprotonated biradical **5**.

Cells in solid tumors can be selectively acidified, thus allowing the biochemical distinction between cancer cells and normal cells. Based on the higher reactivity of the protonated versus the unprotonated *para*-pyridyne, chemists in the future may be enabled to design drugs that are more toxic to cells in solid tumors than to normal cells.

Zusammenfassung

Natürliche Endiine erwiesen sich als ausserordentlich starke Zellgifte, die eine hohe Wirkung gegenüber Tumorzellen besitzen. Ihre starke Toxizität schliesst jedoch eine Anwendung als Medikamente gegen Krebs aus. Sie besitzen einen einzigartigen Wirkmechanismus: Nachdem sie an die DNA gebunden haben, lagert die Endiin-Einheit in einer Bergman Cyclisierung zu *para*-Benzin (1,4-Didehydrobenzen) um. *Para*-Benzin ist in der Lage, Wasserstoffatome von den Desoxyriboseringen der DNA abzuspalten. Dies führt letztendlich zu Doppelstrangbrüchen, die in der Regel tödlich für die Zellen sind. In Modellstudien konnte gezeigt werden, dass *para*-Benzin **2** mit dem anfänglichen Endiin **1** und seinem „gegenüberliegenden“ Isomeren Endiin **1'** im Gleichgewicht steht. Das thermodynamische Loch dieser Reaktion ist die Bildung von Benzol, nachdem **2** zwei Wasserstoffatome vom Lösungsmittel abgespalten hat.

In Biradikalen können die ungepaarten Elektronen miteinander in Wechselwirkung treten (through-bond coupling), was zu einer Stabilisierung des Singlet Radikals führt. Die Stabilisierung des Singlets (singlet-triplet gap) bestimmt die Reaktivität des Biradikals. Je grösser die Stabilisierung, desto höher ist die Aktivierungsbarriere für Radikalreaktionen, wie z. B. für die Abspaltung von Wasserstoffatomen. Das Triplet wird als Modell für das nicht koppelnde Biradikal betrachtet. Man kann ein Kohlenstoffatom aus *para*-Benzin durch ein Stickstoffatom ersetzen und erhält 2,5-Didehydropyridin (*para*-Pyridyn). Rechnungen legen nahe, dass die Singlet-Stabilisierung in *para*-Pyridyn (17 kJ/mol) und im protonierten *para*-Pyridinium (7 kJ/mol) sehr verschieden sind.

Die Azaendiine **9**, **10** und **11** wurden durch die Reaktion eines speziellen Kupfer-Lithium-Phenylacetylen Komplexes mit Alkinyloxim-Arylsulfonaten hergestellt. **9** und **10** bilden jeweils *cis*- und *trans*-Isomere, die bei Raumtemperatur nicht getrennt werden können. Die Aktivierungsenergie für die *cis/trans*-Isomerisierung von **10** wurde mittels ¹H-NMR Experimenten bestimmt, sie beträgt 51 kJ/mol (12 kcal/mol). Beim Erwärmen lagern alle drei Azaendiine in einer Bergman-Cyclisierung zu den jeweiligen *para*-Pyridynen um und reagieren anschliessend unter Ringöffnung zu den entsprechenden Nitrilen, die das thermodynamische Loch dieser Reaktion bilden. Die Aktivierungsenergie für die Bergman-Umlagerung beträgt 97.6 ± 6 kJ/mol (23.1 ± 1.5 kcal/mol) mit einem Frequenzfaktor $\log_{10} A = 9.7 \pm 0.9$.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Reaktivität von 2,5-Didehydropyridin durch Protonierung geändert werden kann. Azaendin **9** wurde in Diisopropylether erhitzt. Das Lösungsmittel diente als Modell für C(4') in Desoxyribose. **9** lagerte zu *para*-Pyridyn **72** um und reagierte dann weiter zum Nitril **68**. Es wurde jedoch keine Substanz gefunden, die aus einer Radikalreaktion von *para*-Pyridyn herrührte. Da das *para*-Pyridyn nicht in einem Gleichgewicht mit **68** steht, hätte das Biradikal abgefangen werden müssen, als es sich das erste Mal gebildet hat. Erhitzen von **9** in Diisopropylether unter Zugabe von 2.5 Äquivalenten HBF₄ führte zum Verlust des Materials. Als **9** allerdings mit Säure und 2-Fluorpyridin als Puffer erhitzt wurde, konnte die Bildung kleiner Mengen des Pyridins **84** beobachtet werden. **84** kann durch Abstraktion zweier Wasserstoffatome durch das protonierte Didehydropyridin **73** aus Diisopropylether entstehen. Die Wasserstoffabstraktion steht in Konkurrenz mit der irreversiblen Ringöffnung zum Nitril. Da man die

Aktivierungsbarriere für die Abspaltung von Wasserstoff durch Biradikale abschätzen kann, indem man zur Aktivierungsbarriere des Phenylradikals die Singletstabilisierung addiert, kann man die experimentellen Befunde durch eine niedrigere Singletstabilisierung des protonierten Biradikals **6** als des unprotonierten Biradikals **5** erklären.

Der pH-Wert in soliden Tumoren kann selektiv erniedrigt werden. Dadurch wird eine Unterscheidung zwischen Krebszellen und normalen Zellen möglich. Aufgrund der höheren Reaktivität von protoniertem gegenüber dem unprotonierten 2,5-Didehydropyridin sind Chemiker vielleicht einmal in der Lage, Substanzen zu entwerfen, die gegenüber Zellen in soliden Tumoren giftiger sind als gegenüber normalen Zellen.