Charles University, Faculty of Science
Department of Organic and Nuclear Chemistry

Synthesis and Properties of Chiral Acyclic Nucleoside Bisphosphonates and Phosphonomethylphosphinates

Doctoral Thesis Abstract

Mgr. Petra Doláková

Advisor: Prof. Dr. Antonín Holý, DrSc., Dr.h.c. mult.

Academy of Sciences of the Czech Republic
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry

Prague 2008

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra organické a jaderné chemie

Syntéza a vlastnosti chirálních bisfosfonátů a fosfonomethoxyfosfinátů acyklických analogů nukleosidů

Autoreferát disertační práce

Mgr. Petra Doláková

Školitel: Prof. Dr. Antonín Holý, DrSc., Dr.h.c. mult.

Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, v.v.i.

Praha 2008

Introduction

Acyclic nucleoside phosphonates (ANPs) represent a key class of nucleotide analogs with a broad spectrum of antiviral and cytostatic activity.[1] Among ANPs, particularly 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]adenine (PMEA, adefovir, Figure 1) is active against DNA and retroviruses; its prodrug, adefovir dipivoxil, was approved for hepatitis B therapy (Hepsera). 9-(*R*)-[2-(Phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA, tenofovir), is a promising anti-HIV drug, its prodrug Viread was approved for treatment of AIDS and chronic hepatitis B. A third type of antiviral compounds is represented by 9-(*S*)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)-propyl]cytosine (HPMPC, cidofovir, Vistide) which possesses general anti-DNA-viral activity. Cidofovir was approved for treatment of cytomegalovirus retinitis in AIDS patients.

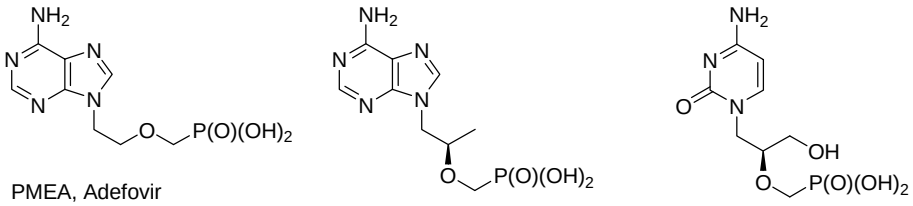


Figure 1. Acyclic nucleoside phosphonates.

Acyclic nucleoside phosphonates derived from 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine, where the alkoxyalkylphosphonate side chain is attached to the oxygen atom at the position 6 of the pyrimidine moiety, are considered as the second generation of ANPs (Figure 2).[2]

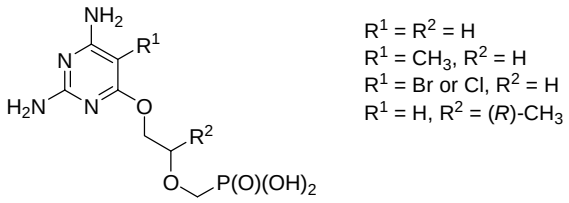
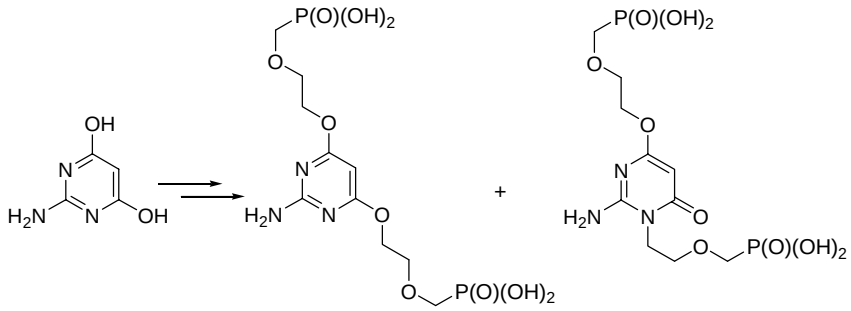


Figure 2. "Open-ring" acyclic nucleoside phosphonates.

These compounds can be considered as 2,6-diaminopurine analogues with an open imidazole ring. 2,4-Diamino-6-[2-(phosphonomethoxy)ethoxy]pyrimidine shows inhibitory activity against both DNA and retroviruses comparable to adefovir and tenofovir. Further SAR studies showed that 5-substituted derivatives of 2,4-diamino-6-[2-(phosphonomethoxy)-ethoxy]pyrimidine markedly inhibited retrovirus replication in cell culture. The 5-methyl

derivative was inhibitory to human immunodeficiency virus and Moloney murine sarcoma virus-induced cytopathicity in cell culture but also cytostatic to CEM cell cultures. Also the 5-halogen substituted derivatives showed a pronounced antiretroviral activity, comparable to that of the reference drugs adefovir and tenofovir, but were devoid of any measurable toxicity *in vitro*.[3]

The isomeric compounds depicted in Scheme 1 bearing two phosphonate side chains were prepared among the products in the SAR studies of "open-ring" ANPs. The symmetrical O^4,O^6-dialkylated product was reported to show antiretroviral activity. The aim of my work was to prepare bisphosphonates bearing two identical or diverse phosphonomethoxyalkoxy side chains at positions 4 and 6 of the pyrimidine moiety, to develop their regioselective synthesis and evaluate their biological properties.[4]



Scheme 1. Acyclic nucleoside bisphosphonates.

In the second part of my work I focused on the synthesis of acyclic nucleoside phosphonomethylphosphinates, nonhydrolyzable analogues of acyclic nucleoside diphosphates, biologically interesting compounds that have not yet received much attention (Figure 3).[5] Furthermore, analogues of dUDP and dUTP containing the phosphonomethyl-phosphinate system were prepared as potential inhibitors of deoxyuridine nucleotido-hydrolase (dUTPase).[6]

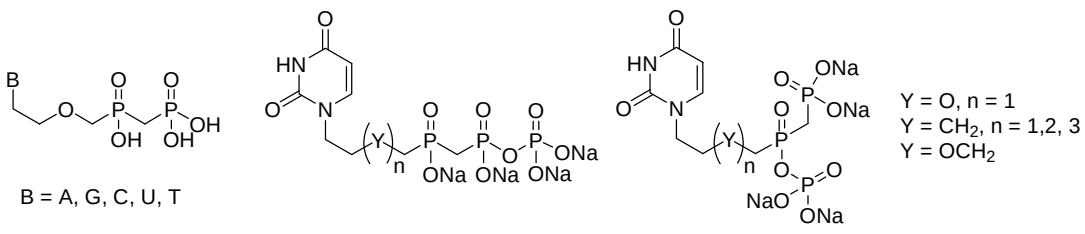
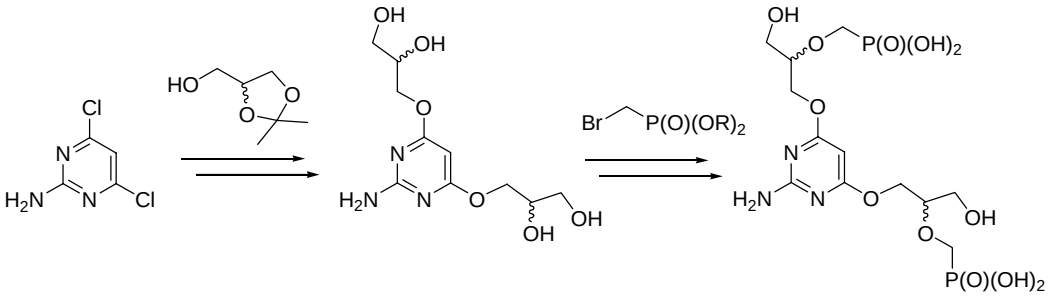


Figure 3. Acyclic nucleoside phosphonomethylphosphinates.

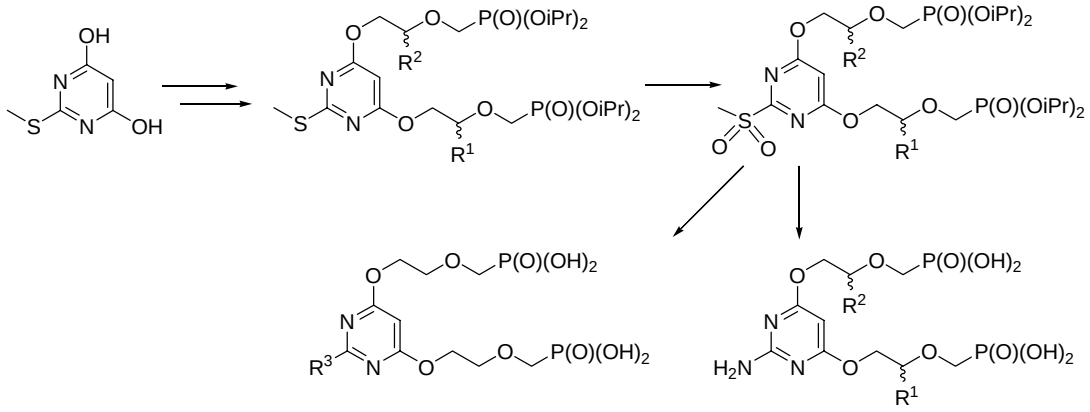
Results

Bisphosphonates bearing two chiral 3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propoxy (HPMPO) side chains were successfully prepared from 2-amino-4,6-dichloropyrimidine by nucleophilic aromatic substitution with isopropylideneglycerol and subsequent alkylation with diisopropyl bromomethylphosphonate (Scheme 2). However, this synthetic strategy was not suitable for preparation of other bisphosphonates due to low reactivity of 2-amino-4,6-dichloropyrimidine and its 4,6-difluoro congener.



Scheme 2. Synthesis of bis-HPMPO derivatives from 2-amino-4,6-dichloropyrimidine.

Alkylation of 4,6-dihydroxy-2-(methylsulfanyl)pyrimidine in DMSO that gives predominantly *O*-alkylated regioisomers was finally used for the synthesis of a large number of bisphosphonates (Scheme 3). Bisphosphonates bearing two identical or diverse chiral phosphonomethoxyalkoxy chains were prepared as well as 2-substituted bis[2-(phosphonomethoxy)ethoxy] derivatives. 2-Methylsulfanyl and/or 2-methylsulfonyl group proved to be suitable leaving groups for introduction of various substituents at position 2 of the pyrimidine ring.



R^1 = H, (*S*)-CH_3, (*R*)-CH_3, (*S*)-CH_2OH, (*R*)-CH_2OH
R^2 = H, (*S*)-CH_3, (*R*)-CH_3, (*S*)-CH_2OH, (*R*)-CH_2OH
R^3 = H, OH, OCH_3, cyclopropylamino, cyclopentylamino, methylamino, benzylamino, 4-methoxybenzylamino, morpholino

Scheme 3. Synthesis of bisphosphonates by alkylation of 4,6-dihydroxy-2-(methylsulfanyl)pyrimidine.

Liphophilic esters of bisphosphonates were prepared to decrease their polarity however their introduction dramatically decreased their solubility (Figure 4).

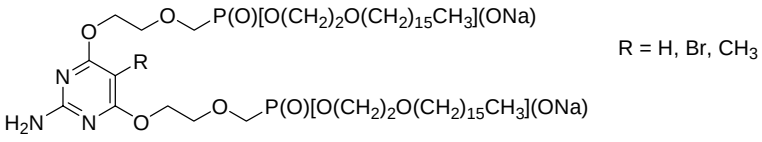
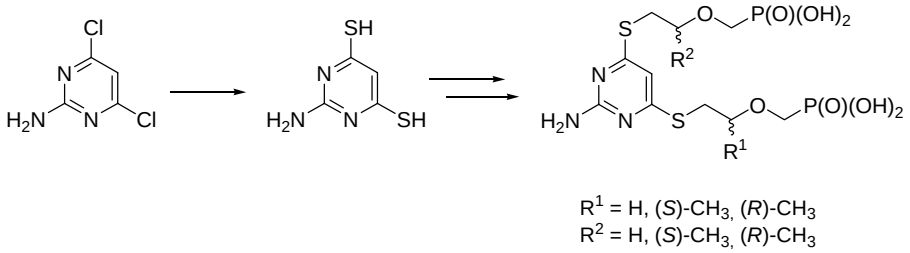


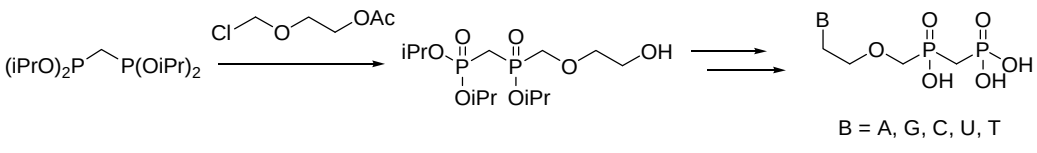
Figure 4. Lipophilic esters of bisphosphonates.

A series of bisphosphonates with phosphonomethoxyalkylsulfanyl side chain was prepared by alkylation of 2-amino-4,6-disulfanylpyrimidine with the phosphonate bearing building block. Owing to better nucleophilicity of sulphur compared to oxygen and nitrogen, the alkylation gives exclusively *S*-alkylated product (Scheme 4).



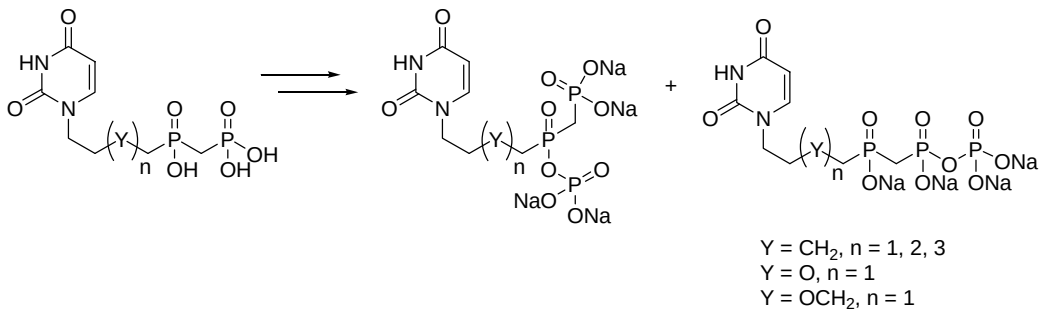
Scheme 4. Synthesis of bisphosphonates from 2-amino-4,6-disulfanylpyrimidine.

In the second part of my work, I prepared a series of 2-[(hydroxy)(phosphonomethyl)-phosphorylmethoxy]ethyl purines (A, G) and pyrimidines (C, U, T) as chemically and enzymatically stable analogues of acyclic nucleoside diphosphates. Alcohols bearing the phosphonomethylphosphinyl moiety were prepared by Arbuzov reaction of tetraisopropyl methylenediphosphonite with acetyl alkyl bromides and alkyl iodides and subsequent deprotection of the acetyl group. Suitably protected heterocyclic bases were coupled with functionalized alcohols by Mitsunobu reaction and finally deprotected by standard procedures (Scheme 5).



Scheme 5. Synthesis of acyclic nucleoside phosphonomethylphosphinates.

In addition, acyclic analogues of dUDP bearing phosphonomethylphosphinylalkyl and alkoxyalkyl side chains were prepared by above described procedure. dUDP analogues were converted to their phosphate counterparts by reaction with 1,1'-carbonyldiimidazole and subsequent reaction with tri-*n*-butylammonium phosphate. Interestingly, branched phosphates were isolated as major products unlike the expected linear phosphates that were in minority (Scheme 6). The detailed ^{31}P NMR studies of the reaction course showed that both branched and linear phosphates are formed immediately during the reaction. The intramolecular phosphate migration was not observed. pKa values of phosphonate and phosphinate moiety were determined by ^{31}P NMR titration studies and are around 2.7 and 1.8, respectively, that explains reactivity of both phosphonate and phosphinate residue with CDI. In addition, the thermodynamic stability calculations showed that the branched phosphates are more stable.



Scheme 6. Synthesis of dUDP and dUTP analogues containing phosphonomethylphosphinyl moiety.

Conclusions

In conclusion, in the SAR studies of "open-ring" ANPs a series of bisphosphonates derived from 2-amino-4,6-(dihydroxy)pyrimidine was prepared. Bisphosphonates bearing two identical or diverse achiral or chiral phosphonoalkoxy chains were prepared either by nucleophilic aromatic substitution of 2-amino-4,6-dichloropyrimidine or by alkylation of 4,6-(dihydroxy)-2-(methylsulfanyl)pyrimidine. The second method proved to be the universal method for regioselective preparation of *O*–alkylated pyrimidines at positions 4 and 6. Furthermore, 2-methylsulfanyl function is a versatile leaving group for introduction of various substituents at position 2 of the pyrimidine moiety. Disulfanylpyrimidine was alkylated in the same manner to give exclusively *S*–alkylated product. Alkoxyalkyl esters of selected bisphosphonates were prepared to improve their bioavailability. However, introduction of two lipid esters to bisphosphonates dramatically decreased their solubility. The enantiomerical

purity of selected bisphosphonates was successfully determined by capillary zone electrophoresis and it was confirmed that optically active phosphonates do not tend to racemize.

Prepared bisphosphonates and their esters were tested for their cytostatic and antiviral activity. Antiviral activity of bisphosphonates was not confirmed, compounds do not show any appreciable biological activity or toxicity.

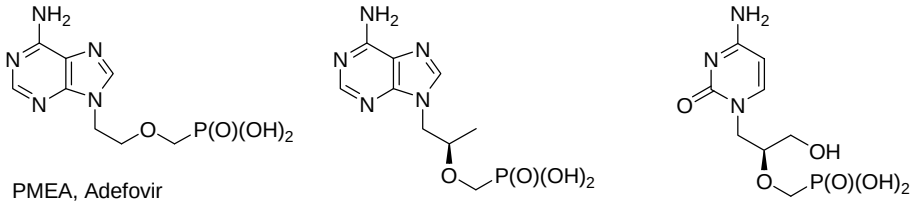
Furthermore, nonhydrolyzable analogues of acyclic nucleoside diphosphates containing phosphonomethylphosphinyl moiety were prepared by the improved previously described methods. The phosphorylation of dUDP to dUTP analogues gave mixture of α- and β-phosphates. The ^{31}P NMR study of the course of the phosphorylation reaction and measurement of pKa of the phosphonomethylphosphinate moiety showed that both phosphinate and phosphonate hydroxyl groups react with 1,1′-carbonyldiimidazole and phosphate to give a mixture of α- and β-phosphate in approx. 2:1 to 10:1 ratio.

All prepared phosphonomethylphosphinates were screened for cytostatic and antiviral activity and none of the tested compounds exhibited any significant biological activity or cytotoxicity. dUDP and dUTP analogues were tested for their potency to inhibit *Mycobacterium tuberculosis* dUTPase however none of the analogues inhibited the enzyme.

These data indicate that phosphonomethylphosphinyl system is not optimal analogue of the natural diphosphate in nucleotides. This effect may be due to the differences between the pKa's of the phosphonomethylphosphinyl analogue and the normal diphosphate, small geometric differences between C–P and O–P bonds and differences in metal ion binding properties.

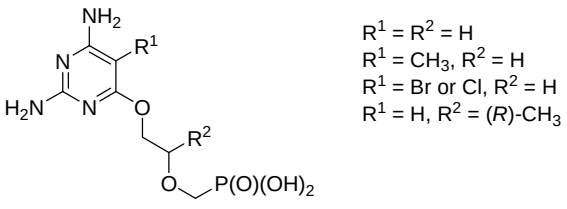
Úvod

Acyklické fosfonáty nukleosidů (ANP) jsou stabilní nukleotidová analoga s významnými biologickými, zejména protivirovými a cytostatickými účinky.[1] ANP jsou substrátem i inhibitorem reversních transkriptas a působí jako terminátory rostoucího polynukleotidového řetězce. 9-[2-(Fosfonomethoxy)ethyl]adenin (PMEA, adefovir, Obr. 1) inhibuje DNA viry a retroviry a jeho orální profarmakum adefovir dipivoxil je základem léku proti chronické hetatitidě B (Hepsera™). 9-(*R*)-[2-(Fosfonomethoxy)propyl]adenin (PMPA, tenofovir) je velmi aktivní vůči retrovirům, jeho orální profarmakum tenofovir disoproxil fumarate bylo schváleno pro léčení AIDS a chronické hepatitidy B (Viread™). Třetím lékem ze skupiny fosfonátů nukleosidů je 9-(*S*)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosin (HPMPC, cidofovir, Vistide™), který inhibuje všechny DNA viry. Cidofovir byl schválen pro léčení cytomegalovirové retinitidy u pacientů s AIDS, nicméně byl mnohokrát úspěšně klinicky použit proti papilomavirovým a poxvirovým infekcím.



Obr. 1. Acyklické fosfonáty nukleosidů.

Acyklické fosfonáty nukleosidů nové generace jsou odvozeny od 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidinu. Tyto sloučeniny mohou být považovány za purinové deriváty s otevřeným imidazolovým kruhem (Obr. 2).[2]



Obr. 2. Acyklické fosfonáty nukleosidů s otevřeným kruhem.

2,4-Diamino-6-[2-(fosfonomethoxy)ethoxy]pyrimidin je účinný proti DNA virům a retrovirům, jeho aktivita je srovnatelná s účinkem adefoviru a tenofoviru. Další studie vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou látek ukázaly, že 5-substituované deriváty inhibují replikaci retrovirů v buněčné kultuře. 5-Methyl derivát inhibuje HIV and MSV (Moloney murine sarcoma virus) viry a 5-halogen deriváty se vyznačují významnou protiretrovirovou aktivitou a nízkou *in vitro* toxicitou.[3]

Isomerní látky, zobrazené ve Schématu 1, nesoucí dva fosfonátové řetězce byly připraveny v rámci studií acyklických fosfonátů nukleosidů s otevřeným kruhem a bylo uvedeno, že symetrická O^4,O^6-dialkylovaná látka má protiretrovirový účinek. Cílem mé disertační práce bylo připravit sérii bisfosfonátů se dvěma stejnými nebo různými fosfonomethoxyalkylovými řetězci v poloze 4 a 6 pyrimidinového kruhu, vypracovat jejich regioselektivní syntézu a vyhodnotit jejich biologické účinky.[4]

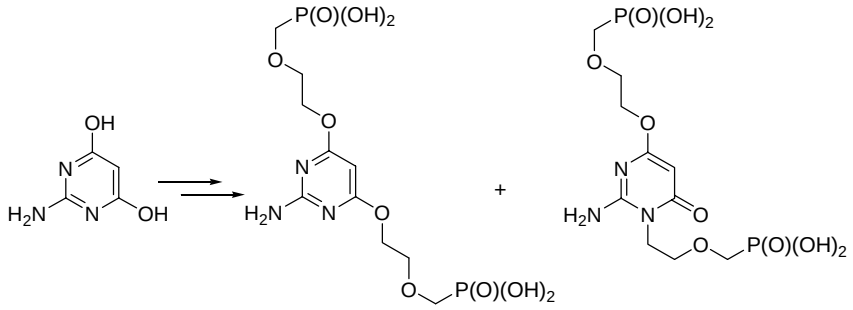
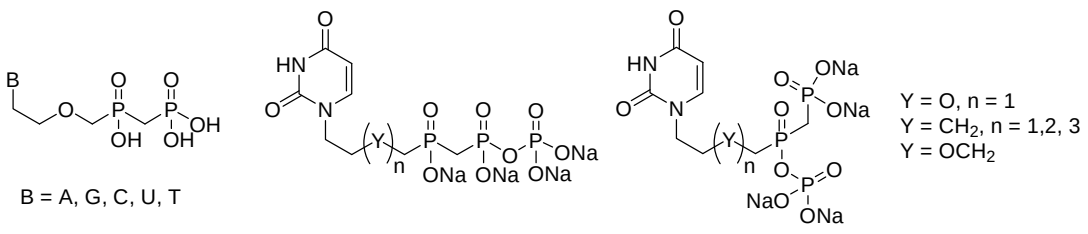


Schéma 1. Bisfosfonáty acyklických analogů nukleosidů.

V druhé části mé práce jsem se zabývala syntézou acyklických fosfonomethylfosfinátů nukleosidů, nehydrolyzovatelných analogů acyklických difosfátů nukleosidů, biologicky zajímavých látek s potenciálním protivirovým účinkem (Obr. 3).[5] Dále byla syntetizována analoga dUDP a dUTP obsahující fosfonomethylfosfinátovou skupinu jako potenciální inhibitory deoxyuridin nukleotidohydrolasy (dUTPasy, ref. 6).



Obr. 3. Acyklické fosfonomethylfosfináty nukleosidů.

Výsledky

Bisfosfonáty nesoucí dva chirální 3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propoxylové (HPMPO) vedlejší řetězce byly připraveny z 2-amino-4,6-dichlorpyrimidinu nukleofilní aromatickou substitucí isopropylidenglycerolem a následnou alkylací diisopropyl brommethylfosfonátem (Schéma 2). Bis-HPMPO deriváty byly úspěšně připraveny nukleofilní aromatickou substitucí, nicméně tato syntéza nebyla vhodná pro přípravu dalších bisfosfonátů kvůli nízké reaktivitě 2-amino-4,6-dichlorpyrimidinu i jeho 4,6-difluoro analogu.

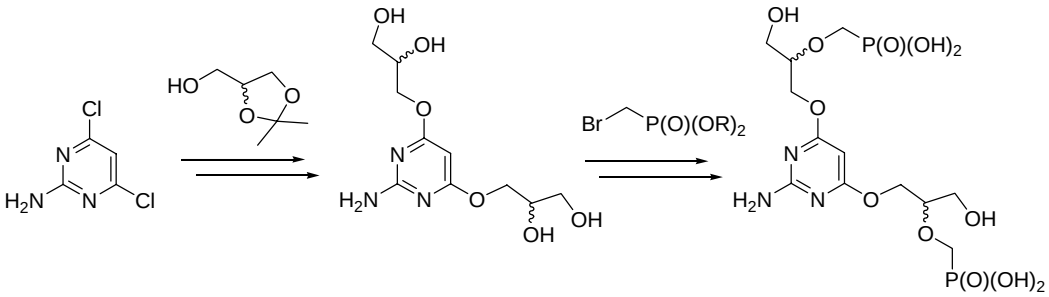
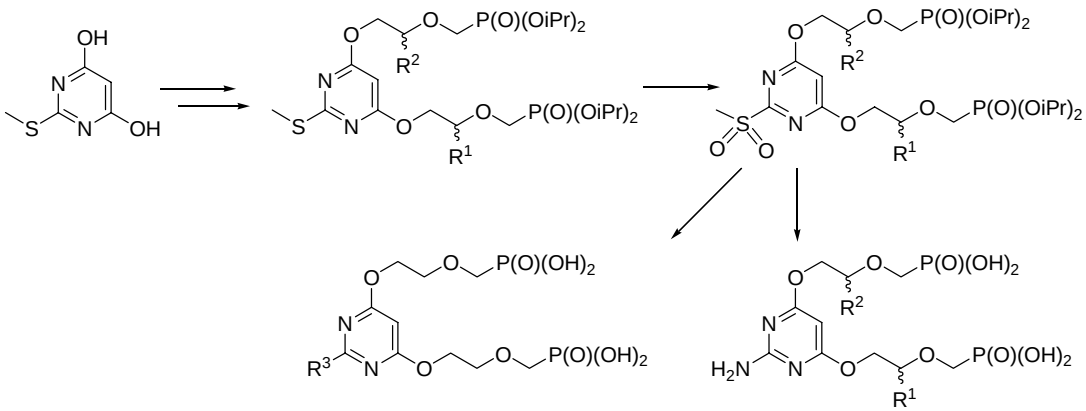


Schéma 2. Syntéza bis-HPMPO derivátů vycházející z 2-amino-4,6-dichlorpyrimidinu.

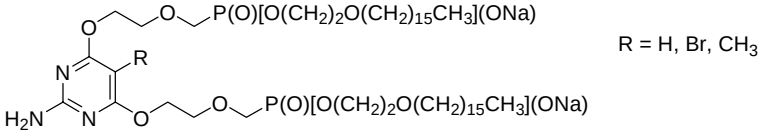
Série bisfosfonátů nesoucích dva stejné nebo různé fosfonomethoxyalkoxylové řetězce byla nakonec připravena alkylací 4,6-dihydroxy-2-(methylsulfanyl)pyrimidinu v DMSO, která poskytuje *O*-alkylovaný derivát jako hlavní produkt (Schéma 3). Dále byly připraveny 2-substituované deriváty 4,6-bis[2-(fosfonomethoxy)ethoxy]pyrimidinu. Methylsulfanylová a/nebo methylsulfonylová skupina je v tomto případě vhodná odstupující skupina pro zavedení substituentů do polohy 2 pyrimidinového kruhu.



R^1 = H, (*S*)-CH_3, (*R*)-CH_3, (*S*)-CH_2OH, (*R*)-CH_2OH
R^2 = H, (*S*)-CH_3, (*R*)-CH_3, (*S*)-CH_2OH, (*R*)-CH_2OH
R^3 = H, OH, OCH_3, cyklopropylamino, cyklopentylamino, methylamino, benzylamino, 4-methoxybenzylamino, morfolino

Schéma 3. Syntéza bisfosfonátů alkylací 4,6-dihydroxy-2-(methylsulfanyl)pyrimidinu.

Lipofilní estery vybraných bisfosfonátů byly připraveny kvůli snížení polarity a zvýšení biologické dostupnosti látek. Bohužel zavedení těchto esterů výrazně snížilo rozpustnost bisfosfonátů (Obr. 4).



Obr. 4. Lipofilní estery bisfosfonátů.

Série bisfosfonátů s fosfonomethoxyalkylsufanylovým postraním řetězcem byla připravena alkylací 2-amino-4,6-disulfanylpyrimidinu. Vzhledem k vyšší nukleofilicitě síry v porovnání s kyslíkem a dusíkem, alkylace disulfanyl derivátu poskytuje výhradně *S*-alkylovaný produkt (Schéma 4).

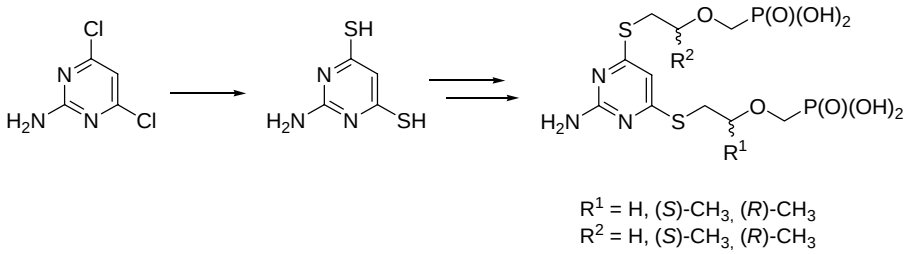


Schéma 4. Syntéza bisfosfonátů odvozených od 2-amino-4,6-disulfanylpyrimidinu.

V druhé části mé práce jsem připravila 2-[(hydroxy)(fosfonomethyl)fosforylmethoxy]-ethyl puriny (A, G) a pyrimidiny (C, U, T), chemicky a enzymaticky stabilní analoga acyklických difosfátů nukleosidů. Alkoholy nesoucí fosfonomethylfosfinylovou skupinu byly připraveny Arbuzovovou reakcí tetraisopropyl methylendifosfonitu s acetyl alkyl bromidy a alkyl jodidy a následným odchráněním acetylové skupiny. Vhodně ochráněné heterocyklické báze byly alkylovány připravenými alkoholy Mitsunobuovou reakcí (Schéma 5).

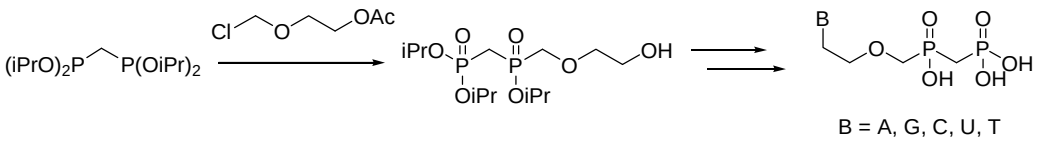


Schéma 5. Syntéza acyklických fosfonomethylfosfinátů nukleosidů.

Dále byla připravena acycklická analoga dUDP obsahující fosfonomethylfosfinyl-alkylovou a alkoxylovou skupinu výše popsanou metodou. Tyto látky byly převedeny reakcí s 1,1'-karbonyldiimidazolem (CDI) a následnou reakcí s tri-*n*-butylammonium fosfátem na analoga dUTP, nicméně rozvětvené fosfáty byly izolovány jako hlavní produkt (Schéma 6). ^{31}P NMR studie průběhu reakce ukázala, že v reakci vzniká směs obou, tj. rozvětveného a lineárního, fosfátu. Intramolekulární migrace fosfátu nebyla pozorována. Hodnoty pKa fosfonátové a fosfinátové skupiny byly stanoveny pomocí ^{31}P NMR spektroskopie, tyto hodnoty jsou 2.7 a 1.8 a jasně ukazují, že obě skupiny mohou reagovat s CDI a tri-*n*-butylammonium fosfátem.

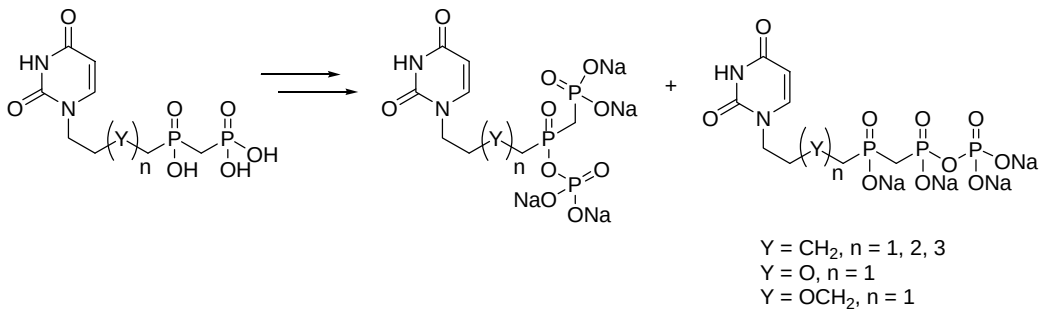


Schéma 6. Syntéza analogů dUDP and dUTP obsahujících fosfonomethylfosfinátovou skupinu.

Závěr

V rámci rozsáhlé studie acyklických fosfonátů nukleosidů s otevřeným imidazolovým kruhem byla připravena série bisfosfonátů strukturně odvozená od 2-amino-4,6-(dihydroxy)-pyrimidinu. Bisfosfonáty nesoucí dva stejné nebo různé fosfonoalkoxylové řetězce byly připraveny nukleofilní aromatickou substitucí 2-amino-4,6-dichlorpyrimidinu nebo alkylací 4,6-dihydroxy-2-(methylsufanyl)pyrimidinu. Druhá metoda se ukázala jako univerzální pro přípravu široké škály různě substituovaných pyrimidinových derivátů. Methylsufanylová skupina je vhodná odstupující skupina pro zavedení substituentů do polohy 2 pyrimidinového kruhu. Lipofilní estery bisfosfonátů byly připraveny pro zvýšení biologické dostupnosti látek, avšak tyto estery výrazně snížily jejich rozpustnost. Enantiomerní čistota vybraných bisfosfonátů byla stanovena pomocí kapilární zónové elektroforézy a bylo potvrzeno, že při přípravě opticky aktivních fosfonátů nedochází k racemizaci.

Připravené bisfosfonáty a jejich estery byly podrobeny testování na cytostatickou a protivirovou aktivitu, nicméně protivirová aktivita bisfosfonátů nebyla prokázána.

V druhé části mé práce byla připravena acyklická analoga difosfátů nukleosidů s purinovými a pyrimidinovými bázemi a dále analoga dUDP a dUTP nesoucí fosfonomethylfosfinátovou skupinu. Reakce analogů dUDP s CDI a tri-*n*-butylammonium fosfátem poskytla přednostně rozvětvené fosfáty místo očekávaných lineárních analogů dUTP. ^{31}P NMR studie průběhu fosforylační reakce a stanovení pKa fosfonomethyl-fosfinátové skupiny ukázaly, že fosfonátová i fosfinátová hydroxylová skupina reaguje s CDI a tri-*n*-butylammonium fosfátem za vzniku směsi rozvětveného a lineárního fosfátu.

Všechny připravené fosfonomethylfosfináty byly podrobeny testování na cytostatickou a protivirovou aktivitu, avšak záměna fosfonátu za fosfonomethylfosfinátovou skupinu vedla ke ztrátě biologické aktivity látek. Analoga dUDP a dUTP neinhibují dUTPasu *Mycobacteria tuberculosis*.

Získaná data ukazují, že fosfonomethylfosfinátový systém není vhodným analogem přirozeného difosfátu v nukleotidech. To může být způsobeno rozdílem mezi pKa difosfonátu a přirozeného fosfátu, geometrickými rozdíly mezi C–P a C–O vazbou a rozdíly ve schopnosti komplexovat ionty kovů.

References/Seznam citací

1. a) De Clercq E., Holý A.: *Nature Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 928; b) Holý A.: *Curr. Pharm. Des.* **2003**, 9, 2567; c) Khandazhinskaya A., Yasko M., Shirokova E.: *Curr. Med Chem.* **2006**, 13, 2953; d) De Clercq E.: *Biochem. Pharmacol*. **2007**, 73, 911.
2. Holý A., Votruba I., Masojídková M., Andrei G., Snoeck R., Naesens L., De Clercq E., Balzarini J.: *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1918.
3. a) Hocková D., Holý A., Masojídková M., Andrei G., Snoeck R., De Clercq E., Balzarini J.: *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5064; b) Hocková D., Holý A., Masojídková M., Andrei G., Snoeck R., De Clercq E., Balzarini J.: *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 3197; c) Balzarini J., Schols D., Van Laethem K., De Clercq E., Hocková D., Masojídková M., Holý A.: *J. Antimicrob. Chemother*. **2007**, 59, 80.
4. Doláková P., Dračínský M., Masojídková M., Šolínová V., Kašička V., Holý A.: *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, in press.
5. Doláková P., Dračínský M., Fanfrlík J., Holý A.: *Eur. J. Org. Chem*. **2008**, submitted.
6. a) El-Hajj H. H., Zhang H., Weis B.: *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 1069; b) Gadsen M. H., McIntosh E. M., Game J. C., Wilson P. J., Haynes R. H.: *EMBO J*. **1993**, 12, 4425; c) Hidalgo-Zarco F., González-Pacanowska D.: *Curr. Protein Pept. Sci.* **2001**, 2, 389; d) Bertani L. E., Häggmark A, Reichard P.: *J. Biol. Chem.* **1961**, 236, 67; e) Shlomai J., Kornberg A.: *J. Biol. Chem.* **1987**, 253, 3305; f) Richie T. L., Saul A.: *Nature* **2002**, 694.