

Synthesis and biological evaluation of organometallic thymidine analogues as inhibitors of thymidine kinases

Doctoral Thesis

Author(s):

Netter, Martina

Publication date:

2004

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004717137>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH No. 15329

Synthesis and Biological Evaluation of Organometallic Thymidine Analogues as
Inhibitors of Thymidine Kinases

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Science

presented by

MARTINA NETTER

Mag.pharm./University of Vienna

born 12.11.1972

in Vienna/Austria

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. P.A. Schubiger, examiner
Prof. Dr. L. Scapozza, co-examiner

2004

Summary

As long as conventional treatment modalities for cancer, such as surgery, chemotherapy and radiotherapy, still fail to cure a significant number of patients, it is necessary to investigate new techniques and methods, respectively. In suicide gene therapy of cancer, a new technique has been found, which could be considerably improved by using nuclear medicine imaging techniques for verifying the successful expression of transferred genes into the tumour cells. Radiolabelled nucleosides, especially thymidine derivatives, are particularly suitable for the imaging of reporter genes, consisting of the Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase (HSV-1 TK).

In the present work the functionalisation of thymidine for labelling with the $[M(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ($M = {}^{99\text{m}}\text{Tc}$, Re) precursor on the 5' position of the sugar moiety was performed. The synthetic strategy was guided by the structures of potent inhibitors of HSV-1 TK with K_i values in the nanomolar range. These inhibitors are carboxamide derivatives of 5'-amino-2',3'-dideoxy-5-ethyl-uridine, with different bulky, aromatic entities. Derivatisation, on other positions than 5' of thymidine, with a space-demanding residue, like a metallo tricarbonyl core, is not advisable, because the active site of HSV-1 TK is precisely designed for thymidine and purine analogues. The only available, sufficient space exists in the binding pocket of ATP. Thus, a series of 5'-carboxamide derivatives of 5' amino thymidine with glycyl, propyl, butyl, hexyl, undecyl, eicosyl, and hydroxy-butyl and phenyl-butyl spacers and imino diacetic acid (IDA) or picolylamino monoacetic acid (PAMA) chelating moieties were synthesized. The thymidine derivatives were reacted in aqueous solution with the organometallic precursor $[M(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ($M = {}^{99\text{m}}\text{Tc}$, Re). The corresponding anionic complexes and one neutral complex have been fully characterized by means of ^1H , ^{13}C NMR, HPLC, MS and EA. 1D and 2D NMR experiments confirmed clearly the tridentate coordination of the metallo-tricarbonyl centre via the IDA chelate and the PAMA chelate, respectively.

Internalisation studies with five different human cancer cell lines revealed uptake of a ${}^{99\text{m}}\text{Tc}-(\text{CO})_3$ -thymidine-complex with a spacer with 10 methylene groups of 3.0 ± 1.1 % (Caki-2), 4.9 ± 1.3 % (GW), 3.6 ± 1.1 % (HT-29), 8.9 ± 3.2 % (PC-3) and 1.3 ± 0.6 % (CRL-8303 TK negative). However, the experiments indicated an uptake via passive diffusion and not, as expected, by the nucleoside transport system, because no inhibitions of the uptake by

nucleoside transport inhibitors (dipyridamole and nitrobenzylthioinosine (NBMPR)) could be observed. [³H]thymidine uptake was used as a positive control and the uptake could be inhibited by NBMPR and dipyridamole, as expected, but also and unexpected, with the corresponding non-radioactive Re-complex. The water-soluble Re complex revealed the same inhibitory activity as the potent, but highly lipophilic nucleoside transport inhibitor NBMPR.

The organometallic tricarbonyl thymidine complexes were preliminary screened by HPLC for their inhibitory activity against HSV-1 TK and human cytosolic thymidine kinase (hTK1). No inhibitory effect against HSV-1 TK was observed, the only exception was a complex with an eicosyl spacer, whereas all complexes inhibited hTK1.

Enzyme kinetic studies with all inhibitory active compounds revealed competitive inhibition exclusively for the hTK1 with K_i values in a range of 7-334 μM . One exception was found with a complex, consisting of an eicosyl spacer, which inhibits the HSV-1 TK with a K_i value of $1.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ competitively. Extensions of the spacer (more than 11 methylene groups), is obviously necessary to inhibit HSV-1 TK. This is to our knowledge the first time, that organometallic thymidine derivatives revealed such a "reversed" selectivity exclusively for hTK1.

This work presents new insights into the differences between the mammalian enzyme hTK1 and the viral enzyme HSV-1 TK. The structure - activity relationship were investigated and the inhibitory activity towards hTK1 was improved. The application of inhibitors of hTK1 as proliferation markers can be investigated now, by using these new organometallic thymidine analogues, which are internalised into cancer cell lines. Additionally, one compound was synthesised and evaluated which was found to be an inhibitor of HSV-1 TK. Further increase of the inhibitory activity as well as the selectivity may lead to an imaging probe for reporter gene imaging of the HSV-1 TK gene expression for use in suicide gene therapy.

Zusammenfassung

Konventionelle Behandlungsmethoden von Krebs, wie z.B. operative Entfernung des Tumors, Chemotherapie oder Radiotherapie sind immer noch weit davon entfernt eine signifikante Anzahl von Patienten zu heilen. Es ist daher notwendig, neue Techniken bzw. Methoden zu erforschen und zu verbessern. Eine neue Technik, die suizide Gentherapie, kann beispielsweise erheblich verbessert werden, indem man, mit nuklearmedizinischen, bildgebenden Methoden, die Genexpression in der Zielzelle bzw. Tumorzelle, überwacht. Radiomarkierte Nukleoside, wie z.B. Thymidinderivate, eignen sich hervorragend, um Reporter Gene, wie z.B. das Herpes Simplex Virus Typ 1 Thymidine Kinase (HSV-1 TK) Reporter Gen, indirekt zu markieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde Thymidin so funktionalisiert, dass es mit dem Prekursor $[M(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ($M = {}^{99\text{m}}\text{Tc}$, Re), an der 5' Position des Zuckerringes markiert werden kann. Unsere Synthesestrategie wurde von bekannten, potenten Inhibitoren der HSV-1 TK geleitet, die K_i Werte im nanomolaren Bereich besitzen. Diese Inhibitoren sind Carboxamidderivate von 5'-Amino-2',3'-dideoxy-5-ethyl-Uridin, mit unterschiedlich, grossen, aromatischen Resten. Die Derivatisierung des Thymidins an einer anderen Stelle, als 5', mit einem sperrigen Rest, wie dem Re- oder Tc-Tricarbonyl Komplex, wäre nicht ratsam, da die Bindungsstelle des Enzyms genau an die Grössen von Pyrimidin- bzw. Purinderivaten angepasst ist. Der einzig verfügbare Platz liegt in der Bindungsstelle des ATP. Es wurde daher eine Serie von 5'-Carboxamidderivaten hergestellt, die aus Glycyl-, Propyl-, Butyl-, Undecyl-, Eicosyl-, sowie Hydroxybutyl- oder Phenylbutylspacern und einem Imino-diessigsäure (IDA) oder Picolylaminmonoessigsäure (PAMA) Chelatsystem aufgebaut sind. Diese Thymidinderivate wurden in wässriger Lösung mit dem organometallischen Prekursor $[M(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ($M = {}^{99\text{m}}\text{Tc}$, Re) umgesetzt und die entsprechenden anionischen Komplexe, sowie ein Neutralkomplex, wurden mittels ^1H , ^{13}C NMR, HPLC, MS und EA charakterisiert. 1D und 2D NMR Experimente bestätigten eindeutig die tridentate Koordination des Metall-tricarbonyls mit dem IDA- bzw. dem PAMA Chelator.

Internalisierungsstudien mit fünf verschiedenen menschlichen Krebszelllinien, zeigten eine Aufnahme eines ${}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ Thymidin Komplexes mit einem Spacer mit 10 Methylen Gruppen von $3,0 \pm 1,1$ % (Caki-2), $4,9 \pm 1,3$ % (GW), $3,6 \pm 1,1$ % (HT-29), $8,9 \pm 3,2$ % (PC-3) und $1,3 \pm 0,6$ % (CRL-8303 TK negativ). Der Komplex wurde wahrscheinlich durch passive Diffusion aufgenommen und nicht, wie erwartet durch das Nukleosid

Transportsystem, da die Internalisierung nicht durch Inhibitoren des Nukleosid Transporters (Dipyridamol und Nitrobenzylthioinosin (NBMPR)) blockiert werden konnte. Die Zellaufnahme von [³H]Thymidin wurde parallel als Positivkontrolle getestet und konnte mit Dipyridamol und NBMPR inhibiert werden, aber unerwarteterweise trat eine Inhibition auch mit dem entsprechenden, nicht radioaktiven Re Komplex auf. Der wasserlösliche Re Komplex zeigte dieselbe inhibitorische Aktivität wie NBMPR, ein starker Inhibitor des Nukleosidtransportsystems, welcher jedoch sehr lipophile Eigenschaften besitzt.

Die organometallischen Tricarbonyl Thymidin Komplexe wurden vorerst, mittels HPLC, auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber HSV-1 TK und humaner cytosolischer Thymidinkinase (hTK1) getestet. Erstaunlicherweise konnte keine Inhibition der HSV-1 TK festgestellt werden, mit einer Ausnahme: ein Komplex mit einem Eicosyl Spacer. Alle Komplexe inhibierten exklusiv hTK1.

Studien zur Enzym Kinetik, die mit allen inhibitorisch aktiven Komplexen durchgeführt wurden, zeigten ausschliesslich gegenüber hTK1 kompetitive Inhibition mit K_i Werten zwischen 334 -7 μ M. Die einzige Ausnahme bildete der Komplex mit dem Eicosyl Spacer, der die HSV-1 TK mit einem K_i Wert von $1.6 \pm 0.3 \mu$ M kompetitiv inhibierte. Eine Verlängerung des Spacers (länger als 10 Methylen Gruppen) ist offensichtlich notwendig, um eine Inhibition der HSV-1 TK zu erreichen. Nach unserem Wissensstand ist dies das erste Mal, dass organometallische Thymidinderivate eine solch umgekehrte Selektivität, ausschliesslich gegenüber der hTK1 zeigen.

Mit Hilfe dieser Arbeit können neue Einblicke in die Unterschiede zwischen dem humanen Enzym hTK1 und dem viralen Enzym HSV-1 TK gewährt werden. Die Struktur-Aktivitätsbeziehungen verschiedener organometallischer Thymidinkomplexe wurde erforscht. Zukünftige organometallische Tricarbonyl Thymidin Komplexe könnten mithelfen die Behandlungsmethoden von Krebs deutlich zu verbessern.